

# 猴体细胞核移植

## Somatic Cell Nuclear Transfer of Monkeys

王燕、许玉婷、李春杨、孙强\*

中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心, 中国科学院, 上海

\*通讯作者邮箱: [gsun@ion.ac.cn](mailto:gsun@ion.ac.cn)

引用格式: 王燕, 许玉婷, 李春杨, 孙强. (2023). 猴体细胞核移植. *Bio-101* e1010987. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010987.

How to cite: Wang, Y., Xu, Y. T., Li, C. Y., and Sun, Q. (2023). Somatic Cell Nuclear Transfer Of Monkeys. *Bio-101* e1010987. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010987. (in Chinese)

**摘要:** 体细胞核移植(SCNT)又称为体细胞克隆, 是利用显微操作技术将体细胞注入去核卵母细胞, 使其发生重编程并发育为新的胚胎, 这个胚胎最终可发育为动物个体。

本文以猴成纤维细胞作为供体细胞描述了体细胞核移植的方法。

**关键词:** 成纤维细胞, 克隆猴, 体细胞核移植

## 材料与试剂

### 实验耗材

1. 15 ml 离心管 (Corning, catalog number: 430791)
2. 18-G 卵泡吸取针 (Olympus, catalog number: G19715)
3. 移液枪(Eppendorf)
4. 40  $\mu$ m 过滤器 (FALCON, catalog number: 352340)
5. 3.5 cm 培养皿 (Coring, catalog number: 430165)
6. 6 cm 培养皿 (Coring, catalog number: 430166)
7. 10 cm 培养皿 (Coring, catalog number: 430167)
8. 口吸管 (北京正天, catalog number: BJ-40)
9. 毛细玻璃管 (Sutter Instrument, catalog number: B100-75-10)

### 实验试剂

1. 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco, catalog number: 25200-072)

2. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, catalog number: 11965-092)
3. Dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma, catalog number: D2650)
4. PVP (Sigma, catalog number: PVP360)
5. 细胞松弛素 B (cytochalacin B) (Sigma, catalog number: C6762)
6. Fusogenic viral envelop (HVJ-E) (COSMO BIO CO. LTD)
7. Ionomycin (碧云天, catalog number: S1672)
8. 6-Dimethylaminopurine (Sigma, catalog number: D2629)
9. 矿物油 (Sigma, catalog number: M8410)
10. 肝素钠 (上海三杰, catalog number: 091201)
11. Hyaluronidase (Sigma, catalog number: H3884)
12. PBS (Gibco, catalog number: 10010-023)
13. Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate medium with HEPES (TH3) (见溶液配方)
14. Hamster embryo culture medium-9 (HECM-9) (见溶液配方)
15. CMRL-1066 (见溶液配方)
16. 成纤维细胞培养基 (见溶液配方)

## 仪器设备

1. 振荡器 (Kylin-Bell Lab Instruments, catalog number: QH-600)
2. 腹腔镜系统
3. 腹腔镜 (Olympus, model: OVT-SC2)
4. 光源 (Olympus, model: CLH-250)
5. 显示器 (Sony)
6. 负压吸卵系统 (Cook)
7. 管式加热器 (Cook)
8. 体视显微镜 (Olympus, model: SZX7)
9. 倒置显微镜 (Olympus, model: IX-83).
10. 培养箱 (Thermo Scientific, model: Forma 3111、Forma 371)
11. 离心机 (Eppendorf centrifuge, model: 5702)

12. 拉针仪(Sutter Instrument, model: P97)
13. 锻针仪(Narishige,model: MF-900)
14. 磨针仪 (Narishige,model: EG-400)
15. 激光系统(Hamilton Thorne)
16. 压电冲击驱动系统(Prime Tech).
17. 纺锤成像显微系统(Oosight)
18. 显微操作臂(Narishige)
19. 微量注射器 (Narishige IM-9B)

## 实验步骤

### 一、卵母细胞的收集

1. 在 15 ml 离心管中吸入 2-3 ml 含 2.5%肝素的 TH3 培养基，用 37 °C 管式加热器预热。将 18-G 卵泡抽吸针管端塞进 15 ml 离心管中。在腹腔镜系统将滤泡吸取针插入腹腔后点吸卵巢上面的明显卵泡，为防止血液凝固，将采集卵泡液的 15 ml 离心管装入振荡混合器，在抽吸过程开始后，使用振荡混合器全程运行。
2. 取卵结束后，向卵泡液混合物中加入 1 ml 透明质酸酶(2 mg/ml)，使用移液枪吹吸以消化颗粒细胞。用 40  $\mu$ m 的细胞过滤器过滤卵泡混合液，以去除血液和颗粒细胞，卵母细胞留在过滤器网膜上。
3. 将细胞滤器翻转后使用约 10 ml TH3 培养基向干净的 6 cm 培养皿中冲洗，以收集过滤器网膜上的卵母细胞。
4. 用口径约 300  $\mu$ m 的口吸管在体视显微镜下捡取卵母细胞。收集的卵母细胞在 CMRL-1066 培养基中培养。

### 二、猴子成纤维细胞的准备

猴子成纤维细胞既可以来自食蟹猴流产的胎儿（步骤 1-3），也可以来自出生后的食蟹猴（步骤 4-6）。

1. 对于猴子胎儿成纤维细胞，将胎儿的皮肤全部剥皮并切成小块。
2. 将小块组织放入含有 DNase (1 mg/ml)和胶原酶 IV (0.5 mg/ml)的细胞培养液中，在 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 中消化 4 h，加入细胞培养液终止消化。收集细胞悬液，用细胞过滤

器过滤细胞悬浮液以排除未消化的细胞团。得到单个成纤维细胞，将成纤维细胞以适当密度种植于 10 cm 培养皿中，记录传代数 of P0。

3. 第二天，检查培养皿，以确保成纤维细胞贴壁生长。及时更换细胞培养液，直到细胞覆盖培养皿 80%-90% 的面积，0.25% 胰蛋白酶消化后用 10% DMSO 和 90% FBS 在冷冻器中冻存细胞，隔天转移液氮中长期保存直到使用。
4. 对于出生的成体猴子，从麻醉的猴子身上切下一小块皮肤。用含青霉素和链霉素的 PBS 清洗三次，然后切成 1-2 mm<sup>3</sup> 小块。
5. 将这些组织放入 6 cm 培养皿中，加入适量的细胞培养基，使所有的皮肤组织都被培养液覆盖，同时不会有切碎的皮肤组织漂浮在培养液中，等待成纤维细胞爬出皮肤组织。
6. 当成纤维细胞达到培养皿 80% 的面积时，用 0.25% 胰蛋白酶消化成纤维细胞 1 分钟。200 × g 离心 3 min 后，将成纤维细胞传代至 10 cm 的培养皿中。
7. 细胞覆盖培养皿 80%-90% 的面积时，0.25% 胰蛋白酶消化后用 10% DMSO 和 90% 胎牛血清在冷冻器中冻存细胞，隔天转移液氮中长期保存直到使用。

### 三、成纤维供体细胞准备

1. 从液氮中取 1 管成纤维细胞，在 37 °C 水浴中快速解冻。立即将细胞转移到 15 ml 的离心管中。加入 3-5 ml 细胞培养基，轻轻吹打混匀。  
200 × g 离心 3 min 后弃上清。重新加入培养基混匀细胞，将细胞按不同的浓度梯度传代于 48 孔板的 2-4 孔上，密度梯度为：5×10<sup>4</sup> 孔、3×10<sup>4</sup> 孔、2×10<sup>4</sup> 孔和 1×10<sup>4</sup> 孔。
2. 将解冻后的细胞在 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 中培养，通过细胞生长接触致使大量细胞停留在 G0 期。使用前，用 0.25% 胰蛋白酶消化成纤维细胞，37 °C 孵育 1 min。然后加入 2 倍体积的细胞培养基终止消化。
3. 将细胞混合液 200 × g 离心 3 min，弃上清。使用 20 μl PBS 吹吸细胞沉淀至混合均匀，使用细胞悬浮液进行后续核注射。

#### 四、体细胞核移植

1. 在实验前使用 P97 拉针仪将毛细管玻璃(B100-75-10)拉制合适的长度和并使用 MF-900 锻针仪准备去核显微操作针注射针和 RNA 注射针和持卵针，去核针外径 8-10  $\mu\text{m}$ ，内径 7-9  $\mu\text{m}$ ，用 1 ml 注射器将水银（约 2 mm）装入去核移液管后端；用于注射成纤维细胞的注射针外径为 16-18  $\mu\text{m}$ ，内径 15-17  $\mu\text{m}$ ，之后使用 EG-400 微型磨针仪倾斜 45°磨制体细胞注射针；RNA 注射针的制备和去核针相似，在外径为 3  $\mu\text{m}$  处断口而后用同样的方法加入 2 mm 左右的水银柱；持卵针的外径为 100  $\mu\text{m}$ ，内径为 10  $\mu\text{m}$ ；以上的针在制备后使用 MF-900 锻针仪打弯至合适仪器的角度。
2. 准备一个玻璃底的操作碟，操作液是 CB 的终浓度为 5  $\mu\text{g/ml}$  的 TH3 溶液。并滴加 3  $\mu\text{l}$  的 10% PVP 液体用来清洗注射针，用矿物油覆盖所有的溶液。
3. 将显微操作臂和去核针调至适当位置，使用较大电压脉冲高等速度(5-6)和功率(4-5)在 PVP 液滴中清洗操作针，将 10 个 MII 左右的卵母细胞放入操作滴液中，采用纺锤体成像显微系统观察卵母细胞的纺锤体。在视线下方，纺锤看起来像一个明亮的小薄片。
4. 用持液针将卵母细胞固定在适当位置，并将纺锤体和去核针调整到同一水平面。使用压电装置以中等速度(2-3)和功率(2-3)打破透明带。携带尽可能少的细胞质将纺锤体吸出（图 1. a, b, c）。
5. 在一个操作液滴加适量 2.5 mol/L 融合病毒包膜(HVJ-E)，将供体细胞滴加到这个操作滴中。将去核的卵母细胞移入其他操作滴中，用激光破膜仪在透明带打出一个通道。用注射针管吸取病毒液滴的供体细胞通过该通道注射进入卵母细胞（图 1. d, e），之后在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下将操作的卵母细胞移入预平衡的 HECM-9 培养皿中。
6. 细胞融合 1-2 h 后，将胚胎移入含 5 mM ionomycin 的 TH3 培养基中 5 min，再移入激活液（10  $\mu\text{M}$  TSA 和 2 mM 6-Dimethylaminopurine 的 HECM-9 溶液）5 h。激活后，将 SCNT 胚胎移入 TSA 终浓度为 10  $\mu\text{M}$  的 HECM-9 培养皿 3-5 h，再转回 HECM-9 培养皿中。
7. 激活 6 小时后，对胚胎进行 RNA 注射，RNA 注射针放入 PVP 滴液中清洗。将激活的胚胎转移到操作滴中，注入 10 个 pL Kdm4d mRNA，其浓度在 1,000 ng/ $\mu\text{L}$  以

上（图 1. f）。将操作后的胚胎在 HECM-9 中培养，37 °C，5% CO<sub>2</sub>，等待胚胎移植。

## SCNT 过程

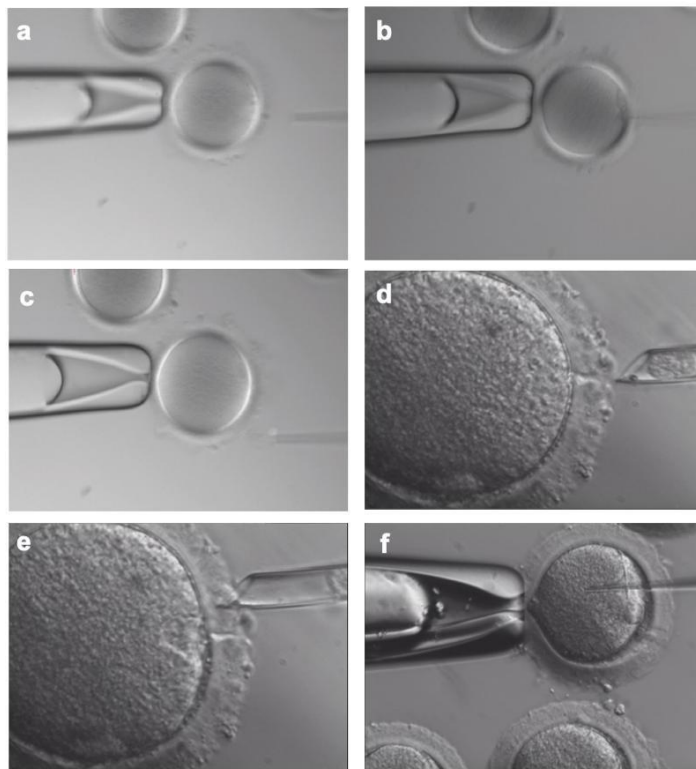


图 1. a b c 为去核过程；d e 为供体成纤维细胞注射；f. kdm4d mRNA 注射。

## 溶液配方

### 1. Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate medium with HEPES (TH3) (表 1)

**表 1. Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate medium with HEPES (TH3) 配制表**

| 成分                                   | /100ml      | /50ml         | 备注              |
|--------------------------------------|-------------|---------------|-----------------|
| NaCl                                 | 3.329 ml    | 1.665 ml      | 200 mg/ml stock |
| KCl                                  | 239 $\mu$ l | 119.5 $\mu$ l | 100 mg/ml stock |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 294 $\mu$ l | 147 $\mu$ l   | 100 mg/ml stock |
| MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 102 $\mu$ l | 51 $\mu$ l    | 100 mg/ml stock |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>     | 48 $\mu$ l  | 24 $\mu$ l    | 100 mg/ml stock |
| NaHCO <sub>3</sub>                   | 210.6 mg    | 105.3 mg      |                 |
| HEPES                                | 240 mg      | 120 mg        |                 |
| D-Glucose                            | 90 mg       | 45 mg         |                 |
| Sodium Pyruvate                      | 12 mg       | 6 mg          |                 |
| Sodium lactate (60% syrup)           | 0.17 ml     | 85 $\mu$ l    |                 |
| BSA                                  | 300 mg      | 150 mg        |                 |
| penicillin-streptomycin (100X)       | 1 ml        | 500 $\mu$ l   |                 |
| Phenol Red (0.01%)                   | 10 $\mu$ l  | 5 $\mu$ l     |                 |
| pH                                   | 7.4         |               |                 |

## 2. HECM-9 (表 2)

**表 2. HECM-9 配制表**

| 成分                                   | /100ml   | 终浓度          |
|--------------------------------------|----------|--------------|
| NaCl                                 | 0.6639 g | 113.6 mmol/L |
| KCl                                  | 0.0224 g | 3 mmol/L     |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 0.0279 g | 1.9 mmol/L   |
| MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 0.0102 g | 0.5 mmol/L   |
| NaHCO <sub>3</sub>                   | 0.2100 g | 25 mmol/L    |
| Sodium lactate (60% syrup)           | 0.0504 g | 4.5 mmol/L   |
| PVA                                  | 0.01 g   | 0.1 mg/ml    |
| 1 mol/L HCl                          | 0.14 ml  | 1.4 mmol/ml  |
| 11 AA with Pantothenate              | 1 ml     |              |

### **100X AA stock**

| 成分            | MW  | 100X 母液浓度  | 终浓度         |
|---------------|-----|------------|-------------|
| Taurine       | 125 | 50 mmol/L  | 0.5 mmol/L  |
| Asparagine    | 132 | 1 mmol/L   | 0.01 mmol/L |
| Cysteine      | 121 | 1 mmol/L   | 0.01 mmol/L |
| Histidine     | 155 | 1 mmol/L   | 0.01 mmol/L |
| Lysine        | 146 | 1 mmol/L   | 0.01 mmol/L |
| Proline       | 115 | 1 mmol/L   | 0.01 mmol/L |
| Serine        | 105 | 1 mmol/L   | 0.01 mmol/L |
| Aspartic acid | 133 | 1 mmol/L   | 0.01 mmol/L |
| Glycine       | 75  | 1 mmol/L   | 0.01 mmol/L |
| Glutamic acid | 147 | 1 mmol/L   | 0.01 mmol/L |
| Glutamine     | 146 | 20 mmol/L  | 0.2 mmol/L  |
| Pantothenate  | 238 | 0.3 mmol/L | 3 μmol/L    |

### 3. CMRL-1066（表 3）

**表 3. CMRL-1066 配制表**

|                 | /10 ml      |
|-----------------|-------------|
| CMRL-1066       |             |
| 10% FBS         | 1 ml        |
| Sodium Pyruvate | 0.4 mg      |
| Glutamine       | 1.5 mg      |
| Calcium lactate | 5.5 mg      |
| Estradiol       | 1 $\mu$ l   |
| Progesterone    | 750 $\mu$ l |

### 4. 成纤维细胞培养基（表 4）

**表 4. 成纤维细胞培养基配制表**

| 成分              | 终浓度       |
|-----------------|-----------|
| FBS             | 15%       |
| penicillin      | 100 IU/ml |
| streptomycin    | 100 IU/ml |
| Glycine         | 0.1 mM    |
| L-Alanine       | 0.1 mM    |
| L-Asparagine    | 0.1 mM    |
| L-Aspartic acid | 0.1 mM    |
| L-Glutamic Acid | 0.1 mM    |
| L-Proline       | 0.1 mM    |
| L-Serine        | 0.1 mM    |
| glutamax        | 2 mM      |
| sodium pyruvate | 1 mM      |