

犬体细胞克隆

Canine Somatic Cell Nuclear Transfer

王晓民^{1,2}, 赖良学^{1,*}

¹中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广州, 广东省; ²生命科学学院, 西湖大学, 杭州, 浙江省

*通讯作者邮箱: lai_liangxue@gibh.ac.cn

引用格式: 王晓民, 赖良学. (2022). 犬体细胞克隆. *Bio-101* e1010974. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010974.

How to cite: Wang, X. M. and Lan, L. X. (2022). Canine Somatic Cell Nuclear Transfer. *Bio-101* e1010974. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010974. (in Chinese)

摘要:

体细胞克隆是指将体细胞注射到去核卵母细胞中, 并进行融合构建重构胚胎, 再将其移植回受体输卵管, 使之发育成一个完整个体的一项技术。通过该技术获得的后代其绝大部分遗传物质完全来自于体细胞。因此, 该技术可以快速获得大量优良性状的个体或是进行保种。通过探讨犬的体细胞克隆技术, 可以成功实现犬优良性状个体的快速扩繁, 同时也可以对体细胞进行基因编辑, 再进行克隆, 进而改变犬的某些性状。

关键词: 体细胞克隆, 体细胞, 遗传物质, 细胞融合

研究背景

犬的生殖系统以其许多独特的特征而闻名。首先, 犬的卵巢被卵巢囊包裹, 卵巢囊是一种由脂肪组织组成的特殊覆盖物, 这使得内镜检查技术变得困难。第二, 它们的发情周期是非季节性的, 单次发情, 发情间隔比其他动物长 (犬, 4.5-8 个月; 小鼠, 5 天; 奶牛, 21 天)。第三, 犬的生殖系统是特殊的, 由于阴道与子宫的角度很陡, 非手术进入子宫进行人工授精、经宫颈插管或转移环形胚胎在技术上很困难, 因此需要昂贵的腹腔镜设备。此外, 在大多数物种中, 卵母细胞在中期 (MII) 排卵, 而犬卵母细胞则在生发泡 (GV) 期排卵; 卵母细胞最终成熟至中期 (MII) 需要在输卵管中停留 48 - 72 小时。最后, 因为犬卵母细胞富含脂质, 所以颜色很黑, 严重影响去核操作。由于犬繁殖的这些独特特性, 与其他物种相比, 辅助生殖技术 (ART), 例如在体

外受精、胚胎移植、冷冻保存和体细胞核移植（SCNT）等的应用还不够成熟。然而，自从 2005 年克隆出第一只狗以来，人们对犬 SCNT 在兽医医学和生物医学研究中的应用越来越感兴趣，犬与我们生活在同样的环境中，会发展出与人类相似的疾病，包括糖尿病和肥胖。此外，由于犬近亲繁殖的原因，基因突变如髌关节发育不良和某些癌症的易感性变得明显。由于这些原因，以及它们在进化上与人类比啮齿动物更为相似，因此，犬是研究人类疾病的理想模型。体细胞核移植是遗传学家工具箱中的一个重要工具，它是将体细胞转移到去核的卵母细胞中，构建重构胚胎，将该胚胎移植到受体体内能够重新发育成一个新的个体。这项技术已被评估为一种可能的工具，用于繁殖优良牲畜、预先饲养濒危动物和生物医学研究应用。因此，在犬身上掌握 SCNT 和其他 ART 将为人类和兽医医学带来诸多益处。

材料与试剂

1. 胚胎操作液（自配）
2. 细胞融合液（自配）
3. M199（Invitrogen）
4. FBS（Gibco）
5. 透明质酸酶（Sigma）
6. Ionomycin（Sigma）
7. 6-DMAP（Sigma）
8. 矿物油（Sigma）
9. 培养皿（Corning）
10. 口吸管（自制）
11. 玻璃针（国产）

仪器设备

1. 倒置显微镜（Olympus-IX73）
2. 显微操作系统（TransferMan 4r）
3. CO₂ 培养箱（Thermo-4111）
4. 生物安全柜（ESCO-AC2-6S1）

5. 体视显微镜（Nikon-SMZ745）
6. 电融合仪（BTX-ECM2001）

实验步骤

1. 确定犬卵母细胞成熟的时间并冲卵，收集体内成熟的卵母细胞；
2. 用 0.1%的透明质酸酶脱去卵母细胞上的颗粒细胞；
3. 将脱去颗粒细胞的卵母细胞用 Hoechst 染色 5 min；
4. 染色完成后清洗胚胎，并将胚胎转移到胚胎操作液中；
5. 在倒置显微镜下用固定针固定好卵母细胞，将极体置于 3 点钟方向；
6. 在荧光照射下可以看到细胞核，并用注射针吸去细胞核，第一极体及周边的胞质；
7. 用注射针吸取体细胞，并将体细胞注射到去核的卵母细胞卵周隙中；
8. 将重构好的胚胎用电融合液清洗两次，再移入电融合液中；
9. 调节好电融合参数（电压：4 kV/cm；时间：10 μ s；脉冲数：2 次），进行电融合；
10. 融合后的胚胎用胚胎培养液清洗 3 遍，转入胚胎培养基中，放入培养箱 30 min；
11. 电融合后的胚胎再进行化学激活（10 μ mol/L Ionomycin 处理 4 min；1.9 mmol/L 6-DMAP 处理 4 h）；
12. 激活后用胚胎培养基清洗 3 遍，放入培养箱中培养，待移植。

结果与分析

1. 重构胚胎的融合率低，可能与卵母细胞的成熟程度或是融合的条件和参数有关；
2. 体细胞克隆效率低，可能与体细胞的类型和整个克隆操作效率有关。

失败经验

1. 细胞融合过程中需要将胚胎摆好，让体细胞的位置与电流方向垂直；
2. 细胞电融合过程中可以适当提高电压或是换用点状电极。

溶液配方

1. 胚胎操作液

M199+10%FBS

2. 胚胎培养液 (SOF)

3%(v/v) EAA + 1%(v/v) NEAA + BSA (3 g/L) + Hepes (10 mM) + NaCl (6 3.35 mg/ml) + KCl (5.35 mg/ml) + KH₂PO₄ (1.6 mg/ml) + MgCl₂·6H₂O (1.8 mg/ml) + NaHCO₃ (21 mg/ml) + CaCl₂·2H₂O (26.2 mg/ml) + L-Glu (29.2 mg/ml) + 1% P/S(v/v) + 肌醇 (0.5 mg/ml) + 丙酮酸钠 (0.2 mM) + 0.6%乳酸钠(v/v)

3. 电融合液

0.26 M mannitol + 0.1 mM MgSO₄ + 0.5 mM Hepes + 0.05%(w/v) BSA

致谢

1. 感谢北京希诺谷生物科技有限公司提供的实验场地、实验用犬及技术研发；
2. 研究成果以 “Generation of ApoE deficient dogs via combination of embryo injection of CRISPR/Cas9 with somatic cell nuclear transfer” 发表在 Journal of Genetics and Genomics 杂志上。

参考文献

1. 胡敏华，周志东，王晓民，龙海斌，倪庆纯，刘运忠. (2015) [实验用 Beagle 犬的繁殖性能分析](#). 广东畜牧兽医科技, 3: 41-44.
2. 张敦伟，王晓民，连雪科，刘运忠，高翔，倪庆纯. (2013) [Beagle 犬活体取胎及其成纤维细胞的培养](#). 实验动物与比较医学, 3: 210-214.
3. Bouchard, G. F., Solorzano, N., Concannon, P. W., Youngquist, R. S., Bierschwal, C. J. (1991) [Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology, and elisa for progesterone](#). Theriogenology 3: 603-11.
4. Feng, C., Wang, X. M., Shi, H., Yan, Q. M., Zheng, M., Li, J., Zhang, Q. J., Qin, Y. M., Zhong, Y. G., Mi, J. D., Lai, L. X. (2018). [Generation of ApoE deficient dogs via combination of embryo injection of CRISPR/Cas9 with somatic cell nuclear transfer](#). J Genet Genomics 45: 47-50.
5. Concannon, P. W. (1986) [Canine pregnancy and parturition](#). Vet Clin North Am Small Anim Pract 16: 453-75.
6. Evans, J. M., and Savage, T. J. (1970) [The collection of vaginal smears from bitches](#). The Veterinary record 87: 598-599.

7. Jang, G., Kim, M. K., Oh, H. J., Hossein, M. S., Fibrianto, Y. H., Hong, S. G., Park, J. E., Kim, J. J., Kim, H. J., Kang, S. K., Kim, D. Y., Lee, B. C. (2007) [Birth of viable female dogs produced by somatic cell nuclear transfer](#). *Theriogenology* 5: 941-7.
8. Zou, Q. J., Wang, X. M., Liu, Y. Z., Ouyang, Z., Long, H. B., Wei, S., Xin, J. G., Zhao, B. T., Lai, S. S., Shen, J., Ni, Q. C., Yang, H. Q., Zhong, H. L., Li, L., Hu, M. H., Zhang, Q. J., Zhou, Z. D., He, J. X., Yan, Q. M., Fan, N. N., Zhao, Y., Liu, Z. M., Guo, L., Huang, J., Zhang, G. G., Ying, J., Lai, L. X., Gao, X. (2015) [Generation of gene-target dogs using CRISPR/Cas9 system](#). *J Mol Cell Biol* 6: 580-3.