

盘羊供体细胞对异种核移植效率的影响

潘晓燕¹, 杨梅², 张寒莹¹, 王正朝¹, 汪立琴², 陈童², 郭志勤², 王锋¹

(¹南京农业大学动物胚胎工程技术中心, 南京 210095; ²新疆维吾尔自治区畜牧科学院/农业部家畜繁育生物技术重点开放实验室, 乌鲁木齐 830000)

摘要: 【目的】利用核移植技术生产异种重构胚, 研究供体细胞对异种核移植效率的影响。【方法】以新疆盘羊和绵羊耳皮肤组织建立成纤维细胞系, 进行细胞遗传学分析; 以来自不同个体、不同代次、不同汇合度和不同保存方式的盘羊成纤维细胞为核供体, 当地绵羊卵母细胞为受体, 进行异种重构胚的构建。【结果】来自 3 只盘羊耳皮肤成纤维细胞的异种重构胚的卵裂率与囊胚率均无显著差异; 采用 10 代以内的细胞作为核供体, 细胞代次不会影响重构胚的发育率; 生长到 70%~80% 汇合的供体细胞重构胚的囊胚率显著高于刚完全汇合组和汇合 2~4 d 组; 将供体细胞 4℃ 保存 2 d, 虽降低了卵裂率, 但囊胚率没有受到显著影响; 盘羊的染色体数目为 $2n=56$, 核型式为 $4(M)+50(T), XY(T, M)$; 绵羊的染色体数目为 $2n=54$, 核型式为 $6(M)+46(T), XY(T, M)$ 。【结论】利用本试验中的 3 只盘羊耳成纤维细胞, 培养到 10 代以内、70%~80% 汇合后用于构建异种重构胚, 能得到较高的早期胚胎发育率。

关键词: 盘羊; 体细胞核移植; 成纤维细胞; 染色体核型; 胚胎发育

Effects of Argali (*Ovis ammon*) Donor Cells on Interspecies Nuclear Transfer

PAN Xiao-yan¹, YANG Mei², ZHANG Han-ying¹, WANG Zheng-chao¹, WANG Li-qin², CHEN Tong², GUO Zhi-qin², WANG Feng¹

(¹Center of Animal Embryo Engineering and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095; ²Key Laboratory of Animal & Veterinary Biotechnology of Ministry of Agriculture, Animal Science Academy of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830000)

Abstract: 【Objective】 The aim of this study was to investigate the effect of passage number, confluency and storage method of argali (*Ovis ammon*) fibroblasts from different individuals on development of embryos. 【Method】 The embryos were reconstructed by interspecies nuclear transfer using local ovine oocyte cytoplasm. Fibroblasts were derived from skin of adult argali sheeps' ear in Xinjiang while they were analyzed by chromosome karyotype. 【Result】 There was no difference in the cleavage rate and blastocyst rate among three the argali sheep. The passage number of fibroblast cells within 10 passages didn't affect the development rate of reconstructed embryos; The blastocyst rate, which was produced using 70%-80% confluent fibroblast cells, was higher than those using full-confluency cells on 0 d and 2-4 d. The cleavage rate of embryos reconstructed using donor cells stored for 2 days at 4℃ was lower than that using donor cells from control group ($P<0.05$), but no difference was found in the proportion of blastocysts in total embryos. Chromosome number of argali (*Ovis ammon*) and local sheep is 56 and 54, respectively, and the karyotype formula is $4(M)+50(T), XY(T, M)$ and $6(M)+46(T), XY(T, M)$, respectively. 【Conclusion】 The embryos, which were reconstructed by interspecies nuclear transfer using 70%-80% confluent fibroblasts within 10 passages from three argali sheep in Xinjiang, had higher development competence.

Key words: Argali (*Ovis ammon*); Somatic nuclear transfer; Fibroblast cells; Chromosome karyotype; Embryo development

收稿日期: 2007-06-07; 接受日期: 2008-02-27

基金项目: 新疆维吾尔自治区科学研究和技术开发攻关项目 (200631109)

作者简介: 潘晓燕 (1979-), 女, 山东烟台人, 博士研究生, 研究方向为动物胚胎工程。E-mail: pxy19790105@163.com。通讯作者王 锋 (1963-), 男, 陕西彬县人, 教授, 研究方向为动物胚胎工程。E-mail: caeet@njau.edu.cn。通讯作者郭志勤 (1936-), 男, 浙江杭州人, 研究员, 研究方向为家畜育种与家畜胚胎工程技术。E-mail: abt.guo@vip.sina.com

0 引言

【研究意义】盘羊是中国二级珍稀保护动物, 栖息于海拔 3 000~6 000 m 的高山裸岩地带, 主要分布于新疆、青海、甘肃、西藏、四川、内蒙古, 长期的过度猎杀造成盘羊濒临灭绝。本研究试图通过异种核移植技术来保护这种濒危动物。【前人研究进展】2001 年, Advanced Cell Technology (ACT) 公司利用南亚濒危野生牛 Gaur 的体细胞与家牛的卵母细胞进行异种核移植, 产下了世界首例异种克隆野牛——“North”^[1]。Loi 等^[2]首次将死亡了 18~24 h 的雌性欧洲盘羊的颗粒细胞作为供核, 移入去核的绵羊卵母细胞中, 成功异种克隆一只盘羊。到目前为止, 仅有这两个试验获得了异种克隆成活的动物。这两个试验的成功, 说明体细胞核可以在异种动物的卵母细胞中进行重新编程, 构建的胚胎不仅可以发育到着床前的最后阶段, 而且可以在适当的受体子宫中着床, 进一步发育成胎儿。异种核移植的成功为保护珍稀濒危动物提供了一种新的方法和思路^[3]。【本研究切入点】体细胞核移植的成功率不高, 特别是异种核移植则更低。影响核移植效率的因素很多, 其中供体细胞的选择是很重要的一个方面^[4]。【拟解决的关键问题】笔者以供体细胞的来源、代次、细胞周期以及保存方式为重点对异种核移植效率的影响等方面开展试验研究, 以期优化异种体细胞核移植技术程序, 提高核移植效率。

1 材料与方法

1.1 材料

培养器皿购自 Costar 或 Nunc 公司; 胎牛血清 (FBS) 购自 Hyclone 公司; LH 购自中国科学院动物研究所; 其它试剂除特殊注明外均购自 Sigma 公司。

1.2 溶液

细胞培养液: 10% (体积比) 胎牛血清 (FBS) 的高糖 DMEM (Sigma); 细胞消化液: 0.25% (m : V) Trypsin+0.02% (m : V) EDTA; 抽卵液: 2% (V : V) FBS+HEPES 缓冲的 TCM199 (H199); 卵母细胞 IVM 液: 10% (V:V) FBS+5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 促卵泡素 (FSH)+0.3 $\text{IU}\cdot\text{ml}^{-1}$ 促黄体素 (LH)+1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ β -雌二醇的 TCM199 (M199); 显微操作液: 7.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 细胞松弛素 B (CB)+10%FBS 的 H199; 融合液: 0.3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇+0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 +0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 +0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES+0.05%BSA; 激活液包括 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 离子霉素 (Ionomycin) 的 H199 和 2

$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-二甲氨基嘌呤 (6-DMAP) 的 SOF 液^[5]; 胚胎培养液: 1%非必需氨基酸+2%必需氨基酸+4 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ BSA 的 SOF 液。

1.3 方法

1.3.1 盘羊和绵羊成体成纤维细胞系的建立及其染色体分析 分别采取 3 只 4 岁的新疆野生雌性盘羊 (*Ovis ammon*) 和 3 只 2~4 岁的新疆本地雌性绵羊 (*Ovis aries*) 的耳皮肤组织, 用含 100 $\text{IU}\cdot\text{ml}^{-1}$ 双抗的 D-Hanks 反复洗涤 3 次后剔去软骨和脂肪, 剪成 1 mm^3 左右的碎块, 再用细胞培养液清洗 2 次后分批植块于 25 cm^2 的培养瓶, 干涸 4 h, 然后加入 5 ml 细胞培养液覆盖组织块, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、100%湿度的培养箱中培养 6~7 d, 每 2 d 换液 1 次, 待细胞生长至 80%汇合后, 加细胞消化液消化传代。

取 70%汇合的细胞, 常规方法制备染色体^[6], Giemsa 染色, 在 Nikon 低倍镜下选出染色体分散良好、长度适中、染色体清晰的中期分裂相, 油镜视野下拍照, 用 ikaros 软件进行核型分析。

1.3.2 卵母细胞的成熟培养 从屠宰厂摘取刚屠宰的绵羊卵巢, 置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 左右的生理盐水中在 2 h 内送到实验室, 剔除卵巢表面的结缔组织和附着的输卵管, 将卵巢用含 100 $\text{IU}\cdot\text{ml}^{-1}$ 双抗的抽卵液清洗 2 遍, 用手术刀片剖开卵巢表面 1~5 mm 的卵泡, 挑选卵丘细胞包裹 3 层以上、结构致密的卵丘-卵母细胞复合体 (COCs), 以 IVM 液洗涤 2 次, 转入平衡好的 IVM 液滴中, 在 38.6 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、100%湿度的培养箱中成熟培养 18~20 h。将成熟的 COCs 放入 0.1%透明质酸酶中, 脱去包裹在卵母细胞周围的卵丘细胞, 选择卵周隙明显、胞质均匀并排出第一极体的卵母细胞作为受体胞质。

1.3.3 核移植程序 具体方法见参考文献[7]。将带有第一极体的卵母细胞移入显微操作液滴中, 同时将供体细胞也转入此液滴中。在配有显微操作臂的 200 倍倒置显微镜下, 用一内径为 20 μm 的吊尖斜口去核针将第一极体及其下方胞质内的染色体一并吸除, 再将消化好的直径为 15~20 μm 、折光性强、圆形的、光滑的供体细胞直接从原切口处移入去核卵母细胞的卵周隙中, 尽量使供体细胞紧贴卵细胞膜。然后将操作好的重构胚放入胚胎培养液中恢复 1 h。将恢复好的重构胚分批放入融合液中平衡 2 min, 在融合槽内用拨卵针转动卵母细胞, 使供体细胞与卵母细胞接触面与电场方向垂直, 同时施以场强为 1.2 $\text{kV}\cdot\text{cm}^{-1}$, 脉冲时间为 20 μs , 脉冲次数为 2 次的直流脉冲进行融合

(融合仪为宁波新芝生物公司生产)，融合后用胚胎培养液洗 3 遍，入箱恢复 0.5 h 后检查融合率，挑选融合胚进行下一步激活处理。

1.3.4 重构胚的激活与培养 将重构胚移入 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ionomycin 液中作用 4 min，然后转到 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-DMAP 液培养 3 h，最后用胚胎培养液洗 3 遍，放入含同种液体的液滴里，在 38.6 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、100%湿度的培养箱中培养 2 d 后统计卵裂率，7 d 后检查囊胚发育率^[8]。

1.4 试验设计

试验 1 分别以 3 头不同个体的盘羊成年耳皮肤成纤维细胞为核供体进行核移植，研究不同个体的同类细胞对核移植效率的影响。

试验 2 分别以 3 号盘羊不同代次的成年成纤维细胞为核供体进行核移植，研究同一个体不同代次的细胞对核移植效率的影响。

试验 3 分别以 3 号盘羊同一代次不同汇合度的

成年成纤维细胞为核供体进行核移植，研究同一个体同一代次不同汇合度的细胞对核移植效率的影响。

试验 4 分别以 3 号盘羊同一代次不同保存方式的成年成纤维细胞为核供体进行核移植，研究同一个体同一代次不同保存方式的维细胞对核移植效率的影响。

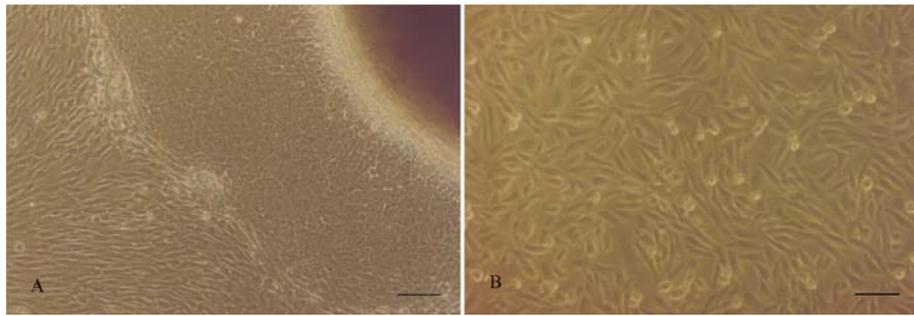
1.5 统计分析

所有试验重复 4 次，以统计分析软件 SPSS12.0 的 ANOVA 或 *T* 检验进行差异显著性分析，*P*<0.05 认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 不同品种羊的成年体细胞系的建立及其染色体分析

经过原代培养、继代培养等细胞体外培养操作，建立了新疆野生盘羊(1 号、2 号和 3 号)与新疆本地绵羊不同个体的成年成纤维细胞系(图 1)，并对其染色体进行了分析比较(图 2)。



A: 绵羊原代成纤维细胞与上皮细胞; B: 传代的盘羊成纤维细胞。标尺为 100 μm
A: The 1st passage of fibroblast cells and epithelia from local sheep; B: Fibroblast cells from argali (*Ovis ammon*) after several passages. Bar =100 μm

图 1 原代与传代中的成纤维细胞

Fig. 1 The 1st passage and several passages of fibroblast cells



A₁、A₂: 盘羊的染色体与核型; B₁、B₂: 绵羊的染色体与核型。标尺为 10 μm
A₁, A₂: The metaphase mitotic chromosome and karyotype of argali(*Ovis ammon*); B₁, B₂: The metaphase mitotic chromosome and Karyotype of local sheep. Bar =10 μm

图 2 盘羊与绵羊的染色体与核型

Fig. 2 The metaphase mitotic chromosome and karyotype of argali (*Ovis ammon*) and local sheep

盘羊二倍体染色体数 $2n=56$, 其中包括27对常染色体和1对性染色体, 常染色体中有2对为中着丝粒染色体, 25对为端着丝粒染色体, X染色体为最大的近端着丝粒染色体, Y染色体为最小的亚中着丝粒染色体(图2-A₁、A₂)。与同属绵羊染色体 $2n=54$ 相比较(图2-B₁、B₂), 盘羊少了一对近中着丝粒染色体, 而多了两对近端着丝粒染色体^[9]。

2.2 盘羊供体细胞对异种体细胞核移植效率的影响

比较新疆野生盘羊不同个体(羊号: 1号、2号和3号)的成年成纤维细胞重构胚的发育情况, 结果表明三者之间的融合率(76.0%、80.9%和89.4%)、卵裂率(72.8%、82.4%和88.1%)和囊胚率(13.3%、11.4%和12.4%)均无显著差异(表1)。

比较3号盘羊2代、4代与7~10代的成年成纤维细胞重构胚的发育情况, 结果表明3组之间的融合率(77.4%、71.7%和75.9%)、卵裂率(79.2%、82.4%和88.1%)和囊胚率(13.7%、10.7%和12.4%)均无显著差异(表2)。

比较3号盘羊4代70%~80%汇合、刚100%汇合和100%汇合2~4 d的成年成纤维细胞重构胚的发育情况, 结果表明3组之间的融合率(86.8%、76.0%和84.7%)和卵裂率(82.8%、81.6%和90.3%)无显著差

异, 但前者重构胚的囊胚率要显著高于后两者(18.3%、11.8%和10.8%)(表3)。

比较来自3号盘羊解冻传代后或传代后4℃保存2 d的4代成年成纤维细胞重构胚的发育情况, 结果表明前者的融合率(86.6%和67.8%)与卵裂率(84.5%和68.0%)显著高于后者, 但囊胚率(15.9%和13.6%)无显著差异(表4)。

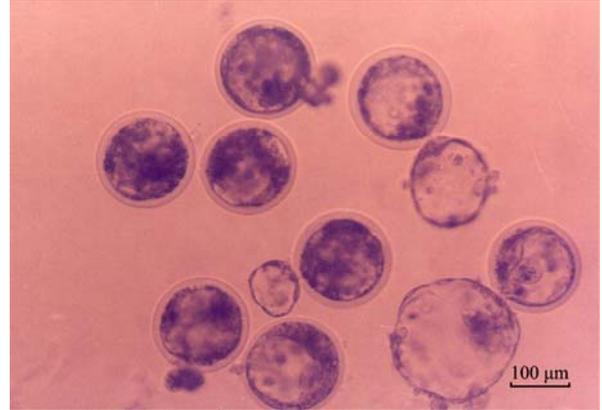


图3 盘羊-绵羊异种克隆囊胚

Fig. 3 The blastocysts derived from argali-local sheep interspecies nuclear transfer

表1 供体动物的个体对重构胚发育的影响

Table 1 Effects of individual of donor animals on the development of reconstructed embryos

个体类型 Individual	重构胚数 No. of embryos reconstructed	融合率 Fusion rate (%)	卵裂率 Cleavage rate (%)	囊胚率 Blastocyst rate (%)
1	150	76.0±3.2	72.8±8.2	13.3±0.2
2	105	80.9±4.3	82.4±3.0	11.4±3.8
3	113	89.4±4.0	88.1±5.0	12.4±2.0

表2 供体细胞的代次对重构胚发育的影响

Table 2 Effects of passage number of donor cells on the development of reconstructed embryos

代次 Passage number	重构胚数 No. of embryos reconstructed	融合率 Fusion rate (%)	卵裂率 Cleavage rate (%)	囊胚率 Blastocyst rate (%)
2代 Passage 2	155	77.4±4.6	79.2±4.4	13.7±2.0
4代 Passage 4	127	71.7±5.4	82.4±8.9	10.7±1.4
7~10代 Passage 7-10	133	75.9±4.0	88.1±5.0	12.4±2.1

3 讨论

本研究利用新疆盘羊耳皮肤组织建立了成纤维细胞系, 再利用核移植技术生产异种重构胚, 分析不同个体、不同代次、不同汇合度和不同保存方式的盘羊

成纤维细胞作为核供体对异种重构胚发育的影响。结果清楚地表明, 盘羊耳成纤维细胞在10代以内, 70%~80%汇合后用于构建异种重构胚, 能得到较高的早期胚胎发育率, 支持利用异种克隆方法进行盘羊保种的设想。

表 3 供体细胞的汇合度对重构胚发育的影响

Table 3 Effects of confluency of donor cells on the development of reconstructed embryos

汇合度 Confluency	重构胚数 No. of embryos reconstructed	融合率 Fusion rate (%)	卵裂率 Cleavage rate (%)	囊胚率 Blastocyst rate (%)
70%~80%汇合 70%-80% confluency	114	86.8±2.4	82.8±3.8	18.3±2.5a
刚 100%汇合 Full confluency	150	76.0±3.2	81.6±8.2	11.8±0.2b
100%汇合 2~4 d Full confluency for 2-4 days	85	84.7±8.1	90.3±4.7	10.8±1.6b

同一列内不同字母的值差异显著 ($P<0.05$), 下同

^{a,b} Within columns, values with different letters are significantly different ($P<0.05$). The same as below

表 4 供体细胞的保存方式对重构胚发育的影响

Table 4 Effects of storage method of donor cells on the development of reconstructed embryos

保存方式 Storage method	重构胚数 No. of embryos reconstructed	融合率 Fusion rate (%)	卵裂率 Cleavage rate (%)	囊胚率 Blastocyst rate (%)
解冻后传代 Thawed and passaged	112	86.6±2.7a	84.5±1.9a	15.9±1.1
4℃保存 2d Stored for 2 days at 4℃	143	67.8±5.3b	68.0±1.7b	13.6±3.2

盘羊 (*Ovis ammon*) 为中国二级珍稀保护动物, 属于偶蹄目、牛科、羊亚科、羊属, 与绵羊亲缘关系较近^[10], 在繁殖性能上可进行杂交, 妊娠期长短基本一致, 以绵羊作为代孕母体, 可解决盘羊异种克隆中移植受体的选择问题, 进一步支持利用绵羊卵母细胞进行盘羊异种克隆保种的可行性。

为了研究不同核供体动物个体差异对克隆胚早期生长发育的影响, 本试验比较了 3 只盘羊耳皮肤成纤维细胞作为供体细胞构建异种重构胚的融合率、卵裂率及囊胚率, 结果发现三者之间均没有显著性差异, 表明供体细胞的个体来源对盘羊异种重构胚的早期发育没有显著影响。这与李颜欣的研究结果是一致的, 其异种克隆牦牛试验结果也表明不同个体体细胞克隆囊胚的发育率没有显著差异^[11]; 但也有研究者认为不同动物个体的体细胞对克隆胚的早期发育率及出生率均有显著影响^[12]; 这可能是由于种间不同动物体细胞差异比种内大, 从而掩盖了不同动物个体的体细胞来源对克隆胚早期生长发育的影响, 其机制还需进一步探讨。体细胞核指导重构胚的发育必需经过重编程过程, 使其恢复到胚胎细胞核的状态^[13], 在这一过程中表遗传修饰是关键^[14], 不同供体细胞由于类型及分化程度等差异均可引起表遗传的变化, 从而影响核的重编程与胚胎的生长发育。

供体细胞的培养代次与核移植效率之间的关系是近年来研究的热点之一。随着传代次数的增加, 细胞在传代培养过程中会出现许多异常, 如基因组不稳定性增加及端粒长度缩短等, 使得 DNA 发生不可逆的

损伤, 细胞进入生长停滞期, 进而导致细胞死亡^[15,16]。为了研究供体细胞的培养代次对盘羊克隆胚早期生长发育的影响, 本试验将 2~10 代的盘羊体细胞用于异种核移植, 结果发现体细胞传代次数对核移植胚的卵裂率与囊胚率没有显著影响, 这与先前的其它物种的研究结果是一致的, 如 Kasinathan 等将传至 18 代的细胞用于核移植时未影响核移植胚的发育潜力^[17], Bhuiyan 等、Cho 等将低代次 (2~7 代) 和高代次 (8~12 代) 的转基因体细胞用于核移植时发现转基因核移植胚的体外发育率没有明显性差异^[18,19]。核移植效率不受供体细胞培养代次影响的前提是供体成纤维细胞能够保持相对稳定的核型^[20,21]。供体细胞核指导重构胚发育, 必须具有一个正常的核型, 利用高代次的成纤维细胞虽然不影响重构胚的发育率, 却显著造成重构胚卵裂球的凋亡比率升高^[22]。因此, 为了提高核移植试验的成功率, 有必要将细胞的培养代次控制在一定范围内。

决定核移植成功与否的另一重要的因素就是供体细胞周期的选择。本试验比较了 70%~80%汇合的细胞与接触抑制不同天数 (刚 100%汇合和 100%汇合 2~4 d) 的细胞重构胚的发育率, 结果表明 70%~80%汇合的细胞重构胚的融合率和卵裂率与接触抑制不同天数的两试验组之间差异不显著, 但囊胚率却显著高于后两试验组; 供体细胞刚 100%汇合组和 100%汇合 2~4 d 组的囊胚率虽然没有显著差异, 但是随着接触抑制天数的增加, 囊胚率有下降的趋势, 表明供体细胞的长时接触抑制, 增加了细胞的凋亡率^[23], 从而

影响了重构胚的发育率。目前, 利用静止期和增殖旺盛期的体细胞可成功获得克隆动物^[24-27]。有研究认为, 供体细胞处于 G0 期不是核移植成功的必需因素, 利用血清饥饿、接触抑制或化学抑制剂处理诱导 G0 期可提高核移植成功率^[28-31]; 但也有试验表明, 没必要对供体细胞进行 G0 期的同期化处理, 利用增殖期的体细胞进行核移植, 卵裂率得到了显著提高^[32]。本试验利用增殖期的体细胞进行核移植可以显著提高重构胚的囊胚率, 但卵裂率差异不显著; 可能是由于物种、供体细胞类型以及试验条件的差异, 使得各个试验得出的结论不尽相同。由此可见, 采用 G0 期细胞作为供体细胞并非体细胞核移植的必须条件。本试验采用增殖期体细胞进行核移植, 也可以获得较高的早期胚胎发育率, 从而扩大了供体细胞的选择范围。

为了简化克隆程序, 更好更有效地利用宝贵的供体细胞资源, 本试验研究了盘羊成纤维细胞的不同保存方式对重构胚发育的影响, 结果表明核移植细胞 4℃ 悬浮保存 2 d 后使用, 降低了克隆胚的融合率和卵裂率, 但囊胚发育率没有受到显著影响。这与其它人研究结果一致, 他们发现 4℃ 冷藏水牛体细胞降低了核移植胚的卵裂率, 囊胚率没有显著差异^[33]; 郭继彤等将供体细胞在 4℃ 冷藏保存 24 h 后用于核移植, 克隆胚的早期发育未受到显著影响, 并且获得了一只成活的小羔羊^[34]; Liu 等将消化好的供体细胞在 4℃ 冷藏保存 1~2 周, 重构胚的融合率、卵裂率和囊胚率均未降低, 提出冷藏是一种简便有效的供体细胞准备方法^[35]。本试验中重构胚融合率与卵裂率降低的原因可能是由于细胞消化好后直接进行 4℃ 悬浮保存, 使用前发现细胞表面不光滑, 进而影响了克隆胚的融合率和卵裂率。若将细胞先在 37℃ 孵育恢复一段时间, 使其细胞表面光滑后再进行 4℃ 悬浮保存, 可能就会得到理想的试验结果。因此, 供体细胞的冷藏保存是一种行之有效的细胞保存方法, 但对保存条件需要继续进行优化, 在不影响重构胚发育率的情况下, 延长供体细胞的保存时间可以为克隆研究提供更多的核供体细胞。

4 结论

利用本试验中的 3 头盘羊耳成纤维细胞, 培养到 10 代以内、70%~80% 汇合后用于构建异种重构胚, 能得到较高的早期胚胎发育率。

致谢: 衷心感谢新疆畜牧科学院农业部家畜繁育生物技

术重点开放实验室刘明军主任和谭立新老师在试验中给予的指导, 石河子大学博士研究生彭夏雨在试验取材方面提供的帮助。

References

- [1] Vogel G. Cloned gaur a short-lived success. *Science*, 2001, 291: 409.
- [2] Loi P, Ptak G, Barboni B, Jr. Fulka J, Cappai P, Clinton M. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nature Biotechnology*, 2001, 19: 962-964.
- [3] Loi P, Galli C, Ptak G. Cloning of endangered mammalian species: any progress? *Trends in Biotechnology*, 2007, 25: 195-200.
- [4] Yang F, Hao R, Kessler B, Brem G, Wolf E, Zakhartchenko V. Rabbit somatic cell cloning: effects of donor cell type, histone acetylation status and chimeric embryo complementation. *Reproduction*, 2007, 133(1): 219-230.
- [5] Holm P, Booth P J, Schmltdt M H, Greve T, Callesen H. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*, 1999, 52: 683-700.
- [6] 雷初朝, 李瑞彪, 陈宏, 韩增胜, 刘静. 山羊与绵羊的染色体核型比较. *西北农业学报*, 2001, 10(3): 12-15.
Lei C Z, Li R B, Chen H, Han Z S, Liu J. Comparative study on chromosome karyotype of goat and sheep. *Acta Agriculture Boreali-occidentalis Sinica*, 2001, 10(3): 12-15. (in Chinese)
- [7] 张运海, 潘登科, 孙国杰, 孙秀柱, 李燕, 戴蕴平, 李宁. 猪体外受精胚胎、孤雌激活胚胎以及体细胞核移植胚胎的体外培养. *中国农业科学*, 2007, 40: 588-593.
Zhang Y H, Pan D K, Sun G J, Sun X Z, Li Y, Dai Y P, Li N. Preimplantational development of porcine embryos derived from *in vitro* fertilization, parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transfer. *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, 40: 588-593. (in Chinese)
- [8] 潘晓燕, 杨梅, 王正朝, 汪立琴, 陈童, 赵雪萍, 郭志勤, 王锋. 绵羊卵母细胞孤雌发育的研究. *西北农业学报*, 2007, 16(3): 7-10.
Pan X Y, Yang M, Wang Z C, Wang L Q, Chen T, Zhao X P, Guo Z Q, Wang F. Study on parthenogenetic development of ovine oocytes. *Acta Agriculture Boreali-occidentalis Sinica*, 2007, 16(3): 7-10. (in Chinese)
- [9] Huang L, Nie W H, Wang J H, Su W T, Yang F T. Phylogenomic study of the subfamily caprinae by cross-species chromosome painting with Chinese muntjac paints. *Chromosome Research*, 2005, 13: 389-399.
- [10] Bunch T D, Vorontsov N N, Lyapunova E A, Hoffmann R S.

- Chromosome number of Severtzov's sheep (*Ovis ammon severtzovi*): G-banded karyotype comparisons within Qvis. *The Journal of Heredity*, 1998, 89: 266-269.
- [11] 李颜欣. 异种克隆牦牛, 羚牛及相关机理的研究. 中国农业大学博士学位论文, 2004.
- Li Y X. Production of yak (*Bos grunniens*) & takin (*Budorcas taxicolor*) embryos by interspecies nuclear transfer. Dissertation for Doctoral Degree (Graduation) of China Agricultural University, 2004. (in Chinese)
- [12] 安晓荣, 苟克勉, 朱士恩, 关宏, 侯健, 林爱星, 曾申明, 田见晖, 陈永福. 卵丘细胞核移植技术生产克隆牛犊. 中国科学(C 辑), 2002, 32(1): 69-76.
- An X Y, Gou K M, Zhu S E, Guan H, Hou J, Lin A X, Zeng S M, Tian J H, Chen Y F. Cloned calves produced by nuclear transfer from cultured cumulus cell. *Science in China (Series C)*, 2002, 32(1): 69-76. (in Chinese)
- [13] 章志国, 章孝荣, 刘亚, 金仁桃, 章美玲, 汪存利, 赵焕. 山羊(Bore)-兔异种克隆胚胎连续核移植的研究. 中国农业科学, 2005, 38: 601-605.
- Zhang Z G, Zhang X Y, Liu Y, Jin R T, Zhang M L, Wang C L, Zhao H. Study of serial nuclear transfer on goat (Bore)-rabbit inter-species cloned embryo. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38: 601-605. (in Chinese)
- [14] Armstrong L, Lako M, Dean W, Stojkovic M. Epigenetic modification is central to genome reprogramming in somatic cell nuclear transfer. *Stem Cells*, 2006, 24: 805-814.
- [15] Mastromonaco G F, Perrault S D, Betts D H, King W A. Role of chromosome stability and telomere length in the production of viable cell lines for somatic cell nuclear transfer. *Developmental Biology*, 2006, 6: 41-54.
- [16] Cristofalo V J, Allen R G, Pignolo R J, Martin B G, Beck J C. Relationship between donor age and replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of the America*, 1998, 95: 10614-10619.
- [17] Kasinathan P, Knott J G, Moreira P N, Burnside A S, Jerry D J, Robl J M. Effect of fibroblast donor cell age and cell cycle on development of bovine nuclear transfer embryos *in vitro*. *Biology of Reproduction*, 2001, 64: 1487-1493.
- [18] Bhuiyan M M, Cho J, Jang G, Park E, Kang S, Lee B, Hwang W. Effect of transfection and passage number of ear fibroblasts on *in vitro* development of bovine transgenic nuclear transfer embryos. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2004, 66: 257-261.
- [19] Cho J, Bhuiyan M M, Shin S, Park E, Jang G, Kang S, Lee B, Hwang W. Development potential of transgenic somatic cell nuclear transfer embryos according to various factors of donor cell. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2004, 66: 1567-1573.
- [20] Poehland R, Al-Rostum F, Becker F, Viergutz T, Brunner R M, Kanitz W, Bhojwani S. Donor cell lines considerably affect the outcome of somatic nuclear transfer in the case of bovines. *Journal of Reproduction and Development*, 2007, 53: 737-748.
- [21] 张德福, 刘东, 汤琳琳, 王英, 陈茵, 王凯, 王根林, Karl S, Lin C. 不同供体细胞及其处理对猪核移植重构胚体外发育的影响. 遗传, 2007, 29(2): 211-217.
- Zhang D F, Liu D, Tang L L, Wang Y, Chen Y, Wang K, Wang G L, Karl S, Lin C. Effect of different donor cells on the development of nuclear-transferred porcine embryos. *Hereditas*, 2007, 29(2): 211-217. (in Chinese)
- [22] Jang G, Park E S, Cho J K, Bhuiyan M M U, Lee B C, Kang S K. Preimplantational embryo development and incidence of blastomere apoptosis in bovine somatic cell nuclear transfer embryos reconstructed with long-term cultured donor cells. *Theriogenology*, 2004, 62: 512-521.
- [23] Nagashima H, Fujimura T, Takahagi Y, Kurome M, Wako N, Ochiai T, Esaki R, Kano K, Saito S, Okabe M, Murakami H. Development of efficient strategies for the production of genetically modified pigs. *Theriogenology*, 2003, 59: 95-106.
- [24] Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, Kind A J, Campbell K H S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian. *Nature*, 1997, 385: 810-813.
- [25] Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J, Kane J J, Jerry J, Blacewell C, Ponce de Leon F S, Robl J M. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 1998, 280: 1256-1258.
- [26] Vignon X, Chesne P, Le Bourhis D, Flechon J E, Heyman Y, Renard J P. Developmental potential of bovine embryos reconstructed from enucleated matured oocytes fused with cultured somatic cells. *Reproduction Biology*, 1998, 321: 735-745.
- [27] Bosch P, Hodges C A, Stice S L. Generation of transgenic livestock by somatic cell nuclear transfer. *Biotechnologia Aplicada*, 2004, 21: 122-136.
- [28] Hashem M A, Bhandari D P, Kang S K, Lee B C, Suk H W. Cell cycle analysis of *in vitro* cultured goral (*Naemorhedus caudatus*) adult skin fibroblasts. *Cell Biology International*, 2006, 30: 698-703.
- [29] Gibbons J S, Arat J, Rzuclidlo J, Miyoshi K, Waltenburg R, Respass D, Venable A, Stice S. Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. *Biology of Reproduction*,

- 2002, 66: 895-900.
- [30] 刘 亚, 章孝荣, 陈大元, 张运海, 章志国, 金仁桃, 汪存利, 章美玲, 李东伟, 李 斌, 赵 焕, 程立子. 牛-兔种间重组胚体外发育能力的研究. 中国农业科学, 2004, 37: 441-445.
- Liu Y, Zhang X Y, Chen D Y, Zhang Y H, Zhang Z G, Jin R T, Wang C L, Zhang M L, Li D W, Li B, Zhao H, Cheng L Z. Study on development of cloned embryo using bovine somatic cell and rabbit oocyte *in vitro*. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, 37: 441-445. (in Chinese)
- [31] Hayes O, Ramos B, Rodriguez L L, Aguilar A, Badia T, Castro F O. 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. *Animal Reproduction Science*, 2005, 87: 181-182.
- [32] Zhang Y H, Pan D K, Sun X Z, Sun G J, Liu X H, Wang X B, Tian X H, Li Y, Dai Y P, Li N. *In vitro* developmental competence of pig nuclear transferred embryos: effects of GFP transfection, refrigeration, cell cycle synchronization and shapes of donor cells. *Zygote*, 2006, 14(3): 239-247.
- [33] 陈自洪, 杨素芳, 罗 蝉, 成俊萍, 石德顺. 供体细胞低温冷藏处理对水牛体细胞核移植效果的影响. 黑龙江畜牧兽医, 2007, (1): 38-39.
- Chen Z H, Yang S F, Luo C, Cheng J P, Shi D S. Effects of refrigeration of donor cells on buffalo somatic nuclear transfer. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2007, (1): 38-39. (in Chinese)
- [34] 郭继彤, 安志兴, 李 煜, 李雪峰, 李裕强, 郭泽坤, 张 涌. 成年耳细胞克隆山羊(*Capra hircus*). 中国科学(C 辑), 2002, 32(1): 77-83.
- Guo J T, An Z X, Li Y, Li X F, Li Y Q, Guo Z K, Zhang Y. Cloned goats (*Capra hircus*) from adult ear cells. *Science in China (Series C)*, 2002, 32(1): 77-83. (in Chinese)
- [35] Liu J L, Wang M K, Sun Q Y, Zhang X R, Jiang L K, Chen D Y. Refrigeration of donor cells in preparation for bovine somatic nuclear transfer. *Reproduction*, 2001, 122: 801-808.

(责任编辑 高 雨, 林鉴非)

欢迎订阅 2009 年《植物保护》杂志

《植物保护》创刊于 1963 年, 由中国植物保护学会和中国农业科学院植物保护研究所主办, 为全国中文核心期刊、中国科技核心期刊、“中国期刊方阵”双百期刊, 曾荣获中国科协优秀科技期刊奖、全国优秀科技期刊奖, 北京市全优期刊奖、国家期刊奖提名奖等多个奖项。收录的数据库有英国《CABI 文献数据库》、《Agrindex (FAO)》、美国《化学文摘》(CA)、《中国科学引文数据库》、《中文科技期刊数据库》、《生物学文摘》、《万方数据—数字化期刊群》、《中国农业文摘数据库》、《中国科技论文与引文数据库》、《中国学术期刊(光盘版)》、《中国期刊网》。本刊主要刊登有关植物病理、农林业昆虫、杂草及鼠害等农作物有害生物、植物检疫、农药等植物保护学科各领域原始研究性论文和具有创新性、实用性技术成果文章。设有专论与综述、研究报告、调查研究、基础知识、实验技术、国外植保、争鸣、应用与交流、病虫新动态、学会动态与信息、新书新产品介绍等栏目。

竭诚欢迎全国各地科研院所研究人员、大专院校教师及研究生、各级植保科技工作者等踊跃订阅。欢迎广大作者踊跃投稿! 并欢迎咨询洽谈广告业务!

本刊为双月刊, 大 16 开, 160 页, 铜版纸印刷。每期定价 25.00 元, 全年 150.00 元。邮发代号: 2-483, 全国各地邮局均可订阅。直接在本刊编辑部订阅, 可享受 9 折优惠价, 全年 135 元, 若需挂号, 每期另加 3 元。

联系地址: 北京圆明园西路 2 号中国农科院植保所《植物保护》编辑部(邮编: 100193)

电话: 010-62819059, 62815914; 传真: 010-62815914; E-mail: zwbh1963@263.net

网址: www.plantprotection.ac.cn; 联系人: 王音, 高洪荣