

猪体细胞核移植

Porcine Somatic Nuclear Transfer

樊娜娜, 欧阳振, 王教伟, 赵宇, 赖良学*

中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广州, 广东

*通讯作者邮箱: lai_liangxue@gibh.ac.cn

引用格式: 樊娜娜, 欧阳振, 王教伟, 赵宇, 赖良学. (2022). 猪体细胞核移植. *Bio-101* e1010968. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010968.

How to cite: Pan, N. N., Ouyang, Z., Wang, J. W., Zhao, Y. and Lan, L. X. (2022). Porcine Somatic Nuclear Transfer. *Bio-101* e1010968. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010968. (in Chinese)

摘要: 体细胞核移植是指将体细胞细胞核利用显微操作的方法移入去核卵母细胞, 构建重组胚胎, 经过一段时间的体外培养, 移植到代孕受体内, 产生与供体细胞相同基因型后代的技术过程, 又称之为动物克隆技术。猪体细胞核移植主要包括以下步骤: 供体细胞的准备、卵母细胞的体外成熟、成熟卵母细胞的去核、供核细胞核转移、重构胚胎激活。

关键词: 猪, 体细胞核移植, 卵母细胞的体外成熟, 成熟卵母细胞的去核, 供核细胞核转移, 重构胚胎激活

材料与试剂

1. 四孔板 (NUNC)
2. 24 孔板 (NUNC)
3. 六孔板 (NUNC)
4. 培养皿 (NUNC)
5. 1.0 mm×0.6 mm 玻璃管 (WPI)
6. 1.0×0.8 mm 玻璃管 (WPI)
7. 2.5×2.0 mm 玻璃管 (WPI)
8. DMEM (Gibco, catalog number: 11965-0982)
9. FBS (Gibco, catalog number: 10099141C)

10. NEAA (Gibco, catalog number: 11140050)
11. GlutaMAX (Gibco, catalog number: 35050061)
12. DMSO (Sigma, catalog number: D8779)
13. CollagenaseIV (Sigma, catalog number: C5138)
14. 0.05% 胰酶 (Gibco, catalog number: 25300062)
15. 75% 酒精 (安徽安特生物化学有限公司)
16. DPBS (Gibco, catalog number: D8537)
17. 0.9% 生理盐水 (衡阳制药有限公司)
18. 石蜡油 (Sigma, catalog number: M5310)
19. NaCl (Sigma, catalog number: S5886)
20. KCl (Sigma, catalog number: P4504)
21. NaHCO₃ (Sigma, catalog number: S8875)
22. NaH₂PO₄ (Sigma, catalog number: S5011)
23. MgCl₂·6H₂O (Sigma, catalog number: M0250)
24. Hepes (Sigma, catalog number: H3784)
25. Penicillin (Sigma, catalog number: P3032)
26. phenol Red (Sigma, catalog number: 5530)
27. CaCl₂·2H₂O (Sigma, catalog number: C7902)
28. Polyvinyl alcohol (PVA Sigma, catalog number: P8136)
29. Sorbitol (Sigma, catalog number: S1876)
30. Gentamicin (Sigma, catalog number: G1264)
31. Sodium pyruvate (Sigma, catalog number: P4562)
32. H₂O (Sigma, catalog number: W-1503)
33. Na Lactate (Sigma, catalog number: L7900)
34. TCM-199 (Gibco, catalog number: 11150-059)
35. D-glucose (Sigma, catalog number: G7021)
36. Penicillin (Sigma, catalog number: P3032)
37. Streptomycin (Sigma, catalog number: S1277)
38. Luteinizing hormone (LH Sigma, catalog number: L5269)

39. Epidermal growth factor (EGF Sigma, catalog number: S4127)
40. Follicle stimulating hormone (FSH Sigma, catalog number: F2293)
41. Cysteine (Sigma, catalog number: C8152)
42. Hyaluronidase (Sigma, catalog number: H3506)
43. Mannitol (Sigma, catalog number: M9647)
44. BSA (Sigma, catalog number: A8022)
45. Cytochalasin B (Sigma, catalog number: C6762)
46. Mannitol (Sigma, catalog number: M9647)
47. KH_2PO_4 (Sigma, catalog number: P-5655)
48. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, catalog number: M1880)
49. Na-Pyruvate (Sigma, catalog number: 4562)
50. $\text{Ca}(\text{Lactate})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Fisher, catalog number: C110-500)
51. L-Glutamine (Sigma, catalog number: G-7029)
52. Hypotaurine (Sigma, catalog number: H-1384)
53. NEAA (Sigma, catalog number: M7145)
54. EAA (Sigma, catalog number: B-6766)

仪器设备

1. CO_2 培养箱 (THERMO-3111)
2. 超净工作台 (瑞智净化)
3. 倒置显微镜 (OLYMPUS-IX51)
4. 体式显微镜 (NIKON-SMZ645)
5. 显微镜加热台 (THERMO)
6. 显微操作系统 (NIKON-NT-88-V3)
7. 融合仪 (BLS- CF-150B)
8. 拉针仪 (日本成茂)
9. 断针仪 (日本成茂)
10. 磨针仪 (日本成茂)
11. 恒温胚胎运输箱 (FHK, NFA451)

12. 恒温水浴锅（上海一恒）
13. 天平（赛多利斯- BS224S）
14. PH 计（赛多利斯-PB-10）
15. 磁力搅拌器（科迪- DJ-1A）
16. 冰点渗透压仪（GONOTEC）
17. -20 °C 冰箱（海尔）
18. -80 °C 冰箱（THERMO）
19. 移液枪（EPPENDORF）
20. 电动移液器（THERMO）
21. 离心机（中科科仪-SC-3610）

实验步骤

1. 供体细胞的准备

在猪的核移植中，胎儿成纤维细胞由于其分布广泛，易于获得，特别是在体外具有良好的增殖能力，适合进行基因修饰用于基因修饰猪的制作，是目前最为常用的供体细胞类型。

a. 猪胎儿组织的获取

将怀孕 35 天的妊娠母猪麻醉，手术剖开腹腔，将整个子宫取出至于冰上，带回实验室。将包裹胎膜的胎儿从子宫内膜剥离，置于 10 cm 培养皿中，在超净工作台中去除胎膜，暴露胎儿。用 DPBS 彻底冲洗胎儿 3 次，去除胎儿的头、尾和内脏（肠、肝、心脏等）后的胎儿组织用于胎儿成纤维细胞的分离。

b. 组织消化

在 60 mm 细胞培养皿中，用灭菌的眼科剪将胎儿组织剪碎成为 1 mm³ 的小块，加入 4 ml 胶原酶 IV（Sigma C5138, 0.32 mg/ml），消化 46 小时，期间用枪头吹打分散组织块。消化完成后，收集细胞于 15 ml 离心管中，500 × g 5 分钟离心细胞悬液，弃上清；用细胞培养液洗一次后，将其铺于 10 cm 培养皿，39°C，5% CO₂ 培养箱中培养。

c. 细胞传代培养

待细胞生长汇合后，需要对细胞进行传代扩增培养。吸弃细胞培养液，用 DPBS 洗细胞，加适量 0.05%胰酶覆盖细胞表面，39 °C 孵育 3 分钟。加等体积的含血清细胞培养液，吹打皿底，收集细胞至 15 ml 离心管，500×g，5 分钟离心收集细胞。弃上清，用细胞培养基重悬细胞，按照 1 比 3 的比例传代培养。

d. 细胞冻存

按照细胞传代培养中的方法消化、离心收集细胞。用细胞冻存液重悬细胞，计数，根据计数结果用冻存液将细胞悬液调整至 107/ml，分装细胞至冻存管中（100 μl/管）。将冻存管放于程序冷冻盒中，于-80℃冰箱过夜，将冷冻管从-80℃冰箱取出，放入液氮，长期保存。

e. 细胞解冻

从液氮中取出细胞冻存管，投入 37 °C 水浴解冻；细胞转移到装有细胞培养液的 15 ml 离心管中混匀，500 × g，5 分钟离心，弃上清，收集细胞。用细胞培养液重悬细胞，铺于 10 cm 培养皿中，置 39 °C，5% CO₂ 培养箱中培养，每隔 2-3 天传代一次。

f. 体细胞基因修饰

解冻原代猪胎儿成纤维细胞，铺于 10 cm 培养皿中，第二天消化收集细胞并用 DPBS 洗一遍用于基因转染。采用 Neon™电转仪，按 5-30 μg DNA/1-2×10⁶ 细胞，100 μL 体系，将质粒 DNA 通过电穿孔的方法转染到猪胎儿成纤维细胞。电穿孔后细胞分至 10 cm 培养皿培养，每皿 1-5×10⁵ 个细胞。第二天细胞大部分都贴壁后，进行筛选。经过 9 天左右的筛选，可见细胞克隆的形成。挑取细胞克隆，至 48 孔板培养。细胞长满后取 1/10 细胞鉴定基因型，9/10 的细胞传至 24 孔板培养。经鉴定打靶的阳性克隆可传至 12 孔板培养或冻存。

2. 猪卵母细胞的体外成熟

a. 成熟液准备

24 孔板，每空 0.5 ml 成熟液，以石蜡油覆盖后置于 CO₂ 培养箱中（5% CO₂，饱和湿度，39℃）平衡 3 小时以上。

b. 卵母细胞的采集

从屠宰场收集猪卵巢，并将其置于加有青霉素和链霉素的 0.9%的生理盐水中，39℃保温带回实验室。将卵巢用 39℃的 0.9%的生理盐水冲洗，清除血污。使

用带有 12 号针头的 10 mL 注射器将卵巢卵泡中的卵子和卵泡液吸出，置于 50 mL 的离心管中，39℃水浴保温。卵泡液静置 5 分钟，吸弃上清，用 PVA-TL-Hepes 洗 3 遍。在体视镜下挑出胞质均匀，外裹多层卵丘细胞的卵丘-卵母细胞复合体（COCs），在 PVA-TL-Hepes 液中洗 2 遍，然后在成熟液中洗 3 遍，再进行成熟培养。约 50-70 个 COCs 置于 4 孔板的 1 孔中，每孔含 500ul 成熟培养液，并覆盖矿物油，置于饱和湿度，39 °C，5% CO₂ 培养箱中培养 42-44 小时。

c. 成熟卵母细胞的处理

将成熟培养 42-44 小时的猪卵母细胞置于含 1 ml 透明质酸酶（1 mg/ml）的 1.5 ml 离心管中，涡旋震荡 4-5 min。将消化后的卵母细胞转移入盛有操作液的 35 mm 皿中，体式显微镜下挑取排放第一极体、质膜完整、外形规则，有明显的卵周隙的卵母细胞于另一盛有操作液的 35 mm 皿中，39℃保存，待用。

3. 供体细胞的处理

处于 G0 期（静止期）和 G2/M 期的体细胞均可作为核移植供体细胞。

a. G0 期细胞的获得（血清饥饿法）：

解冻细胞，铺于 24 孔板或 4 孔板中培养。12-24 小时后，在细胞生长汇合前吸弃培养基，加入 500 μl 含 0.5%FBS 的 DMEM 培养基，培养 5 天；换液，加入 500 μl 含 0.1%FBS 的 DMEM 培养基，继续培养 3 天。消化，离心收集细胞，用胚胎操作液重悬细胞，用作供体细胞。

b. G2/M 期细胞的获得

解冻细胞，铺于 24 孔板或 4 孔板中培养。12-24 小时后，在细胞生长汇合前吸弃培养基，加入 500 μl 含 1.0 μM 秋水仙胺（Colchicine, Sigma, C9754）的细胞培养基，培养 24 小时。消化，离心收集细胞，用胚胎操作液重悬细胞，用作供体细胞。

4. 成熟卵母细胞的去核

核移植前需要对成熟卵母细胞进行去核处理，以清除卵母细胞核遗传物质对克隆胚胎发育的干扰。

a. Bisbenzamide 染色紫外光辅助定位去核

成熟卵母细胞在含 5 $\mu\text{g/ml}$ bisbenzamide (Sigma, B1155) 的操作液中染 10 分钟；在 60 mm 皿的皿盖中央区域做几个去核操作液液滴，并用石蜡油覆盖。将 bisbenzamide 预染的卵母细胞转移至覆盖矿物油的去核小滴中，放置 5 分钟；在显微操作仪下，用固定针吸住卵母细胞，用注射针轻轻拨动卵母细胞使其极体位于五点钟方向，在三点钟方向入针，将第一极体及其附近包含中期核的部分胞质吸出；在紫外光下确认吸出的胞质中含有中期核染色体。

b. 盲吸去核法

紫外光照射以及 bisbenzamide 染色都会影响猪卵母细胞发育能力，操作时，卵母细胞暴露于紫外光下的时间应尽量控制在 3-5 秒以内。成熟卵母细胞处于第二次减数分裂中期，此时高度凝集的中期核染色体通常位于靠近极体的胞质边缘，因此，可以通过极体的位置推断核的位置，不经过染色，直接将极体及其附近的胞质一并吸出，达到去核的目的。对于熟练的操作者，这种盲吸去核法去核的比率通常可以达到 85%-90%。猪卵母细胞的去核通常采用盲吸法。

5. 供核细胞核转移

将供体核移入受体卵母细胞胞质有两种方法：一是直接将供体细胞核注射到去核卵母细胞胞质中的直接注射法；二是将供体细胞注到卵母细胞的透明带下，通过电脉冲将供体细胞与去核卵母细胞融合获得重构胚的融合法。在操作上，注射法去核和注核需要采用不同直径的显微操作针，因而去核、注核的步骤要分两步进行，操作时间长、难度大；而采用融合法时去核、注核使用相同直径的纤维操作针，去核、注核可以连续完成，此外，猪的卵母细胞可以通过电刺激激活，采用融合法在电融合的同时即可激活卵母细胞，因而，目前在猪的核移植研究中比较普遍的采用融合法进行核移植操作。

a. 直接注射法

将去核的卵母细胞置于胚胎培养液中恢复 30 分钟后，将去核卵母细胞及供体细胞置于矿物油覆盖的显微操作小滴中。用直径 10 微米（G0/G1 期细胞）或 15 微米（G2/M 期细胞）带尖的注射针，反复吹吸供体细胞，破坏细胞膜，将供体细胞核连同残留的胞质成分一并吸入注射针，从去核时留下的透明带缺口入针，穿过质膜将供体核及胞质成分注射到去核卵母细胞中。注意：注射细胞

核时应十分小心，尽量减少注入胞质中的培养基的量。同时要确保穿透质膜，将供体核注入胞内。撤出注射针时要确保胞质立刻自然愈合。

b. 融合法

去核操作滴中，每个卵母细胞去核完成后，吐出吸取的卵母细胞核和极体；用去核针吸取一个供体细胞，从去核时形成的透明带缺口穿入，将供体细胞置于透明带下，用去核针挤压透明带确保供体细胞与受体卵母细胞胞质接触紧密。去核、注核完成后，卵母细胞-体细胞对置于胚胎培养液中，放回 CO₂ 培养箱，等待融合操作。调整电融合仪参数：2 次 120KV/cm，30 微秒直流电脉冲，间隔 1 秒；待融合的卵母细胞-体细胞对在融合液中洗 3 遍后置于覆盖融合液的融合电极之间，用玻璃微针拨动使得卵母细胞-体细胞接触面与电极方向平行，触动电极按钮，执行一组电脉冲；电击后 的细胞对置于胚胎培养液中培养 30 分钟，体视镜下挑选出融合的胚胎，置培养箱中培养。

6. 重构胚胎的激活

供体核转移入受体卵母细胞质后，需要进行激活处理以启动胚胎的发育。猪卵母细胞的激活可以采用多种物理的或化学激活实现，以下介绍两种常用的方法：

a. 电激活

成熟的猪卵母细胞很容易被电刺激激活，电融合的同时就可以实现重构胚胎的激活。采用的是电融合法进行核转移重构胚胎无需再进行进一步激活；而如果采用直接注射的方法，需要对重构胚进行激活处理，如果采用电激活，只需要将重构胚采用与电融合相同的参数进行电脉冲刺激即可。

b. 化学激活

猪卵母细胞也可以在化学激活剂的作用下激活，常用 Thimerosal 与 DTT 的组合处理进行猪卵母细胞或重构胚胎的化学激活。卵母细胞或重构胚在 200 μM Thimerosal (Sigma, T2295) 中处理 10 分钟，再作液中洗一遍；再将母细胞或重构胚在 8mM DTT (Sigma, 45777- 9) 中处理 30 分钟，在操作液中洗一遍，在胚胎培养液 中洗两遍，置培养箱中培养；注意：Thimerosal 对光敏感，操作时要避光，溶液颜色变暗时应丢弃。

7. 胚胎的体外培养

激活后的重构胚胎 CB 处理 3-5 小时后，置于含 500 微升胚胎 培养液的四 孔板中，覆盖矿物油，于饱和湿度，39 °C，5% CO₂ 培养箱中培养。激活后 8-15 小时可以观察到原核形成，24-36 小时后可以观察到卵裂，6-7 天形成囊胚。

结果与分析

1. 卵母细胞体外成熟率达 80%以上，胎儿成纤维细胞与卵母细胞融合率因传代次数不同略有不同，在 70-90%之间。胎儿成纤维细胞克隆胚胎囊胚发育率为 20%左右。
2. 猪卵母细胞和胚胎对温度敏感，所有操作过程中均需要控制温度。

失败经验

1. 屠宰场收集卵巢注意保温，并尽快运回实验室，抽取卵母细胞卵丘复合物，从卵巢收集到卵母细胞成熟培养，时间不超过 4 小时，否则会影响卵母细胞质量。

溶液配方

1. 猪胎儿成纤维细胞培养基

DMEM + 15% FBS + 0.1 mM NEAA + 2 mM GlutaMAX

2. 细胞冻存液

90% FBS + 10% DMSO

3. 细胞消化液

DMEM + 6.4 mg CollagenaseIV + 15% FBS

4. 洗卵液 PVA-TL-HEPES

称取 6.6633 g NaCl, 0.2386 g KCl, 0.1680 g NaHCO₃, 0.0408 g NaH₂PO₄, 0.1017 g MgCl₂·6H₂O, 2.3830 g Hepes, 0.0650 g Penicillin, 0.0100 g phenol Red, 0.2940 g CaCl₂·2H₂O, 0.1000 g Polyvinyl alcohol, 2.1860 g Sorbitol, 0.0250 g Gentamicin, 0.0220 g Sodium pyruvate, 加 998.132 mL Milli Q H₂O 后再加 1.868 mL Na Lactate, 溶解后调节 PH 为 7.2-7.4, 渗透压为 295-310 mOsm。

5. 卵母细胞成熟液

TCM-199 加 3.05 mM D-glucose, 0.91 mM Sodium pyruvate, 0.1% PVA, 75 µg/mL Penicillin, 50 µg/mL Streptomycin, 0.5 µg/mL Luteinizing hormone, 10

ng/mL Epidermal growth factor (EGF), 0.5 µg/mL Follicle stimulating hormone (FSH), 0.57 mM Cysteine, 10% 卵泡液。

6. 去卵丘操作液

0.030 g Hyaluronidase, 5.46 g Mannitol, 0.001 g BSA, 5 ml PVA-TL-Hepes, 95 mL Milli Q H₂O

7. 胚胎操作液

9.500 g TCM-199, 0.050g NaHCO₃, 0.750 g Hepes, 0.050 g Penicillin, 0.060 g Streptomycin, 1.755 g NaCl, 3.00 g BSA, 1000 mL Milli Q H₂O, 溶解后调节 PH 为 7.2-7.4 溶解后调节 PH 为 7.2-7.4, 渗透压为 295-310 mOsm。

8. 去核操作液

3 mL 胚胎操作液加 4 µL Cytochalasin B 浓储

9. Cytochalasin B 浓储

1 mg Cytochalasin B 加 200 µl 100% ethanol

10. 融合激活液

0.3 M Mannitol, 1.0 mM CaCl₂·2H₂O, 0.1 mM MgCl₂·6H₂O, 0.5 mM Hepes

11. 胚胎培养液 PZM-3

108.00 mM NaCl, 10 mM KCl, 0.35 mM KH₂PO₄, 0.40 mM MgSO₄·7H₂O, 25.07 mM NaHCO₃, 0.2 mM Na-Pyruvate, 2.0 mM Ca.(Lactate)2·5H₂O, 1.0 mM L-Glutamine, 5.0 mM Hypotaurine, 10 ml/L NEAA, 20 mg/mL EAA, 0.05 mg/mL Gentamicin, 3 mg/ml BSA

致谢

1. 感谢国家重点研发计划“干细胞与转化研究”专项提供经费支持。
2. 已发表的使用本实验方案的文章“A Huntingtin Knockin Pig Model Recapitulates Features of Selective Neurodegeneration in Huntington's Disease”“Piglets cloned from induced pluripotent stem cells”。
3. 该实验方案摘自“Production of Cloned Pigs by Using Somatic Cells as Donors”

参考文献

1. 樊娜娜, 杨东山, 赖良学.(2009). 克隆猪技术及其在转基因猪研究中的应用. 生命科学, 21:652-657.
2. Lai, L., Kolber-Simonds, D., Park, K. W., Cheong, H. T., Greenstein, J. L., Im, G. S., Samuel, M., Bonk, A., Rieke, A., Day, B. N., Murphy, C. N., Carter, D. B., Hawley, R. J. and Prather, R. S. (2002). [Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning](#). *Science* 295(5557): 1089-1092.
3. Lai, L. and Prather, R. S. (2003). [Production of cloned pigs by using somatic cells as donors](#). *Cloning Stem Cells* 5(4): 233-241.
4. Lai, L., Kang, J. X., Li, R., Wang, J., Witt, W. T., Yong, H. Y., Hao, Y., Wax, D. M., Murphy, C. N., Rieke, A., Samuel, M., Linville, M. L., Korte, S. W., Evans, R. W., Starzl, T. E., Prather, R. S. and Dai, Y. (2006). [Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids](#). *Nat Biotechnol* 24(4): 435-436.
5. Yang, D., Wang, C. E., Zhao, B., Li, W., Ouyang, Z., Liu, Z., Yang, H., Fan, P., O'Neill, A., Gu, W., Yi, H., Li, S., Lai, L. and Li, X. J. (2010). [Expression of Huntington's disease protein results in apoptotic neurons in the brains of cloned transgenic pigs](#). *Hum Mol Genet* 19(20): 3983-3994.