

无透明带核移植技术

胡军和 杨春荣 窦忠英*

(西北农林科技大学, 国家干细胞工程研究中心陕西分中心, 杨凌 712100)

摘要 近几年, 虽然体细胞核移植研究取得了巨大的成就, 但是基本上沿用 Willadsen 最初的方法——去核、注核、融合和激活。而且所获得的克隆动物往往会出现很多问题如器官发育异常等, 其中的原因不清。因此, 人们试图革新原有的核移植方法, 并建立了新的核移植方法——无透明带核移植法, 以期提高核移植的效率及解决核移植中存在的问题。现对无透明带核移植技术的两种方法——反向核移植法和手工核移植法以及单个胚胎培养系统进行介绍。

关键词 核移植; 无透明带卵; 反向克隆; 手工克隆

传统的核移植是在透明带完整的基础上进行的, 因为传统观点认为透明带对于核重新编程及胚胎的后续发育是必须的。利用传统方法进行核移植研究时, 需要昂贵的仪器设备, 同时要求操作者掌握熟练的技术, 从而限制了核移植研究, 特别是应用的发展。但是, 最近的研究表明透明带并非胚胎发育所必需^[1-3]。有学者发现无透明带的受精卵能发育至囊胚。Tatham 等^[4]尝试利用梯度离心对完全去除透明带的卵母细胞进行去核, 尽管结果不理想, 但这主要与此方法许多环节不完善有关。当时无透明带核移植有两大难题: (1) 附植前的分裂球彼此易分开; (2) 无透明带的胚胎在培养时易聚集, 而当时单个胚胎培养系统不成熟。近来, 由于克服了这两方面的问题, 无透明带核移植获得了很大的发展。Peura 等^[5]成功地对牛进行了无透明带的胚胎细胞核移植。Vajta 等^[6]成功应用此方法获得了体细胞核移植牛。值得注意的是 Vajta 等^[6]没有借助显微操作仪, 完全用手工方法进行无透明带卵核移植。与此同时, 单个胚胎培养系统获得了很大的发展, 如微穴法(well of the well, WOW)^[7]及 GO(the glass oviduct system)法, 其中 WOW 系统使培养的重构胚囊胚率达 50%。Peura 等^[8]建立了反向核移植法, 先注核后去核对绵羊进行了研究, 从而把核移植技术推到了一个新的高度。本文就目前几种不同的无透明带核移植方法——反向核移植和手工核移植及单个胚胎培养系统作一介绍。

1 反向核移植(克隆)

1.1 手工去核反向克隆

1.1.1 无透明带卵母细胞的准备 按常规的方法去除卵丘细胞, 选择出成熟的卵母细胞(以排出第一极体为标志)。然后, 把成熟的卵母细胞放入链霉蛋白酶(5 mg/ml)的操作液中, 直到透明带开始溶解(一般 5~15 min)。最后把无透明带的卵母细胞放入高浓度 BSA(防止彼此黏附)的培养液中, 备用。

1.1.2 卵母细胞与供核细胞的黏附 把一批无透明带卵母细胞(1~10 个)转入 2 mg/ml 植物血凝素(PHA)液中, 然后再把供核细胞移入此液中。接着每次把一个卵母细胞在一个合适的供核细胞上滚动使得彼此黏附在一起。最后把卵母细胞-供核细胞复合体转入另外的操作液中。重复上述过程, 直至一批卵母细胞操作完成。

1.1.3 融合 先把卵母细胞-供核细胞复合体转入融合槽中, 然后采用合适的参数进行电融合。但是, 无透明带的重构胚与有透明带重构胚相比, 其融合的电电压要低。具体的参数因动物而异。

1.1.4 手工去核 把已融合好的卵母细胞转入含有 CB(细胞松弛素 B)的液滴中, 尽量使得它们排成一条直线。在倒置显微镜高倍下, 用特殊的切割玻璃针滚动卵母细胞, 当极体处于 11 点位置时用切割玻璃针在卵母细胞正上方固定卵母细胞(图 1A)。然后水平滚动卵母细胞使极体处于 9 点位置, 此时快

收稿日期: 2004-09-27 接受日期: 2004-12-02

国家重点基础研究发展规划项目(973 计划)(No.G19990543301)和国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(No.2002AA216161)资助

* 通讯作者。Tel: 029-87012124, Fax: 029-87092599, E-mail: douzhongying@china.com

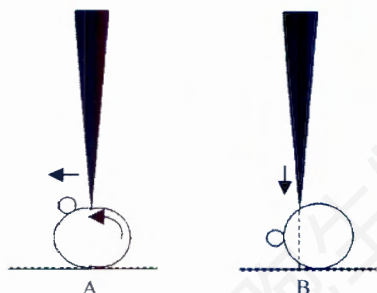


图1 手工去核^[9]
(A)固定；(B)去核。

速用切割玻璃针垂直向下切割，从而把第一极体及周围少量胞质切掉(图1B)。然后把切掉的部分转入另外液滴(预先 Hoechst33342 温育)中，并在 UV 下照射确认去核是否成功。

1.1.5 激活 采用常规的方法。

1.2 借助显微操作仪反向克隆

无透明带卵母细胞的准备、卵母细胞与供核细胞的黏附、融合与前相同。

1.2.1 去核 首先把卵母细胞在CB/Hoechst33342液滴中温育 3~5 min，然后转入去核操作液滴中。

(1) 用一根钝的去核针进行去核

(a) 用去核针滚动卵母细胞使第一极体固定于3点位置(图2A)；

(b) 用去核针吸取第一极体及附近少部分胞质，同时快速运动使载物台与母细胞分离(图2B)；

(c) 在 UV 下照射，观察去核针内的物质，从而确认去核是否成功。

(2) 用分离针和去核针进行去核

(a) 用分离针配合去核针使卵母细胞的第一极体与去核针接近并处于同一平面(图3A)；

(b) 在 UV 照射下用去核针吸取第一极体及附近少部分胞质(图3B)；

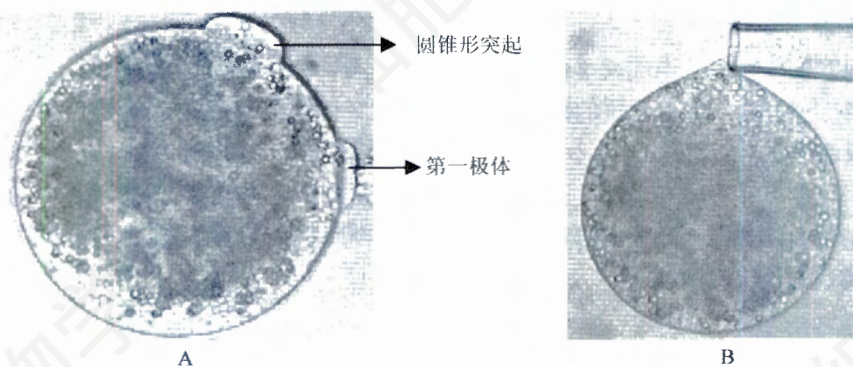


图2 钝性去核管去核^[9]
(A)固定；(B)去核。

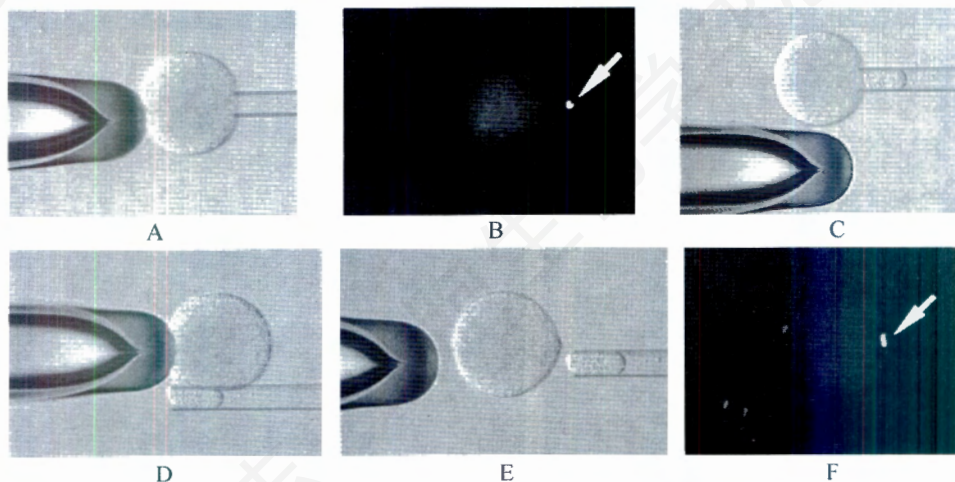


图3 分离针和去核针去核^[10-11]
(A)固定；(B)去核；(C)移动分离针；(D)两针摩擦；(E)两针分离；(F)确认去核。

(c)然后直向前移行分离针至卵母细胞正下方(图3C);

(d)把去核针在分离针上轻轻向前摩擦使得卵母细胞将要与去核针分离(图3D);

(e)去核针与卵母细胞完全分离(图3E);

(f)同时在UV下照射并观察去核针, 确认去核是否成功(图3F)。

1.2.3 激活 采用常规的方法。

2 手工核移植(克隆)

2.1 胞质受体的准备

如前所述方法去除卵母细胞的卵丘细胞, 不一定只选择成熟的卵母细胞, 只丢弃那些质量差的卵母细胞, 同时用链霉蛋白酶处理去除透明带。接着把卵母细胞放入切割操作的平皿中, 并尽量位列于平皿的中央(图4A), 然后用胚胎分割刀随机切割卵母细胞, 切成两半(图4B)。

2.2 胞质受体的选择

用Hoechst33342温育那些已切成两半的卵母细胞。然后在UV照射下观察, 选择无核的那半卵母细胞转入另外的液滴中, 备用。

2.3 配对和融合

2.3.1 配对 选择好无核的一批半卵母细胞胞质体和供核细胞分别放在不同的液滴中。

2.3.2 融合 (1)第1次黏附。把半个胞质体在PHA滴中处理(一般3~5 s), 然后取出在供核细胞液滴中的一个供核细胞上侧滚动使之彼此黏附在一起。当一批黏附一完成, 立即转入融合槽进行第2次融合(图4C)。(2)第2次黏附及融合。把一批(10~20个)剩余或未黏附的半卵母细胞胞质体转入融合槽, 并排列在融合槽的一边(如远离操作者); 同时把同数量的半卵母细胞胞质体-供核细胞复合体移入融合槽, 并排列在融合槽的另一边(如靠近操作者)。然后按半卵母细胞胞质体与半卵母细胞胞质体-供核细胞复合体配对并排列在融合槽中间, 接着选择合适的电融合参数进行融合。最后, 把融合好的胞质体-供核细胞复合体移入操作液中(图4D)。

2.4 激活

采用合适的化学方法和电刺激方法进行激活。然后, 进行胚胎的体外培养。

3 单个胚胎培养系统

传统核移植方法中透明带完整的重构胚的培养可以群组的方式进行培养, 但是无透明带卵核移植后却要求重构胚必须进行单个培养。因此单个胚胎培养系统的完善将推动无透明带卵核移植技术的发展。

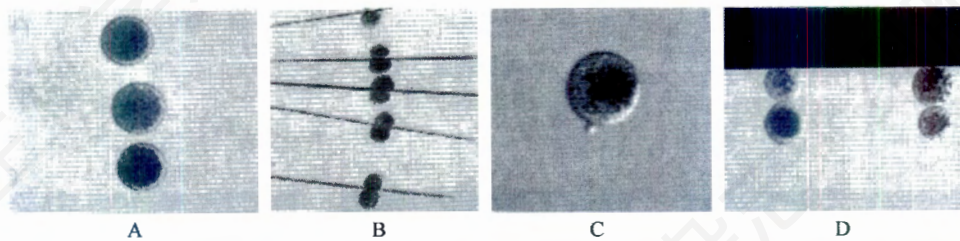


图4 手工核移植^[6]

(A)待操作卵母细胞; (B)切割; (C)第1次黏附; (D)第2次黏附及融合。

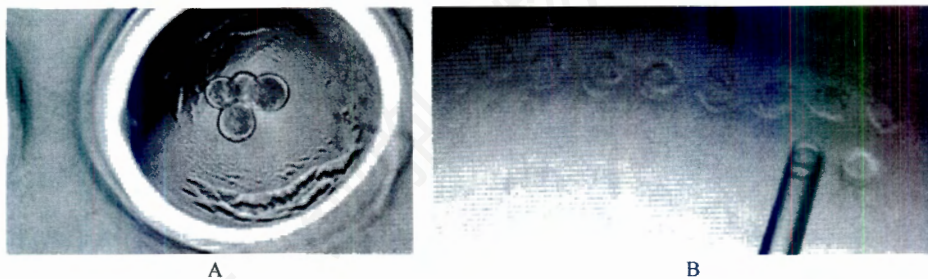


图5 单个胚胎培养系统^[9]

(A)微穴法培养; (B)明胶-孔培养。

3.1 微滴培养

用胚胎培养液在培养皿上作好 5~20 μl (以下同)的微滴,但是胚胎培养液中蛋白质的浓度必须比较高(如 20 mg/ml BSA 或 20%FCS),防止胚胎彼此黏附。同时,上面覆盖石蜡油防止挥发。

3.2 微穴法培养系统

在倒置显微镜下,在四孔板的一个孔中用加热的铁针来回运动并且适当用力作好一些小孔(如 24 个或 36 个),并且在使用前冲洗和消毒。在使用时在此孔中加入培养液(400~600 μl),再在上面覆盖上石蜡油。最后,在每个小孔中放入一个重构胚(图 5A)。

3.3 明胶-孔系统

用胚胎培养液(无 BSA 和氨基酸)溶解明胶,使明胶浓度为 1%。然后在四孔板的一个孔中铺上一层明胶,接着在孔中放入胚胎培养液 400~600 μl ,并在上面覆盖上石蜡油。用直径为 50~100 μm 的塑料小管在明胶上作好一排排的小孔(图 5B)。最后,每个小孔中放入一个胚胎。

4 讨论

4.1 无透明带卵母细胞及胚胎的黏附

无透明带的卵母细胞容易黏附在器皿的表面,如平皿、去核针管,同时彼此易相互黏附。这个问题尤其在无蛋白质溶液中显得更为明显(如 PHA 溶液)。因此必须操作快,同时在其他环节操作时可以摇动平皿防止黏附;另外,可以使用高浓度蛋白质的溶液进行操作和培养(如 20%FCS 或 20 mg/ml BSA),从而防止黏附。

4.2 透明带消化的时间

为了去除透明带, Wells 等^[12]用机械去除方法、细胞溶解方法及用链霉菌蛋白酶处理进行了尝试。尽管用酶消化可能对胞膜造成损伤,但是可以通过添加血清的方法来抵消这种损伤。同时由于用酶处理一次可以大批量的进行,从而可节省大量的时间。在进行透明带消化时,必须掌握好消化的时间,否则会造成对卵母细胞的损害。一般当透明带开始变薄时即可(一般 5~15 min)。同时,应该注意链霉菌蛋白酶的浓度。

4.3 反向核移植中融合判定和去核的时间

一般融合判定应该在融合后立即进行。因为观察过晚,在反向核移植中融合的供核细胞临近的地方会形成圆锥形的突起(图 2A),这样就可能难于判

定融合是否成功。在反向核移植中去核的时间很重要,因为如果去核过晚则染色体可能形成早期原核。这样去除第一极体及附近的少部分胞质就不足以去除卵母细胞的核遗传物质。而不同动物其早期原核形成的时间不一样,因此其去核的时间也就不一样。

4.4 单个胚胎培养系统

许多研究者^[13~15]已证明在体外以多个胚胎一起培养的方式有利于附植前胚胎的发育,他们认为这种方式有利于胚胎分泌许多因子如胰岛素、类胰岛素 I 和 II 及 bEGF 等^[16]。但是,在实际应用中需要以少量或单个方式进行胚胎的培养(如可获得卵母细胞少的动物的研究),另外多个胚胎一起培养的方式有可能受到未受精胚胎或退化及死亡胚胎的不利影响^[17]。目前常用的单个胚胎培养方法有微滴培养、微穴法(WOW)及明胶孔方法。由于微滴培养中上层油的覆盖使培养液接触面扩大,使培养液中物质成分的高度扩散,这样就造成不利于胚胎发育的环境。另外,也可能使许多胚胎代谢的产物浓度很高。而微穴法(WOW)及明胶孔方法由于其应用方便及微环境稳定等优点被广泛应用于单个胚胎的培养。

总之,无透明带核移植与传统核移植相比,不仅不需要昂贵的仪器设备,而且其工作强度和操作技术难度也降低了许多。同时,无透明带核移植有独特的优势如进行胚胎嵌合的研究^[18]。在最近几年,无透明带核移植技术已获得了很大的发展。但是,目前通过此方法得到克隆动物还不多,只有牛^[19]的成功报道,但是在其他动物如猪^[20]、绵羊^[8]现在也展开了研究,并且取得了一定进展。总之,无透明带核移植由于其独到的优势,在不久的将来一定会受到广大研究者的关注,大大促进核移植领域的发展。

参考文献 (References)

- [1] Bronson RA et al. *J Reprod Fertil*, 1970, **22**: 129
- [2] Modlinski JA. *J Embryo Exp Morphol*, 1970, **23**: 539
- [3] Trounson AO et al. *J Reprod Fertil*, 1974, **41**: 97
- [4] Tatham BG et al. *Biol Reprod*, 1995, **53**: 1088
- [5] Peura TT et al. *Mol Reprod Dev*, 1998, **50**: 185
- [6] Vajta G et al. *Cloning*, 2001, **3**: 89
- [7] Vajta G et al. *Mol Reprod Dev*, 2000, **55**: 256
- [8] Peura TT. *Cloning Stem Cells*, 2003, **5**: 13
- [9] Peura TT et al. *Cloning Stem Cells*, 2003, **4**: 257
- [10] Oback B et al. *Cloning Stem Cells*, 2003, **5**: 243
- [11] Oback B et al. *Cloning Stem Cells*, 2003, **5**: 3
- [12] Wells KD et al. *Cloning*, 2000, **2**: 9

- [13] Wiley LM *et al. Fertil Steril*, 1986, **45**: 111
[14] Kato Y *et al. Theriogenology*, 1994, **41**: 1315
[15] Hendriksen PJM *et al. Theriogenology*, 1999, **51**: 319
[16] Donnay I *et al. Theriogenology*, 1997, **47**: 1549
[17] Jones GM *et al. Hum Reprod*, 1998, **13**: 169
[18] Nagy A *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 8424
[19] Tecirlioglu RT *et al. Reprod Fert Dev*, 2003, **15**: 361
[20] Booth PJ *et al. Cloning Stem Cells*, 2001, **3**: 191

Nuclear Transfer Using Zona-free Oocytes

Jun-He Hu, Chun-Rong Yang, Zhong-Ying Dou*

(Shaanxi Province Branch Center of National Stem Cell Engineering & Technology Center,
Northwest Sci-tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

Abstract Although somatic nuclear transfer (NT) achieved a lot of progress in recent years, the ways of NT was still the same to the Willadsen's method: enucleation, injection, fusion and activation. Cloning animals showed many problems such as abnormally developing organs, but the reason was unclear. Therefore, it is necessary to innovate the ways of NT. A novel NT method that employing zona-free oocyte has been developed in order to improve the efficiency and solve existed problems of NT. This paper introduces two methods of zona-free NT: the reverse cloning and handmade cloning as well as the single embryo culture system.

Key words nuclear transfer (NT); zona-free oocyte; reverse cloning; handmade cloning

Received: September 27, 2004 Accepted: December 2, 2004

This work was supported by the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No.G19990543301) and the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No.2002AA216161)

*Corresponding author. Tel: 86-29-79012124, Fax: 86-29-87092559, E-mail:douzhongying@china.com