

# 细胞松弛素 B 对延边黄牛体细胞核移植效率的影响

宋君博, 林 涛, 胡艳明, 李钟淑, 方南洙\*  
(延边大学 农学院, 吉林 龙井 133400)

**摘要:** 探讨融合液、激活液中添加细胞松弛素 B (CCB) 对延边黄牛体细胞核移植效率的影响, 以摸索适合延边黄牛体细胞核移植的电融合、激活条件。结果表明, 融合液中添加  $7.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  CCB 组的桑葚胚及囊胚发育率显著高于其他 3 组; 激活液中添加  $5.0 \mu\text{g}/\text{mL}$  的 CCB 组的卵裂率、桑葚胚及囊胚发育率显著高于其他 3 组; 融合液、激活液中同时添加 CCB 的囊胚发育率高于单独添加组, 但是差异不显著。

**关键词:** 细胞松弛素 B; 体细胞核移植; 融合液; 激活液; 延边黄牛

中图分类号: S823.8<sup>+</sup>1 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2009)04-0123-04

## Effects of Cytochalasin B on the Efficiency of Somatic Cell Nuclear Transfer in Yanbian Yellow Cattle

SONG Jun-bo, LIN Tao, HU Yan-ming, LI Zhong-shu, FANG Nan-zhu\*  
(College of Agriculture, Yanbian University, Longjing 133400, China)

**Abstract:** To investigate the best conditions of electrofusion and activation for nuclear transplantation in Yanbian yellow cattle, the cytochalasin B (CCB) was added in the medium of fusion and activation and the efficiency of somatic cell nuclear transfer was determined. The result showed that the morula rate and the rate of development into blastocyst stage of the group added with  $7.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  CCB in fusion medium were significantly higher than that of other groups. The cleavage rate, morula rate and the rate of development into blastocyst stage of the group added with  $5.0 \mu\text{g}/\text{mL}$  CCB in activation medium were significantly higher than that of other groups. When the CCB was added in the fusion and activation media together, the rate of development into blastocyst stage was slightly higher than that added with CCB in fusion or activation medium alone, but no significant difference was observed.

**Key words:** Cytochalasin B; Somatic cell nuclear transfer; Fusion medium; Activation medium; Yanbian yellow cattle

哺乳动物体细胞核移植是将外源的单个细胞核与去核卵母细胞结合, 产生遗传同质动物的技术。其在动物育种、制备转基因动物、基因治疗及器官移植等方面具有重要作用。其中, 卵—核融合与激活过程是生产克隆动物的关键步骤之一, 直接影响着

核移植的成功率。目前为止, 电融合方法在核移植中的应用最广<sup>[1]</sup>。近年来, 运用电融合技术进行体细胞的核移植研究, 已在绵羊<sup>[2]</sup>、山羊<sup>[3]</sup>、牛<sup>[4~6]</sup>、小鼠<sup>[7]</sup>和猪<sup>[8,9]</sup>等动物上取得成功。核移植胚胎的充分激活是保证胚胎正常发育的先决条件, 卵母细胞

收稿日期: 2008-10-21

基金项目: 国家自然科学基金(30860184); 振兴东北老工业基地项目[发改高技(2004)2057号]; 延边大学合作项目[延大科合字(2005)06号]

作者简介: 宋君博(1983-), 女, 吉林通化人, 在读硕士研究生, 研究方向: 动物繁殖与生物技术。

通讯作者: 方南洙(1960-), 男, 吉林延吉人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事胚胎移植及转基因方面的研究。

只有激活后才能完成成熟分裂,并由此向有丝分裂过渡,开始新的个体发育。当前,动物克隆的总效率很低,很可能与受体卵母细胞未被充分激活有关。目前,细胞松弛素 B(CCB)被广泛用于哺乳动物细胞核移植研究中,可抑制极体的形成和染色体的排出,保证了核移植胚胎的染色体倍数。与其他激活剂配合使用,可提高激活的卵母细胞囊胚发育率。本试验以延边黄牛耳皮肤成纤维细胞为供核细胞,将融合、激活液进行优化,旨在探索出一种适合延边黄牛体细胞核移植的 CCB 添加方案。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂

细胞松弛素 B(CCB)、蔗糖、离子霉素、六-二甲氨基嘌呤(6-DMAP)、牛血清白蛋白(BSA)、谷胱甘肽、Tissue culture medium(TCM 199)、透明质酸酶、D-PBS(日本制药株式会社)、DMEM 粉末、胎牛血清(FBS)(杭州四季青动物药业)、孕马血清促性腺激素(宁波市激素有限公司)、人绒毛膜促性腺激素(宁波市激素有限公司)等,除特殊标明外,均购自于 Sigma 公司。

### 1.2 卵巢的采集

延边黄牛卵巢采自延吉市牛屠宰场。宰杀延边黄牛后 30 min 内取出卵巢,放于 37℃生理盐水中,6h 内运回实验室进行处理。

### 1.3 卵母细胞的体外成熟

从屠宰场收集牛的卵巢,用 38.5℃的生理盐水清洗数次后,抽取直径为 2~8mm 的卵泡。在实体显微镜下挑选出细胞质均匀、形态良好、结构致密的卵丘-卵母细胞复合体(COCs),放入平衡好的成熟培养小滴(90%的 TCM-199+10%的胎牛血清+10 $\mu$ g/mL PMSG+10 $\mu$ g/mL HCG)中,在 38.5℃、5%CO<sub>2</sub>(V/V)培养箱中成熟培养 20~22h。

### 1.4 供体细胞的准备

将处理好的延边黄牛耳尖部组织进行原代培养,待有细胞游离出来后去掉组织块。将成纤维细胞与上皮细胞系进行分离纯化,成纤维细胞进行传代培养。在注核前进行血清饥饿培养,培养好的成纤维细胞用胰蛋白酶消化;待细胞收缩变圆时,加入含 10%FBS 的 DMEM 培养液终止消化,放入注核操作液中以供注核。

### 1.5 卵母细胞的去核、注核

将成熟培养 20~22h 的卵母细胞放入含有 0.3%透明质酸酶的试管内振荡 6~7min,再用玻璃

管轻轻吹打,使卵丘-卵母细胞完全脱离。选择形态完整、细胞质均匀并排出第一极体的卵母细胞用于试验。采用第一极体引导的挤压去核法。注核时用注核管吸取已准备好的供体细胞,先回吸少量细胞质,再将细胞质连同供体细胞一起注入卵周隙中,使供体细胞与卵膜紧贴在一起,便于融合。

### 1.6 重组卵母细胞的融合、激活及体外培养

将注核后培养 2h 的重组卵母细胞放入添加不同浓度 CCB(0 $\mu$ g/mL、5.0 $\mu$ g/mL、7.5 $\mu$ g/mL、10.0 $\mu$ g/mL)的 0.28mol/L 的蔗糖融合液中洗 3 次;待细胞完全沉底后取出,放入融合小室。用手工拨动的方法调整细胞位置,使注入的成纤维细胞与细胞质的待融合两质膜平面与电场方向垂直,然后进行电脉冲刺激(融合场强为 1100V/cm,脉冲宽度是 20 $\mu$ s,2 次电脉冲),诱导供体细胞与去核卵母细胞相融合。

融合后,将重组卵母细胞放入 5 $\mu$ mol/L 离子霉素中预激活 5min。然后放入添加不同浓度 CCB(0 $\mu$ g/mL、2.5 $\mu$ g/mL、5.0 $\mu$ g/mL、7.5 $\mu$ g/mL)的 6-DMAP 中培养 3~5h,确定融合液与激活液中各自添加 CCB 的最佳浓度之后,在融合液和激活液中同时添加最佳浓度的 CCB,与单独添加最佳浓度的 CCB 进行比较,来确定最佳添加方案。将激活后的重组胚放入 CR1aa(95%CR1aa+5%FBS+0.3%BSA)中,在 38.5℃、5%CO<sub>2</sub>(V/V)的培养箱中培养 24h;每间隔 48h 观察胚胎发育率;72h 时半量换液。记录胚胎发育情况,并计算囊胚发育率。

### 1.7 统计分析

试验结果采用 SPSS14.0 进行统计,利用方差分析检验数据的差异性,差异显著标准为(P<0.05)。

## 2 结果与分析

### 2.1 融合液中添加不同浓度的 CCB 对体细胞核移植胚融合率及重组胚发育率的影响

融合液中添加 7.5 $\mu$ g/mL CCB 组的桑葚胚率和囊胚发育率显著高于其他 3 组;该组的融合率显著高于对照组和 5.0 $\mu$ g/mL 组,与 10.0 $\mu$ g/mL 组差异不显著;卵裂率显著高于对照组和 10.0 $\mu$ g/mL 组,与 5.0 $\mu$ g/mL 组差异不显著;对照组、5.0 $\mu$ g/mL 组和 10.0 $\mu$ g/mL 组的桑葚胚率及囊胚发育率均无显著性差异。由此得出,在融合液中添加 7.5 $\mu$ g/mL CCB 的融合效果最好,最有利于提高延边黄牛体细胞核移植胚的发育率(表 1)。

表 1 融合液中添加不同浓度的 CCB 对融合率及重组胚发育率的影响

| 组别( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) | 供试卵数(枚) | 融合率(%)                         | 卵裂率(%)                          | 桑椹胚率(%)                        | 囊胚发育率(%)                       |
|-------------------------------|---------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 对照                            | 107     | 70.06 $\pm$ 6.85 <sup>a</sup>  | 77.02 $\pm$ 13.14 <sup>a</sup>  | 13.94 $\pm$ 9.85 <sup>a</sup>  | 13.04 $\pm$ 8.79 <sup>a</sup>  |
| 5.0                           | 116     | 70.16 $\pm$ 5.27 <sup>a</sup>  | 84.93 $\pm$ 10.45 <sup>ab</sup> | 14.03 $\pm$ 8.30 <sup>a</sup>  | 12.93 $\pm$ 10.21 <sup>a</sup> |
| 7.5                           | 133     | 81.04 $\pm$ 10.27 <sup>b</sup> | 92.49 $\pm$ 7.91 <sup>b</sup>   | 23.06 $\pm$ 7.64 <sup>b</sup>  | 19.96 $\pm$ 9.90 <sup>b</sup>  |
| 10.0                          | 104     | 73.09 $\pm$ 8.13 <sup>ab</sup> | 75.03 $\pm$ 14.75 <sup>a</sup>  | 13.19 $\pm$ 11.57 <sup>a</sup> | 11.86 $\pm$ 10.89 <sup>a</sup> |

注: 同列肩标字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同

## 2.2 激活液中添加不同浓度的 CCB 对体细胞核移植胚发育率的影响

激活液中添加浓度 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CCB 试验组的卵裂率、桑椹胚率和囊胚发育率显著高于其他 3 组, 其

他 3 组之间各时期发育率均差异不显著。由此得出, 在激活液中添加 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CCB 组的囊胚发育率最高, 有利于提高延边黄牛体细胞核移植胚的发育率 (表 2)。

表 2 激活液中添加不同浓度的 CCB 对囊胚发育率的影响

| 组别( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) | 供试卵数(枚) | 融合率(%)                        | 卵裂率(%)                        | 桑椹胚率(%)                        | 囊胚发育率(%)                       |
|-------------------------------|---------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 对照                            | 66      | 74.20 $\pm$ 3.08 <sup>a</sup> | 73.36 $\pm$ 4.49 <sup>a</sup> | 11.64 $\pm$ 10.77 <sup>a</sup> | 10.24 $\pm$ 10.14 <sup>a</sup> |
| 2.5                           | 85      | 76.26 $\pm$ 3.88 <sup>a</sup> | 76.50 $\pm$ 5.29 <sup>a</sup> | 15.90 $\pm$ 4.85 <sup>a</sup>  | 14.44 $\pm$ 7.04 <sup>a</sup>  |
| 5.0                           | 85      | 74.46 $\pm$ 4.02 <sup>a</sup> | 81.20 $\pm$ 4.52 <sup>b</sup> | 23.06 $\pm$ 10.43 <sup>b</sup> | 22.16 $\pm$ 10.01 <sup>b</sup> |
| 7.5                           | 64      | 73.54 $\pm$ 2.14 <sup>a</sup> | 73.42 $\pm$ 6.06 <sup>a</sup> | 8.52 $\pm$ 8.04 <sup>a</sup>   | 8.52 $\pm$ 8.04 <sup>a</sup>   |

## 2.3 融合液、激活液中添加 CCB 对体细胞核移植胚发育率的影响

由表 3 可知, I 组与 II 组之间融合率差异不显

著, 但这两组均显著高于 II 组。虽然 3 组之间的卵裂率、桑椹胚及囊胚发育率差异不显著, 但 II 组的发育率相对好一些, 囊胚发育率最高。

表 3 融合、激活液中添加 CCB 对体细胞核移植囊胚发育率的影响

| 组别  | 供试卵数(枚) | 融合率(%)                        | 卵裂率(%)                        | 桑椹胚率(%)                        | 囊胚发育率(%)                       |
|-----|---------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| I   | 77      | 81.64 $\pm$ 6.09 <sup>a</sup> | 83.81 $\pm$ 7.02 <sup>a</sup> | 16.44 $\pm$ 10.14 <sup>a</sup> | 16.17 $\pm$ 11.10 <sup>a</sup> |
| II  | 79      | 74.33 $\pm$ 7.04 <sup>b</sup> | 81.47 $\pm$ 6.88 <sup>a</sup> | 18.31 $\pm$ 9.08 <sup>a</sup>  | 17.58 $\pm$ 8.91 <sup>a</sup>  |
| III | 82      | 82.16 $\pm$ 6.27 <sup>a</sup> | 81.15 $\pm$ 7.41 <sup>a</sup> | 20.18 $\pm$ 9.04 <sup>a</sup>  | 20.18 $\pm$ 9.04 <sup>a</sup>  |

注: I 组为在融合液中添加 CCB; II 组为在激活液中添加 CCB; III 组为融合液、激活液中都添加 CCB

## 3 讨论

CCB 是一种微丝抑制剂, 能够切断微丝纤维, 并结合在微丝末端, 抑制肌动蛋白加合到微丝纤维上, 破坏了微丝结构, 抑制胞质分裂, 增加了细胞的柔韧性<sup>[10]</sup>。有利于融合过程中对细胞的手工操作, 从而增加了核移植胚胎的融合率。试验结果表明, 在融合液中添加 7.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CCB 的重组胚, 其桑椹胚率囊胚发育率显著高于其他组别, 说明在融合液中添加 7.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 CCB, 有利于延边黄牛核移植胚胎的发育。

离子霉素 (ionomycin) 是近年来发现的高效  $\text{Ca}^{2+}$  载体, 也是一种有效的人工激活剂<sup>[11~13]</sup>, 和 6-DMAP 的协同作用可以有效地激活牛卵母细胞<sup>[14]</sup>, 因而被广泛用于哺乳动物卵母细胞和核移植

胚胎的激活<sup>[15]</sup>。CCB 破坏了纺锤体的形成, 抑制了极体的形成和染色体的排出, 保证了核移植胚胎的染色体倍数。无 CCB 时, 融合到激活卵子中的间期核会发生染色体单倍化现象<sup>[16]</sup>。Smith 和 Wilmut<sup>[17]</sup>认为, 在无 CCB 时, 激活时诱发的微丝依赖性机制会影响供体核的染色体倍数, 从而引起早期操作胚胎的发育停止。本研究中证实, 在激活液中添加 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CCB 的重组胚的囊胚发育率最高, 显著高于不添加组, 所得结论与李雪峰等<sup>[10]</sup>的结果一致。可见, 无论是在融合液或激活液中单独添加 CCB, 还是在融合、激活液中同时添加 CCB, 均有利于提高延边黄牛体细胞核移植胚的发育率。

### 参考文献:

- [1] 焦瑞身. 细胞工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 1989. 313—338.

- [ 2 ] Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells [ J ] . Nature, 1997, 385: 810—813.
- [ 3 ] Baguisi A, Behboodi E, Melican D T, *et al.* Production of goats by somatic cell nuclear transfer [ J ] . Nat Biotechnology, 1999, 17: 456—461.
- [ 4 ] Shiga K, Fujita T, Hirose K, *et al.* Production of calves by transfer of nuclei from cultured somatic cells obtained from Japanese black bulls [ J ] . Theriogenology, 1999, 52: 527—535.
- [ 5 ] Wells D N, Misica P M, Tervit H R. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells [ J ] . Biol Reprod, 1999, 60: 996—1005.
- [ 6 ] Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, *et al.* Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture [ J ] . Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 990—995.
- [ 7 ] Wakayama T, Perry A C, Zuccotti M, *et al.* Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei [ J ] . Nature, 1998, 394: 369—374.
- [ 8 ] Betthausen J, Forsberg E, Augenstein M, *et al.* Production of cloned pigs from *in vitro* systems [ J ] . Nat Biotechnol, 2000, 18: 1055—1059.
- [ 9 ] Polejaeva I A, Chen S H, Vaught T D, *et al.* Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells [ J ] . Nature, 2000, 407: 86—90.
- [ 10 ] 李雪峰, 安志兴, 郭继彤, 等. 几种不同化学激活方法对牛卵母细胞孤雌激活的影响 [ J ] . 西北农林科技大学学报, 2002, 40(2): 43—47.
- [ 11 ] De La Fuente R, King W A. Developmental consequences of karyokinesis without cytokinesis during the first mitotic cell cycle of bovine parthenotes [ J ] . Biol Reprod, 1998, 58(4): 952—962.
- [ 12 ] Alberio R, Kubelka M, Zakhartchenko V, *et al.* Activation of bovine oocytes by specific inhibition of cyclin-dependent kinases [ J ] . Mol Reprod Dev, 2000, 55(4): 422—432.
- [ 13 ] Loi P, Ledda S, Fulka J Jr, *et al.* Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols [ J ] . Biol Reprod, 1998, 58(5): 1177—1187.
- [ 14 ] Ledda S, Loi P, Bogliolo L, *et al.* The effect of 6-dimethylaminopurine(6-DMAP) on DNA synthesis in activated mammalian oocytes [ J ] . Zygote, 1996, 4: 7—9.
- [ 15 ] 邓满齐, 范必勤, 刘永民, 等. 小鼠卵受精和人工激活过程中胞质游离  $Ca^{2+}$  变化及其在卵激活中的作用 [ J ] . 动物学报, 1996, 42(1): 80—86.
- [ 16 ] Czolowska R, Waksmundzka M, Kubiak J Z, *et al.* Chromosome condensation activity in ovulated metaphase II mouse oocytes assayed by fusion with interphase blastomeres [ J ] . J Cell Sci, 1986, 84: 129—133.
- [ 17 ] Smith L C, Wilmut I. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development *in vivo* of sheep embryos after nuclear transplantation [ J ] . Biol Reprod, 1989, 40: 1027—1035.

## 本刊常用单位符号及换算

依据国家标准, 本刊在刊发稿件中一律使用法定计量单位, 为便于读者阅读, 现将本刊常用单位符号及其换算方法介绍如下:

- 1 长度单位: km= 公里、千米, m= 米, cm= 厘米, mm= 毫米; 换算: 1 km= 1 000m, 1 m= 100cm= 3 尺, 1 cm= 10 mm
- 2 重量单位: t= 吨或 1 000 kg, kg= 公斤、千克, g= 克, mg= 毫克; 换算: 1 t= 1 000kg, 1 kg= 1 000 g, 1 g= 1 000mg, 500g= 1 市斤, 50g= 1 两
- 3 面积单位: m<sup>2</sup>= 平方米, hm<sup>2</sup>= 公顷, cm<sup>2</sup>= 平方厘米; 换算: 1 hm<sup>2</sup>= 10 000 m<sup>2</sup>= 15 亩, 1 亩= 667 m<sup>2</sup>
- 4 浓度单位: 1 mg/ kg, mg/ L 或 mg · kg<sup>-1</sup>, mg · L<sup>-1</sup>, μL · L<sup>-1</sup>= 1 × 10<sup>-6</sup>= 1 ppm, 即百万分之一, 不用 ppm 和 1 × 10<sup>-6</sup>表示
- 5 时间单位: “天、小时、分钟、秒”分别用“d, h, min, s”表示

(本刊编辑部)