中国科学 C 辑:生命科学 2009 年 第 39 卷 第 4 期: 384 ~ 391
www.scichina.com life.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

论 文

化学激活和季节对克隆猪出生率的影响

马育芳[①②], 卫恒习[①], 李燕[③], 李秋艳[③], 方锐[①], 赵蕊[③], 张坤[①], 薛恺[①], 娄颜坤[①], 戴蕴平[③], 连林生[②], 李宁[①*]

① 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193;
② 中国农业大学动物科技学院, 北京 100193;
③ 北京济普霖生物技术有限公司, 北京 100193
* 联系人, E-mail: ninglcau@cau.edu.cn

收稿日期: 2008-11-23; 接受日期: 2009-02-19
国家重点基础研究发展计划(批准号: G20000161)资助项目

摘要 为了解化学激活对克隆猪出生效率的影响, 研究了体外成熟的猪卵母细胞被激活恢复减数分裂到克隆猪出生的整个过程. 首先研究了电激活(Ele), Ele+CHX+CB 和 Ele+6-DMAP 3 种激活方法对猪卵母细胞孤雌激活(parthenogenetic, PA)和核移植(nuclear transfer, NT)重构胚体外发育的影响. 比较了 Ele 或 Ele+CHX+CB 激活方法对克隆猪出生效率的影响. 实验中单独列出了 PA 胚的扩张囊胚率或 NT 优质囊胚率来代表囊胚的质量. 结果表明: 化学联合激活提高了 PA 的囊胚率和扩张囊胚率, 但对 PA 胚的卵裂率和囊胚细胞数没有显著影响(P>0.05). Ele+6-DMAP 对 PA 胚的囊胚率和扩张囊胚率有显著提高(P<0.05), 但对 NT 胚的囊胚率和优质囊胚率没有提高甚至降低了 NT 胚的发育. Ele+CHX+CB 虽然提高了 NT 胚的囊胚率(P<0.05), 但对优质囊胚率没有影响. Ele+CHX+CB 激活方法使克隆猪出生率有所提高但不显著. 本文还研究了季节对猪孤雌发育和克隆猪出生率的影响. 结果表明, 春季收集的猪卵母细胞使用 3 种激活方法卵母细胞的孤雌囊胚率均高于冬季收集的猪卵母细胞的囊胚率. 春季和冬季进行移植, 克隆猪出生率没有区别. 综上, 在 PA 中获得的结果与 NT 胚中获得的结果不一定完全匹配, 说明孤雌激活和重构胚的激活机制还是有区别的. 化学联合激活虽然能提高囊胚率, 但它的作用相当于降低囊胚形成的门槛, 却不是从本质上改变囊胚发育能力, 因此不能显著提高克隆猪出生效率. 春季收集的卵母细胞在体外培养中的发育能力好于冬季收集的卵母细胞, 但季节对克隆猪出生率没有显著影响.

关键词
孤雌激活
化学激活
体细胞核移植
克隆猪
季节

尽管来自成年体细胞的第一头克隆动物出生已经 12 年, 其他物种的克隆动物也陆续出生, 但核移植的效率一直没有质的突破. 根据最近的报道克隆效率一直维持在 1%~2%[1]. 猪是多胎动物, 至少要有 4 枚优质囊胚同时着床才能够造成有效的妊娠信号[2], 由于自身的技术难题, 所以直到 2000 年克隆猪才出生[3,4]. 目前体外成熟的猪卵母细胞孤雌发育的囊胚率是 20%~30%, NT 胚的囊胚率是 10%~15%[5]. 为了提高克隆效率, 克隆技术的每一个技术环节都需要改进, 而对 NT 胚激活方法的改进被认为是提高克隆效率的一个重要方面.

关于猪卵母细胞的激活方法有很多种, 但因为培养基、电压和频率、化学激活药品等不同, 得到了不同的结果. 但总的说来, 相对于其他动物, 猪卵的

引用格式: 马育芳, 卫恒习, 李燕, 等. 化学激活和季节对克隆猪出生率的影响. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2009, 39(4): 384—391

PA 胚和 NT 胚的体外发育能力均比较低[5], 还有很大的研究空间. 体外成熟的猪卵母细胞最先使用电激活的方法激活并获得了克隆猪[3,4,6]. 卵子的 PA 胚和 NT 胚的激活是一个复杂的过程, 有研究证明电激活加上化学激活可以提高 PA 胚和 NT 胚的囊胚率, 甚至囊胚细胞数[5,7]. 由于技术和实验条件的限制, 对体外成熟猪卵母细胞 PA 发育的研究很多[1,8~11], 而对不同激活方法激活 NT 胚体外发育能力的研究近几年才开始[5,12~14]. 用不同激活方法得到克隆猪后代的比较还未见报道. 关于季节变化对体外培养的卵母细胞发育能力的影响目前研究得还很少, 但我们在实验中发现随着季节变化卵母细胞的体外发育能力还是有区别的, 因此做了一些统计学上的比较. 为了弄清楚化学激活和季节在克隆猪实验中到底产生怎样的影响, 本研究设计了 4 个实验. 实验一, 卵母细胞用 3 种激活方法进行孤雌激活, 比较卵母细胞的体外发育能力(卵裂率、囊胚率、扩张囊胚率和囊胚细胞数). 实验二, 为了验证季节影响, PA 实验数据分为春季和冬季两组进行季节间的比较. 实验三, NT 胚用同样的 3 种激活方法激活, 看体外发育情况和 PA 是否一致. 实验四, 比较不同激活方法和不同季节克隆猪出生效率的差异. PA 胚的扩张囊胚的平均细胞数高于一般囊胚的平均细胞数, 可以作为优质囊胚[15](图 1 和图 2). 因此单独列出了 PA 胚扩张囊胚或 NT 优质囊胚的数据. 本文研究了卵母细胞被激活恢复减数分裂到克隆猪出生整个过程, 更能说明化学激活和季节在卵发育中作用.

1 材料与方法

1.1 卵母细胞的收集和体外成熟(IVM)

除特别注释外, 所有化学试剂均购于 Sigma 公司(St Louse, MO, USA).

成熟基础培养液 TCM199 购自 Gibco 公司. 成熟培养时添加 10%成年牛血清、10%猪卵泡液(porcine follicular fluid, pFF, 自制)、0.57 mmol/L L-半胱氨酸、10 ng/mL 表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、10 IU/mL 孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotrophin, PMSG)和 10 IU/mL 人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin, hCG).

pFF 的制备: 抽取卵巢上 6~8 mm 直径的卵泡, 将抽取液放入 50 mL 离心管, 2000×*g* 4℃ 离心 30 min, 取上清液, 用 0.45 μm 针头滤器过滤分装到 1.5 mL 离心管中, 放入–20℃保存备用.

从屠宰场收集初情期前母猪卵巢, 放入 37℃含

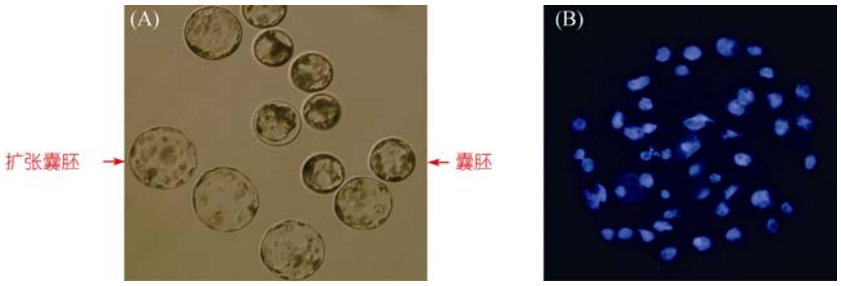


图 1 孤雌囊胚和扩张囊胚（优质囊胚）

(A) PA 囊胚照片(200×); (B) PA 囊胚细胞计数 5 μg/mL hoechst33342 (400×)

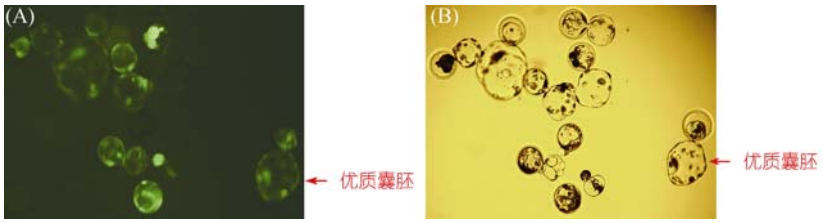


图 2 核移植优质囊胚

(A) 表达 GPF 的 NT 囊胚(蓝光激发照片 200×) (B) 核移植囊胚(白光照片 200×)

青霉素和链霉素的生理盐水中, 3 h 内运回实验室. 用连接 18 号针头的 10 mL 注射器抽吸 3~6 mm 的卵泡. 在体式显微镜下捡取胞质均匀、包裹 3 层以上卵丘细胞且紧密的卵丘-卵母细胞复合体(Cumulus-oocyte complexes COCs), 洗 3 遍后放入成熟培养液中. 成熟培养是在四孔板(Nunc, Roskilde, Denmark)中完成, 每孔加入 400 μL 成熟培养液, 并覆盖 400 μL 石蜡油. 成熟培养时, 每孔放入小于 100 枚 COCs. 培养条件为 39℃, 5% CO_2, 饱和湿度. 经过 42~44 h 成熟培养后, 用 0.1% (*W/V*)的透明质酸酶(Gibco)脱去卵丘细胞, 在体式显微镜下(SMZ1000, Nikon)观察统计卵母细胞成熟(排出第一极体)情况, 并将成熟的且胞质均匀的卵母细胞挑出来放到预先平衡的 50 μL 的含有 4 mg/mL 的无脂肪酸的 BSA(Fraction V)的 NCSU-23[16]液滴中, 每个液滴放少于 100 枚的卵母细胞, 然后放入培养箱中准备后面的实验.

1.2 转 GFP 猪胎儿成纤维细胞的制备

妊娠 24 天的长白猪胎儿建立的胎儿成纤维细胞系 slw6, 用脂质体 LipofectamineTM 2000 购自 Invitrogene (life technologies, USA)进行 GFP 转染, 所用质粒是绿色荧光表达质粒 pEGFP-N1(购自 Clontech Laboratories, Inc Palo Alto, CA), 600 μg/mL G418 筛选 10 天, GFP 的表达在 90%以上(Slw6-GFP). 转人溶菌酶(hLY)基因的香猪胎儿成纤维细胞 Sw8-hLY, GFP 的表达在 95%以上. 核移植前细胞准备的具体操作见参考文献[17,18].

1.3 孤雌激活

脱去卵丘的成熟卵母细胞, 在成熟培养 48 h 时, 在融合液(0.25 mol/L 甘露醇, 0.1 mmol/L $CaCl_2$, 0.1 mmol/L $MgCl_2$, 0.5 mmol/L HEPES 和 0.01% PVA)中平衡 2~3 min, 再用融合液洗 3 遍, 转移到充满融合液的 0.1 mm 融合槽内, 随后用 CUY-21(BEX, Nepa, Tokyo, Japan)电转仪施加 2 个 1.6 kV/cm, 100 μs, 间隔 100 μs 的直流电脉冲进行电激活. 将激活卵分成 3 组: 电激活卵用 PZM3 洗 3 遍后直接培养在 PZM3 中作对照; 电激活后, 用 PZM3 洗涤后立即转移到含有 10 μg/mL CB(细胞松弛素 B)和 10 μg/mL CHX(放线菌素酮)的 PZM3 中处理 4 h; 电激活后, 用 PZM3 洗涤后立即转移到含有 2 mmol/L 6-DMAP(二甲基氨基嘌呤)的 PZM3 液中处理 4 h.

1.4 体细胞核移植、NT 胚的融合和激活

以接触抑制 1~2 d 的转基因猪胎儿成纤维细胞为供体细胞进行核移植, 操作的具体方法见参考文献[17,19]. NT 胚在电融合的同时就被激活了, 电激活的条件同孤雌激活. 融合后的重构胚同 PA 一样被分成 3 组.

1.5 胚胎体外培养

孤雌激活卵母细胞或激活后的核移植重构胚用 PZM3 洗 3 遍, 转移到预先在培养箱中平衡 4 h 的加有 PZM3 四孔板中培养. 培养条件为 39℃, 5% O_2, 5% CO_2, 90% N_2, 饱和湿度. 培养到 48 h 记录卵裂, 第 6 天观察囊胚发育情况.

1.6 囊胚细胞计数

把第 6 天的囊胚取出, 用 DPBS-PVA 洗涤 3 遍, 4%多聚甲醛固定 10 min, 再用 DPBS-PVA 洗涤 3 遍, 转移到 5 μg/mL hoechst33342 的 DPBS-PVA 中染色 10 min, 压片, 荧光显微镜(BX51, Olympus)下进行细胞计数.

1.7 胚胎移植

核移植重构胚在激活后 12~48 h 后, 经手术移入自然发情第 0 天或第 3 天的受体母猪输卵管内(以出现压背反应为发情的第 0 天), 每头受体猪移植 170~300 枚胚胎. 对怀孕到期的 3 头代孕母猪的克隆猪出生率进行比较.

1.8 微卫星鉴定

共检测了 11 个位于不同染色体上的微卫星标记(S940, S957, S2409, S0089, S0215, S742, S2540, S1856 , S1473, S1987, S1647), 具体方法见文献[20]

1.9 统计学分析

应用 SAS8.0 软件对实验数据进行 *t* 检验和单因素方差分析, 差异显著水平为 $P<0.05$.

2 结果

实验中提到的囊胚率是指体外发育到第 6 天的囊胚占培养胚胎总数的比例, 扩张囊胚率(优质囊胚率)

是指发育到第 6 天的扩张囊胚(优质囊胚)占培养胚胎总数的比例. 除了胚胎移植实验外, 其余实验均重复 3 次以上. 有文献报道老龄卵更易被激活, 有相对高的囊胚率[11,21], 因此每次调整 3 组实验的先后顺序.

2.1 不同激活方法对卵母细胞 PA 发育能力的影响

因为卵母细胞随着季节变化, 影响了 PA 胚发育能力[22], 根据季节将实验分成了 2 组.

(1) 春季卵母细胞 PA 发育能力. 从表 1 可以看出, 3 组不同激活方法的卵裂率(82.0±1.2, 80.3±2.0 *vs* 79.5±1.7)差异不显著(P>0.05). 联合激活的囊胚率和扩张囊胚率都高于单纯的电激活. 尤其电激活后用 6-DMAP 处理的卵母细胞发育到囊胚(50.6±0.1 *vs* 36.5±1.6)和扩张囊胚(29.2±0.7 *vs* 22.5±1.1)的比例更高, 差异显著(P<0.05). 电激活后用 CHX 处理的卵母细胞的扩张囊胚率(27.3±1.1)高于电激活的扩张囊胚率(22.5±1.1), 但差异不显著(P>0.05). 3 组囊胚细胞数没有显著差异.

(2) 冬季卵母细胞 PA 发育能力. 从表 2 可以看出, 卵母细胞激活后的卵裂率(78.5±1.5, 79.1±2.8 *vs* 75.7±1.4)和囊胚细胞数(37.3±8.0, 34.4±2.0 *vs* 37.8±9.0)3 种激活方法没有显著差异(P>0.05). 囊胚率(47.3±2.2, 36.4±3.6 *vs* 29.4±2.6)联合激活实验组优于电激活实验组, 差异显著(P<0.05). 扩张囊胚率(24.4±2.3, 22.7±2.3 *vs* 21.2±2.3)差异不显著(P>0.05).

2.2 不同激活方法对 NT 胚体外发育能力的影响

在 NT 胚发育中 6-DMAP 组的囊胚效果最差(8.7±3.5), Ele+CHX+CB 组比 Ele 组的囊胚率高(21.6±1.8 *vs* 12.5±2.6), 差异显著(P<0.05). 优质囊胚的比率 6-DMAP 效果也是最差(5.8±2.7), Ele+CHX+CB 组和 Ele 组(10.4±1.0 *vs* 9.2±2.1)差异不显著(P>0.05). 联合激活方法(Ele+CHX+CB)对 NT 囊胚率影响是显著的(P<0.05), 但对优质囊胚率没有显著影响(P>0.05) (表 3).

2.3 不同激活方法和季节对克隆猪出生效率的比较

根据 3 头代孕母猪胎儿出生情况来看, 不管电激活, 还是联合激活克隆猪的出生效率都不是很高, 胎儿出生率没有明显区别. 不同季节克隆猪的出生效率也没有区别(表 4).

2.4 春、冬季节对卵母细胞孤雌发育能力的影响

从图 3 中可以看出春季收集的卵母细胞用 3 种不同激活方法发育的囊胚率均明显高于冬季收集的卵

表 1 不同激活方法对春季卵母细胞 PA 胚体外发育能力的影响 a)

组别	卵总数	卵裂率/%	囊胚率/%	扩张囊胚率/%	囊胚细胞数(检测囊胚数)
Ele	244	79.5±1.7a	36.5±1.6b	22.5±1.1b	39.3±10.7a(79)
Ele+6-DMAP	89	82.0±1.2a	50.6±0.1a	29.2±0.7a	42.5±11.6a(39)
Ele+CHX+CB	117	80.3±2.0a	41.0±1.9b	27.3±1.1b	36.0±12.3a(43)

a) 3 种不同激活方法对春季收集的卵母细胞进行 PA 体外发育能力的比较, 联合激活方法 PA 发育能力优于电激活 PA 发育能力. 每组实验重复至少 3 次. Ele: 电激活用 2 个 1.6 kV/cm, 100 μs、间隔 100 μs 的直流电脉冲; Ele+6-DMAP: 电激活后用 2 mmol/L 6-二甲基氨基嘌呤处理 4 h; Ele+CHX+CB: 电激活后用 10 μg/mL 细胞松弛素 B 和 10 μg/mL 放线菌酮处理 4 h. 同一列中标注字母不同表示差异显著 P<0.05

表 2 不同激活方法对冬季卵母细胞 PA 胚体外发育能力的影响 a)

组别	卵总数	卵裂率/%	囊胚率/%	扩张囊胚率/%	囊胚细胞数(检测囊胚数)
Ele	102	75.7±1.4a	29.4±2.6b	21.2±2.3a	37.8±9.0a(23)
Ele +6-DMAP	131	78.5±1.5a	47.3±2.2a	24.4±2.6a	37.3±8.0a(50)
Ele +CHX+CB	110	79.1±2.8a	36.4±3.6a	22.7±1.3a	34.4±2.0a(36)

a) 3 种不同激活方法对冬季收集的卵母细胞 PA 胚体外发育能力的比较, 联合激活方法 PA 的囊胚率优于电激活的囊胚率, 差异显著(P<0.05); 但扩张囊胚率没有区别. 每组实验重复至少 3 次. Ele: 电激活用 2 个 1.6 kV/cm, 100 μs、间隔 100 μs 的直流电脉冲; Ele+6-DMAP: 电激活后用 2 mmol/L6 二甲基氨基嘌呤处理 4 h; Ele+CHX+CB: 电激活后用 10 μg/mL 细胞松弛素 B 和 10 μg/mL 放线菌酮处理 4h. 同一列中标注字母不同表示差异显著 P<0.05

母细胞囊胚. 而春季收集的卵母细胞扩张囊胚率同样都高于冬季收集的卵母细胞的扩张囊胚率, 但差异不显著(P>0.05).

2.5 克隆猪鉴定

微卫星结果表明, 9 头克隆猪的遗传组成与供体细胞完全一致, 而与代孕母猪无任何遗传亲缘关系. 采克隆猪耳组织进行细胞培养, 在显微镜下可以观察到表达 GFP 的细胞(图 4). 经 PCR 鉴定出生胎儿染色体内均整合有 GFP 基因(图片未提供).

3 讨论

成熟的卵母细胞核停滞于 M Ⅱ期, 为了使体外培养的成熟卵母细胞脱离 M Ⅱ期, 必须对其进行激活. 在正常受精过程中, 精子对卵子的激活作用使得卵母细胞中游离的钙离子浓度升高, 这被认为是卵母细胞活化的必要条件[23]. 一般认为, M 期促进因子(MPF)是恢复减数分裂的关键因子. 另一个调节减数分裂的信号转导途径是有丝分裂原激活蛋白途径(MAPK). MPF 由异源二聚体构成, 包括一个细胞依赖激酶 1(cdk1)催化亚基和一个细胞周期蛋白 B(CB)调节亚单位. MAPK 酶是一个丝氨酸、苏氨酸蛋白激酶, MAPK 和它的下游底物的作用是稳定 MPF 和帮助 MPF 诱导细胞进入有丝分裂. 而胞质内钙离子浓度的升高能够引发一系列的磷酸化和去磷酸化事件, 最终导致 MPF 活性降低而使得卵母细胞从 M Ⅱ期释放出来[7]. 因此, 对于成熟卵母细胞和重构胚的激活

表 3 3 种不同激活方法对 NT 胚的体外发育能力的影响 a)

组别	卵总数	卵裂率/%	囊胚率/%	优质囊胚率/%	囊胚细胞数
Ele	184	75.2±1.3a	12.5±2.6b	9.2±2.1a	43±3.5a(20)
Ele +6-DMAP	104	73.5±2.5a	8.7±3.5b	5.8±2.7a	50±5.2a(9)
Ele +CHX+CB	162	79.0±2.8a	21.6±1.8a	10.4±1.0a	44±4.8a(34)

a) 3 种不同激活方法对核移植重构胚激活后体外发育能力的比较, 联合激活方法对 NT 胚体外发育能力不完全优于电激活对 NT 胚的体外发育能力. 每组实验重复至少 3 次. Ele: 电激活用 2 个 1.6 kV/cm, 100 μs、间隔 100 μs 的直流电脉冲; Ele+6-DMAP: 电激活后用 2 mmol/L 6 二甲基氨基嘌呤处理 4 h; Ele+CHX+CB: 电激活后用 10 μg/mL 细胞松弛素 B 和 10 μg/mL 放线菌酮处理 4 h. 同一列中标注字母不同表示差异显著 P<0.05

表 4 不同激活方法和季节对克隆猪出生效率的比较 a)

组别	移植季节	供体细胞	重构胚数	出生胎儿/头	出生率
Ele	春季	Sw8-hLY	320	3	0.94%
Ele+CHX+CB	春季	Slw6-GFP	340	4	1.17%
Ele+CHX+CB	冬季	Slw6-GFP	170	2	1.17%

a) NT 胚激活后移植到代孕母猪体内发育到期比较, 不同激活方法和不同季节的胎儿出生率没有显著区别. Ele: 电激活用 2 个 1.6 kV/cm, 100 μs、间隔 100 μs 的直流电脉冲; Ele+CHX+CB: 电激活后用 10 μg/mL 细胞松弛素 B 和 10 μg/mL 放线菌酮处理 4 h.

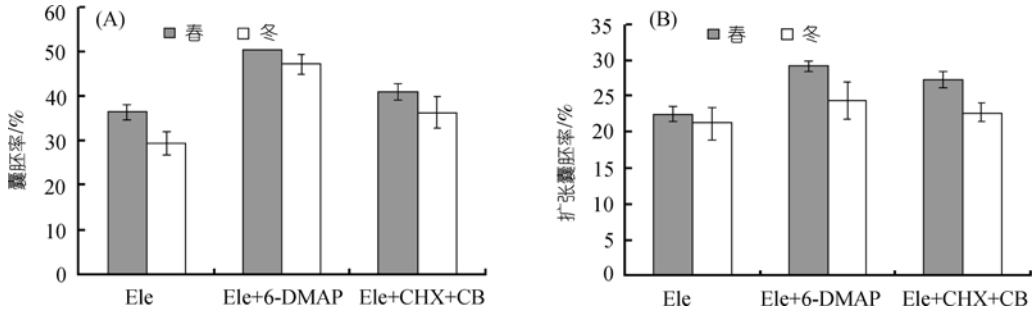


图 3 春季收集的卵母细胞和冬季收集的卵母细胞用 3 种不同激活方法激活后囊胚率(A)和扩张囊胚率(B)的比较.

Ele: 电激活用 2 个 1.6 kV/cm, 100 μs、间隔 100 μs 的直流电脉冲; Ele+6-DMAP: 电激活后用 2 mmol/L6 二甲基氨基嘌呤处理 4 h Ele+CHX+CB: 电激活后用 10 μg/mL 细胞松弛素 B 和 10 μg/mL 放线菌酮处理 4 h

必须通过人为的方法使重构胚内游离的钙离子浓度升高. 高压的直流电场脉冲在胞质膜上形成临时的小孔, 因而允许细胞内和细胞外离子和分子的转换. 跨膜钙的增加最终引起了胞内钙的升高, 而导致卵的激活. 尽管电穿孔法导致胞质内自由钙的升高, 它提供仅仅单一的钙转换而不是钙震荡[24]. 所以单一的钙转换只能使那些蛋白合成能力低的老龄卵激活而不能有效诱导早期发育的卵 MPF 的失活, 这可能导致 MPF 和 MAP 的重新激活, 阻碍了卵发育进程[1]. 电激活只是降低了 MPF 的活性而不是 MAPK 的活性[7]. 防止 MPF 的重新激活一个可能的方法是通过使用蛋白合成或蛋白激酶抑制剂. CHX 是蛋白合成抑制剂, 能阻止 CB 的合成、MPF 调节能力. CB 是在细胞间期产生, 有丝分裂开始后立即消失, 抑制 CB 的合成显著地降低 MPF 合成. 6-DMAP 是蛋白激酶抑制剂, 通过调节 MAPK 的失活而使 MPF 催化亚基失活[25].

在孤雌发育中, 研究结果表明电激活加化学药物(CHX, 6-DMAP)的联合激活大大提高了成熟卵母细胞孤雌发育能力. 联合激活相对于电激活的囊胚率和扩张囊胚率都有提高, 但卵裂率和囊胚细胞数没有提高. 联合激活不但提高了孤雌囊胚的发育而且提高了扩张囊胚所占的比率. 激活后的重构胚通常要用 CB 处理 3~4 h, 以防止第二极体排出, 维持正常的二倍体核型. 所以 CHX 组还加 CB 以维持孤雌胚的正常核型. 电激活后加 6-DMAP 处理的囊胚率比 CHX+CB 组的囊胚率高. 有研究表明 6-DMAP 处理的孤雌卵 H1 的激活曲线和体外受精的曲线相似, DMAP 可以阻止第二极体的排出, 而维持二倍体的核型. DMAP 处理组的囊胚增加不是因为阻止第二极体的排出维持正常的核型造成囊胚率增加而是对 MPF 活性影响造成的[25]. 因此联合激活方法提供了有效的刺激去诱导 MPF, MAPK 两者的失活, 激发更高的原核信息[7], 促进更高的后期发育率. 有文章说正常的核型可以提高囊胚率, 这也可能是联合激活有更高囊胚率的另一个原因[26].

在 NT 胚的发育中, 6-DMAP 联合激活的效果非常差甚至还不如电激活组. 有文献报道: 电融合后直接放入 6-DMAP 组中没有过 20 min 再放入 6-DMAP 组的囊胚发育率高[12], 说明 6-DMAP 对 NT 胚的激活时间段能影响囊胚的发育. 本实验中采用的是电激活后直接放入 6-DMAP 中处理, 这可能是造成囊胚率低的原因. 这也说明 PA 胚和 NT 胚的激活机制有一定的区别, 因为 NT 胚是电融合的同时被激活, 所以在 PA 中获得的结果和 NT 结果不一定完全匹配. 也有文献报道, 6-DMAP 的作用可能是物种特异的[25]. Kim 等人[14]通过比较 6-DMAP 对 PA 胚和 NT 的作用囊胚核型发现, 6-DMAP 提高了 PA 胚囊胚率, 而且囊胚具有正常核型; 6-DMAP 也能提高 NT 囊胚率, 但异常核型的囊胚比较多. 这些情况说明 6-DMAP 对猪 NT 发育作用机理还需要进一步的研究, 目前还没有找到一个最佳的处理方式. CHX+CB 方法虽然显著地提高了 NT 胚的囊胚率但没有显著提高优质囊胚的数量. 核移植实验所用的体细胞是表达 GFP 的胎儿成纤维细胞, 囊胚是表达 GFP 的囊胚, 确保了 NT 数据的准确性.

克隆猪出生结果表明, 不管是联合激活还是季

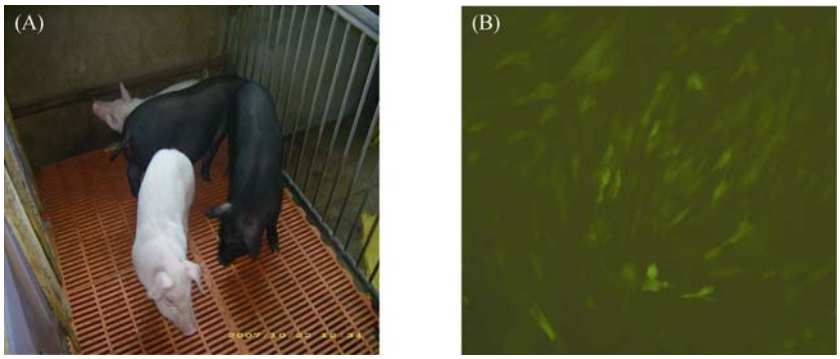


图 4 克隆猪照片和克隆猪耳组织细胞

(A) 目前存活的克隆猪照片; (B) 采克隆猪耳组织培养的细胞, 在荧光显微镜下可看到 GFP 的表达(200×)

节对克隆猪出生率都没有显著的影响. 因为每次胚胎移植受许多外界条件的影响, 所以这里没有给出克隆猪移植怀孕率的比较, 只是比较了 3 头怀孕到期的克隆猪出生率. 虽然每组只有一头代孕猪, 但因为每次移植的重构胚的数量是足够多的(170~340 枚 NT 胚), 也能准确反映 NT 胚的发育能力. 当然这个结果还需要进一步的重复实验进行验证. 但不论电激活还是联合激活都能得到克隆猪.

猪是全年发情的动物, 其卵母细胞发育能力从理论上说应该没有区别. 但由于猪卵中含有大量的脂肪滴, 这可能造成猪卵对温度的敏感性[27,28], 使得春季收集的猪卵母细胞质量好于冬季收集的猪卵母细胞. 春季和冬季进行移植, 克隆猪出生率没有显著区别.

联合激活所起的作用就如同降低囊胚形成的门槛, 而不是从本质上改善胚胎的质量. 如果我们要想从根本上改善胚胎的质量, 就应该从分子水平上考虑. 核成熟反映染色体从 GV 期到 MⅡ期的状态, 细胞质成熟包含每个细胞器从 GV 期到 MⅡ期的分配和组建. 分子成熟是 GV 期累积的分子指令, 控制着核和胞质的发展. 卵的核成熟程序在卵从卵泡中排出后自动打开. 减数分裂的恢复诱导一个转录的阻碍, 限制了卵的分子编程要求. 因而对卵的分子编程的修饰必须出现在 GVBD 以前. 修饰卵的过程可以通过在体外阻止减数分裂去培养卵进而影响卵的编程, 或是在开始核成熟前通过卵泡处理来改变卵的编[29]. GVBD 和 MⅠ称过渡期的卵, 后期、末期和 MⅡ卵称为成熟期卵. GV 期的阻断剂必须有 3 个特征, 高效率的减数分裂阻断, 并能恢复减数分裂的能力, 并且被处理卵的后期发育展能力[30]. 如果从这些方面着手才能从本质上改变卵母细胞体外发育能力, 最终提高克隆效率.

致谢 衷心感谢北京嘉捷康宁生物技术公司王刚, 农业生物技术国家重点实验室费菁在实验取材方面提供的帮助. 感谢中国农业大学动物科技学院郑淑华在数据处理方面的帮助.

参考文献

1 Nanassy L, Lee K, Javor A, et al. Effects of activation methods and culture conditions on development of parthenogenetic porcine embryos. Anim Reprod Sci, 2008, 104: 264—274[DOI]
2 Lai L, Kolber-Simonds D, Park K W, et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. Science, 2002, 295: 1089—1092[DOI]
3 Onishi A, Iwamoto M, Akita T, et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. Science, 2000, 289: 1188—1190[DOI]
4 Polejaeva I A, Chen S H, Vaught T D, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. Nature, 2000, 407: 86—90[DOI]
5 Naruse K, Quan Y S, Kim B C, et al. Brief exposure to cycloheximide prior to electrical activation improves *in vitro* blastocyst development of porcine parthenogenetic and reconstructed embryos. Theriogenology, 2007, 68: 709—716[DOI]
6 Lai L, Prather R S. Production of cloned pigs by using somatic cells as donors. Cloning Stem Cells, 2003, 5: 233—241[DOI]
7 Im G S, Seo J S, Hwang I S, et al. Development and apoptosis of pre-implantation porcine nuclear transfer embryos activated with different combination of chemicals. Mol Reprod Dev, 2006, 73: 1094—1101[DOI]
8 Varga E, Pataki R, Lorincz Z, et al. Parthenogenetic development of *in vitro* matured porcine oocytes treated with chemical agents. Anim Reprod Sci, 2008, 105: 226—233[DOI]
9 Lee J W, Tian X C, Yang X. Optimization of parthenogenetic activation protocol in porcine. Mol Reprod Dev, 2004, 68: 51—57[DOI]
10 Yi Y J, Park C S. Parthenogenetic developme nt of porcine oocytes treated by ethanol, cycloheximide, cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine. Anim Reprod Sci, 2005, 86: 297—304[DOI]
11 Kim N H, Moon S J, Prather R S, et al. Cytoskeletal alteration in aged porcine oocytes and parthenogenesis. Mol Reprod Dev, 1996, 43(4): 513—518[DOI]
12 Im G S, Samuel M, Lai L, et al. Development and calcium level changes in pre-implantation porcine nuclear transfer embryos acti-

vated with 6-DMAP after fusion. Mol Reprod Dev, 2007, 74: 1158—1164[DOI]
13 Che L, Lalonde A, Bordignon V. Chemical activation of parthenogenetic and nuclear transfer porcine oocytes using ionomycin and strontium chloride. Theriogenology, 2007, 67: 1297—1304[DOI]
14 Kim Y S, Lee S L, Ock S A, et al., Development of cloned pig embryos by nuclear transfer following different activation treatments. Mol Reprod Dev, 2005, 70: 308—313[DOI]
15 Young, L E, Sinclair K D, Wilmut I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. Rev Reprod, 1998, 3: 155—163[DOI]
16 Petters R M, Wells K D. Culture of pig embryos. J Reprod Fertil Suppl, 1993, 48: 61—73
17 张运海, 潘登科, 孙秀柱, 等. 利用体细胞核移植技术生产表达绿色荧光蛋白的猪转基因克隆胚胎.中国科学 C 辑: 生命科学, 2005, 35(5): 439—445
18 Zhang Y H, Pan D K, Sun X Z, et al. *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: 239—247[DOI]
19 Zhang K, Wang S H, MaY F, et al. Effects of leptin supplementation in *in vitro* maturation medium on meiotic maturation of oocytes and preimplantation development of parthenogenetic and cloned embryos in pigs. Anim Reprod Sci, 2007, 101: 85—96[DOI]
20 潘登科, 张运海, 孙秀柱, 等. 低氧培养早期胚胎克隆小型猪, 科学通报, 2006, 51: 415—418
21 Liu L, Moor R M. Factors affecting electrical activation of porcine oocyte matured *in vitro*. Anim Reprod Sci, 1997. 48: 67—80[DOI]
22 张坤, 张运海, 潘登科, 等. 季节对猪体外成熟卵母细胞的发育能力的影响. 自然科学进展, 2007, 17: 963—967
23 Whitaker M. Calcium at fertilization and in early development. Physiol Rev, 2006, 86: 25—88[DOI]
24 Zimmermann U, Vienken J. Electric field-induced cell-to-cell fusion. J Membr Biol, 1982, 67: 165—182[DOI]
25 Grupen C G, Mau J C, McIlfatrick S M, et al. Effect of 6-dimethylaminopurine on electrically activated *in vitro* matured porcine oocytes. Mol Reprod Dev, 2002, 62: 387—96[DOI]
26 Cha S K, Kim N H, Lee S M, et al. Effect of cytochalasin B and cycloheximide on the activation rate, chromosome constituent and *in vitro* development of porcine oocytes following parthenogenetic stimulation. Reprod Fertil Dev, 1997, 9: 441—446[DOI]
27 Li G P, Seidel G E, Squires E L. Intracytoplasmic sperm injection of bovine oocytes with stallion spermatozoa. Theriogenology, 2003, 59: 1143—1155[DOI]
28 Li R, Lai L, Wax D, et al. Cloned transgenic swine via in vitro production and cryopreservation. Biol Reprod, 2006, 75: 226—230[DOI]
29 Sirard M A. Resumption of meiosis:mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. Theriogenology, 2001, 55: 1241—1254[DOI]
30 Le Beux G, Richard F J, Sirard M A. Effect of cycloheximide, 6-DMAP, roscovitine and butyrolactone I on resumption of meiosis in porcine oocytes. Theriogenology, 2003, 60: 1049—1058[DOI]