文章编号:1671-9964(2012)06-0047-04 **DOI**:10.3969/J.ISSN.1671-9964.2012.06.009

用KOSR优化山羊克隆胚的培养体系

陈 威[1,2],胡 伟[1,2],曹 辉[1,3],李 凯[1,2],王清泉[1,2],
蔡 勤[1,2],蔡琳琳[1,2],刘 宇[1,2],习书斌[1,3],李 华[1,2],
陈美珏[1,2],黄 英[1,2],黄淑帧[1,2],曾凡一[1,2,4]

(1.上海市儿童医院 上海医学遗传研究所,上海交通大学 医学遗传研究所,上海 200040;
2.卫生部医学胚胎与分子生物学重点实验室暨上海市胚胎与生殖工程重点实验室,上海 200040;
3.上海滔滔转基因工程股份有限公司,上海 201604;4.上海交通大学 医学院 医学科学研究院,上海 200025)

摘 要:体细胞核移植重构胚的体外培养一直是影响山羊克隆效率的一个重要因素,为了排除成分复杂的胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)对克隆重构胚发育的潜在抑制作用,本研究采用成分明确的血清替代品(knockout serum replacement,KOSR)进行山羊体细胞克隆重构胚胎的体外培养,并比较KOSR与FBS对重构胚的发育效率的影响。结果显示,KOSR组山羊重构胚培养体系的分裂率明显高于FBS组(80.67±0.63%. vs 49.02±4.85%,$P<0.01$),2组在重构胚重编程过程中的8细胞率具有显著差异(48.89±1.92% vs. 28.59±3.13%,$P<0.05$);2组不同培养体系的受孕率也有明显不同(33.3% vs. 10%,$P<0.05$)。研究结果表明,KOSR培养体系能有效提高山羊重构胚的发育效率,特别是有利于重构胚的早期重编程,为获得健康的转基因克隆山羊奠定了良好的基础。

关键词:血清替代品(KOSR);山羊体细胞克隆;重构胚;重编程;发育
中图分类号:S814.8 **文献标识码**:A

Optimization of Culture Technique for Goat Embryos Cloning with KOSR

CHEN Wei[1,2], *HU Wei*[1,2], *CAO Hui*[1,3], *LI Kai*[1,2], *WANG Qing-quan*[1,2],
CAI Qin[1,2], *CAI Lin-lin*[1,2], *LIU Yu*[1,2], *XI Shu-bin*[1,3], *LI Hua*[1,2],
CHEN Mei-jue[1,2], *HUANG Ying*[1,2], *HUANG Shu-zhen*[1,2], *ZENG Fan-yi*[1,2,4]

(1. Shanghai Institute of Medical Genetics, Children's Hospital of Shanghai, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200040, China; 2. Key Laboratory of Medical Embryo and Molecular Biology of the Ministry of Health, Shanghai Key Laboratory of Embryo and Reproduction Engineering, Shanghai 200040, China; 3. Shanghai Tao Tao Transgenic Engineering Co., Ltd., Shanghai 201604, China; 4. Institute of Medical Sciences, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract: The *in vitro* culture of cloned embryos established by nuclear transplantation is a key factor affecting the efficiency of goat cloning system. To develop an effective culture system for cloned goat embryos, knockout serum replacement (KOSR) was used to take over fetal bovine serum (FBS) in an *in*

收稿日期:2012-07-04
基金项目:国家科技重大专项(2011ZX08008-004,2009ZX08010-018B);国家自然科学基金杰出青年基金(81125003);遗传学国家重点学科,遗传学上海市重点学科(B204)

作者简介:陈威(1982-),男,硕士,实习研究员,研究方向:分子生物学和胚胎工程,E-mail:44030455@qq.com;
胡伟(1976-)为本文并列第一作者,男,本科,畜牧师,研究方向:动物繁殖和胚胎工程技术,E-mail:hw761106@citiz.net;
曾凡一(1968-)为本文通讯作者,女,教授,博士生导师,研究方向:发育生物学和医学遗传学,E-mail:fzeng11@gmail.com

vitro culture system. The developmental potential and stability of the reconstructed embryos were then compared. The results showed that the cleavage rate from KOSR was significantly higher than that from FBS (80.67 ± 0.63% vs. 49.02 ± 4.85%, $P<0.01$). The 8-cell formation rate in KOSR cultured group was much higher than that in FBS (48.89±1.92% vs. 28.59 ± 3.13%, $P<0.05$). In addition, the pregnancy rate was significantly different between the two media groups (33.3% vs. 10%, $P<0.05$). This study demonstrated that using KOSR can benefit early reprogramming of cloned embryos and increase the development rate of goat cloned embryos. The culture system in this study greatly increased the efficiency for goat cloning and provides a valuable foundation for generating healthy cloned animals in the future.

Key words: knockout serum replacement(KOSR); somatic cell nuclear transfer; reconstructed embryo; reprogramming; development

在体细胞核移植中,重构胚的重编程是影响克隆效率的关键。目前重构胚的体外培养体系中都普遍加入胎牛血清(FBS)作为营养成分。由于FBS的成分的不确定性以及不同批号的不稳定性,在重构胚培养之前不得不对不同批次的FBS进行鉴定和比较,购置并冻存符合要求的FBS备用,这造成在筛选FBS的过程中浪费了珍贵实验材料、时间和人力。而Knockout血清替代品(knockout serum replacement,KOSR)是一种人工合成产品,成份明确,质量易于控制,目前已有报道将KOSR应用于干细胞的培养体系中[1],而在山羊体细胞克隆中尚未见报道。本研究首次应用KOSR培养体系以取代FBS进行山羊重构胚的培养,并与FBS培养体系在重构胚的分裂率、发育潜能及受孕率等方面进行比较。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和材料

必需氨基酸、非必需氨基酸、胎牛血清(FBS)、DMEM和KOSR均购自Gibco公司(美国);放线菌酮(cycloheximide, CHX)、细胞松弛素B(cytochslasin B, CB)、离子霉素(ionomycin)、Hoechest33342和DMSO购自Sigma公司(美国);Pronase购自CALBIOCHEM公司(美国)。核移植所用的体外操作液(TL-Hepes)、融合液(fusion media)、激活液(Z1)和胚胎体外培养液(ACM)均为本研究所自备[2]。其他试剂如无特殊说明均为Sigma公司产品。

1.2 试验动物

所有实验羊均由上海滔滔转基因工程股份有限公司的松江大动物实验基地提供。实验羊群都经长期观察具有良好的健康状况和稳定的发情周期。所有实验遵循上海交通大学医学院动物实验伦理委员会的许可及实验动物管理和使用指南。

1.3 山羊体细胞核移植和重构胚培养

1.3.1 卵母细胞体外成熟

卵母细胞从屠宰羊场的新鲜卵巢中获取。按本所常规方法[3]进行体外成熟培养。

1.3.2 体细胞核移植(SCNT)

供核细胞的制备和处理、成熟卵母细胞的去核、注核、融合和活化均按本所方法[2-4]进行。

1.3.3 重构胚的体外培养

实验设计分为FBS培养组(ACM+1% FBS)和KOSR培养组(ACM+1% KOSR)2组。活化后重构胚随机分成相等数目的2组,分别置于FBS和KOSR培养体系中进行培养。培养条件为5% CO_2,38.5 ℃和100%湿度。于活化后24与36 h不同时间点来描述并计算重构胚的卵裂率和发育效率。同样条件下的实验共进行了3次。

1.3.4 B超鉴定重构胚移植后的受孕情况

重构胚在8细胞期进行输卵管移植,应用B型超声仪(MEDISON SA.600)经腹部探查移植60 d后受孕情况[5]。

1.4 数据统计

数据用SPSS 11.5软件进行统计分析,以t-Test检验差异的显著性,$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 体细胞核移植后重构胚的体外发育效率

对202枚成熟卵母细胞进行了体细胞核移植,获得了144枚融合胚,然后分3批分别用FBS培养

体系和 KOSR 培养体系体外培养活化的重构胚，然后培养 24 h 和 36 h 后，观察 2 细胞和 8 细胞的数目，比较和分析 FBS 和 KOSR 对体细胞核移植重构胚发育的影响。结果显示：FBS 培养组重构胚的分裂率（2～4 细胞百分比）分别为 43.75%、50.00%和 53.30%，平均为 49.02±4.85%，而 KOSR 培养组重构胚的分裂率分别为 81.25%、80.77%和 80.00%，平均为80.67%±0.63%（表 1），2 组差异极为显著（$P<0.01$），表明 KOSR 与相应的 FBS 重构胚培养组比较，不仅分裂率高，而且 KOSR 培养液培养重构胚分裂较为稳定。

为了观察 FBS 和 KOSR 培养体系对重构胚分裂发育至 8 细胞期的影响，我们继而对 8 细胞期的重构胚数目进行了比较。结果显示，KOSR 培养组在 3 次实验中可以稳定地获得 8 细胞期的重构胚，8 细胞发育率分别为 50.00%、50.00%和 46.67%，平均为 48.89±1.92%；而 FBS 培养组的重构胚 8 细胞发育率分别为 25.00%、30.77%和 30.00%，平均为 28.58±3.13%，2 组之间差异显著（$P<0.05$）（表 1）。

表 1　KOSR 组和 FBS 组山羊体细胞核移植重构胚体外发育效率比较

Tab. 1　The comparison of the *in vitro* developmental efficiency of goat reconstruction embryos between KOSR and FBS groups

分组 Group	培养的重构胚数 No. of reconstructed embryos			2-4 细胞分裂率/% Cleavage rate	8 细胞生成率/% 8-cell rate
	1	2	3		
FBS	16	26	30	49.02±4.85^{A}	28.59±3.13^{a}
KOSR	16	26	30	80.67±0.63^{B}	48.89±1.92^{b}

注：A、B 表示差异极显著（$P<0.01$）；a、b 表示差异显著（$P<0.05$）。

Notes: A & B are significantly different ($P<0.01$), a & b are different ($P<0.05$).

2.2　重构胚的发育质量比较

重构胚的发育质量对胚胎移植后的受孕率有很大的影响，所以要求培养体系要很好地支持重构胚的正常发育。优质的重构胚必须是分裂相均匀，细胞大小一致，没有细胞分裂碎片，胚胎细胞比较致密，立体感强。活化完成后，重构胚分别用 KOSR 培养体系和 FBS 培养体系培养，于 24 和 36 h 观察 2～4 细胞和 8～16 细胞的生长状态。结果发现在 2～4 细胞期 KOSR 培养组的细胞状态好于 FBS 培养组的细胞（图 1），KOSR 培养组重构胚轮廓清晰，结构紧凑，无游离细胞；FBS 培养组发育状态不均衡，同期分裂球不均匀，有明显分裂碎片（箭头所示）。当发育至 8 细胞期以上，KOSR 培养组胚胎细胞分裂相均匀，已经明显进入压缩致密期，且立体感强（图 2）；FBS 培养组同期发育较缓慢，分裂球不均匀且有明显的分裂碎片（箭头所示）。

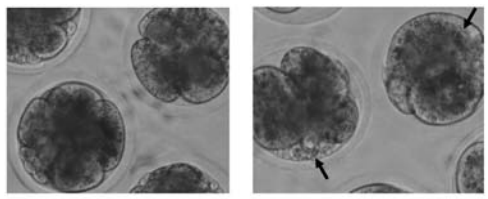

图 1　山羊重构胚在 FBS 和 KOSR 培养体系中培养 24 h 后发育情况比较

Fig. 1　The comparison of development quality of goat reconstruction embryos culturing in KOSR and FBS medium for 24 hours

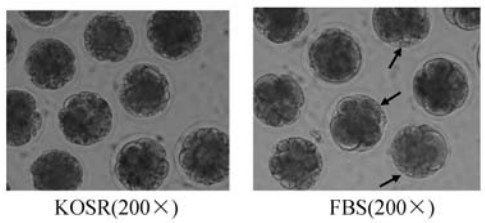

图 2　山羊重构胚在 KOSR 和 FBS 培养体系培养 36 h 后发育情况比较

Fig. 2　The comparison of development quality of goat reconstruction embryos culturing in KOSR and FBS medium for 36 hours

2.3　山羊克隆胚胎手术移植受孕情况

KOSR 培养组重构胚经输卵管移植 15 头受体羊，FBS 培养组重构胚输卵管移植 10 头受体羊。移植后 2 个月进行 B 超检查受孕情况，结果发现，KOSR 培养组重构胚移植后有 5 头受体羊怀孕，而 FBS 培养组重构胚移植后仅有 1 头受体羊怀孕（表 2）。

表 2　FBS 和 KOSR 培养重构胚受孕率的比较

Tab. 2　The comparison of pregnancy rate between FBS and KOSR groups

分组 Group	胚胎数 No. of embryos	受体羊数（平均移植胚胎数） No. of recipients (Average number of transfer)	移植后 60 d 怀孕数/% No. of pregnacy 60 day after transfer
FBS	21	10(2.1)	1(10.00%)
KOSR	32	15(2.1)	5(33.33%)

3　讨论

FBS 在牛和羊胚胎的体外培养过程中被广泛

使用。不少研究者认为,FBS的添加对牛胚胎早期的发育有抑制作用而对后期的发育则有促进作用[6-8],另有报道认为FBS对胚胎早期发育的抑制作用可能与大量的脂肪颗粒蓄积有关,通过显微操作去除了胚胎内的脂肪颗粒后不仅有利猪、牛的早期胚胎发育而且可以提高后期的桑椹和囊胚率[9-10]。目前在猪、牛、羊等大型动物体细胞核移植后重构胚的培养体系中通常添加FBS,但是其成分不确定性可能对大型动物克隆重构胚体外发育产生较大影响。因此寻求FBS的替代品并优化重构胚的培养体系对提高克隆效率具有重要的意义。

近年有学者在干细胞培养中用KOSR来替代FBS或血清,并产生比较满意的效果。KOSR是一种人工配制的产品,成份明确,质量易于控制,不像FBS或血清不同批次质量不同因而不能获得稳定的结果。从其申请的专利中可知,KOSR成分包括有机小分子(氨基酸、维生素和抗氧化剂),微量元素和3种蛋白质(胰岛素、转铁蛋白和富含脂肪酸白蛋白)[11]。近来我们应用KOSR培养系统将小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)诱导成iPS细胞(induced pluripotent stem cells),结果显示,KOSR培养体系较其他培养体系(包括FBS)更适合将MEF经重编程诱导成为iPS细胞,获得了37株表达多能性标记的iPS细胞系,并成功运用四倍体补偿技术获得3只来源于iPS细胞的小鼠[12]。王宏等[13]用KOSR代替FBS提高C57BL/6J小鼠胚胎干细胞建系效率的研究中也获得成功。上述研究表明,KOSR培养体系更有利于克隆胚胎和干细胞发育的重编程过程。

细胞的重编程是体细胞克隆过程中的关键性事件,其分子本质是基因组有序的时空表达。哺乳动物胚胎发育中胚胎细胞核基因开始并不表达,胚胎依靠卵母细胞质中储存的母源性物质存活和发育,在特定时期后胚胎基因才开始表达,这个时期称为母源-合子基因组表达转变期(maternal-zgyotic transition,MZT),而发育阻滞现象正好位于MZT期,被认为是重构胚基因组核基因重编程和基因活化启动转录及表达时期。不同动物的MZT出现时间不同,我们先前的研究表明,小鼠为2细胞期[14],而牛为8细胞期[15]。另有研究表明,牛的体细胞核移植重构胚分裂发育到8细胞后才完成重编程,此时基因组开始有序表达,供体细胞核基因的表达对克隆胚胎发育会有决定性的影响[15-16]。

本文的研究结果表明,在山羊重构胚的早期发育中,KOSR培养组的分裂效率明显高于FBS培养组,特别是在分裂至8～16细胞期时,KOSR培养组与FBS培养组的发育效率差异显著(表1),证明KOSR对于山羊体细胞核移植重构胚的早期发育非常有效,提示KOSR相对于FBS更有利于重构胚重编程的完成。因此可从上述研究结果中得出,KOSR培养体系可能更加有效地支持山羊克隆重构胚发育至8～16细胞,完成基因组重编程过程,为移植后胚胎在体内定植及完整发育提供了有利支持。

本文的研究结果还表明,KOSR培养组重构胚移植后的受孕率也优于FBS培养组,说明KOSR培养体系不仅有利于重构胚重编程的完成,而且可提高重构胚移植后在体内的发育能力,其受孕率明显提高,从而对于提高山羊体细胞核移植的总体效率发挥了重要的作用,为获得更多、更健康的转基因克隆山羊提供了有价值的科学依据和技术基础。

致谢:感谢曾溢滔院士、任兆瑞教授对本研究给予的指导和帮助,以及上海滔滔转基因工程股份有限公司的大力支持。

参考文献:

[1] Shimizukawa Rie, Sakata Aya, Hirose Michiko, *et al*. Establishment of a new embryonic stem cell line derived from C57BL/6 mouse expressing EGFP ubiquitously [J]. **Genesis**, 2005, 42: 47-52.

[2] 伏静,赵磊文,管鹏飞,等. 共培养体系中滋养层细胞对牛核移植胚胎早期发育的影响[J]. **上海交通大学学报(农业科学版)**, 2007, 25(6): 519-524.

[3] Huang S Z, Huang Y, Chen M J, *et al*. Selection of in vitro produced transgenic embryos by nested PCR for efficient production of transgenic goats [J]. **Theriogenology**, 2001, 56: 545-556.

[4] 赵磊文,伏静,管鹏飞,等. 胚胎移植时机对牛体细胞克隆胚胎妊娠率的影响[J]. **上海交通大学学报(农业科学版)**, 2008, 26(2): 96-100.

[5] 许淼,黄文英,胡伟,等. 超声引导下宫内移植制备人/山羊干细胞嵌合体的方法建立[J]. **实验动物与比较医学**, 2009, 29(4): 211-214.

[6] Rizos D, Gutie' rrez-Ada' n A, Pe' rez-Garnelo S, *et al*. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: Implications for blastocyst development cryotolerance, and messenger RNA expression [J]. **Biol Reprod**, 2003, 68: 236-243.

(下转第57页)