

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利说明书

C12N 5/00

C12N 5/02

C12N 15/00

A01K 67/00

[21] ZL 专利号 00815685.9

[45] 授权公告日 2005 年 7 月 6 日

[11] 授权公告号 CN 1209457C

[22] 申请日 2000.10.13 [21] 申请号 00815685.9

[30] 优先权

[32] 1999.10.14 [33] US [31] 60/159,368

[86] 国际申请 PCT/US2000/028287 2000.10.13

[87] 国际公布 WO2001/026454 英 2001.4.19

[85] 进入国家阶段日期 2002.5.14

[71] 专利权人 马萨诸塞大学

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 J·M·罗伯尔 K·普特哈普莱

J·G·科诺特 J·D·杰丽

审查员 李金光

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 唐伟杰

权利要求书 3 页 说明书 20 页 附图 3 页

[54] 发明名称 用于核移植的供体细胞的制备和选择

[57] 摘要

本发明涉及一种将体细胞群体同步化在 G₁ 期的方法，通过使用机械振荡分离以及选出有丝分裂双联体细胞，制备用于核转移或核移植的细胞。这种方法可进一步包括冷却细胞或使细胞更长时间同步化在 G₁ 期的其它方法。本发明还涉及通过这些方法制备得到的快速分裂体细胞经过同步化后，用作在核转移或核移植中所用的供体核或染色质来源。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种选择和使用供体体细胞用于核转移或核移植的方法，包括步骤：

(A) 通过用机械方式将细胞从培养皿表面脱落使供体体细胞的细胞周期同步化；

(B) 选择双联体体细胞；以及

(C) 在核转移或核移植中使用所述选出的双联体体细胞或所述双联体体细胞的细胞核作为供体体细胞。

2. 权利要求1的方法，包括步骤：

(A) 获得25%到50%汇合的细胞并平板培养细胞24小时至同步化步骤；

(B) 通过用机械方式将细胞从培养皿表面脱落使供体体细胞的细胞周期同步化；

(C) 选择双联体体细胞；以及

(D) 在核转移或核移植中使用所述选出的双联体体细胞或所述双联体体细胞的细胞核。

3. 权利要求1的方法，包括步骤：

(A) 获得90%或更高汇合的细胞并将其在平板培养24小时至同步化步骤；

(B) 通过用机械方式将细胞从培养皿表面脱落使供体体细胞的细胞周期同步化；

(C) 选择双联体体细胞；以及

(D) 在核转移或核移植中使用所述选出的双联体体细胞或所述双联体体细胞的细胞核。

4. 权利要求1-3任一项的方法，进一步包括冷却选出的有丝分裂双联体细胞以延长它们的G₁期的步骤。

5. 权利要求4的方法，其中细胞冷却到4℃。

6. 权利要求1的方法，其中选出的细胞接下来在缺乏至少一种下述

物质的培养基中培养：血清、异亮氨酸、谷氨酰胺或磷酸盐。

7. 权利要求 1 的方法，其中向所述选出细胞的培养基中加入 G_1 期同步化试剂以延长它们的 G_1 期。

8. 权利要求 7 的方法，其中 G_1 期同步化试剂选自：蚜栖菌素、含羞草氨酸、KT5823、KT5720、KT5926 和 K252b。

9. 权利要求 1 的方法，其中当细胞为 20%到 50%汇合时使用机械方式使细胞脱落。

10. 权利要求 9 的方法，其中当细胞为 25%汇合时振荡细胞。

11. 权利要求 1 的方法，其中当细胞汇合时使用机械方式使细胞脱落。

12. 一种制备非人转基因动物的方法，包括步骤：

(A) 根据权利要求 1 制备供体体细胞；

(B) 从所述选出的体细胞中分离细胞核；

(C) 在适于形成核转移 (NT) 单元的条件下，将细胞核插入至少一个去核的胚胎干 (ES) 细胞、胚胎生殖 (EG) 细胞、去核胚胎、或去核体细胞中，以产生融合的 NT；

(D) 激活所述融合的 NT 单元，产生激活了的 NT 单元；以及

(E) 将所述激活了的 NT 单元转移至宿主哺乳动物中，使激活了的 NT 单元发育成胎儿。

13. 权利要求 12 的方法，包括步骤：

(A) 根据权利要求 1 制备体细胞；

(B) 从所述选出的体细胞中分离细胞核；

(C) 在适于形成核转移 (NT) 单元的条件下，将细胞核插入到去核的卵母细胞、去核的精子、去核的胚胎、或去核的体细胞中，以产生融合的 NT 单元；

(D) 激活所述融合的 NT 单元，产生激活了的 NT 单元；以及

(E) 将所述激活了的 NT 单元转移至宿主哺乳动物中，使激活了的 NT 单元发育成胎儿。

14. 权利要求 12 的方法，包括步骤：

- (A) 根据权利要求 1 制备体细胞;
- (B) 从所述选出的体细胞中分离细胞核;
- (C) 在适于形成核转移 (NT) 单元的条件下, 将细胞核插入至少一个去核的 ES 细胞或去核的 EG 细胞中, 以产生融合的 NT 单元;
- (D) 激活所述融合的 NT 单元, 产生激活了的 NT 单元; 以及
- (E) 将所述激活了的 NT 单元插入至宿主哺乳动物胚胎中, 使该胚胎发育成胎儿。

用于核移植的供体细胞的制备和选择

发明背景

A. 细胞同步

细胞周期分析的一种重要方法是使细胞能够达到细胞周期（如 S, M, G₁, 或 G₂）的相同时期的能力。几年前已可作到细胞同步化, 可以使用或不使用化学物质。同步化的最佳方法之一利用这样的事实: 球形的, 有丝分裂期 (M) 细胞与玻璃表面的黏附力小于分裂间期细胞 (如, 分裂间期的细胞是那些在 S, G₁, 或 G₂ 的细胞)。所以振荡细胞培养物可以分离得到大量未污染的 M 期细胞 (参见 JAMES D. WATSON 等, MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE 971 (4th ed., 1987)。非化学的“振荡分离” (shake-off) 技术对于中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞和一些 HeLa 亚系的效果很好 (R. IAN FRESHNEY, CULTURE OF ANIMAL CELLS: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES 384-385 (3rd ed. 1994); 和 Zwanenburg, Mutat. Res. 120: 151-9 (1983))。在同步化人二倍体成纤维细胞中使用机械的振荡分离得到可与 CHO 的观察结果相比的成功 (Tobey 等 Exp. Cell Res. 179: 400-16 (1988))。振荡分离法已应用于同步化胚胎鸕鹑骨骼成肌细胞 (Devlin 等, Dev. Biol. 95: 175-92 (1983)) 和 HeLa 细胞 (Wheatley 等, Cytobios. 55: 191-204 (1988))。另一种同步细胞到 G₁ 的机械方法是使用离心淘析, 该方法导致细胞暂时滞留在 G₀ 期 (Zickert 等, Exp. Cell. Res. 207: 115-21 (1993))。

细胞同步化还可以通过结合机械振荡分离和化学物质 (如蛻栖菌素) 来得到 (Graves 等, Anal. Biochem. 248: 251-7 (1997))。但是, 使用药物 (如蛻栖菌素或羟基脲) 对 CHO 细胞有毒副作用, 而振荡分离则没有 (Fox 等, Cytometry 8: 3 15-20 (1987))。可单独使用药物同步化细胞。G₁ 和/或 G₀ 滞留药物包括地塞米松 (Goya 等, Mol. Endocrinol. 7: 1121-32 (1993)), 以及其它糖皮质激素 (Sanchez 等, Cell Growth Differ.

4: 215-25 (1993)), 或者双配位基 3-羟基吡啶-4-酮 (HPO) 和六配位基去铁胺 (DFO) (Hoyes 等, *Cancer Res.* 52: 4591-9 (1992))。其它的 G_1 特异性细胞周期同步化试剂在 Gadbois 等, *Proc. Nat' l Acad. Sci. USA* 89: 8626-8630 (1992)) 的文章中讨论。

温度已经被用来介导细胞的细胞周期。冷激 (cold-shock) 可同步外周血或骨髓中不成熟的粒细胞 (Boucher 等, *Hum. Genet.* 54: 207-11 (1980))。通过将细胞转换到低温, 例如 30°C , 人类二倍体成纤维细胞即停滞在 G_1 期 (Enninga 等, *Mutat. Res.* 130: 343-53 (1984))。使用机械振荡分离方法使 CHO 细胞达到同步化之后, 利用温度将细胞周期停滞在 G_1 期, S 期, 晚 S 期和 G_2 +M 期 (Schneiderman 等, *Radiat. Res.* 116: 283-91 (1988))。

供体细胞核的细胞周期阶段强烈地影响染色质结构和核移植胚胎的发育。供体核同步化在 G_1 期是核移植胚胎成功发育的一个重要方面 (Cheong 等, *Biol. Reprod.* 48: 958-63 (1993))。具体地, 晚 S 期染色质影响胚胎中的染色体组成, 这可以解释当使用晚 S 期供体核时, 核移植胚胎的发育降低 (Collas 等, *Biol. Reprod.* 46: 501-11 (1992))。细胞周期影响供体核的染色质结构和移植到去核卵母细胞中的小鼠胚胎核的发育。当供体融合到去核中期 II 卵母细胞后, 细胞周期同步化已显示出在猪外胚层细胞供体核的使用中对核物质的核重新编程有重要作用 (Ouhibi 等, *Mol. Resprod. Dev.* 44: 533-9 (1966))。但是, 为了体细胞核移植的目的进行的细胞同步化, 还没有联合使用有丝分裂细胞振荡分离与双联体细胞筛选。而且, 体细胞的振荡分离和双联体筛选没有联合其他细胞周期同步化方法 (如 G_1 期滞留剂或方法) 用于制备移植用的体细胞核。

B. 制备用于核移植或核转移的体细胞

在 1996 年, 报道的首例成功核移植是将细胞核从成熟的乳腺细胞移植到去核卵母细胞中 (Campbell 等, *Nature* 380: 64-6 (1996))。继此之后, 又通过胚胎细胞的核移植培育出恒河猴。核移植包括制备胞质体作为受体细胞。在多数情况下, 胞质体来源于染色体已被去除的成熟

中期 II 卵母细胞。然后供体细胞核被置于透明带和胞质体之间；通过电刺激开始融合及激活胞质体。胞质体成功地对供体细胞核重新编程是非常重要的，该步骤可被细胞周期所影响。参见 Wolf 等, *Biol. Reprod.* 60: 199-204 (1999)。通过利用胎儿细胞作为供体核来源已经建立了一些妊娠。但是，使用细胞系来建立转基因动物允许大的克隆规模和核移植前对细胞进行体外遗传操作。同上。调节早期胚胎发育的机理可能在哺乳动物物种中保守，例如，不论染色体数目，物种或供体成纤维细胞的年龄，牛卵母细胞胞质都可支持导入的分化供体核 (Dominko 等, *Biol. Reprod.* 60: 1496-1502 (1999))。

根据 Cibelli 等, *Science* 280: 1256-9 (1998) 中论述的方法，活跃分裂的胎儿成纤维细胞可用作核供体。在国际 PCT 申请 99/05266; 99/01164; 99/01163; 98/3916; 98/30683; 97/41209; 97/07668 和 US 专利 5,843,754 中还公开了制备用于供体分化核移植的受体卵母细胞的其它制备方法。典型地，移植核是来自培养的胚胎干 (ES) 细胞，胚胎生殖 (EG) 细胞或其它胚胎细胞。参见国际 PCT 申请 95/17500 和 95/10599; 加拿大专利申请 2,092,258; 英国专利 2,265,909; 和美国专利 5,453,366; 5,057,420; 4,994,384; 4,664,097。内细胞群 (ICM) 细胞也可用作核供体 (Sims 等, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90: 6143-6147 (1990); 和 Keefer 等, *Biol. Reprod.* 50: 935-939 (1994))。

C. 转基因动物及其制备

前核显微注射。已有各种各样的方法用于遗传修饰动物以得到更优良的性质，其中包括前核显微注射。前核显微注射的一个不足就是基因插入位点是随机的。这典型地导致不同的表达水平，必须产生几个转基因系以得到表达水平适当的系。由于整合是随机的，有利之处在于从一个基础动物开始转基因动物系，以避免在监测接合性时的困难和多插入位点相互作用可能引起的困难 (Cundiff 等, *J. Animal Sci.* 71: 20-25 (1993))。即使不考虑近交，仍需要 6.5 年的时间才能在纯合的动物中检测繁殖 (Seidel 等, *J. Animal Sci.* 71: 26-33 (1993))。

前核注射方法的另一个缺点是效率不高。只有 0.34 到 2.63% 的基因

注射胚胎发育成转基因动物，而这些的一小部分能够适当表达这些基因（Purcel 等, *J. Animal Sci.* 71: 10-19 (1993)）。这种效率低下导致产生转基因动物的高成本，因为需要大量的受体。这样，能够克隆包含目的基因修饰的动物或能够制备大量相同遗传拷贝的包含目的基因修饰的动物将是非常有利的。

胚胎干细胞。另一种产生转基因动物的系统是使用胚胎干(ES)细胞。在小鼠中，ES 细胞使研究人员能挑选转基因细胞并进行基因寻靶。与其他转基因技术相比，这种方法可允许进行更多遗传操作。例如，ES 细胞更易于在体外作为集落生长，可通过常规方法转染，可通过抗生素抗性克隆筛选出转基因细胞（T. Doetschman, “Gene transfer in embryonic stem cells.” IN TRANSGENIC ANIMAL TECHNOLOGY: A LABORATORY HANDBOOK 115-146 (C. Pinkert 等, Academic Press, Inc. New York 1994)）。而且，这种方法的效率很高，可产生足够的转基因集落（成百上千）以允许进行第二次筛选获得同源重组体。同上。ES 细胞可与普通宿主胚胎进行结合，由于它们仍保持自己的潜能，可在所产生的动物中发育成各种组织，包括生殖细胞。所以，转基因修饰可传递至后代。

从早期小鼠植入前胚胎中体外获得胚胎干(ES)细胞系的方法已众所周知（Evans 等, *Nature* 29: 154-156(1981); Martin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 7634-7638(1981)）。如果培养基中存在成纤维细胞（Evans 等, 1981）或分化抑制剂（Smith 等, *Dev. Biol.* 121: 1-9 (1987)），ES 细胞可以以不分化的状态进行传代。

由于 ES 细胞具有将其基因组传递给其下一代的能力，ES 细胞在家畜生殖系操作中很具潜力。一些研究单位已报道了所谓的多能胚胎细胞系的分离。例如 Notarianni 等, *J. Reprod. Fert. Suppl.* 43: 55-260(1991) 报道从猪和羊胚泡中建立了稳定的，多能细胞系，该细胞系显示了一些与免疫外科分离自羊胚泡的内细胞群（ICMs）原代培养物中的细胞相似的形态学和生长特性。同样，Notarianni 等, *J. Reprod. Fert. Suppl.* 41: 51-56 (1990) 公开了来自猪胚泡的推定多能胚胎干细胞系培养物的维持和分化。Gerfen 等, *Anim. Biotech.* 6: 1-14 (1995) 公开了从猪胚

泡中分离胚胎干细胞系。这些细胞在没有小鼠胚胎成纤维细胞饲养层时稳定维持并据报道在培养中分化成几种不同的细胞类型。

进一步的, Saino 等, Roux's Arch. Dev. Bid. 201: 134-141 (1992) 报道, 培养的牛胚胎干细胞样细胞系存活了三代, 但是在第四次传代中丢失。Handyside 等, Roux's Arch. Dev. Biol. 196: 185-190 (1987) 公开了在允许小鼠 ICMS 来源的小鼠 ES 细胞系分离的条件下用免疫切除法分离的羊胚胎内细胞群 (ICMS) 的培养。

Chemy 等, Theriogenology 41: 175 (1994) 报道了来源于所谓多能牛原始生殖细胞的细胞系在长期培养中的维持。这些细胞培养大约七天后, 产生 ES 样集落, 这些集落对碱性磷酸酶 (AP) 染色呈阳性染色, 显示出形成胚状体的能力, 并自发地分化成至少两种不同的细胞类型。

Campbell 等, (1996) 报道了在促进小鼠 ES 细胞系分离的条件下培养九天的羊胚胎的胚盘 (ED) 细胞经过核移植后产生了成活羊羔。

Van Stekelenburg-Hamers 等, Mol. Reprod. Dev. 40: 444-454 (1995) 报道了牛胚泡 ICMS 来源的所谓永久细胞系的分离及其性质。作者在不同条件下分离并培养了八或九天牛胚泡 ICMS, 以鉴定出对于支持牛 ICM 细胞的黏附和自然发展效率最高的饲养层细胞和培养基。

据称, 动物干细胞已经被分离, 筛选并繁殖用于得到转基因动物 (参见 Evans 等, W090/03432; Smith 等, W094/24274; 和 Wheeler 等, W094/26884)。Evans 等, 也报道了来自猪和牛物种所谓多能 ES 细胞的产生, 据评价这对转基因动物的产生很有用处。

来自转基因胚胎的 ES 细胞可用于核移植。有蹄类动物 ICM 细胞在核移植中的应用也有报道。在家畜类动物中, 如有蹄类, 来自类似的移植前家畜胚胎的核支持去核卵母细胞发育到分娩期 (Keifer 等, 1994; Smith 等, Biol. Reprod. 40: 1027-1035 (1989))。与之相反, 来自小鼠胚胎的核经过转移后在 8 细胞期之后不支持去核卵母细胞的发育 (Cheong 等, Biol. Reprod. 48: 958 (1993))。所以, 来自家畜的 ES 细胞是非常期望的, 因为它们可以提供很具潜力的经遗传操作或其它操作用于核移植方法的全能供体核来源。

使用 ICM 细胞。Collas 等, Mol. Reprod. Dev. 38: 264-267 (1994) 公开了通过将溶解的供体细胞显微注射到成熟去核卵母细胞中的牛 ICMs 核移植。在体外培养胚胎 7 天, 产生 15 个胚胎, 转移到牛受体中后, 导致 4 例受孕, 并有 2 例生产。同样, Keefer 等, Biol. Reprod. 50: 935-939 (1994) 公开了在核移植方法中使用牛 ICM 细胞作为供体细胞, 产生胚胎, 该胚胎产生了几例存活后代。进一步的, Sims 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6143-6147 (1993) 公开了通过将核从短期体外培养的牛 ICM 细胞中转移到成熟去核卵母细胞中产生了小牛。

所以, 尽管在文献中有所报道, 仍需要一种改进的制备大量用于核转移或移植的细胞的方法, 以应用于产生转基因或嵌合动物。使用细胞周期同步细胞, 其代表一种快速分裂亚群, 作为供体核, 采用核转移方法可以促进转基因或嵌合动物特别是家畜的发育。

发明概述及目的

本发明的一个目的是提供一种制备用于核转移或核移植的供体体细胞的方法, 包括步骤: (A) 通过振荡细胞使供体体细胞的细胞周期同步化; (B) 从所述经过振荡的体细胞中筛选出双联体细胞(doublet cells), 以及 (C) 制备选出的有丝分裂双联体细胞用于核转移。还可任选地包括一个冷却步骤, 其中选出的双联体细胞被冷却到低于新陈代谢的温度, 以延长 G_1 期。同样, 可选择地, 提高 G_1 期的细胞数量或者 G_1 期的时期可以通过将细胞放入到适当的培养基中来完成, 如缺乏至少一种下述物质的培养基: 血清, 异亮氨酸, 谷氨酰胺或磷酸盐, 或者加入 G_1 期同步化试剂(如蚜栖菌素或含羞草氨酸)。

本发明的一个具体目的是得到细胞, 例如快速分裂的体细胞(细胞周期在 15 个小时或更短时间内完成, 更优选 10 个小时或更短)。这样的细胞可利用上述方法制备得到。

附图说明

图 1: 汇合度和细胞寿命对细胞周期长度的影响。直方图说明 25% 汇合度的细胞相比于 90% 汇合度的细胞的细胞周期长度(以小时计)的区别。细胞周期在获自 40 天龄的胎儿(40D FET), 4 年龄的母牛(4 YRS),

15 年龄母牛 (15 YRS) 的细胞群和全体细胞中观察。

图 2: 培养时间和供体年龄对细胞生长速率的影响。比较 40 天龄胎儿 (40D FET), 0-13 月 (0-13 MO) 龄小牛和 24-72 月 (24-72) 龄小牛来源的细胞中的细胞生长速率。依据细胞培养的天数比较群体倍增 (PD)。平均 PD 值随着培养天数的增加而减小。

图 3: 从培养物中回收的成纤维细胞 G_1 期的长度。

发明详述

为更好地理解本发明, 下述具体描述参照了附图和实施例, 其中例举和描述了本发明优选的示例性实施方式。本发明涉及一种获得体细胞作为供体细胞的新方法, 其为核转移或核移植提供一种目前最优化的供体核群体。

A. 定义

“同步化的细胞”或“同步”指细胞培养物或制备所述细胞的方法, 该细胞中多于 90% 的细胞在 G_1 期。

“汇合细胞”指细胞群密度约为 90% 或更大。

术语“核转移”或“核移植”指一种克隆方法, 其中供体细胞核被移植到细胞胞质体内。该胞质体可来自于去核卵母细胞, 去核 ES 细胞, 去核 EG 细胞, 去核胚胎细胞或去核体细胞。核转移技术或核移植技术在文献中已知 (Campbell 等, *Theriogenology* 43:181 (1995); Collas 等, (1994); Keefer 等, (1994); Sims 等, (1993); Evans 等, W090/03432; Smith 等, W094/24274; 和 Wheeler 等, W094/26884。同样在 US. Patent Nos. 4, 994, 384 和 5, 057, 420 中描述了牛核移植的方法。在本申请中, “核转移”或“核移植”或“NT”可互相替换使用。

术语“核转移单元”和“NT 单元”指体细胞或细胞核与去核胞质体 (如去核卵母细胞) 之间的融合产物或注射产物, 其有时在此称融合 NT 单元。

“体细胞”指任何多细胞生物, 优选动物, 的细胞, 该细胞未成为配子。优选的“体细胞”是黏附细胞。“黏附细胞”指培养时会黏附在组织培养瓶或其它这类容器的表面上的细胞。

“动物”包括哺乳动物，例如家畜（如有蹄类，如牛，水牛，马，绵羊，猪和山羊），以及啮齿动物（如小鼠，仓鼠，大鼠和豚鼠），驯养动物如狗，猫，马，兔和灵长类动物。动物还包括濒危甚至灭绝的物种如 guar，大熊猫，象，非洲大羚羊，苏门答腊虎，bucardo 山羊，猎豹，豹猫等。

“双联体细胞(doublet cell)”包括通过细胞质桥连接的那些细胞。

“细胞质桥”发生在胞质分裂的最后阶段，在子细胞完全分离之前。

“快速分裂细胞”指在含有血清的培养基中以低群体密度（50%群体密度或更小）生长的细胞。

“G₁期同步试剂”指可提高 G₁期细胞的产生或滞留细胞在 G₁期的试剂。

“嵌合体”或“嵌合动物”指由两种遗传上不同类型的细胞组成的生物。嵌合体可以通过，例如两个早期囊胚期胚胎的融合形成。

“转基因动物”指其基因组整合进了一个或多个外来 DNA 分子的有机体。

B. 细胞周期同步化

可以使用有丝分裂振荡分离进行体细胞同步化，其中，通过拍击组织培养瓶，振荡细胞，使有丝分裂的细胞从瓶壁上摇下。简言之，在振荡分离前 24 小时以 0.5×10^6 细胞平板培养。典型地，在涡旋器或其它振荡仪器上放置培养瓶或其它组织培养皿约 30-约 60 秒，进行振荡分离。取出含有振荡分离出的细胞的培养基，离心。沉淀的细胞在 250 μ l 培养基中重悬浮。通过目测分离双联体细胞与振荡步骤得到的非双联体细胞。双联体细胞也可通过例如使用梯度离心将双联体细胞与非双联体细胞分开分离。

这些细胞可直接用于去核以进行核移植或核转移。可供选择地，该细胞可冷却到新陈代谢以下温度（如低于 37°C，更优选在 4-20°C，最优选在 4°C）以维持它们停滞在 G₁期。这些细胞可用其它方法使之保持在 G₁期，例如在双联体筛选后，培养基中剥夺血清或缺失异亮氨酸，谷氨酰胺或磷酸盐。药物，例如秋水仙碱，可阻留细胞在 M 期（JAMES D. WATSON

等, MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE 973 (4th ed., 1987)。其它药物可阻留细胞在 G₁ 期, 例如含羞草氨酸 (Krude, Exp. Cell. Res. 247: 148-59 (1999)), 糖皮质激素 (Sanchez 等, Cell Growth Differ. 4: 215-25 (1993)), 蛭蛭菌素和某些激酶抑制剂 (如 Gadbois 等, 1992 中描述的 KT5720, KT5823, KT5926 和 K5256)。其它药物阻断细胞在 G₁-S 边界, 包括双配位基的 3-羟基吡啶-4-酮和六配位基的去铁胺 (Hoyes 等, Cancer Res. 52: 4591-9 (1992))。这些药物可加入到选出的双联体细胞的培养基中以延长 G₁ 期的时间。

C. 使用体细胞进行核移植和转基因动物的培育

已使用绵羊成熟细胞和胎儿成纤维细胞用作核转移供体来产生克隆绵羊后代 (Wilmut 等, Nature 385: 810-813 (1997))。但是, 该项研究中, 重点在于使用处于静止状态的血清饥饿核供体细胞对于 Wilmut 克隆方法的成功非常重要。在本发明中无须血清饥饿或静止维持细胞在 G₀ 期。相反, 使用分化的正在通过细胞周期的哺乳动物细胞, 即 G₁ 期, G₂ 期或 M 期或 S 期细胞, 实现克隆。

这样, 一个方面, 本发明提供一种改进的克隆动物的方法。总体来说, 该动物是通过核转移方法产生的 (p Lourenco roduced), 该方法包括以下步骤:

- (i) 通过这里所述的方法获得目的体细胞作为供体核来源, 该细胞可以是血清饥饿或非血清饥饿的;
- (ii) 从动物如牛获得卵母细胞;
- (iii) 去除所述卵母细胞的细胞核;
- (iv) 将目的体细胞或细胞核转移至去核卵母细胞中, 例如通过融合或注射, 以形成 NT 单元;
- (v) 激活 NT 单元产生激活了的 NT 单元; 以及
- (vi) 将所述激活了的 NT 单元转移至宿主动物中, 使 NT 单元发育成胎儿。

可选择地, 激活的 NT 单元在转移到宿主动物中之前, 培养至 2 细胞发育阶段以上。

本发明还包括一种遗传工程或转基因动物的克隆方法，通过该方法，在将分化的动物细胞（如体细胞）或细胞核插入到核转移之前或之后去核的卵母细胞之前，在血清饥饿或非血清饥饿的分化动物细胞或细胞核中目的DNA序列被插入，去除或修饰。

除以上所述的用途之外，本发明的遗传工程或转基因动物还可用于产生目的蛋白，例如药理学上重要的蛋白例如人类血清白蛋白。该目的蛋白可从转基因动物的奶或其它液体或组织中分离得到。可替代地，外源DNA序列可带给转基因动物农业上有用的特性，例如疾病抗性，体内脂肪的减少，瘦肉产品增加，改进的饲料转化或改变的后代性别比例。

在去核和核转移时卵母细胞的成熟阶段已报道对于NT方法的成功具有显著的意义（Prather等，Differentiation 48: 1-8（1991））。大致上，成功的哺乳动物胚胎克隆实践是使用中期II期卵母细胞作为受体卵母细胞，因为据认为在这个阶段卵母细胞可以通过引起核解装配和染色质浓缩来重新编程核。然后诱导NT单元的激活。在驯化的动物中，卵母细胞激活期的范围通常为吸出后（post-aspiration）16-52个小时，优选大约20-45小时。

本领域已知卵母细胞的分离方法。基本上，这包括从动物例如牛的卵巢中或生殖道内分离出卵母细胞。一种容易获得的牛卵母细胞来源是来自屠宰场的原料。

为成功使用遗传改造，核转移和克隆等技术，在卵母细胞用作核转移的受体细胞之前，以及在它们可被精子细胞受精发育成胚胎之前，卵母细胞通常必须在体外成熟。这个过程大致需要收集哺乳动物卵巢如来自屠宰场牛卵巢的未成熟（前期I）卵母细胞，然后在受精或去核之前，在成熟培养基中使其成熟直到卵母细胞到达中期II阶段，通常对牛卵母细胞该期会出现在吸出后18-24小时。为了本发明的目的，该时间期被作为“成熟期”。在此用作计算时间期，“吸出（aspiration）”指未成熟卵母细胞从卵巢卵泡中吸出。

此外，在体内已成熟的中期II阶段卵母细胞，已成功应用于核转移技术。大致上，可从非超排卵或超排卵母牛或小母牛中，在发情期开始

之后或注射人类绒毛膜促性腺激素（hCG）或相似激素之后约 20 到约 30 小时，外科收集成熟母牛中期 II 卵母细胞。

已有报道称去核和核转移时卵母细胞成熟阶段对于成功的 NT 方法意义显著。（参见 Prather 等，Differentiation 48: 1-8（1991））。大体上，成功的哺乳动物胚胎克隆实践使用中期 II 期卵母细胞作为受体卵母细胞，因为在这个时期，据信卵母细胞可被或已被足够“激活”而将导入的核当作受精精子处理。在驯化的动物中，尤其是家畜，卵母细胞激活时期大致从吸出后 16-52 小时，优选 28-42 小时。

例如，未成熟的卵母细胞可在 HEPES 缓冲的仓鼠胚胎培养基（HECM）中清洗，如 Seshagine 等，Biol. Reprod. 40: 544-606（1989）中所述，然后在 39℃，将其置于由含有 10%胎牛血清的 50 μl 组织培养基（TCM）199 组成的成熟培养基液滴中，该培养基处在一层轻石蜡或硅油之下，并进一步含有适当促性腺激素如黄体生成素（LH）和促卵泡激素（FSH），和雌二醇。

经过一定时间的成熟期后，该成熟期范围为从约 10 到约 40 小时，优选 16-18 小时，卵母细胞将被去核。在去核之前，卵母细胞优选被分离并在移去丘细胞之前置于含有 1mg/ml 透明质酸酶的 HECM 中。这可通过从很细的吸液管反复吹打或通过简单涡旋进行。然后从剥离的卵母细胞中筛选极体，然后选出的中期 II 卵母细胞，正如极体的存在所确定的，用于核转移。

细胞去核的方法。去核可用已知的方法完成，例如在 U. S. Patent No. 4, 994, 384 中所述，该文献在此列入作为参考文献。例如将中期 II 卵母细胞置于可选含有 7.5 μl/ml 细胞松弛素 B 的 HECM 中，以进行立即去核，或者将其置于合适的培养基中如胚胎培养基，如 CR1 aa（CR1 培养基在 U. S. Patent No. 5, 096, 822 中描述。CR1 aa 以氨基酸进行补充），加入 10%发情期母牛血清，然后迟些时间优选不超过 24 小时之后，更优选 16-18 小时之后，进行去核。

去核可通过使用微量加样器除去极体和邻接的细胞质以显微手术方式进行。卵母细胞可被筛选以鉴定那些已成功去核的细胞。这种筛选可

这样实施：用 $1\mu\text{g/ml}$ 33342 Hoechst 染料在 HECM 中对卵母细胞进行染色，然后在紫外光下观察卵母细胞少于 10 秒钟。成功去核的卵母细胞可被置于合适的培养基如补充 10% 血清的 CR1aa 培养基中。

在本发明中受体卵母细胞优选在体外成熟起始后约 10 小时到约 40 小时，更优选在体外成熟起始后约 16 小时到 24 小时，最优选在体外成熟起始后约 16-18 小时的时间范围内被去核。

相同物种或不同物种哺乳动物的单个体细胞将被转移到用于产生 NT 单元的卵母细胞的卵周隙中。最近，有报道称转移 guar 细胞到去核的牛卵母细胞产生了能存活的胚胎 (Scientific American Lonza 等, October 2000)。根据本领域已知的方法，哺乳动物细胞和卵母细胞将用于产生 NT 单元。例如，细胞可用电融合进行融合。电融合可通过提供大得足够致使胞质膜瞬间损坏的电脉冲来实现。这种胞质膜的损坏是非常短暂的，因为膜很快重新形成。这样，如果两种邻接的膜被损坏，然后在重新形成脂双层时，将会在两个细胞之间打开小通道。由于这种小通道的热不稳定性，它将不断扩大直至两个细胞变为一个。参考 Prather 等的 U.S. Patent 4,997,384 (在此其全部被列入作为参考) 进一步讨论了该方法。可使用各种电融合介质，包括如蔗糖，甘露糖醇，山梨糖醇和磷酸盐缓冲溶液。融合可使用仙台 (Senclai) 病毒作为融合剂 (Graham, Wistar Inst. Symp. Monogr. 9: 19 (1969)) 来完成。

同样，在某些情况下 (如对小供体核)，可优选将核酸直接注射到卵母细胞中而不使用电融合。这种技术在 Collas 等, Mol. Reprod. Dev. 38: 264-267 (1994) 中公开，在此全部列入作为参考。

优选地，在卵母细胞成熟起始后约 24 小时，体细胞或生殖细胞和卵母细胞在 500p.m 室内应用约 90-120V 的电脉冲融合 15 微秒。融和后，得到的 NT 单元被置于合适的培养基如 CR1aa 培养基中直到激活。典型的激活可在其后短时间内，通常短于 24 小时后完成，优选在约 4-9 小时后完成。

NT 单元可通过已知的方法激活。这些方法包括如在亚生理学温度下培养 NT 单元，基本上是给 NT 单元应用冷或实际上凉的温度休克。这可

通过在室温下培养 NT 单元简便地完成，室温相对于胚胎通常所处的生理学温度条件要冷些。

可供替代的，激活可通过使用已知的激活剂来实现。例如在受精期间卵母细胞的精子渗透已显示出可激活融合前卵母细胞以在核转移后产生更大数量的存活受孕和遗传相同的多个小牛。同样，电休克和化学休克等处理也可激活融合后的 NT 胚胎。合适的卵母细胞激活方法已在 U. S. Patent No. 5, 496, 720 中由 Susko-Parrish 等进行了研究，在此将其全部列入作为参考。

此外，激活可通过同时或相继：

- (i) 增加卵母细胞中二价阳离子水平，以及
- (ii) 减少卵母细胞中细胞蛋白的磷酸化，来实现。

这可通过向卵母细胞胞质中导入二价阳离子例如镁，锶，钡或钙，例如以离子载体的形式，来完成。其它增加二价阳离子水平的方法包括使用电休克，用乙醇处理和用笼形螯合剂处理。

磷酸化作用可用已知的方法减少，例如通过加入激酶抑制剂（例如丝氨酸-苏氨酸激酶抑制剂，如 6-二甲基氨基嘌呤，星形孢菌素，2-氨基嘌呤和鞘氨醇）。

可供替代的，细胞蛋白的磷酸化还可通过向卵母细胞中加入磷酸酶来抑制，如磷酸酶 2A 和磷酸酶 2B。

在一个实施方案中，NT 激活通过简单地将融合的 NT 单元暴露在含有 5 μ M 离子霉素和 1mg/ml BSA 的 TL-HEPES 培养基中，然后在融和后约 24 小时内，优选在融合后约 4 到约 9 小时，将其在含有 30mg/ml 的 BSA 的 TL-HEPES 培养基中清洗，来实现。

激活的 NT 单元可在适合的培养基中体外培养，直到产生培养的内细胞群（CICM）细胞和细胞集落。适于培养和成熟胚胎的培养基在本领域中已知。已知可用于牛胚胎培养和维持的培养基包括 Ham's F-10+10%胎牛血清（FCS），补充 10%胎牛血清的组织培养培养基 199（TCM-199），Tyrodes-白蛋白-乳酸盐-丙酮酸盐（TALP）（Tyrodes-Albumin-Lactate-Pyruvate），Dulbecco's 磷酸盐缓冲液

(PBS), Eagle's 和 Whitten's 培养基。一种用于收集和成熟卵母细胞的普通培养基是 TCM-199, 补充 1-20%FCS, 新生动物血清, 发情期母牛血清, 羊羔血清或去势牛血清。优选的维持培养基包括含有 Earl 盐, 10% 胎牛血清, 0.2mM 丙酮酸钠和 50 μ g/ml 庆大霉素硫酸盐的 TCM-199。上述任一种还可包括共同培养各种细胞类型, 例如颗粒细胞, 输卵管细胞, BRL 细胞和子宫细胞和 STO 细胞。

另一种维持培养基在 Rosenkrans 的 U.S. Patent No. 5,096,822 中有描述, 在此将其列入作为参考。这种胚胎培养基, 命名为 CR1, 含有维持胚胎所必需的营养物质。

例如, 激活的 NT 单元可转入含有 2.0mM DMAP (Sigma) 的 CR1aa 培养基中, 并在环境条件下培养, 例如约 38.5 $^{\circ}$ C, 5%CO₂, 适合的时间如约 4 到约 5 小时。

然后, 优选清洗培养的 NT 单元, 然后置于合适的培养基中, 如含有 10%FCS 和 6mg/ml 含有 20 在孔平板中的 CR1aa 培养基, 该平板优选包含适当的汇合饲养层。合适的饲养层包括, 举例来说, 成纤维细胞和上皮细胞, 如来源于有蹄类的成纤维细胞和子宫上皮细胞, 鸡成纤维细胞, 鼠(如小鼠或大鼠)成纤维细胞, STO 和 SI-m220 饲养细胞系和 BRL 细胞。

胚胎转移的方法和受体动物的管理在本发明中是胚胎转移工业中使用的标准方法。同步的转移对于本发明的成功是重要的, 即, NT 胚胎的阶段与雌性受体动物的发情周期是同步的。这一点的优点和如何维持受体在 Seidel, "Critical review of embryo transfer procedure with cattle", FERTILIZATION AND EMBRYONIC DEVELOPMENT IN VITRO (L Mastroianni, Jr 等编. Plenum Press, New York, NY, 1981) 中回顾, 在此将其列入作为参考。

本发明还可用于克隆基因工程的或转基因的动物。如上所述, 本发明的优点在于转基因方法可以通过使用体细胞来源而简化, 该体细胞源可被克隆繁殖。尤其的, 供体核所用的体细胞, 可以是血清饥饿或非血清饥饿的, 具有插入, 缺失或修饰的目的 DNA 序列。然后这些遗传改变后的体细胞将和卵母细胞用于核移植。

任何已知的插入, 缺失或修饰哺乳动物细胞目的 DNA 序列的方法都可用于改变将用作核供体的体细胞。这些方法可以去除 DNA 序列的全部或部分, 而且该 DNA 序列可以是异源的。还包括同源重组的技术, 其可允许在细胞基因组特异的一个或几个位点进行一段 DNA 序列或几段序列的插入, 缺失或修饰。一个优选的方法是正/负筛选方法, 其由 Capecchi 申请了专利 (U.S. Patent No. 5, 631, 153, 5, 627, 059 和 5, 847, 982), 或在 U.S. Patent No. 6, 110, 735; 5, 948, 653; 5, 925, 577; 5, 830, 698; 5, 776, 777; 5, 763, 290; 5, 574, 205 和 5, 527, 644 中所述的载体, 将以上文献全文列入作为参考。

本发明还可用于提供带有目的基因型的成年动物, 例如母牛。带有证实的遗传优越性或其它目的性状的成年动物的增殖是十分有用的, 这包括转基因或基因工程的动物和嵌合动物。这样, 本发明将可以产生单性别后代, 并产生具有改进的肉生产, 繁殖性状和/或疾病抗性的动物。进一步的, 来自 NT 胎儿的细胞和组织, 包括转基因和/或嵌合胎儿, 如下所述, 结合使用 CICM 细胞, 可用于治疗多种疾病的细胞、组织和器官移植中。因此, 转基因动物具有多种用途, 包括疾病模型, 外源移植细胞或器官, 以及产生药用蛋白。

为产生 CICM 细胞和细胞系, 在促进细胞分裂而不分化的条件下培养激活的 NT 单元。当 NT 单元已培养到所需的大小时, 采用机械方法从透明带中分离出细胞, 然后投入使用。这可优选通过如下方式完成: 取出包含培养的 NT 单元 (其典型地含有至少约 50 个细胞) 的细胞团, 清洗这些细胞, 并将其在饲养层 (如射线照射的成纤维细胞) 上平板培养。典型的, 用于制备干细胞或细胞集落的细胞将从培养的 NT 单元内的大部分中得到, NT 单元优选的大小是含有至少 50 个细胞。但是, 具有更少或更多细胞的培养 NT 单元以及从培养 NT 单元其它部分得到的细胞也可用于获得 ES 细胞和细胞集落。这些细胞在饲养层上适当的培养基如补充 10%FCS 和 0.1mM β -巯基乙醇 (Sigma) 和 L-谷氨酰胺的 alpha MEM 中维持。生长培养基尽可能经常更换以优化生长, 如约每 2-3 天更换。

这种培养方法导致 CICM 细胞或细胞系的形成。本领域技术人员可按

特定 CICM 细胞最适生长的需要改变培养条件。同样，例如，基因工程或转基因母牛 CICM 细胞可按本发明的方法产生。那即是说，上述方法可用于生产这类 NT 单元，该单元已导入一段或几段目的 DNA 序列，或者该单元中已去除或修饰了一段或几段内源 DNA 序列。这些基因工程或转基因 NT 单元可用作产生基因工程或转基因 CICM 细胞。

这样得到的 CICM 细胞和细胞系具有很多治疗和诊断应用。最特别的是，这样的 CICM 细胞可用作细胞移植治疗。

在这个方面，已知小鼠胚胎干 (ES) 细胞能够分化成几乎所有的细胞类型，如造血干细胞。所以，本发明制备的 CICM 细胞应当具有类似的分化能力。根据已知的方法，本发明的 CICM 细胞可经诱导分化得到目的细胞类型。例如，通过在分化培养基中和细胞分化所需条件下培养 CICM 细胞，目的母牛 CICM 细胞可诱导分化成造血干细胞，神经细胞，肌细胞，心肌细胞，肝脏细胞，软骨细胞，上皮细胞，尿道细胞，神经细胞等。导致 CICM 细胞分化的培养基和方法以及合适的培养条件是本领域内公知技术。

例如，Palacios 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 7530-7 (1995) 介绍了通过将干细胞经过诱导方法，从胚胎细胞系产生造血干细胞，该诱导方法包括在缺乏视黄酸的悬浮培养基中开始培养这些细胞聚集物，然后在含有视黄酸的相同培养基中培养，然后将细胞聚集物转移到一种可提供细胞黏附的基质中。

而且，Pedersen, J. *Reprod. Fertil. Dev.* 6: 543-552 (1994)，一篇评论文章，引用了大量文献，这些文献公开了体外分化胚胎干细胞来产生不同分化了的细胞类型的方法，其中包括细胞造血细胞，肌细胞，心肌细胞，神经细胞。这些文献特别是其中涉及分化胚胎干细胞的方法的公开在此将其全文列入作为参考。

这样，使用已知的方法和培养基，本领域技术人员可培养目的体细胞和利用体细胞核制备得到的细胞，来获得用于产生转基因或嵌合动物的细胞。

本发明已通过优选实施方式来说明。但是，对于本领域技术人员而言，

可在不脱离本发明精神的原则下，将本发明以不同于上述形式的具体形式实施。下述实施例是用于说明而不能将本发明保护范围限于此。本发明的保护范围由附加的权利要求书说明，而不是由前述的说明限定，所有落入权利要求范围的变化或替换均属本发明保护范围。

实施例 1

汇合和细胞年龄对于细胞周期长度的影响

建立胎儿细胞系 从屠宰场得到牛胎儿，测量其顶臀长度。在洗液（含有抗生素/抗真菌剂（Sigma）和二性霉素（Gibco）的 DPBS）中清洗后，去除头部和内部器官，剩余的组织用解剖刀分成细小块状。通过将组织块沉到 50ml 试管底部再去除上清液的方法使其在洗液中清洗 2 次。向组织块加入 30-40ml 含有 0.08%胰蛋白酶（Difco）和 0.02%EDTA（Sigma）的 PBS（Gibco）溶液，在 39℃，5%CO₂ 条件下培养组织块 30min。每间隔 30min，小心移出上清液，在另一试管中以 300 ×g 离心 5min。然后去除上清液，分离出组织块，再另外加入 30-40ml 含有 0.08%胰蛋白酶和 0.02%EDTA 的 PBS 溶液，再在 39℃，5%CO₂ 条件下培养组织块 30min。小心移出上清液将组织块保留在 50ml 试管中；再向组织块中加入等体积的补充了 10%FCS（胎牛血清，Hyclone），谷氨酰胺（Sigma），巯基乙醇（Gibco）和抗生素/抗真菌剂的 alpha MEM（Gibco），将组织块以 1,000 ×g 离心 5 分钟。小心吸出上清液分离沉淀。在补充了上述组分的 alpha MEM 中重悬浮组织块，在 100mm 组织培养皿（Coming）上接种，39℃，5%CO₂ 条件下培养。组织块再用含有胰蛋白酶-EDTA 的 PBS 溶液培养，收集上清，并如上所述接种细胞。接种的第三天，使用胰蛋白酶-EDTA 溶液收集细胞，并计数。选出 1 百万个细胞，在 100mm 组织培养皿上再接种，剩余的细胞冷冻在含有 10%DMSO（Sigma）的 alpha MEM 中。本领域技术人员可同样制备其它类似的贴壁细胞。

建立小牛和成熟细胞系 通过修剪皮毛以及消毒液清洗以彻底清洁皮肤表面后在耳朵上打孔（1mm）。耳打孔样品用洗液清洗 3 遍，分离出皮肤外层和内层表面之间的软骨部分。样品转移到 100mm 组织培养皿上，用载玻片覆盖以防止其在培养基中飘浮。制得该外植体后，加入 10ml 补

充了建立胎牛细胞系(上述)中所用组分的 alpha MEM, 并在 39℃, 5%CO₂ 条件下培养。在第 10 天分离出外植块后, 使用含 0.08%胰蛋白酶和 0.02%EDTA 的 PBS 溶液收集单层细胞, 计数并在 100mm 组织培养皿中重接种。

群体倍增和细胞计数 初次接种后, 当细胞有 90%汇合时通过标准胰蛋白酶作用方法使用 20 0.08%胰蛋白酶和 0.02%EDTA 的 PBS 溶液计数细胞。收集的细胞以 1000 ×g 离心 5 分钟, 细胞沉淀在 10ml alpha MEM 中重悬浮。使用血细胞计数器计数合适的细胞样品。当这些培养物达到 95%的汇合时, 收集细胞, 计数, 计算其群体倍增时间。重复该方法直到这些细胞衰老。在收集过程和重接种步骤中得到的过量细胞冷冻在补充的 alpha MEM 和 10%DMSO (Sigma) 中, 在液氮中保存。

细胞固定, 染色和流式细胞术 比较不同汇合度细胞的细胞周期(图 1)。细胞经过在 70%乙醇中的过夜固定后, 用冷的 PBS 彻底清洗细胞, 再用 10 RNase 处理, 接下来在 37℃ 孵育 2-3hrs。孵育后, 用 propidium 碘化物 (Sigma) 染色。

分离分裂的 G₁ 期细胞 在“振荡分离”前 24 小时, 5.0 × 10⁵ 的细胞接种于含有 10ml 补充了 10%FCS 的 alpha MEM 的 100mm Corning 组织培养皿中。第二天用 PBS 清洗平皿, 在振荡分离前约 1 到约 2 小时替换培养基。将这些平皿涡旋 30-60 秒, 取出培养基并离心, 将细胞沉淀在 250 μl 培养基中重悬浮。

通过胞质桥连接的细胞刚刚经历胞质分裂, 处于早 G₁ 期。在接下来的实验中, 这些早 G₁ 期细胞基于这个特性被鉴定出(通过目测法)并投入使用。

G₁ 期双联体的 Bdru 标记 G₁ 期双联体细胞置于含有 250 μl 补充了溴脱氧尿苷 (Bdru) (Boehringer Mannheim) alpha MEM 的 Lab-Tek 4 孔培养室 (Nunc) 中。在 0, 2, 4, 和 7 小时, 用 70%的乙醇(在 50mM 甘氨酸缓冲液中, pH2.0) 固定细胞约 20 分钟。固定后, 清洗细胞, 用抗 Bdru 在 37℃ 孵育 30min。30min 后, 清洗细胞, 并加入抗鼠 Ig 荧光素; 然后将固定的细胞在 37℃ 再孵育另外的 30 分钟。在再次孵育之后, 清洗

固定的细胞，再用甘油封固。使用落射荧光显微镜（Nikon）鉴定处在 S 期细胞所占的百分比。

细胞周期长度的评定 使用 25 μm 的倾斜针通过标准显微操作分离出 G_1 期双联体。单个的双联体转移到 50A⁴ 滴来源于成纤维细胞活跃分裂培养物的补充了 10% FCS 的 alpha MEM(条件培养基)中。摘下(Pick-off)的时间计为 0 小时，此后每 2 个小时评定分离的双联体的细胞分裂程度。每个培养皿评定 10 微滴，在 24 小时内分裂的细胞所占比例用于计算平均细胞周期长度。

图 1 的结果是通过测量 90%汇合细胞对 25%汇合细胞的细胞周期长度得到的。得到细胞，如上所述进行接种。在多数情况下，25%汇合度的细胞其细胞周期长度短于 90%汇合度的细胞细胞周期长度。

实施例 2

培养时间和供体年龄对细胞生长速率的影响

图 2 说明上述制备得到的细胞其培养时间的增长，导致每天群体分裂或倍增数目 (PD/DY) 减少。

实施例 3

培养物回收的成纤维细胞的 G_1 期长度

成纤维细胞按实施例 1 所述制备，培养，收集。图 3 显示在采取 (pick-off) 后从培养物中回收的成纤维细胞的 G_1 期长度。

实施例 4

在低汇合度下使用细胞振荡分离和筛选有丝分裂双联体细胞制备用于核转移的体细胞

按以上实施例 1 中所述制备用于核移植的细胞。

核移植 用 1.0%透明质酸酶在 18hpm 在体外剥离成熟的卵母细胞。卵母细胞在 TL-hepes 中清洗，然后用 Hoescht 33342(Sigma)染色 20min。使用 18-20 μm 倾斜针去除细胞核。用 UV 光确定核的去除。在 24 小时，供体细胞使用 20 μm 倾斜针进行转移，在以山梨醇作基础的培养基中使用 115mV 电脉冲融合 20sec(Electrocell manipulator 200, Sam Diego, CA)。

激活 在 28hpm, 使用一种 Ca 离子载体 (5mM) (Cal Biochem) 处理重建的卵母细胞和对照 4min 并用 DMAP (200mM) 处理 3.5 小时使其化学激活。在激活后 3.5 小时, 卵母细胞在 HCEM hepes 中简单清洗并转入培养。

在体外培养核转移胚胎 在含有小鼠阻断饲养层和 0.5ml 覆盖有 200 μ l 胚胎测试矿物油 (Sigma) 的培养基的 4-孔组织培养皿 (Munc) 中进行胚胎的培养。25-50 个胚胎被置于每一个孔中, 在 39 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 条件下培养。在第四天, 向培养基中加入 10%FCS。在第 7 和第 8 天, 记录向胚胎的发育 (development to blastocyst was 10 recorded)。使用在甘油中的 1% Hoechst (Sigma) 封固细胞, 描述细胞数目。

应用的供体体细胞优选任何一种贴壁细胞。本领域技术人员也知悉可以替换和使用其它类似的方法和材料。

实施例 5

在低汇合度下采用细胞振荡分离和有丝分裂双联体筛选制备用于核转移的体细胞以及使用冷却步骤延长 G₁ 期

如上所述, 通过将细胞置于 4 $^{\circ}$ C 和进行核转移步骤可延长体细胞的 G₁ 期。

实施例 6

结合血清饥饿采用有丝分裂振荡分离以及双联体细胞筛选制备用于核移植的供体体细胞

以上所用的方法和材料可以与某些试剂结合使用, 这些试剂使细胞同步化在 G₁ 期, 例如某些激酶抑制剂 (如 KT5720, KT5823 或 KT5926)。细胞可通过上述的振荡分离制备得到。然后细胞可在含有激酶抑制剂的培养基中重悬浮, 激酶抑制剂可以下述任一种浓度存在: KT5720 约 11 μ M, KT5823 约 15 μ M, KT5926 约 3 μ M 或 K2526 约 11 μ M。如果需要进一步延长 G₁ 期, 可通过将细胞置于 4 $^{\circ}$ C 进一步延长 G₁ 期。然后细胞可如前述进行应用。

在此所有的参考文献全文列入作为参考。

图 1

汇合度与细胞年龄对细胞周期长度的影响

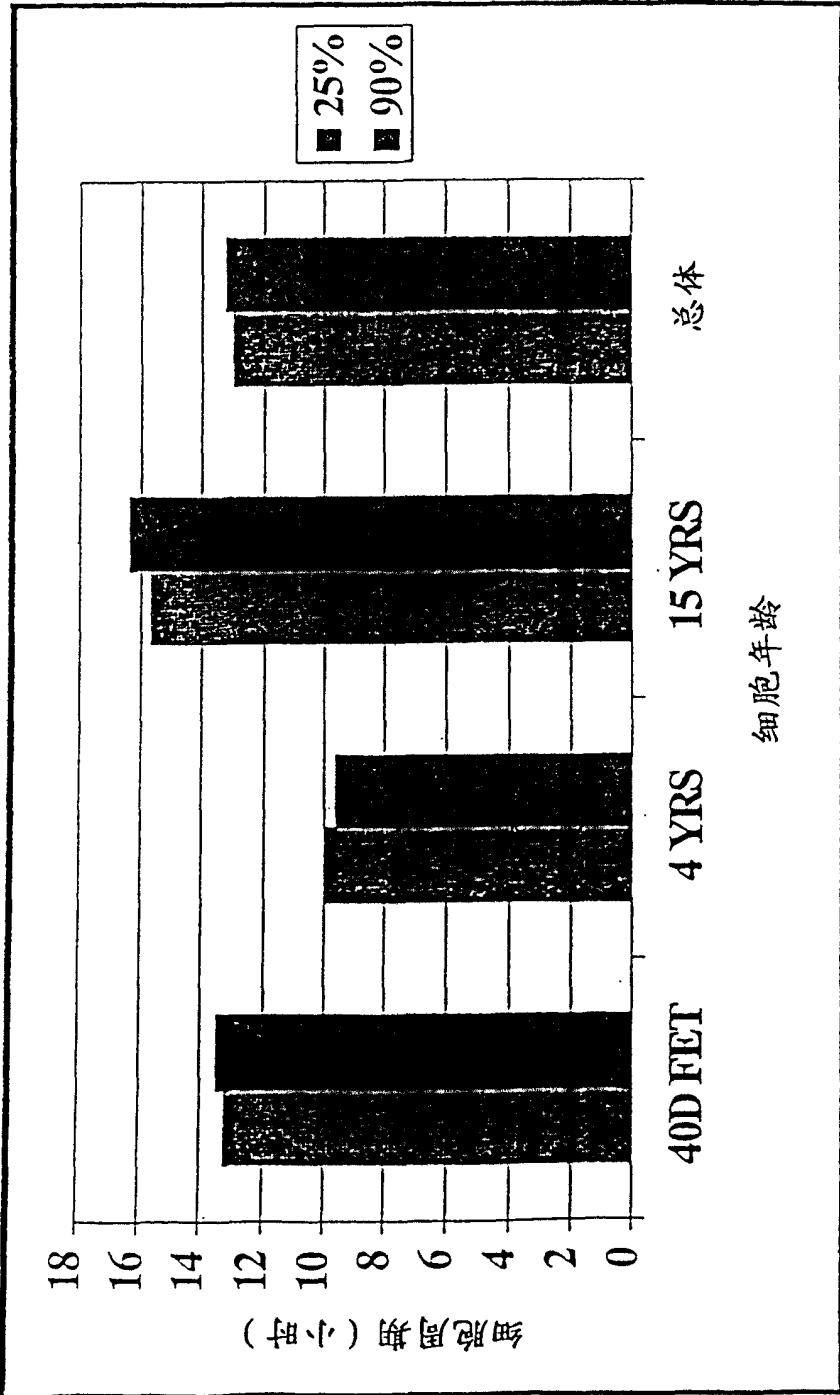


图 2

培养时间和供体年龄对细胞生长速率的影响

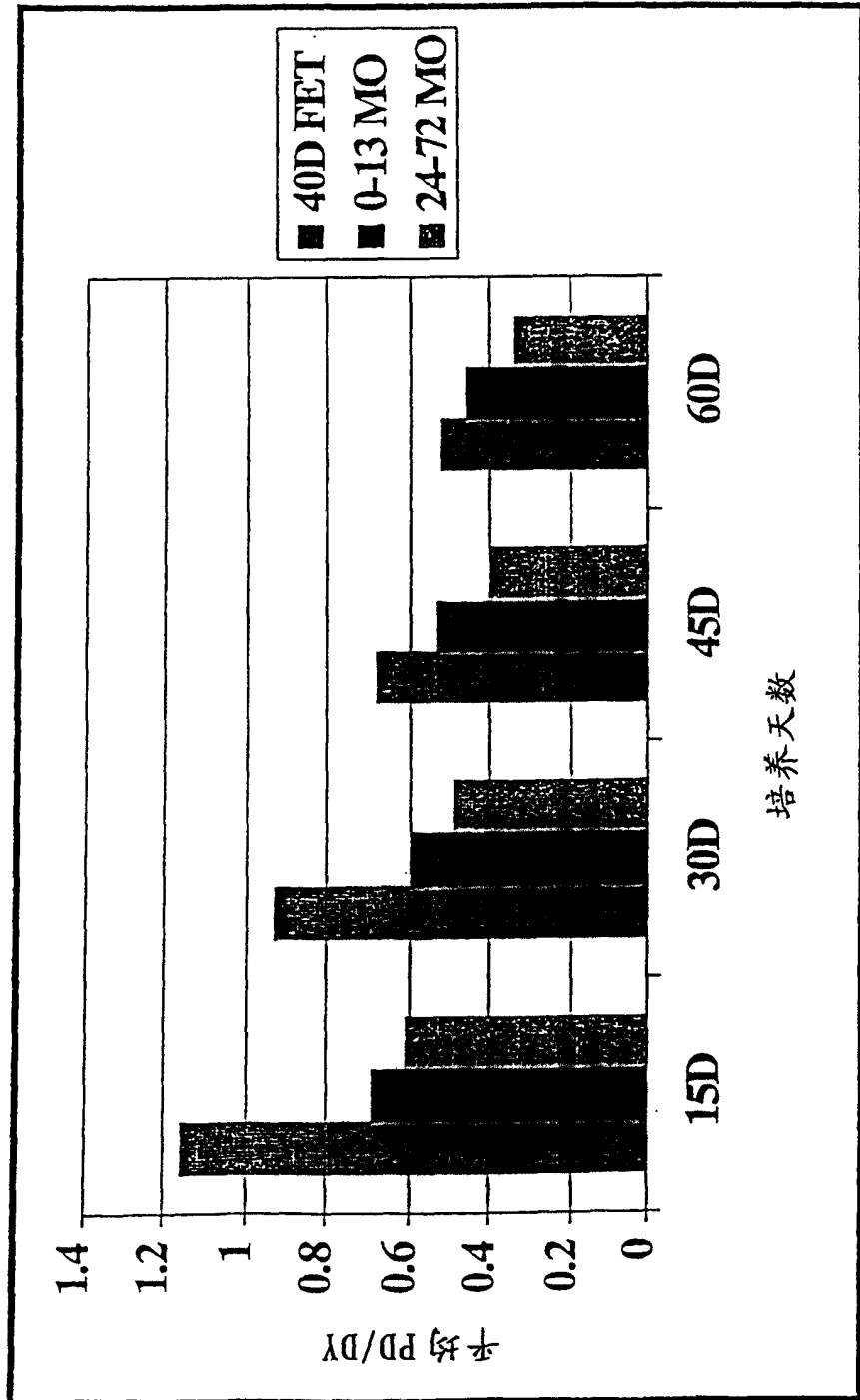


图 3

从培养物中回收的成纤维细胞 G1 期长度

