

鸡卵细胞提取液有维持和增强细胞活性的关键作用

阮光萍 王金祥 庞荣清 姚翔 阮光洪 朱光旭 朱向情 蔡学敏

何洁 赵晶 李自安 石琳琳 王桂华 潘兴华*

(解放军昆明总医院干细胞工程实验室, 昆明 650032)

摘要 该文鉴定了一种提取物具有维持和增强细胞存活与分化的能力, 这将在细胞生物学研究中得到应用。制备四种卵细胞提取物, 雄鼠的脾细胞被提取物渗透并培养, 然后输注给雌鼠。在移植后雌鼠外周血中GFP阳性细胞和骨髓细胞中的Y染色体被检测, 对比脾细胞在体内存活与分化的不同能力。移植蛋白和全蛋提取液处理的脾细胞的雌鼠外周血检测到GFP阳性细胞, 在移植后120 d, 雌鼠骨髓中检测到的Y染色体阳性率与外周血中的GFP阳性细胞率呈正比。用蛋白和全蛋提取液渗透脾细胞后, 脾细胞在雌鼠体内存活能力强于其他提取液。结果表明, 鸡蛋白提取液有维持并增强脾细胞存活的作用。因此蛋白提取物可在将来用于干细胞功能的维持。

关键词 GFP转基因鼠; 脾细胞; 提取物; 细胞存活; 细胞分化

Chicken-egg Extracts Have the Key Roles in Maintaining and Enhancing the Cell Activity

Ruan Guangping, Wang Jinxiang, Pang Rongqing, Yao Xiang, Ruan Guanghong, Zhu Guangxu, Zhu Xiangqing,

Cai Xuemin, He Jie, Zhao Jing, Li Zian, Shi Linlin, Wang Guihua, Pan Xinghua*

(Stem Cell Engineering Laboratory, Kunming General Hospital of PLA, Kunming 650032, China)

Abstract This paper concerns the identification of an extract with the ability to maintain and enhance the survival and differentiation of cells which will be useful in cellular biology research. Four types of egg extracts were prepared. The spleen cells from male mice were permeabilized with the extracts and cultured respectively, and then transfused into female mice. The GFP-positive cells in the peripheral blood of female mice and Y chromosome in bone marrow cells were detected to compare the different abilities of spleen cells to survive and differentiate *in vivo*. Surviving GFP-positive spleen cells were detected in the female mice of chicken-egg-white and whole-egg extracts group. At 120 days after transplantation, the percentage of cells containing a Y chromosome in the bone marrow positively correlated with the percentage of GFP-positive cells in the peripheral blood. After permeabilization by chicken-egg-white or whole-egg extracts, spleen cells demonstrate significantly enhanced survivability. The results show the vital role of chicken-egg-white extracts in maintaining and enhancing the survival of spleen cells. Therefore, the chicken-egg-white extracts may be of use in future stem cells study.

Key words GFP-transgenic mice; spleen cells; extracts; cell survival; cell differentiation

收稿日期: 2013-02-08 接受日期: 2013-03-25

国家自然科学基金(批准号: 31172170)、国家重点基础研究发展计划(973计划)(批准号: 2012CB518106)和中国博士后科学基金(批准号: 201104748)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0871-64774773, Fax: 0871-64774920, E-mail: panxhynkm@yahoo.cn

Received: February 8, 2013 Accepted: March 25, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31172170), the National Basic Research Program of China (973 Program)(Grant No.2012CB518106) and the Postdoctoral Science Foundation of China (Grant No.201104748)

*Corresponding author. Tel: +86-871-64774773, Fax: +86-871-64774920, E-mail: panxhynkm@yahoo.cn

网络出版时间: 2013-05-22 14:31

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130522.1431.003.html>

干细胞是再生医学中极具潜能的生物学材料来源。然而干细胞在培养中容易分化为成熟细胞。研究表明, 哺乳动物^[1]和蟾蜍^[2]卵细胞提取物有重编程细胞的作用。因此, 我们推测鸡或鱼的卵细胞提取物也具有维持细胞的功能的作用。鼠脾细胞含有一定数量的造血干细胞^[3], 我们以前的研究表明, 这些细胞能重建造血功能, 但在培养过程中容易分化为成熟细胞失去重建造血功能的作用。因此, 我们制备了不同物种的卵细胞提取物并观察这些提取物对保护脾细胞中造血干细胞的作用。

荧光鼠是GFP转基因鼠, 体内所有的细胞都带荧光^[4-7], 用荧光雄鼠的细胞回输照射后的雌鼠, 为回输细胞提供了两种跟踪方法, 一种是检测外周血中的GFP阳性细胞, 一种是检测骨髓细胞中的Y染色体。我们的结果表明, 外周血中GFP阳性细胞的百分比与骨髓中Y染色体的百分比呈正相关。因此, 简单地检测外周血中的GFP阳性细胞就能反映造血重建的程度。在这个研究中, 我们对比了荧光雄鼠脾细胞被四种卵细胞提取物渗透后在雌鼠体内存活与分化作用的不同。

许多研究表明, 卵细胞提取物, 包括哺乳动物卵^[1]、非洲爪蟾^[8-9]、果蝇^[10-11]和其他非哺乳动物卵细胞^[12-13]提取物能在体细胞中部分诱导核重编程。因此, 我们想研究是否鸡卵或红鲢鱼卵提取物有同样的功能, 因为鸡卵和红鲢鱼卵能产生较多的提取物而且容易获得, 我们观察了这些提取物处理鼠脾细胞的作用, 通过输注荧光雄鼠的脾细胞给雌鼠, 我们能容易地定量脾细胞在体内的存活与分化能力, 我们用四种提取液透化处理脾细胞后培养12 d后, 回输照射的雌鼠体内, 结果表明, 加蛋白和全蛋提取液的脾细胞仍有在雌鼠体内存活和分化的功能, 鸡卵提取液保护了脾细胞中的造血前体细胞。因此, 使用鸡蛋白和全蛋提取液有望在将来用于体细胞重编程和/或保护干细胞。

1 材料与方法

1.1 提取液的制备

取一个鸡蛋, 无菌分离蛋白和蛋黄, 蛋白按1:1加裂解液, 蛋黄按1:3加裂解液, 充分搅匀, 存放于4 °C。第3天离心, 取上清, 4 °C保存。裂解液配方: 50 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl₂, 100 mmol/L HEPES(pH8.2), 1 mmol/L二硫苏糖醇(DTT), 0.1 mmol/L苯甲基磺酰

氟(PMSF)和蛋白酶抑制剂。由此得到的提取液为蛋白提取液和蛋黄提取液。再取一个鸡蛋, 按1:3加裂解液混合, 充分搅匀, 存放于4 °C。第3天离心, 取上清, 4 °C保存, 即为全蛋提取液。红鲢鱼卵直径为1 cm左右, 用生理盐水洗干净后, 1:1加生理盐水, 用搅拌机充分搅匀, 冻于-80 °C, 解冻后, 按1:2加裂解液, 4 °C放10 min, 离心, 取上清过滤除菌备用。各种提取液留取50 μL测蛋白浓度。标记蛋白浓度和制备时间, 分装保存于-20 °C。使用前, 提取物的蛋白浓度用HBSS调到10 mg/mL。

1.2 五种提取物的SDS-PAGE电泳

胶的浓度为上胶5%、下胶15%, 样品上样到孔中, 每孔上样8 μg, 电泳到胶的底部后结束, 染色3 h, 脱色过夜后拍照观察。

1.3 制备GFP转基因雄鼠的脾细胞悬液

研究中使用的小鼠福利由我们机构的监管框架监测, 所有实验步骤经昆明总医院实验动物伦理委员会批准。无菌取脾并浸泡于双抗中, 放在100目筛网上, 用注射器针蕊压碎, 用基础培养基冲洗, 滤过筛网的脾细胞收集, 用红细胞裂解液溶解红细胞。

1.4 荧光雄鼠脾细胞用四种提取液透化诱导

步骤按文献[14-15]进行了一些修改。简单地, 500 000个脾细胞用500 μL HBSS洗并再悬于475 μL冰冷的HBSS中, 管子在37 °C放2 min, 加入25 μL链球菌溶血素O(SLO), 使SLO终浓度为500 ng/mL, 37 °C放置30 min, 中间敲打混合细胞一次。注意最佳的SLO浓度和孵育时间需要根据每批SLO进行调整。样品用1 mL冰冷的HBSS稀释, 细胞在4 °C离心120×g 5 min。渗透的细胞一管加HBSS 500 μL做阴性对照, 一管加蛋白提取液500 μL, 一管加蛋黄提取液500 μL, 一管加全蛋提取液500 μL, 一管加红鲢鱼卵提取液500 μL。提取物中预先加入ATP再生系统和20 μL 25 mmol/L的NTP混合物, 37 °C放60 min, 中间敲打混合细胞一次。每管加1 mL预热(37 °C)完全培养基含2 mmol/L氯化钙, 转入24孔板3个孔, 每孔500 μL。培养2~4 h后, 移去上清300 μL, 用完全培养基500 μL代替。

1.5 透化诱导7, 10, 12 d后流式检测oct-3/4和c-myc双阳性的百分比

透化诱导7, 10, 12 d后, 取一定量的脾细胞, 离心, 弃上清, 沉淀悬于200 μL 4%多聚甲醛的PBS中,

室温10 min, 用SAP洗1次, 悬于50 μ L SAP中, 加入oct-3/4-PE(购自R&D Systems, Inc.) 10 μ L, 加入c-myc-percp(购自Santa Cruz Biotechnology, Inc.) 20 μ L, 根据供应商的说明书, 室温30 min, 流式检测阳性率。在细胞处理后7, 10, 12 d重复流式检测, 结果显示为均值 $\pm$ 标准差($n=3$)。

1.6 雌鼠照射和回输透化诱导的细胞

雌鼠20只, 分5组, 每组4只。用直线加速器照射, 剂量600 cGy, 剂量率50 cGy/min, 原皮距98.5 cm, 距老鼠中部100 cm。第一组到第五组分别回输HBSS、蛋白、蛋黄、全蛋和红鳟鱼卵提取液透化处理的脾细胞。每只鼠均回输 2×10^6 脾细胞。

1.7 移植后不同天数雌鼠外周血GFP阳性细胞百分比检测

移植后21, 34, 55 d, 雌鼠剪尾采血, 血用氯化铵溶血, 上流式检测GFP阳性细胞百分比。

1.8 GFP阳性细胞中CD4和CD8阳性的百分比

移植后21, 34, 55 d, 雌鼠剪尾采血, 血分两管, 一管加CD4-PE(购自Biolegend公司)1.5 μ L, 一管加CD8-PE(购自Biolegend公司)1.5 μ L, 室温30 min, 血用氯化铵溶血, 上流式检测GFP和CD4双阳性细胞, GFP和CD8双阳性细胞的百分比。

1.9 骨髓中Y染色体阳性率检测

1.9.1 染色体玻片标本的处理 滴片后, 在相差镜下检查染色体的分散情况, 选择染色体分散良好, 细胞质少的玻片标本做FISH。65 $^{\circ}$ C烤箱中烤片2~3 h后, 取出放室温下备用。或者放在室温下过夜, 第二天用。

1.9.2 探针的配制和变性 取10 μ L Biotin-16-dUTP标记好的小鼠Y染色体特异探针(一次杂交用), 置于EP管中。将EP管置于70 $^{\circ}$ C水浴中10 min, 使探针变性, 然后在37 $^{\circ}$ C水浴中退火30~60 min或者用PCR仪进行探针变性。

1.9.3 染色体玻片标本的变性 将70%甲酰胺置于水浴中加热至65 $^{\circ}$ C~67 $^{\circ}$ C。将备用的染色体玻片标本放入预热好的65 $^{\circ}$ C~67 $^{\circ}$ C 70%甲酰胺中变性1.5~2 min, 然后立即将玻片标本取出, 放入冰冷的70%乙醇中, 1 min后取出, 用70%、90%、100%乙醇系列脱水各2 min, 取出, 置室温下晾干备用。

1.9.4 杂交 将变性、退火后的探针加在变性好的染色体玻片标本上, 加盖片(22 cm $\times$ 22 cm), 用橡胶水封闭盖片四周, 将玻片标本置密封的湿盒于37 $^{\circ}$ C温箱中过夜。

1.9.5 杂交后洗涤 用镊子去掉封片的橡胶, 把玻片放入一瓶2 $\times$ SSC中2~5 min, 脱掉盖片, 将玻片换到50%甲酰胺中洗两次, 每次5 min, 然后在2 $\times$ SSC中洗两次, 每次5 min, 之后换到4 $\times$ T中洗5 min, 取出。加100 μ L抗体在染色体玻片标本上, 用盖片或parafilm覆盖在上面, 在37 $^{\circ}$ C温箱中染20 min。去掉盖片或parafilm, 在室温下于4 $\times$ T液中洗3次, 每次5 min。加含有DAPI的抗淬灭剂(封片液)10 μ L, 加盖片。镜检: 背景染色体为蓝色(DAPI滤片观察), 信号为红色cy3(Cy3滤片观察)。

1.10 统计方法

用two-way ANOVA, 统计软件为SPSS 17.0。

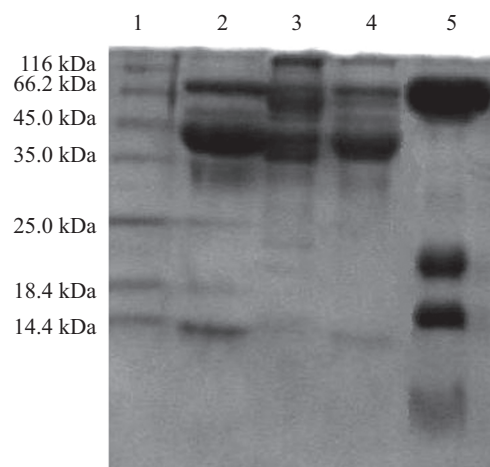
2 结果

2.1 SDS-PAGE结果

四种提取物含不同的蛋白有不同的分子量(图1)。具体哪个蛋白条带在重编程中起作用需要深入地研究。

2.2 透化诱导7, 10, 12 d后流式检测结果

脾细胞透化诱导后, 流式检测结果表明, 蛋白提取液和全蛋提取液处理的脾细胞c-myc和oct-3/4的阳性表达率与HBSS处理的脾细胞相比有统计学意义($P=0.005$, 图2)。在细胞处理后7, 10, 12 d重复流式检测, 结果显示为均值 $\pm$ 标准差($n=3$)。



1: 蛋白分子量标准; 2: 鸡蛋白提取液; 3: 鸡蛋黄提取液; 4: 鸡全蛋提取液; 5: 红鳟鱼卵提取液。

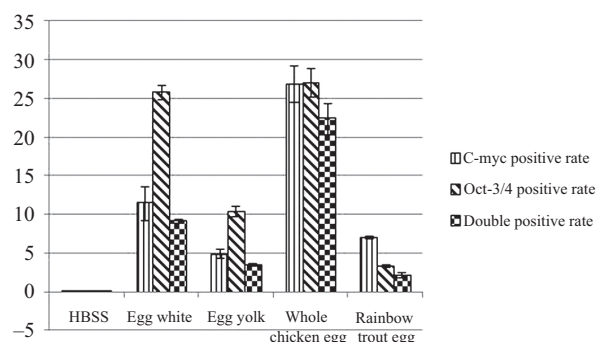
1: protein standards; 2: egg white extracts; 3: egg yolk extracts; 4: chicken whole egg extracts; 5: rainbow trout egg extracts.

图1 四种提取物的SDS-PAGE结果

Fig.1 SDS-PAGE result of four extracts

2.3 移植后21, 34, 55 d检测雌鼠外周血GFP阳性细胞百分比

透化处理12 d的脾细胞移植给雌鼠后, 雌鼠外周血中GFP阳性细胞的百分比各不相同, 蛋白和全蛋提取液处理过的脾细胞回输后, 雌鼠体内检测到的GFP阳性细胞百分比明显比用HBSS处理的脾细胞(质控)和其他提取液处理过的脾细胞阳性率高, 两者相比有统计学意义。方差分析表明, 各处理组外周血GFP阳性率之间差异有统计学意义($P=0.01$, 图3)。结果显示为均值 $\pm$ 标准差($n=4$)。

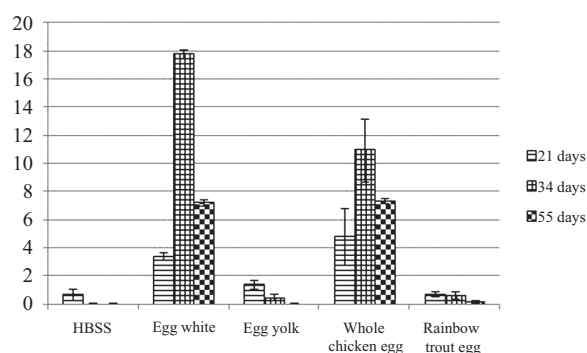


蛋白提取液和全蛋提取液处理的脾细胞c-myc和oct-3/4的阳性表达率与HBSS处理的脾细胞相比有统计学意义($P=0.005$), 结果显示为均值 $\pm$ 标准差($n=3$)。

The chicken-egg white and whole-egg extract permeabilized spleen cells showed statistically significant higher expression of c-myc and oct-3/4 compared with the spleen cells permeabilized with HBSS($P=0.005$). The results are shown as the mean $\pm$ S.D.($n=3$).

图2 透化诱导7, 10, 12 d后脾细胞流式检测结果

Fig.2 Flow cytometry results of spleen cells after permeabilized for 7, 10, 12 days



各处理组外周血GFP阳性率之间差别有统计学意义($P=0.01$), 结果显示为均值 $\pm$ 标准差($n=4$)。

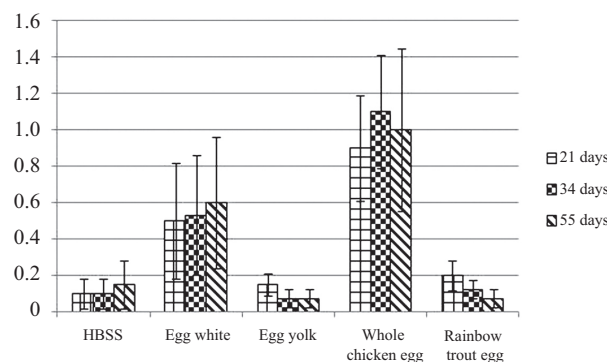
An analysis of variance showed that the GFP-positive percentages among each treatment group were significantly different($P=0.01$), the results are shown as the mean $\pm$ S.D.($n=4$).

图3 移植后不同时间雌鼠外周血GFP阳性率

Fig.3 The percentage of GFP-positive transplanted cells in the peripheral blood of the female mice at varying days after transplantation

2.4 GFP阳性细胞中CD4阳性的百分比

移植后不同天数, 检测GFP与CD4双阳性结果表明, 蛋白提取液和全蛋提取液处理的脾细胞回输雌鼠后, 雌鼠体内的双阳性百分比均大于其他提取液处理的脾细胞回输后的雌鼠, 差异有统计学意义($P=0.015$, 图4)。



结果显示为均值 $\pm$ 标准差($n=4$)。

The results are shown as the mean $\pm$ S.D.($n=4$).

图4 移植后不同时间外周血CD4和GFP双阳性的百分比

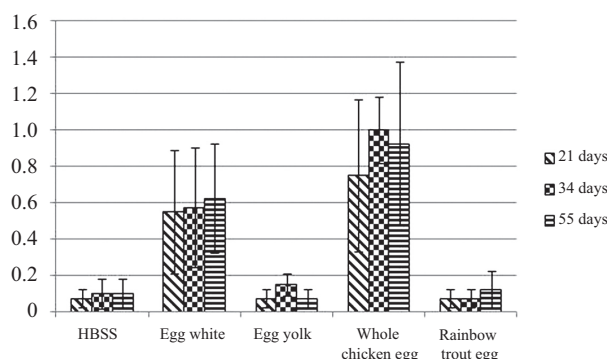
Fig.4 The percentage of CD4 and GFP double positive cells at varying days after transplantation

2.5 GFP阳性细胞中CD8阳性的百分比

移植后不同天数, 检测GFP与CD8双阳性结果表明, 蛋白提取液和全蛋提取液处理的脾细胞回输雌鼠后, 雌鼠体内的双阳性百分比均大于其他提取液处理的脾细胞回输后的雌鼠, 差异有统计学意义($P=0.019$, 图5)。

2.6 移植后120天骨髓中Y染色体阳性率

与外周血中GFP阳性细胞百分比呈正相关(图6和图7)。结果显示为均值 $\pm$ 标准差($n=3$)。这个结果

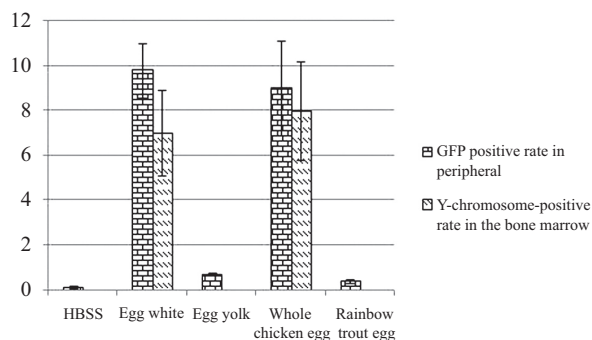


结果显示为均值 $\pm$ 标准差($n=4$)。

The results are shown as the mean $\pm$ S.D.($n=4$).

图5 移植后不同时间外周血CD8和GFP双阳性的百分比

Fig.5 The percentage of CD8 and GFP double positive cells at varying days after transplantation



结果显示为均值±标准差($n=3$)。

The results are shown as the mean±S.D.($n=3$).

图6 移植后120天骨髓中Y染色体阳性率与外周血GFP阳性率呈正比

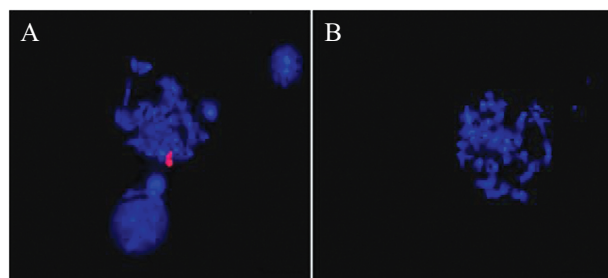
Fig.6 The percentage of cells with a Y-chromosome in the bone marrow positively correlated with the percentage of GFP-positive cells in the peripheral blood at 120 days after transplantation

表明, 用鸡蛋白和全蛋提取液处理的移植的干细胞能在雌鼠体内长期存活。

3 讨论

在目前的研究中, 我们报道了不同类型的卵细胞提取液处理的脾细胞在体内有不同的存活率, 这间接证明了不同提取液对维持脾细胞功能的作用不同。存活率被定义为 2×10^6 脾细胞移植体内后有多少细胞存活, 能找到一种提取液有能力维持和增强细胞的存活与分化将在细胞生物学研究中得到广泛应用。我们的结果证明, 鸡蛋白和全蛋提取液有维持脾细胞活性的作用。脾细胞用四种类型的卵细胞提取液和HBSS做为质控渗透30 min, 并培养7, 10, 12 d后, 流式检测结果表明, 用HBSS透化处理的脾细胞没有oct-3/4和c-myc阳性表达, 而用蛋白和全蛋提取液透化处理的脾细胞有oct-3/4和c-myc的阳性表达, 差别有统计学意义, 表明脾细胞透化后有重编程的现象。

许多研究报道指出, 动物卵细胞提取液能重编程体细胞^[1,16], 鸡蛋中的蛋黄是最大的卵细胞, 卵黄膜是细胞膜, 蛋白、卵带和蛋壳则是由输卵管分泌物形成的, 有营养和保护作用。因此我们制备了鸡蛋白、蛋黄、全蛋提取液和红鳟鱼卵提取液用来渗透鼠脾细胞并观察对细胞存活和分化的作用。我们发现, 脾细胞用不同提取液渗透后存活与分化能力不同, 表明蛋白和全蛋处理后的脾细胞维持原有功能比其他提取液处理后的脾细胞作用要强, 说明鸡



A: 有Y染色体的骨髓中期分裂像, 红色代表Y染色体; B: 无Y染色体的骨髓中期分裂像。

A: a representative metaphase spread with a Y chromosome. The red chromosome indicates the Y chromosome. B: a representative metaphase spread without a Y chromosome.

图7 雌鼠骨髓中期分裂像检测到Y染色体

Fig.7 The Y chromosome was detected in metaphase spreads from cells collected from the bone marrow of female mice

蛋白和全蛋含有脾细胞维持原有功能所需的物质, 我们假设这些物质是鸡蛋中的蛋白或小分子。而蛋白和全蛋提取液之间的差别无统计学意义, 进一步推断起作用的是鸡蛋中的蛋白。蛋白作为鸡胚发育过程中必需的营养物质, 也许含有维持胚胎多能性的关键因子, 因此也在脾细胞透化过程中维持了脾细胞的多能性, 进而有助于回输后在雌鼠体内的存活。当前, 还不知道卵细胞提取液重编程的分子机制, 我们的SDS-PAGE结果表明, 四种卵细胞提取液有不同的蛋白和不同的分子量。在渗透过程中, 鸡蛋白和全蛋提取液维持了脾细胞的多能性, 有助于脾细胞输注后在雌鼠体内的存活。而这个结果是由于保护了脾细胞中的造血前体细胞或诱导细胞重编程目前还不知道。如果是由于保护脾中的造血前体细胞, 鸡蛋白和全蛋提取液可应用于保护干细胞, 如果是由于诱导细胞重编程, 将来可以考虑用鸡蛋白和全蛋提取液渗透各种细胞来诱导重编程。

在雌鼠体内存活的GFP阳性细胞中, 由鸡蛋白和全蛋提取液处理的脾细胞CD4阳性和CD8阳性T细胞高于其他提取液处理的组($P=0.019$)。目前, 还没有进一步的实验证明这些细胞是干细胞转化来的, 但可以说明鸡蛋白和全蛋提取液渗透的脾细胞含有较多有活性的CD4阳性和CD8阳性T细胞^[17]。

用蛋白、蛋黄和全蛋提取液透化处理脾细胞, 并回输雌鼠体内的研究目前还无人进行, 我们的研究表明, 蛋白和全蛋提取液透化后回输的脾细胞在雌鼠体内存活, 外周血中GFP阳性细胞百分比明显

比其他组高, 而回输的脾细胞还含有较多有活性的CD4阳性和CD8阳性T细胞, 另外, 移植后120 d, 不同组间骨髓中Y染色体阳性率有统计学差别, 因此推断鸡蛋白和全蛋提取液能维持脾细胞中的造血干细胞活性, 具体机制有待我们深入研究。

我们在研究中用到了红鳟鱼卵提取液, 研究结果表明, 用提取液渗透细胞的方法红鳟鱼卵提取液对维持脾细胞的功能活性没有明显作用, 但不知其他培养方法红鳟鱼卵提取液会不会有别的作用, 也需要更深入的实验来研究。而蛋白和全蛋提取液在渗透细胞后表现出来的维持脾细胞功能活性的作用, 使我们考虑今后将鸡蛋白和全蛋提取液用于各种细胞渗透处理, 并诱导细胞的干性维持, 无论是造血干细胞的功能维持, 还是多能干细胞的功能维持, 均显示了蛋白和全蛋提取液的优势。

参考文献 (References)

- Miyamoto K, Tsukiyama T, Yang Y, Li N, Minami N, Yamada M, *et al.* Cell-free extracts from mammalian oocytes partially induce nuclear reprogramming in somatic cells. *Biol Reprod* 2009; 80(5): 935-43.
- Alberio R, Johnson AD, Stick R, Campbell KH. Differential nuclear remodeling of mammalian somatic cells by *Xenopus laevis* oocyte and egg cytoplasm. *Exp Cell Res* 2005; 307(1): 131-41.
- Huang X, Cho S, Spangrude GJ. Hematopoietic stem cells: Generation and self-renewal. *Cell Death Differ* 2007; 14(11): 1851-9.
- Balic A, Mina M. Identification of secretory odontoblasts using DMP1-GFP transgenic mice. *Bone* 2010; 48(4): 927-37.
- Smeti I, Savary E, Capelle V, Hugnot JP, Uziel A, Zine A. Expression of candidate markers for stem/progenitor cells in the inner ears of developing and adult GFAP and nestin promoter-GFP transgenic mice. *Gene Expr Patterns* 2010; 11(1/2): 22-32.
- Takaishi S, Shibata W, Tomita H, Jin G, Yang X, Ericksen R, *et al.* *In vivo* analysis of mouse gastrin gene regulation in enhanced GFP-BAC transgenic mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 300(2): G334-44.
- Wilkosz S, Pullen N, de-Giorgio-Miller A, Ireland G, Herrick S. Cellular exchange in an endometriosis-adhesion model using GFP transgenic mice. *Gynecol Obstet Invest* 2011; 72(2): 90-7.
- Danilchick M, Peng HB, Kay BK. *Xenopus laevis*: Practical uses in cell and molecular biology. Pictorial collage of embryonic stages. *Methods Cell Biol* 1991; 36: 679-81.
- Lohka MJ, Masui Y. Formation *in vitro* of sperm pronuclei and mitotic chromosomes induced by amphibian ooplasmic components. *Science* 1983; 220(4598): 719-21.
- Leno GH. Cell-free systems to study chromatin remodeling. *Methods Cell Biol* 1998; 53: 497-515.
- Ulitzur N, Gruenbaum Y. Nuclear envelope assembly around sperm chromatin in cell-free preparations from *Drosophila* embryos. *FEBS Lett* 1989; 259(1): 113-6.
- Cameron LA, Poccia DL. *In vitro* development of the sea urchin male pronucleus. *Dev Biol* 1994; 162(2): 568-78.
- Iwao Y, Katagiri C. *In vitro* induction of sperm nucleus decondensation by cytosol from mature toad eggs. *J Exp Zool* 1984; 230(1): 115-24.
- Freberg CT, Dahl JA, Timoskainen S, Collas P. Epigenetic reprogramming of OCT4 and NANOG regulatory regions by embryonal carcinoma cell extract. *Mol Biol Cell* 2007; 18(5): 1543-53.
- Taranger CK, Noer A, Sørensen AL, Håkelién AM, Boquest AC, Collas P. Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Mol Biol Cell* 2005; 16(12): 5719-35.
- Hansis C, Barreto G, Maltry N, Niehrs C. Nuclear reprogramming of human somatic cells by xenopus egg extract requires BRG1. *Curr Biol* 2004; 14(16): 1475-80.
- Ning L, Goossens E, Geens M, van Saen D, van Riet I, He D, *et al.* Mouse spermatogonial stem cells obtain morphologic and functional characteristics of hematopoietic cells *in vivo*. *Hum Reprod* 2010; 25(12): 3101-9.
- Cho HJ, Lee CS, Kwon YW, Paek JS, Lee SH, Hur J, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult somatic cells by protein-based reprogramming without genetic manipulation. *Blood* 2010; 116(3): 386-95.