

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

A01K 67/027

C12N 15/87

# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99803907.1

[43] 公开日 2001 年 8 月 1 日

[11] 公开号 CN 1306390A

[22] 申请日 1999.1.20 [21] 申请号 99803907.1

[30] 优先权

[32] 1998.1.21 [33] US [31] 60/072,002

[32] 1998.6.19 [33] US [31] 60/089,940

[32] 1998.8.10 [33] US [31] 09/132,104

[86] 国际申请 PCT/US99/01144 1999.1.20

[87] 国际公布 WO99/37143 英 1999.7.29

[85] 进入国家阶段日期 2000.9.11

[71] 申请人 夏威夷大学

地址 美国夏威夷

[72] 发明人 T·瓦卡雅玛

R·杨吉麦希

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 徐 迅

权利要求书 3 页 说明书 30 页 附图页数 5 页

[54] 发明名称 以成年体细胞胞核重建的去核卵母细胞足月发育成动物

[57] 摘要

将成年体细胞胞核注入去核卵母细胞中后,产生动物。本发明提供了一种克隆动物的方法,该方法是将至少一部分成年体细胞胞核插入接受的去核卵母细胞中。较佳的,通过显微注射插入胞核,更佳的,通过压电驱动的显微注射插入胞核。卵母细胞在插入胞核之前、同时、或最多 6 小时后通过电激活或与化学激活剂(如  $Sr^{2+}$ )接触而激活。使激活的核植入的卵母细胞发育成胚胎,并移植到宿主替代母亲中发育成活的后代。



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

# 权 利 要 求 书

1. 一种克隆动物的方法，该方法包括下列步骤：
  - (a)从成年动物的体细胞收集体细胞胞核；
  - 5 (b)将包括染色体的至少一部分体细胞胞核插入去核卵母细胞中形成核植入的卵母细胞；
  - (c)使核植入的卵母细胞发育成胚胎；和
  - (d)使胚胎发育成活的后代。
2. 根据权利要求1所述的方法，其中成年体细胞是卵丘细胞。
- 10 3. 根据权利要求1所述的方法，其中成年体细胞是成纤维细胞。
4. 根据权利要求3所述的方法，其中成纤维细胞是培养的细胞。
5. 根据权利要求3所述的方法，其中成纤维细胞来自成年雄性动物。
6. 根据权利要求3所述的方法，其中成纤维细胞来自成年雌性动物。
7. 根据权利要求1所述的方法，其中成年体细胞胞核具有二倍染色体。
- 15 8. 根据权利要求1所述的方法，其中成年体细胞胞核是2C至4C。
9. 根据权利要求1所述的方法，其中将成年体细胞胞核插入去核卵母细胞的细胞质中。
10. 根据权利要求1所述的方法，其中插入步骤通过显微注射来实现。
11. 根据权利要求10所述的方法，其中显微注射是压电驱动的显微注射。
- 20 12. 根据权利要求1所述的方法，其中去核卵母细胞停滞于第二次减数分裂的中期。
13. 根据权利要求1所述的方法，它还包括在插入成年体细胞胞核之前、同时或之后激活卵母细胞的步骤。
14. 根据权利要求13所述的方法，其中激活步骤发生在插入成年体细胞胞核后  
25 0至6小时内。
15. 根据权利要求13所述的方法，其中激活步骤发生在插入成年体细胞胞核之后1至3小时内。
16. 根据权利要求13所述的方法，其中激活步骤包括电激活、或暴露于化学激活剂。
- 30 17. 根据权利要求16所述的方法，其中化学激活剂选自乙醇、精子胞质因子、卵母细胞受体配体肽模拟物、Ca<sup>2+</sup>释放的药物刺激剂、Ca<sup>2+</sup>离子载体、锶离子、磷蛋白信号传导调节剂、蛋白合成的抑制剂和它们的组合。



18. 根据权利要求 16 所述的方法，其中化学激活剂选自咖啡碱、Ca<sup>2+</sup>离子载体 A 23187、乙醇、2-氨基嘌呤、星形孢菌素、鞘氨醇、环己酰胺、离子霉素、6-二甲基氨基嘌呤和它们的组合。
19. 根据权利要求 17 所述的方法，其中激活剂包括 Sr<sup>2+</sup>。
- 5 20. 根据权利要求 1 所述的方法，该方法还包括在插入成年体细胞胞核之前或之后破坏卵母细胞中的微管和/或微丝装配一段时间的步骤。
21. 根据权利要求 20 所述的方法，其中该时间间隔为 0 至 6 小时。
22. 根据权利要求 20 所述的方法，其中用选自细胞松弛素 B、噻氨酯哒唑、秋水仙碱及其组合的物质破坏微管和/或微丝装配。
- 10 23. 根据权利要求 22 所述的方法，其中用细胞松弛素 B 破坏微管和/或微丝装配。
24. 根据权利要求 1 所述的方法，该方法还包括在插入成年体细胞胞核之前或之后破坏卵母细胞中的微丝一段时间的步骤。
25. 根据权利要求 24 所述的方法，其中该时间间隔为 0 至 6 小时。
- 15 26. 根据权利要求 24 所述的方法，其中用细胞松弛素 D、甲斯普拉诺、拉纯库林 A 或它们的组合来破坏微丝。
27. 根据权利要求 1 所述的方法，其中使胚胎发育成活后代的步骤还包括将胚胎转移给雌性替代接受者的分步骤，其中该胚胎发育成活的胎儿。
28. 根据权利要求 1 所述的方法，其中插入步骤还包括将试剂加入所述卵母细胞 20 胞的细胞质中。
29. 根据权利要求 28 所述的方法，其中该试剂选自外源蛋白、外源蛋白的衍生物、抗体、药物制剂及其组合。
30. 根据权利要求 28 所述的方法，其中插入步骤还包括将外源核酸或外源核酸的衍生物插入所述卵母细胞的细胞质中。
- 25 31. 根据权利要求 1 所述的方法，其中动物选自哺乳动物、两栖动物、鱼类和鸟类。
32. 根据权利要求 31 所述的方法，其中哺乳动物选自灵长类动物、羊、牛、猪、熊、猫、狗、马、啮齿类动物。
33. 根据权利要求 32 所述的方法，其中哺乳动物是小鼠。
- 30 34. 一种动物，它的体细胞和种系细胞只含有从成年动物的成年体细胞胞核衍生的染色体。
35. 根据权利要求 34 所述的动物，其中动物选自哺乳动物、两栖动物、鱼类和

鸟类。

36. 根据权利要求 35 所述的动物，其中哺乳动物选自灵长类动物、羊、牛、猪、熊、猫、狗、马、啮齿类动物。

37. 根据权利要求 36 所述的动物，其中哺乳动物是小鼠。

5 38. 根据权利要求 34 所述的动物，其中成年体细胞是卵丘细胞。

39. 根据权利要求 34 所述的方法，其中成年体细胞是成纤维细胞。

40. 根据权利要求 39 所述的方法，其中成纤维细胞是培养的细胞。

41. 根据权利要求 40 所述的方法，其中成纤维细胞来自成年雄性动物。

42. 根据权利要求 40 所述的方法，其中成纤维细胞来自成年雌性动物。

10 43. 一种调节胚胎发育的方法，该方法包括下列步骤：

(a)将成年体细胞的胞核与去核卵母细胞合并，形成核植入的卵母细胞；

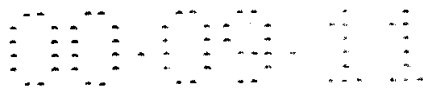
(b)在该合并步骤之前、同时或之后，将试剂插入卵母细胞的细胞质中；和

(c)使经试剂处理的核植入的卵母细胞发育成胚胎。

15 44. 根据权利要求 43 所述的方法，其中试剂选自外源蛋白、外源蛋白的衍生物、抗体、药物制剂、外源核酸、外源核酸的衍生物及其组合。

45. 根据权利要求 43 所述的方法，其中插入步骤包括显微注射。

46. 根据权利要求 45 所述的方法，其中显微注射是压电驱动的显微注射。



# 说明书

## 以成年体细胞胞核重建的去核卵母细胞足月发育成动物

5

本申请是 1998 年 8 月 10 日提交的美国专利申请 No. 09/132,104 的部分续展申请, 该专利申请要求了 1998 年 1 月 21 日提交的美国临时专利申请 No. 60/072,002 和 1998 年 6 月 19 日提交的 No. 60/072,002 的优先权。

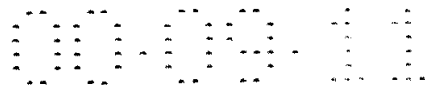
10 美国政府在本发明中有一个已支付的许可, 并且在一定情况下有权根据公众健康服务部国立卫生研究院资助合同 No. R01-HD-03402 中的条款要求专利所有人以合理的条件许可他人。

### 发明背景

15 本发明涉及一种克隆动物的方法, 该方法是将成年体细胞的细胞核插入去核的卵母细胞, 从而使宿主卵母细胞形成胚胎, 并能发育成活的动物。在本发明的一个实施方案中, 细胞核的插入是通过压电驱动的显微注射来实现的。

20 迅速生产大量几乎相同的动物是非常希望的。例如, 当几乎相同的动物是基因工程产生的(例如转基因)动物时, 预计可以获得广泛的医学效益。经过遗传改变的大动物可作为活的药物“工厂”, 在其乳液或其它体液或组织中生产出有价值的药物制剂(该生产方法有时称为“产药(pharming)”), 或可作为活器官或细胞的“工厂”, 产生不会被人免疫系统排斥的人类器官或细胞。生产大量几乎相同的研究动物如小鼠、豚鼠、大鼠和仓鼠也是所希望的。例如, 小鼠是研究哺乳动物生物学的主要研究模型, 因此几乎相同的转基因或非转基因小鼠的获得对于(例如)分析胚胎发育、分析人疾病以及测试新药是非常有益的。因此, 出于各种原因(例如在繁殖农场动物方面, 25 或解释小鼠中产生的资料方面), 希望能可靠地产生在遗传学上与其亲代几乎相同的特定动物的后代。

30 另外, 在转基因技术中, 目前用来产生转基因动物的方法并非先进得足以保证整个动物中的基因表达受程序控制。尽管可以最大程度地减小由转基因整合到宿主基因组中的准随机方式引起的有害的“位置”效应, 但是携带插入相同基因座的相同拷贝数的同一转基因构建物的个体之间仍存在转基因表达水平的差异。因此, 即使是产生为数不多的能产生所需水平给定重组蛋白的转基因动物仍是非常耗时和昂贵的。由于转基因后代的数目通常很低(通常只有一个, 因为效率低), 且许多转基因动物是不能生育的, 这些问题可能会进一步加剧。



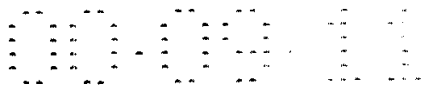
解决这些问题的一种方法是从具有所需性状或能产生所需水平目标产物的转基因或非转基因成年动物细胞“克隆”出遗传上几乎相同的动物。所以，能从一个成年动物的细胞相当迅速地产生遗传上几乎相同的动物群落(克隆)。另外，选择性地、可靠地克隆能产生高产量乳液和肉的成年动物，就能迅速地产生大量的高产者。从成年体细胞克隆动物在复制宠物(如狗、猫、马、鸟等)以及稀有或将要绝种的动物方面也是有益的。本文所用的“克隆”指完全发育至动物成年期，该动物的非线粒体DNA可以通过将供体体细胞的核染色体转移到已经除去原有染色体的受体细胞(如卵母细胞)中而从该供体体细胞衍生获得。

在正常的哺乳动物发育中，卵母细胞在第一次减数分裂前期发育停滞在生发泡(GV)阶段。在合适的刺激(例如血浆促黄体素骤增)下，继续开始减数分裂，生发泡破裂，完成第一次减数分裂，然后卵母细胞停滞在第二次减数分裂中期(“Met II”)。然后，Met II 卵母细胞能排卵和受精。一旦受精，卵母细胞完成减数分裂，排出第二极体，形成雄性和雌性的前核。胚胎开始发育，经历一系列的减数分裂然后分化成特异性的细胞，从而导致组成组织和器官。这种发育程序确保了从卵母细胞成功地转变至后代。

尽管认为早期胚胎的细胞在分类上是全能的(即它们本身能发育成新的个体)，但是这种全能性在几次分裂后丧失，而动物种类(如鼠和牛的胚胎)之间的分裂次数是不同的。对这种表现上的全能性丧失的机制尚知之很少，但推测它反映了影响基因表达的DNA环境中的细微变化，总称为“重新编程(reprogramming)”。不希望受理论的束缚，认为克隆技术可能扰乱或模拟了“重新编程”。

鉴于克隆在实践上的众多优点，人们对克服技术障碍和胚胎细胞或胎儿细胞(fetal cell)与去核卵母细胞融合新技术的开发有极大的兴趣。然而，迄今还没报道过一种方法经从成年体细胞再现地产生了足月发育(full term development)的克隆(个体)。例如，曾报道说，将牛卵丘细胞核注射到去核卵母细胞内，然后将这些卵母细胞电激活，351个注射后的卵母细胞中有9%发育成胚泡，但没有一个发育到底。同样，用仙台病毒介导成年小鼠胸腺细胞与去核的Met II卵母细胞融合，然后用7%乙醇激活30至60分钟，结果使20个卵母细胞中70%达到2细胞阶段，但是没有一个是发育超过4细胞阶段。

最近的一份报告描述了培养的“乳腺细胞”与去核的卵母细胞电融合产生了一个活的后代绵羊，称为“多利”(Wilmut, I. 等人 (1997), Nature 385, 810-813)。据报道，多利羊是去核卵母细胞在血清饥饿条件下培育5天的与乳腺衍生细胞电融合的434个中的一个发育而成。根据报道用来克隆多利羊的方法，系通过显微移液将“乳



腺细胞”插入去核卵母细胞的卵周隙内。Wilmot 报道说，立即给予细胞电脉冲，以诱导膜融合并激活卵母细胞以触发细胞周期的再次开始。将所得的胚胎(在实验中还有其它 28 个)转移到合适的接受者中，在这个唯一的例子中，受孕产生了多利羊。然而，由于该“乳腺细胞”取自 6 岁处于第三次受孕、受孕三个月的绵羊建立的细胞系，因此公众怀疑获得供体细胞胞核的细胞身份，甚至怀疑该细胞是否来源于成年羊。

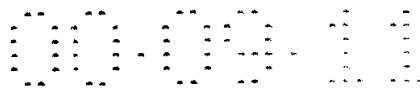
在我们的共同拥有的待批美国专利申请 No. 09/132,104(本申请是它的部分续展)中，我们公开并要求了一种从成年体细胞克隆动物的可控制的有效方法，其典型例子是从成年卵丘细胞胞核成功地产生了克隆的能生育的小鼠。我们还公布说，该方法能成功地用于产生该克隆小鼠的克隆。由于供体卵丘细胞的来源是雌性的，因此产生的所有克隆小鼠都是雌性。

### 发明概述

本发明是从成年动物的成纤维细胞成功产生克隆的活后代的发明方法的延伸。具体地说，本发明的方法提供了从成年雄性动物的成纤维细胞获得克隆的活后代，显示该方法不局限于产生雌性克隆动物。在本发明的一个实施方案中，在将成纤维细胞用作胞核供体产生克隆动物前先培育该细胞一段时间。

本发明的从成年体细胞克隆动物的方法是，将体细胞的细胞核(或一部分核物质，至少包括最低限度的能支持发育的染色体物质)直接插入去核卵母细胞的细胞质中，促进重建的卵母细胞胚胎发育，产生活的后代。本文所用的术语“成年体细胞”指来自出生后动物的细胞，因此它既不是胎儿细胞，也不是胚胎细胞，且不是配子谱系。所得存活后代是最初提供体细胞胞核用于注射入卵母细胞的动物的克隆。本发明适用于克隆所有的动物，包括两栖动物、鱼类、鸟类(例如家鸡、火鸡、鹅等)以及哺乳动物，如灵长类动物、羊、牛、猪、熊、猫、狗、马、啮齿类动物等。

在本发明的一个实施方案中，供体成年体细胞是“两倍的(2n)”；即，如在细胞周期的 G0 或 G1 期所见具有两套染色体。供体细胞可以从体内来源获得，或可来自培养的细胞系。两倍供体胞核(即处于 G0 或 G1 期)的体内来源的例子是卵丘细胞。称卵丘(cumulus, 拉丁文意思是“小土丘”)细胞是因为在排卵前它们在发育的卵子周围形成了卵泡细胞的紧密团块(堆)。在一些动物如小鼠排卵后，这些细胞有许多仍保持与卵母细胞结合(形成卵丘)，在小鼠中，它们 90%以上处于 G0/G1 期，因此是双倍体。本发明打算采用的供体胞核取自其它体内或体外的(即培育的)二倍体成年体细胞来源，它们包括，但不局限于，上皮细胞、神经细胞、表皮细胞、角质细胞、造血



细胞、黑色素细胞、软骨细胞、淋巴细胞、巨噬细胞、单核细胞、带核红细胞、成纤维细胞、足细胞、心肌细胞、骨骼肌细胞、平滑肌细胞和来自器官的其它细胞，这些器官包括但不限于，皮肤、肺、胰、肝、肾、膀胱、胃、肠、骨等，以及它们的合适的先祖细胞。

5            在本发明的另一个实施方案中，供体成年体细胞是“2C 至 4C”；即，它含有 1 至 2 倍的二倍体基因组物质(由细胞周期 S 期复制产生)。该供体细胞可以从活跃分裂的细胞的体内或体外来源获得，它包括但不限于，上皮细胞、造血细胞、表皮细胞、角质细胞、成纤维细胞等，及其合适的先祖细胞。

10           本发明方法的一个实施方案包括下列步骤：(i)在插入卵母细胞之后、激活卵母细胞之前，使胞核(或其包括染色体的部分)与去核卵母细胞的细胞质接触一段时间(例如多达约 6 小时)，和(ii)激活该卵母细胞。在该实施方案中，用不伴随激活卵母细胞的方法将胞核插入去核卵母细胞的细胞质中。

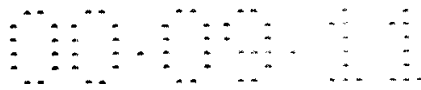
15           当采用具有二倍染色体的供体胞核时，该方法还包括在将胞核插入去核卵母细胞之后一定时间内破坏微管和/或微丝装配(assembly)的步骤，以便抑制极体形成并维持二倍染色体数目。例如，当采用四倍供体胞核时，省略方法中的该步骤，从而形成一个极体，核植入的卵母细胞的染色体倍数可以减少至二倍。

20           在本发明的一个较佳的实施方案中，通过显微注射，更佳的是通过压电驱动的显微注射插入胞核。压电显微操作仪的使用能以一个针头进行供体胞核的收获和注射。而且，可以迅速有效地进行卵母细胞的去核以及供体细胞胞核的注射，因此，对卵母细胞的损伤比以前报道的方法(例如通过促进融合的化学物质、通过电或通过融合性病毒介导来融合供体细胞和卵母细胞)更少。

25           通过显微注射引入胞核物质在时间上和局部解剖学上均与细胞融合不同。采用显微注射方法，经一步或多步刺入供体细胞的质膜(以便能抽提出胞核)，这些步骤与刺入质膜后将该胞核(或其一部分，至少包括染色体)输送入去核卵母细胞的步骤在时间上是分开的。分开刺入的行为并不是细胞融合的特征。

30           另外，胞核的除去与导入的时空分开使得能够控制除胞核外的其它物质的导入。除去外源细胞质和导入额外的物质或试剂的方法是非常需要的。例如，添加物可有利地调节核植入卵母细胞的胚胎学发育。这种试剂可包括抗体、药理学上的信号转导抑制剂或它们的组合，其中抗体和/或抑制剂针对和/或抑制在细胞分裂或胚胎发育中起负调节作用的蛋白质或其它分子的作用。该种试剂可包括核酸序列，例如能在胚胎发育期间表达的重组质粒或转化载体构建物，以编码对发育具有潜在正效应的蛋白，和/或整合入细胞基因组中的核酸序列，以形成转化的细胞和遗传学发生改变





的动物。试剂导入细胞可发生在胞核与去核卵母细胞结合之前、同时或之后。

### 附图简述

本专利申请文卷含有至少一张彩色附图。在请求并缴付所需费用后，可由美国  
5 专利商标局提供具有彩色附图的本专利申请副本。

图 1A 是卵丘细胞包围的排卵的活卵母细胞的显微照片。卵膜(egg coat)(透明带)看上去是围绕卵母细胞的相对透明区域。

图 1B 是在将卵丘细胞胞核注射入去核卵母细胞的细胞质后 10 分钟内拍摄的显微照片，图中显示了在卵母细胞细胞质内的完整的卵丘细胞胞核。对注射了卵丘细胞胞核的卵母细胞进行固定，染色，用相差显微镜拍照。  
10

图 1C 是显示胞核注射后 3 小时胞核转化进入显现混乱的染色体的显微照片。混乱反映了一个不同寻常的状态，其中每个单倍的凝聚的染色单体与纺锤体的一极相连，因此没有排列在中期板上。

图 1D 是用  $Sr^{2+}$  激活卵母细胞后 1 小时拍摄的显微照片，图中显示染色体分成两组(mb=中间体)。  
15

图 1E 和 1E' 是用  $Sr^{2+}$  激活卵母细胞后 5 小时拍摄的显微照片，图中显示了两个假前核，每个卵具有不同数目的可辨认的核仁样结构。假前核的大小和数目是变化的，提示卵母细胞激活后染色体是“随机”分开的。

图 1F 是将卵丘细胞胞核注射入去核卵母细胞后产生的活的胚泡的显微照片。

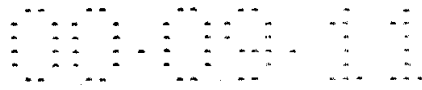
20 图 2A 是四周龄(克隆小鼠)Cumulina(前者)与其代孕母鼠的照片。

图 2B 是 Cumulina 在 2.5 个月时与其和 CD-1(白化体)雄鼠交配后产下的幼鼠的照片。

图 2C 显示了两只 B6C3F1 衍生的克隆的野灰色(agouti)幼鼠(中间)，以及它们的代孕母鼠(CD-1)(B6D2F1 卵母细胞供体，黑色，右侧)和 B6C3F1 卵丘细胞供体(野灰色，左侧)。中央的两只野灰色后代是野灰色卵丘细胞供体的克隆(相同的“孪生”姐妹)，是系列 C(见下文)和表 2 中描述的后代中的两只。  
25

图 3 描述了在将足细胞胞核注射入去核卵母细胞后衍生的胚胎转移到子宫内后的发育。图 3A 是交配(coitum)后 8.5 天(8.5 dpc)接受雌鼠的子宫的显微照片，子宫用布安固定液固定，用苯甲酸苄酯脱水并清洁。所有的子宫植入部位均不能发育，除了一个以外(箭头处)，在该处胚胎(图 3B)看来正常并处于大约 12 个体节阶段。  
30

图 4 显示了系列 C(见下文和表 2)中供体与后代的 DNA 分型，它确证了克隆后代与卵丘细胞供体之间的遗传相同性，且卵母细胞供体与宿主代孕雌鼠之间的不相



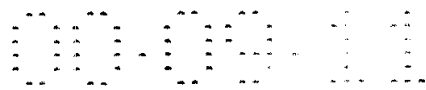
同性。将 6 个克隆的系列 C 后代的胎盘 DNA(泳道 10-15)与三只卵丘细胞供体雌鼠的 DNA(泳道 1-3)、三只卵母细胞接受雌鼠(泳道 4-6)的 DNA 和三只宿主雌鼠(泳道 7-9)的 DNA 比较。对照 DNA 来自 C57BL/6(泳道 16)、C3H(泳道 17)、DBA/2(泳道 18)、B6C3F1(泳道 19)和 B6D2F1(泳道 20)。图 4A 和 4B 的左侧显示了 100 碱基对(bp)DNA 大小标记的序列梯。图 4A 描述了用株系特异性标记 D 1 Mit46 进行的 PCR 分型。图 4B 描述了用株系特异性标记 D2Mit102 的 PCR 分型。F1 代杂交小鼠的 PCR 扩增的 DNA(图 4A 和图 4B)显示出在近交亲代株系的 DNA(泳道 16-20)中未见的额外的凝胶条带。该额外的条带对应于从两个亲代产物衍生获得的异源双链体，它的构型导致了反常的凝胶迁移。图 4C 描述了株系特异性 Emv 基因座(Emv1, Emv2 和 Emv3)的 Southern 印迹分型。

图 5 是本发明的克隆程序的示意图。

### 发明详述

有丝分裂细胞周期确保分裂的每个细胞将相等的遗传物质给予两个子细胞。DNA 合成并非贯穿整个细胞分裂周期，而是局限于该周期的一部分，即在有丝分裂前的合成期(或“S”期)。在 DNA 合成后和细胞分裂前有一时间间期(G<sub>2</sub>)；另一间期(G<sub>1</sub>)发生于分裂后和下一个 S 期之前。这样，细胞周期包括 M(有丝分裂)期、G<sub>1</sub>期(间期 1)、S 期、G<sub>2</sub>期(间期 2)，最后回到 M 期。组织中许多不分裂的细胞(例如所有的休眠的成纤维细胞)周期中止于有丝分裂后至 S 期前。在 S 期之前退出细胞周期的这种“休眠”细胞被称为处于 G<sub>0</sub> 期。进入 G<sub>0</sub> 期的细胞可以暂时或长时间地停留于该状态。例如，足细胞和神经元的特征是在成年动物中不分裂、而保持处于 G<sub>0</sub> 期。新近排卵(小鼠)的卵母细胞周围的卵丘细胞有 90%以上处于 G<sub>0</sub> 或 G<sub>1</sub> 期。G<sub>0</sub> 或 G<sub>1</sub> 期的细胞胞核具有二倍(2n)DNA 含量，即，它们的形态上不同的染色体(n-1 倍的常染色体)各具有两个拷贝。处于 G<sub>2</sub> 期的细胞胞核具有 4 倍的 DNA 含量，即，在 S 期期间，每个不同染色体的两个拷贝各自已经被复制。

本发明描述了产生脊椎动物克隆的方法。在该方法中，每个克隆从去核卵母细胞发育而成，该卵母细胞已经接受了成年体细胞的胞核(或其一部分，至少包括染色体)。在本发明的一个实施方案中，在用本发明方法将卵丘细胞(即排卵的卵泡细胞)胞核显微注射到去核的卵母细胞中后生出了克隆小鼠。在本发明的另一实施方案中，在用本发明的方法将成年动物尾部成纤维细胞的胞核注射到去核卵母细胞中后生出了克隆小鼠。在采用成纤维细胞的本发明实施方案中，将一些成纤维细胞体外培养在不含血清的培养基中；因此，这些成纤维细胞是“饥饿”的，以便诱导它们处于



细胞周期的 G0 或 G1 期(这是本领域所知道的), 并假定它们含有二倍染色体。其它成纤维细胞体外培养在含有血清的培养基中; 因此, 这些成纤维细胞通过分裂继续着细胞周期, 假定它们是 2C 至 4C 的。在本发明的另一个实施方案中, 用胸腺细胞、脾细胞、巨噬细胞作为成年体细胞胞核供体。

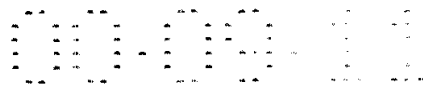
5 其它的动物, 例如但不局限于, 灵长类动物、牛、猪、猫、狗、马等也可用本发明的方法来克隆。本文显示的本发明方法提供的胚胎成功发育至桑椹胚/胚泡阶段的比例高, 转移的胚胎植入代孕接受动物的比例高, 产生新生哺乳动物的成功率大于 2%。这些效率的量值意味着本发明的方法容易再现。

10 图 5 的例子中描述了本发明克隆动物方法之一个实施方案的步骤和分步骤。简言之, (1)从卵母细胞供体动物收获卵母细胞。(2)除去 Met II 板, 形成去核卵母细胞(无染色体的卵)。(3)从成年供体中收获体细胞, (4)选出外表健康的细胞, (5)获得它们的胞核(或包括染色体的胞核组成物)。(6)将单个胞核注射入去核卵母细胞的细胞质中。(7)使胞核在去核卵母细胞的细胞质中停留达 6 小时, 在此期间可观察到染色体凝聚。(8)然后在微管和/或微丝装配的抑制剂存在下激活卵母细胞, (9)以抑制极体的形成。在该激活期间, 可观察到假前核的形成。(10)选出形成假前核的卵, 置于胚胎培养物中。(11)然后将胚胎转移到代孕母体中, (12)使活的后代出生。

因此, 本发明克隆哺乳动物方法的一个实施方案包括下列步骤: (a)从成年动物的体细胞收集体细胞胞核或至少含有染色体的部分胞核; (b)将至少部分体细胞胞核插入去核卵母细胞中形成核植入的卵母细胞; (c)使核植入的卵母细胞发育成胚胎; 20 和(d)使胚胎发育成活的后代。下面将详细描述这些步骤的每一个步骤。体细胞胞核(或含有染色体的胞核组成物)可从二倍以上染色体的体细胞(例如具有一倍或两倍的正常二倍体基因组物质的细胞)收集得到。较佳的, 从具有二倍染色体的体细胞收集得到体细胞胞核。较佳的是, 将体细胞胞核插入去核卵母细胞的细胞质中。胞核的插入宜用显微注射、更佳的是用压电驱动的显微注射来实现。

25 卵母细胞的激活可在插入体细胞胞核之前、期间或之后发生。在一个实施方案中, 激活步骤在插入体细胞胞核后 0 至 6 小时时发生, 以使胞核与卵母细胞的细胞质在卵母细胞激活前接触一段时间。激活可用各种方式, 包括但不限于, 电激活、或接触乙醇、精子胞质因子、卵母细胞受体配体肽模拟物、Ca<sup>2+</sup>释放的药物刺激剂(如咖啡碱)、Ca<sup>2+</sup>离子载体(例如 A2318、离子霉素)、磷蛋白信号传导调节物、蛋白合 30 成抑制剂等, 或它们的组合。在本发明的一个实施方案中, 通过使细胞接触锶离子(Sr<sup>2+</sup>)来实现激活。

宜使注射了二倍染色体的激活的核植入的卵母细胞与微管和/或微丝装配破坏剂



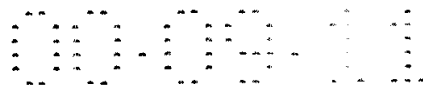
(下文有描述)接触，以防止形成极体，从而使供体胞核的所有染色体保留在核植入的宿主卵母细胞内。而注射了 2C 至 4C 胞核的激活的核植入的卵母细胞宜不接触这种试剂，以便形成极体使染色体数目减少至 2n。

使胚胎发育的步骤可包括将胚胎转移至雌性哺乳动物代孕接受者中的分步骤，  
5 该胚胎在该接受者体内发育成活的胎。如本领域技术人员所知道的，任何阶段(从两细胞到桑椹胚/胚泡)的胚胎均可作转移。

本发明的实施方案具有下列的一个或多个优点以及未列出的其它优点。首先，用显微注射输送胞核(或输送包括染色体的胞核组成物)适用于各种细胞类型，无论细胞生长在体外还是体内，不考虑供体的大小、形态、发育阶段等。第二，用显微注射输送胞核能在注射胞核时小心控制(例如最大程度地减少)导入去核卵母细胞的胞核供体细胞的细胞质和核质的体积，因为外来物质可能对发育潜力有毒性。第三，用显微注射输送胞核能在注射胞核时小心地控制额外试剂(与供体胞核)一同注射入卵母细胞。这些试剂在下文有例举。第四，用显微注射输送胞核能使供体胞核在(去核卵母细胞)激活前与去核卵母细胞的细胞质接触一段时间。这种接触可能使得染色质重新塑造/重新编程，这有利于随后的胚胎发育。第五，用显微注射输送胞核允许对随后的激活方案作多种选择(在一个实施方案中采用  $Sr^{2+}$ )。不同的激活方案可能对发育潜力发挥不同的效果。第六，激活可以在微管和/或微丝破坏剂(在一个实施方案中是细胞松弛素 B，以防止染色体挤压)出去和细胞分化的修饰剂(在一个实施方案中是二甲基亚砜，以促进有利的发育结果)存在下进行。第七，在一个实施方案中，用压电驱动的显微注射来输送胞核，这能迅速有效地处理样品，从而减少受操作细胞的损伤。这部分是因为体细胞胞核的制备和导入去核卵母细胞可用同一注射针头进行(与常规的显微注射方法相反，常规的显微注射方法在透明带成粒和刺入卵母细胞质膜之间需要至少换一次注射针)。另外，一些种类动物(如小鼠)的卵母细胞不适合用常规针头作显微注射，而压电驱动的显微注射提供了高成功率。最后，不仅是本发明的个别步骤，而且这些步骤相互之间作为一个整体的关系也导致了高克隆效率。下面将更详细地表述各个步骤，以显示这些步骤在本发明中是怎样相互排列的。  
10  
15  
20  
25

### 卵母细胞接受者

已经报道说，去核时卵母细胞的体内成熟阶段以及胞核输送对于胞核输送方法的成功是很重要的。通常，哺乳动物胞核输送的报道描述了采用 Met II 卵母细胞作为接受者。Met II 卵母细胞是通常被受精精子激活的细胞类型。已知卵母细胞细胞质的化学成分变化贯穿于整个成熟过程中。例如，与成熟中期促进因子(“MPF”)有  
30



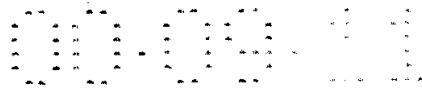
5 关的胞质活性在未成熟卵母细胞处于第一次减数分裂(“Met I”)中期时最高, 随着第一极体(“Pb 1”)的形成和排出而下降, 在 Met II 时再次达到最高水平。MPF 活性在停滞于 Met II 的卵母细胞中保持高水平, 在卵母细胞激活后迅速降低。当将体细胞核注射入 Met II 卵母细胞(即 MPF 活性高的卵母细胞)的细胞质中后, 其核膜破裂, 染色质浓缩, 导致形成中期染色体。

10 可用于本发明方法的卵母细胞包括未成熟(例如 GV 期)和成熟的(即 Met II 期)卵母细胞。成熟的卵母细胞可以这样获得, 例如, 通过注射促性腺素或其它激素(例如依次给予马和人绒毛膜促性腺激素)诱导动物超排卵, 然后在排卵后(例如在家猫开始动情后 80-84 小时, 奶牛开始动情后 72-96 小时, 以及小鼠开始动情后 13-15 小时)用外科方法收获卵细胞。在只能获得未成熟卵母细胞时, 将它们培养在促进成熟的培养基中, 直至它们进展至 Met II; 这称为体外成熟(“IVM”)。未成熟牛卵母细胞的 IVM 方法在 WO98/07841 中有所描述, 未成熟小鼠卵母细胞的 IVM 方法在 Eppig & Telfer(Methods in Enzymology 225, 77-84, Academic Press, 1993)中有所描述。

### 15 卵母细胞去核

较佳的是, 在去核前和去核时使卵母细胞接触含有微管和/或微丝破坏剂的培养基。微丝和/或微管的破坏赋予了细胞膜以及其下的皮层细胞质相对流动性, 从而使包封在膜内的卵母细胞部分易被吸入移液管, 而对细胞结构的破坏最小。所选的一种微管破坏剂是细胞松弛素 B(5 微克/毫升)。其它合适的微管破坏剂, 例如噻氮酯啉、6-二甲基氨基嘌呤和秋水仙碱, 也是本领域技术人员已知的。微丝破坏剂也是已知的, 包括但不限于, 细胞松弛素 D、甲斯普拉诺(jasplakinolide)、拉纯库林 A(latrunculin A)等。

25 在本发明的一个较佳的实施方案中, Met II 卵母细胞的去核是通过用压电驱动微量移液管抽吸来实现的。在整个去核显微手术中, 用常规的握持移液管固定 Met II 卵母细胞, 使压电驱动的去核移液管(内径约为 7 微米)的平嘴与透明带接触。合适的压电驱动单元由 Prime Tech Ltd.(Tsukuba, Ibaraki-ken, Japan)以压电显微操作仪/压电冲击驱动单元(Piezo Micromanipulator/Piezo Impact Drive Unite)的名称出售。该单元利用压电效应使(注射)移液管支架以受高度控制的快速方式向前推进非常小的距离(约 0.5 微米)。每次脉冲之间的强度和间隔可以变化, 由一个控制单元调节。施加压电脉冲(例如, 强度=1-5, 速度=4-16), 以推进(或钻孔)移液管通过透明带, 同时维持移液管内的小负压。这样, 移液管嘴迅速通过透明带, 从而推进至毗邻 Met II 板的位置(在几种动物的 Met II 卵母细胞的细胞质中可辨别的半透明区域, 通常在第一



极体附近)。然后将含有中期板的卵母细胞细胞质(它含有染色体-纺锤体复合物)以最少  
5 的量轻轻地吸入注射移液管中, 轻微地抽出注射移液管(现在含有 Met II 染色体)。该程序的效果是夹断含有 Met II 染色体的卵母细胞细胞质的那一部分。然后将注射移液管拉出透明带, 将染色体排入邻近的培养基中, 准备对下一个卵母细胞进行去除染色体的显微手术操作。在适当的时候, 可以对一批卵母细胞进行筛选, 以确认完全去核。对于含有粒状细胞质的卵母细胞(例如猪、羊、猫卵母细胞), 在确定去核效率时, 用 DAN 特异性荧光物(例如 Hoeschst 33342)进行染色并用低 UV 照射(用图象强化视频监测仪而加强)作简单检查是有好处的。

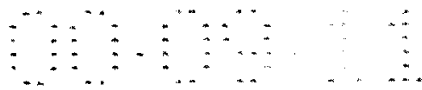
10 Met II 卵母细胞的去核可用其它的方法, 如美国专利 4,994,384 中描述的方法来实现。例如, 与压电驱动的显微移液管相反, 可用常规的显微移液管通过显微手术来实现去核。这可通过用玻璃针沿透明带靠近 Met II 染色体位置的周围 10-20%将卵母细胞的透明带撕开来实现(通过差分干涉显微镜显示纺锤体在卵母细胞的皮质中)。将该卵母细胞置于显微操作室中一小滴含有细胞松弛素 B 的培养基中。用具有未削尖斜边嘴部的去核移液管除去染色体。

15 去核后, 卵母细胞容易用成年体细胞胞核来重建。较佳的是在插入供体胞核的约 2 小时内制备去核卵母细胞。

### 制备成年体细胞胞核

20 从所含细胞带有二倍染色体(即处于 G0 或 G1 期的细胞)或二倍以上染色体(例如处于 G2 期的细胞, 通常为四倍)的体内或体外生长的细胞群衍生获得的细胞可能是合适的胞核供体。在本发明的一个实施方案中, 该细胞是从成年哺乳动物获得的且经机械和/或酶方法(例如用透明质酸酶)分散的卵泡(卵丘细胞)细胞。可将所得的分散的细胞悬液置于微量操作室中, 以有助于详细地检查、选择并操纵个别细胞, 以避免具有某些特征(例如表现出凋亡、坏死或分裂的进展阶段)的那些细胞。轻轻地重复  
25 抽吸以这种方式选出的细胞, 以使质膜破裂, 并收获相应的胞核。然后将个别选出的胞核吸入下述的注射移液管中, 用来插入去核卵母细胞内。

30 在本发明的另一个实施方案中, 成年细胞胞核的供体是成纤维细胞。成纤维细胞可以用本领域技术人员熟知的方法从动物获得。例如, 成纤维细胞可这样从成年小鼠尾获得, 将切碎的尾组织置于短期培养中(例如含 5%CO<sub>2</sub> 的空气下 37.5°C 培育 5-7 天), 此期间培养物中的成纤维细胞变成占主导地位的细胞类型。在本发明的还有一个实施方案中, 采用胸腺细胞、脾细胞、巨噬细胞作为成年体细胞胞核的供体。获得胸腺细胞或脾细胞悬液的方法是本领域技术人员所熟知的。巨噬细胞例如可通过



用本领域技术人员已知的方法灌洗腹膜腔或肺来获得。

可用作胞核来源的其它体细胞包括，但不局限于，上皮细胞、神经细胞、表皮细胞、角质细胞、造血细胞、黑素细胞、软骨细胞、淋巴细胞、单核细胞、带核红细胞、足细胞、心肌细胞、骨骼肌细胞、平滑肌细胞和来自器官的其它细胞，这些器官包括但不局限于，皮肤、肺、胰、肝、肾、膀胱、胃、肠等(以及它们的合适的先祖细胞)，它们直接从体内来源获得，或在体外培养后获得。

### 将供体胞核插入去核卵母细胞

用显微注射技术可将胞核(或包括染色体的胞核组成物)直接注射入去核卵母细胞的细胞质中。在将体细胞胞核注射入去核卵母细胞的一个较佳的方法中，采用压电驱动的微量移液管，其中可以采用基本上如上所述(关于卵母细胞的去核)的装置和技术，这里详细描述改进之处。

例如，如上所述制备注射移液管，使其具有内径约为 5 微米的平嘴。注射针在嘴部附近含有水银，并根据生产商说明书安置在压电驱动的单元中。注射移液管嘴附近水银液滴的存在增加了动量，因此提高了刺入的能力。使含有单个选出胞核的注射移液管嘴与去核卵母细胞的透明带紧密接触，施加数个压电脉冲(用控制器设定强度等级为 1-5，速度为 4-6)，以推进移液管，同时维持移液管内轻度负压。当移液管嘴通过透明带，就将所含的透明带堵塞物挤入卵黄周隙，胞核被向前推至靠近移液管嘴。然后将移液管嘴与质膜并列，并向卵母细胞的相对面推进，直至夹持移液管几乎到达卵母细胞皮质的对侧。现在，卵母细胞质膜被深深地套在注射针嘴的周围。在施加 1 至 2 次压电脉冲(通常强度为 1-2，速度为 1)后，卵膜在移液管嘴处被刺破，表现为清晰可见的卵膜迅速松弛。然后，将胞核和伴随的最少量(约 6pL)培养基排入卵浆中。然后轻轻抽出移液管，使新导入的胞核留在卵母细胞的细胞质内。该方法的进行很迅速，通常一批 10-15 个去核卵母细胞，它们在其它时间是维持在培养状态下。

其它显微注射方案也可用来插入供体胞核，其中采用的是常规注射移液管。采用常规移液管将精子核插入仓鼠卵母细胞的合适显微注射方法例子在 Yanagida, K., Yanagimachi, R., Perreault, S.D.和 R.G. Kleinfeld, *Biology of Reproduction* 44, 440-447(1991)中有所描述，关于该方法的公开内容被纳入本文作参考。

### 宿主卵母细胞的激活

在本发明的一个实施方案中，在激活前，使核植入的卵母细胞回到培养条件下

培育 0-6 小时。因此，在本发明的实施方案中，卵母细胞可在核植入后最长约 6 小时(潜伏期)内的任一时刻，通过电激活、注射入一种或多种激活卵母细胞的物质、或将卵母细胞转移到含有一种或多种激活卵母细胞的物质的培养基中来激活。

能提供激活刺激(或组合的激活刺激)的试剂包括，但不局限于，精子细胞质激活因子以及某些药物化合物(例如  $\text{Ca}^{2+}$  和其它信号转导调节剂)，这些试剂能在核植入之后或其同时通过显微注射来导入。在将核植入的卵母细胞转移(立即或在潜伏期后)至含有一种或多种激活性化合物亚组员的培养基中后，就可提供某些激活刺激，这些激活化合物包括  $\text{Ca}^{2+}$  释放刺激剂(如咖啡碱， $\text{Ca}^{2+}$  离子载体如 A23187 和离子霉素，以及乙醇)、磷蛋白信号传导调节剂(例如 2-氨基嘌呤、星形孢菌素和鞘氨醇)、蛋白合成抑制剂(例如 A23187、环己酰胺)、6-二甲基氨基嘌呤或前述物质的组合(例如 6-二甲基氨基嘌呤和离子霉素)。在本发明的一个实施方案中，通过在含有 2-10 毫摩尔  $\text{Sr}^{2+}$ 、不含  $\text{Ca}^{2+}$  的 CZB 培养基中培育 1-6 小时来激活小鼠卵母细胞。

在核植入的同时或之后施加激活刺激的本发明实施方案中，将核植入的卵母细胞转移至培养基中，该培养基含有一种或多种微管和/或微丝抑制剂(例如 5 微克/毫升细胞松弛素 B)或如上所述的制剂，以抑制施加激活刺激时或其后不久的染色体挤出(通过“极体”)。

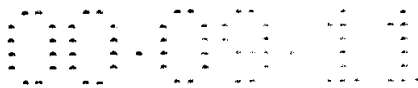
在本发明的一个实施方案中，在核植入前可以激活去核的卵母细胞。激活方法如上所述。在接触激活刺激后，可以培育卵母细胞至多约 6 小时，然后如上所述注射入二倍体细胞核。在该实施方案中，体细胞衍生的染色体直接转化入核植入的卵母细胞的前核样结构中，通过与胞质分裂预防剂(如细胞松弛素 B)一起培育，无需抑制“极体”挤出。

### 胚胎发育产生活的胎儿和后代

在形成前核后，可通过培养在不含微管破坏剂的培养基中，使胚胎发育。培养可以持续到 2-8 细胞阶段或桑椹胚/胚泡阶段，此时可将胚胎转移至代孕母亲的输卵管或子宫内。

另外，为了提高产量，胚胎可以分裂，细胞克隆扩增。或者另外，用本发明的方法可以提高活胚胎的产量，方法是对供体进行克隆扩增，和/或如果使用连续(胞核)转移的方法，则可根据本发明上述方法将所得胚胎的核组成物转移回到去核卵母细胞中，以产生新的胚胎。在本发明的另一个实施方案中，在直接转移入合适接受者中后体内培养该前核胚胎。





## 细胞分裂或胚胎发育的调节

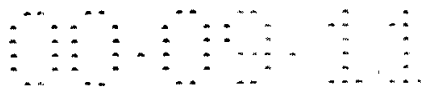
在本发明的一个实施方案中，卵母细胞的核植入允许在胞核与去核卵母细胞结合之前、期间或之后导入一种或多种试剂，这些试剂具有改变胚胎发育结果的潜在作用。或者，试剂可在核植入之前或之后导入。例如，胞核可以和抗体一起共注射，  
5 这些抗体所针对的蛋白具有假想的调节作用，有影响本发明方法结果的可能。这些分子可包括，但不局限于，参与小泡运输的蛋白(例如突触结合蛋白)，能介导染色质-卵质通讯的分子(例如 DNA 损伤细胞周期关卡分子，如 *chk1*)，在卵母细胞信号传导中有推定作用的分子(如 *STAT3*)或修饰 DNA 的分子(如 DNA 甲基转移酶)。此类分子的成员还可以是通过显微注射导入的调节性药物制剂的(间接的)靶分子，它们具有  
10 与抗体类似的作用。抗体和药物制剂均通过结合它们各自的靶分子来起作用。当靶标对发育结果有抑制作用时，这种结合减少了靶分子的功能，当靶分子对发育结果有正作用时，这种结合促进了该功能。另外，可通过注射蛋白(如上述类型的蛋白)而不是注射结合该蛋白的制剂来直接实现克隆过程中重要功能的调节。

在本发明的另一个实施方案中，可在核植入之前或之后通过显微注射将外源核  
15 糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA)导入卵母细胞中。例如，注射入携带所需顺式活性信号的重组 DNA 可导致重组 DNA 上的序列通过常驻的或共注射的转录因子来转录，随后表达出对发育抑制因子有拮抗作用、或对胚胎发育有正作用的编码蛋白质。另外，转录物可具有针对编码发育抑制蛋白 mRNA 的反义活性。或者，可通过注射入核酸(或它们的衍生物)来实现反义调节，这些核酸能通过与没有在卵母细胞中先行  
20 转录的它们的核酸靶标直接相互作用来发挥抑制作用。

通过本发明方法导入的重组 DNA(线形或其它形状)可含有一个功能性复制子，该复制子含有在启动子控制下的一个或多个表达的功能性基因，该启动子能表现出从窄到宽的发育表达分布图。例如，当启动子仅在早期合子中有活性时，该启动子可能指导立即而简短的表达。导入的 DNA 可能在胚胎发育期间的某一时刻丧失，或  
25 整合入一个或多个基因组基因座，在所得转基因个体的整个生命中稳定地复制。在一个实施方案中，编码推定“抗老化”蛋白(如端粒酶或超氧化物歧化酶)的 DNA 构建物可通过显微注射导入卵母细胞。另外，可直接注射这些蛋白。

## 实施例

30 下列实施例描述了本发明的方法以及从注射了成年体细胞胞核的卵母细胞发育成活的后代。具体地说，实施例描述了从注射了分离自成年小鼠卵丘细胞、足细胞、神经细胞、成纤维细胞、脾细胞、胸腺细胞和巨噬细胞的胞核的去核卵母细胞来克



隆小鼠。本文描述的例子只是用来描述动物卵母细胞、成年体细胞、以及可用于本发明方法的介质的例子，并没有限制性，如同本领域技术人员容易明白本发明其它实施方案的例子。

#### 试剂

5 所有无机和有机化合物购自 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO), 除非另有所述。

用来显微手术后培养卵母细胞的介质是 CZB 培养基(Chatot, 等人 1989. J. Reprod. Fert. 86, 679-688), 其中添加了 5.56mM D-葡萄糖。CZB 培养基含有 81.6 毫摩尔 NaCl、4.8 毫摩尔 KCl、1.7 毫摩尔 CaCl<sub>2</sub>、1.2 毫摩尔 MgSO<sub>4</sub>、1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、25.1 毫摩尔 NaHCO<sub>3</sub>、0.1 毫摩尔 Na<sub>2</sub>EDTA、31 毫摩尔乳酸钠、0.3 毫摩尔丙酮酸钠、  
10 7 单位/毫升青霉素 G、5 单位/毫升链霉素硫酸盐和 4 毫克/毫升牛血清白蛋白。

从输卵管收集卵母细胞、随后进行处理和显微操作的培养基是改进的 CZB, 它含有 20 毫摩尔 HEPES、减少量的 NaHCO<sub>3</sub>(5 毫摩尔)和 3 毫克/毫升牛血清白蛋白。该培养基在本文中称为 HEPES-CZB。CZB 和 HEPES-CZB 培养基的 pH 约为 7.5。出于显微注射的目的, 较佳的是用 0.1 毫克/毫升聚乙烯醇(PVA, 冷水可溶, 平均分子量为 10×10<sup>3</sup>)代替 HEPES-CZB 中的 BSA, 因为 PVA 能比 BSA 在更长时间内保持注射  
15 移液管壁粘度较低, 这在重复使用一个移液管进行多次胞核/卵母细胞转移时是有益的。

用来激活重建的卵母细胞的培养基是不含 Ca<sup>2+</sup>的 CZB, 它含有 10 毫摩尔 SrCl<sub>2</sub> 和 5 微克/毫升细胞松弛素 B。将 Sr<sup>2+</sup>的贮存液(蒸馏水中 100 毫摩尔)贮藏在室温下。  
20 将细胞松弛素 B 的贮存液(二甲基亚砷 DMSO 中 500 微克/毫升)贮藏在-20℃下。在使用前, 用不含 Ca<sup>2+</sup>的 CZB 1: 10 稀释 Sr<sup>2+</sup>贮存液, 从而使 Sr<sup>2+</sup>的最终浓度为 10 毫摩尔。用不含 Ca<sup>2+</sup>的 CZB 稀释细胞松弛素 B 贮存液, 从而使细胞松弛素在最终 1%DMSO 浓度中的最终浓度为 5 微克/毫升。

用来分离脑细胞的培养基是胞核分离培养基(NIM), 它由 123.0mM KCl、2.6 mM  
25 NaCl、7.8mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、3 mM Na<sub>2</sub>EDTA 组成。通过加入少量 1 M HCl, 将其 pH 值调节至 7.2。在注射前, 用添加了 PVP(平均分子量为 3×10<sup>3</sup>, ICN Biochemicals, Costa Mesa, CA)的 NIM 悬浮脑细胞。

实施例中所用的其它培养基在适当的时候揭示。

#### 30 动物

用 5-10 周龄的 B6D2F1(C57BL/6×DBA/2)、B6C3F1(C57BL/6×C3H/He)和 DBA/2 雌鼠作为卵母细胞供体。用 5-10 周龄的 C57BL/6、C3H/He、DBA/2、B6D2F1

和 B6C3F1 雌鼠作为卵丘细胞胞核的供体。用 10-12 周龄的 B6C3F1 雄鼠作为成纤维细胞胞核的供体。用 5-10 周龄的 B6D2F1 雄鼠和雌鼠作为其它成年细胞胞核的供体。代孕母鼠是 CD-1 雌鼠，与同一株系的结扎输精管的雄鼠交配。

5 这些实施例中所用的所有动物根据夏威夷大学实验室动物服务部(Laboratory Animal Service at the University of Hawaii)以及实验室来源国立研究委员会研究所的实验室动物护理和使用委员会(Committee on Care and Use of Laboratory Animals of the Institute of Laboratory Resources National Research Council)制定的指南(DHEW 公开号 [NIH]80-23,1985 年修订)来饲养。动物处理的方法得到夏威夷大学动物护理和使用委员会的检查和批准。

10

### 实施例 1

#### 体细胞的制备

在本实施例中，从小鼠输卵管中分离出卵丘细胞，作为成年体细胞胞核的来源，用于注射入去核的小鼠卵母细胞中。表 2 以及下文所述的系列 A-D 中产生的克隆小鼠的获得方法在 Wakayama, 等人 1998, Nature 394, 369-374 中也有所描述。

15

通过连续静脉内注射 5-7.5 单位的马绒毛膜促性腺激素(eCG)和 5-7.5 单位的人绒毛膜促性腺激素(hCG)，诱导雌鼠 B6D2F1(C57BL/6×DBA/2, 系列 A 和 B 中采用)、B6C3F1(C57BL/6×C3H/He, 系列 C 中采用)或系列 D 中产生的 B6C3F1 克隆小鼠超排卵。注射 hCG 后 13 小时，从输卵管收集卵丘-卵母细胞复合物(见图 1A)，在添加了牛睾丸透明质酸酶(0.1%[w/v]，300 单位/毫升，ICN Biochemicals, Costa Mesa, CA)的 Hepes-CZB 培养基中处理，使卵丘细胞分散。中等大小的卵丘细胞(直径为 10-12 微米)是最常见的(>70%)，选出这些细胞用于注射。分散后，将细胞转移至含有 10%(w/v)聚乙烯吡咯烷酮(平均分子量为 360000 道尔顿)的 Hepes-CZB 中，在注射前室温下放置最多 3 小时。

20

25

### 实施例 2

#### 体细胞的制备

在本实施例中，从成年小鼠中分离出足细胞和脑细胞(神经元)。这些细胞的特征是在成年动物中不分裂，且永久性地停留在细胞周期的 G0 期。

30

从睾丸中分离出生精小管，与 1 毫克/毫升胶原酶的 Hepes-CZB 溶液 30℃接触 20 分钟。然后用剃须刀片切碎小管，置于含有 1 毫克/毫升胰蛋白酶的 Hepes-CZB 中，并偶尔搅动。然后使所得悬液静置。富含足细胞的组分首先沉降。吸出悬浮的

细胞，用新鲜的培养基重悬剩余物。具有特征性形态特征的足细胞在低倍显微镜下很容易鉴定。单个足细胞的操作用大的注射移液管(内径约为 10 微米)进行。

5 从成年 B6D2F1 雌鼠的大脑皮质中分离出神经细胞。用消毒剪刀取出脑组织，在红细胞裂解缓冲液中迅速清洗，并在室温下胞核分离培养基(NIM)中手工轻轻匀化数秒。用注射移液管从所得悬液中分别收集携带显著核仁的胞核，然后输送给接受的去核卵母细胞。

### 实施例 3

#### 体细胞的制备

10 从成年 B6C3F1 小鼠的尾部制得成纤维细胞。分离得到小鼠的尾部，除去其皮肤，切成小片，然后置于组织培养皿中添加了 10%胎牛血清(FCS, Hyclone, Logan, UT)的 5 毫升 Dulbecco 改进的 Eagle 培养基(DMEM, Sigma)中。在含 5%CO<sub>2</sub> 的空气中 37.5 °C 培育 5-7 天后，看到许多成纤维细胞沿平皿内表面散布。在一些实验中，用不含 FCS 的 DMEM 代替平皿中的培养基，再培育 3 至 5 天。为了从平皿中脱离下成纤维细胞，  
15 用含有 0.25%胰蛋白酶和 0.75 毫摩尔乙二胺四乙酸(EDTA, Specialty Media, Lavallette, NJ)的不含 Ca<sup>2+</sup>、不含 Mg<sup>2+</sup>的磷酸盐缓冲液(PBS)代替培养基。10 分钟后，通过移液管抽吸数分钟来搅动培养基，以将细胞从平皿表面上释放下来。收集培养基，离心(150 ×g, 10 分钟)使细胞沉降。然后在 DMEM 培养基中离心洗涤细胞三次。

### 实施例 4

#### 体细胞的制备

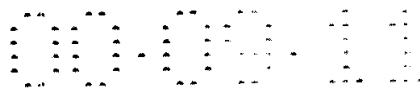
20 从成年 B6D2F1 雄鼠和雌鼠中取出脾脏。在 CZB 培养基中清洗除去粘附于表面的血液后，将每个脾脏置于 5 毫升 HEPES-CZB 培养基中，并撕成小片，以使细胞分散在培养基中。

### 实施例 5

#### 体细胞的制备

25 从成年 B6D2F1 雄鼠和雌鼠中取出胸腺。在 CZB 培养基中清洗除去粘附于表面的血液后，将每个胸腺置于 5 毫升 HEPES-CZB 培养基中，并撕成小片，以使细胞分散在培养基中。  
30

### 实施例 6



## 体细胞的制备

在处死雌鼠或雄鼠(B6D2F1)后,立即通过皮下针头将 5 毫升 0.9% NaCl 或 CZB 培养基注射入其腹腔内。然后按摩腹部,通过针头回收该培养基。离心含有腹腔巨噬细胞的回收培养基,使细胞沉降。然后将细胞重悬于 Hepes-CZB 培养基中。

5

## 实施例 7

### 成熟的未受精卵母细胞的去核

在本实施例中,收获鼠 Met II 卵母细胞,去核,随后用压电驱动的微量移液管显微注射入分离自实施例 1 至 6 的细胞的胞核。所有卵母细胞的操作、培养以及细胞核的插入均在—层矿物油下进行,该矿物油宜含有维生素 E(例如购自 E.R. Squibb and Sons, Princeton, NJ)作为抗氧化剂。

用 Prime Tech Ltd. (Tsukuba, Ibaraki-ken, Japan)的压电显微操作仪 MB-U 型,通过压电驱动的微量移液管的抽吸,进行卵母细胞的去核。该装置采用压电效应在某时刻以非常高的速度将移液管夹持器向前推进非常短的距离(约 0.5 微米)。脉冲的强度和速度由控制器调节。

将卵母细胞(接触过 eCG 的雌鼠注射 hCG 后 13 小时获得)与卵丘分离,在约 5%(v/v)CO<sub>2</sub> 的空气下 37.5°C 置于 CZB 培养基中至需使用时。将—组卵母细胞(通常数目为 15-20)转移到 1 滴(约 10 微升)含有 5 微克/毫升细胞松弛素 B 的 Hepes-CZB 中,该 Hepes-CZB 培养基预先置于显微镜台的操作室内。在用卵母细胞夹持移液管夹住一个卵母细胞后,通过向去核移液管嘴(内径约 10 微米)施加数个压电脉冲,将其透明带“钻开”。将 Met II 染色体-纺锤体复合物(在卵质中呈半透明斑点)以及少量附带卵质吸入移液管内,然后从卵母细胞中轻轻抽出,直至伸长的胞质桥被夹断。在使—组中的所有卵母细胞(通常为 20 个卵母细胞)去核(花大约 10 分钟)后,将它们转移到不含细胞松弛素 B 的 CZB 中,37.5°C 放置最多 2 小时。如上所述的那样固定卵母细胞并染色进行评价,去核效率为 100%。

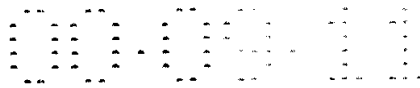
25

## 实施例 8

### 将成年体细胞胞核插入去核卵母细胞中

为了将供体胞核注射入上述制得的去核卵母细胞中,用塑料平皿(100 毫米×150 毫米; Falcon Plastics, Oxnard, CA, 目录号 1001)的盖子制得显微注射室。沿平皿的中心线放置—排两滴圆形液滴和—滴伸长的液滴。第一滴液滴(约 2 微升;直径为 2 毫米)用于洗涤移液管(Hepes-CZB, 含有 12%[w/v]PVP, 平均分子量为 360000 道尔

30



顿)。第二滴(约 2 微升; 直径为 2 毫米)含有 HEPES-CZB 配的供体细胞悬液。第三滴伸长的液滴(6 微升; 宽 2 毫米, 长 6 毫米)是用于卵母细胞的 HEPES-CZB 培养基。每滴液滴用矿物油覆盖。将平皿置于有 Hoffman 调制对比镜片的倒置显微镜的载物台上。

5 用上述的压电显微注射方法将供体细胞胞核显微注射入卵母细胞中。从各自的体细胞中取出胞核, 轻轻地抽吸进出注射移液管(内径约 7 微米), 直至它们的胞核“裸露”或几乎裸露(即基本上没有可见的细胞质物质)。对于具有“坚韧的”质膜的细胞(即尾成纤维细胞)来说, 施加几次压电脉冲以破坏该质膜。在将“裸露的”胞核深深吸入移液管内后, 将下一个细胞(的胞核)吸入同一移液管。将这些胞核一个接一个地  
10 注射入去核卵母细胞内。

为了注射胞核, 将少量(约 0.5 微升)水银置于注射移液管的近端附近, 然后与上述压电驱动单元连接。在水银被推向移液管嘴后, 少量的培养基(约 10 pL)被抽吸入移液管。

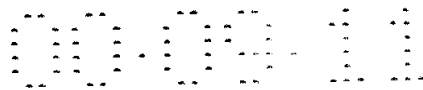
15 将去核卵母细胞置于显微镜台上一滴含有 5 微克/毫升细胞松弛素 B 的 CZB 培养基内。用夹持移液管夹住卵母细胞, 同时使注射移液管嘴与透明带紧密接触。给予数次压电脉冲(例如强度为 1-2, 速度为 1-2), 以推进该移液管, 同时在其内稍稍施加负压。在移液管嘴通过透明带时, 将移液管内的透明带柱状片段排入卵黄周隙。在供体胞核向前推进至其靠近注射移液管嘴时, 以机械方法使移液管推进至其嘴部几乎到达卵母细胞皮质的相对侧。施加 1 至 2 次压电脉冲(通常强度为 1-2, 速度为 1)  
20 后, 卵膜被刺破, 将胞核和最少量(约 6pL)伴随的培养基挤入卵质中。有时, 可将培养基抽回。然后轻轻抽出移液管, 使胞核留在卵质内。每个卵母细胞注射一个胞核。采用该方法, 在 10-15 分钟内可显微注射约 5-20 个卵母细胞。所有注射通常在 24-28 °C 的室温下进行。所有操作在室温下(24-26°C)进行。每个胞核在剥露后 10 分钟内注射入分开的去核卵母细胞中。

25 图 1B 描述了在注射后 10 分钟以内去核卵母细胞中的卵丘细胞胞核。

用注射卵丘细胞的上述方法, 通过压电显微注射将实施例 2 所述制得的足细胞和脑细胞的胞核注射入去核卵母细胞。

用注射卵丘细胞的上述方法, 通过压电显微注射将实施例 3、4、5 和 6 分别制得的尾成纤维细胞、胸腺细胞和巨噬细胞的胞核注射入去核卵母细胞。

30 然后如实施例 9 所述的那样, 立即激活含有注射的胞核的一些卵母细胞。在激活前, 培育其它类似的卵母细胞最多约 6 小时。



## 实施例 9

### 卵母细胞激活

在注射了体细胞胞核后，将一些组的卵母细胞立即置于含有 10 毫摩尔  $\text{Sr}^{2+}$  和 5 微克/毫升细胞松弛素 B、不含  $\text{Ca}^{2+}$  的 CZB 中放置 6 小时。其它组注射了卵丘细胞胞核的去核卵母细胞在 5%(v/v) $\text{CO}_2$  的空气中 37.5°C 置于 CZB 中约 1 至 6 小时，较佳的约 1 至 3 小时，在此期间卵母细胞内的胞核解凝聚，并转化成可见的染色体{该叙述是否正确?}。然后在含有 10 毫摩尔  $\text{Sr}^{2+}$  和 5 微克/毫升细胞松弛素 B、不含  $\text{Ca}^{2+}$  的 CZB 中培育卵母细胞约 6-7 小时进行激活。 $\text{Sr}^{2+}$  处理激活了卵母细胞，而细胞松弛素 B 防止了随后形成极体，因此防止了染色体排出，从而确保成年体细胞胞核的所有染色体均保留在激活卵母细胞的细胞质内。检查注射了卵丘细胞胞核的去核卵母细胞，结果揭示染色体在注射后 1 小时内发生凝聚(见图 1C)。在不含  $\text{Sr}^{2+}$  的培养基中随后培育 1-6 小时后，在含有  $\text{Sr}^{2+}$  和细胞松弛素 B 的培养基中卵母细胞被激活，它们的卵丘细胞衍生的染色体分开(见图 1D)形成类似于正常受精后形成的原核的结构(这里称假前核)。检查 47 个固定和染色后的这样的卵母细胞，结果显示 64% 具有两个假前核(见图 1E 和 1E')，36% 有三个或更多个假前核。认为具有至少一个清楚的假前核的卵母细胞是正常激活的。对第一次切割之前固定的 13 个这样的卵母细胞进行染色体分析(数据未显示)，结果揭示 85% 具有正常的二倍染色体数目( $2n=40$ )。

用不含  $\text{Sr}^{2+}$  和细胞松弛素 B 的 CZB 培养基洗涤，并在 5%(v/v) $\text{CO}_2$  的空气中 37.5°C 培育激活的卵母细胞，直至它们到达二细胞至八细胞期或桑椹胚/胚泡阶段。

图 1F 描述了在将卵丘细胞胞核注射入去核卵母细胞后产生的活的胚泡。

## 实施例 10

### 胚胎转移

将两细胞至八细胞的胚胎(激活开始后 24 小时或 48 小时)转移至代孕母鼠(CD-1, 白化体)的输卵管或子宫内，这些代孕母鼠已经在 1 天前分别和结扎输精管的 CD-1 雄鼠交配。将桑椹胚/胚泡(激活后 72 小时)转移到在 3 天前与结扎输精管的雄鼠交配的代孕母鼠子宫内。当用卵丘细胞或成纤维细胞作为胞核供体时，在交配后 19.5 天(dpc)处死接受的雌鼠，检查它们的子宫中是否存在胎儿以及植入部位。如果有活的胎儿，就用其它哺乳的代孕母鼠(CD-1)喂养。在采用其它体细胞(即脾细胞、胸腺细胞和巨噬细胞)胞核时，在交配后 8.5 天至 12.5 天处死所有接受的雌鼠，检查其子宫中胎儿的存在和植入部位。



## 实施例 11

### DNA 分型

从脾组织获得下列对照株系以及杂种的 DNA: C57BL/6J(B6)、C3H/HeJ(C3)、DBA/2J(D2)、B6C3F1 和 B6D2F1。从尾尖活检物制得三只卵丘细胞供体雌鼠 (B6C3F1)、三只卵母细胞接受雌鼠(B6D2F1)以及三只代孕雌鼠(CD-1)的 DNA。6 只 B6C3F1 衍生的克隆后代的总 DNA 从其所附有的胎盘制得。

对于微型卫星标记 D1Mit46、DS2Mit102 和 D3Mit49, 引物对(图谱对, MapPairs) 购自 Research Genetics(Huntsville, AL), 如 Dietrich, W. 等人, Genetics 131, 423-477(1992)中所述的那样进行分型, 只是 PCR 反应进行 30 轮, 用 3%琼脂糖凝胶 (Metaphor)分离产物, 用溴化乙锭染色来显示。

根据 Taylor, B.A.和 L. Rowe, Genomics 5, 221-232(1989)描述的方法, 在使 *PvuII* 消化的基因组 DNA 与诊断性探针 pEc-B4 杂交后, 鉴定内源亲嗜性鼠白血病病毒 DNA 序列(*Emv* 基因座)。探针标记、Southern 印迹和杂交程序如 Johnson, K.R. 等人, Genomics 12, 503-509(1992)中描述的那样进行。

15

## 实施例 12

### 胎盘的检查

当在子宫内发现足月胎儿(19.5dpc)后, 分离胎盘, 称重, 用布安固定液固定, 以便于以后检查组织学详细情况。通常, 在每个宿主代孕母鼠中只有一个或两个植入的克隆小鼠后代到达分娩期(足月)。在本研究的过程中, 注意到克隆胎儿的胎盘明显大于正常胎儿的胎盘(见表 7)。为了研究大胎盘是由于每个子宫内胎数少(在正常怀孕期间, 每只小鼠的子宫携带了数胎或多达 10 胎)而引起的可能性, 故意减少正常怀孕的一窝仔鼠数, 其方法如下: 使 C57BL/6 雌性小鼠与 C3H/He 雄鼠交配。第二天, 从输卵管收集含有前核的卵, 将 2-3 个卵转移到每个假孕代孕母鼠(CD-1)的输卵管内, 以便仅仅植入 1-2 个胚胎。交配后 19.5 天对胚胎和胎盘称重。

25

## 结果

与卵丘细胞胞核的克隆。表 1 中描述了注射了卵丘细胞胞核的宿主去核卵母细胞的植入前发育情况。在注射后立即经受激活刺激的 182 个卵母细胞中, 有 153 个 (84.1%)被成功地激活并存活。在这 153 个卵母细胞中, 有 61 个体外发育至桑椹胚/胚泡阶段。然而, 508 个注射后 1-3 小时激活的注射的卵母细胞中有 474 个(93.3%)成功激活并存活, 182 个注射后 3-6 小时激活的注射的卵母细胞中有 151 个(83.0%)

30





隆)。因此，看来克隆的连续产生没有经历影响克隆过程结果的变化(阳性或阴性的变化)。

克隆与卵丘细胞供体的遗传相同性的确认。如图 4A、4B 和 4C 所述，供体与系列 C 后代的 DNA 分型确证克隆的后代与卵丘细胞供体有遗传相同性，而与卵母细胞供体以及宿主代孕雌鼠没有相同性。用 C57BL/6、C3H、DBA/2 和 CD-1 小鼠品系的诊断性高度可变等位基因(品系特异性标记)进行 DNA 的 PCR 分型。在该工作中采用这些株系或它们的 F1 杂种，因此它们全体组成了所有存在的基因型。在所有图中，将 6 只克隆的系列 C 后代的胎盘 DNA(泳道 10-15)与三只卵丘细胞供体雌鼠的 DNA(B6C3F1，泳道 1-3)、三只卵母细胞供体雌鼠的 DNA(B6D2F1，泳道 4-6)和三只宿主雌鼠的 DNA(CD-1，泳道 7-9)作了比较。对照 DNA 来自 C57BL/6(泳道 16)、C3H(泳道 17)、DBA/2(泳道 18)、B6C3F1(泳道 19)和 B6D2F1(泳道 20)。图 4A 和 4B 描述了用琼脂糖凝胶以及品系特异性的标记 D 1 Mit46 和 D2Mit102 进行 DNA 分型的结果，图 4C 描述了采用 Southern 印迹分析和品系特异性 *Emv* 基因座(*Emv1*, *Emv2* 和 *Emv3*)标记的 DNA 分型结果。

这些图中的数据显示了卵丘细胞胞核供体与推定克隆之间的遗传可重叠性，以及与卵母细胞供体或代孕母鼠之间的遗传不同性。因此，6 只克隆小鼠的每一只的基因组衍生于卵丘细胞的胞核。

以下几个方面证实了本文报道的系列 B-D 中所有活后代代表了只从卵丘细胞染色体衍生的克隆。(1)卵母细胞/卵没有体外接触过精子。(2)代孕母鼠(CD-1，白化体)与结扎输精管、证实没有生育力的雄鼠(CD-1，白化体)交配。这种结扎输精管的雄鼠发生不可能的受精行为时，后代应为白化体。(3)将 2-8 细胞胚胎或胚泡转移到代孕母鼠的输卵管/子宫内。众所周知的是，2-8 细胞的小鼠胚胎/胚泡总体上很难被精子受精。(4)出生的足月动物具有黑色的眼睛。系列 B 中存活的 10 胎具有黑色皮毛，系列 C 中存活的 5 胎具有野灰色皮毛。这种皮毛颜色从遗传角度上与每一例中胞核供体基因型所预测的结果完全相符。因为 B6D2F1 小鼠缺失 *agouti A* 基因，因此，系列 C 中的野灰色小鼠必定从非 B6D2F1 的胞核遗传了其野灰色的皮毛颜色。(5)本文所用的 B6、C3、D2 和 CD-1 品系的诊断性高度可变等位基因的 DNA 分型(图 4)证实，毋庸置疑，系列 C 中的 6 只克隆后代(包括出生后不久死亡的那一只)与所用的三只卵丘细胞供体雌鼠(B6C3F1)是同基因的，且不含从卵母细胞供体(B6D2F1)或宿主代孕母鼠(CD-1)衍生的 DNA。(6)去核后，通过使用细胞松弛素 B 抑制了染色体挤出极体。这样，如果卵母细胞的去核完全不成功或仅仅部分成功，则所有的胚胎将会是超倍体，且不会发育成正常的后代。(7)在模拟实验中，使 204 个卵母细胞去

核,并在固定后染色后检查,结果未见染色体,这提示除去染色体的效率超过 99.99%。

在实施例 1 中,将所用的细胞类型高度肯定地鉴定为卵丘细胞。细胞不作体外培育。为卵丘细胞胞核转化成去核 Met II 卵母细胞胞质中凝聚的染色体提供了充足的时间。胚胎发育成桑椹胚/胚泡以及植入的比例非常高。延长胞核注射与卵母细胞  
5 激活之间的时间对于植入前和植入后的发育均是有利的(见表 1 和 2),并可能增加了卵丘细胞基因经历胚胎发育重新编程的机会。

据信用压电显微操作仪也赋予了较高的胚胎发育比例。该装置能使卵母细胞和供体细胞的操作(例如对透明带钻孔以使卵母细胞去核,并注射入供体细胞胞核)非常迅速有效地进行。用压电驱动的移液管将供体胞核导入卵母细胞内的方法看来对卵  
10 母细胞造成的损伤比使用电脉冲、仙台病毒或聚乙二醇的方法要小,该方法还能使体细胞胞核直接导入卵母细胞的细胞质中。另外,显微注射可使导入去核卵母细胞的体细胞胞质的量最少。这可能也使本发明中胚胎在植入前的发育更好。

**用足细胞胞核和脑细胞胞核克隆。**注射了足细胞胞核以及脑细胞胞核的去核卵母细胞分别有大约 63 个(40%)和 50(22%)个体外发育成桑椹胚/胚泡,其中分别有 59  
15 个和 46 个被转移到接受者代孕母鼠的子宫内。图 3 描述了在将足细胞胞核注射入去核卵母细胞后转移的胚胎发育情况。图 3A 是交配后 8.5 天(dpc)接受鼠子宫的照片。在 8.5dpc 处死的一只代孕母鼠子宫内发现,除了一个活胎(图 3B)外,所有的子宫植入部位均不能发育(表 3)。注射了脑细胞胞核的去核卵母细胞发育均不超过 6-7dpc(表 3)。因此,本发明的方法提供了注射足细胞或脑细胞胞核的卵母细胞的胚胎发育和  
20 胎儿发育。

### **用成年成纤维细胞胞核克隆。**

表 5 描述了将 B6C3F1 成年雄鼠(野灰色)尾部成纤维细胞的胞核注射入 B6D2F1 雌鼠(非野灰色)的去核卵母细胞的实验结果。如表所述,注射了成纤维细胞(培养在含有血清的培养基中)胞核的激活的卵母细胞约有 50%发育成桑椹胚/胚泡阶段。其中  
25 177 个二细胞或桑椹胚/胚泡阶段的胚胎被转移到接受者代孕母鼠中,有 1.1%的胚胎达到足月(即生出了两个活的后代)。注射了培养在无血清培养基中的成纤维细胞胞核的激活的卵母细胞约有 58%发育至桑椹胚/胚泡阶段。其中 97 个二细胞或桑椹胚/胚泡阶段的胚胎被转移到接受者代孕母鼠中,1.0%的胚胎到达足月(即生出了 1 个活的后代)。所有活的后代均为雄性,具有黑色的眼睛和野灰色的皮毛颜色,和成纤维细胞胞核供体一样。所有上述后代在交配时均证实是能生育的。无论成纤维细胞是培  
30 养在无血清培养基还是有血清培养基中,看来对所得活后代数目的影响很小或没有影响。





盘(Nature Genet. 13, 91-94(1996))。在怀孕 13.5 天时, 这些单性生殖胚具有过大的胎  
盘。Kono 等人提出缺少母体等位基因的表达可能解释了胚胎和胎盘发育比正常  
小鼠大的原因。其它一些基因可能对于胎盘发育是特别重要的, 例如母体表达的 Mash  
2 (Guillemot 等人, (1995). Nature Genet. 9, 235-242), 以及父体表达的(母体表达的)极  
5 性滋养外胚层细胞增殖所需的基因(Barton 等人(1985), J. Embryol. Exp. Morphol. 90,  
267-285)。另外, 出生后不久死去的一些克隆小鼠的重量比其它小鼠重。另外, 如 Kato  
等人(Science 282, 2095-2098(1998))报道的, 从体细胞衍生的死去的克隆幼仔趋向于  
比活着的幼仔大。这提示在核转移后体细胞进行胞核重新编程期间, 一些基因没有  
10 完全完成编程或重新编程以正常工作。不希望受理论的束缚, 这些发现与特征性  
(imprinted)基因表达中可能的变化一致。

尽管本发明已经参照较佳实施方案在这里作了描述, 应理解这并不意味着本发  
明局限于所公开的具体形式。相反, 这意味着其覆盖了本发明精神和范围内的所有  
各种改动和替换形式。

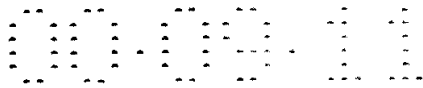


表 1

注射了卵丘细胞胞核的去核卵的植入前发育

卵母细胞 激活时间	所用卵母 细胞总数	去核卵母细 胞数	注射后存活的卵 母细胞数	激活的卵母 细胞数	激活 72 小时后从激活卵母细胞发育的胚胎数(平均值±SD)		
					单细胞和异常	二细胞至八细胞	桑椹胚/胚泡
与注射同时	233	230	182	153(84.1)	17	75	61(39.9±16.6) <sup>a</sup>
注射后 1-3 小时	573	565	508	474(93.3)	20	177	277(58.4±12.6) <sup>b</sup>
注射后 3-6 小时	195	191	182	151(83.0)	9	41	101(66.9±14.4) <sup>b</sup>

同一列内的上标 a 或 b 表示二者之间由显著的差别(P<0.005)。用 Chi-square 检验分析数据。

5

表 2

注射了卵丘细胞胞核的去核卵细胞的植入后发育

实施例 系列*	卵母细胞 激活时间	卵母细胞 注射数	转移的胚 胎数(接受 者)	转移胚 胎的植入 数(%)	从转移胚胎发育的胎儿数				从转移胚 胎的新生 鼠数(%)	
					总数(%) <sup>†</sup>	8.5dpc		11.5dpc		
					活	死	活	死		
A	与注射同时	82	34(4)	8(23.5) <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>					—
	注射后 1-3 小时	136	45(5)	32(71.1) <sup>b</sup>	7(15.6) <sup>b</sup>	3	2 <sup>†</sup>	2	0	—
	注射后 3-6 小时	124	63(7)	36(57.1) <sup>b</sup>	3(4.8) <sup>b</sup>	0	2 <sup>††</sup>	0	1 <sup>†††</sup>	—
B	注射后 1-3 小时	1345	760(49)	—	—	—	—	—	—	16(2.1)
	注射后 3-6 小时	62	40(5)	—	—	—	—	—	—	1(2.5)
C	注射后 1-3 小时	458	298(18)	—	—	—	—	—	—	6(2.0)
D	注射后 1-3 小时	603	287(18)	—	—	—	—	—	—	8(2.8)

\*系列 A, 在 8.5dpc 或 11.5dpc 时进行剖腹产手术; 系列 B 和 C, 在 18.5-19.5dpc 时进行剖腹产手术。在系列 A 和 B 中, 每个供体胞核来自 B6D2F1 卵丘细胞。在系列 C 中, 每个供体胞核来自 B6C3F1 卵丘细胞。在系列 D 中, 每个供体胞核来自系列 C 的 B6C3F1 克隆小鼠。

10

†同一栏内的上标 a 和 b 表明 a 和 b 之间显著的差别: 植入(p<0.005); 胎儿发育(p<0.05)。用 Chi-square 检验分析数据。

‡: 交配后 6-7 天死亡; ††: 交配后 7-8 天死亡; †††: 交配后 10 天死亡

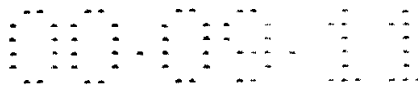


表 3

注射了足细胞或脑细胞胞核的去核卵的发育

注射的细胞 类型	注射的卵母 细胞的存活数	卵母细胞激 活数(%)	发育的桑椹胚 /胚泡的总数(%)	转移胚胎数 (接受者)	数目(%)	
					植入部位	胎儿
足细胞	159	159(100)	63(39.6) <sup>a</sup>	59(8)	41(69.5)	1(1.7) <sup>‡</sup>
脑细胞	228	223(97.8)	50(22.4) <sup>b</sup>	46(5)	25(54.3)	1(2.2) <sup>†</sup>

\*所有接受者在 8.5dpc 时处死。相同栏内的上标 a 和 b 表明 a 和 b 之间有显著差别(P<0.005)。

5 †交配后 6 至 7 天死亡。

‡交配后 12.5 天仍存活。

表 4

注射了不同类型的成年体细胞胞核的去核小鼠卵的发育<sup>1</sup>

成年细胞类 型	细胞供体 性别	核转移后存 活的卵母细 胞数	卵母细胞数(%)		转移的胚胎 数(接受者)	数目(%)	
			激活的	发育至桑椹 胚/胚泡		植入部位	胎
胸腺细胞	雌性	176	168(95.5)	5(3.1)	0	---	---
	雄性	96	58(60.4)	0	0	---	---
脾细胞	雌性	80	49(61.3)	11(22.4)	11(2)	10(90.9)	2(18.2)*
	雄性	52	38(73.1)	8(21.1)	8(1)	6(75)	0
巨噬细胞	雌性	308	187(60.7)	58(31.0)	52(5)	26(50.0)	4(7.7)*
	雄性	205	109(22.9)	25(22.9)	25(3)	19(76.0)	0

10

<sup>1</sup> 在交配后 8.5 至 12.5 天测定植入部位和胎儿的数目。

\* 交配后 6 至 7 天后死亡或停止生长。



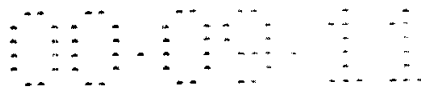


表 5

注射了成年雄鼠尾成纤维细胞胞核的小鼠去核卵母细胞的足月发育：  
成纤维细胞在含血清培养基中初培养 5-7 天后  
再于无血清培养基中培养 3-5 天的效果比较

无血清培养基(-)或含血清培养基(+)中培养成纤维细胞	注射过的去核卵母细胞数	注射的卵母细胞数		发育至桑椹胚/胚泡阶段的卵母细胞数(%)	转移的胚胎数目(接受者)	活后代的数目(%) <sup>†</sup>
		存活的,	激活的(%)			
+	467	414	327(78.9)	162(49.5)*	97(9)	2(1.1)
-	250	219	136(62.1)	35(58.3)*	177(16)	1(1.0)

5 \*将二细胞至胚泡阶段的胚胎转移到接受者的输卵管或子宫内。

†在获得雌性和雄性克隆之间活后代的成功率上没有显著差别。用 Chi-square 检验分析数据。

表 6

注射了小鼠各品系和杂交系的卵丘细胞胞核后去核小鼠卵母细胞的足月发育：

10

卵丘细胞胞核供体	卵母细胞接受者	去核的卵母细胞数	卵母细胞数		发育至桑椹胚/胚泡阶段的激活的卵母细胞%	转移的胚胎数目(接受者)	活后代的数目(%) <sup>§</sup>
			注射后的存活的,	激活的(%)			
近交系							
C57BL/6	B6D2F1	1098	1045	1006(96.3)	23.8	413(24)	0
C3H/Hc	B6D2F1	322	305	297(97.4)	48.4	200(16)	0
DBA/2	B6D2F1	382	370	354(95.7)	59.3	308(16)	1(0.3)
DBA/2	DBA/2	57	51	46(90.2)	---	44(4)	3
	小计	1859	1771	1703(96.2)		965(60)	1(0.1) <sup>a</sup>
杂交系							
B6D2F1 <sup>‡</sup>	B6D2F1	1552	1522	1444(94.9)	62.0	865(58)	22(2.5)
B6C3F1 <sup>‡</sup>	B6D2F1	502	473	454(96.0)	71.1	312(19)	7(2.2)
B6D2F1	B6C3F1	381	372	354(95.2)	49.4	189(18)	7(3.7)
B6C3F1	B6C3F1	367	341	307(90.0)	81.4	267(20)	5(1.9)
	小计	2811	2708	2559(94.5)		1633(115)	41(2.5) <sup>b</sup>

\*在胚胎培养成胚泡阶段时计算得到这些数据。

†将所有二细胞胚胎转移到接受的雌鼠中。

‡这些数据包括表 2 中的数据，B6D2F1 小鼠为系列 A 和 B，以及表 2，B6C3F1 小鼠为系列 C。

§上标表示 a 和 b 之间有统计学上显著的差别( $p < 0.005$ )。用 Chi-square 检验分析数据。

表 7

克隆小鼠在交配后 19.5 天时的胎盘重量

用于克隆的 成年体细胞	胎鼠性别	胎盘	
		检查数	重量(克数*)，平均值±标准偏差(范围)
卵丘细胞	雌性	23	0.33 <sup>a</sup> ±0.08(0.21-0.61)
成纤维细胞	雄性	3	0.34 <sup>a</sup> ±0.07(0.29-0.39)
-	雌性(没有 克隆)	10	0.12 <sup>b</sup> ±0.02(0.10-0.16)
-	雄性(没有 克隆)	11	0.15 <sup>b</sup> ±0.03(0.10-0.18)

\*上标表明 a 和 b 之间有统计学上显著的差别( $p < 0.001$ )。用斯图登特 t 检验分析数据。

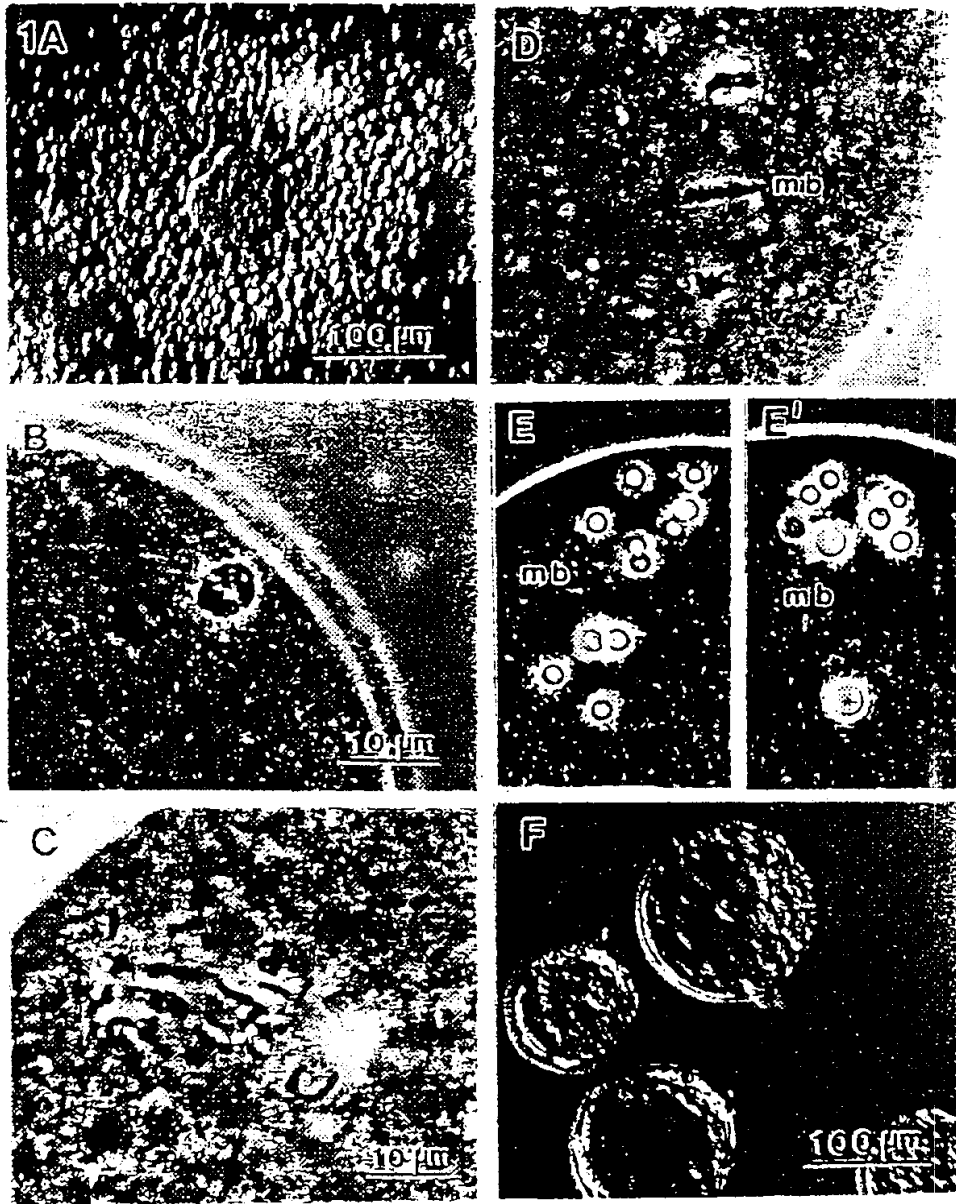


图 1

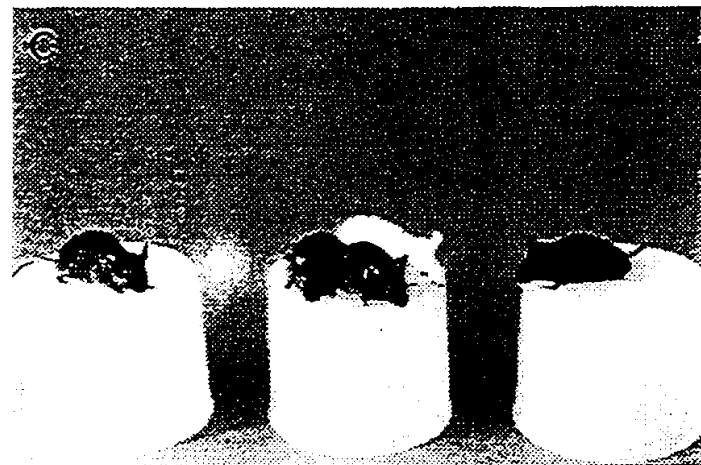


图 2

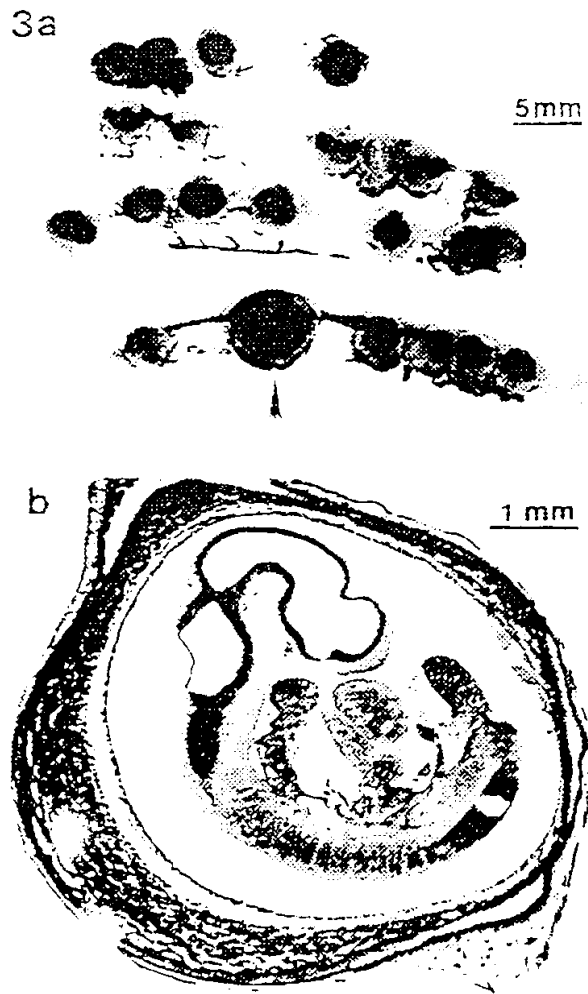


图 3

4 A. *D1Mit46*



B. *D2Mit102*



C. *Emv* 基因座

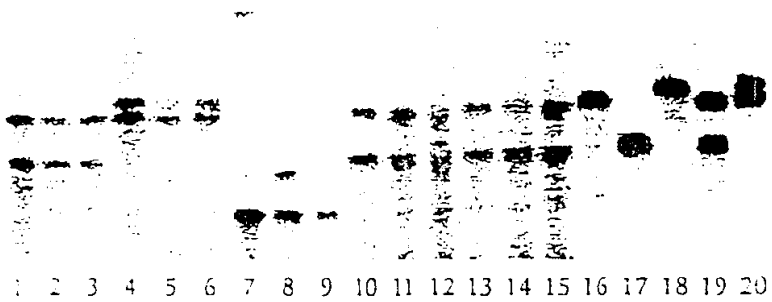


图 4

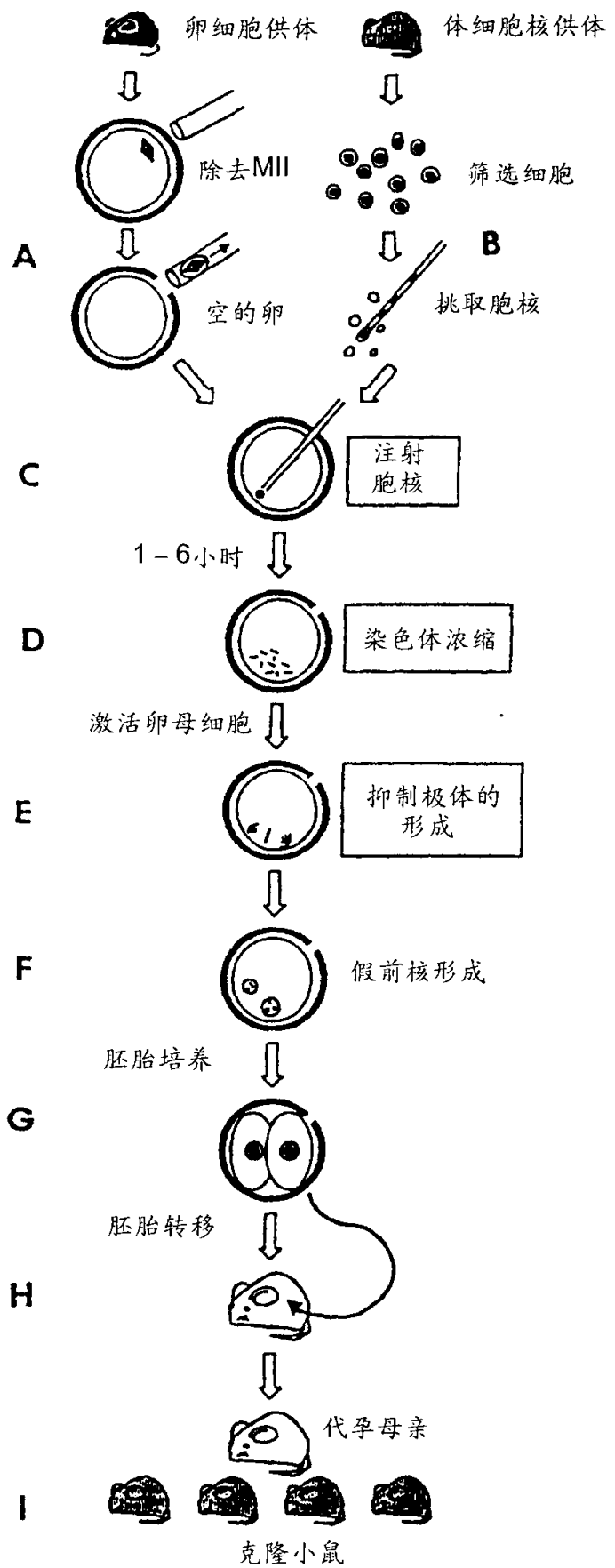


图 5