



绒山羊表达红色荧光及转胰岛素样生长因子 基因体细胞核移植胚胎的制备

郭旭东^①, 杨东山^②, 奥旭东^①, 吴侠^①, 李光鹏^①, 王玲玲^①, 宝明涛^①, 雪莲^①, 旭日干^{①*}

① 内蒙古大学, 哺乳动物生殖生物学及生物技术教育部重点实验室, 呼和浩特 010021;

② 中国科学院, 广州生物医药与健康研究院, 广州 510663

* 联系人, E-mail: xurg@cae.cn

收稿日期: 2008-04-11; 接受日期: 2008-06-27

国家高技术研究发展计划(批准号: 2002 AA242061)、内蒙古自治区自然科学基金(批准号: 200607010405)、内蒙古自治区高等学校科学研究项目(批准号: NJ06055)资助

摘要 利用含有红色荧光和*Neo^r*基因双选择标记的IGF1 毛囊特异表达载体pCDsR-KI 转染绒山羊胎儿成纤维细胞, 经G418 筛选获得具有红色荧光的IGF1 转基因细胞. 核移植操作前, 通过比较卵母细胞体外成熟培养不同时间的成熟率以及核与极体的距离, 确定 20 h 为绒山羊卵母细胞的最佳成熟时间. 比较了不同激活方法和培养体系对孤雌胚激活效率和孤雌胚早期发育的影响, 结果表明: IA23187+6-DMAP组的激活效率和囊胚率(88.7%&21.6%)均稍高于乙醇+6-DMAP组(86.4%&20.4%), 但二组相应数据之间差异均不显著($P>0.05$), 选择前者作为转基因核移植胚的激活方案; SOFaa和CR1aa 两种体外培养体系中, 孤雌胚卵裂率(86.8%vs83.9%)和囊胚率(23.1%vs17.2%)均差异不显著($P>0.05$), 选择结果较好的SOFaa组. 比较了不同电融合参数的融合效果, 结果表明: 190 V/mm处理组结果(62.4%)显著高于 130 V/mm(32.8%)和 200 V/mm(42.9%)组($P<0.05$). 通过T-SCNT获得转基因重构胚胎 203 枚, 48 h 卵裂率为 79.3% (161/203), 第 7~9 天囊胚发育率为 15.3% (31/203). 所得到的 31 枚囊胚中, 较强表达红色荧光蛋白的囊胚数为 17 枚(阳性率为 54.8%). 随机挑选两枚红色荧光囊胚以PCR法进行鉴定, 结果全部为转基因阳性. 以上结果显示: (i) 表达载体的红色荧光蛋白和*Neo^r*基因可以正常表达可获取转基因细胞和阳性转基因胚胎; (ii) 所制备转基因囊胚仍有部分不表达红色荧光蛋白, 说明即使选择转基因阳性细胞进行核移植所得囊胚也并非全部为转基因阳性, 在囊胚期进一步筛选是必要的; (iii) 通过TSCNT操作及优化, 成功获得了表达红色荧光并同时转有IGF1 基因的绒山羊胚胎, 为绒山羊的转基因研究提供基础数据.

关键词

绒山羊
胰岛素样生长因子
毛囊
胎儿成纤维细胞
转基因
体细胞核移植

内蒙古白绒山羊(以下简称绒山羊)是我国在蒙古山羊的基础上经过长期选育而形成的绒、肉兼用型

地方良种^[1]. 绒山羊的毛被主要由髓质发达的粗毛和无髓的绒毛两类纤维组成, 与之相应的皮肤毛囊也

分为两类: 初级毛囊和次级毛囊, 此种毛被称为异质毛被^[2]. 羊绒就是由次级毛囊衍生的无髓细绒毛. 优良的绒山羊个体所产羊绒品质好、绒纤维细度仅在 13~16 μm 之间, 产绒量也较高^[3]. 但目前绒山羊的养殖普遍存在着个体性能退化、平均产绒量降低、良种和杂交改良品种所占比例不高等问题, 急需以现代生物技术进行二次选育和品种改良. 转基因技术为家畜优良品种的培育提供了全新的技术手段. 而 20 世纪 90 年代后期, 体细胞核移植技术的(somatic cell nuclear transfer, SCNT)^[4]的成功, 又极大地促进了转基因技术在农畜动物中的研究进程. 转基因体细胞核移植方法(transgenic somatic cells nuclear transfer, TSCNT)正成为制备转基因家畜的主要技术路线^[5-8]. 这为利用转基因技术探索进行绒山羊优良品种的培育提供了技术保障.

近年来在我国以 TSCNT 方法制备转基因家畜的研究日益增多. 已经有多家研究机构报道通过该方法获得了转基因牛^[9,10]和山羊^[11,12]等畜种. 然而, 目前大部分转基因家畜的研究焦点仍集中在乳腺生物反应器(mammary gland bioreactor)领域. 在绒用山羊或细毛羊, 以改良绒、毛品质为目的转基因研究资料非常有限. 有研究证明, 胰岛素样生长因子 (insulin like growth factor 1, IGF1) 在毛囊细胞的发育和生长周期中起重要的调控作用^[13]. Damak 等人^[14]曾利用 IGF1 构建毛囊特异表达载体, 在转基因美利奴绵羊中获得了羊毛平均增产 6.2% 的结果. 但是尚未见到以转基因技术探讨细胞因子对绒山羊毛囊周期产生影响的研究报道.

本研究以 IGF1 毛囊特异表达载体 pCDsR-KI 转染的绒山羊胎儿成纤维细胞(caprine fetal fibroblast cells, CFFCs)作为核供体, 与体外成熟培养的绒山羊卵母细胞构建转基因核移植胚胎, 为获得转基因绒山羊、研究 IGF1 在其毛囊发育和生长周期中的调控作用提供基础.

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

绒山羊胎儿及卵巢等材料取自鄂尔多斯达拉特旗四季青屠宰场.

DMEM/F12 培养基、G418(Geneticin sulphate)为 Gibco 公司产品; M199、牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)、胰蛋白酶(Trypsin)、透明质酸酶(Hyaluronidase)、6-DMAP(6-Dimethylamino Purine)、细胞松弛素 B(Cytochalasin B, CCB)、Hoechst33342、IA23187 均为 Sigma 产品. 无机盐类、DMSO 及 D-PBS 为日本和光试剂产品; 标准胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)为 TBD 产品. 35, 60 和 100 mm 培养皿均购自 Corning 公司; 细胞四孔培养板等耗材为 Nunc 产品; 分子生物学常规试剂购自宝生物工程(大连)有限公司; PCR 引物合成委托上海生工生物工程公司; 玻璃器皿为国产.

细胞培养液为添加 10%FBS 和 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青霉素、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 DMEM/F12 (pH 7.4); 体细胞消化液为含有 0.25% Trypsin, 0.02% EDTA 的 PBS 溶液 (pH 7.4); 采卵液为添加金属盐离子 (Ca^{2+} , Mg^{2+})、5.5 mmol/L 葡萄糖、0.32 mmol/L 丙酮酸钠、1% FBS 以及 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青霉素、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 PBS 溶液 (pH 7.4); 卵母细胞成熟液为含有 10% 发情羊血清 (OSS)、0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 雌二醇 (E2)、0.04 IU/mL 卵泡刺激素 (FSH)、0.8 IU/mL 垂体促黄体生成素 (LH) 的 M199 溶液; 显微操作液为含有 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 细胞松弛素 B (CCB)、10%FBS、HEPES 缓冲的 M199 溶液; 融合液为含有 0.25 mol/L 甘露醇, 0.1 mmol/L 氯化钙, 0.1 mmol/L 氯化镁, 0.5 mmol/L HEPES 以及 0.01% BSA 组成; 胚胎培养液为: SOFaa+6mg/mLBSA 或 CR1aa+6mg/mLBSA 和 SOFaa+4%FBS 或 CR1aa + 4%FBS+卵丘细胞共培养体系.

1.2 转基因供体细胞的制备

(1) IGF1 毛囊特异表达载体的分子构建. 利用绵羊角蛋白关联蛋白(keratin associated protein)KAP6-1 基因启动子区序列指导绵羊 IGF1 cDNA 构建毛囊特异性载体, 同时线性连接由 CMV 启动子引导的红色荧光蛋白(pDsRed2)基因和 SV40 启动子引导的新霉素抗性(Neo^r)基因构成双选择性标记(图 1).

(2) 原代绒山羊胎儿成纤维细胞(CFFCs)通过组织块贴附的方法^[15]进行分离培养和冷冻保存. 以脂质体介导方法转染线性化质粒 pCDsR-KI 至第 2 代

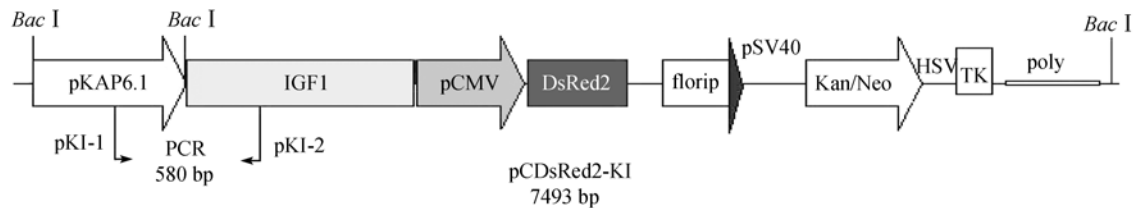


图1 IGF1毛囊细胞特异表达载体的线性结构

CFFCs, 以 800 $\mu\text{g/mL}$ G418 作为抗性筛选的浓度, 在 DMEM/F12+10%FBS 培养液、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度条件下连续培养 12~15 天以筛选出表达红色荧光的转基因细胞克隆。所获得转基因细胞以常规方法冷冻保存。

(3) 在二十四孔板中, 将冷冻保存的、转 *pCDsR-KI* 基因的 CFFCs 解冻并按照一定浓度梯度、以 DMEM/F12+10%FBS+300 $\mu\text{g/mL}$ G418 培养液培养。待细胞生长汇合时即可作为细胞核供体。核移植前, 经细胞消化液消化、悬浮和收集的体细胞重新以核移植操作液 50 μL 悬浮, 室温静置 0.5~1 h 后用于核移植操作。

1.3 卵母细胞的体外成熟和去卵丘细胞处理

采自当地屠宰场的绒山羊卵巢, 置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 左右无菌生理盐水中, 3~3.5 h 内运回实验室。在室温条件下用生理盐水清洗卵巢 2~3 次, 室温下放置 3~4 h。采卵时, 将卵巢直接浸入盛有采卵液的 90 mm 玻璃培养皿中, 用无菌手术刀片在采卵液中切开 1~5 mm 大小的卵泡, 使之释放出卵泡液和卵丘-卵母细胞复合体(cumulus oocyte complexes, COCs)。挑选形态良好, 卵丘细胞包裹完整、致密并带有 2~3 层卵丘细胞的 COCs, 用玻璃细管在卵母细胞成熟液中洗 3 遍, 按 30~50 个 COCs 每孔置于含 1 mL 卵母细胞成熟液的四孔培养板中, 在 38.5 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 和饱和湿度条件下分别成熟培养 18~24 h。

将成熟培养 18~24 h 的 COCs 移入含有 0.25% 透明质酸酶的卵母细胞成熟液, 利用 200 μL 移液器反复吹打多次以去除卵丘细胞, 挑选形态饱满、细胞质均匀并且具有第一极体排放的成熟卵母细胞用于下一步操作。

1.4 利用孤雌卵优化选择激活和体外发育条件

(1) 将成熟去卵丘的卵母细胞置入含有 7% 乙醇

的成熟液中激活 7 min, 然后在含 2 mmol/L 6-DMAP 的 SOFaa 发育液中 38.5 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 和饱和湿度条件下培养 4 h, 用发育液洗 3 次, 放入含有 500 μL 相应发育培养液(SOFaa+6 mg/mL BSA 或 CR1 aa+6 mg/mL BSA)的四孔板中, 在 38.5 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 和饱和湿度条件下培养, 48 h 后检查卵裂率; 然后在相应发育培养液(SOF aa+4%FBS 或 CR1 aa+4%FBS+卵丘细胞共培养体系), 38.5 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度条件下培养。发育至第 7、8 和 9 天时取出, 观察和统计囊胚发育率。

(2) 将成熟去卵丘的卵母细胞置入含 5 $\mu\text{mol/L}$ IA23187 的 SOFaa 中激活 5 min, 然后在含 2 mmol/L 6-DMAP 的 SOFaa 培养液中, 在 38.5 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 和饱和湿度条件下培养 4 h, 用发育培养液洗 3 次, 放入含 500 μL 相应发育培养液(同上)的四孔板中, 在 38.5 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 和饱和湿度条件下培养, 48 h 后检查卵裂率; 然后在相应发育培养液(同上), 38.5 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度条件下培养。发育第 7、8 和 9 天时分别观察, 统计囊胚发育率。

1.5 卵母细胞的去核及注核操作

将去卵丘处理的卵母细胞置于含有 5 $\mu\text{g/mL}$ Hoechst33342 荧光染料的成熟液中处理 3 min, 用成熟液洗 3 次, 然后将其置于显微操作液中, 再加入适量的转基因核供体细胞, 在显微操作仪下进行去核和注核的操作。去核时先将第一极体置于钟表 5 点的位置, 然后短暂开启荧光激发器, 将光栅置于 UV 处, 看清核的位置以后, 立刻以光栅挡住荧光光路, 用内径 20~25 μm 的去核针从相当于钟表 4 点位置处进针、吸出卵母细胞核及第一极体, 打开荧光光路检查去核是否成功(荧光检查不超过 5 s), 然后将光栅置于红荧光滤光片处, 挑选形态良好、直径约 20 μm 的红色荧光细胞, 从去核处将其注射到去核卵母细胞透

明带下。

1.6 供体-卵母细胞复合体最佳融合条件的选择

将核移植操作后的卵母细胞-供体细胞复合体, 用成熟液洗 3 次, 在 38.5℃, 5%CO₂和饱和湿度条件下恢复培养 0.5~1 h. 电融合操作: 先将待融合的卵母细胞-供体细胞复合体在融合液中平衡 1~2 min, 然后转入极间距为 1.5 mm 盖有融合液的融合槽中, 用吸管调整方向, 使卵母细胞-供体细胞接触面与两极平行, 分别设计 3 组不同的融合参数进行电融合操作. 按每次 20 个重构卵操作完成后, 以成熟液洗 3 次, 再放入成熟液滴、置 CO₂ 培养箱中恢复 30 min 后检查融合情况, 比较 3 组电融合参数之间的融合率. 3 组电融合参数, A: 在电极之间通以单个直流脉冲, 电压 130 V/mm, 脉冲时长 40 μs; B: 在电极之间通以两个直流脉冲, 电压为 190 V/mm, 脉冲时长 20 μs, 脉冲间隔 100 ms; C: 在电极之间通以两个直流脉冲, 电压为 200 V/mm、脉冲时长 20 μs、脉冲间隔 100 ms.

1.7 重构卵的激活与体外培养

重构卵的激活操作与上述孤雌卵的激活步骤相同. 将激活处理的重构胚胎在优选后的体外培养体系, 38.5℃, 5% CO₂, 饱和湿度条件下进行培养, 至第 7, 8 和 9 天时统计囊胚发育率.

1.8 转基因胚胎的 PCR 鉴定

以预先设计的 DNA 表达载体为模板, 在 *KAP6-1* 基因启动子 3' 末端和 *IGF1* 基因 5' 端连接处大约 580 bp 区域设计一对特异性 PCR 引物 pKI-1, pKI-2(图 1).

荧光显微镜下随机挑选 2 枚表达红色荧光的转基因囊胚, 分别放入装有 10 μL 六蒸水的 PCR 管中, 应用液氮和 37℃ 水浴反复冻融 2~3 次, 然后以冻融液为模板, 以合成的特异性鉴定引物(pKI-1, pKI-2)进行 PCR 反应. 分别设置以转基因表达载体 pCDsR-KI 质粒为模板的阳性对照和 2 枚孤雌发育囊胚为模板的阴性对照.

2 结果

2.1 不同培养时间对于卵母细胞体外成熟和发育的影响

卵母细胞经成熟培养 18, 20 和 24 h 后, 18 h 组成

熟率为 67.1%(51/76), 20 h 组成熟率为 80.6% (79/98), 24 h 组成熟率为 82.2% (83/101). 数据经过统计分析表明, 20 和 24 h 组的成熟率显著高于 18 h 组的成熟率(χ^2 检验, $P<0.05$). 后续发育结果显示, 18, 20 和 24 h 3 组之间卵裂率和囊胚发育率差异均不显著 ($P>0.05$).

进一步 Hoechst33342 染色观察, 发现 24 h 组卵细胞核与极体的距离比 18 和 20 h 组变大. 因此做核移植时, 把体外成熟时间确定为 20 h. 所培养时间和卵母细胞成熟及孤雌激活后发育关系数据见表 1.

2.2 不同激活条件和发育培养体系对孤雌胚胎发育的影响

两种孤雌激活方法处理成熟卵母细胞 48 h 卵裂率和囊胚发育率分别为: (1) 乙醇+6-DMAP组 86.4% (89/103), 20.4% (21/103); (2) IA23187 + 6-DMAP组 88.7% (205/231), 21.6% (50/231). 两组间激活率和囊胚发育率差异均不显著(χ^2 检验, $P>0.05$). 但是以 IA23187 激活组的激活效率和后续发育较好, 因此选择 IA23187+ 6-DMAP 组激活方法作为绒山羊核移植重构胚的激活方案(表 2).

在 SOFaa 和 CR1aa 两种培养体系内培养以 IA23187+6-DMAP 激活的孤雌胚胎. 48 h 后统计卵裂率: SOFaa 组为 86.8%(105/121); CR1aa 组为 83.9% (73/87). 体外培养 7~9 天后统计发育率为: SOFaa 组为 23.1% (28/121); CR1aa 组为 17.2% (15/87). 统计分析, 卵裂率和囊胚发育率两组之间差异均不显著(χ^2 检验, $P>0.05$). 但实验结果表明, SOFaa 培养体系对绒山羊孤雌胚胎的体外发育效果更好(表 3). 因此, 转基因重构胚的体外培养选择 SOFaa 培养体系.

2.3 不同电融合条件之间的比较及最佳选择

3 组不同的电融合条件下进行绒山羊重构胚的融合结果为: 130 V/mm 处理组融合率为 32.8% (22/67), 190 V/mm 处理组融合率为 62.4% (58/93), 200 V/mm 处理组融合率为 42.9% (18/42). 其中以 190 V/mm 处理组(融合参数为 190 V/mm, 两次直流脉冲、20 μs/次, 间隔 100 ms)的融合效果最好, 融合率显著高于 130 和 200 V/mm 组(χ^2 检验, $P<0.05$)(表 4).

2.4 转基因胚胎的体外发育

本研究共获得可供体外发育培养的转基因重构胚胎 203 枚, 48 h 卵裂率为 79.3%(161/203), 第 7~9 天囊胚发育率为 15.3% (31/203). 所得到的 31 枚囊胚中, 经荧光显微镜检测筛选, 较强表达红色荧光蛋白的囊胚数为 17 枚(阳性率为 54.8%). 而且在荧光显微镜下观察发现, 阳性胚胎之间红色荧光蛋白的表达也有一定的强弱差异(图 2(C)和(D)).

2.5 转基因胚胎的 PCR 鉴定

PCR 反应结果显示, 两枚转基因荧光囊胚的 PCR 产物均在大约 580 bp 处出现清晰明亮的单一条带, 与预期 PCR 产物的分子量大小相符, 而孤雌囊胚 PCR 反应则没有在该区域出现条带(图 3). 这一结果

表明, pCDsR-KI 表达载体已经被成功整合到了两个红色荧光转基因囊胚的染色体基因组中.

3 讨论

卵母细胞的成熟实际上是一个复杂的生理生化过程. 在性激素信号刺激下, 卵泡卵母细胞核内部发生一系列的变化, 核膜发生破裂(germinal vesicle break down, GVBD)、恢复减数分裂机制并继续完成核内染色体的减数分裂、染色体凝聚, 进而排出第一极体, 此时的卵母细胞处于第 2 次减数分裂的中期(M)^[16]. 从形态学上, 判定卵母细胞体外成熟的标志首先是观察到第一极体的存在, 其次是包裹卵母细胞外围的卵丘细胞的扩散和黏稠化^[16]. 王雪红等人^[17]根据不同时间段取样观察细胞核相的方法, 得出山羊卵成熟、并停滞于M 期的时间段为体外培

表 1 体外成熟时间对绒山羊卵母细胞孤雌发育的影响^{a)}

体外成熟时间/h	卵母细胞数/枚	成熟卵母细胞数(%)	孤雌胚胎 2~8 细胞 I(%)	孤雌囊胚数(%)
18	76	51 (67.1) ^a	43 (84.3) ^a	9 (17.6) ^b
20	98	79 (80.6) ^b	71 (89.9) ^a	16 (20.3) ^b
24	101	83 (82.2) ^b	72 (86.7) ^a	15 (18.1) ^b
18~24	275	213 (77.5)	186 (87.3)	40 (18.8)

a) χ^2 检验结果, 同列不同上标之间差异显著($P<0.05$)

表 2 不同激活方案处理卵母细胞孤雌激活率的比较^{a)}

激活方法	处理卵子数/枚	激活卵子数(%)	囊胚数(%)
乙醇+6-DMAP	103	89(86.4) ^a	21(20.4%) ^c
IA23187 + 6-DMAP	231	205(88.7) ^b	50(21.6%) ^d

a) χ^2 检验, a,b之间, c,d之间差异均不显著 ($P>0.05$)

表 3 绒山羊孤雌胚胎在体外不同发育培养液中的发育情况^{a)}

培养液	培养孤雌激活卵数/枚	卵裂(%)	囊胚(%)
SOFaa	121	105(86.8) ^a	28(23.1) ^c
CR1aa	87	73(83.9) ^b	15(17.2) ^d

a) χ^2 检验, a与b, c与d之间差异均不显著 ($P>0.05$). 表中数据为 3 次实验结果的总和

表 4 不同电融合条件下绒山羊重构胚融合率的比较^{a)}

融合参数	融合处理卵数	融合成功数(%)	死卵数(%)
130 V/mm, 单次直流脉冲, 40 μ s/次	67	22 (32.8) ^a	4(5.97) ^c
190 V/mm, 两次直流脉冲, 20 μ s/次, 间隔 100 ms	93	58(62.4) ^b	15(16.1) ^c
200 V/mm, 两次直流脉冲, 20 μ s/次, 间隔 100ms	42	18(42.9) ^a	14(33.3) ^d

a) χ^2 检验, 同列中不同上标之间差异显著 ($P<0.05$)

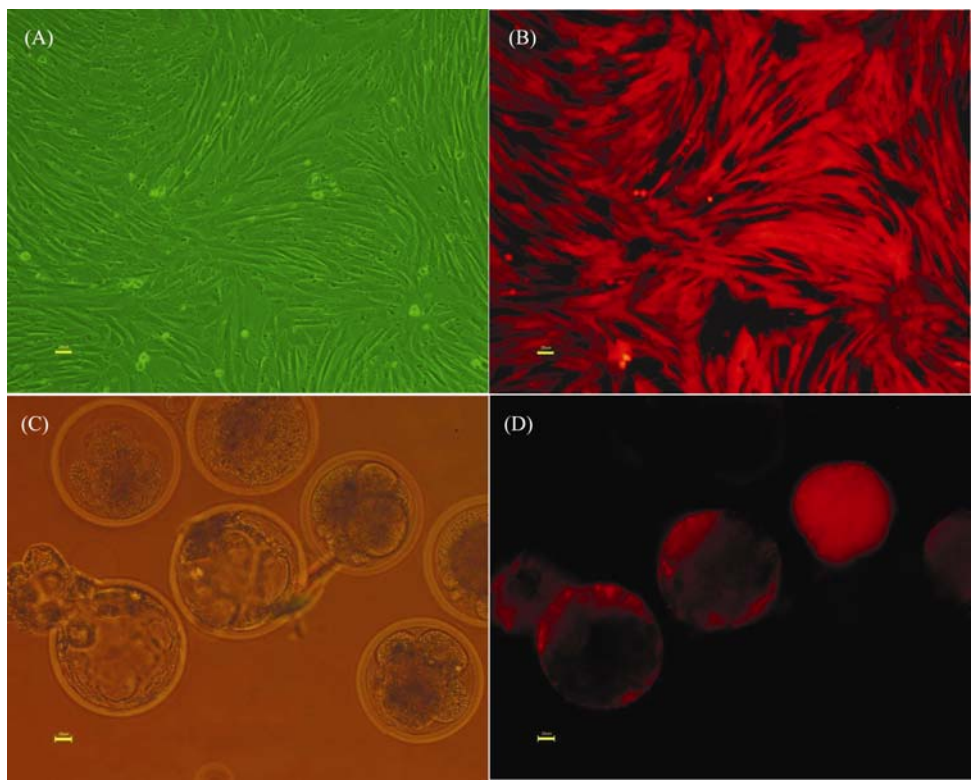


图 2 表达红色荧光的绒山羊转基因成纤维细胞和转基因克隆胚胎

(A),(B) 经扩大培养的 pCDsR-KI 转基因绒山羊胎儿成纤维细胞. (A) 相差显微镜, 100 $\times$; (B) 荧光显微镜, 100 $\times$; (C),(D) 体外发育至第 8 天的转基因克隆囊胚. (C) 可见光、微分干涉; (D) 荧光显微镜, 100 $\times$. 标尺代表 20 μ m

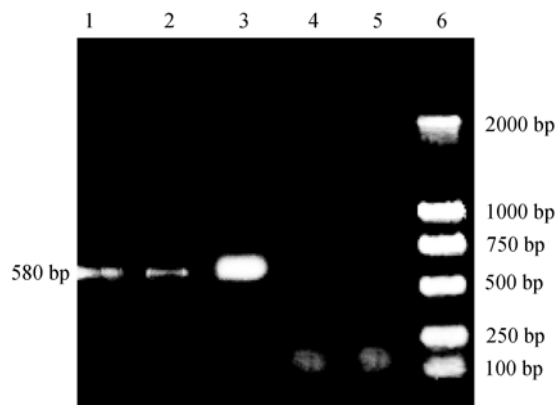


图 3 绒山羊转基因囊胚的 PCR 检测鉴定

泳道 1,2: 转基因克隆囊胚; 泳道 3: pCDsR-KI 阳性对照; 泳道 4,5: 孤雌囊胚检测对照; 泳道 6: DNA 分子量标准 DL2000

养后 17.5~22 h. 根据这个时间段, 同时参照在转基因克隆牛操作中卵母细胞的成熟培养时间~18 h^[10], 分别设定了 3 组不同时间段(18, 20 和 24 h)来研究绒山羊卵母细胞成熟的规律. 结果证明成熟率从小到大

依次为 18, 20 和 24 h(表 1), 并且 18 h 组的成熟率显著低于 20 和 24 h 组($P<0.05$), 而 20 和 24 h 之间差异不显著($P>0.05$). 但是经 Hoechst33342 染色卵母细胞核发现, 24 h 组的细胞核与极体的距离明显比 18 和 20 h 组加大. 因为卵母细胞在成熟后, 随着培养时间的延长, 细胞核又逐渐远离第一极体端^[17]. 因此, 为去核操作方便、增加核移植成功率, 确定 20 h 为核移植时绒山羊卵母细胞体外成熟的最佳培养时间.

以 TSCNT 技术路线生产转基因动物时, 由于把转基因步骤提前到体细胞培养阶段, 因此通过特定的选择性标记可以预先筛选出转基因的体细胞, 再以这种转基因细胞进行核移植操作, 这样理论上获得的胚胎或动物个体应该全部是转基因阳性. 但有文献^[9,18]指出, 以这种技术路线获得的胚胎或动物仍然有一部分是转基因表达阴性的. 获得的转基因核移植囊胚, 也有近 50% 未检测到红色荧光蛋白的表达(荧光显微镜观察结果). 究其原因, 很可能在胚胎

期由于某种原因发生了基因沉默。又或者在某些囊胚中荧光蛋白表达非常微弱以致未达到检测灵敏度。但具体原因还有待于进一步研究。而在具有红色荧光的囊胚中发现其表达强弱也有差异, 这很可能缘于使用的供核体细胞来源于表达红色荧光的多克隆细胞群, 因此其外源基因整合位点并不一致。由这些具有不同整合位点的体细胞所构建的克隆胚胎, 因为位置效应荧光强度就有可能存在差异。

早期胚胎的体外培养是辅助生殖技术(assisted reproductive technology, ART)的一项关键技术环节。目前常用于牛、羊克隆胚胎发育的体外培养体系有 SOFaa^[19], CR1aa^[20], mCR1aa^[21]等。这几种培养液的基本成分大体相同, 主要区别就在于在血清添加量、 $[K^+]$ 和牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)含量等方面^[22]。有研究者指出, 培养液中相对高浓度的 $[K^+]$ 对于胚胎发育是有益的^[23]。刘凤军等人^[22]通过比较认为, SOFaa培养液中 $[K^+]$ 比CR1aa $[K^+]$ 高, 更接近于生理条件下输卵管中 $[K^+]$ 。本研究经过比较 SOFaa和CR1aa两种培养体系对绒山羊孤雌胚胎的发

育效果, 也获得SOFaa培养组其卵裂率和囊胚率均略高于CR1aa培养组(差异不显著, $P>0.05$)的结果。因此选择以SOFaa培养体系作为绒山羊转基因胚胎的体外发育体系。因为发情母羊血清(oestrous goat serum, OGS)的活性成分比常规FBS高, 在IVF胚胎体外发育中可以有效提高胚胎质量和发育率, 曾尝试以OGS替代常规FBS作为转基因胚胎 8-16cell期后的体外培养添加成份, 发育率的确比添加FBS的发育率有所提高(未发表资料)。因此添加OGS有望提高T-SCNT胚胎的体外发育率。这方面详尽的实验数据还需要在今后的研究中进一步补充和完善。

结果表明: (i) 表达载体的红色荧光蛋白和 Neo^r 基因可以正常表达从而使获取转基因细胞和阳性转基因胚胎; (ii) 所制备转基因囊胚仍有部分不表达红色荧光, 说明即使选择转基因阳性细胞进行核移植所得囊胚也并非全部为转基因阳性, 在囊胚期进一步筛选是有必要的; (iii) 通过TSCNT操作及优化, 成功获得了表达红色荧光并同时转有 $IGF1$ 基因的绒山羊胚胎, 为绒山羊的转基因研究提供基础。

致谢 感谢本实验室吴应积教授为本研究提供的红色荧光蛋白 pDsRed2-1(promoterless)载体、王建国副教授在绒山羊外科手术等工作中给予的指导、呼和浩特市刘桂秀女士、内蒙古恩格贝绒山羊生物高技术繁育中心兽医师王海军、袁友良以及鄂尔多斯市达拉特旗兽医站岳永明、杨喜在绒山羊取材等方面提供的帮助、美国公共健康研究所(PHRI)王建英博士和 Karl Drlica 教授的建议。

参考文献

- 1 毛怀志, 岳文斌, 冯旭芳. 绵、山羊品种资源及利用大全. 北京: 中国农业出版社, 2006. 169
- 2 尹长安. 绒山羊饲养与疾病防治. 北京: 中国农业出版社, 2003
- 3 刘晓芳, 张萍, 刘少卿, 等. 内蒙古白绒山羊保种及开发利用的研究与应用. 种业研究, 2005, 6: 35—37
- 4 Wilmut I, Schnieke A E, McWhir W A, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature, 1997, 385: 810—813[DOI]
- 5 Schieke A S, Kind A J, Ritchie W A, et al. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. Science, 1997, 278: 2130—2133[DOI]
- 6 Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J, et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. Science, 1998, 280: 1256—1258[DOI]
- 7 Baquisi A, Behboodi E, Melican D T, et al. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. Nat Biotechnol, 1999, 17: 456—461[DOI]
- 8 Lai L, Kolber-Simonds D, Park K W, et al. Production of alpha-1,3-galactosyl transferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. Science, 2002, 295: 1089—1092[DOI]

- 9 Gong G, Dai Y, Fan B, et al. Birth of calves expressing the enhanced green fluorescent protein after transfer of fresh or vitrified/thawed blastocysts produced by somatic cell nuclear transfer. *Mol Reprod Develop*, 2004, 69: 278—288[DOI]
- 10 杨东山, 郭旭东, 海棠, 等. 利用体细胞核移植技术制作人胰岛素原转基因牛. *动物学研究*, 2007, 28(4): 409—416
- 11 连正兴, 张磊, 刘兆良. 整合人 *mAAT* 基因转基因山羊的获得. *遗传学报*, 2001, 28(8): 716—721
- 12 Zou X G, Wang Y G, Cheng Y. Generation of cloned goats (*Capra hircus*) from transfected foetal fibroblast cells, the effect of donor cell cycle. *Mol Reprod Develop*, 2002, 61(2): 164—172[DOI]
- 13 Harris P M, McBride B W, Gurnsey M P. Direct infusion of a variant of insulin like growth factor I into skin of sheep and effects on local blood flow, amino acid utilisation and cell replication. *Endocrinology*, 1993, 139: 463—472[DOI]
- 14 Damak S, Su H Y, Jay N P, et al. Improved wool production in transgenic sheep expressing insulin-like growth factor 1. *Biotechnology*, 1996, 14: 185—188[DOI]
- 15 杨东山, 杜晨光, 高飞, 等. 牛胎儿成纤维细胞的组织块贴附法分离培养与电穿孔法基因转染. *动物学研究*. 2006, 27(1): 41—47
- 16 陈大元. 受精生物学——受精机制与生殖工程. 北京: 科学出版社, 2000. 13—14
- 17 王雪红, 董雅娟, 柏学进. 山羊卵母细胞体外成熟过程中细胞核迁移的研究. *生物技术通报*, 2006, 增刊: 412—415
- 18 Chen T D, Vaught J A, Monahan J, et al. Efficient production of transgenic cloned calves using preimplantation screening. *Biol Reprod*, 2002, 67(5): 1488—1492[DOI]
- 19 Loi P, Clinton M, Barboni B, et al. Nuclei of nonviable ovine somatic cells develop into lambs after nuclear transplantation. *Biol Reprod*, 2002, 67(1): 126—132[DOI]
- 20 Tervit H R, Whittingham D G, Rowson L. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil*, 1972, 30: 493—497
- 21 郭继彤, 李煜, 安志兴, 等. 成年耳细胞克隆山羊. *中国科学C辑: 生命科学*, 2002, 32(1): 77—83
- 22 刘凤军, 王勇胜, 华松. 培养液及血清浓度对山羊孤雌胚胎体外培养的影响. *黑龙江畜牧兽医*, 2004, 2: 11—13
- 23 Roblero L S, Guadarrama A, Ortiz M E, et al. High potassium concentration and the cumulus corona oocyte complex stimulate the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Fertil Steril*, 1990, 54: 328—332