

由成年转基因山羊体细胞而来的克隆山羊

成 勇^{1*} 王玉阁² 罗金平¹ 沈 玉² 杨跃飞¹ 鞠辉明¹
邹贤刚³ 徐少甫¹ 劳为德² 杜 森²

¹(扬州大学畜牧兽医学院 扬州 225009)

²(中国科学院发育生物学研究所 北京 100080)

³(The Babraham Institute, Babraham, Cambridge CB2 4AT, UK)

摘 要 在已经获得的乳腺特异性表达人促红细胞生成素(rhEPO)成年转基因山羊(*Capra hircus*)的基础上,取其耳尖成纤维细胞和卵巢颗粒细胞,进行体外传代培养,然后将这种培养的转基因山羊的体细胞移入去核的处于第Ⅱ次减数分裂中期的卵母细胞中,并进行电融合,构建重构胚胎,重构胚胎在体内培养6d,再将发育至囊胚或桑椹胚的重构胚胎移入同步情期的寄母羊子宫内。结果,有2只寄母羊妊娠并最终产下2只成活的克隆山羊。她们分别来自同一成年母羊的耳尖成纤维细胞和卵巢颗粒细胞。克隆羊经PCR-RFLP图谱分析显示:以克隆羊组织DNA为模板的PCR产物与相应的提供体细胞的基因羊的PCR产物的酶切图谱完全一致;并且经PCR对外源hEPO基因检测表明2只克隆山羊均携带hEPO外源基因。由此证明获得了转基因成年体细胞的克隆山羊。

关键词 山羊, 转基因动物, 成纤维细胞, 颗粒细胞, 克隆

中图分类号 Q813.6;Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2002)01-0079-05

自从1997年英国报道了体细胞克隆绵羊——“多莉”以来^[1],国际上许多研究者一直在进行不同类型的体细胞克隆研究,并相继获得了体细胞克隆牛、山羊、鼠和猪^[2-5]。从这些报道的结果来看,大部分体细胞克隆的供核细胞来源于生殖系统相关的体细胞,如乳腺上皮细胞、卵巢颗粒细胞、输卵管上皮细胞,因此大多数学者认为采用与生殖有关的体细胞克隆的成功率要明显高于其它类型的体细胞。1999年,王玉阁等报道在中国获得了山羊胎儿成纤维细胞的克隆羊^[6];2000年,杨向中等用成年牛耳尖成纤维细胞进行克隆也得到了克隆牛^[7];Baguisi等用转基因山羊胎儿成纤维细胞获得了转基因克隆山羊^[8]。但是,迄今为止,尚未见有用成年转基因山羊作供核细胞的转基因体细胞克隆的报道。

从理论上来说,经克隆(无性繁殖)产生的后代在遗传组成方面与供核细胞的基因组完全一致。由此可推断,由转基因动物提供的体细胞所产生的克

隆动物,应该携带与供核细胞相对应的外源基因。在此基础上,可以利用成年转基因动物的体细胞克隆出大量转基因动物。

随着转基因克隆研究的进展,尤其是转基因家畜乳腺生物反应器逐渐走向商业应用^[9-11]。转基因动物的克隆不仅可以从理论上探索外源基因的传代过程中的遗传稳定性;而且在商业上有很好的应用前景,加速转基因动物的繁殖,保证转基因动物的稳定表达。

1 材料与方 法

1.1 供质卵母细胞的准备

供质羊选用成年长江三角洲白山羊,两次注射PG调节母羊的情期,连续3天注射FSH,每天2次,在注射LRH26~30h后,手术回收中Ⅱ期卵母细胞,回收的卵母细胞在37℃,50%CO₂,M2培养液中作短期培养。如卵母细胞周围有颗粒细胞,可用透明质酸酶去除。

收稿日期:2001-08-03,修回日期:2001-10-25。

基金项目:国家重点基础研究发展规划(973)项目(No.2000016107)和国家自然科学基金重点项目资助(No.39830280)。

* 通讯作者。 Tel:86-514-7979348; Fax:86-514-7350440; E-mail:yz.dyx@public.yz.js.cn

1.2 卵母细胞的去核

将卵母细胞在含有 $7.5\mu\text{g}/\text{mL}$ 细胞松弛素 (CB) + M2 培养液组成的显微操作液中, 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 培养 30min, 每次取 20 ~ 30 枚卵母细胞移入显微操作液, 在 Olympus 显微镜下将位于第一极体处的中期染色体和部分细胞质去除。

1.3 卵巢颗粒细胞和成纤维细胞的分离和培养

1.3.1 卵巢颗粒细胞的培养: 选用 hEPO 转基因的花母羊 (长江三角洲白山羊与济宁青山羊的杂交后代, 编号: MF-2), 经超排, 在发情之后和排卵之前手术剖腹, 直视下穿刺和抽取较大的卵巢滤泡, 在解剖镜下检查并取出颗粒细胞和卵母细胞, 经透明质酸酶消化, 颗粒细胞移入培养液 (DMEM + 10% FBS, 37°C , $5\% \text{CO}_2$) 中培养 (见图 1)。

1.3.2 耳尖皮肤成纤维细胞的培养: 利用同一只 hEPO 转基因的花母羊, 取 ($\sim 0.5\text{g}$) 耳尖皮肤, 清洗剪碎后胰蛋白酶消化, 分离得到的细胞在 DMEM + 10% FBS 的培养液, 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 中培养, 得到贴壁的培养细胞 (见图 1)。

1.3.3 供核细胞的饥饿: 将生长良好的培养细胞中的原培养液吸出, 并用 PBS 洗 2 次, 加入 DMEM + 0.5% FBS 培养液, 继续培养 1 ~ 3d。饥饿培养的细胞用胰蛋白酶消化, 悬浮细胞用作供核细胞。

1.4 供核细胞的移植

去核卵母细胞和供核细胞在含有 CB 的 M2 培养液中, 移核针吸取成纤维细胞或颗粒细胞, 移入去核卵母细胞的卵周隙中。

1.5 融合和激活

采用电融合法, 电融合操作在室温下进行, 将经短期恢复培养后的卵母细胞与供体细胞复合体移入融合液中 ($0.3\text{mol}/\text{L}$ 甘露醇, $0.1\text{mmol}/\text{L}$ MgSO_4 , $0.05\text{mmol}/\text{L}$ CaCl_2 和 3% BSA)。融合条件是: $1.25\text{kV}/\text{cm}$, $40\mu\text{s}$; 电刺激后, 重构胚胎在 M16 培养液中培养 30min, 检查其融合结果。融合卵在 M16 中培养 5h; 在激活液 ($5\mu\text{mol}/\text{L}$ 离子霉素 + $7.5\mu\text{g}/\text{mL}$ CB) 中 5min; 然后在含有 $2\mu\text{mol}/\text{L}$ 6-DMAP 和 $5\mu\text{mol}/\text{L}$ CB 的 M16 培养液中 5h; 最后在 M16 培养液中培养。

1.6 重构胚胎的体内培养

1.6.1 重构胚胎琼脂包埋: 用 1% 琼脂糖, 作双层包埋。包埋后的克隆胚胎移入同步情期羊的结扎后的输卵管内培养 6d。

1.6.2 回收体内培养的克隆胚胎: 手术回收体内培养的克隆胚胎, 在显微镜下判定其发育。

1.7 胚胎移植

选择正常发育的重构胚胎, 用外科手术的方法移入同步情期的寄母羊子宫内。一般每只羊移植 2 ~ 3 枚胚胎。

1.8 寄母羊妊娠诊断与妊娠期的护理

胚胎移植后 4 ~ 6 周进行超声波检查。用加拿大生产的 AMI-900 型 B 超仪, 配有 5M 的直肠探头进行妊娠诊断。以见到尿囊、胎儿或胎心搏动作为妊娠的判别标准。再过 2 ~ 3 周后复查 1 次, 对妊娠羊隔离饲养, 增加营养。

1.9 克隆羊的出生

在预产期前 10 天进行昼夜观察, 做好产前和难产的应急准备。正常生产的羊及时清理口鼻粘液, 消毒脐带。难产羊及时破腹产, 以保证羔羊成活。

1.10 克隆羊的 DNA 指纹分析和外源基因检测

1.10.1 指纹分析: 指纹分析采用 PCR 扩增与 PCR + RFLP (限制酶片段多态性分析) 的方法^[12]。采集克隆羊、寄母羊、正常羊的耳组织, 提取组织 DNA。山羊 MHC II 类 DRB 基因第二外显子的引物为:

(1) DRB1.1; 5'-ATCCCGTCTCTGCAGCACATTTTC-3'

(2) Gio; 5'-CGTACCCAGAGTGAGTGAAGTATC-3'

(3) DRB1.2; 5'-TCGCCGCTGCACACTGAAACTCTC-3'

以样品 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 第一轮以 (1)、(2) 为引物, 进行 10 个循环, 结束后再加入 (1)、(3) 引物进行第二轮扩增, 30 个循环。PCR 产物经 RsaI (Boehringer Mannheim) 消化、凝胶电泳后, 观察结果。

1.10.2 外源转基因检测: 外源基因检测采用 PCR 扩增法。DNA 获取同上, EPO 基因的 PCR 引物:

5'-AACGTCGACGATGACGATAAG-3'

5'-CTCTGGATTTCAGAGTTGCTCT-3'

扩增产物经凝胶电泳后, 与阳性对照一致, 可判定为阳性。

2 结果和讨论

2.1 不同类型体细胞与去核卵母细胞的融合率和克隆胚胎的发育率

不同细胞类型、培养代数和饥饿天数与融合率和发育率的关系见表 1。

从表 1 中可以看出, 卵巢颗粒细胞与去核卵母细胞的融合率为 86.7% ~ 100.0%, 平均为 93.4%; 成纤维细胞与去核卵母细胞的融合率为 50.0% ~ 62.2%, 平均为 57.9%。卵巢颗粒细胞用于克隆的融合率高于成纤维细胞的融合率, 其差异明显 ($P <$

0.01)。根据我们检测的结果:颗粒细胞的直径为 $\sim 26\mu\text{m}$,而成纤维细胞的直径为 $\sim 19\mu\text{m}$ 。可见,供核细胞的直径大小与融合率相关,供核细胞直径越大,融合率增高。这与我们以前的结果类似,即影响融合率的主要因素之一是:与细胞的大小和细胞表面的绒毛有关^[6]。在本研究中发现用原代的卵丘细胞

(直径较小; $\sim 10\mu\text{m}$)作为供核细胞时,其融合率仍可达到80%。这可能同供核细胞与去核卵母细胞接触的紧密程度有关。随着细胞培养时间的增长,培养细胞逐步老化,细胞表面的绒毛增多、增长对融合率也会有影响。

表 1 不同供体细胞组成重构胚胎的融合率和发育率

Table 1 *in vivo* development of embryos reconstructed with different donor cells

Cell type injected	Culture passage(P ₁)	Starvation period	No. of fusion/%	No. of embryos developing to morulae/blastocyst/%
MF-2/OC*	3	2.5	26/30(86.7)	10/24(41.7)
MF-2/OC	4	3	26/28(92.9)	7/22(31.8)
MF-2/OC	3	3.5	33/33(100.0)	1/26(3.8)
Average			85/91(93.4)	18/72(25.0)
MF-2/AF**	1	2	23/37(62.2)	2/22(9.1)
MF-2/AF	5	3	10/20(50.0)	2/9(22.2)
Average			33/57(57.9)	4/31(12.9)

* OC as cumulus cells; ** AF as fibroblasts

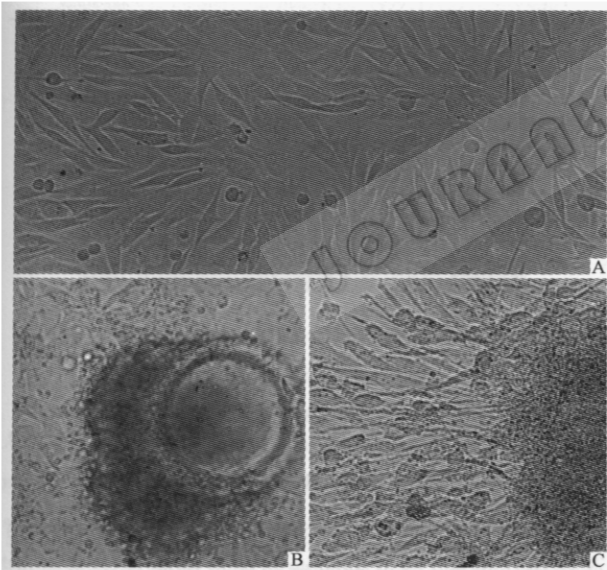


图 1 体外培养的成年成纤维细胞(A)和卵巢颗粒细胞(B和C)($\times 120$)

Fig.1 Fibroblasts (A) and cumulus cells (B and C) cultured *in vitro* for 10 days ($\times 120$)

重构胚胎的发育率与供核细胞的类型也有关。由卵巢颗粒细胞构建的重构胚胎的发育率为3.8%~41.7%,平均为25.0%;由成年成纤维细胞所组建的重构胚胎的发育率为9.1%~22.2%,平均为12.9%。由成纤维细胞所组建的克隆胚胎的发育率低于由卵巢颗粒细胞构建的重构胚胎的发育率。但

为什么会出现这样的差异,是一个非常复杂的发育生物学问题,也是当今哺乳动物克隆的研究重点之一,这可能部分取决于细胞核与卵母细胞质的相互作用,细胞核DNA与线粒体DNA的相互作用等。

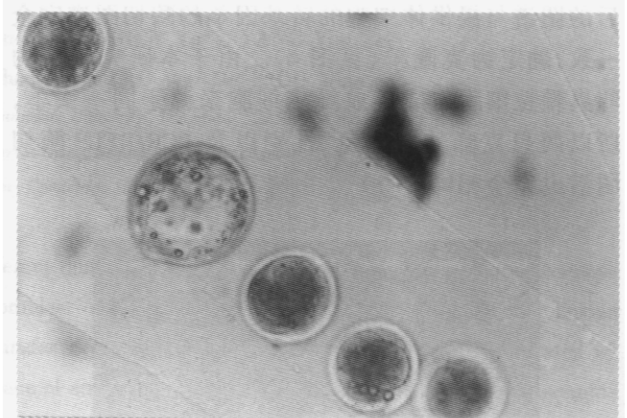


图 2 体内培养 6d 的重构囊胚(左)和异常发育的克隆胚胎(右)($\times 100$)

Fig.2 Reconstructed blastocysts after cultured *in vivo* for 6 days ($\times 100$)

2.2 寄母羊妊娠检查和克隆羊的出生

按寄母羊发情日为0d计算,在第28~40天用B超探查寄母羊,结果两头寄母羊(NT-1、NT-9)确定为妊娠,并且胎儿发育正常,胎心搏动明显(见图3)。

在两只确定妊娠的寄母羊中,NT-1妊娠至第



图3 克隆羊(C-4F和C-5F)和克隆供体细胞羊(中)
Fig.3 Cloned goats C-4F(left)from fibroblasts and
C-5F(right)from cummulus cells

148天自然产出1只羔羊;寄母羊NT-9妊娠至154天出现分娩征兆,但由于分娩过程较长,肌肉阵缩无力。因此立即采取了破腹产手术,取出1只羔羊,这只羊除左前肢稍有跛行外,其它发育均正常。出生的2只克隆羊的毛色有典型的花纹、雌性;这与所用的供体细胞基因羊完全一致。2只克隆羊的初生体重分别为2165g和2160g(见图3),在同种羔羊中属正常体重。

根据表2的结果,成纤维细胞作为供核细胞的克隆羊的出生率和妊娠率较高,但由于试验材料较少,无统计学意义。2只克隆羊的出生,证明山羊成纤维细胞和卵巢颗粒细胞一样,可以在去核卵母细胞中达到去分化和恢复全能性,并且重构胚胎可正常发育成个体^[13]。

表2 体细胞克隆山羊的出生情况

Table 2 Rates of somatic cloned goats born of reconstructed embryos

No. of foster mather	Donor cells	Blastocysts/morulae	No. of gestation	Lambs born	Serial number
2	Blastocysts	4	1(1/2)	1	C-4F
4	Cumulus cells	21	1(1/10)	1	C-5F

2.3 克隆羊亲子鉴定

采用对山羊MHC II类DRB基因第二外显子的PCR/RFLP分析:克隆羊的PCR产物,经*Rsa*I酶切后的图谱与提供体细胞的转基因羊的酶切图谱完全一致,确定为克隆羊(见图4)。由于本研究所用的卵巢颗粒细胞与成年成纤维细胞来源于同一头羊,所以两只克隆羊的毛色、性别以及PCR/RFLP酶切图谱也完全相同。

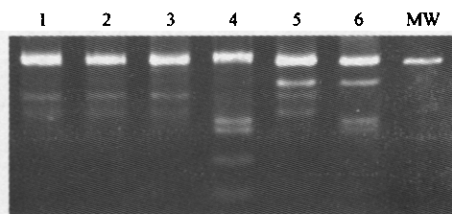


图4 克隆羊PCR-RFLP分析

Fig.4 Cloned goats fingerprints

1. Cloned goat C-4F; 2. Cloned goat C-5F; 3. Donor cell goat;
4. Foster mother for cloned C-4F; 5. Foster mother for cloned C-5F;
6. Control goat DNA; MW. Molecular weight

2.4 克隆羊的hEPO转基因检测

克隆羊C-4F、C-5F和提供体细胞的基因羊的DNA,以及转基因阳性和阴性对照DNA,经hEPO特异PCR引物的扩增有与阳性对照相同的条带(图5)。

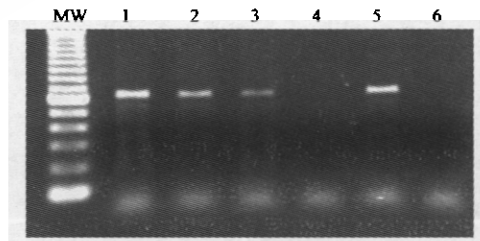


图5 克隆羊的EPO转基因分析

Fig.5 EPO transgenic detect

1. Cloned goat C-5F; 2. Cloned goat C-4F; 3. Donor goat for cells;
4. Negative DNA control; 5. EPO transgenic goat (positive control);
6. Water control; MW. Molecular weight

总之,这一研究说明:转基因羊的体细胞核,经体外传代培养,可以在去核的卵母细胞质中去分化、支持克隆胚胎的正常发育,并得到正常个体;而且证明山羊体细胞中的外源基因也能在克隆过程中稳定地复制和传代。由此显示:转基因动物不仅可以通过自然交配来繁殖,而且还可以通过体细胞克隆的方法进行无性繁殖,并且获得的克隆后代为100%的转基因动物。这将对转基因动物应用于畜牧生产、动物模型、生物制药等方面有重大意义^[14-15]。

致 谢:参加本研究工作的还有唐慧林、穆宗尧、耿世忠、孙长美、吴维芬、刘思国、郭鹏、张旭晨、颜桂军。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, **385**: 810 ~ 813
- [2] Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J *et al.* Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 1998, **280**: 1256 ~ 1258
- [3] Wells D N, Misica P M, Tervit H R. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod*, 1999, **60**(4): 996 ~ 1005
- [4] Wakayama T, Perry A C, Zuccotti M *et al.* Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 1998, **394**: 369 ~ 374
- [5] Onishi A, Iwamoto M, Akita T *et al.* Cloned pig produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 2000, **407**: 86 ~ 90
- [6] WANG Y G(王玉刚), ZOU X G(邹贤刚), CHENG G X(成国祥) *et al.* Cloned goats (*Capra hircus*) from fetal fibroblast cell lines. *Chinese Science Bulletin* (科学通报), 1999, **44**(21): 2319 ~ 2323
- [7] Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J *et al.* Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 2000, **97**: 990 ~ 995
- [8] Baguisi A, Behboodi E, Melican D *et al.* Production of goats by somatic nuclear transfer. *Nat Biotechnol*. 1999, **17**(5): 456 ~ 461
- [9] CHENG Y(成勇), CHENG G X(成国祥), WANG X L(王杏龙) *et al.* Study on special expression feature of mammary gland in transgenic goats. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Science* (畜牧兽医学报), 1999, **30**(3): 193 ~ 199
- [10] ZHANG J P(张靖涛), LAO W D(劳为德), CHENG Y(成勇) *et al.* Expression construction of HbsAg gene directed by bovine α -casein control sequence in transgenic goats. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1997, **13**(2): 154 ~ 159
- [11] Hill J R, Roussel A J, Cibelli J B *et al.* Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology*, 1999, **51**: 1451 ~ 1465
- [12] Amills M, Francino O, Sanchez A. A nested PCR allows the characterization of TaqI and PstI RFLPs in the second exon of the caprine MHC class II DRB gene. *Vet Immunol Immunopathol*, 1996, **48**: 313 ~ 321
- [13] Hill J R, Winger Q A, Long C R *et al.* Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Bio Reprod*. , 2000, **62**: 1135 ~ 1140
- [14] Schnieke A E, King A J, Ritchie W A *et al.* Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 1997, **278**(5346): 2130 ~ 2133
- [15] Wilmut I, Campbell K H S. Quiescence in nuclear transfer. *Science*, 1988, **281**(5383): 1611

Cloned Goats Produced from the Somatic Cells of an Adult Transgenic Goat

CHENG Yong^{1*} WANG Yu-Ge² LUO Jin-Ping¹ SHEN Yu² YANG Yue-Fei¹JU Hui-Ming¹ ZOU Xian-Gang³ XU Shao-Fu¹ LAO Wei-De² DU Miao²¹ (Animal Science and Veterinary medicine college of Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)² (Developmental Biology of Chinese Academy Sciences, Beijing 100080, China)³ (The Babraham Institute, Babraham, Cambridge CB2 4AT, UK)

Abstract This study was carried out to examine the effect of different donor cell type and micro-manipulation on the development of reconstituted embryos. Cultured mural cumulus cells or fibroblast cells from an adult transgenic goat expressing human erythropoietin (rhEPO) were used as the donor cells in nuclear transfer experiments. The reconstituted eggs were generated by transferring fibroblast cells or cumulus cells into the perivitelline space of enucleated M II oocytes and then followed by electrofusion and activation. After 6 days' incubation *in vivo*, the reconstructed embryos developed into morulae or blastocysts were transferred into 6 foster recipients. Two of the foster-mothers were pregnant and gave birth to two offspring, which were derived from the fibroblast cell and cumulus cell, respectively. Fingerprint analysis showed that the PCR-RFLP patterns of the two offspring were identical to that of donor goats. PCR results indicated that these cloned goats carried hEPO gene as same as their donor cells.

Key words goat, transgenic animal, fibroblast cells, cumulus cells, cloning

Received: 08-03-2001

This work was supported by grants from the Special Funds for Major State Basic Research (973) of China (No. 2000016107) and the National Natural Science Foundation of China (No. 39830280).

* Corresponding author. Tel: 86-514-7979348; Fax: 86-514-7350440; E-mail: yz.dyx@public.yz.js.cn