

# 牛卵母细胞孤雌激活及马-牛异质克隆胚构建

刘春霞<sup>1</sup> 王文龙<sup>2</sup> 周欢敏<sup>1\*</sup>(内蒙古农业大学,<sup>1</sup>生物工程学院,<sup>2</sup>动物科学与医学学院,呼和浩特 010018)

**摘要** 首先用不同的激活剂孤雌激活体外成熟培养的牛卵母细胞,经试验获得:离子霉素、A23187和7%乙醇联合6-DMAP可有效地激活牛卵母细胞,并支持其发育到囊胚,但离子霉素激活效率显著优于其他两种( $P < 0.05$ );以10%FBS+SOFAa+颗粒细胞为发育体系培养激活的成熟牛卵母细胞可得到较高的卵裂率和囊胚率(72.30%, 14.91%)。其次,通过体外培养成年马皮肤成纤维细胞,将获得的成纤维细胞经血清饥饿培养后,作为核供体移入去核牛卵母细胞透明带下,电融合后,能得到融合的马牛重构胚,在交流电脉冲起始电压20 V,持续时间10 s,频率0.2 MHz,结束电压15 V,2次脉冲和融合间隔为0.125 s的条件下,当融合电压为2.0 kV/cm,脉冲时程为40  $\mu$ s时,重组胚的融合率和卵裂率最高(52.27%, 71.74%)。

**关键词** 成纤维细胞; 体外培养; 核移植; 马; 牛

体细胞克隆绵羊“多莉”的诞生,表明已分化的哺乳动物体细胞可在去核卵母细胞中去分化并恢复全能性<sup>[1]</sup>。目前,体细胞克隆已在绵羊<sup>[1]</sup>、小鼠<sup>[2]</sup>、牛<sup>[3,4]</sup>、山羊<sup>[5]</sup>、猪<sup>[6]</sup>、猫<sup>[7]</sup>、骡子<sup>[8]</sup>、马<sup>[9]</sup>和大鼠<sup>[10]</sup>等动物上获得成功,但异种间核移植较少,主要问题是核质供体组合的选择及核质相互作用还不清楚。但已有成功的例子,如印度野牛<sup>[11]</sup>、欧洲盘羊<sup>[12]</sup>。已有研究者用来自同品种的两匹马的皮肤成纤维细胞与牛卵母细胞构建克隆胚,卵裂胚最多发育到8~16细胞期,胚胎移植后无一妊娠<sup>[13]</sup>。目前,马皮肤成纤维细胞与牛卵母细胞构建克隆胚在国内还未见报道,本研究用马皮肤成纤维细胞与牛卵母细胞构建重组胚,为进一步明确牛卵母细胞胞质是否是马供体细胞的合适受体提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供体细胞培养

无菌方法采集一小块蒙古马耳部皮肤,用含抗生素的PBS洗涤3次,置于75%酒精中浸泡约1 min后,在10%NCS的DMEM(Gibco)液中剪碎,接种于25 ml卡式培养瓶内,置于5%CO<sub>2</sub>、37℃、饱和湿度的CO<sub>2</sub>培养箱中培养。当培养的细胞生长铺满瓶底时,用含0.25%胰蛋白酶(Gibco)和0.02% EDTA的D-Hanks消化5 min(37℃),吸管吹打悬浮细胞,离心稀释后接种于培养瓶中传代培养,如

此反复传3代以后,能够得到纯化的成纤维细胞,将细胞悬浮在冻存液(含20%NCS,10%DMSO,10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup>个/ml)中,接种于冻存管后,-20℃平衡2 h,-70℃过夜,次日投入液氮长期保存。解冻细胞接种于24孔培养板培养,细胞贴壁后,用含0.5%NCS的DMEM液饥饿培养3~7天后(图1a)用于核移植。

### 1.2 受体牛卵母细胞的准备及去核

从呼和浩特市回民屠宰场采集牛卵巢,置于25~30℃含硫酸庆大霉素的灭菌生理盐水中,1 h内运回实验室。用带12#针头的10 ml注射器吸取卵巢表面2~5 mm大小的卵泡,体视显微镜下收集卵泡液中的卵丘-卵母细胞复合体(cumulus oocyte complexes, COCs),置于TCM199(Gibco)成熟液(添加2.86 × 10<sup>-7</sup> mol/L FSH, 6.67 × 10<sup>-7</sup> mol/L LH, 5.51 × 10<sup>-6</sup> mol/L 17- $\beta$ E<sub>2</sub>, 激素均为国产)中,38.5℃、5%CO<sub>2</sub>和饱和湿度的CO<sub>2</sub>培养箱中培养20~24 h。将培养后的COCs置于含0.2%透明质酸酶的H-M199(Sigma)中,吸管吹打去掉卵丘细胞。

选择成熟的卵母细胞,分别置入含5 mmol/L离子霉素(inomycin, Sigma)、5 mmol/L A23187(Sigma)和7%乙醇的H-M199中激活5 min,移入含2 mmol/L

收稿日期:2005-10-08 接受日期:2006-08-28

教育部骨干教师资助计划项目(99-6)

\*通讯作者。Tel/Fax: 0471-4309242, E-mail: huanminzhou@263.net

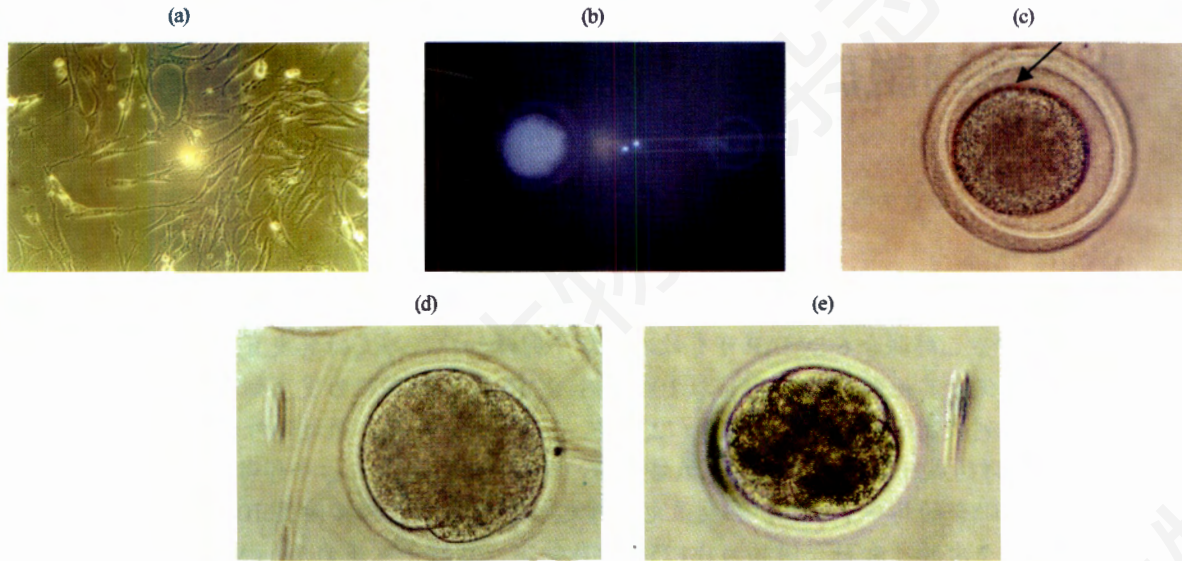


图1 马-牛克隆胚构建图

a: 饥饿后3天的成纤维细胞(200×); b: 荧光显微镜下去核检查(100×); c: 电融合后的重组胚(400×); d: 2-细胞期重组胚(400×); e: 4-细胞期重组胚(400×)

6-DMAP(Sigma)的SOF培养液中, 38.5℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下培养4h后, 转入发育培养液中培养, 48h检查卵裂率。然后将卵裂胚移入以贴壁颗粒细胞为滋养层的SOFaa培养液(含10%FBS)中共培养, 9天后检查囊胚率。

将成熟卵母细胞于含7.5 μg/ml细胞松弛素B(Sigma)和5 μg/ml Hoechst33342(Sigma)的培养液中静置15 min, 用内径20 μm的去核针吸去成熟卵第一极体, 核及其周围胞质, 荧光显微镜下检查去核情况(图1b), 选取去核完全的卵母细胞用于核移植。

### 1.3 核移植与融合

去核完成后, 用同一根去核针将体细胞注射到卵周隙中, 并使其与细胞膜紧密接触, 用PA4000环形电极融合仪进行电融合。将待融合的核移植胚移入融合液(含0.3 mol/L甘露醇、0.5 mmol/L HEPES、0.05 mmol/L CaCl<sub>2</sub>、0.1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>和0.05% BSA)平衡5 min后, 转入极间距为0.25 mm的融合槽中, 在交流电脉冲起始电压为20 V, 持续时间10 s, 频率0.2 MHz, 脉冲2次, 结束电压15 V和融合电压间隔为0.125 s的条件下, 设定融合电压分别为1.7、2.0和2.3 KV/cm, 脉冲时间分别为60、40和20 μs后进行电融合。融合完毕后转入10%FBS的H-M199微滴中, 放回培养箱恢复30 min, 显微镜下检查融合结果。

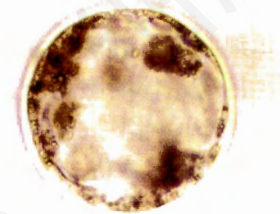


图2 牛卵母细胞孤雌激活囊胚(400×)

### 1.4 重组胚的激活及体外培养

将融合胚经离子霉素-DMAP激活后(方法同上面的孤雌激活), 置于38.5℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的CO<sub>2</sub>培养箱中进行培养。每隔3天换50%体积的新鲜培养液。

## 2 结果

### 2.1 激活剂对牛卵母细胞孤雌激活的影响

用离子霉素、A23187和7%乙醇联合6-DMAP激活成熟牛卵母细胞, 放入10%FBS+SOFaa+颗粒细胞的体系中培养, 结果表明, 48h卵裂率和9天囊胚率都以离子霉素组最高(72.30%, 14.91%)(表1)。孤雌激活后囊胚发育见图2。

### 2.2 发育体系对牛卵母细胞孤雌激活的影响

成熟牛卵母细胞经离子霉素-DMAP激活后,

表1 不同激活剂对牛卵母细胞孤雌激活及发育的影响

激活剂	卵裂率(%)	囊胚率(%)
离子霉素	72.30(684/946) <sup>a</sup>	14.91(102/684) <sup>a</sup>
A23187	65.33(196/300) <sup>b</sup>	12.44(24/196) <sup>b</sup>
7% 乙醇	60.01(125/208) <sup>c</sup>	7.20(9/125) <sup>c</sup>

卡方检验, a 和 c, a 和 b, a' 和 c' 之间差异显著( $P<0.05$ ); b 和 c, a' 和 b', b' 和 c' 之间差异不显著( $P>0.05$ )。

表2 发育体系对牛卵母细胞孤雌激活及发育的影响

发育体系	卵裂率(%)	囊胚率(%)
10%FBS+SOFAa+ 颗粒细胞	72.30 (684/946) <sup>a</sup>	14.91 (102/684) <sup>a</sup>
5%FBS+SOFAa+ 颗粒细胞	70.00 (42/60) <sup>b</sup>	14.29 (6/42) <sup>b</sup>
5%FBS+SOFAa	60.00 (36/60) <sup>c</sup>	0
SOFAa+ 颗粒细胞	68.75 (33/48) <sup>d</sup>	9.09 (3/33) <sup>d</sup>
SOFAa	35.71 (15/42) <sup>e</sup>	0

卡方检验, a, b 和 d, a', b' 和 d' 之间差异不显著( $P>0.05$ ); b 和 c, d 和 e 之间差异极显著( $P<0.01$ )。

分别放入 5 个不同发育体系中培养。结果表明, 48 h 后卵裂率在含颗粒细胞的 3 个组间差异不显著( $P>0.05$ ), 在含 5%FBS 和不含 5%FBS 的两组中, 添加颗粒细胞组的卵裂率极显著地高于不添加颗粒细胞的( $P<0.01$ )。9 天后囊胚率在添加颗粒细胞的 3 组间差异不显著( $P>0.05$ ), 在不加颗粒细胞的两组中, 均无囊胚产生。以 10%FBS+SOFAa+ 颗粒细胞组的卵裂率和囊胚率最高, 分别为 72.30% 和 14.91% (表 2)。

### 2.3 电融合参数对重组胚融合率及胚胎发育的影响

当融合电压为 2.0 kV/cm, 脉冲时程为 40  $\mu$ s 时, 重组胚(图 1c)的融合率极显著高于融合电压为 1.7 kV/cm, 脉冲时程为 60  $\mu$ s 组( $P<0.01$ )。融合胚经离子霉素-6-DMAP 激活后培养, 48 h 后卵裂(图 1d, 1e)率以融合电压为 2.0 kV/cm, 脉冲时程为 40  $\mu$ s 组的最高(71.74%), 而融合电压为 2.3 kV/cm、脉冲时程为 20  $\mu$ s 组与其他两组间无显著差异( $P>0.05$ )(表 3)。

## 3 讨论

### 3.1 卵母细胞的激活

目前常用的人工激活方法有物理激活和化学激活。乙醇是发现较早的一种能够有效激活大多数哺乳动物卵母细胞的化学激活剂<sup>[14]</sup>, 可以激活许多动物的卵母细胞, 虽然乙醇激活无种间特异性, 但有些哺乳动物卵母细胞对乙醇刺激不敏感, 如用

表3 电融合参数对重组胚的影响

融合电压(KV/cm)	脉冲时程( $\mu$ s)	融合率(%)	卵裂率(%)
1.7	60	29.79 (14/47) <sup>a</sup>	35.71 (5/14) <sup>a</sup>
2.0	40	52.27 (46/88) <sup>b</sup>	71.74 (33/46) <sup>b</sup>
2.3	20	48.89 (22/45) <sup>c</sup>	59.09 (13/22) <sup>c</sup>

卡方检验, a 和 b, a' 和 b' 之间差异极显著( $P<0.01$ ); a 和 c, b 和 c, a' 和 c' 之间差异不显著( $P>0.05$ ); b' 和 c' 之间差异显著( $P<0.05$ )。

7%~20% 的乙醇不能激活兔<sup>[15]</sup>卵母细胞。A23187 能够有效地激活 ICSI 后受精失败的卵母细胞恢复受精并继续发育成胚胎<sup>[16]</sup>。单独用离子霉素虽能激活卵母细胞, 但以此激活的卵母细胞无原核形成。当离子霉素和 6-DMAP 联合使用能使卵母细胞激活后囊胚发育率提高<sup>[17]</sup>, 本研究也得到相似的结论。

在培养液中添加颗粒细胞能使胚胎在更接近于体内环境条件下发育。将山羊体外受精卵同山羊颗粒细胞单层共培养, 能获得 22.2% 的卵裂率<sup>[18]</sup>。将牛胚与颗粒细胞单层共培养, 发育至可用胚的百分率可达 22.73%<sup>[19]</sup>。本试验将成熟牛卵母细胞用离子霉素-6-DMAP 激活后, 分别置于 5 个发育体系中培养。结果卵裂率和囊胚率以添加颗粒细胞的 3 个组高于不加颗粒细胞的两个组, 说明培养液中添加颗粒细胞也可以促进马牛异质克隆胚胎的发育。

### 3.2 重组胚的融合

本研究中通过 3 个融合组的比较可以看出, 直流脉冲电压为 2.0 kV/cm, 脉冲时程为 40  $\mu$ s 时, 融合率和卵裂率最高(52.27% 和 71.74%)。融合电压降低时, 所产生的瞬间高压不足以使磷脂双层产生电微孔, 随着融合电压的增高, 卵母细胞的融合率升高, 但当高达 2.3 kV/cm 时, 脉冲时程为 20  $\mu$ s 时, 融合率又有所下降。这就说明, 当融合电压过大时, 细胞膜可能形成较大的孔道而发生不可逆性破裂, 高的融合电压会对卵母细胞产生损伤作用。该研究结果与在兔<sup>[20]</sup>、猪<sup>[21]</sup>上的结果相似, 只是在最佳融合电压的选取上略有不同。将牛卵母细胞质与马皮肤成纤维细胞融合的成功率远低于牛胎儿成纤维细胞或卵裂球与牛卵母细胞的融合率, 这可能与两种动物细胞膜的差异有关系或与马皮肤成纤维细胞及牛卵母细胞的体积比有关。

用去核的牛卵母细胞为受体, 与牛、绵羊、猪、猴子及大鼠等动物的体细胞构建克隆胚, 经体外培养均能发育到囊胚期<sup>[4]</sup>。将藏绵羊皮肤成纤维细胞<sup>[22]</sup>、人的体细胞<sup>[23]</sup>、野牛体细胞<sup>[24]</sup>等与牛去核卵母细胞融合激活后也能发育到囊胚期。上述实验

有力说明牛的卵母细胞可以与多种动物体细胞构建重组胚。本研究以马体细胞与牛卵母细胞构建克隆胚, 有个别克隆胚能够发育到 8- 细胞期, 这一结果与 Sansinena 等<sup>[13]</sup>在马上结果相似。

还有报道, 重组胚囊胚率以胞质注射法高于带下注射结合电融合法<sup>[10]</sup>。本试验采用后一种方法得到 71.74% 的卵裂率, 但尚无囊胚产生, 如改用胞质内直接注射是否会提高马牛克隆胚的卵裂率或囊胚率, 有待于进一步的研究。

总之, 马皮肤成纤维细胞可以与牛的卵母细胞构建克隆胚。在此发育过程中, 马的细胞核与牛卵母细胞质相容, 协同进行细胞分裂。

### 参考文献 (References)

- [1] Wilmut I *et al. Nature*, 1997, **385**: 810
- [2] Wakayama T *et al. Nature*, 1998, **394**: 369
- [3] Kato Y *et al. Science*, 1998, **282**: 2095
- [4] Wells DN *et al. Biol Reprod*, 1999, **60**: 996
- [5] Baguisi A *et al. Nat Biotechnol*, 1999, **17**:456
- [6] Onishi A *et al. Science*, 2000, **289**: 1188
- [7] Shin T *et al. Nature*, 2002, **415**: 859
- [8] Woods GL *et al. Science*, 2003, **301**:1063
- [9] Galli C *et al. Nature*, 2003, **424**: 635
- [10] Zhou Q *et al. Science*, 2003, **302**: 1179
- [11] Vogel G. *Science*, 2001, **291**: 409
- [12] Loi P *et al. Nat Biotechnol*, 2001, **19**: 962
- [13] Sansinena MJ *et al. Theriogenology*, 2002, **58**: 775
- [14] Cuthbertson KS *et al. Nature*, 1981, **294**: 754
- [15] Onodera M *et al. Gamete Res*, 1989, **22**: 277
- [16] 舒益民等. *生殖医学杂志*, 2002, **11**: 145
- [17] 李雪峰等. *实验生物学报*, 2002, **35**: 239
- [18] 徐照学等. *中国兽医学报*, 1998, **18**: 506
- [19] 陈小武等. *中国奶牛*, 1996, (6): 27
- [20] 刘 林. *北京农业大学博士学位论文*, 1993
- [21] 陈乃清等. *中国兽医学报*, 1996, **16**: 613
- [22] White KL *et al. Cloning*, 1999, **1**: 47
- [23] Lanza RP *et al. Nat Med*, 1999, **5**: 975
- [24] Lanza RP *et al. Cloning*, 2000, **2**: 79

## Parthenogenetic Activation of Bovine Oocytes and Heterogeneous Embryo Reconstruction by Horse Skin Fibroblasts and Bovine Oocytes

Chun-Xia Liu<sup>1</sup>, Wen-Long Wang<sup>2</sup>, Huan-Min Zhou<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Biotechnology, <sup>2</sup>College of Animal Science and Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China)

**Abstract** Firstly, *in vitro* matured bovine oocytes were activated by three different activators. The results showed that matured bovine oocytes were efficiently activated by Inomycin, A23187 and 7% ethanol alone followed by 6-DMAP, respectively, and developed to blastocyst phase, but the cleavage rate and the blastocyst rate of matured bovine oocytes activated by inomycin-6-DMAP were significantly higher than those of matured bovine oocytes activated by the two others ( $P<0.05$ ); When the activated oocytes were cultured in SOFaa added with 10% FBS and cumulus, a higher cleavage rate and blastocyst rate were achieved (72.30%, 14.91%). Secondly, horse skin fibroblasts were cultured *in vitro* and induced to quiescence stage ( $G_0$  phase) by serum starvation culture. The cells were injected into enucleated bovine oocytes and the reconstructed heterogeneous embryos could be obtained. The cell fusion was induced by 2.0 kV/cm for 40  $\mu$ s under the condition of 20 V start-voltage, 10 s duration, 0.2 MHz frequency, 15 V end-voltage and an interval of 0.125 s, fusion rate and cleavage rate of reconstructed embryos reached the peak values (52.27%, 71.74%).

**Key words** fibroblast; *in vitro* culture; nuclear transfer; horse; bovine

Received: October 8, 2005 Accepted: August 28, 2006

This work was supported by the Main Teacher Program of Ministry of Education (99-6)

\*Corresponding author. Tel/Fax: 86-471-4309242, E-mail: huanminzhou@263.net