

# 喜马拉雅塔尔羊异种克隆及相关研究

## 中文摘要

异种体细胞核移植研究对于濒危野生动物保护, 细胞内核质互作关系揭示以及医学上“治疗性克隆”具有重要意义。但是, 种间核质重构胚胎附植前后发育潜能低, 尤其是着床后的胚胎丧失是异种克隆基础研究, 甚至获得异种克隆个体的瓶颈问题。本试验对于此问题进行了探索, 以去核山羊卵母细胞为胞质受体, 构建喜马拉雅塔尔羊异种重构胚, 研究了其附植前后的发育能力, 并探讨了山羊四倍体胚胎对于塔尔羊异种重构胚胎外组织代偿的可能性。

- 1、从上海动物园采集了雄性喜马拉雅塔尔羊耳部组织, 常规组织培养法成功获得塔尔羊耳成纤维细胞系, 长期培养细胞仍具有良好的形态和正常的染色体核型(60, XY)。采用血清饥饿48h和细胞汇合24h处理细胞, 可以显著提高塔尔羊细胞G0 / G1期比例。
- 2、把塔尔羊耳成纤维细胞移入去核奶山羊卵母细胞卵周隙, 电融合法构建异种间核质重构胚, 激活后培养6.5天重构胚胎发育至囊胚。山羊输卵管内活体培养的异种重构胚的囊胚发育率(16.67%)明显高于体外培养组(4.66%) ( $P < 0.01$ )。经过血清饥饿48h, 汇合24h两种方法处理供核细胞所获得的异种重构胚的桑椹/囊胚发育率相似(27.27%VS28.21%,  $P > 0.05$ )。塔尔羊—奶山羊异种重构胚的卵裂率与奶山羊—奶山羊重构胚基本一致(86.64%VS85.19%), 但是其桑椹/囊胚发育率存在差异(30.36%VS44.44%,  $P < 0.05$ )。
- 3、塔尔羊异种重构胚的Y染色体核型分析及SRY基因扩增, 鉴定基因组的遗传物质来自雄性塔尔羊细胞。通过位点特异巢式PCR分析异种重构胚的线粒体组成, 结果表明在囊胚阶段重构胚线粒体以奶山羊线粒体为主, 塔尔羊线粒体少量存在, 所占比例 $< 0.1\%$ 。
- 4、将55枚塔尔羊异种重构囊胚移至17只奶山羊受体子宫内, 胚龄30天B超检测到3个孕囊存在, 妊娠率为17.65%, 但是胚龄45天再次检测时已经无孕囊存在。

剖检受体子宫发现塔尔羊异种重构胚在奶山羊子宫内终止妊娠时间大约在胚胎龄35天左右。

- 5、优化电融合参数后，以DC0.8Kv/cm，40us，3次刺激山羊2-细胞期胚胎可以获得高的融合率（80.08%）和四倍体胚胎发育率。山羊输卵管内活体培养，四倍体胚胎的囊胚发育率明显高于体外培养组（45.16%VS3.33%， $P<0.01$ ）。细胞组织学分析，83.3%的融合后发育的囊胚具有四倍体核型（ $4N=120$ ），但是其细胞数目仅为（ $53.3\pm 2.8$ ），约为山羊二倍体囊胚的一半（ $116.0\pm 4.9$ ）。山羊四倍体囊胚移植到山羊受体子宫内可以正常着床，其胚胎发育异常，但是胎膜部分发育正常。
- 6、在含有180ng/mlPHA的mKSOM培养液中，通过玻璃针挤压法将去除透明带的8-细胞期塔尔羊异种重构胚和4-细胞期山羊四倍体胚胎聚合，微孔内培养24h后聚合成“单胚胎”，3.5天后发育至囊胚。通过囊胚透射电镜分析塔尔羊异种重构胚胎细胞与山羊四倍体胚胎细胞在聚合囊胚中，并不混杂，四倍体细胞主要分布在囊胚的滋养层部分，而异种重构胚胎细胞则在内细胞团和滋养层都由分布，并且初步判定2N-4N细胞间存在间隙样细胞连接。塔尔羊异种重构胚-奶山羊四倍体胚胎聚合后发育的嵌合体囊胚移植到奶山羊受体子宫内，发现受体子宫出现妊娠反应，尽管剖检发现胚胎在着床后发育早期即发生退化。

关键词 异种体细胞核移植，喜马拉雅塔尔羊，奶山羊，位点特异PCR，四倍体胚胎

## **DEVELOPMENT OF HIMALAYAN TAHR EMBRYOS PRODUCED BY INTERSPECIES NUCLEAR TRANSFER**

### **Abstract**

Interspecies somatic cell nuclear transfer provides an important pathway to conserve the endangered animals, investigate the interaction between nuclei and cytoplasm in the cells and produce the immunity compatible embryonic stem cells for medical therapy. However, low developmental competence of interspecies constructed embryos at pre- and post-implantation stages, especially high loss rate of these embryos early after implantation was a severe obstacle to advance the ISCNT technology and even obtain interspecies cloned offspring. In the present study, we used goat enucleated oocytes as cytoplasts to produce Himalayan tahr interspecies constructed embryos and studied their developmental potentials pre- and post-implantation. In addition, the feasibility of the compensation of goat tetraploid embryos for the extraembryonic tissues of the tahr interspecies constructed embryos was investigated.

1. Ear tissues of a male Himalayan tahr were collected from a donor maintained in the Shanghai Animal Park and we established a fibroblast cell line by normal tissue culture. After cultured for many cell passages, tahr fibroblast cells remained good morphology and normal karyotype (60, XY). Serum starvation for 48h and cell confluence for 24h significantly raised the rate of G0/G1 stage cells.
2. Interspecies constructed embryos were produced by transferring the serum starved tahr fibroblast cells into the perivitelline space of the enucleated goat oocytes and then exposing to the electric stimulus to fuse the donor cells and the cytoplasts. These constructed embryos were cultured in vivo or in vitro for 6.5 days to develop up to blastocyst stage after activation. The blastocyst rate of those interspecies constructed embryos cultured in the goat oviduct in vivo (16.67%) was higher than that of interspecies constructed embryos cultured in vitro (4.66%) ( $P < 0.01$ ). The morula and blastocyst rate of the interspecies constructed embryos from donor cells after serum

starved for 48h was similar to the development rate of those from donor cells confluencing for 24h ( 27.27% VS 28.21%,  $P>0.05$ ). The cleavage rate of tahr-goat interspecies constructed embryos (86.64%) was comparable to the goat-goat constructed embryos (85.19%,  $P>0.05$ ), but the morula and blastocyst rate showed significant difference (30.36% VS 44.44%,  $P<0.05$ ).

3. Y chromosome analysis and SRY gene PCR amplification of interspecies constructed embryos confirmed that the nuclear genome was from the donor nuclei of tahr fibroblasts. We established nest allele specific PCR to analyse the composition of mitochondria in the cytoplasm of interspecies constructed embryos. The results showed that mitochondrion DNA was mainly from goat oocytes although tahr mitochondria existed at the rate of about 0.1%.
4. Fifty-five tahr interspecies constructed blastocysts were transferred into the uteri of the seventeen recipient goats. At constructed embryonic age of 30 days, three conceptuses were detected by ultrasonic wave scanning and the pregnancy rate was 17.65%. However, three conceptuses were lost at the time of EA 45 days. The dissections of uteri of recipients found that the interspecies constructed embryos began to degeneration at about EA 35 days in the recipients' uteri.
5. High fusion rates (80.46%), viability and developmental capacity were obtained when goat 2-cell stage embryos exposed to electric stimulus under Direct Current 0.8kV/cm, 40 $\mu$ s duration, three times applied. These fused embryos had the capacity to develop up to blastocyst stage after cultured for six days both *in vivo* and *in vitro*, although higher blastocyst rate (45.16%) was observed when cultured *in vivo* than *in vitro*(3.33%). Cytological analysis showed that 83.3% (10/12) of blastocysts derived from *in vivo* culture were tetraploid. The mean number of cells in the tetraploid blastocysts derived from *in vivo* culture was 53.30, nearly half of the diploid embryos (116.40). Goat tetraploid embryos implanted into the recipients' uteri of the goats and the development of extraembryonic tissues seemed to be normal although the embryos were abnormal.
6. The 2N-4N embryo aggregates were prepared by crushing zona-free tahr interspecies constructed embryos at 8-cell stage with zona-free goat tetraploid embryos at 4-cell

stage in the mKSOM medium containing 180ng/ml PHA. These aggregates became “single” embryos after cultured in the micro-well for 24h and developed to blastocyst stage after 3.5 days. The transmission electron microscope analysis of chimeric blastocysts confirmed that embryonic cells with different ploidy did not mix up and constructed embryonic cells distributed in both ICM and trophoblast while goat tetraploid embryonic cells were restrictive distribution in the part of trophoblast. From the electron microscope scanning results, gap junction-like connection was primary thought to exist between different the cellular membranes of embryonic cells with different ploidy. The blastocyst developed from the 2N-4N aggregates were transferred into the goat recipients’ uteri. The dissections of recipients’ uteri showed the pregnant reactions although the embryos degraded early after implantation.

**Key words:** interspecies somatic cell nuclear transfer; Himalayan tahr; goat; allele specific PCR; tetraploid embryos

## 符号说明

简写	英文名称	中文名称
AKP	alkaline phosphatase	碱性磷酸酶
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
CB	cytochalasin B	细胞松弛素 B
6-DMAP	6-dimethylaminopurine	6-二甲基氨基嘌呤
DMEM	DMEM medium	DMEM 培养液
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
EGF	epidermal growth factor	表皮生长因子
EFM	fibroblast medium	成纤维细胞培养液
ESCs	embryonic stem cells	胚胎干细胞
ESM	ES culture medium	胚胎干细胞培养液
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
bFGF	basic fibroblast growth factor	碱性成纤维细胞生长因子
FSH	follicle stimulating hormone	促卵泡激素
GnRH	gonadotropin-releasing hormone	促排卵素
ICM	inner cell mass	内细胞团
IGF	insulin-like growth factor	胰岛素样生长因子
IM	ionomycin	离子霉素
mKSOM	modified KSOM medium	改良的KSOM培养液
LIF	leukemia inhibitory factor	白血病抑制因子
M16	M16 medium	M16 培养液
M2	M2 medium	M2 培养液
MEFs	mouse embryo fibroblasts	小鼠胚胎成纤维细胞
MII	second meiotic division	第二次减数分裂中期
NEAA	non-essential amino acids solution	非必需氨基酸

---

PBS	phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PFA	paraformaldehyde	多聚甲醛
PG	prostaglandin	前列腺素
iSCNT	interspecies somatic cell nuclear transfer	种间体细胞核移植
SCNT	somatic cell nuclear transfer	体细胞核移植
TE	trophoblast	滋养层
ZGA	zygote genome activation	合子基因组激活
d	day	天
h	hour	小时
min	minute	分钟
mg	milligram	毫克
μg	microgram	微克
ml	milliliter	毫升
μl	microliter	微升
cm	centimeter	厘米
M	molar/liter	摩尔 / 升
mM	millimolar/liter	毫摩尔 / 升
rpm	revolutions per minute	每分钟转数
IU	international unit	国际单位

## 上海交通大学

### 学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：

日期：      年    月    日



# 上海交通大学

## 学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权上海交通大学可以将本学位论文的全部或部分内 容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密，在\_\_\_年解密后适用本授权书。

本学位论文属于

不保密。

(请在以上方框内打“√”)

学位论文作者签名：

日期： 年 月 日

指导教师签名：

日期： 年 月 日

## 前言

自1996年体细胞克隆绵羊“多莉”诞生<sup>[1]</sup>以来,体细胞核移植技术迅速发展,已分别在小鼠<sup>[2]</sup>,大鼠<sup>[3]</sup>,牛<sup>[4,5]</sup>,山羊<sup>[6]</sup>,骡<sup>[7]</sup>,猪<sup>[8,9,10]</sup>,马<sup>[11]</sup>,猫<sup>[12]</sup>,犬<sup>[13]</sup>,兔<sup>[14]</sup>,雪貂<sup>[15]</sup>,红鹿<sup>[16]</sup>,水牛<sup>[17]</sup>等十四种哺乳动物上获得成功,这些克隆动物的获得,是基于体细胞核移植到同一物种的去核卵母细胞,称之为同(品)种(系)体细胞克隆。而使用种间或亚种间的卵母细胞进行核移植操作,构建异种重构胚,进行的早期胚胎发育,或进一步在异种寄母中建立妊娠甚至全程发育,称为异种体细胞核移植(interspecies somatic cell nuclear transfer, iSCNT)。异种体细胞核移植研究的开展,首先是迫于种内核移植工作中受体卵母细胞来源的不足,如对于某些珍稀、濒危野生动物,获取卵母细胞根本不可能<sup>[18]</sup>,在人类,受到伦理道德因素的限制,进行“治疗性克隆”所需的人类卵母细胞数量很少<sup>[19]</sup>;其次,在研究核质互作关系方面,诸如胞质对于供核的调控,重构胚中线粒体来源及异源性线粒体的作用等一系列基础问题,通过异种核移植手段,它们可能会更容易得到揭示,从而有助于推动对核移植技术的基础研究<sup>[20]</sup>。

1984年,McGrath和Solter等将不同品系的小鼠卵裂球移入去核的合子中,发现重构胚能在体外卵裂,但无法进一步发育<sup>[21]</sup>。1993年,梅祺等用小鼠8-细胞胚胎的卵裂球移植到去核兔卵母细胞中,重构胚出现核重塑和染色体聚缩现象,并且5.4%异种重构胚体外发育到囊胚<sup>[22]</sup>。1998年,Wells等把Enderby Island牛颗粒细胞核移植到去核奶牛卵母细胞中,构建亚种间重构胚,成功克隆了一头名为“贵妇”的珍稀母牛,获得两头克隆个体,其中一头存活<sup>[23]</sup>。2004年,以家猫去核卵母细胞为胞质受体,非洲野猫体细胞为供核细胞构建重构胚,胚胎移植到家猫体内成功获得妊娠,两只克隆的非洲野猫成活<sup>[24]</sup>。本实验室以奶山羊为卵母细胞胞质供体,波尔山羊耳成纤维细胞作供核,构建的波尔山羊-奶山羊重构胚发育至囊胚的比率为34.6%,1只受体羊妊娠到期产下一头健康的克隆波尔山羊<sup>[25]</sup>。

1999年,Dominko等分别将绵羊、猪、猴和大鼠等动物的体细胞核移植到去核的牛卵母细胞中,异种重构胚均能完成早期发育<sup>[26]</sup>。White等将盘羊的体细胞核移植到

绵羊的去核卵母细胞中,异种重构胚有1.56%发育到囊胚<sup>[27]</sup>。陈大元等对异种克隆大熊猫进行了大量的研究,他们把大熊猫体细胞核移植入兔卵母细胞,得到了异种大熊猫早期胚胎,并以猫为寄母建立了异种妊娠,但未能克隆出大熊猫<sup>[28,29,30]</sup>。Loi等<sup>[31]</sup>将欧洲盘羊的颗粒细胞核移植到绵羊的去核卵母细胞中,获得重构胚,其中7枚发育到囊胚,移入受体绵羊子宫,最终一只受体正常妊娠并产下1只异种克隆盘羊。Lanza等<sup>[32]</sup>将野牛皮肤成纤维细胞移入去核的牛卵母细胞中获得异种野牛克隆胚,其中12%的重构胚发育到囊胚,并使一头受体母牛妊娠到期,产下一头发育正常的克隆亚洲野牛“*Noah*”,供核的亚洲野牛的染色体数目为58条,而卵母细胞受体奶牛的染色体数目为54条。Illmensee等<sup>[33]</sup>将人的颗粒细胞和成纤维细胞移植到去核的牛卵母细胞,重构卵融合后可以发育到囊胚阶段,囊胚率分别为31.3%和29.3%。Chen等将人体细胞核移植到去核兔卵母细胞内发育至囊胚并分离得到人类胚胎干细胞<sup>[34]</sup>。这些研究表明某些哺乳动物(牛、兔、山羊等)的卵母细胞具有使异种体细胞核去分化和重编程的能力,异种重构胚可以完成早期发育,甚至获得异种克隆个体。

尽管如此,对种间(亚种间)重构胚的着床及着床后发育的研究表明:由盘羊(供核)与绵羊(供质)组成的亚种间重构胚,在移入绵羊子宫后可诞生克隆盘羊<sup>[31]</sup>;由野牛(供核)与家牛(供质)组成的亚种间重构胚,在移入家牛的子宫后,可发育至妊娠后期<sup>[32]</sup>;但是,由熊猫(供核)与家兔(供质)组成的种间重构胚,在移入熊、猫子宫后,几乎未见着床<sup>[30]</sup>。同样,由熊猫(供核)与山羊(供质)组成的种间重构胚,在移入山羊子宫后亦未见着床(内部资料)。上述结果提示:亲缘关系较近的盘羊-绵羊以及野牛-家牛等亚种间重构胚在移植后能够着床,并可发育至妊娠后期,而亲缘关系较远的种间重构胚则几乎未能着床。于是推测,种间重构胚难以着床的根源可能在于:(1)种间胎盘类型与子宫内膜发育方式存在的固有差异,导致重构胚无法着床;(2)母体子宫内膜组织与移入胚胎间存在组织相容性抗原的差别,导致免疫排斥,造成植入胚胎被迅速逐出;(3)种间孕期的差异,母体妊娠期间激素水平的波动引起子宫内环境的变化,使得其与胚胎发育不同步,最终胚胎无法适应子宫内环境而夭折;(4)种间组织体液成份上的差异,导致胎儿无法自母体子宫获得合适的营养,而出现发育中止。

综上所述,着床问题已成为限制对种间核质重构胚的着床后发育研究、获得种间克隆动物的一道屏障。由于自然界的物种生殖隔离机制,建立胚胎在异种受体子宫内着床发育的模型较少,仅有三种:啮齿类模型,马驴模型以及绵羊、山羊模型<sup>[35]</sup>。研究发现,滋养层细胞在建立母体与胚胎联系过程中起重要作用,异种妊娠能否建立与滋养层细胞的类型相关<sup>[36,37,38]</sup>。当滋养层细胞与母体是同一类型时,不管内细胞团细胞是来自何物种,异种妊娠能够建立;反之,如果滋养层细胞与母体非同一物种,即使内细胞团细胞与母体是同一物种,也无法建立异种妊娠。在异种克隆过程,改变受体子宫内环境或者改造胚胎滋养层细胞构成,从而建立异种妊娠,目前可借鉴或采用的技术包括:(1)同种胚胎诱导异种妊娠;(2)内细胞团置换;(3)二倍体/四倍体(2n/4n)嵌合等等<sup>[39,40,41]</sup>。

嵌合体动物的研究最早可追溯到1901年Spermann等在两栖类上进行的试验。60年后,Tarkowki等(1961)利用哺乳动物的早期胚胎细胞,经聚合培养后,获得了世界上首例嵌合体小鼠<sup>[42]</sup>。在随后的几十年里,有关嵌合体动物的制作研究取得了长足进展。其中包括:采用胚胎聚合法与显微注射法制作嵌合体;采用种内与种间的胚胎细胞制作嵌合体;采用不同发育阶段的胚胎细胞(如4-cell与8-cell间、胚胎细胞与ES细胞间等)制作嵌合体;采用不同染色体倍性的胚胎细胞(如二倍体与四倍体胚胎细胞间)制作嵌合体(小鼠、大鼠、牛);采用单性生殖的二倍体胚胎细胞与正常二倍体的胚胎细胞制作嵌合体;以及采用转基因的胚胎细胞(如ES细胞等)与正常二倍体细胞或四倍体胚胎细胞制作嵌合体等等,并先后获得了种内嵌合体动物,如小鼠<sup>[43]</sup>、兔<sup>[44]</sup>、猪<sup>[45]</sup>、绵羊<sup>[46]</sup>、牛<sup>[47]</sup>等,以及种间或亚种间的小鼠-大鼠<sup>[48]</sup>、绵羊-山羊<sup>[49]</sup>、鸡-鸭<sup>[50]</sup>等嵌合体。由转基因的ES细胞制作嵌合体动物,在小鼠上已成为研究基因功能的常规方法之一,在牛上亦有成功的报道<sup>[51,52]</sup>。

其中,小鼠ES细胞与四倍体胚胎聚合法已经运用于小鼠的体细胞克隆,并成功获得神经元,淋巴细胞来源的克隆小鼠<sup>[53,54]</sup>。小鼠等2N-4N嵌合体能够产生可能与以下事实有着诸多关联:(1)在哺乳动物早胚的着床过程中,参与胚外组织发育的部分细胞,常表现为多倍体<sup>[55]</sup>,如合体滋养层的形成,则是由于细胞滋养层细胞保持核分裂而胞质不分裂所产生的,尽管这种多倍体细胞带有某种恶变的倾向,但却

可能有助于胚胎在母体子宫内膜组织的侵入,从而便于胚胎的着床;(2)实验诱导产生的4N胚胎,具有与孤雌、孤雄等发育受损胚胎相似的命运,而无法发育至足月<sup>[56,57]</sup>。于是,寻求与正常2N的胚胎细胞组构成嵌合胚,从而有可能使其发育得到拯救。Graham最早组建了这样一种由4N胚胎细胞(仙台病毒融合)与2N胚胎细胞所组成的聚合胚,经研究发现,在所获得的出生仔鼠中,却检测不到任何源自4N胚胎的细胞<sup>[58]</sup>。关于该嵌合胚及其中4N胚胎细胞的发育特性,目前研究证实:构成嵌合胚的4N胚胎细胞最终仅仅参与到由滋养外胚层及原始内胚层衍生的胎盘滋养层及卵黄囊内胚层组织中,而在所形成的胎儿及动物组织中不存在<sup>[59,60]</sup>。并且,人们已利用4N胚胎来源的细胞具有明显的胚外组织限制性的分布(发育)这种特性,实现了对大量发育相关基因的功能研究<sup>[61,62,63]</sup>。

Ciebli等(1998)以转有外源基因的成纤维细胞作供核细胞进行核移植,然后自重构胚(囊胚)分离类ES细胞系,以类ES细胞与8-cell期的2N胚胎聚合,最后成功获得了转基因牛<sup>[51]</sup>。随后,Isaski等(2000)自体外成熟、体外受精、体外培养后得到的囊胚分离类ES细胞系,然后以2-cell期的胚胎(体外产生)经电融合、体外培养后获得8-cell期的4N胚胎。利用两个4N胚胎中间夹一团类ES细胞的“夹心法”方法,获得77枚2N-4N聚合胚,其中发育至囊胚的有28枚(36.7%)。在对12枚聚合胚作移植后,共分娩得到6头犊牛(二个受体双胞胎,两个受体单胎)<sup>[52]</sup>。但在以微卫星DNA方法分析胎儿与胎盘组织中的细胞来源时,发现:胎盘组织中含有ES细胞来源的细胞,且与源自4N胚胎的细胞共同嵌合分布;在犊牛的体组织中,也出现有源自4N胚胎的细胞。这种预期外结果的根源可能在于:(1)牛2-cell期胚胎经电融合所获得的胚胎并非完全为4N胚胎,而可能出现有2N/4N镶嵌胚胎;(2)受操作技术的影响,“夹心法”聚合时,类ES细胞并非全部夹于4N胚胎细胞之间。但该途径获得聚合胚的着床后发育率高,为核移植重构胚所不及。

所有的上述结果表明:4N胚胎的印迹基因的表达是正常的,在2N-4N嵌合胚的发育过程中,它可限制性性地分布至胚外组织。因此,以之与异种核移植重构胚(2N)组合2N-4N聚合胚,并且将之移入与4N胚胎种属相同的受体子宫,可以对异种重构胚正常附植提供可能性,从而可提高异种重构胚的着床及着床后的发育率、异种克

隆克隆的效率，并由此高效地获得转基因克隆动物。

鉴于此，本研究以中国濒危动物喜马拉雅塔尔羊（Himalayan tahr）为模式动物，主要开展以下三方面研究：

一、分离塔尔羊耳皮肤成纤维细胞系，分析成纤维细胞系的生物学特性，并通过汇合、血清饥饿、长期培养等方法研究了细胞周期和细胞凋亡情况。并以塔尔羊耳成纤维细胞为供核细胞，山羊体内成熟的MII期卵母细胞为供质，构建异种重构胚。体外培养观察重构胚附植前的发育时序。对体内培养获得的异种塔尔羊重构囊胚的线粒体DNA构成进行分析。并且将异种克隆重构胚移植到山羊受体子宫，观察塔尔羊重构胚的着床及其发育潜能。

二、回收超排、受精获得的2-细胞山羊胚胎，电融合法制备山羊四倍体胚胎。体内、体外两种培养方式培养四倍体胚胎，观察其附植前发育能力，并分析四倍体胚胎的核型及其细胞总数。山羊四倍体胚胎移植山羊受体后观察其着床及其发育潜能。

三、开展塔尔羊异种重构胚与山羊四倍体胚胎早期，以PHA为介质的聚合研究，聚合后体外培养观察嵌合胚的着床前发育能力，对所获得的囊胚进行电镜学分析，检测两种细胞间的相互作用。并且将这种嵌合胚移植到受体山羊的子宫观察其着床及发育潜能。

## 实验研究部分

### 第一章 喜马拉雅塔尔羊耳成纤维细胞的建系及其生物学特性分析

塔尔羊喜群居，生活在陡峭、多树木的高山上，全世界共有3种：阿拉伯塔尔羊，尼吉利亚塔尔羊和喜马拉雅塔尔羊。塔尔羊属和山羊属都属于牛科，羊亚科，羊族。喜马拉雅塔尔羊的拉丁名为[Hemitragus jemlahicus]；英文名为Himalayan tahr，为喜马拉雅山系特有种，分布在我国边缘地区—西藏的喜马拉雅山的中段，仅分布于山体的南麓林区。数量稀少约500只，于1972年中科院喜马拉雅综合考察队首次发现，是我国一级保护动物。

喜马拉雅塔尔羊体型粗壮，雄羊达90kg左右。体长120-140cm(雌性)和140-180cm(雄性)。尾长65-75mm，其腹面裸露。通体被毛粗硬，除头部、四肢下部的被毛短而紧贴以外，其余各处毛长而蓬松，尤以雄羊颈部、肩部和股部的被毛更长，形似“蓑衣”。全身几呈暗灰褐或褐黑色；脸面及四肢前面近黑色并具光泽。体色可随性别和年龄的不同而有差异。

塔尔羊适应严寒与多雨的气候。栖息于海拔3000-4000m间的山地森林带，林间险峻的山崖平台和僻静的林缘陡坡，常为它们喜欢出没的生活场所。一年四季有较固定的活动区域，但出现季节性的垂直迁徙现象，即秋后由高处往下移至森林附近栖息，待翌年夏季，又由林缘上升到高山上生活。每群5-30只，冬季能集成上百只的大群。塔尔羊每年11-12月发情交配，雌兽于翌年5-7月生产，每胎产1仔，偶尔为2仔。寿命为16-18年。

目前西藏建有两个喜马拉雅塔尔羊的自然保护区，上海动物园也开展了人工饲养喜马拉雅塔尔羊的研究工作，已经获得人工繁育的喜马拉雅塔尔羊，为人为保护塔尔羊这一珍稀濒危动物打下了良好的基础，但是其数量极为稀少。而异种间克隆则为保护这一珍稀濒危动物提供了新的途径，而且塔尔羊与山羊曾被认为在进化上有亲缘关系，种间核移植的开展可以进一步研究两种来源的线粒体的分布和核质互作，为其遗传学的重要内容。

为此，我们分离了饲养于上海动物园的塔尔羊的耳成纤维细胞，研究了其细胞

生物学特性，不仅为异种间体细胞核移植提供了供核细胞来源，同时也为塔尔羊的保护保留了细胞学资料。

## 1.1 实验材料

### 1.1.1 主要试剂

DMEM (GIBCO/BRL, 11965-092, liquid, 1×)

含有	mg/L
D-glucose	4500
L-glutamine	584
Pyridoxine hydrochloride	4
no sodium pyruvate.	

储存 2℃~8℃.

青霉素/链霉素 (GIBCO/BRL, 15140-122, 200×, 溶解于 0.85% NaCl)

含有 penicillin G	10000 units/ml
streptomycin sulfate	10000 µg/ml

储存 -5℃~ -20℃

胎牛血清(GIBCO/BRL, 10082-147;16141-079, 储存: -5℃~ -20℃)

LIF (SIGMA, L5158, mouse recombinant, 5µg, 100000IU/µg, 溶解于 PBS, pH=7.4, 含 0.02% tween 20, 储存: 4℃, 忌稀释保存)

rhbFGF (SIGMA, F0291, 固体, 25µg, 溶解于10mM Tris(pH=6.0, 含有1.25mg 牛血清白蛋白), 0.2µm 过滤冻干, 储存: -20℃)

7.5% (W/V) 碳酸氢钠 (GIBCO/BRL, 25080-094, 储存: 15~30℃)

PBS (GIBCO/BRL, 14190-144, 1×)

含有 KCl	0.2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2
NaCl	8.0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	2.16 (unit:g/L)

储存 15~30℃

0.25%Trypsin/0.53mM EDTA (GIBCO/BRL, 25300-054, 1×, 猪细小病毒和枝原体检测



合格, 溶解在无钙酶Hanks'Balanced Salt Solution)

含有 trypsin 0.5g/L

EDTA·4Na 0.2g/L

储存-5℃~-20℃

水 (SIGMA, W 3500, 每毫升内毒素低于0.1ng, 过滤除菌, 储存: 室温)

多聚甲醛( $(\text{CH}_2\text{O})_x$ ) (SIGMA, P6148, 储存: 2-8℃)

DMSO (SIGMA, D2650, FW=73.1, 储存: 室温)

Giemsa染色液 (GIBCO/BRL, 10092-013, 储存: 室温)

Gurr's buffer tablets (GIBCO/BRL, 10582-013, 用时每片用1L蒸馏水溶解, pH=6.8, 储存: 室温)

秋水仙碱 (GIBCO/BRL, 15212-012, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 溶解于PBS, 储存: 2~8℃)

甲醇 (上海振兴化工一厂, AR, 储存: 室温)

乙酸 (上海化学试剂公司, AR, 储存: 室温)

鼠抗vimentin抗体 (Santa-cruze, 储存: -20℃)

Hochesst 33342 (SIGMA, 储存: -20℃)

### 1.1.2试剂配制

细胞培养液: DMEM, 内含 2mmol/L 谷氨酰胺、10%FBS、1mmol/L 丙酮酸钠、0.1mmol/L NEAA、5.0ng/ml rhbFGF、100U/ml 青霉素/100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  链霉素。

细胞冻存液: DMEM, 添加10%FBS和10%DMSO。

细胞饥饿液: DMEM, 内含2mmol/L谷氨酰胺、0.05%FBS、1mmol/L丙酮酸钠、0.1mmol/L NEAA、1000IU/ml LIF、100U/ml青霉素/100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素。

低渗 KCl: KCl 0.5g

三蒸水 100ml

高压灭菌, 4℃储存

4%多聚甲醛固定液: PBS添加4%多聚甲醛 (sigma)。

封闭液: PBS添加150mM甘氨酸, 0.3%BSA。

### 1.1.3 主要耗材

组织培养皿:	Φ35mm, Falcon, 3001
	Φ60mm, Nunc, 150288
	Φ100mm, Nunc, 172931
组织培养板:	4 well, Nunc, 176740
	24 well, Nunc, 143982
	96 well, Nunc, 1670018
25mm 过滤器:	Acrodisc, 0.8/0.2μm, 4187
离心管:	1.5ml, Axygen, MCT-150-C
	15ml, Corning, 430052; Falcon, 2196
移液管:	Falcon, 14.6cm, 354642
冻存管:	Corning, 2ml, 430659
移液器枪头:	10μl: Axygen, T-300
	200μl: Corning, 4844
	1000μl: Axygen, T-1000-B

### 1.1.4 主要仪器

AX80型正置显微镜	OLYMPUS
超净工作台	苏净
MCO-15A型CO <sub>2</sub> 培养箱	SANYO
TE-300型倒置显微镜	Nikon
5154D型离心机	Eppendorf
普通冰箱	海尔
低温冰箱	SANYO
FV500型激光共聚焦显微镜	Olympus
FACS Calibur型流式细胞仪	Becton Dickinson Co.USA

### 1.1.5 实验动物

雄性6月龄喜马拉雅塔尔羊, 人工饲养于上海动物园。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 塔尔羊耳成纤维细胞培养

- a) 用刀片将塔尔羊耳缘毛发刮净, 碘酒消毒, 75%酒精洗涤脱碘, 晾干后用无菌的眼科剪刀剪下一小块皮肤组织; 迅速放入DMEM培养液, 放入冰盒, 带回实验室。
- b) 在超净台内依次用75%酒精, 含高浓度双抗的PBS冲洗组织块3次, 然后将组织块移入3.5cm的培养液皿中, 用眼科剪刀将组织块剪切成约1cm<sup>2</sup>碎块, 碎块移至15ml离心管, 9mlPBS, 1000rpm洗涤3次
- c) 将碎块吸至25cm<sup>2</sup>的培养瓶中, 均匀分布于瓶底, 置于培养箱2h后加入含20%FBS的DMEM, 37℃, 5%CO<sub>2</sub>, 100%湿度培养。
- d) 3—5天后更换培养液, 并每两天观察1次, 5—7天后成纤维细胞爬出组织块, 10—14天后成纤维细胞长满瓶底即为P0。
- e) 弃去培养液, 2ml的PBS洗涤1次, 加入500ul的0.1%T/E, 37℃消化1min左右, 加入2ml含10%FBS终止消化, 吹打之后制成细胞悬液。接种于新的培养瓶内, 即为P1。
- f) 接种密度约为 $5 \times 10^5$ , 培养4—5天至90%汇合, 然后消化传代, 传代比例1: 3—1: 4, 培养细胞至两代后开始冻存部分细胞, 其余细胞继续培养并用于检测。

### 1.2.2 塔尔羊耳成纤维细胞的冻存与复苏

- a) 细胞90%汇合后消化, 收集细胞于15ml离心管中, 1000rpm下离心5分钟去上清。
- b) 加入4℃预冷的冷冻液(DMEM+10%FBS+10%DMSO)重悬细胞沉淀, 调整细胞浓度为 $10^6$ 个细胞/ml, 转移细胞至冷冻中。
- c) 放入4℃预冷30分钟, -20℃放置2小时, -80℃冰箱内过夜后迅速投入液氮保存。
- d) 从液氮中取出冻存管, 迅速投入38℃水浴中, 并在水浴中快速晃动冻存管以迅速解冻。
- e) 解冻后迅速移至含10倍体积的新鲜培养液的离心管内, 1000rpm离心5分钟弃上清。
- f) 新鲜温浴过的培养液重悬细胞沉淀, 调整到适宜的细胞浓度, 继续培养。

### 1.2.3 生长曲线的绘制

将第4代细胞以 $3 \times 10^4$  个/ml的密度接种于24孔板, 每孔加入0.5 ml培养基(DMEM +

20%FBS), 37 °C、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中培养。每天同一时间用胰蛋白酶消化3孔细胞, 血球计数板进行计数, 连续进行8天。

#### 1.2.4 细胞染色体核型分析

- a) 取25cm<sup>2</sup>培养瓶培养的指数生长期细胞, 加入100ul(10ug/ul)秋水仙素, 终浓度为0.2ug/ml,作用3小时;
- b) 收集细胞于15ml离心管中, 1000rpm离心5分钟, 弃上清, 用0.075M KCl溶液在37°C水浴中低渗40分钟;
- c) 加入与细胞悬液相同体积固定液(冰醋酸: 甲醇=1: 3), 混匀固定20分钟, 1000rpm离心5分钟弃上清;
- d) 再加入新鲜配制的固定液到细胞沉淀内, 混匀, 室温下固定10—15分钟。1000rpm离心2分钟, 去掉上清。再次用10—15倍细胞体积的新鲜固定液重悬细胞沉淀。
- e) 巴氏吸管滴加悬液到-20°C预冷的载玻片上, 空气室温干燥。
- f) PBS稀释的吉姆萨染液(吉姆萨原液: PBS=1: 9)染色10分钟。蒸馏水冲洗染色液, 空气干燥。
- g) 在1000倍油镜下, 观察扩散良好的分裂相, 随机选取20个分裂相进行染色体计数, 并且拍照。

#### 1.2.5 周期分析

- a) 0.25%的胰蛋白酶消化用于细胞周期分析的培养细胞, DMEM重悬后移至15 ml离心管中, DPBS离心清洗3遍后, 离心附集于管底, 加入1ml柠檬酸固定液固定1h;
- b) 离心去除上清液, 加入1.8ml胰酶消化液, 充分作用15分钟;
- c) 加入1.5ml含有Rnase的胰酶抑制液作用15分钟;
- d) 加入1.5ml碘化丙锭, 作用15分钟;
- e) 200目尼龙网过滤;
- f) 流式细胞仪测定细胞周期, 计算机处理数据软件为ModFIT LT for mac V1.01。

#### 1.2.6 细胞免疫化学分析

- a) 将盖玻片放入24孔板, 接种 $2 \times 10^4$ 细胞培养至细胞生长汇合, 弃去培养液, D-PBS

洗涤细胞1次，加入0.5ml4%多聚甲醛固定15分钟；

- b) 弃去固定液，以PBS (pH 7.4) 清洗3遍，再浸入含1% BSA 的PBS 中作用30 min 作封闭处理，然后加一抗于37 °C共同温育1 h 或4 °C过夜。一抗为抗波形蛋白 (1:200稀释)的小鼠单克隆抗体。
- c) 弃去一抗，PBS清洗3次，每次5 min，再与1:80稀释的FITC标记的山羊抗小鼠IgG 的二抗37 °C温育30 min。
- d) 弃去二抗，在PBS清洗3次后， FITC标记的样品再用5g/ml的Hoechst33342 室温温育10 min。PBS清洗3次，封片后尽快用激光扫描共聚焦显微镜观察。
- e) 阴性对照实验中，用PBS代替第一抗体来排除非特异性的二抗结合。

### 1.2.7 数据处理

细胞周期分析结果用平均数±标准差表示，t检验分析显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

## 1.3 实验结果

### 1.3.1 塔尔羊耳成纤维细胞的培养

常规组织培养法成功获得了濒危动物—喜马拉雅塔尔羊 (图 1) 的成纤维细胞系 (Tahr-1) (图 2)，细胞具有典型的梭状，折光性强，有立体感。

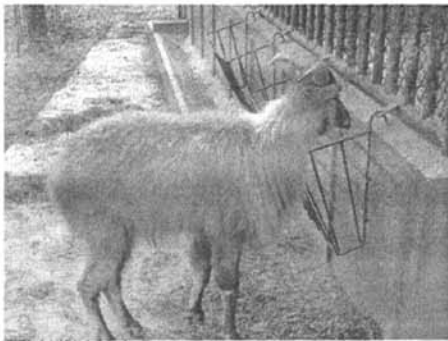


图 1 上海动物园内饲养的塔尔羊  
Fig.1 Tahr maintained in the ShangHai Zoo

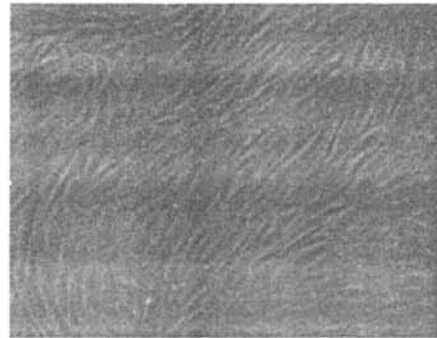


图 2 生长汇合后的塔尔羊耳成纤维细胞  
Fig.2 The confluent tahr fibroblast cells

### 1.3.2 塔尔羊耳成纤维细胞的生长曲线

以培养天数为横坐标，细胞数为纵坐标绘制了塔尔羊耳成纤维细胞生长曲线图

(图 3)。生长曲线显示培养细胞具有正常的分裂增殖特性, 没有转化倾向, 反映培养条件较为适合。

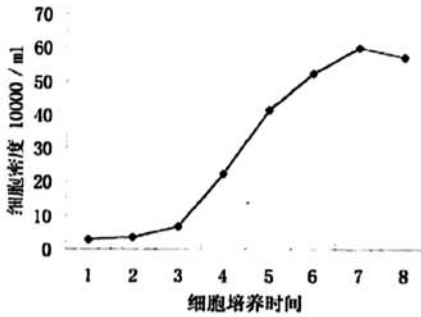


图 3 塔尔羊成纤维细胞生长曲线

Fig.3 Growth curve of tahr fibroblasts cultures in different time

图 4 塔尔羊染色体核型

Fig.4 The karyotype of tahr fibroblast

### 1.3.3 染色体分析

统计分析了培养细胞 20 个分裂相的染色体条数, 图 4 为其中一个分裂相, 统计结果表明 90% (18/20) 的细胞具有正常的染色体数目 ( $2n=60$ )。

### 1.3.4 周期分析

通过汇合细胞、血清饥饿 (24h, 48h)、长期培养等方法处理细胞, 通过流式细胞检测细胞周期, 发现细胞汇合丰度达到 90—95% 时显著提高 G0/G1 比例(表 1), 相当于血清饥饿 48h 的作用, 同时其细胞凋亡少, 形态也优于血清饥饿组 (图 6)。

成纤维细胞在血清饥饿后细胞间隙变大, 细胞形态拉长。细胞长期培养后细胞不规则, 隆起生长, 细胞凋亡增多。

表 1 不同处理方法对塔尔羊成纤维细胞周期的影响

处理方法	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	Apoptosis (%)
丰度 (85%)	88.93±1.31 <sup>b</sup>	3.45±1.44	7.62±0.13	0.55
汇合 (95%)	91.19±1.28 <sup>b</sup>	1.65±0.43	7.16±0.82	2.86
血清饥饿 24h	80.29±1.51 <sup>a</sup>	7.43±0.90	12.28±1.10	3.36
血清饥饿 48h	91.27±0.97 <sup>b</sup>	1.33±0.79	7.39±1.30	3.27
长期培养	78.42±3.35 <sup>a</sup>	9.33±0.86	12.25±1.06	6.49

注: 各行肩标字母不同者表示差异显著 ( $P < 0.05$ )

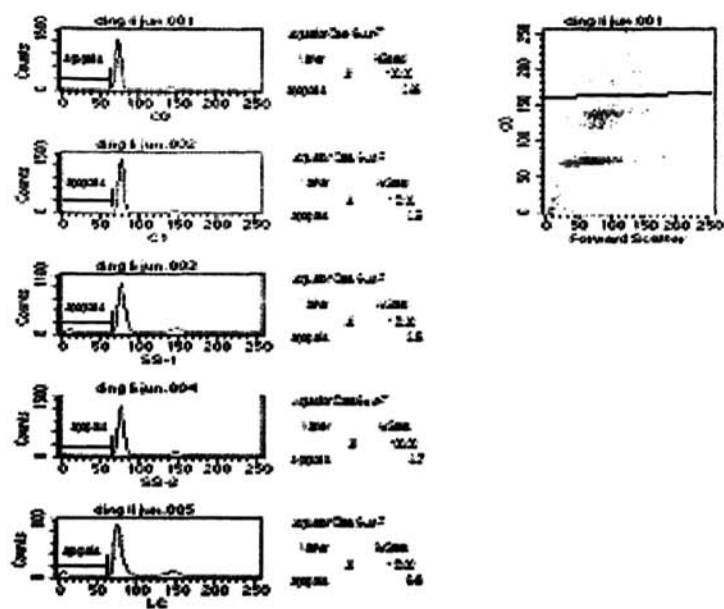


图 5 不同处理方法时塔尔羊细胞周期分析

Fig.5 The cell cycle of tahr fibroblast with different treatments

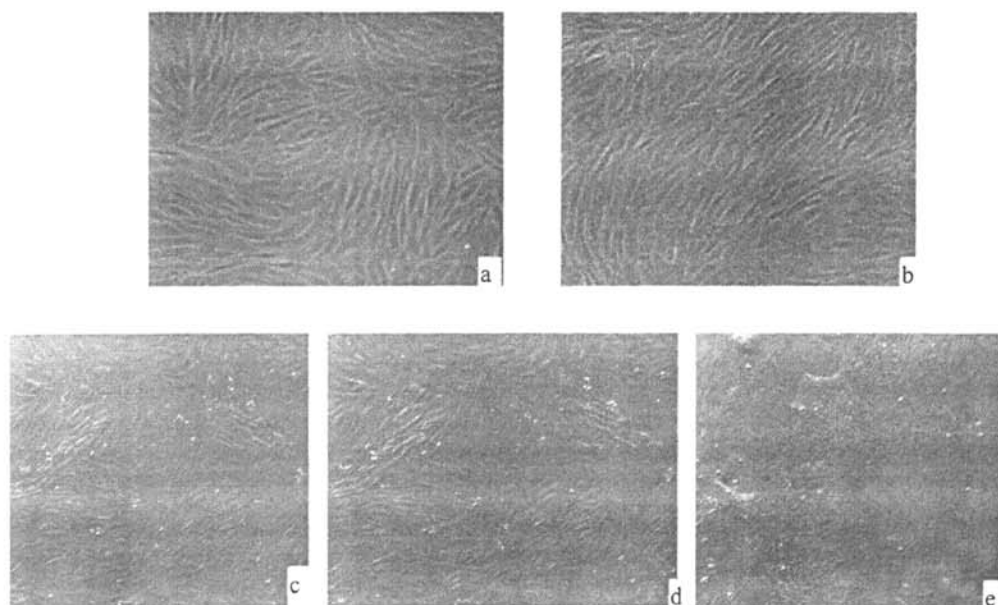


图 6 不同处理方法对细胞形态的影响 a: 汇合丰度 (80-85%); b: 汇合丰度 (90-95%); c: 血清饥饿 24h; d: 血清饥饿 48h; e: 长期培养。

Fig.6 Morphology of tahr fibroblast treated with different methods a, confluence with 80% - 85% abundance; b, confluence with 90%-95% abundance; c, serum starvation for 24h; d, serum starvation for 48h; e, long culture.

### 1.5 细胞标志蛋白免疫组织化学分析

通过免疫组化对成纤维细胞标志蛋白 Vimentin 的检测, 染色后共聚焦扫描, 发现成纤维细胞胞浆内呈现阳性表达 (图 7-d), 说明 Tahr-1 为成纤维细胞系。

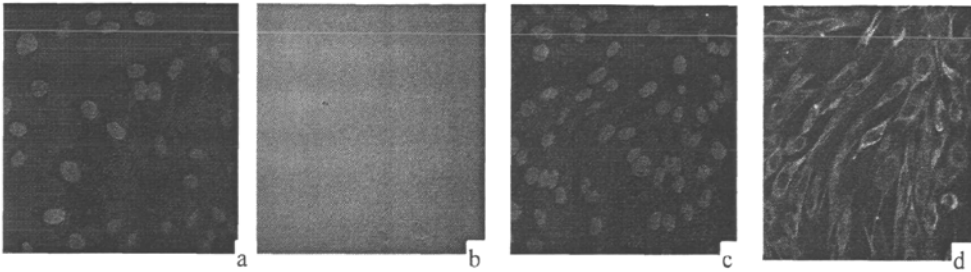


图 7 塔尔羊成纤维细胞 Vimentin 蛋白的间接免疫组织化学检测 a, b 为阴性对照, c 为 Hoechst 染核, d 为胞浆内绿色荧光

Fig.7 Immunochemistry of cell specific protein (Vimentin) in the tahr fibroblasts a, b negative controls c nuclear staining by Hoechst33342 d positive signal with green fluorescence.

### 1.4 讨论

#### 成纤维细胞培养方法

分离耳成纤维细胞的方法主要有机械分离组织块培养液法和胰酶消化培养法两种。考虑到耳部皮肤有大量纤维组织和软骨组织, 胰酶消化短时间作用不大<sup>[64]</sup>, 而长时间消化则会损伤细胞, 所以我们采用了组织块培养法, 成功分离到塔尔羊成纤维细胞, 并且细胞在传代 2-3 代后生长旺盛, 保持了良好的成纤维细胞形态, 传代至 15 代以上仍然具有良好的细胞特性和正常的染色体核型, 据我们所知, 这是首次获得塔尔羊耳成纤维细胞系。本实验室还采用此方法分离了用于体细胞核移植的山羊耳成纤维细胞, 牛耳成纤维细胞, 兔耳成纤维细胞等, 效果很好。

#### 不同处理方法对塔尔羊成纤维细胞的影响

通过“汇合”(confluence)法, 血清饥饿, 长期培养等三种方法, 5 种处理方式,



根据细胞周期分析结果,生长丰度 80%—85%之间血清饥饿延长至 48h 可以提高 G0/G1 期细胞比例,并且差异显著,同时血清饥饿 24h 并没有提高 G0/G1 期细胞比例的作用,这与以往报道一致<sup>[65,66]</sup>。同时,血清饥饿 24—48h,细胞凋亡数并无明显的升高,所以血清饥饿 48h 是合适的提高 G0/G1 期细胞比例的方法。

通过汇合法丰度 95%时,由于细胞接触抑制产生的休止,使得 G0/G1 期细胞比例显著上升,达到 90%以上,这在猕猴成纤维细胞和山羊胎儿成纤维细胞的培养结果相似<sup>[67,68]</sup>。而细胞凋亡比例要少于血清饥饿法,说明汇合法对细胞的损伤小于血清饥饿。

长期培养组 G0/G1 期比例下降,可能是由于细胞成堆而隆起生长的结果,其凋亡细胞的比例大大增加,显然不适合体细胞核移植时的供核细胞处理。

## 小结

采用组织块培养法获得了雄性塔尔羊耳成纤维细胞系,细胞生长旺盛,具有正常的核型  $2N=60, XY$ 。

血清饥饿 48h 可以提高 G0 / G1 期细胞比例,汇合丰度达到 95%时细胞 G0 / G1 期比例可以达到与血清饥饿 48h 相似的效果,同时细胞凋亡比例要少。细胞长期培养时凋亡比例增加,G0 / G1 期比例下降。

本实验所获得成纤维细胞系表达成纤维细胞的特异性蛋白。

## 第二章 喜马拉雅塔尔羊异种克隆胚胎的附植前发育

异种间体细胞核移植技术为保护濒危动物提供了崭新的途径,目前使用绵羊卵母细胞,奶牛卵母细胞,家猫卵母细胞为胞质成功获得了异种克隆的盘羊<sup>[31]</sup>,印度野牛<sup>[32]</sup>和非洲野猫<sup>[24]</sup>。异种克隆大熊猫<sup>[28,29,30]</sup>,藏羚羊<sup>[69]</sup>,北山羊<sup>[70]</sup>,牦牛<sup>[71]</sup>等研究也获得进展。

但是,异种间克隆研究目前仍然存在许多困难,表现在植入前囊胚发育率明显低于种内核移植胚胎,胚胎早期丧失率高以及异种胚胎着床后无法长期发育。对于异种克隆的胞质受体选择是影响其早期发育的关键因素,卵母细胞与供核细胞亲缘关系,卵母细胞普遍性等是选择卵母细胞的基础,目前牛<sup>[26]</sup>,兔<sup>[30]</sup>是常用的“万能胞质受体”,我们以前的试验证实山羊卵母细胞可以重编程牛,赤斑羚羊,兔,猪,人的成纤维细胞,并支持其发育到囊胚阶段<sup>[72]</sup>。

考虑物种的亲缘关系,我们选择山羊卵母细胞作为胞质受体,用于塔尔羊异种间克隆试验。本实验室建立了山羊体细胞核移植技术平台,拥有体细胞克隆转基因山羊 150 头,所以我们以成熟的技术路线,通过不同的供核细胞处理,不同的培养方式开展塔尔羊异种间克隆试验观察其附植前胚胎发育,并与种内克隆试验作比较,探讨塔尔羊体细胞是否能够在山羊卵母细胞内重编程并且发育到囊胚阶段。

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 主要试剂

M16 (Sigma, M7297, 100ml/瓶 储存: 2℃-8℃)

M2 (Sigma, M7167, 100ml/瓶 储存: 2℃-8℃)

FBS (Hyclone, SH30071.03, 500ml, 储存: -20℃)

FSH (宁波生物激素制品公司, 冻干粉、每支 100IU, -4℃冷冻)。

PG (上海计划生育研究所, 每支 2ml, 含 0.2mg, -4℃冷冻)。

LHRH-A3 (宁波生物激素制品公司, 冻干粉, 每支 20μg, -4℃, 冷藏)。

EGF(Sigma, E9644, 200μg/瓶, 储存: -20℃)

IGF-1(Sigma, I3769, 50μg/瓶, 储存: -20℃)

透明质酸酶 (Sigma, 4272, 储存: 2°C-8°C)

细胞松弛素 B (Cytochalasin B, CB, Sigma, C6762, 储存: -20°C)

DMSO (Sigma, D-2650, 储存: 室温)

离子霉素 (Sigma, I-0634, 粉末, 储存: -20°C)

6-DMAP (Sigma, D2629, 储存: -20°C) /

KSOM (MR-121-D, Specialty Media, NJ, USA, 储存: 2°C-8°C)

BSA (Sigma, A3311, 储存: 2°C-8°C)

Taurine (Sigma, T8691, 储存: 室温)

琼脂糖 (Agarose, Sigma, A6877, 储存: 室温)

D-甘露醇 (Sigma, M1902, 储存: 室温)

CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (Sigma, C7902, 储存: 室温)

MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (Sigma, M2393, 储存: 室温)

Hepes (Sigma, H6147, 储存: 室温)

NaCl (Sigma, S5886, 储存: 室温)

KCl (Sigma, P5405, 储存: 室温)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma, P5655, 储存: 室温)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma, S5136, 储存: 室温)

## 2.1.2 试剂配制

### 冲卵液

成分	(分子量)	1000 ml	mM
NaCl	(58.44)	10.0g	171.12
KCl	(74.55)	0.25g	3.35
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(136.1)	0.25g	1.84
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	(142.0)	1.44g	10.14

分析天平精确称出各组分，放入 1000ml 干净的玻璃烧杯中，向杯内加入 800ml 左右的 MILLPONE 的去离子水，放入磁力搅拌棒、完全溶解，搅拌均匀，最后用去离子水定容到 1000ml，分装于 500ml 玻璃瓶中，高压灭菌，室温保存。

使用时每 500ml PBS 中加入 5ml Hyclone 小牛血清即为冲卵液，按每瓶 50 ml 分装，于 4℃ 保存。

#### 透明质酸酶母液

组分	数量
透明质酸酶	500mg
M2	50ml

充分混合后分装到 1.5 ml 离心管内，每管 0.5ml，-20 度保存。

#### 细胞松弛素 B (CB) 母液 (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)

组分	数量
CB	1000 $\mu$ g
DMSO	1.0 ml

吸 DMSO 1.0 ml 到 1000 $\mu$ g /瓶的 CB 瓶内，充分混合后分装到 1.5 ml 离心管内，每管 7.5 $\mu$ l 或 15 $\mu$ l，-20 度避光保存。

#### 操作液 (M2 +CB)

组分	数量
M2 基质	1.985ml
CB 液 (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	15.0 $\mu$ l

在应用前 3~4 小时把上述两种溶液相加、混匀，置 CO<sub>2</sub> 培养箱中平衡 30 分钟待用。

## 融合基质

## Ca、Mg (100×) 母液配制

组分	分子量	数量
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	203.3	0.10165g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	147.0	0.03675g
H <sub>2</sub> O (三蒸水)	加到	500ml

充分溶解后 4℃ 保存, 使用期不超过两周

## 融合液

组分	分子量	量
D-甘露醇	182.2	2.7g
Ca <sup>++</sup> 、Mg 母液 (100×)		0.5ml
Hepes		5.975ml
H <sub>2</sub> O (Sigma)		49.5ml
BSA		0.025g

上述前四种制剂相加并在 D—甘露醇充分溶解后加入 BSA。用 1M 的 HCl 和 1M 的 NaOH 调整 pH 到 7.2~7.4。经 0.22μm 滤膜过滤、除菌, 分装在 5ml 灭菌清净的青霉素瓶内、贴标签、4℃ 保存。使用时间不超过两周。融合液最终浓度 0.1mM MgCl<sub>2</sub>、0.05mM CaCl<sub>2</sub>、0.3M 甘露醇。

## 离子霉素母液 (1000×) 和应用液 (×100)

组分	量
离子霉素	1.0mg
DMSO	0.268ml

充分混匀后分装在 0.5ml 离心管中,每管 10 $\mu$ l, -20 $^{\circ}$ C 避光保存。在每批实验之前, 每管 (10 $\mu$ l) 加 M16 90 $\mu$ l 稀释成应用液 ( $\times 100$ ), 分装在 0.5ml 离心管中, 每管 10 $\mu$ l、-20 $^{\circ}$ C 避光保存、待用。

#### 6-DMAP 母液 (100 $\times$ )

组分	量
6-DMAP	8.16mg
DMSO	0.25ml

称取 6-DMAP 和用 DMSO 混匀,分装在 1.5ml 离心管中,每管 20 $\mu$ l、-20 $^{\circ}$ C 避光保存。

#### 离子霉素激活液

组分	量
M16	1.975ml
CB 母液	15.0 $\mu$ l
离子霉素母液	10.0 $\mu$ l

上述三种组分用前混匀,总量 2.0ml,最终浓度 CB 7.5 $\mu$ g/ml.离子霉素 5 $\mu$ mol/L, 现配现用。

#### 6-DMAP 激活液

组分	量
6-DMAP 母液	20.0 $\mu$ l
CB 母液	15.0 $\mu$ l
M16	1.965ml

上述三种组分用前相加混匀。总量 2.0ml,最终浓度 6-DMAP 2m mol/L、CB 7.5 $\mu$ g/ml.

## 1%琼脂糖的配制

组分	量
Agarose (熔点: $37\pm 1.5^{\circ}\text{C}$ )	1g
PBS	100ml

用 PBS 定容到 100 ml, 煮沸溶解, 稍冷却后分装 10 ml/管,  $4^{\circ}\text{C}$  保存。

mKSOM 胚胎培养液的配制<sup>[73]</sup>

组分	量	终浓度
KSOM	8.88ml	
NEAA (100×)	100ul	1% (v/v)
EAA (50×)	200ul	2% (v/v)
L-谷氨酰胺 (200×)	50ul	1mmol/l
BSA (20×)	500ul	5mg/ml
Taurine (1000×)	10ul	50umol/l
IGF-I (5000×)	2ul	10ng/ml
EGF (10000×)	1ul	10ng/ml

混匀后  $4^{\circ}\text{C}$  保存, 使用期不超过两周。

## 2.1.3 耗材

肉簿硝子管 (NARISHIGE 公司, 货号 MODEL G-100, 规格  $1\times 90\text{mm}$ , 200 根/盒)

玻璃平皿 (国产)

注射器 (5ml, 10ml, 20ml, 上海米沙瓦公司)

枪头 ( $10\mu\text{l}$ 、 $200\mu\text{l}$ 、1ml, 国产)

硅化载玻片 (国产)

方杯 (带盖, 自制)

乳胶吸管（国产医用）

#### 2.1.4 仪器

融合仪（CE-900, Kefa, Beijing）

解剖镜（SZ-PT, OLYMPUS）

加热板（PC-200, PCC, USA）

正置显微镜（AX80, OLYMPUS）

显微操作器（LEICA, 上海徕卡公司）

体视解剖镜（MOTIC, 麦克迪奥公司）

CO<sub>2</sub> 培养箱（MMM Group, Germany）

离心机（5415D, EPPENDORF）

超净工作台（XSW-CJ-1A, 吴江市绿叶空调净化有限公司）

微量移液器（GILSON, 规格：10μl、200μl、1000μl）

锻针仪（NARISHIGE 公司, 货号 MODEL, PN-30）

断针仪（NARISHIGE 公司, 货号 MODEL, MF-900）

磨针仪（NARISHIGE 公司, 货号 MODEL, EG-40）

#### 2.1.5 实验动物

试验用关中奶山羊 150 头采购于山东, 由上海杰隆生物工程有限公司提供, 饲养于上海转基因研究中心实验牧场, 饲养参考国家标准（204 GB/T 4631）。

实验动物的饲养管理与使用按照上海交通大学医学院实验动物中心实验动物伦理委员会规定执行。

## 2.2 试验方法

### 2.2.1 山羊卵母细胞的准备

常规山羊超排获得 MII 期卵母细胞, 手术法冲洗山羊输卵管回收卵母细胞, 透明质酸酶中吹打去除颗粒细胞, 挑选排出第一极体的卵母细胞作为胞质供体。

采用 FSH 递减法, 总量 240IU, 在注射 FSH 的第三天, 同时注射 PG, 第四天注射 LHRH-A3。供体羊在发情后 9~11 天进行超排处理方法如下:

山羊的超排规程



日程	上午(七时)	下午(十七时)
第一天(发情后9~11天)	FSH 50IU	FSH 50IU
第二天	FSH 40IU	FSH 40IU
第三天	FSH 30IU, PG (0.1mg)	FSH 30IU
第四天	LHRH-A3, 20 $\mu$ g(+3时)	
第五天		回收卵母细胞(十三时)

FSH 和 LHRH-A3 均用生理盐水稀释, 现配现用。

### 2.2.2 塔尔羊供核细胞的准备

培养的细胞, 经复苏、培养、传代、消化后接种到4孔板中的二个孔, 细胞接种密度40-50%, 培养2-3天后丰度达80%时饥饿24-48小时或者汇合丰度95%直接使用。核移植操作前30分钟开始消化, 消化后的细胞重悬于1ml培养液中, 37 $^{\circ}$ C培养15分钟, 然后离心, 去上清, 细胞重悬于40 $\mu$ l FBS中待用。

### 2.2.3 核移植<sup>[25]</sup>

**去核:** 在显微镜下(150倍), 用持卵针固定山羊卵母细胞, 并把第一极体调整到“3”点钟位, 将去核针对准第一极体刺入透明带, 在卵周隙中把第一极体连同极体下方的胞质(约1/3)一并吸入去核针。随即退出去核针, 把第一极体连同中期板一并去除。

**移核:** 在操作液中将去核针中第一极体和中期板排出后立即从右上方的细胞悬浮液滴中选择一个优良的塔尔羊体细胞再从卵母细胞透明带上去核时所作切口插入, 把细胞移入卵周隙并和卵质膜紧贴。

**移核卵漂洗:** 在一组卵去核和移核完成之后在体视镜下把移核卵从操作液中吸出, 在经平衡后的M16基质中漂洗6~9次, 洗净操作液。

**移核卵的暂短培养:** 洗净的移核卵在M16基质中培养半小时, 让受损卵质膜修复。

## 2.2.4 融合

采用电融合的方法在融合液中将去核卵母细胞和成纤维细胞融合，融合条件：  
1.5kV/cm，80 $\mu$ s，电击3次。

- a) 在融合槽内加入 1ml 左右预温平衡 2 小时的融合液，准备融合；在硅化玻璃平皿中作 50 $\mu$ l 的融合液微滴 3~4 个（在加热板上）。
- b) 吸出 4 枚卵，在融合液滴中洗涤（3~4 次）后移到融合槽内，把卵与融合槽内的白金丝平行排列。在解剖镜下将每个卵调整至清晰可见供核细胞，且供核细胞与卵膜的接触面与融合槽内的白金丝呈平行放置，连续三次电刺激，间隔 1 秒。
- c) 在硅化玻璃平皿做 50 $\mu$ l 的 M16 微滴 3~4 个，把经电刺激过的卵移入 M16 液滴中洗涤 3~4 次，最后移到 M16 液的方杯中置培养箱内培养。
- d) 融合卵的评定：卵全部融合结束后 30 分钟，检查卵的融合情况。融合卵随即挑出，移入 M16 基质中作暂短培养 4~5h。

## 2.2.5 激活

采用 5 $\mu$ M 离子霉素处理 5min，2Mm 6-D 处理 5h，置于胚胎培养基中培养 10-12h。

- a) 从 CO<sub>2</sub> 培养箱中取出暂短培养后的重构卵，把卵在离子霉素激活液中漂洗 1~2 次。随即移入含离子霉素激活液（2.0ml）的方杯中（含离子霉素 5 $\mu$ mol/L、CB 7.5 $\mu$ g/ml）。置 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 5 分钟。在平皿中做 9~10 个 6-DMAP 激活液液滴（每个 50 $\mu$ l）。
- b) 从 CO<sub>2</sub> 培养箱中取出经离子霉素激活的卵，随即在 6-DMAP 激活液中连续洗涤 9 次以上，充分洗净离子霉素，再移入含 6-DMAP 激活液 2.0ml（含 6-DMAP 2mM CB 7.5 $\mu$ g/ml）的方杯中，置 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 5 小时。
- c) 从 CO<sub>2</sub> 培养箱中取出经 6-DMAP 激活的重构胚，随即在 M16 液滴中连续漂洗 9 次以上，充分洗净 6-DMAP，再移入含 M16 基质 2.0ml 的方杯中培养 5~8 小时，供作琼脂糖包埋后体内培养用。

## 2.2.5 异种克隆胚胎的体外培养

融合的胚胎置于山羊体外发育液mKSOM<sup>[73]</sup>中培养,培养条件,38.5℃,5%CO<sub>2</sub>,饱和湿度。每隔48小时换液1次,48小时后GKSOM培养液中添加5%FBS,观察发育时序和囊胚发育率。

## 2.2.6 异种克隆胚胎的体内培养<sup>[25]</sup>

### 2.2.6.1 包埋

a) 把每次要包埋的卵(通常每次在第一层包埋块内包埋3~5个卵)移入35mm平皿中的血清内,平衡3分钟左右。

b) 从水浴锅内取出含1%琼脂糖凝胶试管,倾入1ml左右,移入在恒温板上的35mm硅化平皿中,制成凝胶液滴。

c) 第一层包埋,选较细的吸卵管(内径约200 $\mu$ m)把卵从PBS+FBS液中移入35mm硅化平皿中的凝胶液滴内,吹吸一次,把卵稍加漂洗,随后依次逐个把卵和凝胶一并吸入管内,卵排列需整齐,卵之间的距离大约为半个卵(估计100 $\mu$ m),并不停地反复在管内吹吸移动直到胶凝固为止,然后吹入原加有PBS+FBS的35mm平皿内。

d) 第二层包埋,选较粗一点的吸卵管(内径约250 $\mu$ m),从35mm平皿内吸入包卵的胶条再在1%琼脂糖胶液滴中重复一次,包第二层胶。

e) 把已经凝固的胶条,用更粗的吸卵管(内径>300 $\mu$ m)把二次包埋卵的胶条移入含M16基质的方杯中,待移植。

### 2.2.6.2 体内培养

将核移植后的重构胚用1%琼脂糖包埋后沿输卵管喇叭口移入到输卵管内,缝合皮肤。6天后手术从输卵管内冲出胚胎。

a) 母山羊肌肉注射0.05mg前列腺素(中国上海计划生育科学研究所)诱导其发情。发情后一天,肌肉注射40mg静松灵,沿腹中线手术打开腹腔暴露卵巢和输卵管,用手术线结扎子宫和输卵管连接处。观察排卵点。

b) 吸琼脂糖包埋块:移植管按以下顺序抽吸,空气、培液、空气、培液、空气、包埋块、空气、培液。

c) 移植:轻轻拎起输卵管伞,看清输卵管喇叭口,移植管顺伞的内侧面下滑进入喇叭口,用眼科镊轻拨输卵管壁,让移卵管前伸,至少要绕过2~3个弯曲,并将移

植管前方的输卵管引直，推动微量注射器活塞，把包埋块注入输卵管腔，然后徐徐退出移植管。移毕，告知记录移入输卵管的部位（左侧或右侧），移入的块数和每块中含有的卵数。

d)术者在输卵管和宫角连接部作双重结扎。把显露的宫角、输卵管、卵巢一并纳入腹腔，整理好大网膜。腹壁缝合。

e)注射青、链霉素。术后注射抗菌素三天，在体内培养五天。

f)回收：麻醉、手术径路和卵巢、输卵管、宫角的显露同卵的回收，理清输卵管和子宫卵巢系膜，用两把弯头止血钳和输卵管平行夹闭子宫卵巢动脉并固定好卵巢子宫系膜，在止血钳的内侧把卵巢、子宫系膜连同卵巢伞、输卵管和结扎部后方约0.5cm的宫角尖部一并切下，稍用生理盐水冲洗、去除血液送实验室回收包埋块。

g)输卵管在生理盐水中漂洗一次，进一步清除血液。用眼科剪仔细修理子宫卵巢系膜，并引直。输卵管喇叭口一端置于圆杯内，另一端（结扎部）拎起，用吸满PBS液的5ml注射器针尖从第一道结扎线的前缘穿入输卵管腔，推动活塞，把输卵管内的琼脂块逆向冲入圆杯内。在体视镜下检查回收结果，观察胚胎发育情况。

### 2.2.7 数据统计

细胞周期分析结果用平均数±标准差表示，t检验分析显著性差异（ $P < 0.05$ ）。

## 2.3 实验结果

### 2.3.1 塔尔羊异种间重构胚胎的附植前发育

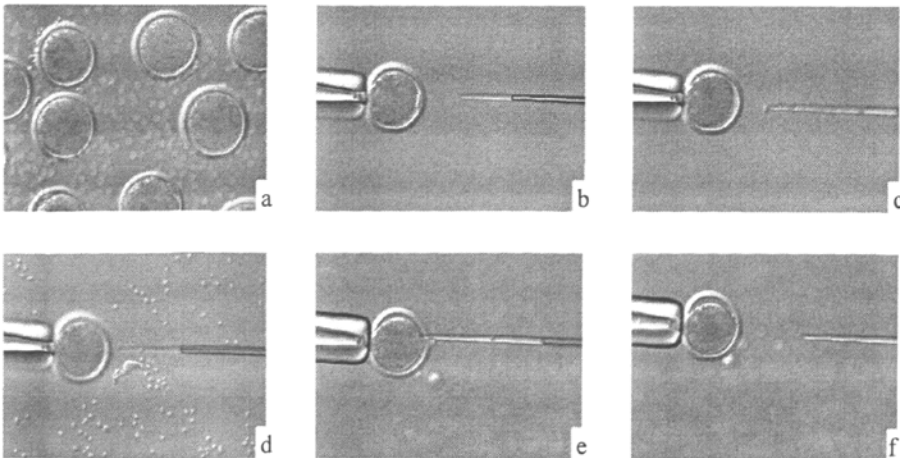


图8 体细胞核移植过程

a MII 期卵母细胞和供核细胞 b 持卵针系住卵母细胞 c 注射针吸取染色体中期板及第一极体; d 注射针吸取1个细胞 e 进针, 轻吹, 将细胞推至卵周隙 f 轻轻退针, 完成操作。

Fig.8 protocol of somatic cell nuclear transfer

a, goat oocytes and tahr donor cells; b, holding the oocytes and the state of the first polar body; c, sucking out the spindle and the first polar body; d, selecting the donor cell; e, injecting the donor cell; f, gently pushing out the needle.

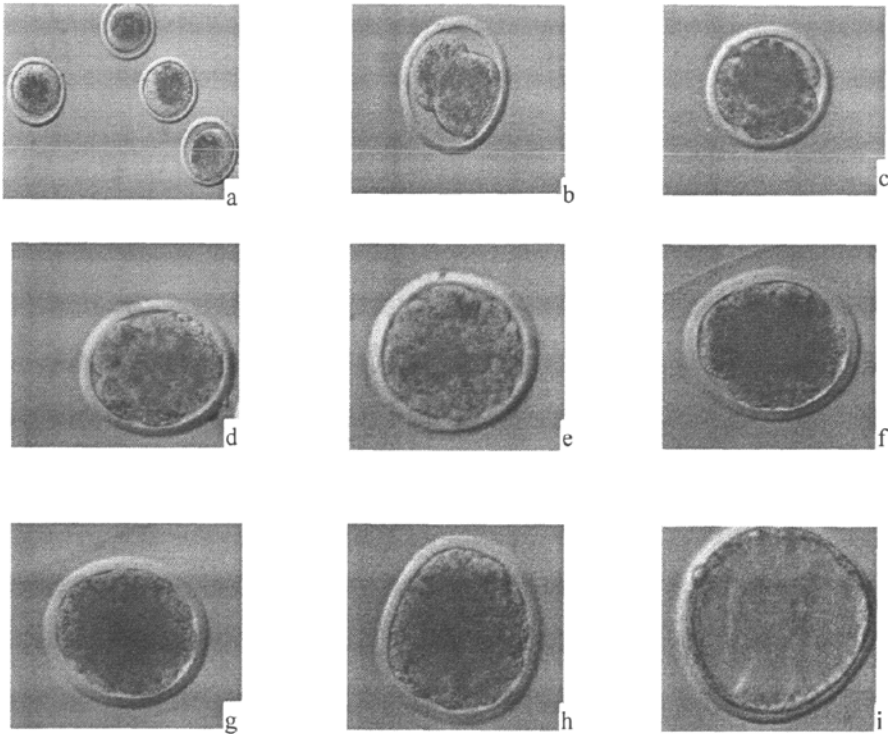


图9 塔尔羊异种体细胞克隆胚胎的附植前发育 a 激活后的重构胚胎 b 2-细胞期胚胎 c 4-细胞期胚胎 d12-细胞期胚胎 e 16-细胞期胚胎 f 32-细胞期胚胎 g 64-细胞期胚胎 h 桑椹胚 i 扩张囊胚。

Fig.9 Development of the tahr interspecies cloned embryos in vitro a, constructed embryos after activation; b, the constructed embryo at 2-cell stage; c the constructed embryo at 4-cell stage; d the cloned embryo at 12-cell stage; e the cloned embryo at 16-cell stage; f the cloned embryo at 32-cell stage; g the cloned embryo at 64-cell stage; h, cloned moulva embryo; i, the expanded cloned blastocyst.

塔尔羊异种重构卵在激活后约 30h 第一次分裂, 发育阻滞发生在 8—16 细胞阶段, 体外培养约 156 小时后发育到囊胚阶段, 8 天时囊胚完全扩张, 9—10 天囊胚出壳。

### 2.3.2 不同培养方式对种间重构胚胎发育的影响

异种克隆塔尔羊胚胎激活、包埋后移入到山羊输卵管内培养 6 天，其卵裂率高于体外培养组，囊胚发育率也明显高于体外培养组 ( $P < 0.05$ )，暗示山羊输卵管具有优于体外培养，模拟了塔尔羊胚胎体内的早期发育环境，含有更适合异种胚胎的发育的微环境。同时，体外培养胚胎的桑椹胚比例较高，存在桑椹胚细胞数少，不压实，分裂不均等情况，可见体外培养系统对于囊胚腔的形成有一定的影响。

表 2 不同培养方式下塔尔羊异种重构胚胎的发育

培养方式	培养重构卵数	卵裂数	桑椹数	囊胚数
体内培养	24	21 (87.5%)	2(8.33%)	4(16.67%) <sup>a</sup>
体外培养	22	17(77.27%)	3(13.64%)	1(4.66%) <sup>b</sup>

注：字母不同者标示差异显著 ( $P < 0.05$ )

### 2.3.3 不同供核细胞处理方法对种间重构胚胎附植前发育的影响

对于供核细胞复苏后培养 3 天（生长丰度 80%—85%左右），饥饿 48 小时与细胞生长汇合 24h 两种不同的处理方法，异种重构胚胎的囊胚发育率基本相似。两种方法的供核细胞 G0 / G1 期比例基本一致，表明了供核细胞的两种处理方法均可以使供核细胞与 MII 期卵母细胞周期具有相容性。

表 3 不同供核细胞处理方法下塔尔羊异种重构胚胎的核移植效率比较

供核细胞 处理方法	重 构 卵 数	融合后存活 数	包埋数	回收数	卵裂数	桑椹 / 囊胚 发育率
血清饥饿 48h	77	62(80.52%)	58(93.55%)	55(94.83%)	50(90.91%) <sup>a</sup>	15(27.27%) <sup>a</sup>
汇合丰度 90 - 100 %	56	41(73.21%)	39(95.12%)	39(100%)	32(82.05%) <sup>a</sup>	11(28.21%) <sup>a</sup>

注：字母不同者标示差异显著 ( $P < 0.05$ )

### 塔尔羊种间克隆胚胎与奶山羊种内克隆胚胎发育的比较

异种体细胞克隆胚胎发育试验结果表明，塔尔羊成纤维体细胞可以在山羊卵母细胞胞质完成重编程，获得附植前发育到囊胚的能力（见图 9）。虽然在重编程效率上，异种间（塔尔羊—山羊）核移植重构胚的囊胚发育率低于种内克隆胚胎（见表 4）。

表4 山羊卵母细胞重编程异种体细胞与同种体细胞能力的差异

重构胚类别	卵母细胞数	重构卵数 (%)	融合后存活数 (%)	激活后包埋数 (%)	回收卵数 (%)	卵裂数 (%)	桑椹/囊胚数 (%)
奶山羊 - 奶山羊	381	367 (96.32)	277 (75.48)	255 (92.06)	243 (95.29)	207 (85.19) <sup>a</sup>	108 (44.44) <sup>a</sup>
塔尔羊 - 奶山羊	416	364 (87.5)	272 (74.73)	253 (93.01)	247 (97.63)	214 (86.64) <sup>a</sup>	75 (30.36) <sup>b</sup>

注：字母不同者标示差异显著 (P<0.05)

## 2.4 讨论

### 体内成熟卵母细胞发育潜能优于体外成熟卵母细胞

对于异种体细胞核移植而言，还涉及到对于卵母细胞异种的选择，研究认为塔尔羊与山羊的遗传相关较强，甚至认为古老的塔尔羊可能是山羊的祖先。因此，本实验中，我们采用了奶山羊的卵母细胞作为供质来源。

尽管研究发现，供核细胞的类型，遗传背景，激活的方法，核移植的操作方法，重构胚的培养方法对于体细胞核移植胚胎早期发育具有一定的影响，但是卵母细胞是提供重编程体细胞和早期胚胎发育的因子和环境所在，其卵母细胞的质量对于体细胞核移植具有决定性的因素之一。

卵母细胞的来源有三种，采用超数排卵从活体内采集体内成熟的卵母细胞，从屠宰动物卵巢上采集窦状卵泡经体外成熟，经超声波引导穿刺活体动物卵巢卵泡体外成熟获得<sup>[74]</sup>。实验证实，体外成熟的卵母细胞尽管根据形态学标准选择优质卵，但其发生的着床前胚胎染色体异常，着床后丧失率，胎儿过大综合症等的发生率远较体内成熟的卵母细胞要高得多，甚至对出生后发育都会带来影响<sup>[75]</sup>。相对而言，采用超排从活体回收的卵在质量上可以得到基本保证。Wells(1997)研究了体内成熟卵母细胞和体外成熟卵母细胞作为胞质来源，移植胚胎细胞后，两者重构胚胎的囊胚率与出生率差异显著(体内成熟的胞质均显著高于体外成熟)<sup>[76]</sup>。本实验在LHRH注射后26-28h回收卵母细胞，正常成熟的优质卵已经基本排放。其中可见第一极体的占80~90%，第一极体和中II期染色体对位一致或相互紧邻的约占88%。线粒体，呈簇状、分布于皮质区，帽状、钩状、多嵴，皮质颗粒分布在卵质膜周缘。这

些指标提示, 卵母细胞在此时胞质具有较高活性, 并以第一极体作定位标志去核率可达 70%以上。在此时期排出的卵母细胞外围具有卵丘细胞和光卵之间的比例为 3:7。在本实验中, 回收卵母细胞第一极体排放在 90%以上, 总的可用于核移植率 93%。而在山羊卵母细胞的体外成熟率仅在 70%左右, 其同种体细胞核移植的融合率, 囊胚发育率均低于体内成熟的发育率。(内部资料)

两种卵母细胞在融合率与支持重构胚早期发育能力的差异和胞质成熟度, 密切相关。卵母细胞排放第一极体并不能够表明其胞质具有充分的发育能力, 在显微结构上表现为微绒毛的长度, 疏密等, 这和供核细胞的捕获, 融合率的高低直接相关。而体外成熟的卵母细胞胞质内某些蛋白质, 母源性 mRNA 的缺乏可能是其低发育潜能的主要原因, 这和体内、外卵母细胞成熟的微环境有关, 卵巢卵泡微环境为卵母细胞的成熟提供多种营养物质, 不断变化的多激素比例, 以及时空上多种成熟信号的调节等等。这些都是体外成熟所不具备的。

大约 50—80%的体内成熟的卵母细胞发育至囊胚<sup>[77,78]</sup>。相反, 体外成熟的卵母细胞的囊胚发育率为 15—40%<sup>[79,80]</sup>。体外成熟来源的卵母细胞受精后出生的羔羊、转基因牛与体内成熟来源的卵母细胞受精后出生的羔羊、牛具有更重的体重<sup>[81,82]</sup>。体外成熟可能影响牛卵母细胞的甲基化模式, 并最终植入后影响胚胎和胎儿发育<sup>[83]</sup>。山羊卵母细胞胞质可以重编程塔尔羊成纤维体细胞并支持其附植前发育

本实验的研究表明, 塔尔羊耳成纤维细胞可以在山羊 MII 期卵母细胞中去分化, 30.46%的重构胚胎可以发育到囊胚阶段。这是首次开展的关于塔尔羊异种克隆的试验。

目前, 异种克隆的研究的胞质受体研究多见于牛、兔, 绵羊, 山羊等家畜的卵母细胞。Dominko(1999)报道绵羊、猪, 猴, 大鼠的成纤维细胞可以在牛卵母细胞内重编程并完成早期发育<sup>[26]</sup>。其后的研究发现, 水牛<sup>[84]</sup>, 牦牛、羚牛<sup>[72]</sup>, 印度野牛<sup>[32]</sup>, 白臀野牛<sup>[85]</sup>, 狗<sup>[86]</sup>, 小鼠<sup>[87]</sup>, 人<sup>[33]</sup>的体细胞都可以在牛的卵母细胞内发生重编程, 并且发育到囊胚阶段。陈大元等报道了大熊猫的乳腺上皮细胞移入去核的兔卵母细胞内可以发育到囊胚阶段, 发育率为 11.7%。此后, 人一兔重构胚的早期发育潜能也被报道<sup>[34]</sup>。



山羊的卵母细胞作为胞质供体的异种核移植研究较少, 仅见于2007年使用山羊卵母细胞胞质, 藏羚羊为供核细胞的异种间核移植研究, 体外成熟的MII山羊卵母细胞可以支持重构胚发育到囊胚阶段, 发育率4.0%<sup>[69]</sup>。另外, 人-山羊异种重构胚的发育潜能也被报道, 人的胚胎成纤维细胞移入去核的山羊卵母细胞中, 重构胚胎激活后体外培养卵裂率为51.33%, 桑椹胚胎发育率9.73%, 未能获得囊胚<sup>[88]</sup>。我们的研究表明, 猪, 兔, 塔尔羊, 人的耳成纤维细胞与山羊去核体内成熟的卵母细胞构建的重构胚胎, 其融合率分别为71.4%, 71.62%, 74.73%, 87.50%, 在山羊输卵管内培养后其囊胚发育率分别为26.67%, 11.11%, 30.46%, 4.69%, 其发育到囊胚的时间分别为5天, 6天, 6.5天, 7天, 表现出明显的种属差异性, 但是前三次的卵裂时间基本一致(内部资料)。这说明山羊的卵母细胞可以作为重编程多种体细胞的胞质供体, 支持异种核质去分化并完成早期发育; 山羊的卵母细胞胞质重编程体细胞的因子存在高度保守性, 但是重编程能力似乎随着遗传距离的增加而下降。

山羊输卵管体内培养可以获得异种重构胚的附植前高发育率

我们将塔尔羊-奶山羊异种核移植胚胎包埋后移植到奶山羊的输卵管内培养6天后获得了高的囊胚发育率, 明显高于体外培养组。此外, 我们还曾将牛的核移植胚胎, 人-山羊, 猪-山羊, 兔-山羊的异种核移植胚胎移植到山羊的输卵管内培养后均获得高于体外的囊胚发育率(内部资料)。

输卵管内培养的方法早在1986年Willadsen研究绵羊胚胎细胞核移植的研究报道<sup>[89]</sup>, 随后因为其程序复杂, 手术操作环节多而逐渐被体外培养体系取代<sup>[90]</sup>。但是, 这种培养系统在我们实验室一直被保留。就一个受精卵而言, 在正常的着床前发育过程中, 除细胞分裂增殖以外, 还要经历基因组激活, 胚胎细胞间的压实作用, 以及第一次分化形成囊胚等重要事件。一个早期胚胎在正常发育过程中, 这些事件都是由输卵管和子宫在某一特定时期把发育的信号和营养信号不断供给胚胎, 其中包括O<sub>2</sub>的张力, 温度、PH、渗透压, 以及若干细胞因子的不断改变才能正确调控胚胎的发育。因此, 输卵管中微环境的动态变化和胚胎的发育进程是同步的。山羊输卵管内培养可以模拟不同物种的体内培养微环境, 从而在时空协调胚胎发育所需的外在多种因素使得胚胎在适宜的条件下经历早期发育的各个事件, 从而获得高的早期

发育率，同时对后期的着床，妊娠甚至克隆动物的出生后的生长起到正效应<sup>[25,91]</sup>。

对早期胚胎发育所需的微环境的了解是不完全的，所采用的各种培养环境（即条件）更多的是凭经验，这就不可避免地把一系列不协调的信号供给胚胎，首先使胚胎在代谢上发生紊乱，继而涉及基因组，尤其是当这种紊乱和胚胎基因组激活相一致时，这种紊乱不仅迅速加剧，而且可导致一系列连锁反应，使胚胎发育异常。表现在发育延迟上（其中尤其在基因组激活之后），胚胎细胞压实不紧，囊胚发育质量差，其中最突出的是内细胞团细胞减少，滋养层细胞和内细胞团细胞的比例失调等等<sup>[92]</sup>。培养环境对早期胚胎发育的影响不仅仅限于发育成囊胚的比例，更重要的是影响到囊胚的质量<sup>[92]</sup>。主要影响包括以下十个方面<sup>[93]</sup>。

第一，囊胚的染色体倍性紊乱，在体外产生的囊胚中，由二倍体细胞和多倍体细胞组成的混合倍体胚胎可达 72%，这种囊胚含多倍体细胞低于 8%的占 83%，在 11-25%之间的占 13%，超过 25%的占 4%。而体内产生的囊胚出现混合倍体的胚胎只有 25%，囊胚含多倍体细胞的比例不足 10%。此外，出现二倍体细胞和非整倍体细胞（如三倍体细胞）组成的混合倍性囊胚，体外产生的囊胚发生率也高于体内产生的囊胚。这类含有多倍体细胞比例过高的囊胚和非整倍体细胞的囊胚常在着床过程和着床后丧失。

第二，核仁蛋白的状态，早期胚胎发育过程中包括核糖体 RNA (rRNA) 在内的基因组依次被激活，但在体外培养条件（尤其是在添加血清的基质中）下可产生异常的 rRNA 基因激活，使关键的核仁蛋白缺乏正确定位。

第三，不适宜培养条件的上行调控出现胚胎细胞凋亡，细胞增殖减少，内细胞团细胞和滋养层细胞的比例改变。例如胚胎在含犊牛血清中培养常和凋亡的活性增加并囊胚细胞数减少有关。显然，这些变化都可影响后续胎儿的发育。

第四，应激敏感基因表达，应激敏感基因在着床前胚胎发育中履行若干保护作用，其有序表达严格控制发育的核点，使在细胞增殖期间发生的众多发育事件同步有序发生，一些受损细胞及时修复。发生过度生长的细胞减慢或停止增殖或选择性地发生细胞死（凋）亡，促使胚胎正常生长。在不良环境条件（尤其是在应用血清的培养基）作用下，gadd153 (CHOP-10)、gas5 和 gas6 等应激敏感基因的失调控，

可导致某些不需的细胞（或细胞谱系）保留而某些需要的细胞（或细胞谱系）退化。造成发育延迟或发育畸形。

第五，调控生长的配体/受体基因表达失调，目前已发现和基因印迹有关的很多基因表达改变，例如 Grb7、H19、IgF-2r 等，导致短期和长期发育改变和破坏，如胎盘发育不全，胎儿过大等等。

第六，细胞压实和囊胚形成，包括 Cx-43 间隙连接蛋白基因在内的表达异常，牛胚胎在整个发育期间都能检测到 Cx-43 mRNA 转录本。在添加血清基质中培养的胚胎在 8-16 细胞期和囊胚出壳期之间缺乏 Cx-43 mRNA，从而导致压实不良、最终难以出壳。

第七，蛋白和氨基酸代谢改变使胚胎从基质中吸收不良，从而导致蛋白量减少，还有可能胞内氨基酸池也缺乏。

第八，超微结构改变，牛胚胎在含血清基质中培养到囊胚期，胚胎甘油三酯量增加近两倍，并且这种脂质包含体是桑椹和囊胚的一个特征。这和外源性衍生的脂质倾向于富含多非饱和脂肪酸有关，继而形成一种线状（牛、羊和猪胚胎）脂质链。这除可导致胚胎对冷冻的耐受性降低以外，还有提高氧化性损害的危险，危及线粒体功能和结构，如滋养层的顶部微绒毛发育不良等。

第九，线粒体的活性。易受游离辐射和其它应激因子损害。体外产生的桑椹胚线粒体量较体内产生的要少，但脂质增加，胚胎氧化磷酸化作用改变，有可能导致对脂质利用不良和发生退行性变化的危险。

第十，胚胎信号发放，如干扰素产生改变，这是胚胎对亚适宜培养条件的一种应激应答反应，可危及建立妊娠的能力。

在牛和小鼠，使用不同的培养系统产生的胚胎导致的不仅是附植前阶段代谢、生长相关基因的表达异常，并且改变了孕体、胎儿出生后的发育<sup>[82,94,95]</sup>。

不同供核细胞处理方法并不影响异种克隆胚胎的附植前发育能力

应用血清饥饿法把供核细胞的细胞周期调整到 G0/G1 期，与中 II 期卵母细胞匹配产生克隆后代在哺乳动物克隆中已普遍应用，并证实是有效的，对用成纤维细胞作供核似乎已成为一种常规<sup>[1][25][96]</sup>。

山羊的胎儿成纤维细胞在 10% FBS 基质中培养贴壁后 G0 期的细胞占 70% 左右, 转入 0.5% 血清中饥饿 24 小时, G0/G1 期的细胞已达 90%, 在随后继续培养的四天中 G0/G1 期的细胞其变动为 90~92% 之间<sup>[97]</sup>。牛的胎儿成纤维细胞在 10% FCS 中培养, 前 48 小时 DNA 合成一直保持在最高水平, 但到 72 小时, 随着细胞的铺满, DNA 合成降低到只有 50% 左右的水平。但改在 0.2% 血清中培养时, DNA 合成的水平在培养 24 小时时只有原有的 21% 左右, 到 48 小时时只有原水平的 3%, 如继续培养到 72 小时也不会再降低<sup>[98]</sup>。本实验中, 85% 细胞丰度的塔尔羊成纤维细胞在饥饿 48h 后 G0/G1 期的细胞已达到 91%。

上述的实验证实, 哺乳动物的体细胞在采用血清饥饿法调整细胞周期时, 细胞的丰度保持在 80~85% 左右, 在含 0.5% FCS 基质中饥饿培养 48 小时, 已可保证有 90% 上的细胞处于 G0/G1 期, 并可以把细胞凋亡的发生率限制在最低程度。尽管血清饥饿会导致胎儿成纤维细胞凋亡, 但只要把添加血清的浓度控制在 0.5% (培养五天只细胞瓦解只有 7%), 细胞的丰度控制在 80~85%, 并且饥饿的时间控制在 48 小时(此时凋亡基因 Bak 和 Bax 转录本虽已增加, 但抗凋亡基因转录本 Bcl-x1 转录本仍有较高水平), 就可把细胞凋亡控制在最低限度。本实验中塔尔羊耳成纤维细胞丰度 (85%) 血清饥饿 48h 后, 细胞凋亡比例在 3% 左右证实了这一点。进一步延长饥饿培养时间不仅不会使 G0/G1 期的细胞在比率上发生有意义的升高, 更不可能达到 100%, 相反, 可导致细胞凋亡的发生, 从而影响重构胚的发育能力。

但是, 近年来的研究发现, 血清饥饿并非体细胞核移植所必须的。细胞周期检测结果表明, 当细胞丰度达到 80% 以上时, 其中细胞达到 G0/G1 期的比例为 85%; 而通过“汇合”法或者挑选 18-20 $\mu$ m 的细胞时, 其 G0/G1 期的比例为 95% 以上<sup>[99]</sup>。Gao (2003) 等研究表明采用生长丰度达到 80% 以上的中等大小的细胞克隆, 其效率与血清饥饿法无差异<sup>[100]</sup>。这与本实验的研究中采用 95% 的丰度, 中等大小的塔尔羊成纤维细胞核移植效率略高于血清饥饿组相一致 (28.21% VS 27.27%); G0/G1 期的比例为 91%, 同时细胞凋亡检测发现, 汇合法的细胞凋亡比例低于血清饥饿组, 这与牛上结果一致<sup>[101]</sup>。

异种塔尔羊重构胚胎早期发育能力与种内重构胚的发育能力差异显著

塔尔羊异种重构胚胎的囊胚发育率低于种内重构胚的发育率, 差异显著。喜马拉雅塔尔羊与山羊同属于牛亚科羊族, 但属于不同属。喜马拉雅塔尔羊属于塔尔羊属, 奶山羊属于山羊属。两种供核细胞的遗传差异, 细胞核-胞质的相互作用的程度决定了重构胚的发育效率, 尽管两者的遗传相近。2007年, 野牛-牛, 野牛×牛杂种-牛, 牛-牛的体细胞核移植的研究表明, 野牛-牛的异种克隆胚胎囊胚发育率低, 发育迟缓, 细胞数目少, 异常凋亡的基因表达增殖, 而当一部分核基因组与胞质遗传相一致时, 发育潜能改善, 暗示核识别胞质组分对于胚胎正常的细胞功能和发育非常重要<sup>[102]</sup>。2007年, 本实验室的研究同样表明改变胞质组分的遗传背景同样可以提高亚种间异种重构胚的发育潜能。在波尔羊-奶山羊, 波尔羊-波×奶山羊杂交羊, 波尔羊-波尔羊的异种重构胚的发育能力比较中, 我们发现杂种羊来源的胞质显著改善了波尔羊亚种间重构胚的发育能力, 三组的早期囊胚发育率分别为34.6%, 50%, 41.4%, 羔羊的出生率分别为2.8%, 5.5%, 8.7%<sup>[25]</sup>。上述试验结果, 表明核质相容性对于异种重构胚胎发育潜能的重要性, 而核质相容的主要内容是核基因组与胞质遗传物质线粒体DNA的相容性。这种相容性是互补的: 不论是改善核的受体细胞胞质对供体核的相容性, 或是改善供体核对卵胞质体的相容性, 均能提高移植前的囊胚发育率, 使克隆胚胎着床后的妊娠丧失率显著下降, 并最终成倍提高亚种间克隆后代出生率<sup>[25]</sup>。如何提高异种核移植尤其是治疗性克隆中胞质线粒体DNA与核遗传物质的相容性, 已经成为改善异种克隆胚胎发育效率的一大课题。

## 小结

体内成熟的山羊卵母细胞可以重编程塔尔羊耳成纤维细胞, 并支持其完成早期胚胎发育;

异种重构胚在奶山羊输卵管内培养可以获得高的囊胚发育率;

血清饥饿并非必需, 成纤维细胞汇合后用于体细胞核移植后重构胚发育率与血清饥饿无差异;

异种塔尔羊重构胚的囊胚发育率低于种内重构胚。

### 第三章 异种重构囊胚遗传学鉴定与线粒体组成检测

对于异种间重构囊胚的遗传学检测方法可以有两种,如果供核细胞染色体数目与受体卵母细胞染色体数目不同,可以采用细胞遗传学方法分析染色体核型,结果易于判定;如果染色体数目相等,则可以采用已知的微卫星座位的多态性进行分子遗传学鉴定<sup>[103]</sup>。

但是,由于喜马拉雅塔尔羊的研究较少,目前既无其染色体核型分析的报道,也无相关微卫星座位的分析。结合本实验的实际情况,我们所采用的细胞来源为雄性塔尔羊,则在核型分析中应该存在 Y 染色体,区别于 X 染色体,同时 Y 染色体携带 SRY 性别决定基因,这一基因具有物种间高度保守性<sup>[104]</sup>。因此,我们通过异种重构囊胚的染色体核型分析以及 SRY 基因的扩增鉴定异种重构囊胚核遗传物质来自雄性塔尔羊成纤维细胞。

另外,我们根据喜马拉雅塔尔羊线粒体细胞色素 B 基因的序列(Genbank: AF034733)与奶山羊线粒体细胞色素 B 基因序列(Genbank: AB004075)的差异,设计通用引物和塔尔羊特异引物分别扩增异种重构囊胚的胞质线粒体 DNA,采用位点特异 PCR 法(AS-PCR)分析塔尔羊异种重构胚的胞质遗传的组分<sup>[105]</sup>,进一步证实异种重构囊胚的塔尔羊成纤维细胞来源,同时检测异种重构囊胚的线粒体组成。

#### 3.1 实验材料

##### 3.1.1 试剂

Taq 酶购自 Promega 公司。EcoV 内切酶 B&D 公司。T/E, M2, Protease 酶, Tyrode 液,秋水仙素 sigma 公司。FBS 购自 GIBCO,其它均为国产分析纯。

##### 3.1.2 试剂配制

TE 缓冲液 (PH 8.0): 10mmol/L Tris-Hcl (PH 8.0) 1mmol/L EDTA (PH 8.0)

DNA 提取液: 10mmol/L Tris-Hcl (PH 8.0) 100mmol/L EDTA (PH 8.0) 100mmol/L Nacl 1%SDS。

1×TAE 缓冲液: 25mmol/L Tris 250mmol/L 甘氨酸(电泳级)(PH 8.3) 0.1%SDS。

细胞mtDNA 提取液 溶液A: 含50mmo l/L葡萄糖,25mmo l/L TrisCl, 50mmo l/L

EDTANa<sub>2</sub>, pH8.0。溶液B: 0.12mo l/L NaOH 含1%SDS (临用前用5mo l/L NaOH 和 10%SDS 贮存液配制)。溶液C: 3mo l/L 醋酸钾液, pH5.40, 含5mo l/L 醋酸根离子。

### 3.1.3 试验仪器

Biometra<sup>®</sup> TCRADIENT PCR 仪、Centrifuge 5804R 冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)。

## 3.2 试验方法

### 3.2.1 细胞 DNA 提取

消化, 离心细胞置于 1.5ml endperoff 管中, 加入 600ul 组织 DNA 提取液, 蛋白酶 K (5mg/ml) 至终浓度 100ug/ml 和 RNase (2.5mg/ml) 至终浓度 50ug/ml, 55℃水浴过夜, 苯酚: 酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1), 氯仿: 异戊醇 (24: 1), 各抽提 1, 2, 1 次, 每次 12000r/min 冷冻离心 10min, 吸上清至新的 1.5ml 离心管。然后加入上清液 1/3 体积 (PH 5.2) 的 3mol/l NaAC 混匀后加入 2 倍体积预冷无水乙醇沉淀 DNA, 70%乙醇洗 1 次。自然干燥后, 100ul TE (PH8.0) 重悬沉淀 DNA 至充分溶解。紫外分光光度计检测浓度、纯度。

### 3.2.2 细胞 m tDNA 的制备程序

- a) 细胞沉淀中加入, 4℃的溶液A 0.2ml吹吸彻底混匀, 冰浴1—2分钟。
- b) 加入常温溶液B 0.4ml 缓慢颠倒10次, 冰浴10分钟。
- c) 加入0℃溶液C 0.3ml 缓慢颠倒10次, 冰浴30分钟。
- d) 反应完毕的溶液以10000g离心10分钟, 取上清, 经等体积T ris 饱和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1) 抽提,
- e) 10000g 离心10分钟, 取水相, 加2倍体积无水乙醇混匀冰浴30分钟, 15 000g 离心 10分钟,
- f) 用70% 冷乙醇漂洗沉淀, 同前离心2分钟, 去上清, 干燥m tDNA, 用适量TE (pH8.0) 溶解, -20℃保存。

### 3.2.3 单个囊胚 DNA 的提取

将单个囊胚放入 10ul 的 TE 中, 沸水浴 10 分钟即可用于 PCR 扩增的模板。

### 3.2.4 异种重构囊胚的 Y 染色体鉴定

发育到囊胚期的异种重构胚采用 pronase-Tyrode'S 法去除透明带后移入含有

0.04ug/ml 秋水仙碱的培养液中培养 3 小时, M2 中洗数次, 然后用 T/E 处理 5 分钟, M2 中洗 3 次后置于 40%FCS 中低渗 5—10 分钟, 连同少量低渗液将胚胎移入固定液中 (甲醇: 冰乙酸: 水=3: 1: 4) 固定 5 分钟后, 用巴斯德吸管吸取一定量的固定液和胚胎直接滴于载玻片上, 40℃恒温干燥后 6% 吉姆萨染色 5 分钟, 洗片, 室温干燥。

镜检, 计数中期分裂相数和染色体数目并指示 Y 染色体。

### 3.2.5 异种重构囊胚的 SRY 基因扩增

通过比对山羊 SRY 基因保守区序列, 设计一对引物扩增塔尔羊异种重构囊胚 DNA 的 SRY 基因。其性别是通过 PCR 扩增 SRY 基因来鉴定的, PCR 所用引物序列如下:

SRY16f (5'-CAATCGTATGCTTCTGCTATGTTTC-3'),

SRY654r (5'-CAATGTTACCCTATCGTGGCC-3')。

反应体系:	10×buffer	2.5ul
	dNTP (25mmol/l)	2ul
	引物 (25umol/l)	Upstream 1ul
		Downsream 1ul
	Taq 酶	1U
	DNA 模板	2ul (100ng)
	ddH <sub>2</sub> O	15.5ul
	final volume	25ul

程序: step	Temperature(°C)	Time	Cycle
Pre-denaturation	95°C	4min	1
Denaturation	94°C	1min	} 28
Annealing	55°C	45s	
Extension	72°C	30s	
Final extension	72°C	7min	1

PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测目的片段。



### 3.2.6 异种重构囊胚的线粒体组成检测

采用位点特异巢式 PCR 扩增, 判定塔尔羊供核线粒体与山羊胞质线粒体在异种重构囊胚的比例。

细胞色素 B 基因是线粒体 DNA 的保守基因, 我们在塔尔羊供核细胞中采用了一对山羊的保守区通用引物, 分别扩增出了塔尔羊细胞和奶山羊细胞中细胞色素 b(CYT b)基因的 357bp 的一段产物, PCR 产物送交上海英骏公司测序。

通用引物: 5' ACG CAA ACG GAG CAT CAA T 3'

5' CGT GGA GGA AGA GCA GGT G 3'

反应体系	10×buffer		2.5ul
	dNTP (25mmol/L)		2ul
	引物 (25umol/L)	Upstream	1ul
		Downsream	1ul
	Taq 酶		1U
	DNA 模板		2ul
	ddH <sub>2</sub> O		15.5ul
	final volume		25ul

程序: step	Temperature(°C)	Time	Cycle
Pre-denaturation	95°C	4min	1
Denaturation	94°C	45s	} 30
Annealing	55°C	45s	
Extension	72°C	30s	
Final extension	72°C	7min	1

PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测目的片段。

塔尔羊细胞测序的序列与山羊的 CYT b 基因序列比对, 并且找出特异差异的位点。通过在差异位点处设计一对引物, 从上一轮扩增产物(CYT b 基因的 357bp 片段)稀释 100 倍后特异性的扩增出塔尔羊的线粒体 CYT b 基因 223bp 的序列, 而这对引物无法扩增出山羊的 CYT b 基因的序列, 从而建立起检测异种重构胚胎的线粒体组成的巢式 PCR 的方法。

### 特异性引物

上游: 5' TCCTCCTACTCACAACAATA 3'

下游: 5' TGATGAATGGGAGAATGAAG 3'

反应体系	10×buffer		2.5ul
	dNTP (25mmol/l)		2ul
	引物 (25umol/l)	Upstream	1ul
		Downstream	1ul
	Taq 酶		1U
	DNA 模板		2ul
	ddH <sub>2</sub> O		15.5ul
	final volume		25ul

程序: step	Temperature(°C)	Time	Cycle
Pre-denaturation	95°C	4min	1
Denaturation	94°C	30s	} 28
Annealing	55°C	30s	
Extension	72°C	30s	
Final extension	72°C	7min	1

PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测目的片段。

通过对异种重构囊胚的 DNA 的两轮 PCR, 第一轮采用通用引物, 第二轮采用塔尔羊特异性引物扩增, 对 PCR 产物的灰度扫描, 可以检测出是否含有供核细胞的线粒体以及供核细胞线粒体的相对含量。

### 3.3 试验结果

#### 3.3.1 塔尔羊异种重构胚遗传物质检测及 Y 染色体的核型分析

随机抽取 3 个塔尔羊囊胚分析细胞的核型, 发现染色体数目为 60 条, 与供核细胞的染色体数目相同, 同时存在雄性的 Y 染色体, 可以判定是重构的塔尔羊的克隆囊胚。结果见图 10。

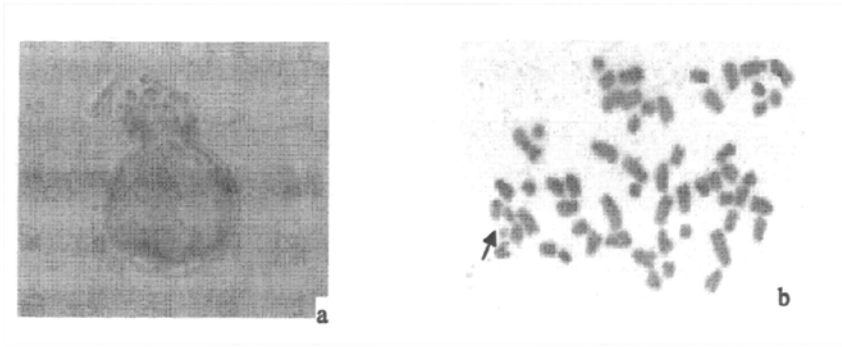


图 10 塔尔羊异种重构囊胚的核型分析 a 塔尔羊异种重构囊胚 b 塔尔羊囊胚细胞染色体 ( $2n=60,XY$ ) 箭头指示为 Y 染色体

Fig.10 The karyotype of the cloned tahr blastocyst a, the cloned tahr hatched blastocyst; b, the karvotype of the blastocvst. Y chromosome was showed by the arrow.

### 3.3.2 塔尔羊异种重构囊胚的 SRY 基因扩增

在囊胚的 DNA 扩增, 可见到特异性的约 550bp 的条带, 与供核细胞的条带一致 (图 11), 但是卵母细胞中未见到条带出现。

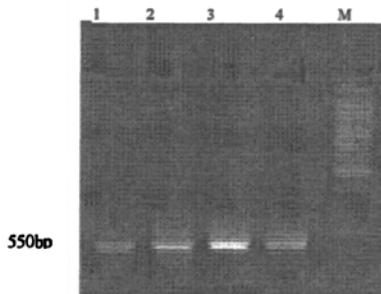


图 11 塔尔羊异种重构囊胚的 SRY 基因扩增

1 tahr 细胞 SRY 基因 PCR 产物; 2, 3, 4 为异种重构囊胚的 SRY 基因 PCR 扩增产物

Fig.11 SRY gene amplification from the tahr cloned blastocysts

1 PCR product of SRY from tahr fibroblasts; 2,3,4 PCR products of SRY from the tahr cloned blastocysts

### 3.3.3 塔尔羊异种重构胚中的线粒体分布

对于塔尔羊异种重构囊胚的线粒体分析过程中, 建立了巢式位点特异 PCR 的方法, 首先, 在细胞水平, 分别提取了山羊和塔尔羊成纤维细胞系的线粒体 DNA (图 12-a), 第一轮 PCR 采用通用的引物扩增线粒体 DNA 上的细胞色素 B 基因 357bp

的片段,两种细胞均可以扩增出特异性条带(图12-b),对PCR产物测序,筛选差别位点,设计针对塔尔羊的特异性引物;第二轮PCR采用特异性引物扩增上一轮PCR产物,仅能扩增出塔尔羊细胞色素B基因片段中221bp片段,而山羊细胞则无条带(图12-c),从而在细胞水平上建立了检测异种重构囊胚中线粒体组成的方法。

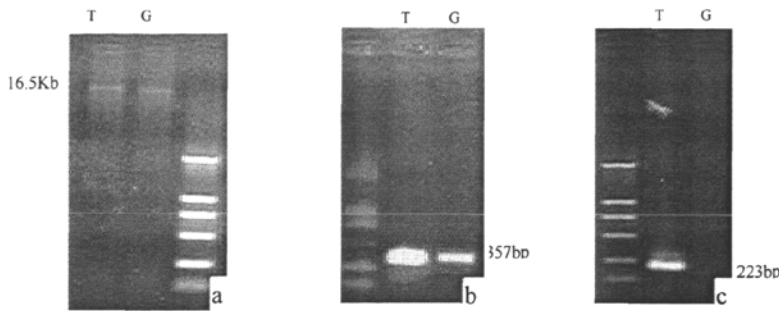


图12 巢式位点特异PCR检测异种重构胚中线粒体组成方法的建立

a 塔尔羊细胞与奶山羊细胞线粒体DNA电泳图 b 通用引物的第一轮扩增产物  
c 特异引物的巢式PCR扩增产物

Fig.12 the methode to detect the composition of the constructed blastocyst established by Nest-AS PCR  
a, mitochondrion DNA gel of tahr cells and goat cells; b, product of amplification of *cyt b* fragment by the same primers; c, product of AS-PCR by specific primers for tahr *cytb* fragment

利用已建立的巢式PCR的方法随机检测了三个塔尔羊囊胚的线粒体组成,结果表明在第一轮PCR中,分别用共同引物和特异引物扩增囊胚线粒体DNA,发现以奶山羊的线粒体为主,塔尔羊线粒体少量存在(图13-a),在第二轮巢式PCR中,特异扩增出塔尔羊细胞色素B片段,且条带量度基本一致(图13-b),计算后塔尔羊线粒体在囊胚线粒体总量中约占0.01%—0.1%。说明塔尔羊囊胚中线粒体呈现异质性,奶山羊卵母细胞来源的线粒体占大多数。

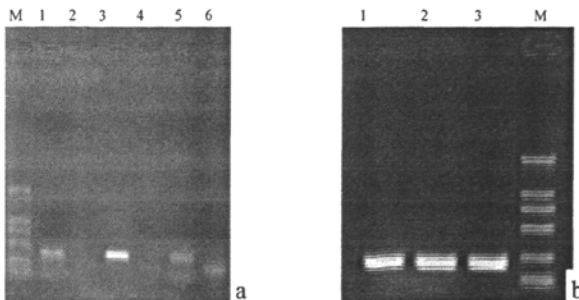


图 13 塔尔羊异种重构囊胚中线粒体组成检测

a 塔尔羊异种重构胚囊胚的第一轮扩增 1, 3, 5 泳道为 3 个塔尔羊囊胚的通用引物扩增; 2, 4, 6 泳道为 3 个塔尔羊囊胚的塔尔羊线粒体特异引物直接扩增。b 巢式扩增产物电泳 1, 2, 3 泳道为 3 个塔尔羊重构囊胚的上一轮 PCR 产物的特异性扩增

Fig.13 the analysis of the composition of tahr constructed blastocysts a product of PCR for *cytb* fragment by general primers in 1, 3, 5, line and by specific primer for tahr in 2, 4, 6 line; b, second amplification product by specific primers for tahr using the above PCR products in 1, 3, 5, line as templates

### 3.4 讨论

#### 核遗传物质的 Y 染色体分析和 SRY 基因判定异种重构囊胚来源于供核细胞

因为对塔尔羊的遗传学信息的缺乏, 我们无法获得其相关的微卫星序列检测其核遗传物质的来源是否与供核细胞一致。但是, 我们的供核细胞是来自于雄性塔尔羊, 即存在 Y 染色体。因此, 我们对异种重构囊胚进行了胚胎细胞的核型分析, 证实了 60, XY 的胚胎核型, 区别于奶山羊卵母细胞孤雌胚胎的 60, XX 的核型, 说明了异种重构囊胚遗传物质确实是来自于塔尔羊供核细胞。为了进一步证实, 我们扩增了 Y 染色体特有的性别决定基因, 发现重构囊胚与供核细胞均可扩增出 SRY 基因片段, 而卵母细胞孤雌激活的囊胚则无此条带, 充分说明了重构囊胚的核遗传物质来自于塔尔羊耳成纤维细胞。

#### 塔尔羊异种重构囊胚线粒体呈现异质性, 绝大多数线粒体来自奶山羊胞质

线粒体不仅为细胞的生命活动提供能量, 也是哺乳动物细胞唯一的核外遗传物质。线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA), 16.5Kb, 编码 37 个基因, 2 种 rRNA, 22 种 tRNA, 13 种多肽。哺乳动物 mtDNA 仅编码线粒体所需的一小部分蛋白, 大部分仍由核 DNA 编码<sup>[106,107]</sup>, 线粒体功能主要由核控制。线粒体在细胞能量供给, 细胞信号转导, 细胞凋亡, 影响胚胎、胎儿发育方面有一系列重要作用。研究表明不充分或不正确的线粒体功能严重影响异种核移植成功, 体细胞克隆胎儿通常出现的某些症状与人类临床线粒体呼吸链缺陷疾病有惊人的相似<sup>[108]</sup>。线粒体融合/裂解、线粒体代偿和 mtDNA 重构过程涉及核-线粒体相互作用, 并且在核重编程过程中线粒体可能参与某些表遗传的修饰<sup>[108]</sup>, 研究也发现异种重构胚囊胚发育过程中的发育延迟、细胞数减少、细胞凋亡以及凋亡相关基因的增殖等等胚胎瓦解过程均和线粒体

的功能相关<sup>[102]</sup>。

正常胚胎发育过程中, mtDNA 通过卵母细胞传递给后代。然而核移植重构胚共同传递受体卵母细胞 mtDNA 和供核 mtDNA。哺乳动物胚胎内线粒体 DNA 的复制起始于囊胚阶段<sup>[109]</sup>。在异种核移植中, 由于受体卵母细胞和供体核来自不同的物种、品种或品系, 目前已证实异种重构胚的线粒体存在 3 种变化模式。第一种是供体细胞线粒体随着胚胎发育逐渐消失, 受体卵母细胞中的线粒体增殖, 最后在数量上占主导地位。Li 分析了牦牛-牛的异种重构胚后, 发现在囊胚阶段线粒体基本来自牛卵母细胞, 而牦牛供核细胞的线粒体已是极少数<sup>[72]</sup>。出生的异种克隆盘羊的线粒体组成全部来自与受体绵羊的卵母细胞, 而无法检测到供核细胞的线粒体<sup>[31]</sup>。第二种是供体细胞线粒体随着胚胎发育不断增殖, 而受体卵母细胞线粒体则逐渐消失, 最后供体线粒体完全取代受体线粒体。Chen 等<sup>[30]</sup>以大熊猫体细胞为供体, 兔卵母细胞为受体, 克隆的大熊猫胚胎在囊胚前各阶段大熊猫和兔线粒体共存, 但在着床后的大熊猫胚胎中, 兔线粒体已经消失只检测到大熊猫线粒体。第三种是受体卵母细胞胞质挽救供体细胞线粒体, 造成在发育各阶段线粒体的异质性。直至囊胚发育阶段, 牛和人的线粒体 DNA 都可以在牛-人异种重构胚中检测到<sup>[33]</sup>。Jiang 等通过 PCR 分析发现在附植前, 在北山羊-兔异种重构胚中北山羊和兔的线粒体共存<sup>[71]</sup>。

本实验中, 异种克隆的塔尔羊异种重构囊胚的线粒体主要来自于受体奶山羊, 塔尔羊的线粒体从融合起始的约占 1% 的比例, 下降到囊胚阶段的 0.01%-0.1% 之间。这和牦牛-牛<sup>[72]</sup>, 绵羊-牛<sup>[110]</sup> 的异种克隆囊胚期线粒体报道基本一致, 而与大熊猫-兔<sup>[30]</sup>, 人-牛<sup>[33]</sup>, 北山羊-兔<sup>[71]</sup> 的异种重构囊胚的线粒体组成差别较大。因此, 我们推测异种核移植中上述线粒体命运的发生可能与线粒体的进化以及供受体亲缘关系远近密切相关。线粒体在进化是较为保守的, 哺乳动物线粒体基因组同源性很高, 而核内编码的线粒体蛋白氨基酸同源性也很高<sup>[109]</sup>。当供、受体亲缘关系相近时, 核基因组对两种线粒体 DNA 复制给予同样的支持, 但由于受体卵母细胞线粒体数量上的优势, 供体细胞线粒体被稀释, 重构囊胚的线粒体组成最终出现第 1 种模式, 亦可视为线粒体的“异源性代偿”。而当供受体亲缘关系较近时, 核基因组对供体来源的线粒体存在优先增殖时, 则出现第 3 种模式。而当供受体亲缘关系疏远,

核基因组则不支持卵母细胞线粒体分裂，仅支持供核线粒体的增殖，则线粒体组成出现第 2 种模式。而对于后两种线粒体的增殖模式，由于供核细胞来源线粒体数量少，必然使得线粒体在维持胚胎发育过程中的功能受到损害，对胚胎细胞增殖，分裂，分化等基本生命活动造成影响，可能表现为胚胎发育迟缓，细胞数减少，细胞凋亡等，最终导致异种克隆胚胎发育的终止。诸多研究表明，异种克隆胚胎中核基因组—胞质线粒体 DNA 的相容性问题是异种核质互作的主要问题之一。

### 小结

- 1、异种克隆囊胚的 Y 染色体分析和 SRY 基因扩增证实了本实验中重构胚的核遗传物质来源于供核塔尔羊细胞，而非奶山羊卵母细胞。
- 2、建立了巢式位点特异 PCR 分析塔尔羊异种重构胚线粒体组成的方法。
- 3、塔尔羊异种重构囊胚中线粒体主要来自于奶山羊卵母细胞，供核细胞线粒体的比例在 0.01%—0.1%之间。

## 第四章 异种克隆塔尔羊胚胎移植与着床后发育

哺乳动物种内体细胞核移植已经在多种动物上获得了成功，但是出生率很低，一般小于3%<sup>[111]</sup>。诸多研究表明了体细胞克隆的囊胚发育率很高(40%—50%)，但是移植后的胚胎在着床后大量丧失<sup>[112, 113]</sup>。目前异种克隆出生的动物仅限于亚洲野牛，盘羊，非洲野猫和白臀野牛，大多数的异种克隆胚胎在移植后妊娠早期即大部分丧失<sup>[26,27,29]</sup>。对于异种克隆胚胎妊娠困难的原因和机理的研究报道较少，主要受限于异种着床模型的缺乏和种属的差异，进展缓慢。

然而，异种克隆动物的出生是将异种间体细胞核移植技术应用于濒危野生动物保护的最终目的。因此，我们将塔尔羊异种克隆胚胎移植到奶山羊子宫内，观察异种克隆胚胎的着床情况，为提高异种克隆胚胎异种受体内的着床和植入后发育打下基础。

### 4.1 实验材料

#### 4.1.1 主要试剂

M16, mKSOM 等见第二章。

2%静松灵注射液（中国农业科学院中兽医研究所药厂，5ml(100mg)/支，储存：室温）

青霉素（上海康复特兽医化学制药有限公司，160万IU/支，储存：室温）

链霉素（山东鲁抗医药股份有限公司，100万IU/支，储存：室温）

破伤风抗毒素（兰州生物制品研究所，1500IU/支，储存：室温）

5%苯扎溴铵溶液（南昌白云药业有限公司，500ml(25g)/瓶，储存：室温）

#### 4.1.2 配制试剂

冲卵液等见第二章。

#### 4.1.3 耗材

常规耗材见第二章。

钨丝针

耦合剂

#### 4.1.4 仪器



## 兽用B型超声波诊断仪

### 4.2 实验方法

#### 4.2.1 重构胚的剥离

a) 在一次性35mm硅化平皿中加M16基质2ml,将回收的包埋块用较粗的吸卵管移入M16基质内,在CO<sub>2</sub>培养箱中暂短培养。

b) 把包埋块调整到适当位置后左手执一根钨丝针在靠近剥离胚胎处压紧、固定包埋块,右手执一根钨丝针在剥离卵的底部刺入胶条,针紧靠胚胎外围按逆时针方向转动直到把胚胎剥出。

c) 在方杯中加M16基质2ml。把剥离出的卵全部移入M16基质中恢复培养,待移入受体。

#### 4.2.2 重构胚的子宫移植

a) 麻醉、腹壁切开、子宫和卵巢显露。

b) 检查黄体:发情后5~7天的黄体呈粉红或暗红色,黄豆大小,突起、实心,卵巢表面应无滤泡生成。通常每个卵巢上只有一个。

c) 准备移卵:用移卵管按空气、基质、空气、基质,胚胎(通常二枚:一个桑椹,一个囊胚)空气、基质顺序吸入移卵管。

d) 黄体存在一侧宫角,距输卵管和宫角连接部2~3厘米的宫角大弯,用12号粗针头避开血管穿通宫壁直达宫腔。随即把套管从针孔中伸入直达宫腔,再把移卵管从套管管腔中插入宫腔。确证移卵管在宫腔内后,推动微量注射器活塞,把卵逐入宫腔内,随后把移卵管拔出。

e) 检查移卵管中是否有胚胎存留。确认移卵结束,拔出套管。宫壁创口通常不需缝合,让其自愈。把子宫、卵巢一并纳入腹壁。

f) 腹壁缝合,受体羊编号(打耳号),肌注青、链霉素,并注射破抗。

g) 术后三天观察食欲,和精神状态,常规注射青、链霉素三天。术后7~10天拆除皮肤缝合线。

#### 4.2.3 塔尔羊异种重构胚着床检测

在异种克隆胚胎移植后17d,28d,35d剖检子宫,观察异种克隆胚胎的着床后胎儿

与胎盘组织发育情况。

#### 4.2.4 B 超诊断妊娠诊断异种重构胚的妊娠情况

a) 检查在胚胎移植后 20-25 天之间进行 (胚龄相当于 25-30 天)

b) 检查前饥饿一天。羊站立保定。

c) 术者在超声探头发射面涂耦合剂后, 伸入直肠 (如直肠内积粪太多应掏出), 向下紧贴直肠下壁延伸, 经盆骨进入腹腔, 在盆腔前方左右旋动, 同时观察显示屏上出现的图像, 呈现正三角形即示膀胱, 随后把探头偏向右下方, 妊娠羊便在膀胱右下方显示孕囊, 有时在孕囊中还可发现闪动光点, 是心搏的征状, 出现一个或两个孕囊图像者即可确定为阳性。

如在检查中未见肠管活动波型及孕囊者, 需把右肋腹部上抬, 在图象上出现肠管活动波并确认无孕囊存在时为止。

d) 阴性者, 通常间隔 10 天复查一次。

e) 阳性羊另关, 每栏四头。

### 4.3 结果

#### 4.3.1 塔尔羊异种重构胚胎着床后发育及其与种内克隆胚胎着床后发育比较

塔尔羊异种重构胚胎在移植同步的受体奶山羊后, 在胚龄 28 天 B 超检测是发现 3 个受体内存在孕囊, 判定为妊娠, 但是胚龄 45 天再次用 B 超检测时发现已经无孕囊存在, 塔尔羊异种重构胚在受体奶山羊子宫内终止妊娠大约在胚龄 35 天左右。

表 5 塔尔羊异种克隆胚与奶山羊同种克隆胚着床后妊娠率的比较

重构胚类别	重构囊胚 数	移植受体 数	胚龄 30 天怀孕 数(%)	胚龄 45 天阳性 数(%)
奶山羊-奶山羊	108	45	28 (62.22) <sup>a</sup>	20 (44.44) <sup>a</sup>
塔尔羊-奶山羊	55	17	3(17.65) <sup>b</sup>	0 (0) <sup>b</sup>

注: 字母不同者表示差异显著 (P<0.05)

#### 4.3.2 异种塔尔羊重构胚着床后的解剖学特征

塔尔羊异种重构囊胚在移植 17 天后解剖受体, 发现受体羊子宫血管丰富, 呈现充血 (图 14-a), 子宫内阜增生, 子宫壁增厚, 子宫内出现丝状拉长的胎膜, 胎儿

已经可以辨认(图 14-c), 但是胎儿与对照的山羊二倍体胎儿相比出现无血管分布, 苍白, 胎儿偏小, 退化等迹象(图 14-e)。异种克隆塔尔羊胎膜长度与对照组基本相同, 但也存在无血管, 混浊, 退化等现象。

在胚龄 30 天解剖受体后发现, 塔尔羊异种重构胚胎进一步退化, 胎儿已经无法辨认, 胎膜缩短, 胎膜内呈现混浊状, 子宫仍然具有妊娠的反应。到胚龄 35 天时, 子宫妊娠反应已经消失, 子宫内无胎儿和胎膜可见。

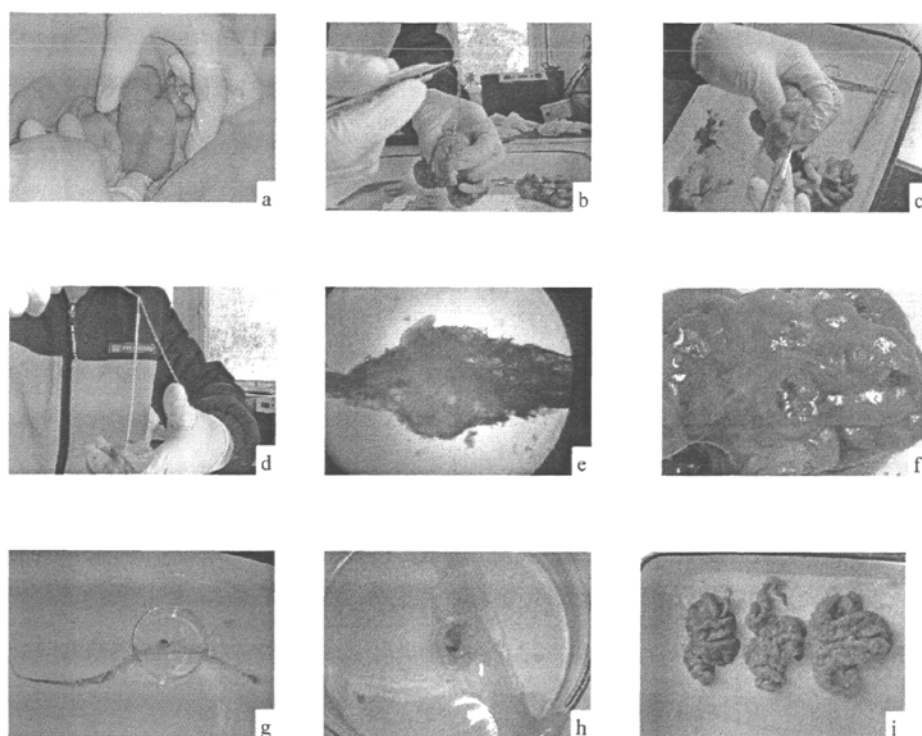


图 14 塔尔羊异种重构胚着床后的发育及其与山羊正常发育胚胎的比较

a 移植塔尔羊异种重构胚后 17 天的受体羊子宫 b 子宫阜增生并且血管丰富 c 着床后发育的胎膜和胎儿 d 胎膜呈现苍白色,胎膜缺乏血管, 不透明, 部分退化 e 解剖镜下的异种克隆塔尔羊胎儿, “C”型 f 正常着床的山羊胎儿 g 山羊的胎儿和胎膜 h 山羊胎膜呈现透明性, 充满透明的液体,山羊同期发育的胎儿 i 胚龄 23, 30, 35 天子宫剖面

Fig.14 Post-implantation development of tahr interspecies reconstructed embryos and comparisons between the cloned embryos and normal embryos  
 a recipients' uterus on the 17<sup>th</sup> after the cloned embryos transferred; b endometria proliferation and vascularization; c the cloned thar embryonic membrane and fetus; d the constructed embryonic membranes appeared pale, lack of blood vessel and partly degraded; e the cloned tahr fetus with apparently "C" morphology; f a normal fetus produced by natural fertilization; g the normal fetus and embryonic membrane; h the normal membranes filled with amniotic fluid and showed hyaline; i the comparison of the uteri at EA 23, 28, 35.

#### 4.4 讨论

##### 塔尔羊异种重构胚在异种受体子宫内着床早期发育特征

山羊着床后的发育基本分为胚胎发育分为 5 期, 分别是鳃弓期、指蹼期、偶蹄期、形成期、胎儿期。其发育的基本特征与绵羊基本一致, 妊娠期与绵羊相似, 均为 150 天左右<sup>[114]</sup>。

##### 绵羊胎儿早期发育的特征

妊娠天数	胚胎发育特征
14 天	胚胎和子宫附着。
15-16 天	胚胎尿囊形成。
16-17 天	到达 C 形期, 体节、眼基板、咽弓形成。
19-21 天	耳基板、中脑、前肢芽形成, 后肢芽初现。
25-28 天	头稍弯曲, 眼泡色素沉积, 鼻窦开始闭合, 前后肢芽形成。
30-33 天	皮肤不透明, 四肢显趾。
34-35 天	面部分化, 眼耳定位, 口鼻形成, 四肢末端趾间出现凹槽, 肋部初显轮廓。
28-35 天	胚外膜子叶和子宫肉阜愈着, 胎盘完成全部发育

山羊妊娠胚胎与子宫的着床发生在妊娠 14 天<sup>[115]</sup>, 此时胚外部分, 绒毛膜, 羊膜, 和卵黄囊形成。绒毛膜延伸进入非孕角。胚胎内部, 原条和原结出现, 原结前方的外胚层形成神经板和神经沟, 脊索前方的头突形成, 并向前延伸, 发育成为脊索。

20d,18h 的山羊胎儿外形呈典型的“C”字形, 胚长约 4.3mm, 重 65g, 鳃弓 4 对, 3 对清晰, 第 4 对鳃弓尚未完全分化产生, 但已有雏形, 晶体窝产生, 可见有晶体板, 并见有

听泡。整个胚胎躯干部呈半圆形,外观可见有体节30对,前后肢芽尚未发生,肝腹突,中肾均可以从外观上辨别出来,胸突较肝腹突大,此时的尾芽呈钝圆形,因此难以与胚胎后部辨别开。绒毛膜:20d、18h,此期呈长管状,约24cm,包在整个胎儿最外部,中部宽约2cm,两端宽约8mm。没有绒毛叶阜产生,因此整个绒毛膜呈白色丝绸状,游离于子宫腔中,与子宫壁结合不紧。尿囊:尿囊柄从脐环伸出,扩大为长管状,伸向绒毛膜两端,长约20cm,中部宽1cm,两端宽约6mm,在尿囊上有成对的脐动脉及脐静脉,并分枝分布于尿囊壁上。尿囊壁已与绒毛膜内层相吻合,仍有少部分与之脱离而游离于绒毛膜腔中。卵黄囊:离开脐环后,稍膨大,而后分为两条卵黄管,并与两条脐血管平行向两端延伸。此时的卵黄开始退化,全长约10cm,宽1mm。羊膜:包围整个胚胎,与其它胎膜间隔,呈透明清亮而且与胎儿有一定间隙,并充满了羊水<sup>[14]</sup>。

第28天为胚胎向胎儿前期过渡的重要阶段。体节48对全部形成,面部额,鼻部已经成形。额突和舌弓明显,口凹聚中。心脏后方肝明显增大,前肢关节突现,指分叉。雄性性别特征明显,阴囊可见。

第35天从采集到的胎儿的情况看,胚外膜的子叶已和子宫肉阜愈着,分离困难,子叶已有黄豆大小,胎膜从宫角中部延伸到接近宫体部。胎儿大多位于子宫分叉部上方5厘米左右,直径在5厘米左右。切开宫壁和胎膜可放出胎水约20~50毫升左右不等,同时胎儿随羊膜囊一并滑出,羊水清朗,胎儿在羊水中游动,长3.5~4.0cm不等。面部已分化完成,眼、耳、口、鼻清晰可辨。四肢末端也出现趾(指)间槽,肋部轮廓明显。总体上,胎儿已完成器官形成。

塔尔羊异种重构胚胎胎龄23天时的发育形态明显晚于同期的正常山羊胎儿,仅相当于正常山羊21天左右的胎儿,整体胎膜拉长,胎膜血管不够丰富,长约27cm,胎膜组织偏窄小,羊膜包围胚胎,胚胎体节明显,胎儿体苍白,小于正常山羊胎儿。与子宫附着处,宫阜突起,血管化不明显,增生厚度低于正常的奶山羊胎儿。胎龄28天胚胎解剖发现胚胎胎膜出现组织解体,胎液混浊,包裹于羊膜的胚胎出现瓦解,发育呈现异常,羊水混浊。塔尔羊异种重构胚发育至胎龄35天时胚胎基本瓦解,被子宫壁吸收。

塔尔羊异种重构囊胚移植后主要异常是胚胎在着床后不久死亡,胚胎呈现乳白

色，形态呈现 C 型，胎膜组织瓦解，伴有轻度混浊的液体。至 35 天胚龄时子宫已经无反应，基本恢复。

### 异种重构囊胚移植后发育异常原因

本实验中，异种克隆塔尔羊的胚胎在胚龄 28 天时检测到的孕囊仅为 3 个，胚胎丧失率高达 95%，至胚龄 35 天时，已经无孕囊存在，胚胎全部丧失。异种重构囊胚移植后的高丧失率解释可能有二：1、胚胎无法正常着床，着床前就丧失；2、胚胎着床后早期就发生退化，胚胎死亡，胎膜瓦解。妊娠的前 1/3 期间，尤其是着床后一个月是胚胎在母体内发育最关键的时期。在这期间，首先是胚胎要和母体子宫发生直接联系，因此胚外组织必须充分发育、正确完成，以保证胎儿的正常代谢和发育。与此同时，胎体发生剧烈分化，不仅要渡过胎儿的重要发育阶段——原肠形成期，并且绝大部分器官的发育也要完成。因此，发育上的任何偏差都可导致胎儿丧失。异种克隆胚胎着床前后高的胚胎丧失率，在许多研究中已有报道<sup>[26,27,29]</sup>，其原因可以分为两方面加以分析。

首先，体细胞克隆技术中，克隆胚胎的着床表现出高的早期丧失率，本试验中即使是奶山羊种内克隆，其早期胚胎丧失率也高达 50% 以上。绵羊，经 B 超检查发现孕囊，但手术能回收到的胎儿的仅占 50% 左右，在回收的胎儿中还有一半左右出现发育延迟、濒死或已经死亡<sup>[116]</sup>。牛的情况也类似<sup>[117]</sup>。小鼠在妊娠 8.5 天时，回收存活的克隆胎儿只占移入胚胎的 10% 左右<sup>[118]</sup>。

胚胎在原肠形成期完成之后起始着床。着床最初发生在子宫系膜附着部的对侧子宫壁上，绒毛锥从背侧伸入子宫腔。绒毛中含有双核的滋养层细胞（又称滋养层巨细胞），单核滋养层细胞。着床点上，子宫粘膜快速生长，包围整个胚胎和胚外结构。蜕膜生长至接触子宫系膜对侧的子宫壁，进而融合，形成部分胎盘。同时，胚胎腹侧的蜕膜退化，发生消化反应，使得胚胎脱离子宫系膜对侧的子宫壁，使得胚胎反而由绒毛锥和子宫系膜子宫壁附着。着床后胚胎早期营养取自子宫乳（退化的上皮细胞背消化后产生）。中期胚胎沐浴在母体血液中，卵黄囊可从血液中吸收营养。后期，蜕膜基部，绒毛锥，绒毛膜和尿囊的一部分融合产生真正的胎盘，把母体的营养供给胎儿。绒毛中的滋养层巨细胞源于滋养层细胞，一般认为，绒毛巨细胞是

由单核柱状的滋养层细胞分化而来，其过程是核分裂而胞质不分裂。滋养层巨细胞顶端无绒毛，也无饮泡。细胞有两个圆形的核，核仁明显，胞质丰富，内含稀疏的内质网，大量游离的核蛋白体。高尔基体发达，中等大小，胞质中尚含有致密小体，多泡体，和低电子密度的分泌颗粒，可能具有迁移的功能<sup>[119]</sup>。滋养层巨细胞处于绒毛锥的顶端，在着床和把 Reichert's 膜铆定在蜕膜上起重要作用。其具有侵入子宫壁的作用，酶的转运功能，此外，该细胞分泌多种激素，生长因子受体，IgG，转铁蛋白，肌动蛋白，白蛋白等<sup>[120]</sup>。

目前认为克隆胚胎早期发育高的丧失率与滋养层细胞分化与功能失调，从而导致胚胎胎膜发育异常有密切的关系<sup>[121,122,123]</sup>。滋养层细胞产生大部分胎盘以及一部分胚外膜<sup>[124]</sup>。核表观重编程建立是囊胚阶段滋养层细胞功能获得的必需事件。克隆牛胎盘发育异常，可表现为绒毛膜尿囊发育不全，胎盘子叶减少（严重时无子叶发育）、变小，血管稀少<sup>[122, 123]</sup>，克隆牛、羊的滋养层双核细胞数量少<sup>[125,126]</sup>。小鼠，可以发现胚盘异常增大，重量增加，组织学检查，胎盘基层过度肥大，尤其是海绵滋养层细胞，巨滋养层细胞和糖元细胞，并且由于海绵滋养层细胞和糖元细胞侵入迷路层，胎盘层次被破坏，迷路层中毛细血管分枝无规则，异常扩张，海绵状滋养层细胞和迷路层排列异常<sup>[121]</sup>，推测是滋养层谱系的细胞功能失调的一种反映。

其次，异种克隆胚胎的发育早期的高的丧失率是由于异种动物之间在进化过程中所产生的着床类型，子宫生理，妊娠期长短的差异所造成的遗传性隔离现象。自然界中，异种胚胎的正常出生仅限于除了马驴模型，绵山羊模型，啮齿类模型等，异种克隆胚胎的正常着床并出生个体的报道仅限于盘羊，亚洲野牛，白臀野牛而其受体分别是绵羊，奶牛，奶牛。所以，在选择异种克隆胚胎的受体时要充分考虑遗传距离，着床类型，子宫解剖学特征以及妊娠期长短是否一致，塔尔羊与奶山羊的遗传关系较近，妊娠期塔尔羊约为 160 天左右，与奶山羊 155 天接近，同时我们从两者的繁殖行为推测其生殖解剖学特征应该基本相似。但是，我们仍然观察到异种克隆胚胎高的着床后早期丧失率，尤其在妊娠 21—25 天左右，这和绵羊—山羊胚胎异种移植试验中的观察到的现象类似<sup>[127]</sup>，推测可能是由于受体奶山羊的子宫的对异源细胞的免疫应答反应，而塔尔羊异种胚胎未能分泌同源 IgG 抗体，缺乏保护塔尔

羊胎儿的屏障，而这道屏障主要是由滋养层双核细胞或者巨细胞建立<sup>[128]</sup>。

### 体细胞重构胚移植后发育异常的分子机制

尽管采用的供核细胞系不同，供核细胞基因转录模式也显著不同。但是研究发现 SCNT 胚和 IVF 胚显示惊人的相似的基因转录模式，说明体细胞核在卵母细胞内发生了重编程。同时也发现有一小部分基因表达异常，可能影响关键的发育进程，这些发育过程可能引起 SCNT 胚的发育失败<sup>[129]</sup>。

在克隆牛的囊胚，几种基因的异常表达被发现。（Mash2 上调，DNMT 下调，Hsp70 缺失；INF $\tau$  的表达异常），FGF4，IL6 的表达差异很大（因所采用的细胞间的差异而有所不同），颗粒细胞有，而胎儿成纤维细胞则没有<sup>[130, 131, 132]</sup>。但是没有研究报道可以解释附植前后大量的克隆丧失是否由于这些基因表达的异常。表观遗传分析揭示多数 X 染色体正常灭活<sup>[133]</sup>。在特定的 CpG 位点甲基化失稳<sup>[134]</sup>胎儿和成年克隆牛个体的研究均表明印迹正常或者对表现遗传异常可以耐受<sup>[135, 136]</sup>。

牛 NT 胚的基因芯片分析发现与 IVP 胚相比 92 个基因表达升高，43 个基因表达下降，但是，PT-PCR 分析发现单个胚胎，NT 胚胎与 IVP 胚基因表达差异要小。因此，NT 胚的单个基因表达不能解释重编程错误的本质<sup>[137]</sup>。目前普遍认为，体细胞克隆胚胎在移植后所表现的异常主要与胚胎的胎盘的发育异常有关，滋养层细胞的表现遗传重编程的异常，包括印迹基因和一些非印迹基因的甲基化异常造成滋养层细胞分化，增殖等相关基因表达的异常，决定了胎盘的组成、功能的异常<sup>[128, 138]</sup>。

### 基因印迹

许多研究解释克隆后代异常综合征(AOS)的潜在机制主要集中在调节生长发育的印迹基因表达变化<sup>[83]</sup>。SCNT 重编程不完全所造成的在附植前建立的不当的由表观遗传控制的印迹基因表达模式<sup>[139]</sup>。牛<sup>[140]</sup>，山羊<sup>[141]</sup>的印迹基因研究证实了这一假说。啮齿类和绵羊胚胎，胎儿，胎盘的印迹基因的甲基化状态<sup>[139,141,142,143]</sup>也支持印迹基因的表现遗传失调是 AOS 发生的关键因素。尽管 SCNT 对于印迹有影响，但是其作用的机理和发生的机制尚不明确。目前，人类和小鼠已知 70 个印迹基因，SCNT 引起的表观遗传失调可以影响大量基因的表达<sup>[83]</sup>。

IGF 家族在胚胎，胎儿，胎盘发育起到重要作用<sup>[144,145]</sup>。尽管 IGFII 单独过表达



对胎儿生长并无重要影响,但是缺乏 IGFIIIR 时,IGFII 的升高可以导致严重的胎盘和胎儿的过生长<sup>[146]</sup>。

研究检测 D7, D25 牛胚胎 (NT 胚, IVP 胚, 孤雌体内产生胚) 的 IGF-I, IGF-II, IGF-IR, IGF-IIIR 的 RNA 水平, 发现 D7 时未检测到 IGF I 基因表达。D25, NT 胚胎组织和 IVP 胚 IGF-I mRNA 水平高于体内产生胚胎 ( $P < 0.05$ )。IGF-II mRNA 水平, NT 胚高于 IVP 胚胎组织 ( $P < 0.05$ )。胎盘中 IGF-II mRNA 水平, NT 胚高于体内产生胚 ( $P < 0.05$ )<sup>[147]</sup>。

IGF-II 里一种分裂促进剂<sup>[148]</sup>, 影响滋养层迁移, 侵入<sup>[148]</sup>。正确的印迹的丢失可导致转录、翻译的变化, 导致异常的胎盘功能。研究表明克隆牛的胎盘有少的滋养层双核细胞<sup>[125]</sup>。胎盘功能的下降会影响营养, 废物和气体交换, 并可能是胚胎高丧失率的原因<sup>[149]</sup>。胎盘维持母-胎平衡, 并且吸收尿液。然而在 NT 胚和 IVP 孕体中由于减少的子叶数, 导致羊水过多和尿囊积水<sup>[150, 151]</sup>。

NT 胎盘表达 IGF-IIIR mRNA 高于体内胚 4.3 倍, IVP 胚 2.3 倍<sup>[147]</sup>。并且 IGF-IIIR 是体细胞生长的负调节因子, 并且已经证实在克隆牛上是印迹基因<sup>[152]</sup>, 并且克隆胚胎中印迹异常。胎盘, 试图调节发育, 维护母-胚细胞来由的平衡, 上调 IGF-IIIR 可以减少 IGF-II 过表达。D60 牛的克隆中 IGF-IIIR 在胚胎和胎儿组织上调<sup>[153]</sup>, 但是 D72 牛克隆具有正常的 IGF-II 印迹, 但 XIST 印迹在绒毛膜丢失<sup>[154]</sup>。新生克隆胎儿的研究表明死亡的克隆 IGF-II, IGF-IIIR 表达异常, 而正常的克隆牛有正常的表达模式<sup>[155]</sup>。研究者认为: 体外培养或胚胎操作极大影响 NT 胚的印迹基因表达。因此, 进一步的研究需要改善条件使其更加类似于体内环境产生的胚胎。

印迹基因的表达, 小鼠上 IGF-II 控制胎盘和胎儿生长。母源 *Igf2* 基因的位点, 编码 IGF-II, 在鼠上是灭活的,<sup>[156]</sup> 对胎盘而言, *Igf2* 的双表达会导致过度生长<sup>[157]</sup>, 然而 *Igf2* 突变鼠表现出退化, 糖原细胞减少<sup>[158]</sup>; 缺少 IGF2R 表达, 作为抑制 IGF-II 功能, 表现出胎盘的持续生长<sup>[159]</sup>。胎盘生长被报道与 *Igf2/p57kipz* 表达比例有关, 有研究表明 *Igf2, Igf2R, p57kipz* 的在克隆小鼠胚胎中表达均减少<sup>[121]</sup>。

有研究<sup>[154]</sup>表明, NT 胎盘绒毛膜, XIST 位点表达降低, 虽然其 DMR 区域的甲基化正常, 但是绒毛膜部位过度甲基化。XIST 位点的印迹异常, “LOI”<sup>[160]</sup>, 表明

XCI 的异常或基因组印迹的缺失<sup>[160]</sup>，既有表现为胎盘双等位表达，也有可能表现为心脏 MAOA 和 XIST 的无表达，表明 X 染色体完全灭活。原因可能是由于表观遗传的供核细胞状态。Eggan 等表明小鼠上，体细胞和用于调节 XCI 的配子标记是相同的，若在用于克隆时是缺失的，则表现为在滋养层的随意 XCI<sup>[133]</sup>。小鼠上，Igf2R 和 ASCL2 的位点分析表明，从供核细胞单位点表达至胚胎期双位点表达的开关被失调，进一步支持了供核细胞的表观遗传模式影响位点的表达结果<sup>[161]</sup>。

### 甲基化/去甲基化

父源 DNA 的去甲基化是一个主动的过程，并且在受精后立刻发生<sup>[162]</sup>。相反，母源 DNA 的去甲基化是在早期卵裂过程中从核中去除 DNA 甲基化酶这种负机制发生的<sup>[162]</sup>。这种酶负责在 DNA 复制过程中维持甲基化模式。与合子基因组中非印迹基因的表观遗传的标记去除相反，印迹基因的表观遗传标记在父、母源 DNA 中在整个去甲基化过程中均被保护。卵母细胞特异的 DNMT1 是在附植前维持印迹所必需的<sup>[163]</sup>。胚胎甲基化模式在小鼠上是附植后，牛上是在囊胚阶段重新建立<sup>[164]</sup>。再甲基化来自于 DNMT3a 和 DNMT3b<sup>[161]</sup>。常染色质的低甲基化和异染色质的高度甲基化在 SCNT 胚中已经报道<sup>[165]</sup>。DNMT1 和 DNMT3a 的 mRNA 水平在附植前在 NT 胚中表达异常<sup>[166]</sup>，同时，一些染色体结构因素和组蛋白修饰因素也影响这些 DNA 甲基化转移酶作用于基因组。

上皮角蛋白启动子和微卫星 I 区的分析进一步支持了克隆的重编程的失调，绒毛膜部分高密度的甲基化。研究<sup>[154]</sup>认为在胎盘过度甲基化或缺失去甲基化与双位点的表达相关。Kang 等的研究表明牛的滋养外胚层的高度甲基化<sup>[167]</sup>。在 D7 NT 来源的胚胎，Dean 等分析也表明在早期牛克隆胚中重编程不完全<sup>[139]</sup>。克隆鼠中，胚胎异常表达体细胞形式的 DNA 甲基化转移酶<sup>[168]</sup>，DNA 甲基化酶的增高，缺乏重编程如父源基因的快速去甲基化，造成了克隆的绒毛膜部分的高度甲基化状态。

### 胎盘发育关键基因表达

小鼠上，已发现大量的移植的桑椹/囊胚发育不超过 6-7dpc<sup>[113]</sup>，并且附植的比例<10%。因此，多数克隆发育超不过附植前晚期或附植后的早期阶段。

Oct-4 作为小鼠细胞全能性的标志基因，其在正常囊胚期仅限于内细胞团表达，

而小鼠克隆研究中发现,体细胞核移植引发囊胚期 oct-4 空间表达的异常。克隆小鼠囊胚 oct4 基因表达一部分正常,大部分在空间表达上呈现出镶嵌型或异位表达,即在滋养层细胞系内表达<sup>[169]</sup>。同时发现重编程在第一次卵裂仍然存在,并不限制于 MII 卵母细胞<sup>[169]</sup>。这些发现表明鼠克隆胚胎不能发育至附植后可能与 oct4 决定的囊胚中不正确的细胞系有关。oct-4 异位表达胚胎的异常主要表现在孵出透明带的能力降低,出壳后的细胞 oct4 表达降低,产生 ES 细胞的频率下降<sup>[169]</sup>。异常的 oct4 表达是直接或间接由重编程的错误引起的,并且是重建发育程序总体失败的指标。异常的 oct4 表达可能与其它关键发育基因的异常表达有关导致胚胎各阶段异常。不考虑其他基因,单独的 oct4 表达异常是多数体细胞克隆失败的原因<sup>[169]</sup>。

oct4 作为转录因子影响在胚胎发育的早期阶段一系列靶基因的表达,包括 Fgf4, Rex-1, Sox-2, OPN, h CG, Utf-1<sup>[170]</sup>, INFr<sup>[171]</sup>和其它潜在下游基因, creatine kinase B, Makrin 1, Importin  $\beta$ , Histone H2A.Z 和核糖体蛋白 S7<sup>[172]</sup>。Fgf4 是 oct4 的靶基因,并且在克隆牛胚胎中异常表达<sup>[130,131]</sup>。oct4 缺失突变尽管可以发育至囊胚样结构,但是无全能 ICM,也在附植后因缺少分化胚胎细胞系分化能力而死亡(Nichols et al, 1998)<sup>[173]</sup>。体外如果改变 oct4 的表达水平,30%升高或者低于正常水平,则会导致胚胎干细胞向内胚层细胞或 TE 分化<sup>[174]</sup>。而 Oct4/cdc2 表达产物的比例是滋养层细胞分化的决定因素<sup>[175]</sup>,所以 oct-4 的异位表达可能是克隆胎盘滋养层细胞数量缺少和功能缺失的主要原因<sup>[169]</sup>。

Hill 等(2006)在 SCNT 妊娠 45-55d 发现血管的减少,胎盘区上皮重减少<sup>[123]</sup>。SCNT60d 牛胚的妊娠中与 AI 妊娠比较,缺少有组织的绒毛发育,有少的胎盘子叶数<sup>[176]</sup>。在上皮-绒毛膜联系的初级阶段,母胎界面的特征是滋养层双核/巨细胞(TGC)的子宫内膜的进行性侵入。滋养层双核/巨细胞(TGC)约是滋养层细胞 20%,并且通过母胎联系,与子宫上皮细胞融合<sup>[119, 120]</sup>。TGC 细胞通过胞质分裂的有丝分裂成为四倍体,或者核内分裂。DNA 含量可以达到 32N<sup>[120]</sup>。这些细胞产生 PAGCs, PL 催乳素相关蛋白;在妊娠过程的母源血液可以检测到。滋养层双核细胞(BNCs)在母-胚交流起到重要作用,产生 bPRP-1, bPL, bPAG-1 与附着相关<sup>[177,178,179]</sup>。Hill 等<sup>[180]</sup>报道 NT 奶牛显著表达 MHC-1,高于体内培养胚胎,在正常胚胎 MHC 表达由

于受到 bPAGs 表达抑制 MHC-1 的产生,从而免除母体的免疫反应<sup>[181]</sup>。检测牛 NT 胚胎妊娠过程中,30,60,100 天中,bP RP-1,b PL, b PAG-1, b PAG-9 基因转录与 AI 胚相比出现的异常,暗示出牛 NT 中双核细胞特异基因转录的缺陷<sup>[176, 182]</sup>。关于 TGC 细胞在 SCNT 胎盘中的数量报道不一,与 IVF 和 AI 妊娠相比,在早期妊娠阶段(D30~60),有的认为少,无变化或者更多。最近的研究表明,40d 牛 SCNT 的 TGC 的数目少于 IVF、AI 组<sup>[183]</sup>。胎儿直接控制 BNC 的产生<sup>[184]</sup>,NT 牛中见到的异常可能是由于 BNC 的迁移或者由于遗传异常引起的胎儿表达某些胎盘发育的信号不充分。

Arnold<sup>[183]</sup>等比较了决定滋养层细胞增殖、分化和功能密切的因子(Mash2), (Hand1), (IFN- $\tau$ 、PAG-9) 在 AI, IVF, SCNT (17d) 和 SCNT (40d) 的牛胚滋养层的表达以及 TGC 的密度和功能。在附植前阶段, Mash2 mRNA 在 SCNT 胚高于 AI, HandI 在 AINT 胚中高于 SCN 胚。附植后, SCNT 胎儿子叶表现出更高水平 Mash2 和 HandI,与 AI、IVF 相比。IFN-I mRNA 表达无差异。PAG-9mRNA 在 AI 中最高, IVF 次之,在 SCNT 胚无法检测到。Mash2 的位点表达在各组中无差异表明 Mash2 表达升高不是由于 Mash2 的印迹状态的变化<sup>[183]</sup>。

Mash2 刺激细胞增殖,抑制滋养层细胞向终末分化巨细胞形成分化<sup>[185]</sup>然而 Hand1 激发巨细胞形成<sup>[186]</sup>。Mash2 突变鼠中,鼠胚有大量巨细胞在 9.5dpc 丧失; Hand1 突变鼠也在 9.5dpc 丧失,巨细胞少。在牛上,我们 Mash2 也在胚盘里表达,附植前滋养层细胞增殖时表达量最大<sup>[187]</sup>。牛 Mash2 也是印迹基因,附植后父本位点沉默。牛上 D17 妊娠期,滋养层细胞经历快速增殖,导致胚胎在子宫内的拉长,用于附着。牛滋养层细胞发生分化产生 TGC 细胞。TGC 细胞在起始附着和母/胚界面发育具有重要作用。Mash2/Hand1 表达的平衡决定了滋养层细胞的分化。克隆胚中 D17, Mash2、Hand1mRNA 说明滋养层细胞分化为 TGC 细胞受到抑制<sup>[183]</sup>。克隆胚中 IFN-II (单核细胞标记分子) 表达中,克隆胚、IVF、AI 无差异,说明 SCNT 胚中单核细胞发育正常,异常的母源性识别并不能够解释 SCNT 胚的早期妊娠丧失率高。PAG-9 是牛上妊娠 25d TGC 唯一表达的 PAGS 的一种分子<sup>[188]</sup>。Patel 等发现 SCNT 胚胎 30d 时胚盘组织表达 PAG-1, PAG-9 低于 AI 胚胎<sup>[182]</sup>。PAGCS 可能起到

母源免疫抑制的作用<sup>[189]</sup>。D40时 Mash2 基因表达依然很多,表明 Mash2 的表观遗传重编程不正常或调节 Mash2 基因表达异常。研究发现 Mash2 基因在 D17 双位点表达,在附植后母源性表达<sup>[187]</sup>。D40时, Mash2 父源表达沉默,但仍可以在几个样本检测到低水平表达,说明调节 Mash2 基因异常,而不是其印迹状态的改变,也发现早期胚胎丧失中 PAG 的受体血清浓度低,而同样的发育到期克隆受体则有更高的 PAG 浓度。

我们认为体细胞核移植中胎盘功能的不全是由于滋养层增殖(Mash2),分化(Hand1)和功能(IFN- $\tau$ 和PAG-9)这些所需基因异常所引起的。因此,对正常胎盘发育起到关键作用的基因在 SCNT 胚中的表达变化可能是引起异常滋养层分化异常、胎膜丧失的原因。

## 小结

塔尔羊异种重构胚可以在奶山羊子宫内着床,但是胚胎在着床后早期即丧失;

异种重构胚胎着床后的发育异常主要表现在胎儿发育迟缓,胎膜发育不良,这和滋养层细胞的分化和功能有关。

## 第五章 山羊四倍体胚胎制备及其体内外发育

近年来,为了保护濒危珍稀动物而开展的异种体细胞核移植研究,仅在盘羊、亚洲野牛、野狼等几种动物上可以发育至妊娠后期,而多数的异种克隆动物体细胞重构胚在移植受体后未见着床或在妊娠早期即大量丧失<sup>[18,27,29,31]</sup>,研究认为胎盘种间免疫屏障,与受体子宫内膜无法或者不正确的识别异种胚胎造成了无法建立妊娠<sup>[35]</sup>。异种胚胎移植试验发现滋养层细胞在建立母体与胚胎联系过程中起重要作用<sup>[36,37,38]</sup>。可见对于克隆动物的胎盘研究,甚至加以改造是发展体细胞核移植的必然和焦点。

在小鼠四倍体胚胎的研究中,发现四倍体胚胎的着床率很高,虽然着床后胎儿发育异常,但是其胎盘组织形态,印迹基因表达正常<sup>[56,57,190]</sup>;在和二倍体胚胎或ES细胞(2N)嵌合后四倍体细胞发育具有明显的胚外组织分布倾向,而不参与胎儿组织发育<sup>[60]</sup>。利用这一特性,分别获得来自ES细胞的小鼠、淋巴细胞和神经干细胞克隆小鼠,其中四倍体胚胎细胞起到了胎盘组织代偿性的作用<sup>[41,53,54]</sup>。

目前对大动物四倍体胚胎的研究较少,尚无对于山羊四倍体胚胎制备及其发育能力的报道,这里我们通过优化电融合条件获得了高效制备可发育的山羊四倍体胚胎的方法,研究了其附植前后的发育能力,为利用四倍体胚胎代偿克隆胚的胎盘组织试验提供了依据和可能。

### 5.1 试验材料

#### 5.1.1 主要试剂

基本同第二章。

#### 5.1.2 配制试剂

基本同第二章。

#### 5.1.3 耗材

基本同第二章。

#### 5.1.4 仪器

基本同第二章。

### 5.1.5 试验动物

性成熟青年奶山羊由上海转基因研究中心实验牧场提供。奶山羊饲养标准参考中国国家营养标准。试验动物饲养管理执行上海交通大学医学院伦理委员会规定。

## 5.2 方法

### 5.2.1 山羊超数排卵与 2-细胞胚胎回收

山羊超排处理,采用 FSH 递减法,总量 240IU,在注射 FSH 的第三天,同时注射 PG,第四天注射 LHRH-A3。供体羊在发情后 9~11 天进行超排处理方法如下:

山羊的超排规程

日程	上午(七时)	下午(十七时)
第一天(发情后 9~11 天)	FSH 50IU	FSH 50IU
第二天	FSH 40IU	FSH 40IU
第三天	FSH 30IU , PG (0.1mg)	FSH 30IU
第四天	LHRH-A3, 20 $\mu$ g (+3 时) 配种	
第五天		回收 2-细胞胚胎(+2 时)

改良 PBS 冲输卵管获取 2-细胞胚胎,在 mKSOM 培养微滴中洗 3 次后置于 mKSOM 微滴中恢复半小时待电融合。

### 5.2.2 2-细胞期胚胎裂球电融合

电融合按照 Iwasaki<sup>[19]</sup>文献报道。10-15 个 2-细胞胚胎在 0.3mol/l 甘露醇融合液 (0.1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05mM CaCl<sub>2</sub>, 0.3M 甘露醇, 0.5mg/mL BSA) 中洗 3 次,然后移入充满融合液的融合槽 (BTX-201, BTX, USA) 的两电极丝之间,融合直流电脉冲由电融合仪输出施加,细玻璃针排列胚胎使裂球的接触面与电极方向垂直,使用 0.8-1.3 kV/cm, 40  $\mu$ s 的直流电脉冲刺激胚胎。最后将胚胎吸出,在操作液 (M2) 中洗 3-4 次,置于 mKSOM 培养微滴中观察融合情况。刺激后每隔 1 小时观察 1 次,2 小时后仍未融合者弃之。

### 5.2.3 融合胚胎培养

融合的胚胎置于山羊体外发育液mKSOM中培养，培养条件，38.5℃,5%CO<sub>2</sub>，饱和湿度。每隔48小时换液1次，48小时后mKSOM培养液中添加5%FBS，观察发育时序和囊胚发育率。

或者，手术法将融合胚移植到山羊输卵管内，在输卵管和宫角连接部作双重结扎，待5天后回收融合胚胎，观察囊胚发育率。

### 5.2.4 染色体分析

发育到囊胚期的融合胚胎采用 pronase-Tyrode's 法去除透明带后移入含有 0.04ug/ml 秋水仙碱的培养液中培养 3 小时，M2 中洗数次，然后用 T/E 处理 5 分钟，M2 中洗 3 次后置于 40%FCS 中低渗 5—10 分钟，连同少量低渗液将胚胎移入固定液中（甲醇：冰乙酸：水=3：1：4）固定 5 分钟后，用巴斯德吸管吸取一定量的固定液和胚胎直接滴于载玻片上，40℃恒温干燥后 6%吉姆萨染色 5 分钟，洗片，室温干燥。

镜检，计数中期分裂相数和染色体数目。

### 5.2.5 Hoechst33342 染色和细胞计数

7 个体内培养的融合囊胚置于含有 Hoechst 33342 (5μg/mL)的 mKSOM 中 10 分钟。胚胎置于 100%甘油中，压成单层后在荧光显微镜下计数。

### 5.2.6 四倍体胚胎的着床分析

融合后胚胎再次卵裂后的胚胎移植于同期发情受体羊的输卵管内，每只受体羊的两侧输卵管各移 5 枚融合胚，分别于移植后的 20 天和 28 天，35 天剖检受体羊的子宫，计算着床点，观察胎儿和胎盘发育情况。

### 5.2.7 胚胎组织切片分析

受体子宫中回收的完整和降解的胚胎组织固定于 Bouin's 液中，用于石蜡切片分析。固定液洗净后所有固定的胚胎置于 80%的乙醇中过夜，梯度脱水后石蜡包埋，所有胚胎连续切片，厚度 5—8um，苏木精/伊红染色。小部分胚外组织用于分析染色体构成。

### 5.2.8 数据处理



百分比和平均数的显著性比较用 $t$  检验,  $P < 0.05$ 时为差异显著。

### 5.3 结果

#### 5.3.1 不同电刺激参数下胚胎融合和胚胎发育结果

根据相关的参考文献<sup>[191]</sup>和预试验,短的脉冲时程25—50us,被用于2—细胞胚胎的融合,我们选择了40us作为固定值,筛选合适的电融合参数。130v,1次脉冲作用后融合率很高,但是胚胎接受电刺激后有40%的死亡。110V,2次和3次均可以获得较高的融合率,但3次刺激后胚胎融合后有11.63%的裂解。80V,3次可获得稳定的融合效率,同时胚胎融合后无死亡。我们选择了110V,2次和80v,3次作为山羊2—细胞胚胎融合的最优参数。

从融合后的胚胎发育情况来看,低电压多次刺激(80V,3次)对于胚胎的影响明显小于高电压单次刺激(130V,40us),差异极显著( $P < 0.01$ )。80V,3次组的四倍体囊胚发育最高45.16%,与正常胚胎发育比较,无明显差异( $P > 0.05$ ),表明在2—细胞胚胎阶段对胚胎施加一定电压刺激,对胚胎的发育没有影响。四倍体胚胎的第1次卵裂率和囊胚发育率间无明显相关性(表6)。

表6 不同电场强度和脉冲次数对于2—细胞胚胎融合及融合胚胎发育的影响

刺激参数*	2-细胞 胚胎数	融合率 (%)		体内培 养	回收 (%)	附植前发育(%)**		
		融合数	破裂数			瓦解数	卵裂数	桑椹/囊 胚数
130v, 1×	30	30 (100)	12(40)	18	18(100)	9(50.0)	9(50.0)	0(0.0) <sup>a</sup>
110v, 1×	12	5(41.67)	0(0.0)	5	5(100)	0(0.0)	4(80)	1(20) <sup>b</sup>
2×	30	24(80)	0(0.0)	24	24(100)	2(3.33)	18(66.7)	4(16.67) <sup>b</sup>
3×	43	40(93.03)	5(12.5)	35	31(88.57)	10(32.26)	18(58.06)	3(9.68) <sup>b</sup>
80v, 2×	30	19(63.33)	0(0.0)	19	19(100)	3(15.78)	8(42.11)	8(42.11) <sup>c</sup>
3×	87	70(80.46)	0(0.0)	40	31(77.5)	7(22.59)	10(32.25)	14(45.16) <sup>c</sup>
对照	22	未刺激		22	22(100)	0(0.0)	5(22.73)	17(77.27) <sup>d</sup>

\* 脉冲时间为40μs。 \*\* 融合胚胎移入寄母输卵管内体内培养,5天后回收胚胎计算囊胚发育率。

字母肩标不同者标示差异显著( $P < 0.05$ )。

#### 5.3.2 不同培养方式时胚胎发育结果

对于正常的2N胚胎,体内培养和体外培养的胚胎发育情况无明显的差异,只是胚

胎在体外KSOM发育液中序贯培养6天后桑椹胚胎占一定的比例，而在体内培养时可以获得更高的囊胚发育率，同时我们也发现体内培养的囊胚细胞数多于体外培养的囊胚。

对于融合后的四倍体胚胎，体外培养可以获得一定比例的桑椹/囊胚发育，但是在体内培养相比有差异，说明四倍体胚胎的培养对于培养液有更高的要求。同样的，在体外培养条件下，四倍体胚胎的桑椹胚胎占更大的比例，说明体外培养体系对于胚胎的影响可能更主要在于囊胚腔的形成。四倍体胚胎从1细胞发育到囊胚的发育时间短于正常胚胎，大约缩短了32小时。4N胚胎的囊胚腔出现约为融合后120小时，但在受精后的157小时，比正常胚胎晚了6小时左右（图15-g）。

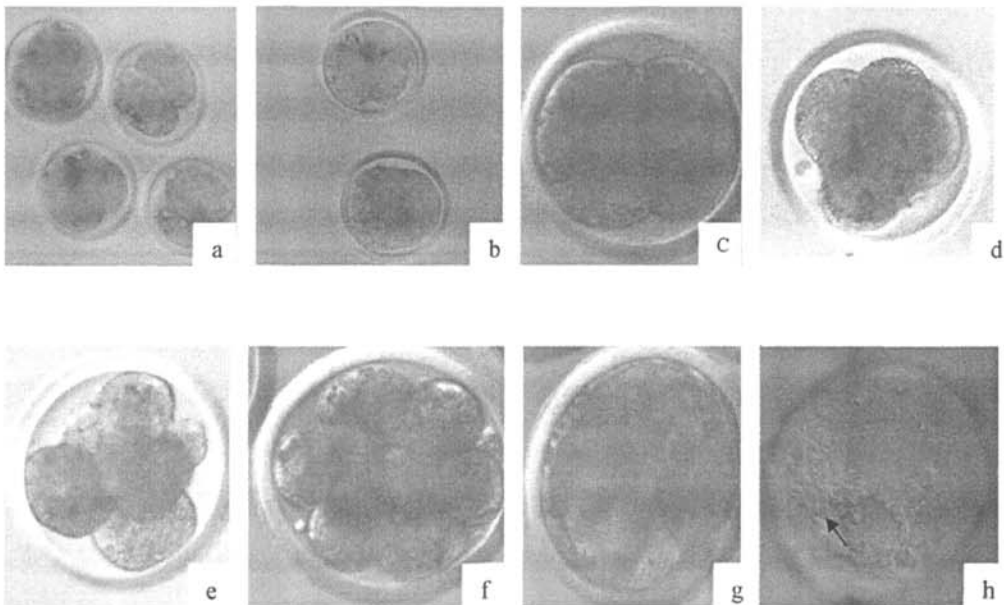


图 15 山羊四倍体胚胎发育

a 山羊 2-细胞期胚胎 b 胚胎融合 c 融合胚胎分裂 d 4-细胞期四倍体胚胎 e 8-细胞期四倍体胚胎 f 16-细胞期四倍体胚胎 g 四倍体囊胚 h 扩张囊胚

Fig. 15 development of goat tetraploid embryos

A. 2-cell embryos of diploid for eletrofusion, B. fused embryos, C. 2-cell tetraploid embryo, D. 4-cell tetraploid embryo, E. 8-cell tetraploid embryo, F. 16-cell tetraploid embryo, G. blastocyst of tetraploid, H. blastocyst of tetraploid (ICM arrowed).

表7 不同培养方式对于融合胚胎发育的影响

培养方法	2-cell 胚胎	融合 (%)	培养 胚胎数*	附植前发育 (%) **		
				4-8 cells	桑椹胚	囊胚
4N <sup>(1)</sup> <i>in vitro</i>	37	30(81.08)	19	12(63.15)	6(20)	1(3.33) <sup>a</sup>
2N <sup>(2)</sup> <i>in vitro</i>	21	ND	21	7(33.33)	6(28.57)	8(38.10) <sup>b</sup>
4N <sup>(1)</sup> <i>in vivo</i>	51	40(78.43)	31	ND	0(0.0)	14(45.16) <sup>b,c</sup>
2N <sup>(2)</sup> <i>in vivo</i>	22	ND	22	ND	2(9.09)	15(68.18) <sup>c</sup>

(1) 所有胚胎经过0.8 kV/cm, 40 μs, 3次电脉冲刺激;

(2) 二倍体胚胎回收自正常受精的母羊。

\* 所有胚胎培养从2-细胞阶段开始。

\*\*所有胚胎在体内体外培养6天, 体内培养胚胎回收率为100%。发育率以培养胚胎数目计算。字母肩标不同者标示差异显著(P<0.05)。

### 5.3.3 山羊四倍体胚胎细胞计数与核型分析

山羊 12 枚融合囊胚进行了核型分析, 其中 10 枚囊胚具有四倍染色体(图 16-a), 染色体数目为 120 条, 其余 1 枚为二倍体, 另外 1 枚为 2N / 4N 嵌合体。

体内培养获得的 7 枚融合囊胚进行细胞计数, 山羊四倍体囊胚的细胞数约为 53(53.3±2.8), 正常胚胎为 116.20±4.9(图 16-d)。融合囊胚的体积与正常二倍体囊胚体积相似, 但是单个四倍体囊胚的细胞体积和核区面积大于正常的二倍体细胞。

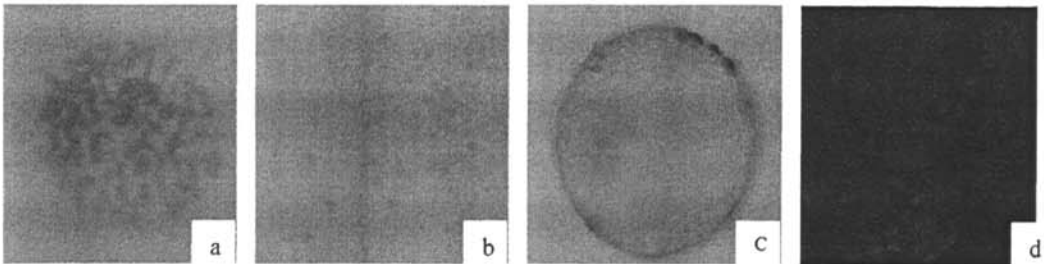


图 16 山羊四倍体胚胎核型分析与胚胎细胞计数

a 四倍体胚胎细胞核型 b 正常二倍体胚胎细胞核型 c 四倍体囊胚 d 四倍体囊胚的细胞计数

Fig. 16 Karyotype and cell counts of tetraploid goat blastocysts

a. Karyotype of goat tetraploid blastocyst cells, b. Karyotype of goat diploid blastocyst cells, c. cell counts of goat tetraploid blastocyst ( bright optic), d. cells count of goat tetraploid blastocyst (TCN=52).

### 5.3.4 山羊四倍体胚胎着床后发育

57 枚融合胚胎移植 6 个受体后分别在三个时间段解剖, 在 20 天时两个受体均发

现有妊娠反应, 在一个受体内发现有两个胎儿和三个退化的胚外组织, 另一个受体内有 4 个退化的胚外组织(图 17-b)。在 28 天时, 一个受体发现有妊娠反应, 发现有两个退化的残迹, 另一个受体则无妊娠迹象。在 35 天时, 两个受体均未有妊娠迹象。融合胚胎移植的受体中, 退化的胚外组织取细胞核型分析, 染色体数目为 120 条, 为四倍体来源。所有妊娠的融合胚胎受体卵巢存在妊娠黄体, 子宫有明显的充血和膨胀现象, 子宫阜出现增生。对照的正常二倍体胚胎移植 3 个受体, 在 28 天解剖时两个受体怀孕, 发现有七个胎儿, 胎膜发育正常。

从移植融合胚胎 28 天解剖的受体内发现的两个退化的胚胎组织, 其长度分别为 3.5 和 4.0cm, 胚胎出现大部分变性, 呈现如白色, 缺少血管分布, 胎膜内含有混浊的胎水, 但无明显的胎儿形态存在。组织学检测发现, 两个退化的胚胎组织胚外部分细胞构成和排列与二倍体胚胎类似(图 17-d), 其中一个退化的胚胎中有神经管样结构, 但缺少二倍体胚胎的其它组织器官。

上述的结果表明, 四倍体胚胎在进入子宫后可以诱导子宫出现妊娠反应, 四倍体胚胎经历了附植的过程, 胚胎可以发育, 尽管系统器官发生不全, 并在着床早期就已经退化并发生自溶。

表 8 融合胚胎移植 28 天的四倍体胚胎的附植后发育

胚胎类型	移植胚胎数/受体数	着床数/受体数*	着床数**
	体数		/ 移植胚胎数
融合胚胎	20 / 2	2 / 1	2/20(10.0%) <sup>a</sup>
正常胚胎	18 / 3	12 / 2	7/18(38.9%) <sup>b</sup>

\*山羊四倍体胚胎和二倍体胚胎在移植 28 天时同时回收。

\*\*着床数包括降解的胚胎。字母肩标不同者标示差异显著(P<0.05)。

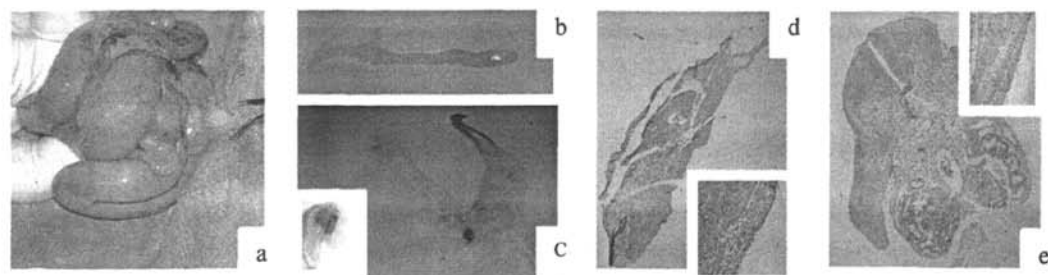


图 17 山羊四倍体胚胎的着床后发育

a 四倍体胚胎移植后 28 天的受体子宫 b 瓦解的四倍体胚胎 c 正常的二倍体胚胎 d 四倍体胚胎和胚外组织的横切面 e 正常二倍体胚胎和胚外组织的横切面

Fig. 17 post-implantation development of goat tetraploid embryos

a Uterus of one recipient 28 days after tetraploid embryos transferred b Degenerated tetraploid embryos c Normal diploid embryos d Transverse sections of tetraploid embryos and extraembryonic tissue e Transverse sections of diploid embryos and extraembryonic tissue

## 5.4 讨论

80V, 40us, 3次或者110V, 40us, 2次的融合参数可以获得山羊两细胞高的融合率(80%), 制备四倍体胚胎, 并且这些胚胎具有正常的发育能力, 完成早期的囊胚发育。40US的脉冲时程为哺乳动物两细胞融合通常采用的参数, 本研究的80V, 40us, 3次是本实验室胚胎细胞核移植的融合参数(融合率75—90%), 而110V, 40us, 2次是山羊体细胞核移植的融合参数(融合率74.86%—89.57%)。两种参数间的融合率基本一致, 但是融合过程的所需的时间上看, 110V组基本在40分钟内可以完成, 而80V组大部分需要1小时(60%), 最长的融合过程甚至需要1小时30分, 这可能融合的机制不同相关, 研究发现高电压可以在膜上直接穿孔, 造成胞质的迅速融合, 而低电压多次脉冲是膜蛋白变性而后发生的融合。结合后期四倍体胚胎发育情况, 我们选择了低电压多次脉冲为最优化的融合参数, 主要是考虑减小对胚胎的损害。

本研究中, 融合的山羊胚胎可以在体内和体外培养后均可早期发育到囊胚阶段, 囊胚发育率差别很大(45.16%VS3.33%), 体外培养中桑椹胚增多。在体外培养过程中发现, 山羊2—细胞胚胎融合后, 70%的胚胎在5—8小时内经历第一次分裂, 这时才可称为“四倍体胚胎”。其发育阻滞现象主要发生在4—8细胞阶段, 相当于二倍体胚胎的8—16细胞期。囊胚腔的出现大概32细胞的后期, 稍微滞后对照组二倍体胚胎, 说明囊胚腔的形成与细胞数目, 胞质分裂次数无关, 更可能是胚胎细胞卵裂过程中固有程序, 推测与DNA复制次数和核质比以及某些基因的表达相关, 我们在小鼠四倍体胚胎和八倍体胚胎的囊胚腔形成试验中也证明了这一点(未发表资料)。在总体的发育时序上, 山羊四倍体胚胎比二倍体胚胎发育到囊胚的时间要晚6小时, 晚期囊胚可以正常出壳, 但是胚胎细胞数目仅约为正常胚胎的一半, 内细胞团数目则更少, 这些现象与小鼠<sup>[192]</sup>、兔<sup>[193]</sup>上的结果类似。山羊晚期囊胚组织核型分析表明83.3%

(10/12), 具有四倍体核型, 染色体数目为120条, 其中的两个囊胚分别具有二倍体核型和嵌合体核型, 这和牛(78.4%)、小鼠(90%)、兔(72.7%)的结果相似。经过山羊四倍体胚胎, 电刺激的未融合的胚胎, 正常发育, 囊胚发育率与正常胚胎差异不显著 ( $P>0.05$ ), 表明一定的电刺激对胚胎细胞的发育没有显著影响, 这与牛<sup>[191]</sup>上的结果不同, 可能是体外受精的胚胎与正常受精的胚胎间对于电刺激的耐受有很大的差别。

在融合的胚胎移植受体试验中, 移植后25天和30天进行解剖后发现有着床的遗迹, 子宫的孕向变化, 对于着床后退化的胚胎组织分析无相关胎儿成分, 主要是胎膜, 核型分析证实是四倍体胚胎来源, 提示四倍体胚胎细胞可能并无器官发生, 缺少形成器官的细胞组成, 但是其胚外组织发育正常。在着床分析中, 我们每个受体山羊移植的胚胎数较多, 主要是观察其着床的效率, 山羊四倍体胚胎早期的着床率为40%, 解剖过程中曾发现有两个胎儿, 但是培养细胞做核型和细胞DNA含量检测其为二倍体和2N / 4N嵌合体。在小鼠和兔的实验中, 融合的四倍体胚胎可以正常发育到囊胚阶段, 但都没有经历器官发生阶段<sup>[194]</sup>, 除了极少数的报道<sup>[56]</sup>。研究表明四倍体胚胎发育的失败主要是由于原条形成的异常, 导致缺少中胚层, 或者是由于四倍体细胞数少而细胞变大引起的生理的异常, 但同时也发现其基因表达处于平衡态<sup>[195]</sup>。在小鼠, 大鼠, 猴和牛的研究表明, 利用四倍体胚胎的细胞的发育特性, 四倍体胚胎已经用于滋养层缺陷胚胎, ES细胞和体细胞克隆的有效的胚外组织代偿<sup>[52-196-198]</sup>。山羊四倍体胚胎产生的胚外组织的印迹状态和甲基化水平是否正常有待进一步研究。电融合法制备山羊四倍体胚胎不仅可以用于多倍体胚胎的代谢和发育研究, 而且在大动物上能否像小鼠研究中一样利用四倍体胚胎细胞的代偿作用为体细胞克隆和濒危物种的克隆提供正常的胚外组织更值得进一步的探索。

### 小结

利用电融合山羊2-细胞胚胎可以高效产生四倍体胚胎, 融合的四倍体胚胎可以正常在体内、外发育到囊胚阶段;

在移植受体羊子宫后可以着床, 尽管胚胎发育无法形成正常的器官, 但是其胚外组织的发育正常。

## 第六章 塔尔羊异种重构胚胎与山羊四倍体胚胎聚合及着床潜力的研究

塔尔羊异种重构胚在移植异种受体山羊子宫后在早期即发生丧失,虽然可以发育至“C”型期,但是胚胎发育迟缓,并存在自溶,推测胚胎和子宫存在不相容和免疫排斥,这些现象与异种克隆研究文献报道相似<sup>[27, 29]</sup>。

四倍体胚胎在小鼠<sup>[190, 199]</sup>,大鼠<sup>[196]</sup>,牛<sup>[52, 198]</sup>,猴<sup>[197]</sup>研究上证实可以有效代偿胚胎或者ES细胞的胚外组织,并且不参与胎儿的发育,而是限制性分布于胚外滋养层部分。但是,这些二倍体胚胎—四倍体胚胎或者二倍体ES—四倍体胚胎聚合研究均是同种间聚合,虽然种间2N—2N胚胎聚合曾有成功的报道,但是仅限于小鼠不同品系间,小鼠—大鼠<sup>[48]</sup>,绵—山羊<sup>[49]</sup>之间。

我们尝试着在胚胎早期发育阶段将塔尔羊异种重构胚胎(2N)与山羊四倍体胚胎(4N)聚合,观察其这种聚合后的嵌合体胚胎的植入前后的发育能力,以期能够解决异种重构胚着床后胚胎丧失的问题。

### 6.1 试验材料

#### 6.1.1 主要试剂

大部分与第二章相同。

植物凝集素(PHA) (Sigma, L4144, 储存: 2°C-8°C)

Protease

Tyrode's 液

戊二醛

钨酸

Epon2812

#### 6.1.2 试剂配制

5% Protease 液

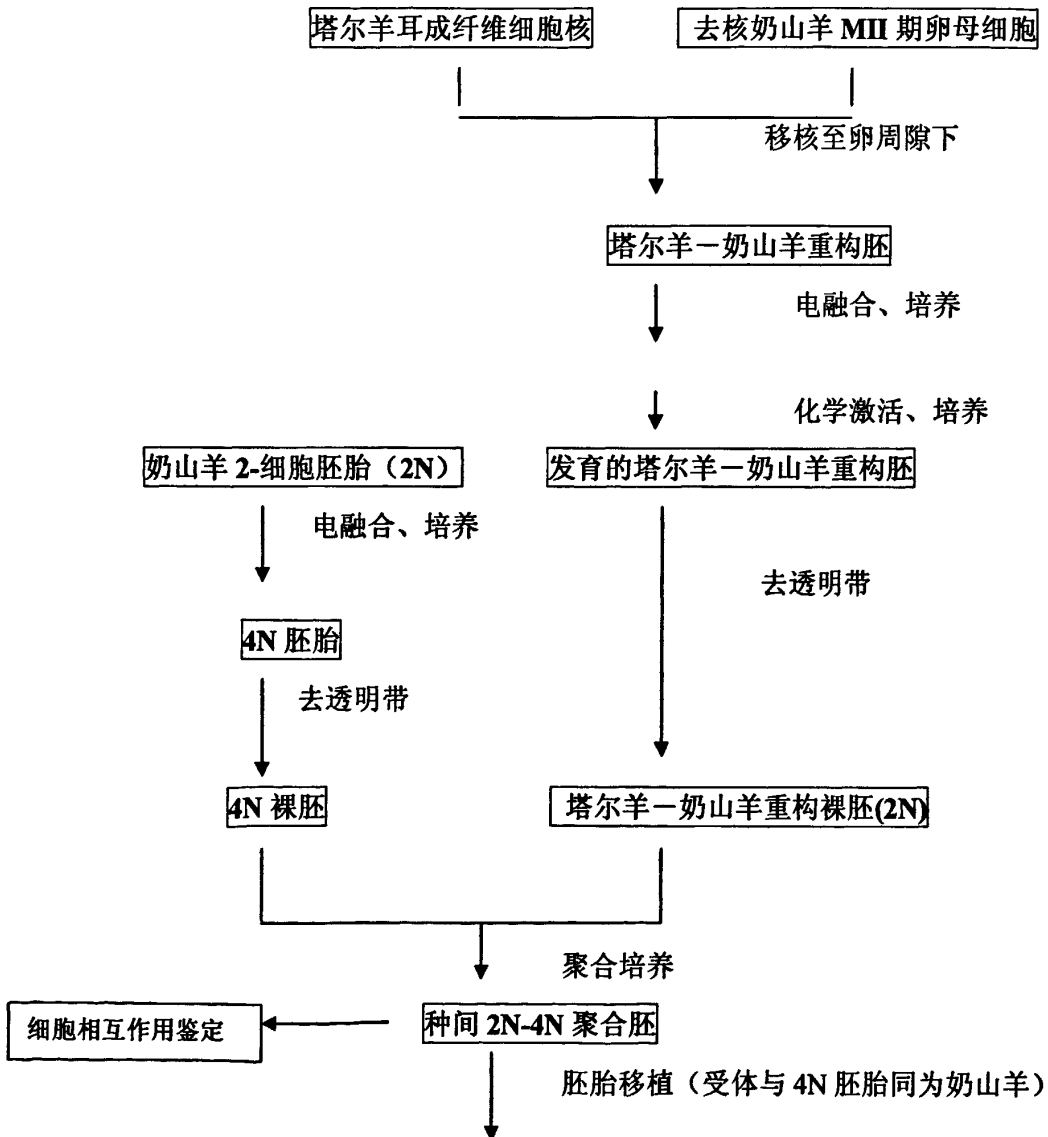
试剂名	级别	分子量	g/50ml	说明
Protease	embryo tested		0.25g	6IU/mg
PVP	embryo tested	36000	0.25g	K 值: 8-10
M16			50ml	

过滤除菌，每管 0.5ml 分装， $-20^{\circ}\sim-70^{\circ}$  存放。

### 6.1.3 仪器

LKB5 型超薄切片机	瑞典
J EL21200II 型透射电子显微镜	日立 日本
DN-10 型打孔针	BLS 匈牙利

### 6.2 技术路线





**着床潜能观察****6.3 方法****6.3.1 奶山羊四倍体胚胎制备**

方法同第五章。

**6.3.2 异种体细胞核移植**

方法同第二章。

**6.3.3 2N-4N 胚胎聚合****6.3.3.1 去透明带**

将发育至 4-cell 期的山羊 4N 胚胎与回收的 8-cell 期塔尔羊异种核移植胚胎回收后转至 0.5% 的 Protease 液滴中 3-5 分钟,透明带变软后立即放入 Tyrode'S 中 30 秒,去除透明带;然后立即用含 20%FBS 的 M2 洗涤 6 次,裸胚置于 mKSOM 中恢复 15 分钟。

**6.3.3.2 聚合**

在含 180-200 $\mu$ g/mlPHA-P 的 mKSOM 微滴中,分别以常规 1:1(1 枚 2N 胚胎配 1 枚 4N 胚胎)与“夹心法”(1 枚 2N 胚胎夹于 2 枚 4N 胚胎之间)方式制作组合,用细的钝头玻璃针使胚胎对相互靠紧,放置聚合胚 10 分钟。聚合成功的成对胚胎在 mKSOM 培养液中洗涤 3 次后置于含 10%FBS 的 mKSOM 培养。

**6.3.3.3 聚合胚体外培养**

mKSOM 培养液中培养 72 小时,记录发育情况,囊胚用于细胞分布检测检测或移植受体。

**6.3.4 聚合囊胚电镜操作步骤**

- a) 用 4%多聚甲醛(在 0.05mol/L 磷酸缓冲液中, PH7.2) 在原位固定(4 $^{\circ}$ C) 1h; D-PBS 配制的 2.5%戊二醛漂洗聚合胚 1 次,吸出卵并立即置入含 0.5ml 2.5%戊二醛液中,封口,标记,4 $^{\circ}$ C 保存供电镜制作。
- b) 小心地用吸管吸出聚合胚胎,经 PBS 充分洗净后,用 0.1M PBS 配制的 1% OsO<sub>4</sub> 固定处理 2 小时。固定后,用 0.1 M PBS 漂洗 3 次,每次 10 分钟。

c) 然后经乙醇(30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%) 逐级脱水各 10 min, 100% 丙酮置换 10 min (以上每步均在体视显微镜下操作), 再放入 1:1 的丙酮与 Epon2812 中浸透 1 h, 纯 Epon2812 浸透 12 h。

d) 最后, 将样品吸到倒好包埋剂的包埋板上, 注意避免产生气泡, (37 °C、45 °C、60 °C 各 24 h) 聚合。包埋块在实体镜下修成小梯形, 在 LKB-5 型超薄切片机上切片。醋酸双氧铀和柠檬酸铅各染色 10 min。样品在 JEL21200II 电镜下观察和拍照, 观察胚胎异种细胞间的连接与相互作用。

### 6.3.5 聚合囊胚的嵌合性分析

聚合囊胚的染色体核型分析方法同重构胚胎的核型分析。

### 6.3.6 聚合囊胚移植后着床分析

塔尔羊异种重构胚与奶山羊四倍体胚胎聚合形成的囊胚移植到周期同步的奶山羊子宫内观察着床后的发育情况, 分别在移植后的胚龄的 20 天, 28 天和 35 天, 剖检子宫检测聚合囊胚的着床点和发育状态。

## 6.4 结果

### 6.4.1 异种重构胚与四倍体胚胎的聚合

3 天胚龄的塔尔羊异种重构胚 (8-cell 期) 与奶山羊四倍体胚胎 (4-cell 期) 聚合后在 KSOM 发育液中培养 1 天后形成单一胚胎 (图 18-d), 培养 3 天后发育至囊胚阶段 (图 18-e)。

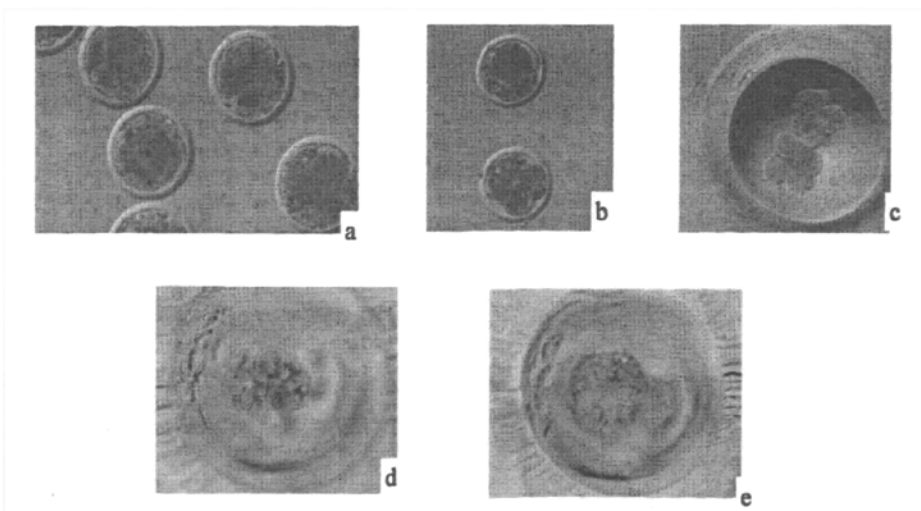


图 18 塔尔羊异种重构胚与奶山羊四倍体胚胎聚合以及聚合后的早期发育

a 塔尔羊异种重构胚 8-cell 期胚胎 b 山羊 4-cell 期四倍体胚胎 c 去除透明带后两种胚胎聚合 d 24h 后发育成单个胚胎 e 72h 后发育至嵌合囊胚

Fig 18 the development of chimeric embryos aggregated by tahr constructed embryos with goat tetraploid embryos a tahr constructed 8-cell embryos b goat 4-cell tetraploid embryos c embryo aggregates after the removal of the zona pellucidas d "single" embryo after culture for 24h e chimeric blastocysts after culture for 72h.

#### 6.4.2 聚合囊胚的细胞间连接

通过囊胚透射电镜分析塔尔羊异种重构胚胎细胞与奶山羊四倍体胚胎细胞聚合后在囊胚中，两种来源的细胞之间的连接，以及是否存在相互作用。从电镜结果看，四倍体胚胎主要分布在囊胚的滋养层部分（图 19-a），具有较大的核区面积，而异种重构胚细胞在内细胞团和滋养层部分都有分布。两种细胞间，初步认定存在间隙样通讯连接（图 19-b, c）。



图 19 聚合囊胚中塔尔羊异种重构胚胎细胞与奶山羊四倍体胚胎细胞间连接 a,b,c 为观察到的两种细胞间出现的间隙样连接

Fig 19 cellular links between tahr cloned embryonic cells and goat tetraploid embryonic cells in the chimeric blastocysts a,b,c were cell-cell junctions appeared.

#### 6.4.3 聚合囊胚的遗传学鉴定

通过聚合囊胚的核型分析，确定了四倍体胚胎细胞与异种重构胚胎细胞的嵌合性分布（图 20-b, c），且四倍体胚胎细胞主要存在于滋养层部分，基本不参与内细胞团的组成。

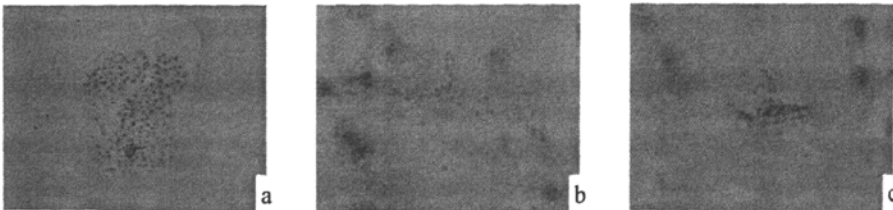


图 20 聚合囊胚的染色体核型分析其嵌合性

a 聚合囊胚的核型分析 b a 中的内细胞团的 1 个核型 ( $2n=60$ ) c a 中滋养层部分的 1 个核型 ( $4n=120$ )

Fig 20 Chimeric analysis of karyotype in the aggregated blastocysts

a Karyotype of the blastocyst b one karyotype in the ICM ( $2n=60$ ) c one karyotype in the TE region ( $4n=120$ )

#### 6.4.4 聚合囊胚移植后的着床

聚合囊胚在移植后 11 天, 21 天, 28 天后解剖受体羊, 子宫出现妊娠反应, 子宫阜出现增生和血管化, 但是仅发现退化的胚胎残迹, 未能获得异种重构胚的进一步发育, 这可能和样本量过少有关或者是因为体外无透明带培养给胚胎发育带来的有害影响, 使得聚合后的嵌合体胚胎发育受到限制。

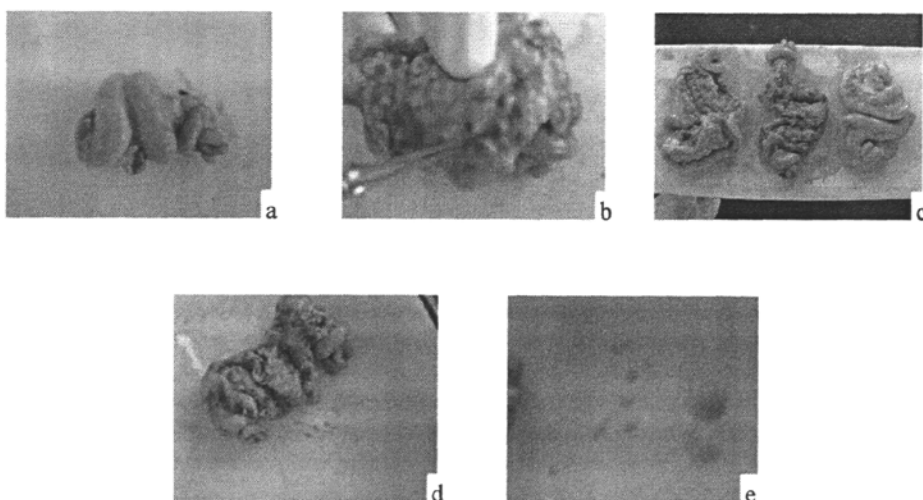


图 21 聚合后的嵌合囊胚的着床后的发育

a 聚合胚胎移植 11 天后的受体羊子宫 b 子宫阜增生 c 移植 11 天, 21 天, 28 天后的受体羊子宫剖面 d, e 移植 11 天后受体羊子宫内退化胚胎残迹

Fig 21 postimplantation development of chimeric embryos

a the recipients' uterus on the 11<sup>th</sup> after embryos transferred b endometria proliferateion c the comparasions of recipients' uteri on the 11<sup>th</sup>, 21<sup>th</sup> and 28<sup>th</sup> after embryos transfer, d,e degenerated embryos in the recipients' uteri.

## 6.5 讨论

### 塔尔羊异种重构胚—奶山羊四倍体胚胎聚合后可以体外发育至囊胚

本实验中, 塔尔羊的 8-细胞重构胚能够与奶山羊 4-细胞的四倍体胚胎聚合,

发育成为嵌合胚，并且在附植前发育成为囊胚。在以往的研究中，小鼠一大鼠的二倍体胚胎，绵—山羊胚胎可以聚合形成单个胚胎，这些异种胚胎的聚合时间都在胚胎发育早期，胚胎细胞间尚无细胞分化决定和极化现象，细胞的连接也以间隙连接为主。异种重构胚 8-细胞与奶山羊四倍体细胞聚合形成的囊胚中，我们在滋养层细胞核型中发现了四倍染色体，说明四倍体胚胎细胞在囊胚中有分布于滋养层细胞的倾向。同时，在内细胞团位置，是塔尔羊细胞的核型，这种异种嵌合囊胚的细胞分布模式与同种 2N-4N 细胞的分布模式基本一致<sup>[60][194]</sup>。小鼠，2N-4N 聚合囊胚的发育中，四倍体胚胎细胞的分布，在囊胚是具有明显的滋养层细胞分布倾向，这可能与对四倍体细胞的负选择相关，使得四倍体细胞在整个胚胎中所占比例减少，同时在分布上退出内细胞团位置<sup>[200, 201, 202]</sup>，从而在胎儿发育期仅分布在胎盘部分，而不参与胎儿的发育。

我们采用了囊胚透射电镜的方法检测了滋养层细胞与内细胞团细胞间的细胞间连接，从电子密度的分布可以看出，滋养层细胞与内细胞团细胞之间存在间隙样的细胞连接，初步判定奶山羊四倍体胚胎细胞与塔尔羊内细胞团细胞存在细胞信号传递，异种的内细胞团细胞对于四倍体胚胎滋养层细胞的分布定位可能起到控制的作用。

### 异种聚合囊胚移植后的发育

聚合囊胚移植后，在胚龄 17 天时，子宫存有妊娠反应，但是胚胎已经瓦解，未能获得着床的胎儿。这和我们的预期有一定的相差，推测可能有几方面的原因：

首先，胚胎在体外培养系统中的条件可能不是最优的，造成了聚合胚胎的活力下降，而且胚胎在体外的操作环节过多也是其胚胎质量不好的原因。

其次，胚胎由于缺乏透明带，容易质脆，和瓦解。在囊胚移植和手术过程中很容易引起胚胎的死亡。另外，裸胚在同种胚胎移植中也表现为较低的着床效率。

最后，我们移植的受体数较少，可能也是我们未获得异种聚合胚着床的原因。

## 小结

塔尔羊异种重构胚胎早期发育阶段可以和奶山羊四倍体胚胎聚合，嵌合胚可以在体外发育到囊胚阶段。

嵌合胚囊胚阶段奶山羊四倍体胚胎分布在滋养层细胞部分。

聚合囊胚在移植受体早期发生瓦解，虽然受体子宫存在妊娠反应。

## 参考文献

- [1] Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997, 385: 810-3.
- [2] Wakayama T, Yanagimachi R. Cloning of male mice from adult tail-tip cells. *Nat Genet* 1999, 22: 127-128.
- [3] Zhou Q, Renard JP, Le Friec G, Brochard V, Beaujean N, Cherifi Y, Fraichard A, Cozzi J. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science* 2003, 302: 1179.
- [4] Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de León FA, Robl JM. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*. 1998, 280(5367): 1256-8.
- [5] Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 1998, 282(5396): 2095-8.
- [6] Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempes MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overstrom EW, Echelard Y. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol* 1999, 17: 456-461.
- [7] Woods GL, White KL, Vanderwall DK, Li GP, Aston KI, Bunch TD, Meerdo LN, Pate BJ. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science* 2003, 301: 1063.
- [8] Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayres DL, Colman A, Campbell KH. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 2000, 407: 86-90.
- [9] Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, Perry AC. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 2000, 289: 1188-1190.
- [10] Forsythe T, Golueke P, Jurgella G, Koppang R, Lesmeister T, Mallon K, Mell G, Misica P, Pace M, Pfister-Genskow M, Strelchenko N, Voelker G, Watt S, Thompson S and Bishop M: Production of cloned pigs from in vitro systems. *Nature Biotechnology* 2000, 18: 1055-1059.
- [11] Galli C, Lagutina I, Crotti G, Colleoni S, Turini P, Ponderato N, Duchi R, Lazzari G. A cloned horse born to its dam twin. *Nature* 2003, 424: 635.

- [12] Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, Buck S, Murphy K, Lyons L, Westhusin M. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 2002, 415: 859.
- [13] Lee BC, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Shamim MH, Kim JJ, Kang SK, Schatten G, Hwang WS. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature* 2005, 436: 641.
- [14] Chesne P, Adenot PG, Viglietta C, Baratte M, Boulanger L, Renard JP. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol* 2002, 20: 366-369.
- [15] Li Z, Sun X, Chen J, Liu X, Wisely SM, Zhou Q, Renard JP, Leno GH, Engelhardt JF. Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. *Dev Biol.* 2006, 293(2): 439-48.
- [16] Berg DK, Li C, Asher G, Wells DN, Oback B. Red deer cloned from antler stem cells and their differentiated progeny. *Biol Reprod* 2007, 77(3): 384-394.
- [17] Shi D, Lu F, Wei Y, Cui K, Yang S, Wei J, Liu Q. Buffaloes (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. *Biol Reprod* 2007, 77:285-291.
- [18] Lanza RP, Cibelli JB, Diaz FM, Farin PW, Farin CE, Hammer CJ, West MD, Damiani P. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning* 2000, 2: 79-91.
- [19] Stojkovic M, Stojkovic P, Leary C, Hall VJ, Armstrong L, Herbert M, Nesbitt M, Lako M, Murdoch A. Derivation of a human blastocyst after heterologous nuclear transfer to donated oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005,11(2): 226-31.
- [20] Semple JL, Ribas G, Hillyard G, et al. A novel gene encoding a coiled-coil mitochondrial protein located at the telomeric end of the human M HC Class III region. *Gene* 2003, 314: 41-54.
- [21] Mc Grath J, Solter D. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. *Science* 1984, 226 (4680): 1317-9.
- [22] 梅祺 邹贤刚 杜森. 鼠兔核质杂交胚胎早期发育的研究. *实验生物学报* 1993, 26(4): 389-397.
- [23] Wells D N, Misica P M, Tervit H R et al. Adult somatic nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderly Island cattle breed. *Reprod Fertil Dev* 1998, 10: 369-378.
- [24] Gomez MC, Pope CE, Giraldo A, Lyons LA, Harris RF, King AL, Cole A, Godke RA, Dresser BL. Birth of African Wild cat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning*



Stem Cells 2004, 6: 247-258.

[25] Chen J Q, Chen J, XU X J et al. Effect of cytoplasm on the development of inter-species nuclear transfer reconstructed goat embryo. *Mol Reprod Dev* 2006, 74(5): 568-573.

[26] Dominko T, Mitalipova M, Haley B et al. Bovine oocyte cytoplasm support development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biol Reprod*, 1999, 60: 1496-502.

[27] White K L, Bunch TD, Mitalipov S, et al. Establishment of pregnancy after the transfer embryos produced from the fusion of Argali (*Ovis ammon*) nuclei into domestic sheep (*Ovis aries*) enucleated oocytes. *Cloning* 2000, 1(1): 47-54.

[28] 陈大元 孙青原 刘冀珑 等. 大熊猫供核体细胞在兔卵胞质中可去分化而支持早期重构胚发育. *中国科学, C辑*, 1999, 29(3): 324-330.

[29] Yang CX, Kou ZH, Wang K et al. Quantitative analysis of mitochondrial DNAs in macaque embryos reprogrammed by rabbit oocytes. *Reproduction* 2004, 127(2): 201-5.

[30] Chen D Y. Achievement of giant panda cloning. *Bulletin of the Chinese Academy of Sciences* 2000, 2: 120-121.

[31] Loi P, Ptak G, Barboni B et al. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat Biotechnol* 2001, 19(10): 962-4.

[32] Lanza R P, Dresser BL, Damiani P. Cloning Noah's ark. *Sci Am* 2000, 283(5): 84-9.

[33] Illmensee K, Levanduski M, Zavos PM. Evaluation of the embryonic preimplantation potential of human adult somatic cells via an embryo interspecies bioassay using bovine oocytes. *Fertil Steril* 2006, 85: 1248-60.

[34] Chen Y, He Z X, Liu A L et al. Embryonic stem cells generated by nuclear transfer of human somatic nuclei into rabbit oocytes. *Cell Research* 2003, 13(4): 251-263.

[35] Anderson G B. Interspecific pregnancy: barriers and prospects. *Biol Reprod* 1988, 38: (1): 1-15.

[36] Rossant J, Croy BA, Clark DA et al. Interspecies hybrids and chimeras in mice. *J Exp Zool* 1983, 228(2): 223-33.

[37] Rossant J, Mauro VM, Croy BA. Importance of trophoblast genotype for survival of

- interspecific murine chimeras. *J Embryol Exp Morph* 1982, 69: 141-9.
- [38] Polzin VJ, Anderson DL, Anderson GB et al. Production of sheep-goat chimeras by inner cell mass transplantation. *J Anim Sci* 1987, 65(1): 325-30.
- [39] Chen D Y, Wen DC, Zhang YP, et al. Interspecies implantation and mitochondria fate of panda-rabbit cloned embryos. *Biol Reprod* 2002, 67(2): 637-42.
- [40] Surani MA, Barton SC, Norris ML. Experimental reconstruction of eggs and embryos: an analysis of mammalian development. *Biol Reprod* 1987, 36(1): 1-16.
- [41] Nagy A, Rossant J, Nagy R et al. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(18): 8424-8.
- [42] Tarkowski AK, Mouse chimaeras developed from fused eggs. *Nature* 1961, 190: 357-60.
- [43] Lu TY and Markert CL. Manufacture of diploid/tetraploid chimeric mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, 77(10): 6012-6016.
- [44] Yang XZ, Foote RH, Production of chimeric rabbits from morulae by a simple procedure. *Gamete Res*, 1988, 21(4): 345-51.
- [45] Onishi A, Takeda K, et al., Production of chimeric pigs and the analysis of chimerism using mitochondrial deoxyribonucleic acid as a cell marker. *Reprod* 1994, 51(6): 1069-75.
- [46] Fehilly CB, Willadsen SM, Tucker EM, Experimental chimaerism in sheep. *J Reprod Fertil*, 1984, 70(1): 347-51.
- [47] Picard L, Chartrain I, et al., Production of chimaeric bovine embryos and calves by aggregation of inner cell masses with morulae. *Mol Reprod Dev*. 1990, 27(4): 295-304.
- [48] Rossant J, Chapman VM. Somatic and germline mosaicism in interspecific chimaeras between *Mus musculus* and *Mus caroli*. *J Embryol Exp Morphol*. 1983, 73: 193-205.
- [49] Fehilly CB, Willadsen SM, Tucker EM. Interspecific chimaerism between sheep and goat. *Nature* 1984, 12: 16-22.
- [50] 李赞东 刘春海 黄劲松 沙金 危华 孙明军 赵晨 姜盛花 Hiroshi KAGAMI. 鸡鸭异种间嵌合体的制备. *动物学报* 2002, 48 (4) : 543~548.
- [51] Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de León FA, Robl JM Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived

- stem-like cell. *Nat Biotechnol.* 1998, 16(7): 642-6.
- [52] Iwasaki S, Campbell K.H.S., Galli C, Akiyama K and Iwasaki S. Production of Live Calves Derived from Embryonic Stem-Like Cells Aggregated with Tetraploid Embryos. *Biology of Reproduction* 2000, 62, 470–475.
- [53] Hochedlinger K, Jaenisch R. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature* 2002, 415: 1035-8.
- [54] Eggen K, Baldwin K, Tackett M, Osborne J, Gogos J, Chess A, Axel R and Jaenisch R. Mice cloned from olfactory sensory neurons. *Nature* 428, 2004: 44-49.
- [55] Hgren EB, Polyploidization of extraembryonic tissues during mouse embryogenesis. *J Embryol Exp Morphol* 1980, 59: 103-11.
- [56] Snow MHL. Tetraploid mouse embryos produced by cytochalasin B during cleavage. *Nature* 1973, 244: 513-4.
- [57] Kanfman MH, Webb S, Postimplantation development of tetraploid mouse embryos produced by electrofusion. *Development*, 1990, 10: 1121-1132.
- [58] Graham CF. Virus assisted fusion of embryonic cells. *Acta Endocr, Copenh. Supp.*, 1971, 153: 154-165.
- [59] Nagy A, Gocza E, Merentes Diaz E, et al. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development* 1990, 110(3): 15-21.
- [60] James RM, Klerkx Ahem, Keighren M, et al. Restricted distribution of tetraploid cells in mouse tetraploid-diploid chimaeras. *Dev Biol* 1995, 167(1): 213-26.
- [61] Guillemot F, Nagy A, Auerbach A, et al. Essential role of Mash-2 in extraembryonic development. *Nature* 1994, 371(6495): 333-6.
- [62] Wu L, de Bruin A, Saavedra HI, et al. Extra-embryonic function of Rb is essential for embryonic development and viability. *Nature* 2003, 421(6926): 942-7.
- [63] Hobbs NK. Removing the vertebrate-specific TBP N terminus disrupts placental beta2m-dependent interactions with the maternal immune system. *Cell* 2002, 110(1): 43-54.
- [64] 斯佩克特等著, 黄培堂等译。细胞实验指南, 北京: 科学出版社, 2001
- [65] Campbell KHS, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996, 380: 64–66.

- [66] Boquest AC, Day BN, Prather RS. Flow cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells. *Biol Reprod*. 1999, 60(4): 1013-9.
- [67] 杨彩侠 吴昱琪 韩之明 朱子玉 陈大元. 用于克隆的猕猴耳成纤维细胞的培养及其有关生物学特性. *细胞生物学杂志*, 2004, 26 (4): 417-420.
- [68] Zou X, Wang Y, Cheng Y, Yang Y, Ju H, Tang H, Shen Y, Mu Z, Xu S, Du M. Generation of cloned goats (*Capra hircus*) from transfected foetal fibroblast cells, the effect of donor cell cycle. *Mol Reprod Dev*. 2002, 61(2): 164-72.
- [69] Zhao ZJ, Li RC, Cao HH, Zhang QJ, Jiang MX, Ouyang YC, Nan CL, Lei ZL, Song XF, Sun QY, Chen DY. Interspecies nuclear transfer of Tibetan antelope using caprine oocyte as recipient. *Mol Reprod Dev*. 2007, 74(4): 412-9.
- [70] Jiang Y, Chen T, Nan CL, Ouyang YC, Sun QY, Chen DY. In vitro culture and mtDNA fate of ibex-rabbit nuclear transfer embryos. *Zygote* 2005, 13(3): 233-40.
- [71] Li Y, Dai Y, Du W, Zhao C, Wang L, Wang H, Liu Y, Li R, Li N. In vitro development of yak (*Bos grunniens*) embryos generated by interspecies nuclear transfer. *Anim Reprod Sci*. 2007, 101(1-2): 45-59.
- [72] 徐旭俊 陈娟 沙红英 陈建泉 成国祥 吴友兵. 山羊卵母细胞重编程异种体细胞研究. *生物工程学报*, 2008(待发表).
- [73] 王海 敖红 潘求真 李荣旗 赵孟彬 连正兴 李宁 吴常信. 绵羊胎儿成纤维细胞不同处理对核移植重构胚发育的影响. *中国科学 C 辑* 2006, 36 (5): 398-404
- [74] Bruggerhoff K, Zakhartchenko V, Wenigerkind H, Reichenbach HD, Prella K, Schernthaner W, Alberio R, Kuchenhoff H, Stojkovic M, Brem G, Hiendleder S, Wolf E. Bovine somatic cell nuclear transfer using recipient oocytes recovered by ovum pick-up: effect of maternal lineage of oocyte donors. *Biol Reprod* 2002, 66(2): 367-73.
- [75] Lazzari G, Wrenzycki C, Herrmann D, Duchi R, Kruij T, Niemann H, et al. Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biol Reprod* 2002, 67: 767-75.
- [76] Wells DN, Misica PM, Day TA, Tervit HR. Production of cloned lambs from an established embryonic cell line: a comparison between in vivo- and in vitro-matured cytoplasts. *Biol Reprod* 1997, 57(2): 385-93.

- [77] Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard MA. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol Reprod* 2002, 66: 38–43.
- [78] Rizos D, Fair T, Papadopoulos S, Boland MP, Lonergan P. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Mol Reprod Dev* 2002, 62: 320–7.
- [79] Choi YH, Carnevale EM, Seidel Jr GE, Squires EL. Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. *Theriogenology* 2001,56:661–70.
- [80] Ward F, Enright B, Rizos D, Boland M, Lonergan P. Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology* 2002, 57: 2105–17.
- [81] Holm P, Walker SK, Seamark RF. Embryo viability, duration of gestation and birth weight in sheep after transfer of in vitro matured and in vitro fertilized zygotes cultured in vitro or in vivo. *J Reprod Fertil* 1996, 107: 175–81.
- [82] Behboodi E, Groen W, Destrempe MM, Williams JL, Ohlrichs C, Gavin WG, et al. Transgenic production from in vivo-derived embryos: effect on calf birth weight and sex ratio. *Mol Reprod Dev* 2001, 60: 27–37.
- [83] Farin P W, Piedrahita J A, Farin C E. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 2006, 65: 178–191.
- [84] Kitiyanant Y, Saikhun J, Chaisalee B, White KL, Pavasuthipaisit K. Somatic cell cloning in Buffalo (*Bubalus bubalis*): effects of interspecies cytoplasmic recipients and activation procedures. *Cloning Stem Cells* 2001, 3(3): 97-104.
- [85] Holden C., Another Endangered Species Cloned, *Science*. 2003, 300(18): 421.
- [86] Murakami M, Otoi T, Wongsrikeao P, Agung B, Sambuu R, Suzuki T. Development of interspecies cloned embryos in yak and dog. *Cloning Stem Cells* 2005, 7(2): 77-81.
- [87] 王春雨 刘凤军 武浩 魏欣 赵甫涛 贾战生. 人-山羊异种核移植胚胎发育的初步研究. *生命科学研究* 2006, 10(1): 50-54.
- [88] 李煜 梁琳 王振飞 旭日干. 小鼠-牛体细胞种间核移植. *中国生物工程杂志* 2006, 26 (7): 74–79.
- [89] Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 1986, 320(6057):

63-5.

[90] Campbell KH. Nuclear transfer in farm animal species *Semin Cell Dev Biol.* 1999, 10(3): 245-52.

[91] Ding L J Tian HB Wang JJ Chen J Sha HY CHEN JQ Cheng GX. Different Intervals of Ovum Pick-Up Affect the Competence of Oocytes to Support the Preimplantation Development of Cloned Bovine Embryos. *Molecular Reproduction and Development* 2008, 9999: 1-6.

[92] Developmental competence of porcine blastocysts produced in vitro. *J Reprod Dev.* 2004, 50(1): 21-8.

[93] Lonergan P, Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Fair T, Boland MP. Effect of culture environment on embryo quality and gene expression - experience from animal studies. *Reprod Biomed Online.* 2003, 7(6): 657-63.

[94] Fernandez-Gonzalez R, Moreira P, Bilbao A, Jimenez A, Perez-Crespo M, Ramirez MA, et al. Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101: 5880-5.

[95] Khosla S, Dean W, Brown D, Reik W, Feil R. Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. *Biol Reprod* 2001, 64: 918-26.

[96] Keefer C.L. Keyston R., Lazaris A., Bhatia B., Begin I., Bilodeau A.S., Zhou F.J., Kafidi N., Wang B., Baldassarre H., and Karatzas C.N. Production of Cloned Goats after Nuclear Transfer Using Adult Somatic Cells. *Biology of Reproduction* 2002, 66: 199-203.

[97] Memili E, Behboodi E, Overton SA, Kenney AM, O'Coin M, Zahedi A, Rowitch DH, Echelard Y. Synchronization of goat fibroblast cells at quiescent stage and determination of their transition from G0 to G1 by detection of cyclin D1 mRNA. *Cloning Stem Cells.* 2004, 6(2): 58-66.

[98] Korfiatis N, Trounson A, Lacham-Kaplan O. Cell synchronization for the purposes of nuclear transfer in the bovine. *Cloning Stem Cells* 2001, 3(3): 125-38.

[99] Boquesta A C., Daya B N., and Prather R S. Flow Cytometric Cell Cycle Analysis of Cultured Porcine Fetal Fibroblast Cells. *Biology of Reproduction* 1999, 60: 1013-1019.

- [100] Gao S, McGarry M, Ferrier T, Pallante B, Priddle H, Gasparrini B, Fletcher J, Harkness L, De Sousa P, McWhir J, Wilmut I. Effect of cell confluence on production of cloned mice using an inbred embryonic stem cell line. *Biol Reprod.* 2003, 68(2): 595-603.
- [101] Hayes O, Ramos B, Rodríguez LL, Aguilar A, Badía T, Castro FO. Cell confluency is as efficient as serum starvation for inducing arrest in the G0/G1 phase of the cell cycle in granulosa and fibroblast cells of cattle. *Anim Reprod Sci.* 2005, 87(3-4): 181-92.
- [102] Mastromonaco GF, Favetta LA, Smith LC, Filion F, King WA. The influence of nuclear content on developmental competence of gaur x cattle hybrid in vitro fertilized and somatic cell nuclear transfer embryos. *Biol Reprod* 2007, 6(3): 514-23.
- [103] 李彦. 异种克隆牦牛、羚牛及相关机理的研究. 中国农业大学博士论文, 中国北京, 2004.
- [104] Payen E J and Cotinot C Y. Comparative HMG-box sequences of the SRY gene between sheep, cattle and goats. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(11): 2772.
- [105] Do JT, Lee J W, Lee B Y, Kim S B, Ryoo Z Y, Lee H T, Chung KS. Fate of donor mitochondrial DNA in cloned bovine embryos produced by microinjection of cumulus cells. *Biology of Reproduction* 2002, 67, 555-560.
- [106] Hiendleder S, Schmutz SM, Erhardt G, et al. Transmitochondrial differences and varying levels of heteroplasmy in nuclear transfer cloned cattle. *Mol Reprod* 1999, 54 (1): 24-31.
- [107] Takeda K, Takahashi S, Onishi A, et al. Dominant distribution of mitochondrial DNA from recipient oocytes in bovine embryos and offspring after nuclear transfer. *J Reprod Fert*, 1999, 116(2): 253-9.
- [108] Hiendleder S, Zakhartchenko V, Wolf E. Mitochondria and the success of somatic cell nuclear transfer cloning: from nuclear-mitochondrial interactions to mitochondrial complementation and mitochondrial DNA recombination. *Reprod Fertil Dev*, 2005, 17(2): 69-83.
- [109] Cummins J. Mitochondrial DNA in mammalian reproduction. *Review of Reproduction* 1998, 3: 172-182.
- [110] Hua S, Zhang Y, Song K, Song J, Zhang Z, Zhang L, Zhang C, Cao J, Ma L. Development of bovine-ovine interspecies cloned embryos and mitochondria segregation

- in blastomeres during preimplantation. *Anim Reprod Sci.* 2008,105 (3-4): 245-57.
- [111] Dinnyes A, De Sousa P, King T and Wilmut I. Somatic cell nuclear transfer: recent progress and challenges. *Cloning Stem Cells* 2002, 4: 81-90.
- [112] Hill JR, Roussel AJ, Cibelli JB, Edwards JF, Hooper NL and Miller MW. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology* 1999, 51: 1451-1465.
- [113] Wakayama, T. and Yanagimachi, R. Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type. *Mol. Reprod. Dev.*2001, 58: 376-383.
- [114] 曹贵方, 张涌. 20d、18h 山羊胚胎系统形态及以后各时期体形发生内蒙古农业大学学报 1999, 20 (4): 81-84.
- [115] CAMPBELL KHS, LOI P, CAPPAL P, and WILMUT I. Improved development to blastocyst of ovine nuclear transfer embryos reconstructed during the presumptive S-phase of enucleated activated oocytes. *Biology of Reproduction* 1994, 50, 1385-1393
- [116] Keefer C.L., 2 Keyston R., Lazaris A., Bhatia B., Begin I., Bilodeau A.S., Zhou F.J., Kafidi N., Wang B., Baldassarre H., and Karatzas C.N. Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. *Biology of Reproduction* 2002, 66, 199-203.
- [117] Hill JR, Winger QA, Long CR, Looney CR, Thompson JA & Westhusin -ME Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Biology of Reproduction* 2000, 62: 1135-1140.
- [118] Kishikawa H, Wakayama T, and Yanagimachi R. Comparison of oocyte-activating agents for mouse cloning. *Cloning* 1999, 1: 153-159.
- [119] Wooding FB & Wathes DC. Binucleate cell migration in the bovine placenta. *Journal of Reproduction and Fertility* 1980, 59: 425-430.
- [120] Klisch K, Hecht W, Pfarrer C, Schuler G, Hoffmann B & Leiser R. DNA content and ploidy level of bovine placental trophoblast giant cells. *Placenta* 1999, 20: 451-458.
- [121] Tanaka S, Oda M, Toyoshima Y, Wakayama T, Tanaka M, Yoshida N, Hattori N, Ohgane J, Yanagimachi R, and Shiota K. Placentomegaly in Cloned Mouse Concepti Caused by Expansion of the Spongiotrophoblast Layer. *Biology of Reproduction* 2001, 65: 1813-1821.
- [122] Hill JR, Edwards JF, Sawyer N, Blackwell C, Cibelli JB. Placental anomalies in a



viable cloned calf. *Cloning* 2001, 3: 83–88.

[123] Hill JR, Burghardt RC, Jones K, Long CR, Looney CR, Shin T, Spencer TE, Thompson JA, Winger QA, Westhusin ME. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol Reprod* 2000, 63: 1787–1794.

[124] Rossant J. Development of extraembryonic lineages. *Semin Dev Biol* 1995, 6: 237–247.

[125] Chavatte-Palmer P, Heyman Y, Richard C, Monget P, LeBourhis D, Kann G, et al. Clinical, hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. *Biol Reprod* 2002, 66: 1596–603.

[126] Ravelich SR, Bernhard BH, Reddy S, Keelan JA, Wells DN, Peterson AJ, et al. Insulin-like growth factor-I and binding proteins 1,2, and 3 in bovine nuclear transfer pregnancies. *Biol Reprod* 2004, 70: 430–8.

[127] Roth TL, Anderson GB, Bondurant RH and Pashen R L. Survival of Sheep x Goat Hybrid Inner Cell Masses after Injection Into Ovine Embryos. *Biology of reproduction* 1989, 41: 675-682.

[128] Patel OV, Yamada O, Kizaki K, Takahashi T, Imai K, Takahashi S, Izaike Y, Schuler LA, Takezawa T and Hashizume K. Expression of trophoblast cell-specific pregnancy-related genes in somatic cell cloned bovine pregnancies. *Biology of Reproduction* 2004, 70:1114–1120.

[129] Beyhan Z, Ross PJ, Iager A E, Kocabas A M., Cunniff K., Rosa G J, Cibelli J B. Transcriptional reprogramming of somatic cell nuclei during preimplantation development of cloned bovine embryos. *Developmental Biology* 2007,305: 637–649.

[130] Daniels, R., Hall, V., and Trounson, A.O. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. *Biol. Reprod.* 2000, 63: 1034–1040.

[131] Daniels, R., Hall, V.J., French, A.J., Korfiatis, N.A., and Trounson, A.O. Comparison of gene transcription in cloned bovine embryos produced by different nuclear transfer techniques. *Mol. Reprod. Dev.* 2001, 60: 281–288.

[132] Wrenzycki, C., Wells, D., Herrmann, D., Miller, A., Oliver, J., Tervit, R., and

- Niemann, H. Nucl ear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. *Biol. Reprod.* 2001, 65: 309–317.
- [133] Eggan, K., Akutsu, H., Hochedlinger, K., Rideout, W., Yanagimachi, R., and Jaenisch, R. X-Chromosome inactivation in cloned mouse embryos. *Science* 2000, 290: 1578–1581.
- [134] Ohgane, J., Wakayama, T., Kogo, Y., Senda, S., Hattori, N., Tanaka, S., Yanagimachi, R., and Shiota, K. DNA methylation variation in cloned mice. *Genesis* 2001, 30: 45–50.
- [135] Humpherys, D., Eggan, K., Akutsu, H., Hochedlinger, K., Rideout III, W.M., Biniszkiwicz, D., Yanagimachi, R., and Jaenisch, R. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science* 2001, 293: 95–97.
- [136] Inoue, K., Kohda, T., Lee, J., Ogonuki, N., Mochida, K., Noguchi, Y., Tanemura, K., Kaneko-Ishino, T., Ishino, F., and Ogura, A. Faithful expression of imprinted genes in cloned mice. *Science* 2002, 295: 297.
- [137] Somers J, Smith C, Donnison M, Wells DN, Henderson H, McLeay L and Pfeffer P L. Gene expression profiling of individual bovine nuclear transfer Blastocysts. *Reproduction* 2006, 131: 1073–1084.
- [138] Cross J C. Factors affecting the developmental potential of cloned mammalian embryos. *PNAS*, 2001, 98, (11): 5949–5951.
- [139] Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, et al. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98:13734–8.
- [140] Blondin P, Farin PW, Crosier AE, Alexander JE, Farin CE. In vitro production of embryos alters levels of insulin-like growth factor-II messenger ribonucleic acid in bovine fetuses 63 days after transfer. *Biol Reprod* 2000, 62:384–9.
- [141] Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, Butterwith SC, Gutierrez CG, Carolan C, et al. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet* 2001, 27: 153–4.
- [142] Young LE, Schnieke AE, McCreath KJ, Wieckowski S, Konfortova G, Fernandes K, et al. Conservation of IGF2-H19 and IGF2R imprinting in sheep: effects of somatic cell nuclear transfer. *Mech Dev* 2003, 120: 1433–42.

- [143] Khosla S, Dean W, Brown D, Reik W, Feil R. Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. *Biol Reprod* 2001, 64: 918–26.
- [144] Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 1993, 75: 73–82.
- [145] Constancia M, Hemberger M, Hughes J, Dean W, Ferguson-Smith A, Fundele R, et al. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature* 2002, 417: 945–8.
- [146] Lau MM, Stewart CE, Liu Z, Bhatt H, Rotwein P, Stewart CL. Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. *Genes Dev* 1994, 8: 2953–63.
- [147] Moore K., Kramer J.M., Rodriguez-Sallaberry C.J., Yelich J.V., Drost M. Insulin-like growth factor (IGF) family genes are aberrantly expressed in bovine conceptuses produced in vitro or by nuclear transfer. *Theriogenology* 2007, 68: 717–727.
- [148] Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ. Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. *Mol Reprod Dev* 2002, 62: 489–95.
- [149] Gootwine E. Placental hormones and fetal-placental development. *Anim Reprod Sci* 2004, 82-83:551–66.
- [150] Bertolini M, Anderson GB. The placenta as a contributor to production of large calves. *Theriogenology* 2002, 57:181–7.
- [151] Wallace JM, Milne JS, Aitken RP. Maternal growth hormone treatment from day 35 to 80 of gestation alters nutrient partitioning in favor of uteroplacental growth in the overnourished adolescent sheep. *Biol Reprod* 2004, 70: 1277–85.
- [152] Long JE, Cai X. Igf-2r expression regulated by epigenetic modification and the locus of gene imprinting disrupted in cloned cattle. *Gene* 2007, 388:125–34.
- [153] Oishi M, Gohma H, Hashizume K, Taniguchi Y, Yasue H, Takahashi S, et al. Early embryonic death-associated changes in genome-wide gene expression profiles in the fetal placenta of the cow carrying somatic nuclear-derived cloned embryo. *Mol Reprod Dev* 2006, 73: 404–9.

- [154] Dindot SV, Farin PW, Farin CE, Romano J, Walker S, Long C, et al. Epigenetic and genomic imprinting analysis in nuclear transfer derived bos gaurus/bos taurus hybrid fetuses. *Biol Reprod* 2004, 71:470–8.
- [155] Yang L, Chavatte-Palmer P, Kubota C, O'Neill M, Hoagland T, Renard JP, et al. Expression of imprinted genes is aberrant in deceased newborn cloned calves and relatively normal in surviving adult clones. *Mol Reprod Dev* 2005, 71: 431–8.
- [156] DeChiara TM, Robertson EJ, Efstratiadis A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* 1991, 64: 849–859.
- [157] Eggenchwiler J, Ludwig T, Fisher P, Leighton PA, Tilghman SM, Efstratiadis A. Mouse mutant embryos overexpressing IGF-II exhibit phenotypic features of the Beckwith-Wiedemann and Simpson-Golabi-Behmel syndromes. *Genes Dev* 1997, 11: 3128–3142.
- [158] Lopez MF, Dikkes P, Zurakowski D, Villa-Komaroff L. Insulin-like growth factor II affects the appearance and glycogen content of glycogen cells in the murine placenta. *Endocrinology* 1996, 137: 2100–2108.
- [159] Lau MM, Stewart CE, Liu Z, Bhatt H, Rotwein P, Stewart CL. Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. *Genes Dev* 1994, 8: 2953–2963.
- [160] Xue F, Tian XC, Du F, Kubota C, Taneja M, Dinnyes A, Dai Y, Levine H, Pereira LV, Yang X. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nat Genet* 2002, 31: 216–220.
- [161] Mann MR, Chung YG, Nolen LD, Verona RI, Latham KE, Bartolomei MS. Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos. *Biol Reprod* 2003, 69: 902–914
- [162] Reik W, Santos F, Dean W. Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and therapy. *Theriogenology* 2003, 59: 21–32.
- [163] Howell CY, Bestor TH, Ding F, Latham KE, Mertineit C, Trasler JM, et al. Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell* 2001, 104: 829–38.
- [164] Dean W, Santos F, Reik W. Epigenetic reprogramming in early mammalian

- development and following somatic nuclear transfer. *Semin Cell Dev Biol* 2003, 14: 93–100.
- [165] Bourc'his D, Le Bourhis D, Patin D, Niveleau A, Comizzoli P, Renard JP, et al. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. *Curr Biol* 2001, 11: 1542–6.
- [166] Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Lemme E, Korsawe K, Niemann H. Gene expression patterns in in vitro-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome? *Anim Reprod Sci* 2004, 82-83:593–603.
- [167] Kang YK, Park JS, Koo DB, Choi YH, Kim SU, Lee KK, Han YM. Limited demethylation leaves mosaic-type methylation states in cloned bovine preimplantation embryos. *Embo J* 2002, 21:1092–1100.
- [168] Chung YG, Ratnam S, Chaillet JR, Latham KE. Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression in cloned mouse embryos. *Biol Reprod* 2003, 69:146–153.
- [169] Boiani ichele, Eckardt S, Schöer H R., and McLaughlin K. J. Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency *Genes & Dev.* 2002 16: 1209-1219
- [170] Pesce, M. and Schöer, H.R. Oct-4: Gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells* 2001, 19: 271–278.
- [171] Ezashi T., Ghosh, D., and Roberts, R.M. Repression of Ets-2-induced transactivation of the interferon promoter by Oct-4. *Mol. Cell. Biol.* 2001, 21: 7883–7891.
- [172] Du, Z., Cong, H., and Yao, Z. Identification of putative downstream genes of Oct-4 by suppression–subtractive hybridization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001, 282: 701–706.
- [173] Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöer, H., and Smith, A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 1998, 95: 379–391.
- [174] Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A.G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet* 2000, 24: 372–376.
- [175] Leonard S, Murrant C, Tayade C, van den Heuvel M, Watering R & Croy BA 2006

Mechanisms regulating immune cell contributions to spiral artery modification – Facts and hypotheses – A review. *Placenta* 27 40–46.

[176] Hashizume K, Ishiwata H, Kizaki K, Yamada O, Takahashi T, Imai K, Patel OV, Akagi S, Shimizu M, Takahashi S, et al. Implantation and placental development in somatic cell clone recipient cows. *Cloning and Stem Cells* 2002, 4: 197–209.

[177] Patel OV, Domeki I, Sasaki N, Takahashi T, Hirako M, Sasser RG, Humblot P. Effect of fetal mass, number and stage of gestation on pregnancy specific protein B concentrations in the bovine. *Theriogenology* 1995, 44: 827–833.

[178] Patel OV, Sulon J, Beckers JF, Takahashi T, Hirako M, Sasaki N, Domeki I. Plasma bovine pregnancy-associated glycoprotein concentrations throughout gestation in relationship to fetal number in the cow. *Eur J Endocrinol* 1997, 137: 423–428.

[179] Patel OV, Camous S, Takenouchi N, Takahashi T, Hirako M, Sasaki N, Domeki I. Effect of stage of gestation and foetal number on plasma concentrations of a pregnancy serum protein (PSP-60) in cattle. *Res Vet Sci* 1998, 65: 195–199.

[180] Hill JR, Schlafer DH, Fisher PJ, Davies CJ. Abnormal expression of trophoblast major histocompatibility complex class I antigens in cloned bovine pregnancies is associated with a pronounced endometrial lymphocytic response. *Biol Reprod* 2002, 67:55–63.

[181] Lee SC, Wooding FBP, Morgan G. Quantitative analysis throughout pregnancy of intraepithelial large granular and non-granular lymphocyte distributions in the synpitheliochorial placenta of the cow. *Placenta* 1997, 18: 675–681.

[182] Patel OV, Yamada O, Kizaki K, Takahashi T, Imai K, Takahashi S, Izaike Y, Schuler LA, Takezawa T and Hashizume K. Expression of trophoblast cell-specific pregnancy-related genes in somatic cell cloned bovine pregnancies. *Biology of Reproduction* 2004, 70: 1114–1120.

[183] Arnold D R , Bordignon V, Lefebvre R, Murphy B D and Smith L C. Somatic cell nuclear transfer alters peri-implantation trophoblast differentiation in bovine embryos. *Reproduction* 2006, 132: 279–290.

[184] Wooding FBP, Flint APF, Heap RB, Morgan G, Buttle HL, Young IR. Control of binucleate cell migration in the placenta of sheep and goat. *J Reprod Fertil* 1986, 76:

499-512.

[185] Cross JC, Flannery ML, Blonar MA, Steingrimsson E, Jenkins NA, Copeland NG, Rutter WJ & Werb Z. Hxt encodes a basic helix-loop-helix transcription factor that regulates trophoblast cell development. *Development* 1995, 121: 2513-2523.

[186] Riley P, Anson-Cartwright L & Cross JC. The Hand1 bHLH transcription factor is essential for placentation and cardiac morphogenesis. *Nature Genetics* 1998, 18 271-275.

[187] Arnold DR, Lefebvre R & Smith LC 2006 Characterization of the placenta specific bovine mammalian achaete scute-like homologue 2 (Mash2) gene. *Placenta* [in press].

[188] Green JA, Xie S, Quan X, Bao B, Gan X, Mathialagan N, Beckers JF & Roberts RM Pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy. *Biology of Reproduction* 2000, 62: 1624-1631.

[189] Dosogne H, Massart-Leen AM & Burvenich C. Immunological aspects of pregnancy-associated glycoproteins. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2000, 480: 295-305.

[190] Goto Y, Takagi N. Tetraploid embryos rescue embryonic lethality caused by an additional maternally inherited X chromosome in the mouse. *Development* 1998, 125: 3352-63.

[191] Iwasaki S, Kono T, Fukatsu H, Nakahara T. Production of bovine tetraploid embryos by electrofusion and their developmental capability in vitro. *Gamete Res* 1989, 24(3): 261-7.

[192] Kubiak JZ, Tarkowski AK. Electrofusion of mouse blastomeres. *Exp Cell Res*, 1985, 157: 561-666.

[193] 刘林 安民.兔 2-细胞胚胎电融合及其融合胚体外发育的研究. *遗传学报* 1993, 20(6): 493-498.

[194] Tarkowski AK, Witkowska A, Opas J. Development of cytochalasin B-induced tetraploid and diploid /tetraploid mosaic mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol* 1977, 41: 47-64.

[195] Koizumi N, Fukuta K, Preimplantation development of tetraploid mouse embryo produced by cytochalasin B. *Exp Anim.* 1995 Apr;44(2):105-9.

- [196] Shinozawa T, Sugawara A, Matsumoto A et al. Development of rat tetraploid and chimeric embryos aggregated with diploid cells. *Zygote* 2006, 14(4): 287-97.
- [197] Schramm D and Paprocki AM. In vitro development and cell allocation following aggregation of split embryos with tetraploid or developmentally asynchronous blastomeres in Rhesus monkeys. *Cloning and stem cell* 2004, 6(3): 302-314.
- [198] Iwasaki S, ITO Y and Iwasaki S. *In-Vitro* Development of Aggregates of Bovine Inner Cell Mass Cells or Bovine Mammary Cells and Putative Tetraploid Embryos Produced by Electrofusion. *J. Reprod. Dev.* 1999, 45: 65-71.
- [199] Eggen K, Akutsu H, Loring J, et al. Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *PNAS* 2001, 98(11): 6209-6214.
- [200] Goto Y. Developmental potential of mouse tetraploid cells in diploid-tetraploid chimeric embryos. *Int J Dev Bio* 2002, 46: 741-745.
- [201] Tang PC, West JD. The effects of embryo stage and cell number on the composition of mouse aggregation chimeras. *Zygote* 2000, 8(3): 235-43.
- [202] Tang PC, Ritchie WA, Wilmut I, et al. The effects of cell size and ploidy on cell allocation in mouse chimaeric blastocysts. *Zygote* 2000, 8(1): 33-43.



## 附 录

### 附录 1 小鼠四倍体胚胎干细胞的分离与培养

Cowan 等人的研究表明, 通过聚乙二醇 (PEG) 介导, 人类胚胎干细胞可以与成纤维细胞融合, 产生杂种细胞, 杂种细胞含有四倍染色体, 培养后具有人 ES 细胞的形态, 生长速率和抗原表达模式, 这种四倍体胚胎干细胞可以传代超过 50 代, 体内、外分化产生三胚层的细胞类型<sup>[1]</sup>。小鼠胚胎干细胞也可以发生与体细胞的融合产生四倍体胚胎干细胞<sup>[2]</sup>。基因组范围的转录活性, 报告基因激活, 位点特异基因表达, DNA 甲基化分析表明, 体细胞的基因组在胚胎干细胞的胞质作用下重编程至胚胎状态<sup>[1]</sup>。

CB 处理, 电融合等方法可以引起 2-细胞期胚胎裂球发生融合, 产生的四倍体胚胎<sup>[3,4]</sup>。四倍体胚胎在植入前可以发育到囊胚阶段, 且囊胚发育率与正常胚胎无差异<sup>[5,6]</sup>, 但是四倍体胚胎植入后的发育存在很大争议。1973 年, Snow 报道了成活的四倍体小鼠, 但是出生后被母鼠吃掉<sup>[7]</sup>。二十世纪九十年代, Kaufman 研究小组报道四倍体胚胎小鼠胚胎植入后可以发育到 15dpc, 并且认为四倍体胚胎发育差异和品系选择相关<sup>[8,9]</sup>。但是, 多数研究表明, 一般小鼠四倍体胚胎发育无法超过 7.5dpc, 即在植入后不久就发生丧失, 同时胚胎各组织发育异常<sup>[10]</sup>。

我们的研究表明, C57BL/6 品系小鼠四倍体胚胎的囊胚发育率可以达到 74.3%, 但是其植入后的发育率很低, 到 10.5dpc 时剖检子宫内已经没有完整的孕囊存在。为了验证小鼠四倍体囊胚的发育潜能, 我们尝试从小鼠四倍体囊胚中分离 ES 样细胞, 并对四倍体 ES 样细胞进行体外分化试验。

#### 1 试验材料

##### 1.1 主要试剂

DMEM (GIBCO/BRL, 11965-092, liquid, 1×)

含有	D-glucose	4500
	L-glutamine	584
	Pyridoxine hydrochloride	4

no sodium pyruvate. (unit:mg/L)  
 储存 2°C~8°C.

Knockout DMEM (GIBCO/BRL, 10829-018, liquid, 1×, 储存: 2°C-8°C)

非必需氨基酸 (GIBCO/BRL, 11140-050, 液体, 10mM, 100×, pH:1.5-1.7)

含有	L-alanine	890
	L-asparagine	1320
	L-aspartic acid	1330
	L-glutamic acid	1470
	glycine	750
	L-proline	1150
	L-serine	1050 (unit:mg/L)

储存 2°C~8°C

β-巯基乙醇(SIGMA, M7522, 摩尔浓度:14.258, d=1.114g/ml, 储存: 室温)

L-谷氨酰胺 (GIBCO/BRL, 25030-149, pH=4.7~5.6, 浓度: 29.2mg/ml in 0.85% NaCl,

储存: -5°C~20°C)

青霉素/ 链霉素 (GIBCO/BRL, 15140-122, 200×, 溶解于 0.85% NaCl)

含有	penicillin G	10000 units/ml
	streptomycin sulfate	10000 µg/ml

储存 -5°C~ -20°C

胎牛血清(GIBCO/BRL, 10082-147;16141-079, 储存: -5°C~ -20°C)

LIF (SIGMA, L5158, mouse recombinant, 5µg, 100000IU/µg, 溶解于 PBS, pH=7.4, 含 0.02% tween 20, 储存: 4°C, 忌稀释保存)

rhbFGF (SIGMA, F0291, 固体, 25µg, 溶解于 10mM Tris(pH=6.0, 含有 1.25mg 牛血清白蛋白), 0.2µm 过滤冻干, 储存: -20°C)

7.5% (W/V) 碳酸氢钠 (GIBCO/BRL, 25080-094, 储存: 15~30°C)

PBS (GIBCO/BRL, 14190-144, 1×)

含有	KCl	0.2
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2

NaCl	8.0	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.16	(unit:g/L)

储存 15~30℃

0.25%Trypsin/0.53mM EDTA (GIBCO/BRL, 25300-054, 1×, 猪细小病毒和枝原体检测合格, 溶解在无钙酶 Hanks'Balanced Salt Solution)

含有	trypsin	0.5g/L
	EDTA·4Na	0.2g/L

储存 -5℃~-20℃

丝裂霉素 C (SIGMA, M 4287)

含有	mitomycin C	2mg
	NaCl	48mg

储存 2~8℃

明胶 (SIGMA, G 1890, solid, 由酸处理的组织中提取, 储存: 室温)

M2 (SIGMA, M-7167, liquid, 1×, 储存: 2℃-8℃)

水 (SIGMA, W 3500, 每毫升内毒素低于 0.1ng, 过滤除菌, 储存: 室温)

多聚甲醛((CH<sub>2</sub>O)<sub>x</sub>) (SIGMA, P6148, 储存: 2-8℃)

DMSO (SIGMA, D2650, FW=73.1, 储存: 室温)

Tris-base (SIGMA, T6066, pKa=8.1 at 25℃, FW=121.1, 储存: 室温)

Naphthol AS-BI alkaline solution ( SIGMA, 86-1, 4mg/ml, in 2M AMPD buffer pH=9.5, 储存: 2~8℃)

FRV-Alkaline solution (SIGMA, 86-2, 5mg/ml, in 0.4M HCl, 储存: 2~8℃)

柠檬酸钠(SIGMA, 91-4, 0.1M, 储存: 2~8℃)

柠檬酸盐溶液 (SIGMA, 91-5, pH=3.6)

含有	柠檬酸	18	
	柠檬酸钠	9	
	氯化钠	12	(unit: mM)

储存 2~8℃

Giemsa 染色液 (GIBCO/BRL, 10092-013, 储存: 室温)

Gurr's buffer tablets (GIBCO/BRL, 10582-013, 用时每片用 1L 蒸馏水溶解, pH=6.8, 储存 室温)

秋水仙碱 (GIBCO/BRL, 15212-012, 10 $\mu$ g/ml, 溶解于 PBS, 储存 2~8 $^{\circ}$ C)

甲醇 (上海振兴化工一厂, AR, 储存: 室温)

乙酸(上海化学试剂公司, AR, 储存: 室温)

丙酮 (上海化学试剂公司, AR, 储存: 室温)

40% (w/w) 甲醛 (上海化学试剂公司, AR, 储存: 室温)

KCl (SIGMA, P5405, FW=74.55, 细胞培养级, 储存: 室温)

乙醇(上海振兴化工一厂, AR, 储存: 室温)

氯仿(上海振兴化工一厂, AR, 储存: 室温)

苯酚(上海振兴化工一厂, AR, 储存: 室温)

Trizol 试剂 (Gibco/BRL, 15596-026, 储存: 2-8 $^{\circ}$ C)

RNA 反转录试剂盒 (Promega, A1702, 储存: -20 $^{\circ}$ C)

## 1.2 试剂配制

**Mitomycin C:** 用无钙镁 PBS 溶解, 浓度为 0.5-1mg/ml, 无菌过滤, 分装冻存, 避光保存, 4 $^{\circ}$ C 保存有效期仅 2 周, 用时以 MEFs 培养基稀释到 10 $\mu$ g/ml.

**0.1%明胶:** 100mg 明胶溶解在 100 ml 水中(SIGMA) to 0.1%, 高压灭菌, 储存在 2-8 $^{\circ}$ C

**100 $\mu$ g 巯基乙醇:** 3.5 $\mu$ l $\beta$ -巯基乙醇溶解在 5ml DMEM, 过滤除菌, 分装冻存于 -20 $^{\circ}$ C; 4 $^{\circ}$ C 可保存 2 周.

**rhbFGF:** 25 $\mu$ g rhbFGF 溶解于 1ml DMEM, 分装冻存于-70 $^{\circ}$ C

**0.01M Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-free PBS:**

NaCl	8g
KCl	0.2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2g

溶于 1L 三蒸水, 用 1N HCl 调节 pH 到 7.2-7.4, 高压灭菌, 室温储存

融合液: 0.1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05mM CaCl<sub>2</sub>, 0.3M 甘露醇, 0.5mg/mL BSA.

### AKP 检测试剂

柠檬酸-丙酮-甲醛固定液:

柠檬酸盐	2.5ml
丙酮	6.5ml
37%甲醛	0.8ml

玻璃瓶中 2~8℃ 储存, 用前加热到 18~26℃

反应液:

1. 将 1ml 柠檬酸钠溶液加到 1ml FRV-Alkaline 溶液, 震荡混匀, 静置 2min
2. 将步骤 1 中的溶液加到 45ml 三蒸水中
3. 再加入 1ml Naphthol AS-BI alkaline 溶液, 混匀

低渗 KCl:	KCl	0.5g
	三蒸水	100ml

高压灭菌, 4℃ 储存

MEFs 培养基: DMEM (Gibco), 内含 2mmol/L 谷氨酰胺 (Gibco)、10%FBS (Gibco)、100U/ml 青霉素/100μg/ml 链霉素 (Gibco)

MEFs 冻存液: DMEM (Gibco), 添加 10%FBS (Gibco) 和 10%DMSO (Sigma)

小鼠 ESCs 培养基: Knockout DMEM (Gibco), 内含 15%Knockout 血清替代品 (Gibco)、2mmol/L 谷氨酰胺 (Gibco)、0.1mmol/L 非必需氨基酸 (Gibco)、0.1 mmol/L 2-巯基乙醇 (Sigma)、100U/ml 青霉素/100μg/ml 链霉素 (Gibco)、1000U/ml 重组鼠白血病抑制因子 (LIF) (Sigma) 和 10ng/ml 重组人碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) (Sigma)。

小鼠 ESCs 冻存液: 小鼠 ESCs 培养基, 添加 10%DMSO。

### 1.3 主要耗材

组织培养皿:	Φ35mm, Falcon, 3001
	Φ60mm, Nunc, 150288
	Φ100mm, Nunc, 172931

组织培养板:	4 well, Nunc, 176740
	24 well, Nunc, 143982
	96 well, Nunc, 1670018
25mm 过滤器:	Acrodisc, 0.8/0.2 $\mu$ m , 4187
离心管:	0.5ml, Axygen, MCT-060-C
	1.5ml, Axygen, MCT-150-C
	15ml, Corning, 430052; Falcon, 2196
移液管:	Falcon, 14.6cm, 354642
冻存管:	Corning, 2ml, 430659
移液器枪头:	10 $\mu$ l: Axygen, T-300
	200 $\mu$ l: Corning, 4844
	1000 $\mu$ l: Axygen, T-1000-B
一次性注射器:	上海米沙瓦医科工业有限公司, 5ml/10ml
显微操作玻璃针:	NARISHIGE
融合槽:	BTX-201, San Diego, CA, USA

#### 1.4 主要仪器

AX80 型正置显微镜	OLYMPUS
SZ-PT 型解剖镜	OLYMPUS
超净工作台	苏净
CE-900 型融合仪	Kefa, Beijing
MCO-15A 型 CO <sub>2</sub> 培养箱	SANYO
TE-300 型倒置显微镜	Nikon
5154D 型离心机	Eppendorf
PE9700 型 PCR 仪	BioRad
普通冰箱	海尔
超低温冰箱	SANYO

#### 1.5 实验动物: ICR 小鼠、C57BL/6J 小鼠购自上海实验动物中心。

## 2 实验方法

### 2.1 小鼠胚胎成纤维细胞 (MEFs) 的制备 (胚胎来源: ICR×ICR)

- a) 14dpc 雌性怀孕小鼠脱臼处死, 70%乙醇浸泡 5min, 手术取子宫, 无钙镁 PBS(自配)洗 2 次。
- b) 用眼科镊撕开子宫, 取出胎儿, 无钙镁 PBS 洗 2 次。
- c) 用眼科镊撕下胎儿背部皮肤, 无钙镁 PBS 洗 1 次, 在一培养皿内将其剪碎。
- d) 将剪碎的组织转移到一个 15ml 离心管, 加入 2ml 0.25%胰酶, 置 37℃孵箱孵育 10min, 其间吹打两次, 加 3ml MEFs 培养基终止消化, 300 目铜网过滤, 1000rpm, 离心 5min 收集细胞。
- e) 用 MEFs 培养基重悬细胞, 计数。按  $5 \times 10^4/\text{cm}^2$  的密度接种到 10cm 培养皿中。
- f) 1 天后换液, 除掉未贴壁的血细胞及死细胞。3~4 天后长满 (铺展的面积大约占到培养皿底的 80%)。

### 2.2 丝裂霉素 C 处理 MEFs 并冻存

- a) 待培养皿中的 MEFs 长满后, 吸除培养基, 每皿加入 6-8ml 新配制的含丝裂霉素 C (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 的 MEFs 培养基, 置 37℃孵箱孵育 2.5~3.5h。
- b) 吸除培养基, 无钙镁 PBS 洗 5 次, 完全去除丝裂霉素 C, 每皿加 2ml 0.25% 胰酶溶液, 37℃孵箱内消化 1 min。
- c) 用手轻拍培养瓶, 检查细胞脱落情况。如已经有成片细胞脱落, 加 3ml MEFs 培养基终止消化, 吹打分散细胞。
- d) 细胞悬液转移到 50ml 离心管, 1000rpm, 5min 离心收集细胞, 重悬细胞于预冷的 MEFs 冻存液中 (细胞密度:  $3 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6/\text{ml}$ )。
- e) 将 1 ml 含细胞的冻存液加入冻存管内, 管壁上标明细胞系的名称、日期。记录簿上注明生长培养基、细胞密度。
- f) 将冻存管放入冻存盒内, -86℃冰箱中过夜后, 转入液氮内保存 (转移过程需插入干冰中) (或将含细胞的冻存管在 4℃放置 30min, -20℃放置 2h, -86℃过夜后, 转入液氮内保存)。

### 2.3 MEFs 复苏及饲养层细胞的准备

- a) 明胶包被培养板或培养皿：0.1%明胶覆盖组织培养板或培养皿底，37℃孵箱内温育 2h，吸除明胶，超净台内晾干待用。
- b) 取一个 500ml 的烧杯，加半杯蒸馏水，40℃水域中预热一个小时。
- c) 从液氮中取出一个冻存管，迅速投入烧杯中，一旦冰块消失即将冻存管取出。
- d) 用 70%乙醇擦拭冻存管外部。
- e) 用巴氏吸管轻悬细胞，缓慢加入到盛有 4ml MEFs 培养基的 15ml 离心管中，1000rpm，离心 5min，收集细胞。用培养基重悬细胞，计数后。按  $1 \times 10^5 / \text{cm}^2$  的密度接种到明胶包被好的培养板或培养皿中培养。
- f) 接种好的饲养层，4~6h 后即可用于 ESCs 培养，一般过夜后使用，一周内均可用于 ESCs 培养。

#### 2.4 2-细胞期胚胎电融合及融合胚胎培养

a)按照常规超排、配种程序，在注射 HCG 48h 后从 1.5dpc 母鼠输卵管内回收 2-细胞期胚胎，在 KSOM 培养液中恢复半个小时；

b)10—15 个 2-细胞胚胎在 0.3mol/l 甘露醇融合液中洗 3 次，然后移入充满融合液的融合槽的两电极丝之间,融合直流电脉冲由电融合仪输出施加,细玻璃针排列胚胎使裂球的接触面与电极方向垂直，使用 0.97kV/cm，40  $\mu\text{s}$ ，1 次的直流脉冲电刺激胚胎。

c)最后将胚胎吸出，在操作液 (M2) 中洗 3—4 次，置于 KSOM 培养微滴中观察融合情况。刺激后每隔半小时观察 1 次，1 小时后仍未融合者弃之。

d)融合胚胎在 KSOM 培养液中培养 48—72 小时后观察囊胚发育。

### 2.5 ESCs 的分离与培养

- a)收集 C57BL/6J 小鼠四倍体囊胚培养在制好的 4 孔板中饲养层上，培养基采用小鼠 ESCs 培养基。
- b)37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。4~5d 后，内细胞团细胞增殖旺盛。
- c)用烧好的玻璃针将充分长大的原始集落剥离饲养层，用拉好的吸管将其吸出。



- d) 用 200 $\mu$ l 无钙镁 PBS 洗一次, 转移到 200 $\mu$ l 0.05% Trypsin/0.53mM EDTA 的消化液中, 37 $^{\circ}$ C 孵箱内消化 10 min。
- e) 将内细胞团吸出, 转移到 300 $\mu$ l ESCs 培养基中, 用玻璃针将其撕扯成若干个大小不等的细胞团块, 并有单个 ESCs。
- f) 将细胞团块及单个细胞转移到制好的 96 孔板中的饲养层细胞上。隔天换液(换掉 1/2~2/3 的培养基), 每个 96 孔板的孔中接种一个内细胞团集落分散的细胞。
- g) 5~8d 后, 挑选 ESCs 集落消化成单个细胞传代培养, 一个孔中出现的 ESCs 集落消化后传到 4 孔板的一个孔中, 此后, 则按 1:10 的比例每 2-3 天传代一次。

## 2.6 ESCs 的消化冻存

- a) 吸出培养板/培养皿中的培养基, 用无钙镁 PBS 清洗 ESCs, 用微量移液器加 0.05% Trypsin/0.53 mM EDTA 消化液覆盖培养皿底。
- b) 37 $^{\circ}$ C 孵箱内孵育 2~5min。
- c) 用微量移液器轻轻吹吸消化液处理细胞几次, 将 ESCs 分散成单个细胞。
- d) 加入 ESCs 培养基终止消化, 计数后, 1000rpm, 离心 5min, 收集细胞。
- e) 倾掉上清液, 加入预冷的冻存液, 按  $1 \times 10^6$ /ml 密度冻存, 0.5ml/冻存管
- f) 将冻存管放入冻存盒内, -86 $^{\circ}$ C 冰箱过夜, 转入液氮内保存(转移过程需放在干冰上)。或将含细胞的冻存管在 4 $^{\circ}$ C 放置 30min, -20 $^{\circ}$ C 放置 2h, -86 $^{\circ}$ C 过夜后, 转入液氮内保存。

## 2.7 ESCs 的复苏

- a) 取一个 500ml 的烧杯, 加多半杯蒸馏水, 放入一个 40 $^{\circ}$ C 水域中预热一个小时。
- b) 从液氮中取出冻存管, 迅速投入烧杯中, 直至完全融化, 一旦冰块消失即将冻存管取出。
- c) 用 70%乙醇擦拭冻存管外部。
- d) 用巴氏吸管轻悬细胞, 缓慢加入到盛有 4ml ESCs 培养基的 15ml 离心管中, 1000rpm, 5min, 离心收集细胞, 用培养基重悬细胞, 计数后, 按  $1 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup>

的密度接种到铺有饲养层细胞的四孔板或 35mm 培养皿中培养。

## 2.8 ESCs 碱性磷酸酶活性的检测

- a) 将细胞培养皿中的培养基吸出，用灭菌超纯水轻洗 2 次。
- b) 加 0.5ml 预热至 18-26℃ 的柠檬酸-丙酮-甲醛固定液到细胞培养皿内，室温固定 30~60s，吸出固定液，用灭菌超纯水轻洗 2 次。
- c) 加 0.5ml 反应混合液，温育 15min。
- d) 吸出反应混合液，用灭菌超纯水轻洗 2 次。
- e) 显微镜下观察显示紫红色的 AKP 阳性的细胞和集落。

## 2.9 ESCs 染色体数目及核型的分析<sup>[11]</sup>

- a) 选指数生长期的细胞，加秋水仙素到培养基内，使最终浓度为：0.1~0.4μg/ml。
- b) 37℃ 孵育 3h，吸掉处理液，用无钙镁 PBS（自配）洗 3 次。用玻璃针将 ESCs 集落拨离培养板底，用吸管吸出集落，转移到 200μl 0.05% Trypsin/0.53 mM EDTA 消化液中 37℃ 消化 10 min，中间轻轻吹打 2 次，分散成单个细胞。
- c) 加 300μl 培养基终止消化，转移到 1.5ml 离心管，1000rpm，离心 5min，收集细胞。
- d) 将细胞重悬于 2 倍体积的低渗 KCl 溶液中，37℃ 温育 30min，1000rpm，离心 10 min，沉淀细胞重悬于低渗 KCl，显微镜下观察直到细胞涨大。
- e) 加入与细胞悬液相同体积的新鲜配制的固定液（甲醇：冰醋酸为 3：1），轻轻吹悬细胞，室温固定 20 min，1000rpm，离心 10 min。
- f) 倾去上清液，再加入新鲜配制的固定液（甲醇：冰醋酸为 3：1）轻轻吹悬细胞，室温放置 10~15min。
- g) 1000rpm，离心 5min，去上清。
- h) 重复步骤 f。
- i) 滴加悬液到干净的、4℃ 预冷的载玻片上，使细胞悬液均匀铺展在玻片上。
- j) 用 0.025% trypsin 消化 5min，流水背面冲洗。

- k) Giemsa 染液染 3~5min, 流水背面冲洗。
- l) 显微镜下观察, 记录典型染色体数目, 拍照。

### 2.10 Oct-4 基因的表达

- a) 待 35mm 培养皿内 ESCs 长满后, 吸掉培养基, 加入 1ml TriZol。反复吹打破碎细胞。
- b) 加入等体积酚: 氯仿 (1: 1), 震荡混匀。
- c) 冰上放置 5min, 12000rpm, 4℃, 离心 10min。
- d) 小心吸取上清 (注意不要吸入中间层)。
- e) 加入等体积氯仿, 震荡混匀。
- f) 冰上稍稍放置, 12000rpm, 4℃, 离心 5min。
- g) 小心吸取上清 (注意不要吸入中间层)。
- h) 加入两倍体积的乙醇, 颠倒混合均匀, -20℃放置 30min。
- i) 8000rpm, 4℃, 离心 10min。
- j) 倒干上清, 70%酒精清洗沉淀。
- k) 晾至无酒精气味后, 加入适量 RNase -free 水溶解。
- l) 选用 Oliger(dT)引物, 按 Promega 公司 Reverse Transcription System 说明书加样如下:

Mgcl <sub>2</sub>	4μl
10×buffer	2μl
dNTP(10mM)	2μl
RNase inhibitor	0.5μl
AMV 转录酶	1μl
Oliger(dT) primer	1μl
Total RNA	5μl
Water (Rnase-free)	4.5μl

总计 20μl 体系。置 70℃水浴 10 min, 冰置 10 min, 室温放置 10 min, 置 42℃水浴 1h, 置 95℃变性 5 min, 0~5℃放置 5 min 即为 cDNA 样品, 取

部分样本用于 PCR,其余置-80℃保存。

m) 以 cDNA 为模板,经 PCR 扩增 oct-4 基因。

PCR 反应液组成:

10×pfu buffer	5 μl
10 mmol/L dNTP	2 μl
up primer(25pmol/μl)	1 μl
down primer(25pmol/μl)	1 μl
cDNA 第一链	2 μl
DNA 聚合酶	1 μl
水	35.5 μl

引物为: 5'GGCTGGACACCTGGCTTC 和 5'GCTCCAGGTTCTCTTGTCTAC。PCR 条件为: 95℃,4min; 94℃,30sec,58℃,30sec,72℃,1min, 30 个循环; 72℃, 10min。

n) 产物用 1.0%的琼脂糖电泳检查, EB 染色, 紫外灯下观察。

### 2.11 ESCs体外分化

a)取处于指数生长期的ESCs集落, 用0.05%胰蛋白酶/0.53mM EDTA消化2~3min, 轻轻吹打成单个细胞, 离心去掉消化液。

b)用不添加LIF和bFGF的ESCs培养基按 $1 \times 10^5$ /ml密度重悬细胞, 将细胞悬液滴在60mm培养皿的盖子内侧, 每滴30μl, 培养皿内加入5mlPBS, 轻轻盖上盖子。

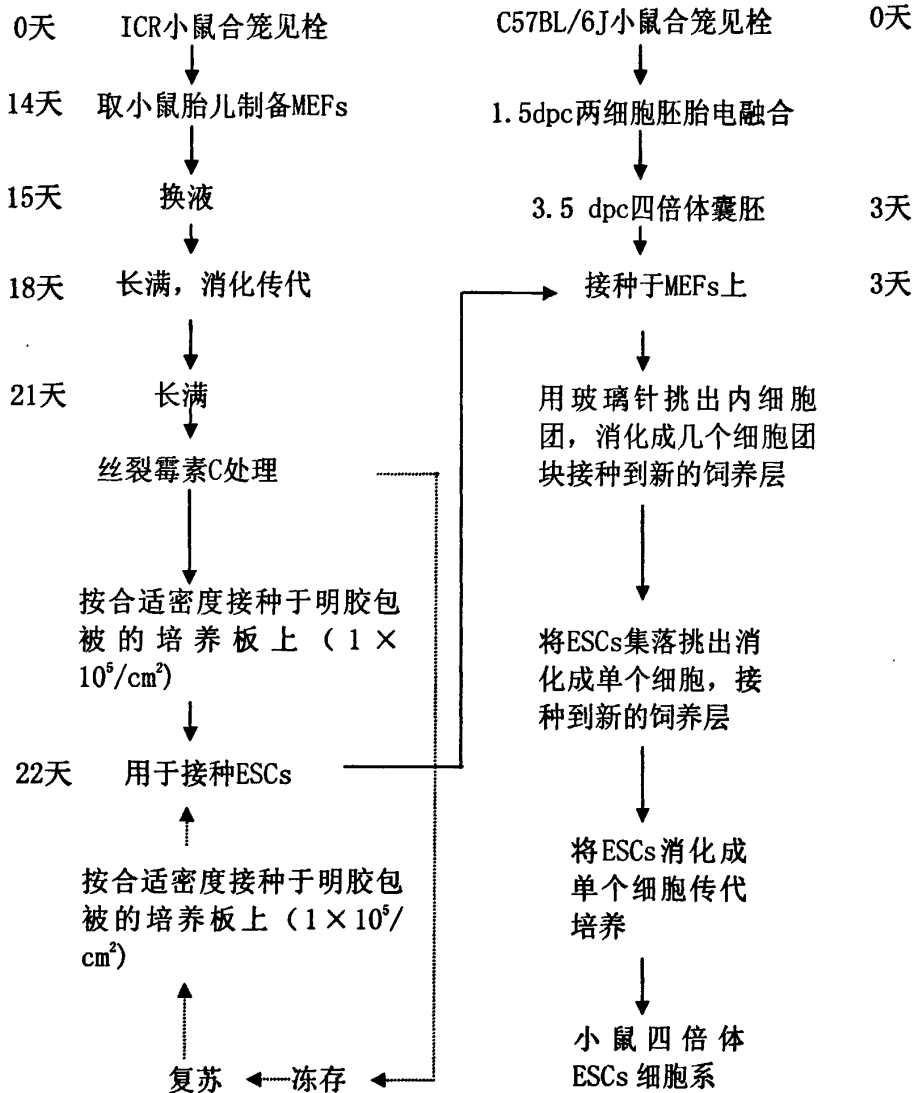
c)37℃培养, 一天后微滴内的ESCs相互聚集, 4天后形成EBs。

d)在35mm的培养皿中放一个干净无菌22mm×25mm的1.5号盖玻片, 并用明胶包被。

e)将EBs接种到盖玻片上, 培养5~7d后会出现有节律跳动的心肌细胞。

f)对心肌细胞进行常规免疫组织化学染色。

## 3 技术路线



#### 4 数据统计

卡方检验分析数据的显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

#### 5 试验结果

##### 5.1 小鼠四倍胚胎干细胞的分离与培养

首次以电融合 C57 / BL6 小鼠 2-cell 期卵裂球制备四倍体胚胎(图 1), KSOM 体外培养 2.5 天至囊胚为材料分离四倍体胚胎干细胞 (图 2,a)。其内细胞团贴壁和集落形成效率与对照的二倍体囊胚相比无明显差异 (表 1), 但集落生长速度慢于二倍体

囊胚(图 2,b)。四倍体胚胎样细胞传代的能力较差,无法超过 8 代(图 2,c)。四倍体胚胎干细胞样细胞 AKP 染色呈阳性(图 3,a),表达干细胞全能性标志基因 Oct-4(图 3,b)。细胞核型分析证实含有四倍( $4N=80$  条)染色体,性染色体为 XXXX 或 XXYY。

表 1 小鼠四倍体胚胎与二倍体胚胎在饲养层上分离 ES 细胞的比较

胚胎类型	囊胚数	贴壁数	形成克隆数	传代超过 3 代数	传代超过 8 代数
四倍体胚胎	39	33	12	2	0
二倍体胚胎	25	20	9	3	2

注:不同字母的肩标标示差异显著( $P<0.05$ )。

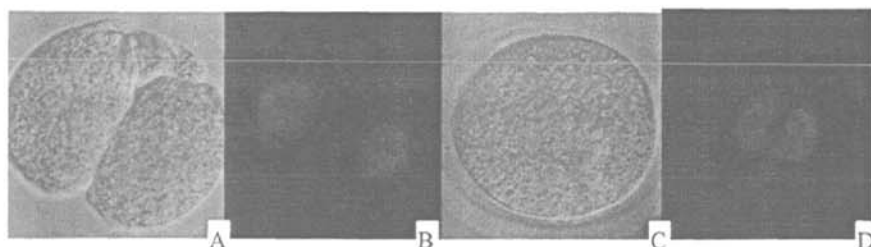


图 1 小鼠两细胞胚胎融合前后的染色质染色

A 小鼠 2-细胞期胚胎 B 2-细胞期胚胎核染色 C 融合后胚胎 D 融合后核染色

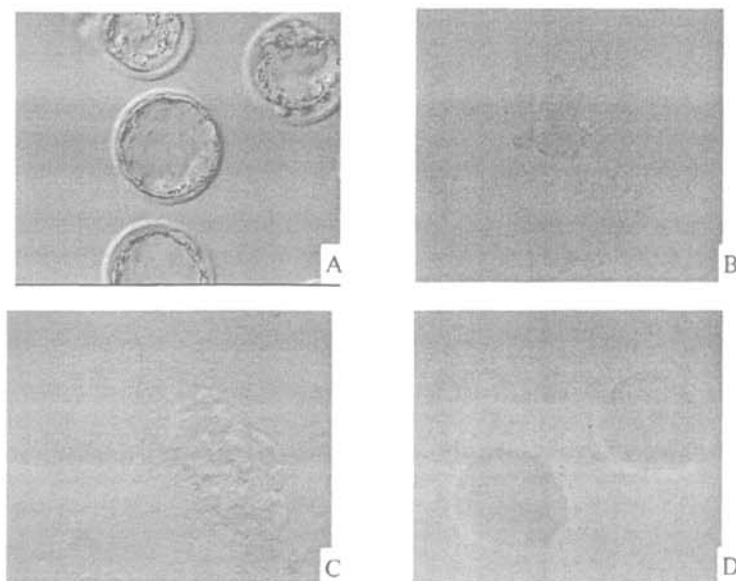


图 2 小鼠四倍体胚胎干细胞的分离、培养

A 小鼠四倍体囊胚 B 小鼠四倍体囊胚原代集落 C 传代后鼠四倍体胚胎干细胞集落 D 传代后鼠二倍体胚胎干细胞集落

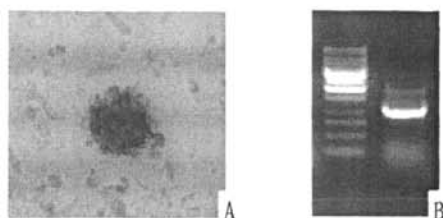


图3 四倍体胚胎样干细胞的特征检测

A 小鼠四倍体胚胎干细胞集落 AKP 染色 B 四倍体胚胎干细胞集落的 Oct 3/4 的表达

## 5.2 四倍体胚胎干细胞的体外分化

体外可以形成拟胚体。无 LIF 自主分化时, 具有三胚层样细胞, 但多核细胞如跳动心肌样细胞和滋养层细胞比例很高。

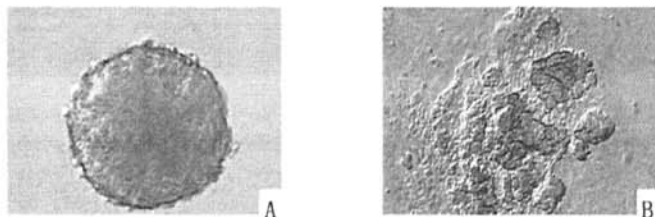


图4 四倍体胚胎干细胞的体外分化

A 拟胚体 B 分化形成的跳动的心肌样细胞

## 6 讨论

### 6.1 四倍体 ES 一样细胞的分离与培养

我们将四倍体囊胚置于饲养层上后, 囊胚贴壁, 并在 6—8 后长出原始集落, 其集落形成的时间晚于正常的胚胎 (二倍体胚胎 4—5 天即长出集落), 这可能与四倍体胚胎内细胞团数少, 染色体加倍后其细胞周期延长相关, 推测其 S 期长于正常胚胎。但是, 总的贴壁效率和原代克隆效率与正常胚胎无明显差异, 令人失望的是其传代的能力远低于正常的胚胎, 我们没有获得传代超过 8 代的四倍体 ES 一样细胞, 这可能和四倍体胚胎的发育潜能有关, 小鼠的四倍体胚胎发育无法超过 8.5dpc<sup>[10]</sup>, 除了极少数报道, 四倍体胎儿罕见<sup>[7,8,9]</sup>。

四倍体 ES 一样细胞的细胞体积明显大于正常的细胞, 胞质丰富, 可以作为良好的胞质来源。研究者已经建立了四倍体胚胎干细胞的显微操作核移植的方法和高速离心去核的方法<sup>[12,13]</sup>, 是否能够作为卵母细胞的重编程材料的替代者, 还需要进一

步的研究, 不过, 从人、小鼠胚胎干细胞与成纤维细胞融合而来的四倍体 ES 一样细胞已经获得, 胚胎干细胞重编程体细胞回到胚胎状态的结果, 提示了胚胎发育早期的细胞质中含有重编程的因子或者启动胚胎期基因转录的调控因子, 而这种因子不仅仅在卵母细胞中存在, 而且在胚胎干细胞内, 早期卵裂胚胎细胞中<sup>[1,14,15]</sup>。

## 6.2 四倍体 ES 一样细胞的体外分化

四倍体 ES 一样细胞可以在无 LIF 的培养液中悬滴培养形成 EBs, 接种在培养皿可以分化成上皮样结构, 管腔状结构等多种组织, 但是皿中的心肌细胞分化活跃, 占据较高的比例。这可能和其四倍体的特性相关, 心肌细胞为多核细胞<sup>[16]</sup>。从分化的结果看到, 四倍体胚胎干细胞具有一定的分化能力, 但是这种分化的倾向性和分化的不协调也可能反应了四倍体胚胎在发育上的异常和早期终止的特性。

利用四倍体胚胎的高的心肌细胞方向的分化特性, 可以作为心肌细胞良好的潜在的分化来源, 这值得进一步的研究。

## 7 小结

1 小鼠四倍体囊胚放在饲养层上, 可以获得与正常胚胎相似的贴壁率和原代克隆率, 但是其传代能力有限, 传代无法超过 8 代;

2 小鼠四倍体 ES 一样细胞具有 ES 细胞的特性, 核型分析  $4N=80$ ;

3 小鼠四倍体 ES 一样细胞在体外具有分化能力, 分化的细胞中以心肌细胞比例较高。

## 参考文献

[1] Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. Cowan C A, Atienza J, Melton D A, Eggan K. Science 2005, 309: 1369-1373.

[2] Pralong D, Lim ML, Vassiliev I, Mrozik K, Wijesundara N, Rathjen P, Verma PJ. Tetraploid embryonic stem cells contribute to the inner cell mass of mouse blastocysts. Cloning Stem Cells. 2005 7(4): 272-8.

[3] Snow MHL. Tetraploid mouse embryos produced by cytochalasin B during cleavage. Nature 1973, 244: 513-4.

[4] Kubiak JZ, Tarkowski AK. Electrofusion of mouse blastomeres. Exp Cell Res 1985,



157: 561-666.

- [5] James RM, Kaufman MH, Webb S, et al. Electrofusion of mouse embryos results in uniform tetraploidy and not tetraploid/diploid mosaicism. *Genet Res Camb*, 1992, 60: 185-194.
- [6] Koizumi N, Fukuta K, Preimplantation development of tetraploid mouse embryo produced by cytochalasin B. *Exp Anim*. 1995, 44(2): 105-9.
- [7] Snow MHL. Embryonic development of tetraploid mice during the second half of gestation. *J Embryol Exp Morphol* 1975, 34(3): 707-21.
- [8] Kaufman MH, Webb S, Postimplantation development of tetraploid mouse embryos produced by electrofusion. *Development* 1990, 110: 1121-1132.
- [9] Kaufman MH, Postcranial morphological features of homozygous tetraploid mouse embryos. *J Anat*. 1992, 180: 521-34.
- [10] Tarkowski AK, Witkowska A, Opas J. Development of cytochalasin B-induced tetraploid and diploid /tetraploid mosaic mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol*. 1977, 41: 47-64.
- [11] Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2003: 388-389.
- [12] Pralong D, Mrozik K, Occhiodoro F, Wijesundara N, Sumer H, Van Boxtel AL, Trounson A, Verma PJ. A novel method for somatic cell nuclear transfer to mouse embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells*. 2005, 7(4): 265-71.
- [13] Pralong D, Trounson AO, Verma PJ. Cell fusion for reprogramming pluripotency: toward elimination of the pluripotent genome. *Stem Cell Rev*. 2006, 2(4): 331-40.
- [14] Mc Grath J, Solter D. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. *Science*, 1984, 226 (4680): 1317-9
- [15] Developmental reprogramming after chromosome transfer into mitotic mouse zygotes. *Nature* 2007, 447(7145): 679-85.
- [16] Marín-García J, Goldenthal MJ. Application of stem cells in cardiology: where we are and where we are going. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2006, 1(1): 1-11.

## 附录 2 文献综述：哺乳动物异种体细胞核移植研究新进展\*

丁利军<sup>1</sup> 陈建泉<sup>2</sup> 成国祥<sup>1,2\*\*</sup>

(1 上海交通大学医学院附属瑞金医院 上海 2 上海转基因研究中心 上海)

**摘要:** 异种体细胞核移植是体细胞核移植技术新的发展。哺乳动物异种核移植技术为探索异种核质关系, 鉴别早期胚胎发育关键基因提供了良好的模型, 同时在濒危动物保护、转基因动物生产、人类医学治疗性克隆上具有重要应用价值。本文对当前异种核移植现状, 异种核移植程序优化, 异种妊娠建立, 异种核移植应用前景作了综述, 重点讨论了异种核移植研究涉及的相关机理。

**关键词:** 异种体细胞核移植; 重编程; 哺乳动物

**学科分类号** Q23

自第一只体细胞克隆绵羊 Dolly 诞生以来, 体细胞核移植技术迅速发展, 已分别在小鼠、大鼠, 牛, 山羊, 驴, 驼, 鹿, 猪, 马, 猫, 犬, 兔等十三种哺乳动物上获得成功, 这些克隆动物的获得, 是基于体细胞核移植到同一物种的去核卵母细胞, 称之为同种体细胞克隆。而使用种间或亚种间的卵母细胞进行核移植操作, 构建异种重构胚, 进行的早期胚胎发育, 或进一步在异种寄母中建立妊娠甚至全程发育, 用于核质之间相互作用, 胚胎发育基因调控, 细胞分化等等研究, 称为异种体细胞核移植(interspecies somatic cell nuclear transfer, ISCNT)。

### 1 哺乳动物异种核移植研究的现状

1984 年, McGrath 和 Solter 等将不同品系的小鼠卵裂球移入去核的合子中, 发现重构胚能在体外卵裂, 但无法进一步发育<sup>[1]</sup>。1993 年, 梅祺等用小鼠 8-细胞胚胎的卵裂球移植到去核兔卵母细胞中, 重构胚出现核重塑和染色体聚缩现象, 并且 5.4% 异种重构胚体外发育到囊胚<sup>[2]</sup>。Meirelles 等将瘤牛 (*Bos indicus*) 早期胚胎卵裂球移植到黄牛 (*Bos taurus*) 去核卵母细胞内, 获得异种克隆囊胚, 移植到 5 头受体黄牛中, 两头妊娠, 其中一头产下异种克隆瘤牛<sup>[3]</sup>。1998 年, Wells 等把 Enderby Island 牛颗粒细胞核移植到去核奶牛卵母细胞中, 构建重构胚, 成功克隆了一头名为“贵妇”的珍稀母牛, 获得两头克隆个体, 其中一头存活<sup>[5]</sup>。

1999 年, Dominko 等分别将绵羊、猪、猴和大鼠等动物的体细胞核移植到去核的牛卵母细胞中, 异种重构胚均能完成早期发育<sup>[4]</sup>。White 等将盘羊的体细胞核移植

\*国家 863 项目 (NO.2002AA206652) 和国家自然科学基金 (NO.30370703) 资助

\*\*通讯作者 E-mail: Chenggx@cngenen.com Tel: 021-58552343 Fax: 021-58040435

到绵羊的去核卵母细胞中, 异种重构胚有 1.56%发育到囊胚<sup>[6]</sup>。Loi 等<sup>[7]</sup>将欧洲盘羊的颗粒细胞核移植到绵羊的去核卵母细胞中, 获得重构胚, 其中 7 枚发育到囊胚, 移入受体绵羊子宫, 最终一只受体正常妊娠并产下 1 只异种克隆盘羊。Lanza 等<sup>[8]</sup>将野牛皮肤成纤维细胞移入去核的牛卵母细胞中获得异种野牛克隆胚, 其中 12%的重构胚发育到囊胚, 并使一头受体母牛妊娠到期, 产下一头发育正常的克隆亚洲野牛“*Noah*”, 供核的亚洲野牛的染色体数目为 58 条, 而卵母细胞受体奶牛的染色体数目为 54 条。Illmensee 等<sup>[9]</sup>将人的颗粒细胞和成纤维细胞移植到去核的牛卵母细胞, 重构卵融合后可以发育到囊胚阶段, 囊胚率分别为 31.3%和 29.3%。这些研究表明某些哺乳动物的卵母细胞具有使异种体细胞核去分化和重编程的能力, 异种重构胚可以完成全程发育。

国内异种克隆研究亦很活跃。陈大元等对异种克隆大熊猫进行了大量的研究, 他们把大熊猫体细胞核移植入兔卵母细胞, 得到了异种大熊猫早期胚胎, 并以猫为寄母建立了异种妊娠, 但未能克隆出大熊猫<sup>[10,11]</sup>。Chen 等将人体细胞核移植到去核兔卵母细胞内发育至囊胚并分离得到人类胚胎干细胞<sup>[12]</sup>。以山羊卵母细胞为胞质受体的异种核移植也获得了一些突破。本实验室以奶山羊为卵母细胞胞质供体, 波尔山羊耳成纤维细胞作供核, 构建的波尔山羊-奶山羊重构胚发育至囊胚的比率为 34.6%, 1 只受体羊妊娠到期产下一头健康的克隆波尔山羊<sup>[13]</sup>。

## 2 异种核移植操作优化

由于异种核移植胚胎早期发育率相对于种内核移植要低得多, 其原因可能是核移植操作技术以及供核、卵母细胞种属差异等原因引起的, 因此, 许多研究者对去核、移核方法和供核细胞的培养、激活方式等作了探讨。

Lu 等研究了纺锤体观察系统 (Spindle View) 去核, 去核成功率 100%, 将水牛成纤维细胞异种核移植到奶牛卵母细胞胞质受体构建水牛-奶牛重构胚, 获得了高的囊胚率 (13.3%)<sup>[14]</sup>。纺锤体观察系统利用纺锤体与胞质折光性的差异准确判定卵母细胞核的位置, 因此可以减少吸出卵母细胞胞质的量, 减少了因反复操作对卵母细胞的机械性损伤。

Jiang 等研究化学去核联合细胞胞质内注射(whole cell intracytoplasmic injection,

WCICI)核移植的方法对兔卵母细胞去核、大熊猫-兔重构胚体外发育的影响,获得了比透明带下注射供核细胞(subzonal injection, SUZI)核移植高的囊胚发育率,但差异不显著( $P>0.05$ )<sup>[15]</sup>。李劲松等采用连续核移植的方法,即首先通过异种体细胞核移植获得大熊猫-兔异种重构胚,然后将重构胚的卵裂球再作为供核移入去核兔卵母细胞透明带下,共进行3次连续核移植,使供核多次暴露于卵胞质环境中,经电激活后,体外培养的异种重构胚的囊胚发育率显著高于原代体细胞核移植组( $P<0.05$ )<sup>[16]</sup>。

Kitiyant 等在将野牛胎儿成纤维细胞移植入去核奶牛卵母细胞后,采用钙离子载体 A23187 联合 6-DMAP 激活重构胚,有效提高囊胚发育率( $P<0.05$ )<sup>[17]</sup>。Chang 等通过采用血清饥饿处理供核细胞,无  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  融合液和无血清培养重构胚,使得人-牛异种重构胚体外发育至囊胚率提高<sup>[18]</sup>。

### 3 异种体细胞核移植相关机理

#### 3.1 供核细胞核结构重塑及纺锤体重装配

1965 年 Gurdon 等在将供核移植入活化的去核受体卵,核仁出现分散。许多异种核移植<sup>[19]</sup>研究发现,处于分化状态的细胞核被移植入卵母细胞后在卵母细胞胞质作用下,发生一系列形态和功能的变化,如核仁分散,供核的急剧膨胀,核膜分解(nuclear envelope breakdown, NEBD),染色质聚缩,染色质解聚缩,新的核膜重建等,与同种核移植观察结果相似。由于供核的重塑与基因组重编程关系的复杂性,对核质融合后的微环境的改变也知之甚少,但最近在两栖类核移植上的一些研究认为卵母细胞成分可引起供核核纤层的重构,去除体细胞核中核纤层 A/C 蛋白,减少体细胞特征,从而对核基因组转录活性的改变起到作用<sup>[21]</sup>。

Zhong 等以 MII 期小鼠卵母细胞为供质细胞,小鼠、大鼠成纤维细胞,猪颗粒细胞为供核细胞构建种内、种间核移植胚胎,发现供核细胞中心体在激活后的 1 细胞胚胎内降解,并参与了过渡性纺锤体和具有正常功能的减数分裂纺锤体的形成,并暗示这种参与纺锤体的装配不具有种属特异性<sup>[22]</sup>。

#### 3.2 供核细胞与供质卵母细胞细胞周期相容性

处于有丝分裂各个时期的细胞作为供核移植到卵母细胞后,在卵母细胞内进行

重编程, 而核移植重构胚的染色体倍性正确与否, 是决定重构胚能否正常发育的重要因素之一<sup>[23]</sup>。因此, 移植核和供质卵母细胞之间的细胞周期相容, 才能避免重构胚的 DNA 损伤, 保持二倍体倍性, 若不相容则发育启动后, 供核细胞的染色体会产生倍性异常, 导致克隆失败<sup>[24,25]</sup>。一般采用血清饥饿处理供核细胞, 使其休止在 G0 期, 供核细胞处于 G0 期, 使 DNA 复制和卵母细胞同步, 减少了染色体畸变的可能性, 而且可能更有利于染色体结构的改变从而完成完全的重编程<sup>[26]</sup>, 有助于核移植胚胎的正常发育。1998 年, Cibelli 等认为血清饥饿处理细胞使其处于静止期再进行核移植并非必需<sup>[27]</sup>。Li 等采用非休止期的小鼠和大熊猫供核细胞移植到去核的兔 MII 卵母细胞中, 分别获得 5.1% 和 4.2% 的囊胚发育率, 表明异种非休止的供核细胞能够在异种卵质中去分化, 并支持早期胚胎发育<sup>[28]</sup>。此外, 最近的一些研究表明血清饥饿并不能显著提高细胞处于 G0 / G1 期细胞比例, 而且血清饥饿所引起的细胞凋亡影响异种重构胚的发育; Hashem 等研究认为细胞汇合 (Confluency) 是一种有效引起细胞休止的方法<sup>[29]</sup>。

目前用作供质通常为 MII 期的卵母细胞, 除了易于操作外, 更重要在于其可以保持核染色体完整、倍性正确, 其高的 MPF 活性有助于供核的重塑, 表现出与正常受精卵相似的转录活性和核仁超微结构<sup>[30]</sup>。

### 3.3 供核基因组重编程

在异种核移植中, 异种细胞核移植到去核的卵母细胞后, 细胞核需要关闭基因表达, 然后进行重新编程<sup>[31,32]</sup>, 启动新的基因转录模式指导重构胚的发育, 基本过程与同种体细胞核移植重编程相似, 这些过程涉及到卵母细胞胞质中母源性 RNA、蛋白质因子与供核基因组的相互作用, 但由于核与去核胞质的物种差异性, 使得异种核移植基因组的重编程更加复杂和困难。Mastro Monaco 等的研究表明了异种核移植过程中核基因组对胞质组分的识别和响应对于正确的细胞功能和胚胎发育非常重要, 其原因也许是正确的、完全的核基因组重编程对于重构胚的正常发育是必需的。研究认为重编程不完全或节奏缓慢, 基因组转录起始过早, 使得重构胚在早期胚胎发育过程中保留过多的体细胞特征是日前体细胞核移植效率低下的主要原因<sup>[33]</sup>。

重编程的首要事件是去分化,即关闭体细胞基因组的转录活动和表达谱。在正常配子发生过程中转录活动减少,染色体的聚缩,与组蛋白修饰密切相关<sup>[34]</sup>,体细胞核重编程出现相似的现象,提示卵母细胞胞质在体细胞核移植过程中模仿正常受精卵的发育,通过母源性因子引发表观遗传事件使体细胞核重编程<sup>[35]</sup>。对基因组的表观遗传修饰包括 DNA 甲基化/去甲基化、组蛋白乙酰化/去乙酰化等,这些对染色体结构的改变和基因表达的调节,将影响核移植胚胎的发育<sup>[36,37,38]</sup>。目前认为多个体细胞基因的去甲基化/再甲基化是在卵母细胞内重编程建立新的转录状态所必需的。研究表明,只有那些甲基化正常的胚胎发育到期<sup>[40]</sup>。核移植过程中,对 Oct4 基因重编程的研究发现, DNA 去甲基化可促进基因重编程,启动 Oct4 转录。并且重编程发生在无 DNA 复制和 RNA/蛋白质合成时,并且具有选择性,只对 Oct4 启动子作用,认为 Sp1/Sp3 和 GGGAGGG 结合位点对于去甲基化和转录是必需的<sup>[39]</sup>。Kang 等发现在核移植胚胎中,单拷贝序列在附植前阶段并不像卫星序列一样去甲基化,基因组序列之间甲基化模式并不相同,表明核移植胚胎中重要基因的选择性甲基化,同时内细胞团(inner cell mass, ICM)与滋养外胚层(trophectoderm, TE)甲基化水平并不一致,这似乎暗示胚外滋养层广泛的基因调节异常可能是由于甲基化不正确引起的<sup>[41]</sup>,而这些最终导致克隆胎儿异常。基因组序列不同的甲基化与不同位置细胞的甲基化导致总体不一却特异的甲基化模式,表明在核移植胚中表遗传的重编程是以限制性的方式发生的。Kang 等在观察牛神经肽 galanin 基因在核移植胚胎中迅速完全去甲基化,在囊胚阶段如正常囊胚一样在一个 CpG 位点重新甲基化,启动分化程序<sup>[42]</sup>。可见核移植过程中体细胞核 DNA 中 CpG 岛的去甲基化以及至囊胚阶段甲基化水平的重新建立,与克隆动物发育过程的基因表达和细胞分化紧密相关。Chen 等通过猪兔交互异种体细胞核移植试验表明供核的特异重复序列的去甲基化是由卵母细胞的胞质决定而不是供核的固有特性,同时不同物种的卵母细胞胞质具有不同的使基因去甲基化的能力<sup>[43]</sup>。

其中,印迹基因在核移植过程中的 DNA 去甲基化/甲基化对于胚胎的发育有着重要影响。基因印迹是指在生殖细胞发育过程中建立起来的区分父源性或母源性及其拷贝数的标志,由于其单亲本的表达特性,通常具有组织特异性及发育阶段特异性

[44]。印迹基因 XIST<sup>[45]</sup>, GTL2<sup>[45]</sup>, Car2<sup>[46]</sup>, Ncam1<sup>[46]</sup>, maspin<sup>[47]</sup>等表观遗传异常导致滋养层/胎盘功能异常。引起胎儿异常的多个印迹基因被发现,包括 IGFII, IGFIIR 等等<sup>[48]</sup>。当小鼠缺乏父源 Igf2 基因小鼠比野生型小鼠小 30-40%, 如果 Igf2R 基因丢失所有的甲基, 其蛋白质分泌比正常值低 30-60%, 使得动物胎儿生长过快, 患胎儿过大综合症 (large offspring syndrome), 影响克隆效率<sup>[48]</sup>。实验室进行核移植和在非生理条件下培养胚胎时, 可能发生外因引起的表遗传修饰, 如某些基因丢失一些甲基<sup>[49,50]</sup>, 以及体细胞核基因组在核移植前增殖分化中不正确的 DNA 修饰的积累<sup>[51]</sup>, 都会影响体细胞核基因组的正常重编程。

在核移植胚的体外培养过程中, 往往无法正常发育至囊胚而停留于某个特定的发育时期, 称为发育阻滞。研究发现, 由母型向合子型基因组调控转换, 即“母胚转换” (maternal-embryo transmission, MET) 是早期胚胎发育的必要内在条件。合子型基因激活 (zygotic gene activation, ZGA) 是基因组再程序化的关键事件之一<sup>[52]</sup>。合子型基因激活受到多种正负调控作用的影响, 最重要的包括基因转录中反式作用因子的调控<sup>[53,54]</sup>。Davis 和 Schultz 在研究蛋白质起始因子 eIF-A 基因在卵母细胞至 2-细胞期的转录变化后认为, 在胚胎发育早期 eIF-A 基因的表达伴随着启动子利用的改变, 这可能是基因表达由母型向合子型基因调控的再程序化所致<sup>[55]</sup>。

核移植再程序化包括了体细胞基因组的去分化, 重编程以及合子型基因激活与表达等一系列变化, 其涉及胞质内环境与供核基因组多层次网络性的相互作用, 对于其中起作用的因子、RNA 和关键基因还知之甚少, 但随着哺乳动物胚胎发育早期基因表达与调控机制的深入理解, 同种克隆中细胞核再程序化机制的阐明, 对异种核移植技术的发展将起到巨大的推动作用。

### 3.4 异种核移植中线粒体命运

线粒体不仅为细胞的生命活动提供能量, 也是哺乳动物细胞唯一的核外遗传物质。线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA), 16.5Kb, 编码 37 个基因, 2 种 rRNA, 22 种 tRNA, 13 种多肽。哺乳动物 mtDNA 仅编码线粒体所需的一小部分蛋白, 大部分仍由核 DNA 编码<sup>[56,57]</sup>, 线粒体功能主要由核控制。线粒体在细胞能量供给, 细胞信号转导, 细胞凋亡 (programmed cell death, PCD), 影响胚胎、胎儿发育方面有一

系列重要作用。研究表明不充分或不正确的线粒体功能严重影响异种核移植成功，体细胞克隆胎儿通常出现的某些症状与人类临床线粒体呼吸链缺陷疾病有惊人的相似<sup>[58]</sup>。线粒体融合/裂解、线粒体代偿和 mtDNA 重构过程涉及核-线粒体相互作用，并且在核重编程过程中线粒体可能参与某些表遗传的修饰<sup>[58]</sup>，研究也发现异种重构胚囊胚发育过程中的发育延迟、细胞数减少、细胞凋亡以及凋亡相关基因的增殖等等胚胎瓦解过程均和线粒体的功能相关<sup>[59]</sup>。

正常胚胎发育过程中，mtDNA 通过卵母细胞传递给后代。然而核移植重构胚共同传递受体卵母细胞 mtDNA 和供核 mtDNA。在异种核移植中，由于受体卵母细胞和供体核来自不同的物种、品种或品系，目前已证实异种重构胚的线粒体存在 3 种变化模式。第一种是供体细胞线粒体随着胚胎发育逐渐消失，受体卵母细胞中的线粒体增殖，最后在数量上占主导地位。Li 分析了羚牛-牛的异种重构胚后，发现在囊胚阶段线粒体基本来自牛卵母细胞，而羚牛供核细胞的线粒体已是极少数<sup>[60]</sup>。第二种是供体细胞线粒体随着胚胎发育不断增殖，而受体卵母细胞线粒体则逐渐消失，最后供体线粒体完全取代受体线粒体。Chen 等<sup>[61]</sup>以大熊猫体细胞为供体，兔卵母细胞为受体，克隆的大熊猫胚胎在囊胚前各阶段大熊猫和兔线粒体共存，但在着床后的大熊猫胚胎中，兔线粒体已经消失只检测到大熊猫线粒体。第三种是受体卵母细胞胞质挽救供体细胞线粒体，造成在发育各阶段线粒体的异质性。直至囊胚发育阶段，牛和人的线粒体 DNA 都可以在牛-人异种重构胚中检测到<sup>[62]</sup>。Steinborn<sup>[63]</sup>等发现克隆牛各种组织中供体 mtDNA 与受体 mtDNA 共存，但供体 mtDNA 比率低（0.5-0.7%），并无增殖优势，保持中性分离。Jiang 等通过 PCR 分析发现在附植前，在北山羊-兔异种重构胚中北山羊和兔的线粒体共存<sup>[64]</sup>。Inone 等通过不同品系小鼠克隆实验分析供受体 mtDNA 在脑、肝、肾、尾等组织的分布情况，发现供体 mtDNA 分布呈现组织特异性模式，表现出核基因组控制的特性<sup>[65]</sup>。

我们认为，异种核移植中上述线粒体命运的发生与线粒体的进化以及供受体亲缘关系远近密切相关。线粒体在进化上是保守的，哺乳动物线粒体基因组同源性很高，人与兔的线粒体蛋白氨基酸同源性为 85%。当供受体亲缘关系相近时，核基因组对两种线粒体 DNA 复制给予同样的支持，但由于受体卵母细胞线粒体在数量上的



优势, 供核细胞线粒体被稀释, 重构胚的线粒体组成最终出现第一种模式。而当供受体亲缘关系较远时, 核基因组对供体来源的线粒体存在优先增殖时, 则出现第三种模式。而当供受体亲缘关系很远, 核基因组则不支持卵母细胞线粒体分裂, 仅支持供核线粒体的增殖, 则线粒体组成出现第二种模式。异种核移植中线粒体命运依然体现了核控制的基本原则, 尤其体现在 mtDNA 复制启动上, 这是核-线粒体互作发育的关键事件之一<sup>[66]</sup>。

#### 4 异种妊娠的建立

哺乳动物的异种妊娠是借一种动物的胚胎在另一种动物的子宫内进行妊娠。由于自然界的物种生殖隔离机制, 建立异种妊娠的模型较少, 仅有三种: 啮齿类模型, 马驴模型以及绵羊、山羊模型<sup>[67]</sup>。研究发现, 滋养层细胞在建立母体与胚胎联系过程中起重要作用, 异种妊娠能否建立与滋养层细胞的类型相关<sup>[68,69,70]</sup>。当滋养层细胞与母体是同一类型时, 不管内细胞团细胞是来自何物种, 异种妊娠能够建立; 反之, 如果滋养层细胞与母体非同一种物种, 即使内细胞团细胞与母体是同一种物种, 也无法建立异种妊娠。

异种妊娠建立应充分考虑供受体之间的亲缘关系, 生殖生理、解剖结构的差异, 在此基础上借助一定的技术, 建立异种妊娠是可行的。目前可采用的技术包括: (1) 同种胚胎诱导异种妊娠; (2) 内细胞团置换; (3) 二倍体/四倍体 (2n/4n) 嵌合等等<sup>[61, 71, 72]</sup>。

#### 5 异种核移植技术的应用

异种核移植建立了不同物种之间体细胞核与卵母细胞胞质互作的良好模型, 而异种克隆动物的出生更证明了人为控制下的遗传物质的改变。异种核移植为研究早期胚胎发育相关基因, 遗传物质融合变化, 线粒体进化提供了新的手段和素材<sup>[59]</sup>。

异种核移植开辟了保护濒危动物和恢复已灭绝动物新的途径。通过选择合适的卵母细胞作胞质受体以及借助异种妊娠, 将濒危动物或已灭绝动物体细胞核进行移植, 以拯救无法获取卵母细胞的珍稀物种是可行的<sup>[51][7]</sup>。

异种核移植降低了制备大型转基因动物的成本。选择低价值的卵母细胞为胞质受体代替大型动物 (牛等) 的卵母细胞, 可以增加卵母细胞获得方法, 为转基因乳

腺生物反应器带来更大的经济利益。

异种核移植结合胚胎干细胞技术, 将人的体细胞核放入动物卵母细胞胞质中发育至囊胚, 分离内细胞团, 建立胚胎干细胞系, 进而产生与患者无排斥反应的组织 and 器官, 用于治疗严重疾病以及创伤, 即所谓的治疗性克隆<sup>[73][74]</sup>。

### 参考文献

- [1] Mc Grath J, Solter D. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. *Science* 1984, 226 (4680): 1317-9.
- [2] 梅祺 邹贤刚 杜森. 鼠兔核质杂交胚胎早期发育的研究. *实验生物学报*, 1993, 26(4): 389 -397.
- [3] Meirelles F V, Smith L C. Mitochondrial genotype segregation in a mouse heteroplasmic lineage produced by embryonic karyoplast transplantation. *Genetics*, 1997, 145: 445-51.
- [4] Dominko T, Mitalipova M, Haley B et al. Bovine oocyte cytoplasm support development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biol Reprod*, 1999, 60: 1496-502.
- [5] Wells D N, Misica P M, Tervit H R et al. Adult somatic nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderly Island cattle breed. *Reprod Fertil Dev* 1998, (10): 369-378.
- [6] White K L, Bunch TD, Mitalipov S, et al. Establishment of pregnancy after the transfer embryos produced from the fusion of Argali (*Ovis ammon*) nuclei into domestic sheep (*Ovis aries*) enucleated oocytes. *Cloning* 2000, 1(1): 47-54.
- [7] Loi P, Ptak G, Barboni B et al. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat Biotechnol* 2001, 19(10): 962-4.
- [8] Lanza R P, Dresser BL, Damiani P. Cloning Noah's ark. *Sci Am* 2000, 283(5): 84-9.
- [9] 陈大元 孙青原 刘冀珑 等. 大熊猫供核体细胞在兔卵胞质中可去分化而支持早期重构胚发育. *中国科学, C辑*, 1999, 29(3): 324-330.
- [10] Yang CX, Kou ZH, Wang K et al. Quantitative analysis of mitochondrial DNAs in macaque embryos reprogrammed by rabbit oocytes. *Reproduction*, 2004, 127(2):201-5

- [11] Chen D Y. Achievement of giant panda cloning. *Bulletin of the Chinese Academy of Sciences* 2000, 2: 120-121.
- [12] Chen Y, He Z X, Liu A L et al. Embryonic stem cells generated by nuclear transfer of human somatic nuclei into rabbit oocytes. *Cell Research* 2003, 13(4): 251-263.
- [13] Chen J Q, Chen J, XU X J et al. Effect of cytoplasm on the development of inter-subspecies nuclear transfer reconstructed goat embryo. *Mol Reprod Dev.* 2006, 74(5): 568-573.
- [14] Jiang MX, Yang CX, Zhang LS et al. The effects of chemical enucleation combined with whole cell intracytoplasmic injection on panda-rabbit interspecies nuclear transfer. *Zygote* 2004, 12(4): 315-20.
- [15] 李劲松 陈大元 韩之明等. 连续核移植对异种克隆大熊猫胚胎发育的影响. *科学通报* 2001, 46(22): 1899-1901.
- [16] Lu F, Shi D, Wei J et al. Development of embryos reconstructed by interspecies nuclear transfer of adult fibroblasts between buffalo (*Bubalus bubalis*) and cattle (*Bos indicus*). *Theriogenology* 2005, 64(6): 1309-19.
- [17] Kitiyanant Y, Saikhun J, Chaisalee B, et al. Somatic cell cloning in Buffalo (*Bubalus bubalis*): effects of interspecies cytoplasmic recipients and activation procedures. *Cloning Stem Cells* 2001, 3(3): 97-104.
- [18] Chang KH, Lim JM, Kang SK et al. An optimized protocol of a human-to-cattle interspecies somatic cell nuclear transfer. *Fertil Steril* 2004, 82(4): 960-2.
- [19] 李光鹏 兰国成 刘莹 等. 鼠猪异种细胞核移植. *动物学研究* 2000, 21(5): 416-418.
- [20] Collas P, Robl J M. Relationship between nuclear remodeling and development in nuclear transplant rabbit embryos. *Biology of Reproduction* 1991: 455 ~ 465.
- [21] Alberio R, Johnson AD, Stick R et al. Differential nuclear remodeling of mammalian somatic cells by *Xenopus laevis* oocyte and egg cytoplasm. *Exp Cell Res.* 2005, 307(1): 131-41.
- [22] Zhong ZS, Zhang G, Meng XQ et al. Function of donor cell centrosome in intraspecies and interspecies nuclear transfer embryos. *Exp Cell Res*, 2005, 306(1): 35-46.
- [23] Campbell KH S, Ritchie WA, Wilmut I. Nuclear2cytoplasmic interactions during

the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: implications for deoxyribonucleic acid replication and development. *Biol Reprod* 1993, 49: 933 ~ 942.

[24] Wolf E, Zakhartchenko V, Brem G. Nuclear transfer in mammals: recent developments and future perspectives. *J Biotech* 1998, 65: 99 ~ 110.

[25] McLaren A. Cloning: Pathways to a pluripotent future. *Science* 2000, 288: 1775 ~ 1780

[26] Campbell K H S, McWhir J, Ritchie WA et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996, 380: 64 ~ 66.

[27] Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 1998, 280: 1256 ~ 1258.

[28] Li J S, Han Z M, Zhu Z Y et al. Interspecies nuclear transfer using nonquiescent somatic cell. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao*, 2002, 35(1): 62-5.

[29] Hashem MA, Bhandari DP, Kang SK, Lee BC. Cell cycle analysis and interspecies nuclear transfer of in vitro cultured skin fibroblasts of the Siberian tiger (*Panthera tigris Altaica*). *Mol Reprod Dev.* 2007, 74(4):403-11.

[30] Fulka J Jr, First NL, Moor RM. Nuclear transplantation in mammals: remodeling of transplanted nuclei under the influence of maturation promoting factor. *BioEssays*, 1996, 18(10): 835 ~ 840.

[31] Hiiragi T, Solter D. Reprogramming is essential in nuclear transfer. *Mol Reprod Dev*, 2005, 70(4): 417-21.

[32] Munsie M O'brien C Mountford P. Transgenic strategy for demonstrating nuclear reprogramming in the mouse. *Cloning Stem Cells* 2002, 4(2): 121-30.

[33] Gao S, Latham KE. Maternal and environmental factors in early cloned embryo development. *Cytogenet Genome Res*, 2004, 105(2-4): 279-84.

[34] 张红卫. 发育生物学. 高等教育出版社, 中国 北京, 2001: 20-26.

[35] Young LE, Beaujean N. DNA methylation in the preimplantation embryo: the differing stories of the mouse and sheep. *Anim Reprod Sci*, 2004, 82-83:61-78.

[36] Tamada H, Kikyo N. Nuclear reprogramming in mammalian somatic cell nuclear cloning. *Cytogenet Genome Res.* 2004, 105(2-4): 285-91.

- [37] Bourc'his D, Le Bourhis D, Patin D et al. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. *Curr Biol*, 2001, 11(19):1542-6.
- [38] Kohda T, Inoue K, Ogonuki N et al. Variation in gene expression and aberrantly regulated chromosome regions in cloned mice. *Biol Reprod*, 2005, 73(6): 1302-11.
- [39] Simonsson S, Gurdon J. DNA demethylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(10): 984-90.
- [40] Miki H, Inoue K, Kohda T et al. Birth of mice produced by germ cell nuclear transfer. *Genesis*, 2005, 41(2): 81-6.
- [41] Kang YK, Park JS, Koo DB et al. Limited demethylation leaves mosaic-type methylation states in cloned bovine pre-implantation embryos. *EMBO J*, 2002, 21(5): 1092-100.
- [42] Kang YK, Yeo S, Kim SH et al. Precise recapitulation of methylation change in early cloned embryos. *Mol Reprod Dev*. 2003, 66(1): 32-7.
- [43] Chen T, Zhang YL, Jiang Y, Liu JH, Schatten H, Chen DY, Sun QY. Interspecies nuclear transfer reveals that demethylation of specific repetitive sequences is determined by recipient ooplasm but not by donor intrinsic property in cloned embryos. *Mol Reprod Dev*. 2006, 73(3): 313-7.
- [44] Tighman S M. The sins of the fathers and mothers: genomic imprinting in mammalian development. *Cell*, 1999, 96: 185 ~ 193.
- [45] Dindot SV, Farin PW, Farin CE et al. Epigenetic and genomic imprinting analysis in nuclear transfer derived *Bos gaurus/Bos taurus* hybrid fetuses. *Biol Reprod*. 2004, 71(2): 470-8.
- [46] Singh U, Sun T, Shi W et al. Expression and functional analysis of genes deregulated in mouse placental overgrowth models: *Car2* and *Ncam1*. *Dev Dyn*. 2005, 234(4): 1034-45.
- [47] Stephen S. C. Chim, Yu K. Tong, Rossa W. K. Chiu, et al. Detection of the placental epigenetic signature of the *maspin* gene in maternal plasma. *PNAS*, 2005, 102: 14753 – 14758.
- [48] Young L E, Fernandes K, McEvoy T G et al. Epigenetic change in *IGF2R* is

- associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nature Genetics*, 2001, 27: 153 ~ 154.
- [49] Young L E, Fairburn H R. Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. *Theriogenology*, 2000, 53: 627 ~ 648.
- [50] Renard J P, Zhou Q, LeBourhis D et al. Nuclear transfer technologies: between successes and doubts. *Theriogenology*, 2002, 57: 203 ~ 222.
- [51] Johnson F B, Sinclair D A, Guarente L. Molecular biology of aging. *Cell*, 1999, 96: 291-302
- [52] Schultz R M, Warren D Jr, Paula S et al. Reprogramming of gene expression during preimplantation development. *J Exp Zool ( Mol Dev Evol)*, 1999, 285: 276 ~ 282.
- [53] Schwartz D A, Schultz R M. Zygotic gene activation in the mouse embryo: involvement of cyclic adenosine monophosphate dependent protein kinase and appearance of an AP-1-like activity. *Mol Reprod Dev*, 1992, 32: 209 ~ 216.
- [54] Nothias J Y, Miranda M, DePmphilis ML. Uncoupling of transcription and translation during zygotic gene activation in the mouse. *The EMBO J*, 1996, 15: 5715 ~ 5725.
- [55] Davis W Jr, Schultz R M. Developmental change in TATA-box utilization during preimplantation mouse development. *Dev Biol*, 2000, 218(2): 275 ~ 283.
- [56] Hiendleder S, Schmutz SM, Erhardt G, et al. Transmitochondrial differences and varying levels of heteroplasmy in nuclear transfer cloned cattle. *Mol Reprod Dev*, 1999, 54 (1): 24-31.
- [57] Takeda K, Takahashi S, Onishi A, et al. Dominant distribution of mitochondrial DNA from recipient oocytes in bovine embryos and offspring after nuclear transfer. *J Reprod Fert*, 1999, 116: (2): 253-9.
- [58] Hiendleder S, Zakhartchenko V, Wolf E. Mitochondria and the success of somatic cell nuclear transfer cloning: from nuclear-mitochondrial interactions to mitochondrial complementation and mitochondrial DNA recombination. *Reprod Fertil Dev*, 2005, 17(2): 69-83.
- [59] Mastromonaco GF, Favetta LA, Smith LC, Filion F, King WA. The influence of

- nuclear content on developmental competence of gaur x cattle hybrid in vitro fertilized and somatic cell nuclear transfer embryos. *Biol Reprod.* 2007, 76(3): 514-23.
- [60] Li Y, Dai Y, Du W, Zhao C, Wang L, Wang H, Liu Y, Li R, Li N. In vitro development of yak (*Bos grunniens*) embryos generated by interspecies nuclear transfer. *Anim Reprod Sci.* 2007, 101(1-2): 45-59.
- [61] Chen D Y, Wen DC, Zhang YP, et al. Interspecies implantation and mitochondria fate of panda-rabbit cloned embryos. *Biol Reprod.* 2002, 67(2): 637-42.
- [62] Illmensee K, Levanduski M, Zavos PM. Evaluation of the embryonic preimplantation potential of human adult somatic cells via an embryo interspecies bioassay using bovine oocytes. *Fertil Steril.* 2006, 85 Suppl 1:1248-60.
- [63] Steinborn R, Schinogl P, Wells DN et al. Coexistence of *Bos taurus* and *B. indicus* mitochondrial DNAs in nuclear transfer-derived somatic cattle clones. *Genetics*, 2002, 162(2): 823-9.
- [64] Jiang Y, Chen T, Nan CL, Ouyang YC, Sun QY, Chen DY. In vitro culture and mtDNA fate of ibex-rabbit nuclear transfer embryos. *Zygote.* 2005, 13(3): 233-40.
- [65] Inoue K, Ogonuki N, Yamamoto Y et al. Tissue-specific distribution of donor mitochondrial DNA in cloned mice produced by somatic cell nuclear transfer. *Genesis*, 2004, 39(2): 79-83.
- [66] St John JC, Lloyd RE, Bowles EJ et al. The consequences of nuclear transfer for mammalian foetal development and offspring survival. A mitochondrial DNA perspective. *Reproduction*, 2004, 127(6): 631-41.
- [67] Anderson G B. Interspecific pregnancy: barriers and prospects. *Biol Reprod*, 1988, 38(1): 1-15
- [68] Rossant J, Croy BA, Clark DA et al. Interspecies hybrids and chimeras in mice. *J Exp Zool*, 1983, 228(2): 223-33.
- [69] Rossant J, Mauro VM, Croy BA. Importance of trophoblast genotype for survival of interspecific murine chimeras. *J Embryol Exp Morph*, 1982, 69:141-9.
- [70] Polzin VJ, Anderson DL, Anderson GB et al. Production of sheep-goat chimeras by inner cell mass transplantation. *J Anim Sci*, 1987, 65(1): 325-30.
- [71] Surani MA, Barton SC, Norris ML. Experimental reconstruction of eggs and embryos:

an analysis of mammalian development. Biol Reprod, 1987, 36(1): 1-16.

[72] Nagy A, Rossant J, Nagy R et al. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(18):8424-8

[73] Lanza R P, Cibelli J B, West M D. Prospects for the use of nuclear in human transplantation. Nature Biotech, 1999, 17: 117-1174.

### **New Research Progress on Interspecies Somatic Cell Nuclear Transfer in Mammals \***

DING Li-Jun<sup>1</sup> CHEN Jian-Quan<sup>2</sup> CHENG Guo-Xiang<sup>1,2\*\*</sup>

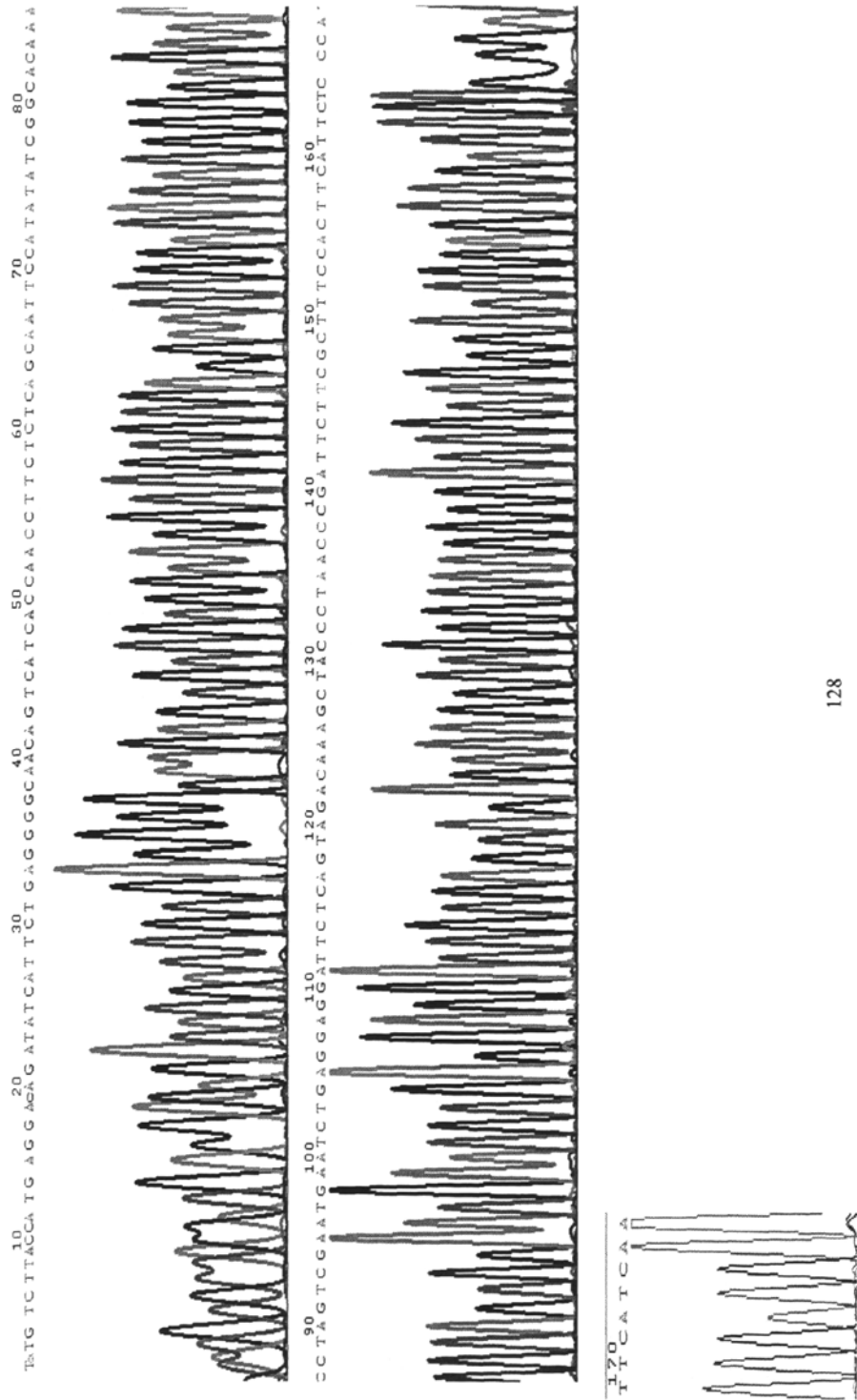
(1 Ruijin hospital, Medical School of Shanghai Jiaotong University, Shanghai China 2 Shanghai transgenic research center, Shanghai China)

**Abstract:** Interspecies somatic cell nuclear transfer (ISCNT) is a new improvement based on somatic cell nuclear transfer (SCNT) technology. ISCNT provides good models for the explorations in the interaction between cell nuclei and cytoplasm and the identifications of the key genes during early embryos development. It also has important applications at endangered animal conservation, production of transgenic animals and therapeutic cloning in regeneration medicine. This article reviews the progresses of ISCNT, optimum of operation procedure, interspecies pregnancy and its prospect. We emphasize the fundamental mechanisms involved in ISCNT.

**Key words:** interspecies somatic cell nuclear transfer, reprogramming, mammal



### 附录3 塔尔羊异种重构成胚线粒体细胞色素B基因部分测序图



## 致 谢

本论文是在导师成国祥教授悉心指导和亲切关心下完成的，导师不仅为学生提供了良好的实验条件和学习环境，更为学生的科研营造了浓郁的学术氛围。导师谆谆的教诲与无微不至的关怀，渊博的知识，勤勉的精神，严谨的治学态度，执着的人格魅力给学生留下了深刻的印象，更是学生今后为人治学的榜样。在此，向我的导师表示衷心的感谢！

感谢指导小组成员中国科学院遗传与发育研究所杜淼研究员，扬州大学兽医学院徐少甫教授以及上海市计划生育科学研究所左嘉客研究员对我的教导和帮助，三位老师作为学识渊博，潜心研究的学者，非常注重对于学生独立思考，创新思维的培养，使学生受益匪浅。

感谢上海转基因研究中心陈建泉副教授对学生具体细致的试验指导和帮助，以及对平时生活的关心和关怀！

上海转基因研究中心胚胎部陈建泉副教授，田海滨博士，沙红英博士，陈娟，王敬军，葛来香，成胜花，徐旭俊，吴友兵，黄志军，胡大伟，徐玉霞等研究人员的出色工作和大力支持，胚胎部团结协作的优良传统保障了本实验的顺利开展；上海转基因研究中心刘思国博士，俞国华博士，张杰博士，朱采红博士，许媛媛博士，李蓓，严钦等同学在分子检测实验部分给与了无私的帮助。在此深表谢意！

上海交通大学医学院发上海育生物学重点实验室李善刚博士对本实验提出了很多有益的建议，陈学进教授在共聚焦显微镜使用上提供了帮助，丁慧同学在实验中给与了很多帮助。在此一并致谢！

感谢张爱民博士，张琦博士，王璞，张鹏跃，彭京，张祺等同学在实验和论文完成过程中的热心帮助！

感谢上海交通大学医学院附属瑞金医院，上海转基因研究中心对我的培养！

感谢国家自然科学基金委员会对本实验的基金资助！

最后对多年来始终默默支持和鼓励我的家人表示深深的感谢！

## 攻读学位期间发表学术论文目录

**Ding Li-Jun Tian Hai-Bin Wang Jing-Jun Chen Juan Sha Hong-Ying Chen Jiang-Qunan Cheng Guo-Xiang. Different Intervals of Ovum Pick-Up Affect the Competence of Oocytes to Support the Preimplantation Development of Cloned Bovine Embryos. *Molecular, reproduction and development* 2008, 9999:1-6**

SCI收录 IF=2.5 第一作者 署名单位：上海交通大学医学院附属瑞金医院