

山羊 (*Capra hircus*) 胚胎细胞经继代细胞核移植后其发育能力的研究*

邹贤刚 李光三 王玉阁 肖英达 李碧荣 黄国屏
钟元 杜淼**

(中国科学院发育生物学研究所, 北京 100080)

徐少甫 穆宗尧 孙长美 王杏龙 杜福良 成勇 成国祥
李国忠 王捍东 吴维芬 王立康

(扬州大学农学院畜牧系, 扬州 225001)

关键词 山羊 胚胎细胞 继代核移植

细胞核移植是研究细胞核和细胞质相互关系问题的最理想的方法之一。继代细胞核移植或称再克隆(recloning)可以了解同一胚胎分裂球或细胞经继代细胞核移植之后, 它们全能性的功能是否有变化, 如有变化, 在第几代开始有变化, 如没变化则能稳定几代。如果继代细胞核移植可行的话, 将会成为获得大量基因型等等的无性繁殖系动物的理想方法。本文主要研究山羊胚胎的分裂球或细胞经继代核移植后仍具有全能性发育的可能性。本实验结果首先在国内外获得了一批继代核移植后的小羊羔。为我国优质家畜克隆动物的繁育奠定了理论和技术的基础。

1 材料和方法

1.1 供体细胞核的获得

(1) 青山羊或白山羊经激素处理后超数排卵, 自然交配后 5 d, 取出 8~32 细胞时期的胚胎和交配后 6 d 取出的早期囊胚。(2) 由第一代(G_0)核移植后所得的重构胚经体内培养 5 d 后获得 8~16 细胞时期的胚胎再作为第二代(G_1)核移植的供体细胞。

1.2 受体卵母细胞的获得

白山羊经激素处理超数排卵, 以最后注射 LRH 25~30 h 回收卵母细胞作为受体卵, 卵外周包有 3~4 层卵丘细胞为最佳的卵。

1.3 寄母暂养羊

与获得受体卵的母羊的情期处于同步阶段。

1.4 培养液与仪器

培养液: M_{16} +10% 小牛血清(灭活); 手术液: M_{16} +28.3 mg/mL Hepes+7.5 μ g/mL CB; 分离液: 2.5% 胰蛋白酶+1% EDTA+无 Ca^{2+} ; Mg^{2+} 的 Hank's 液; 电融合液: 0.3 mmol/L 甘

1993-11-23 收稿, 1994-10-17 收修改稿

* 国家“八六三”高科技资助项目

** 联系人

露醇+0.05 mmol/L CaCl_2 +0.1 mmol/L MgSO_4 ; 冲卵液: 磷酸缓冲液(PBS pH7.2).

电融合仪(科发公司)电场强度为 $\pm 1 \text{ kV/cm}$, 刺激持续时间为 30~60 μs , 刺激 3 次. Leitz 显微操作仪.

1.5 第一代(G_0)和第二代(G_1)核移植

用 0.8% 和 1% 琼脂糖将第一代的重构卵双重包埋^[1], 然后将其移植到处于同步情期山羊的结扎过的输卵管中进行暂养, 5 d 后再从输卵管中回收, 将其中发育比较好的胚胎(8~16 细胞期)作为第二代(G_1)核移植的施主细胞, 再重复第一代核移植的程序, 所得第二代的重构胚再移入受体羊的输卵管待其出生或培养至 5 d 统计其分裂率和发育率.

2 结果与讨论

2.1 同一发育时期的施主细胞在 G_0 (第一代)和 G_1 (第二代)发育能力的比较

1992 年度的实验是将 G_0 (第一代)和 G_1 (第二代)的重构胚分别经琼脂糖(Agarose)双重包埋, 然后移植至同步情期寄母羊经结扎的输卵管中培养 5~6 d 后再用 PBS 从输卵管中冲出, 进行统计学处理, 结果见表 1.

表 1

项目	G_0 (第一代)	G_1 (第二代)
胚胎数	345	101
融合率	87.0%(300/345)	85.1%(86/104)
回收率	73.7%(221/300)	97.7%(84/86)
分裂率	44.3%(98/221)	36.9%(31/84)
发育率	29.2%(64/221)	31.0%(26/84)

G_0 (第一代)和 G_1 (第二代)施主细胞均用 8~32 细胞时期的胚胎. G_0 代和 G_1 代回收率分别是 73.7% 和 97.7%, 之所以出现这样的差异, 主要原因还是技术上的问题. G_0 和 G_1 的融合率、分裂率、发育率相比, 无明显差异($p>0.05$), 原因之一是本实验所用的受体——次级卵母细胞的发育程度在 G_0 和 G_1

的实验中基本处于相同的阶段, 用的是经最后一次注射 LRH 后 26~28 h 回收的卵, 约有 80% 的卵其外包有 3~4 层卵丘细胞, 这样的次级卵母细胞作为受体卵比较合适.

2.2 继代核移植从理论上分析至少有两方面的意义

(1) 了解同一胚胎分裂球或细胞经两代核移植之后其功能是否有变化. (2) 如没有变化则能稳定几代. 从表 1 可看出 G_0 和 G_1 代相比其融合率、分裂率、发育率无显著差异($p>0.05$), 所以山羊胚胎分裂球经继代核移植之后它们的发育全能性无明显变化. Stice^[2] 在牛的继代核移植的实验中其融合率有逐代下降的趋势, 发育率在第一代(G_0)和第三代(G_2)分别为 20% 和 19%, 而第二代(G_1)发育率最低为 10%. 本实验 G_0 和 G_1 的发育率分别为 29.0% 和 31.0%, 比 Stice 的实验结果高, 这也许是种的差异, 但并不发生上述的牛的继代核移植中的情况, 即第二代(G_1)的发育率骤然下降, 到第三代又上升的情况, 因此从本实验结果看, 同一胚胎的细胞或分裂球经两代核移植之后, 细胞核的发育还是等能的, 至少在第二代没有发生变化.

1993 年度实验略不同于 1992 年度的工作, G_0 (第一代)获得的重构卵经电融合后用琼脂糖包埋, 再移植到同步情期寄母羊结扎后的输卵管中培养 5 d, 用 PBS 从输卵管中冲出, 发育正常的胚胎(8~16 细胞时期)再作为第二代的施主细胞, 重复第一代核移植的过程, 移核、电融合之后直接移植到同步情期山羊的输卵管中(不经结扎)待其发育后出生, 现以出生的羊羔为最终统计数, 见表 2.

表 2

供核时期	G ₀ (第一代)					G ₁ (第二代)			
	移核数	融合率	分裂率	发育率		供核时期	移核数	融合率	出生率
A	39	74.36%	69.57%	34.78%	→	8~16	39	89.74%	2.54%
囊胚		29/39	16/23 ^{a)}	8/23		细胞期		35.39	144# ^{b)}
B	61	91.8%	71.88%	40.60%	→	8~16	26	96.15%	3.85%
8~16 细胞		56/61	23/32 ^{a)}	13/32		细胞期		25/26	146# ^{b)}
C	48	92.82%	29.27%	29.27%	→	8~16	69	100%	2.9%
8~16 细胞		46/48	12/41 ^{a)}	12/41		细胞期		69/69	12# ^{b)}

a) 回收卵数

b) 144#, 146#, 12#为受体羊号

实验 B 和 C 的第一代施主细胞用 8~16 细胞时期的分裂球, 实验 A 第一代施主细胞用早期囊胚内细胞团的细胞, 实验 B, C 和实验 A 第一代核移植后其融合率差异极显著 ($p < 0.01$), 因为囊胚的内细胞团的细胞要比 8~32 细胞期的分裂球小得多, 所以和卵母细胞的接触面也小, 融合率就比用 8~32 细胞期的分裂球作施主细胞要低得多, 但实验 A, B, C 的分裂率和发育率并无显著差异 ($p > 0.05$), 虽然发育时期不同, 特别是囊胚期内细胞团细胞, 从某种角度上来说已分化至较高的程度, 但经卵母细胞质调整重新编序之后完全和受精卵一样按正常顺序来发育。

过去在两栖类核移植的研究中, 已有系统的报道. Gurdon^[3] 以成熟蛙的角化皮肤细胞进行核移植, 能得到发育正常的蝌蚪, 该实验说明了某些分化了的体细胞的遗传全能性在适当条件的细胞质的影响下仍然能被激活而表达, 如同受精卵的合子一样参与正常的发育. Di Berardino^[4] 用蛙非细胞周期的和最终分化了的细胞-红血球作施主细胞, 将其注射到第一次成熟分裂中期的卵母细胞中, 获得了发育正常的蝌蚪. 另外用成红细胞、白细胞也进行了类似的核移植实验, 也获得了发育正常的蝌蚪。

正如实验 B, C 用的施主细胞是 8~16 细胞时期的分裂球, 实验 A 用的是早期囊胚内细胞团细胞, 它们的分裂率和发育率无显著差异, 出生率也无差异. 这就是说上述这些不同发育时期的细胞将其移植到去核卵中, 卵子细胞质对外源细胞核进行重新编序 (reprogramming) 使重构卵具有同正常的受精卵一样的发育顺序. 因此施主细胞所处时期的早晚或 RNA 转录起始的早晚不一定是核移植后所得重构胚能否发育甚至能否出生的关键因素, 而主要是卵细胞质和细胞核之间的亲和性. 卵细胞质具有对细胞核激活和重新编序的能力之缘故. 另一方面 Orr^[5] 的实验, G₀ 代用的施主细胞是红细胞, 重构的卵发育至囊胚, 再用这囊胚的细胞作第二代核移植的施主细胞, 依次类推一直到第 8 代为止, 均获得正常的蝌蚪. 该实验充分证明原代红细胞核的有丝分裂后代的基因组的复制和继续进行细胞周期的能力直到第 8 代还没有消失. 对照本实验在山羊继代核移植中不论其原代施主细胞为 8~16 细胞期的分裂球还是囊胚期内细胞团细胞, 均维持了直接能形成各种类型的细胞和全部器官系统的遗传信息. 而且保留了全部的遗传基因组, 因为继代核移植后获得的小羊羔已成熟并已繁殖正常后代. 因此 Stice^[2] 在牛的继代核移植中随着传代的继续, 它们的发育率有下降的趋

势,而且在第二代就突然下降,第三代有回升,到第四代又下降,这情况可能是技术上的缘故而不是细胞核发生变化的原因. 因此我们认为如果在技术上维持稳定的条件,那么在大家畜(牛)也完全可以像两栖类的继代核移植和羊继代核移植那样每代维持在相似的水平.

参 考 文 献

- 1 Willadsen S M. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature*, 1979, 93: 93~112
- 2 Stice S L, Keefer C L. Multiple generational Bovine embryo cloning. *Biol Reprod*, 1993, 48: 715~719
- 3 Gurdon J B, Laskey R A, Reeves O R. The developmental capacity of nuclei transplantated from keratinized skin cells of adult frogs. *J Embryol Exp Morphol*, 1975, 34: 93~112
- 4 Di Berardino M A, Orr N H. Genomic potential of erythroid and Leukocytic cells of *Rana pipiens* analyzed by nuclear transfer into diplotene and maturing oocytes. *Differentiation*, 1992, 50: 1~13
- 5 Orr H N, DiBerardino M A, Mckinnell R G. The genome of frog erythrocytes displays centuplicate replications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 1369~1373