

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A01K 67/02

A01K 67/027 A61K 48/00

C12N 5/16 C12N 5/06

C12N 5/08



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00813845.1

[43] 公开日 2003 年 6 月 18 日

[11] 公开号 CN 1424870A

[22] 申请日 2000.9.14 [21] 申请号 00813845.1

[30] 优先权

[32] 1999.9.14 [33] NZ [31] 337792

[86] 国际申请 PCT/NZ00/00179 2000.9.14

[87] 国际公布 WO01/19182 英 2001.3.22

[85] 进入国家阶段日期 2002.4.4

[71] 申请人 农业研究有限公司

地址 新西兰哈密尔顿

[72] 发明人 戴维·韦尔斯

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 程伟

权利要求书 6 页 说明书 27 页 附图 3 页

[54] 发明名称 用挑选的供体细胞实施核移植

[57] 摘要

本发明提供了一种用从供体细胞群挑选和分离的 G1 细胞进行细胞核移植的方法。该方法比现有技术优越，它提供了供体细胞核所处细胞周期时间阶段的确定性，并且考虑到生产具有农业、制药、滋补和生物医学用途的克隆化转基因或非转基因胚胎细胞、重建胚胎和完整的动物。

ISSN 1008-4274

1. 一种细胞核移植的方法，该方法包括从增殖的或不增殖的供体细胞群中挑选和分离 G1 细胞，并将从如此分离的 G1 细胞中获得的一个核移植到去核受体细胞中。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述的供体细胞群是处于细胞周期的一个或多个已知或未知的阶段。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其中，所述的供体细胞群是不增殖的并且已经同步化于细胞周期 G1 阶段的任何一个时间点。

4. 如权利要求 1-3 任一项所述的方法，其中，所述的 G1 细胞是在 G1 早期分离的。

5. 如权利要求 1-3 任一项所述的方法，其中，所述的供体细胞群是不增殖的并且包括衰老细胞。

6. 如权利要求 1-5 任一项所述的方法，其中，所述的供体细胞群是来自从动物体内或者体外细胞培养物中分离的胚胎、胎儿、幼年或成体细胞。

7. 如权利要求 6 所述的方法，其中，所述的供体细胞群包括任何能够受刺激进入细胞周期和增殖的二倍体核型正常的细胞。

8. 如权利要求 7 所述的方法，其中，所述的供体细胞群是处于未分化细胞状态或是处于分化或静止期或衰老期的任一程度。

9. 如前述权利要求中任一项所述的方法，其中，所述的供体细胞是成体或胎儿的成纤维细胞或滤泡细胞。

10. 如前述权利要求中任一项所述的方法，其中，所述的供体细胞包括修饰细胞。

11. 如权利要求 10 所述的方法，其中，所述的供体细胞包括转基因细胞。

12. 如前述权利要求中任一项所述的方法，其中，所述的受体细胞包括一个去核卵母细胞。

13. 如权利要求 12 所述的方法，其中，所述的去核卵母细胞是从与供体细胞核来源一致的物种中得到的。

14. 如权利要求 1-11 的任一项所述的方法，其中，所述的受体细胞包括一个去核干细胞或融合在一起的一团去核干细胞。

15. 如权利要求 14 所述的方法，其中，所述的干细胞是从正在生长的胚胎中或从一种已经建立的培养细胞系中分离的胚胎干细胞。

16. 一种生产克隆动物胚胎的方法，该方法包括将一个分离的处于细胞周期的 G1 阶段的供体核移植到去核的受体细胞中。

17. 如权利要求 16 所述的方法，其中，所述的供体细胞核用本技术领域所熟知的方法进行遗传修饰以便产生具有所期望遗传性状的克隆化胚胎。

18. 如权利要求 16 或 17 所述的方法，当其用于生产一种动物的克隆化胚胎时，选自：鸟类、两栖类、鱼类和哺乳动物类。

19. 如权利要求 18 所述的方法，其中，所述的克隆化动物胚胎是一种哺乳动物，选自：包括人类的灵长类、啮齿类、兔子、猫、狗、马、牛、绵羊、鹿、山羊和猪。

20. 一种用如权利要求 16 所述的方法制备的重建动物胚胎。

21. 如权利要求 17 所述的方法所述的重建动物胚胎，包括转基因胚胎。

22. 一种如权利要求 20 或 21 所述的重建动物胚胎，其再次克隆进一步增加胚胎数量或者其经过细胞核连续移植，协助细胞核重编和/或发育。

23. 如权利要求 20-22 任一项所述的重建动物胚胎，包括选自包括

人类的灵长类、啮齿类、兔子、猫、狗、马、牛、绵羊、鹿、山羊和猪的哺乳动物。

24. 一种克隆非人动物的方法，该方法包括如下步骤：（1）根据权利要求 16 或 17 任一项所述的方法生产克隆化非人动物胚胎（2）使用已知方法让非人动物胚胎从胚胎期发育到分娩期；和（3）用传统方法或进一步克隆法随意繁殖由此形成的非人动物。

25. 如权利要求 24 所述的方法，其中，所述的克隆化非人动物是选自：包括人类的灵长类、啮齿类、兔子、猫、狗、马、牛、绵羊和鹿的非人哺乳动物。

26. 如权利要求 24 或 25 所述的方法，其中，所述的克隆话非人动物是一种具有期望遗传性状的转基因非人动物。

27. 如权利要求 26 所述的方法，其中，所述的转基因非人动物是一种转基因牛或绵羊。

28. 一种用如权利要求 24 所述方法制备的克隆化非人动物。

29. 如权利要求 28 所述的克隆化非人动物，包括选自：非人灵长类、啮齿类、兔子、猫、狗、马、牛、绵羊和鹿的哺乳动物。

30. 如权利要求 28 或 29 所述的克隆化非人动物，其中包括具有所期望遗传性状的转基因非人动物。

31. 如权利要求 30 所述的克隆化非人动物包括转基因牛或绵羊。

32. 如权利要求 30 或 31 所述的克隆化转基因动物，其中，所述的所期望遗传性状选自：插入、缺失或改变一个或多个基因，其能够在奶、血或尿中生产药用蛋白；生产滋补性奶肉产品；产生有益的农业生产性状以便提高奶、肉和纤维生产的质量；提高对害虫和疾病的抵抗力；在奶中生产工业用蛋白；异种移植；及用于产生作为人类疾病模型的转基因动物。

33. 如权利要求 28-32 任一项所述的克隆化非人动物后代及其后

裔。

34. 一种产生胚胎细胞系的方法，该方法包括如下步骤：a)从供体细胞增殖群或 G1 细胞同步化细胞群或衰老细胞群中挑选分离 G1 细胞，然后从如此分离的细胞中把一个核移植到一个去核受体细胞中；b)培养到胚泡期；c)回收胚胎细胞；以及 d)使用本技术领域公知的方法建立体外无限繁殖细胞系。

35. 如权利要求 34 所述的方法，其中，所述的胚胎细胞是胚胎干细胞。

36. 如权利要求 34 或 35 所述的方法，其中，所述的供体细胞是人细胞。

37. 如权利要求 34-36 任一项所述的方法，其中，所述的供体细胞和受体细胞都是人细胞。

38. 如权利要求 34-37 任一项所述的方法，其中，所述的供体细胞是选自任何一种核型正常的细胞类型的成体或胎儿细胞，受体细胞是选自任何一种能够重编程基因表达的细胞类型。

39. 一种用如权利要求 34-36 任一项所述的方法生产的胚胎细胞系。

40. 一种用如权利要求 36 所述的方法生产的人胚胎干细胞系，当根据权利要求 35 时，在治疗应用上有应用价值。

41. 一种生产胚胎干细胞的方法，该方法包括如下步骤：a)从供体细胞增殖群或 G1 细胞同步化细胞群或衰老细胞群中挑选分离 G1 细胞，然后从如此分离的细胞中把一个核移植到一个去核受体细胞中；b)培养到胚泡期；以及 c)回收胚胎干细胞。

42. 如权利要求 41 所述的方法，其中，所述的供体细胞是人细胞。

43. 如权利要求 41 或 42 所述的方法，其中，所述的供体细胞和受体细胞都是人细胞。

44. 如权利要求 41-43 任一项所述的方法，其中，所述的供体细胞是挑选自任何一种核型正常的细胞类型的成体或胎儿细胞，受体细胞是挑选自任何一种能够重编基因表达的细胞类型。

45. 用如权利要求 41-43 任一项所述方法生产的胚胎干细胞。

46. 如权利要求 45 所述的胚胎干细胞，其中包括人胚胎干细胞。

47. 一种如权利要求 39、40 和 45 任一项所述胚胎细胞的用途，其中，选自神经细胞、肌肉细胞、心脏细胞、肝脏细胞、肺细胞、肾脏细胞或其他一种相关细胞类型的特化细胞或组织类型是用本技术领域公知的方法培养的。

48. 一种如权利要求 47 所述的用途，其中，所述的胚胎细胞是如权利要求 40 或 46 所述的人胚胎干细胞。

49. 一种治疗性克隆方法，其中，胚胎干细胞是依据权利要求 35 和 41-43 任一项所述，从一个受治疗者所得的受体细胞产生，并且培养产生用于需要这种治疗的所述受治疗者或其他受治疗者移植用特化细胞或组织。

50. 如权利要求 49 所述的方法，其中，所述的胚胎干细胞包括一个或多个转基因，赋予用于移植的因而发生的分化细胞期望的遗传性状。

51. 一种用于可以通过移植特化细胞或组织治疗的疾病、障碍或损伤的治疗方法，该方法包括给需要此种治疗的病人施用治疗有效量的权利要求 49 或 50 所述方法生产的特化细胞或组织。

52. 如权利要求 49 或 50 所述的方法，其中，所述的疾病、障碍或损伤选自：多种神经系统障碍（例如帕金森病）、糖尿病、心脏病、肌肉萎缩、多种遗传性疾病、特定癌症（例如白血病）、脊髓损伤、烧伤和其他痛苦。

53. 一种使用权利要求 47 所述方法生产的体外分化人胚胎干细胞

进行药物筛选或药物毒理学测试的方法。

54. 一种异体移植方法，其中，细胞、组织和器官是从如权利要求 28-32 任一项所述的非人克隆化动物中分离，并且用于需要这种治疗的人类疾病患者的移植中。

55. 一种基因治疗方法，其中，细胞、组织和器官包括转基因，并被分离出来用于如权利要求 30 或 31 所述的非人克隆化动物胚胎。

用挑选的供体细胞实施核移植

本发明涉及一种核移植的新方法，明确地说，但决不排斥使用于产生哺乳动物胚胎、胎儿和后代，包括遗传工程或转基因哺乳动物胚胎、胎儿和后代的克隆技术中。

发明背景

胚胎重建时供体细胞核和受体细胞质所处细胞周期的时间阶段是决定核移植后成功发育的关键因素。两种“细胞”的特定组合是确保第一次胚性细胞周期后得到一套二倍体染色质和将细胞核重编和随后的发育机会增加到最大限度所必须的。当细胞分裂期间的供体细胞核与去核中期停顿卵母细胞（称作细胞质或受体细胞）融合时，立即发生核膜解体(NEBD)并且供体染色质遭受染色体超前凝聚(PCC)(Barnes等, 1993)。这些效应是由一个称作促成成熟因子(MPF,也称作促减数分裂或有丝分裂因子, 参考, 综述, Campell 等, 1996a)的细胞质活性诱导的。在卵母细胞成熟中, MPF 的活性在中期最高, 而在受精或人工激活后迅速下降。所以, 两种类型的细胞质可以用于重建; 使用未激活或激活的中期II(M II)细胞质相应是 MPF 含量依次较高或较低的细胞质。

在有助于认识到哺乳动物核移植中, 细胞周期协调性对保持染色体完整和由此引起的发育潜能的重要性的早期研究工作中使用了来自诸如兔子、绵羊和牛等物种植入前胚胎的未分化卵裂球(即未特化胚胎细胞)。这些研究揭示出供体细胞核所处细胞周期的阶段和暴露于细胞质 MPF 的时间长度对观察到的 PCC 程度具有显著的影响。暴露于 MPF 中的 S 期细胞核染色质存在典型的粉碎化外形, 并且染色体研究表明了畸形的高发率。(Collas 等, 1992b)。相反, 处于 G1 或 G2 期的细胞核的染色质凝聚形成依次具有单股或双股染色单体的伸长的染色体(Collas 等, 1992b)。在适当的将重建胚胎从中期停顿中解放出来并激活发育的刺激作用后, 核膜围绕供体染色质重组, 随后不论其以前

所处细胞周期阶段，供体染色质进行 DNA 合成。所以，处于 G1 期的供体细胞核发动了与正常发育相容的 DNA 合成，而处于 G2 期或 S 期的细胞核则完全或部分地再复制已经复制的 DNA，如此以致，到第一次胚性细胞周期结束时，两个子细胞的 DNA 含量不正确，导致异常的早期胚胎发育。

相反，这些早期研究表明在细胞质激活后经过一个足够长的间隔，等 MPF 消失后，把卵裂球细胞核移植到细胞质中，NEBD 就不发生（所以 PCC 也不发生）并且供体细胞核依据其在移植时所处细胞周期的阶段控制 DNA 复制。所以，G1 期或 S 期的细胞核分别启动或继续复制，而 G2 期的细胞核则不能诱导或进入另外一次 DNA 合成。这种预先激活的细胞质被命名为“通用受体”（Campbell 等，1994），其具有在细胞周期的任何阶段协调供体细胞发育的能力。这一点对克隆植入前胚胎特别重要，在植入前胚胎中大多数未分化卵裂球细胞核在任何时刻处于 S 期（80-90%，Barnes 等，1993；Campbell 等，1994），所以最适合移植到含 MPF 较低的细胞质中。

核移植之后，正常发育取决于卵母细胞细胞质里（或者外因诱导的辅助因子）具有重塑染色质结构和适当重编供体细胞核基因表达形式的因子。成熟细胞质包含指导正常受精的卵裂期胚胎发育到基因组正常激活时间的 RNA 转录物和蛋白质，基因组正常激活时间是指胚胎细胞核开始合成自己的 RNA 并指导胚胎发育。所以，来自已经越过基因组正常激活时间点的胚胎或细胞类型的供体细胞核必须在重建后停止它们的 RNA 合成，并且保持失活状态直到新的重编母体胚胎基因组转换发生。移植后，供体细胞核被迫重编合子状态，随后以正常胚胎发育发生所需的正确水平，适当的时空方式激活适当的基因。实现这个细胞核重编的机制目前不是十分清楚。

鉴于新近用培养保存的细胞进行核移植的兴趣，重编和细胞周期协调已经成为重要课题。培养的细胞比用胚胎分裂球克隆用于早期研究的细胞更加分化（即具有更加特化的细胞功能）。这些细胞可以从胚胎、胎儿或动物成体中分离。因为可以得到较大数量的细胞，所以使用分化细胞培养物的高效核移植技术在家畜中可能实现大规模增殖希望的遗传型并且将加速培养细胞基因操作后转基因动物的生产。

用活跃生长、未同步化的绵羊胚细胞（细胞周期不清楚）培养物的早期（Campbell 等，1995）但不是后期的传代细胞（Campbell 等，1996b）与前激活细胞质融合的早期研究实际上产生了分娩期羔羊。用去除血清 5 天后、处于静止状态的细胞（即，经此处理的细胞被认为退出正常的细胞分裂周期，进入所谓的 G0 状态）与其前、其后或同时用相似综合效率激活的细胞质融合的后续研究产生了活羔羊（Campbell 等，1996b）。这些作者（Campbell 等，1996b；Schnieke 等，1997；Wilmut 等，1997；专利 WO97/07669）提出了使用退出正常细胞分裂周期并且被同步于静止或 G0 状态的细胞有助于细胞核重编和从分化细胞产生克隆化动物的重要性。由上述作者提出的优选实现细胞静止同步化的方法（以缺乏增殖细胞核抗原（PCNA）为基础，该种状况表明没有细胞处于 S 期）是合适时间的血清饥饿。然而，近来，关于血清饥饿细胞中实际处于 G0 状态的细胞比例受到了质疑。使用双参量流式细胞计同时测量细胞 DNA 和蛋白含量（为了在二倍体群体中区分 G0 和 G1 期细胞，静止期细胞含有更少的 RNA 和蛋白），Boquest 等(1999)研究了培养的猪胎儿成纤维细胞的细胞周期特征。他们证实虽然经过了 5 天的血清饥饿处理，但是实际上根据他们的定义低于 50%的细胞处于 G0 状态。通过挑选细胞群中的“小”细胞，血清饥饿培养物中 G0 细胞份额增加到 72%（Boquest 等，1999）。

作为使用静止期细胞的替代方法，Cibelli 和同事们（1998；和专利说明书 WO 99/01163）报道了使用非血清饥饿的自由生长的牛细胞培养物与随后使用离子霉素和 6-二甲氨基嘌呤（6-DMAP）激活的中期 II（M II）细胞质融合。但是，这些公告并未阐明使用这些方法最终产生克隆化小牛胚胎的供体细胞在核移植时所处细胞周期。

同样地，其他报道说克隆化小牛（Vignon 等，1998，1999；Zakhartchenko 等，1999）和小鼠（Wakayama 和 Yangimachi,1999）已经从非血清饥饿的自由生长细胞培养物中产生。但是，与前面一样，产生克隆化后代的供体细胞在进行核移植时所处细胞周期的阶段不能确定。

所以，上面所提的研究没有一项准确地证实细胞周期的哪个阶段或哪些阶段导致重建胚胎中最终发育成活后代的比例如此低。

上述讨论强调，迄今为止，关于培养的供体细胞在核移植时所处细胞周期的描述总地来说少的可怜，这就使本技术水平不稳定并且不易重复。

所以，期望有一种准确知晓供体细胞核所处细胞周期阶段的核移植方法。

本发明的一个目的就是向前推进以便实现这一期望或者至少给公众提供有用的选择机会。

发明概述

根据第一个方面，本发明提供了一种核移植的方法，该方法包括从增殖的或未增殖的供体细胞群中挑选分离 G1 期细胞和从如此分离的 G1 期细胞中将一个细胞核移植到一个去核的受体细胞中。供体细胞群可以处于细胞周期的一个或多个已知或未知的阶段。

该方法提供了关于供体细胞核在胚胎重建时所处细胞周期的阶段的确定性，所以优于现有技术。

本发明考虑使用细胞周期抑制剂将自由生长的细胞阻滞在细胞周期的特定阶段，以便产生非增殖同步化细胞群。优选地，细胞生长被阻滞在有丝分裂中，并且一旦去除抑制剂，进入 G1 期的细胞用于核移植。

所以，在第二个方面，本发明提供了一种核移植方法，该方法包括将一个从同步于细胞周期 G1 期的非增殖细胞群中分离的细胞的一个细胞核移植到一个去核的受体细胞中。

优选地，所述 G1 期细胞是从自由增殖的细胞群或从处于 G1 早期的非增殖同步化细胞群中单个分离。

可选择地是，非增殖细胞群可以包括衰老细胞。

分离的 G1 期供体细胞是从动物体内，或者，更优选地，从体外细胞培养物中分离。适合的细胞可以来自胚胎，胎儿，幼年动物，直到完全成熟的成年动物。实际上，任何具备细胞增殖能力的核型正常的二倍体细胞或衰老细胞都可以用于本发明中。细胞可以是未分化状态或细胞分化的不同程度，只要它们可被刺激进入细胞周期和增殖。静止期的细胞可以用合适的培养条件（例如加入血清或特殊的生长因子）

刺激进入细胞周期并且在有丝分裂后的 G1 早期用于核移植。一些细胞类型可被证明比其他的类型更有效，但是成体和胎儿的成纤维细胞和成体卵泡细胞已被发现令人满意。为了说明本发明，下面介绍在牛中（实施例 1-7）使用两种卵泡细胞系、四种皮肤成纤维细胞系和两种遗传修饰的胎儿成纤维细胞系的实施结果。

优选地，受体细胞包括来自与供体细胞核来源一致的物种的去核卵母细胞。去核卵母细胞可以在胚胎重建时具有较高或较低的 MPF 活性，因为两种状态是与具有 2C 含量 DNA 的 G1 期供体细胞核相容。

可选择地是，受体细胞可以包括一个去核的干细胞或一团融合在一起的去核干细胞。优选地，这些干细胞是胚胎干细胞。在核移植中用作受体细胞的胚胎干细胞本身可以从生长着的胚胎或已经建立的培养干细胞系中分离。在这种情况下，用本发明的方法挑选的 G1 期细胞的供体细胞核所做的核移植可以用于“治疗性克隆”的目的。

根据第三个方面，本发明提供了通过将分离的 G1 期供体细胞核，优选地 G1 早期，移植到去核的受体细胞中而产生克隆化动物胚胎的方法。

本发明的方法可以用于生产任何动物胚胎，有关物种包括鸟类、两栖类、鱼类和哺乳类。优选地，相关动物胚胎是哺乳动物胚胎，包括，但不限于，灵长类包括人、啮齿类、兔子、猫、狗、马、猪和最优选地，有蹄类动物如牛、绵羊、鹿和山羊。

优选地使用本技术领域所知的方法遗传修饰的细胞核所获的克隆动物胚胎具有期望的遗传性状。

根据第四个方面，本发明提供一种用本发明的方法制备的重组动物胚胎，包括重组转基因动物胚胎。如此形成的胚胎然后可以再次克隆以便进一步增加胚胎数量或者进行连续核移植以便进一步帮助核重编和/或发育潜能。

根据第五个方面，本发明提供了一种克隆非人类动物的方法，该方法包括（1）根据上面所述的发明提供的方法产生克隆化动物胚胎；（2）用已知方法让动物从胚胎发育到分娩；以及（3）用传统方法或根据本发明方法克隆的随意繁殖如此形成的动物。

本发明的方法可以用于生产非人类动物，有关的物种包括鸟类、

两栖类、鱼类和哺乳类。优选地，所说的非人类动物选自：人以外的灵长类、啮齿类、兔子、猫、狗、马、猪和最优选地，有蹄类动物如牛、绵羊、鹿和狗。

根据第六个方面，本发明提供了用上面描述的发明中的方法制备非人类克隆化动物，以及这种非人类克隆化动物的后代和后裔。

本发明的方法可以用于生产非人类动物，优选哺乳动物，其具有使用本技术领域所熟知的方法遗传修饰供体细胞核所获的期望遗传性状。用这种方法产生的转基因动物也构成本发明的一部分。

本发明也可用于生产适用于，例如细胞、组织和器官移植的胚胎细胞系，胚胎干细胞系，胎儿或后代。

相应地，在另一个实施方案中，本发明提供了产生胚胎细胞系的方法，该方法包括如下步骤：a)从不知道细胞周期的供体细胞增殖群中或同步化的G1期细胞群中挑选分离G1期细胞和将分离细胞的细胞核移植到去核受体细胞中；b)培养到胚泡期；c)回收胚胎细胞；以及d)使用本技术领域公知的方法建立体外无限增殖化细胞系。

在另一个实施方案中，提供了生产动物胚胎干细胞的方法，该方法包括如下步骤：a)从处于细胞周期未知的不同阶段的动物供体细胞生长群中或同步化的G1期培养物中挑选分离G1期细胞和将分离细胞的细胞核移植到去核动物受体细胞中；b)培养到胚泡期；c)回收胚胎干细胞。

优选地，在上述方法中使用的动物供体细胞是人源的。最优选地，在上述方法中使用的动物供体和受体细胞都是人源的。

最优选地，供体细胞是选自任何核型正常的细胞类型的成体或胎儿细胞，并且受体细胞是选自任何能够重编程基因表达的细胞类型，包括去核卵母细胞或胚胎干细胞。

用本发明的方法产生的胚胎干细胞是多潜能细胞，可以用本技术领域公知的方法在培养中诱导分化形成人体细胞特化类型的纯化群，包括神经细胞例如神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞；肝细胞；肌肉细胞例如肌原细胞；心脏细胞例如心肌细胞；造血细胞；胰细胞和其他感兴趣的细胞。

这些特化的人体细胞和组织然后可以在特定疾病或者受损细胞不

能自我更新或不能有效更新的伤害中用于移植治疗。其中，人供体细胞来自需要这种移植的病人，由于移植的组织与病人在遗传上相同，该移植的组织就不会被病人排斥。

可替代地是，这些分化的细胞和组织可以用于治疗疾病或损伤，例如，多种神经系统障碍（例如帕金森病）、糖尿病、心脏病、肌肉萎缩、多种遗传性疾病、特定癌症（例如白血病）、脊髓损伤、烧伤和其他痛苦。

这些方法在本技术领域称做“治疗性克隆”。

人体胚胎干细胞体外分化成特定细胞类型也有助于筛选药物和人类药物毒理学研究。

所以，在另一个方面，本发明提供了用本发明方法生产体外分化人体胚胎干细胞进行药物筛选和药物毒理学实验的方法。

根据另外一个方面，本发明提供了异种移植的方法，其中细胞、组织和器官可以分离自根据本发明的方法生产的非人类克隆化动物和它们的后代，用于需要这种治疗的人类疾病患者的移植中。如果这种细胞、组织或器官中包括了转基因，这种细胞、组织或器官可以用于基因治疗，或调节病人对含有外源基因的组织免疫反应。

附图说明

现在参考附图对本发明予以描述：

图 1 表示用处于供体细胞周期的 G0 或 G1 期卵泡细胞重建的克隆化牛胚胎全妊娠过程中的存活率；

图 2 表示用处于供体细胞周期的 G0 或 G1 期雌性成体皮肤成纤维细胞重建的克隆化牛胚胎全妊娠过程中的存活率；

图 3 表示用处于供体细胞周期的 G0 或 G1 期雌性成体皮肤成纤维细胞（3XTC 细胞）重建的克隆化牛胚胎全妊娠过程中的存活率；

图 4 表示用处于供体细胞周期的 G0 或 G1 期雄性成体皮肤成纤维细胞（LJ801 细胞）重建的克隆化牛胚胎全妊娠过程中的胚胎存活率；

图 5 表示用处于供体细胞周期的 G0 或 G1 期、经过遗传修饰的雌性胎儿肺成纤维细胞（酪蛋白+5110 细胞）重建的克隆化转基因牛胚胎全妊娠过程中的胚胎存活率；和

图 6 表示用不增殖的衰老雌性胎儿成纤维细胞（561 细胞系）重建的克隆化转基因牛胚胎全妊娠过程中的胚胎存活率；

发明详述

本发明涉及对核移植克隆动物胚胎的已有技术的改进。虽然考虑到本发明的胚胎克隆方法可以用于多种哺乳动物和其他动物种类，但是本方法将参考牛类予以描述。本发明的本质特征是供体细胞核处于 G1 期，优选地，处于 G1 早期。

从自由生长的培养细胞群中确定得到 G1 期细胞的一个方法是从培养物表面逐个挑选有丝分裂细胞，并将它们放在包含 10% 的胎牛血清（FCS）的培养基中使其完成有丝分裂。这种供体细胞然后在有丝分裂后的较短时间里并在进入 S 期前融合受体细胞（即细胞质），通常应用中该时间是三个小时，可以用 5-溴脱氧尿苷标记检测。以这种方式，细胞被确保处于 G1 早期并且拥有 2C 含量的 DNA。所以，循环的细胞在其进入 G1/S 分界点前用于核移植。挑选的细胞在操作的整个过程中存放在高血清含量的培养基中，至少到与细胞质的融合完成之后。所以，细胞不能被诱导退出细胞分裂周期，不能静止在任何时刻。

虽然本发明考虑生产用于核移植的同步化 G1 期细胞群，但是本发明的方法中一个优点是不必使用具有细胞潜在毒性或干扰细胞同步化的试剂例如噻氨酯啉或秋水仙素，例如，预先将较高比例的细胞同步化于 M 期，随后再从这一阻滞中释放，等细胞分裂后挑选 G1 早期细胞。但是，为了挑选大量的 G1 期细胞或者可逆性地将用于核移植的 G1 期细胞抑制于特定的时间点，根据本发明，以合适的药物浓度和孵育时间使用合适的试剂即细胞周期抑制剂是有益的。这种试剂和方法为本领域的技术人员所知晓。这些方法可以包括为减少药物暴露时间的预同步化处理，例如在二次加入血清前使用血清饥饿法诱导细胞暂时进入 G0 期，让细胞再次进入 G0/ G1 分界点或限制点和进行细胞分裂周期。适合可逆性把细胞抑制在 G1 期不同时间点的试剂（参考，Gadbois 等，1992）包括：（1）星形孢菌素（一种非专一性的激酶抑制剂，在纳摩尔水平的极低浓度使用）；（2）作用于细胞周期进程的更专一的激酶抑制剂，例如 cAMP 依赖型蛋白激酶和 cGMP 依赖性蛋白激

酶抑制剂；(3) 洛伐他丁；(4) 异亮氨酸缺乏；(5) 蛭蛭菌素或者羟基脲，以阻止细胞进入 S 期、阻滞在 G1/S 分界点的方式使用。

由于 G1 期供体细胞核含有 2C 含量的 DNA（即它是二倍体），它们可以与具有或高或低含量 MPF 的细胞质重建。这也就是说，G1 期细胞核可以在激活发生之前、之后或同时引入细胞质。但是，为了克隆胚胎较好发育，优选地，将供体细胞核（不管是在电诱导细胞融合还是直接细胞核注射后进行引入）在去核卵母细胞的细胞质存在的因子中暴露适当的时间，以便促进细胞核重编。这被称做“激活前融合”或者 FBA。以前的研究工作已经表明与基本上是“同时融合和激活”或 AFS 相比较本方法的好处（Stice 等，1996；Wells 等，1998；1999）。而且，建议在细胞质中暴露时间至少大于一个小时，优选地是在 3-6 小时之间，以便提高发育到胚泡期的比例。但是，使用本方法时，为了在最终胚胎中保持正确的倍性染色体，用合适方法阻止微核形成是重要的，其中微核是在融合早于激活时发生的（Czolowska 等，1984）。

下面是牛类中用培养的 G0 期或 G1 期供体细胞重建和产生克隆化胚胎的方法略述。在下述详细的实施例中，收集自卵泡的牛卵泡细胞使用结果表现在实施例 1-3 中（成纤维细胞系的使用在实施例 4-7 中阐明）。在实际应用中，使用本技术可以证明本质上任何具备正常二倍体核型的细胞类型是全能的，包括胚胎、胎儿、幼年和成体细胞，不论其正在增殖还是能够诱导进入细胞周期或衰老过程。并且，本领域的技术人员觉察到的本技术领域已知的其他方法可以用于重组和生产克隆化胚胎。

卵母细胞的体外成熟

在屠宰场收集雌牛卵巢，放入生理盐水中（30℃），2 小时内运到实验室。用 18 号注射针和负压吸入 3-10 毫米的卵泡从而回收卵丘—卵母细胞复合体（COCs）。（替代地，未成熟卵母细胞可以从供体母牛通过卵子提取收集，随后进行体外成熟）。COCs 被放到补充了 50 微克/毫升肝素（Sigma, St. Louis, MO）和 0.4% w/v 牛血清清蛋白（BSA）（Immuno-Chemical Products(ICP), Auckland, 新西兰）的 N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙烷磺酸（HEPES）缓冲组织培养基 199（H199；Life Technologies, Auckland, 新西兰）中。在进行体外成熟前，只选择具有

紧密非闭锁卵丘放射冠和匀质卵浆的 COCs。这些 COCs 先用 H199 培养基+10%胎牛血清 (FCS) (Life Technologies, 新西兰) 洗两次, 再用碳酸氢盐缓冲的组织培养基 199+10%FCS 洗一次。将十个 COCs 转入 10 微升这种培养基中, 加到置于 5 厘米培养皿 (Falcon, Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, 新泽西州) 里的 40 微升成熟培养基中, 用石蜡油 (Squibb, Princeton, 新泽西州) 覆盖。成熟培养基包括补充 10% FCS, 10 微克/毫升绵羊卵泡刺激素 (FSH) (Ovagen; ICP), 1 微克/毫升绵羊黄体生成素 (LH) (ICP), 1 微克/毫升雌二醇 (Sigma), 和 0.1 毫摩尔/升胱胺 (Sigma) 的组织培养基 199。微滴培养皿在 39°C、湿润的、含有 5%CO₂ 的气体环境中培养 18-20 小时。成熟后, 将 COCs 置于含有 0.1%透明质酸酶 (来自牛睾丸; Sigma) 的 HEPES 缓冲合成输卵管液体 (HSOF; Thompson 等, 1990) 涡流处理 3 分钟, 再用 HSOF+10%FCS 洗三次, 完全除掉卵丘放射冠。

培养细胞的核移植

a) 培养基 成熟的卵母细胞、细胞质和重建胚胎在成熟后直到脉冲电击之后 15-30 分钟融合评估结束的时间区段内是在基于 H199 的培养基中保存或操作的。激活前 3-6 小时使供体细胞和 M II 细胞质融合 (FBA 处理法) 重建的胚胎是在减去钙+10% FCS 的 AgResearch 合成输卵管液体培养基 (AgR SOF; 这种培养基是 Gardner 等, 1994 所述配方的修改配方, 已由 AgResearch, Hamilton, 新西兰, 实现了商业化) 中培养, 直到激活前夕, 即培养 3-6 小时后。此后, 钙存在于所有使用的培养基配方中。

b) 去核 用 15-20 微米 (外径) 玻璃吸管取除成熟处理约 18-20 小时的卵原细胞的细胞核, 方法是在周围细胞质里吸取第一极体和中期板。卵原细胞先在含有 10% FCS, 5 微克/毫升 Hoechst 33342 和 7.5 微克/毫升细胞松弛素 B (Sigma) 染色 5-10 分钟, 然后在没有 Hoechst 33342 的这种培养基中操作。去核操作通过在紫外光下看见细胞核来确认。去核之后, 所得细胞质在 H199+10% FCS 中粗放洗涤, 然后保存在这种培养基中, 直到注入供体细胞。

c) 静止供体细胞的制备 (即 G0 期细胞) 用血清缺失的方法, 培养卵泡细胞被诱导进入静止期 (Campell 等, 1996b)。常规传代的某一天,

培养基被吸走，用新鲜的磷酸缓冲盐溶液(PBS)将细胞洗三次，再加入只含 0.5%FCS 的新鲜培养基。将卵泡细胞放到低血清培养基中进一步培养 9-23 天（通常 10 天），然后用于核移植。就在注射前夕，用标准胰蛋白酶消化制备供体细胞单细胞悬液。沉淀细胞，重悬在 H199+0.5% FCS 中，保存在这种培养基中直到注射。

d) G1 期供体细胞的制备 用合适的培养基（例如添加 10%FCS 的 DMEM/F12）在培养皿中的玻璃盖玻片上培养增殖的卵泡细胞。从培养皿中用无菌操作挑选其表面长有细胞的盖玻片，放在能够进行细胞或细胞核收集和注射的合适构造的微操作室中。将一小滴包含 10% FCS 的 HEPES 缓冲培养基滴在细胞上，然后用矿物油覆盖。只要盖玻片上细胞浓度不太高，就可以区分并且用操作吸管小心地物理性地从盖玻片上挑取有丝分裂细胞，因为有丝分裂中，细胞变圆并且仅仅松松地附着在培养表面。如果这一操作不容易，可以在使用稀释的包含 1.5 微克/毫升细胞松弛素 B 的胰岛素溶液（例如培养细胞系常用转种培养强度的十分之一）前先用 PBS 很快清洗细胞，主要减少从盖玻片上物理挑取细胞导致的机械损伤。使用合适的显微镜（例如相差显微镜或 DIC 光学显微镜），主要通过看到纺锤体中凝聚染色体或识别处于有丝分裂末期仍由细胞质桥连接的细胞双联体中的凝聚染色体识别盖玻片上的有丝分裂细胞。所以，不必使用诸如 Hoechst 的 DNA 专一性荧光染料并将细胞暴露在紫外光中。依靠固定在操作器上的注射滴管，有丝分裂细胞被单个地从盖玻片上挑下来，放入临近的包含 10% FCS 的 HEPES 缓冲培养基小滴中，以便完成有丝分裂和最终的细胞分裂形成两个细胞。吸管的直径应该合适，其取决于细胞系，以便在操作中不会物理性的损伤细胞或纺锤体。所以，优选地，处于后期或末期的有丝分裂细胞被单个挑选、取出并允许完成有丝分裂一分为二。这些分裂产生的成对细胞然后通过短时间暴露在合适酶溶液的简便方法轻轻地被分离成单个细胞。然后，每个完整细胞被注入并融合到细胞质中。替代地，细胞核可以被分离并直接注射进去核卵母细胞的细胞质中。优选地，从最先从培养表面挑取有丝分裂细胞开始的三个小时内，完成供体细胞核导入细胞质。这就确保培养细胞是在细胞周期的 G1 早期并在 S 期发生前融合。对于这里使用的每一种细胞类型或细

胞系应该使用例如，选择细胞样品负 5-溴脱氧尿苷标记法，进行确认。而且，建议确认使用本方法所挑选的细胞实际上处于细胞周期中并且在后边的某一时间点进入 S 期。

e) 微注射 受体细胞质在包含 10% FCS 和 5%蔗糖的 H199 培养基中脱水的。这种培养基也用作微操作培养基。容纳供体细胞的合适大小吸管（例如外径 30-35 微米）刺过透明带，细胞被楔在透明带和细胞质的细胞膜间，将促进有助于随后融合的细胞膜紧密接触。注射后，重建胚胎经过两步再次脱水：首先在 10% FCS 和 2.5%蔗糖的 H199 培养基中脱水 5 分钟，然后在 H199+10% FCS 中脱水直到融合。

f) 细胞融合 对 G0 期和 G1 期细胞处理而言，胚胎是用 FBA 战略（激活前融合）重建的。在成熟过程开始后约 24 小时（hpm），重建胚胎在由 0.3 摩尔/升甘露醇，0.5 毫摩尔/升 HEPES 和含有 0.05 毫摩尔/升钙与 0.1 毫摩尔/升镁的 0.05 无脂肪酸（FAF）的 BSA 组成的缓冲液中进行电融合的。融合是在室温下，在一个具有两个用融合缓冲液覆盖相距 500 微米不锈钢电极的小室中进行。用手将重建胚胎与纤细的口控巴氏吸管对齐，以便细胞质和供体细胞的接触表面与电极平行。对于卵泡细胞，细胞融合是用两次由 BTX 电细胞操作仪 200(BTX, San Diego,加州)（需要区分每种细胞系的合适电参数）发射，每次 15 微秒强度 2.25-2.50 千伏/厘米的脉冲直流电诱导的。电刺激后，用 H199+10% FCS 洗涤重建胚胎。然后在 15-30 分钟内，用显微检查检验融合情况。

不要期望上述的电融合参数对在 24hpm 使用的年轻细胞质产生显著的激活比例，因为在相同电刺激后，同一年龄的对照卵母细胞（n=112）只有低于 1%的形成了原核（Wells 等，1999）。这对 FBA 处理很重要，以便 NEBD 和 PCC 发生，从而允许 G0 期和 G1 期细胞核的供体染色体暴露在卵母细胞质里的因子中使染色质重构和细胞核重编。

可选择地是，正如本领域的技术人员所知，来自 G1 期细胞的细胞核可以被分离并直接注射到卵母细胞细胞质中。

g) 激活 有多种实现人工激活的方法。一种独特的方法涉及离子霉素（Sigma）和 6-二甲氨基嘌呤（6-DMAP; Sigma）（Susko-Parrish 等，1994）。融合后，胚胎优选地在供体细胞核暴露给卵母细胞质 3-6 小时

后被激活。这种优选的方法以被称做“激活前融合”(FBA; Wells 等, 1998)。在激活前 30 分钟,用 FBA 处理方法所得的融合胚胎用 HSOF(含钙)+1 毫克/毫升 FAF BSA 洗涤并保存。在滴加 30 微升 5 微摩尔/升的离子霉素 (Sigma) 的 HSOF+1 毫克/毫升 FAF BSA 中、37°C、孵育 4 分钟诱导激活。激活通常在细胞质年龄 27-30hpm 间发生。用 HSOF+30 毫克/毫升 FAF BSA 粗放地将胚胎洗涤 5 分钟,再在含有 2 毫摩尔/升的 6-二甲氨基嘌呤 (6-DMAP; Sigma) 的 AgR SOF (加钙)+10%FCS 中培养 4 小时。

正如 FBA 方法 (Stice 等, 1996; Wells 等, 1998; 1999) 中所述, 延长细胞核暴露于卵母细胞质的时间所致胚胎发育比率提高必须与适当的阻止延迟激活之后微核形成 (Czolowska 等, 1984) 发生的处理方法结合。丝氨酸-苏氨酸激酶抑制剂, 例如 6-DMAP, 似乎是合适的试剂。所以, 在最初的激活刺激后, 6-DMAP 允许形成单个完整细胞核, 因而在重建胚胎里保持了正确的倍性。

体外培养核移植胚胎

胚胎培养是在矿物油覆盖的 20 微升 AgR SOF (可从 AgResearch, Hamilton, 新西兰购买) 中进行的。AgR SOF 是 SOFaaBSA (包含 8 毫克/毫升的 FAF BSA; 如同 Gardner 等, 1994 描述) 的修改配方。只要可能, 多达 10 个胚胎在培养基小滴中一起培养。胚胎是在保湿的模件孵育小室 (ICN Biomedicals, Aurora, 俄亥俄州) 中, 由 5% CO₂、7% O₂ 和 88% N₂ 组成的气体混合物中 39°C 培养。在发育的第 4-5 天 (0 天=胚胎重建当天), 胚胎转入 20 微升新鲜的加有 10 微摩尔/升 2,4-二硝基苯酚的 AgR SOF 中, 如公开专利说明书 WO 00/38538 所披露的, 其中 2,4-二硝基苯酚作为氧化磷酸化的解偶联剂改善了体外牛胚胎发育, 将该说明书引述于此作为参考。融合后的第 7 天, 对可移植胚泡发育特征进行评价。

胚胎移植、怀孕诊断和产犊

使用本领域熟知的技术进行胚胎移植、怀孕诊断和产犊管理。

连续核移植和再克隆

在本发明另外的实施方案中, 可能期望对起源于使用 G1 期供体细胞与适合受体细胞重建所产生的克隆化胚胎的第一代进行再次克隆。

再次克隆可以通过将植入前胚胎分离成单个细胞，然后将它们每个与合适的受体细胞质融合实现。正如本领域的技术人员所察觉到的那样，这种形式的胚胎细胞（或卵分裂球）克隆要求供体细胞和受体细胞的细胞周期的协调，以便避免染色体不正常，使发育最优化。优选地，供体细胞是在第一代克隆化胚胎的桑椹胚期（牛类约 32 个细胞）取得的，但是胚胎也可以在发育的早期或晚期。替代地，可以先用来自培养的 G1 期供体细胞产生一个克隆胎儿，然后再次得到胎儿细胞系，用该新细胞系再克隆胚胎。这种再克隆方法可以通过在植入前期延长原始供体细胞核暴露于卵母细胞质的时间给细胞核重编提供便利。本发明也在从第一代可用的原始胚胎增殖克隆胚胎数量产生第二代、第三代等克隆化胚胎中具有优势。

连续胚胎移植涉及细胞核向适合的受体细胞质环境连续移植。正如本发明的实施方案中所述，期望先用 G1 期供体细胞和含 MPF 较高的未激活受体细胞质重建一个单细胞胚胎。这将允许发生 NEBD 和 PCC 现象并且当随后跟上激活刺激时，完整的二倍体细胞核将会形成。这个细胞核（该细胞核经历了细胞核重构和一定程度的细胞核重编）然后可以从单细胞克隆胚胎中被作为细胞核吸出，随后移植到处于受精后适当时期的去核受精卵中。然后让胚胎发育进行下去。这种顺序的连续核移植过程可以改善核重编。这也可能产生发育改善，因为第二次核移植步骤是将细胞核引入到用精子受精促使其更适合受激活进入胚胎发育的细胞质环境中。

转基因动物的产生

用经过遗传修饰处于细胞周期 G1 期的供体细胞核做核移植产生转基因家畜可能是一种比向受精卵原核注射 DNA（Wall 等，1997）或涉及细胞质内注射精子和束缚外源基因的 DNA 精子介导基因转移（Perry 等，1999）更有效通用的方法。用培养细胞所做的核移植的优点包括：（1）基因操作的范围可能更广泛；（2）相对于收集卵原细胞或受精卵，用细胞系使基因操作更容易在高遗传背景上进行；（3）所有产生的克隆后代是转基因的并具有期望的性别；和（4）与原核注射方法或精子介导基因转移产生单个原始动物相比，本方法有机会在短期内产生生产有用产品的直接畜群和牧群。

培养细胞可以通过插入、去除或改变适当的 DNA 进行遗传改变。诱发变异包括新 DNA 序列的随机插入（该序列可以是异源的）、DNA 位点特异性插入和允许基因组中特定位点的 DNA 序列插入、缺失或改变的同源重组。使用本技术领域已知的方法进行细胞挑选和 DNA 分析证实了适当的遗传改变后，从核型正常的转基因细胞然后可以选出细胞周期处于 G1 期的，用于细胞核移植以便产生克隆化/转基因动物。

依据操作中特定基因不同，存在多种适用遗传修饰改变生物医学和农业用家畜的因素。因素的范围包括；（1）在奶、血或尿中生产药用蛋白；（2）生产滋补性产品和医用食物，例如牛奶；（3）控制农业生产的特性，例如提高奶、肉和纤维的数量和质量和提高对疾病和害虫的抵抗力；（4）生产工业用蛋白，例如在奶中；（5）异种移植；（6）产生作为人类疾病模型的家畜，例如囊性纤维化和 Huntington 疾病。

治疗性克隆

细胞核移植和胚胎干细胞技术的一个显著的影响可能是基于人细胞的治疗领域（Pederson,1999）。发生特定疾病或者不能修复或不能自身有效更新的组织损伤（例如糖尿病、肌肉萎缩、脊髓损伤、特定癌症、多种神经系统障碍，包括帕金森病）的病人具有产生用于移植的自身治疗组织的潜能，提供了长效或终生治疗。首先本方法将使用人细胞核移植。这涉及从患病或受伤的病人身上收集一份健康组织样品，培养刺激细胞增殖。通过选择细胞周期的 G1 期供体细胞并将它们与合适的受体细胞融合将可能重编细胞核。如果受体细胞是去核的人卵母细胞，那么，在适当的激活刺激后，重建的胚胎能在合适的胚胎培养基中生长到胚泡期。在合适的培养条件下（Thomson 等，1998），人体胚胎干细胞可以来自这种克隆胚胎的内部细胞群，该细胞将和捐赠这种培养细胞的病人在遗传上一致。

从“胚胎干细胞”字面意思来说，是指分离自胚胎中的任何一种多潜能性细胞类型，优选地用本技术领域广为所知的方法分离自胚泡期的内部细胞群。

用本发明方法所产生的胚胎干细胞将是未分化的、多潜能性的（具有分化成细胞内任何一种细胞类型的潜能）和本质上具备体外无限增殖能力。分离自内部细胞群的细胞系也可能有一定程度的分化和具备

分化成多种细胞类型的有限分化能力，但是可能仍具有治疗价值。依据鼠胚胎干细胞的经验，适合的条件能够开发出来，这种条件能够产生特定分化细胞类型的纯化群，例如神经细胞、血细胞、心肌细胞等，治疗特定的疾病（例如产生胰岛素的细胞治疗糖尿病或产生多巴胺的细胞治疗帕金森病）。这些遗传上相容的细胞然后可以施用回病人，以便在移植后原位再生正常组织。因为细胞在遗传上与病人相同，所以将不会遭到排斥，因而不必或几乎不需要免疫抑制药物。经过系统修饰基因座，例如在免疫系统的外来细胞识别中扮演重要角色的主要组织相容性复合体基因，产生用于异源移植的“通用”胚胎干细胞系可能是有益的。

一些应用可能涉及分化和移植前遗传修饰胚胎干细胞。这可能是因为基因治疗的目的是传递治疗用药物或改正体细胞的基因缺陷例如杜兴氏肌营养不良病人骨骼肌中肌营养不良蛋白基因。

除了用细胞、组织或器官进行移植治疗外，人胚胎干细胞分化成特定细胞类型可能也对药物发现和人类药物的毒理学研究有益。

并且，可以从克隆化非人动物后代中分离细胞、组织和器官，用于需要这种治疗（外源移植）的人类病人的移植中。当这种细胞、组织和器官包含转基因，这种细胞、组织和器官可以用于基因治疗或调节病人对外源组织的免疫反应。

人体应用中的受体细胞

在根据本发明所述的细胞核移植的方法中，优选的受体是使用公开的方法制备的去核卵母细胞。然而，对于人体应用而言，这是困难的。

一种能够重编分化体细胞核的受体细胞替代性来源是胚胎干细胞。所以，需要某一形式细胞治疗病人的体细胞可以在培养中去分化，而不必是人体卵母细胞。这可以通过将处于细胞周期 G1 期的健康体细胞与一个去核胚胎干细胞或一组去核胚胎干细胞（为了提供用于重编的大量细胞质）融合实现。控制受体干细胞的细胞周期状态是必要的，优选地在融合时处于 M 期或 G1 期。在这种方法中，体细胞的分化细胞核可以在暴露给干细胞质之后去分化。重建产生的细胞可以具有发育潜力多能性，可能诱导产生治疗用的一组其他特化的细胞类型。这

种观念以前在胸腺淋巴细胞和胚胎生殖细胞融合产生的杂合体细胞中得以证实 (Tada 等, 1997)。

现在用下面的实施例具体说明本发明, 这些实施例正如本领域的技术人员所知不是为了限制本发明的范围。

实施例 1 滤泡供体细胞同步化于 G0 期或 G1 期对核移植后的体外发育的影响

在这个特定实验中, 滤泡颗粒细胞的原代细胞系用于核移植。该细胞系用 J1 表示, 它是来自一头新西兰 Jersey 小母牛。使用于本实验的 J1 细胞是培养中的 7-8 代细胞。

以便比较, 供体细胞是在细胞周期的两个阶段同步化的:

(1) G0 期细胞是在包含 0.5%FCS 的培养基中培养, 在血清缺乏 10-11 天得到的。

(2) G1 期细胞是在完成有丝分裂后的 1-3 小时里与细胞质融合的。

负 5-溴脱氧尿苷标记检测证实在有丝分裂的 3 小时里融合的 J1 细胞未进入细胞周期的 S 期, 而是细胞周期的 G1 期。

本实验中用来自这两种细胞周期处理组的供体细胞重建胚胎是在补充了牛血清清蛋白 (BSA, Life Technologies 产品编号 30036-578) 的 AgR SOF 培养基中体外培养。

体外发育的结果见表 1 中。使用电融合时, 细胞周期 G0 期 (对照) 和 G1 期供体细胞与细胞质 (受体细胞) 的融合效率相等。正如下面的表 1 所示, G0 期和 G1 期供体细胞处理组体外发育到胚泡期的融合重建胚胎的比例没有差别。

表 1: 用处于细胞周期 G0 或 G1 期的 J1 滤泡细胞重建、在补充了 Life Technologies 牛血清清蛋白 (BSA) 的 AgR SOF 培养基中培养的克隆化胚胎的体外发育。

| 细胞周期的阶段 | 融合率 | 1-2 级胚泡期 | 总发育率 |
|------------|---------------|---------------|---------------|
| G0 (n=152) | 86 \pm 5.2% | 24 \pm 1.1% | 77 \pm 6.4% |
| G1 (n=186) | 78 \pm 5.0% | 25 \pm 6.2% | 77 \pm 6.9% |

实施例 2 滤泡供体细胞 (J1 和 EFC 细胞系) 同步化于 G0 期或

G1 期对细胞核移植后培养在补充了 Sigma 牛血清清蛋白的培养基中对体外发育的影响

进一步的证据是在表 2 中提供的，以便支持处于细胞周期 G0 期和 G1 期的滤泡供体细胞对体外培养克隆胚胎培养 7 天后发育到胚泡期没有影响。

实验是用两种独立的滤泡细胞系进行的：

- (1) “EFC”；一种来自新西兰弗里斯兰奶牛的滤泡细胞系和
- (2) “J1”一种来自新西兰泽西种小奶牛。

在本实验中，EFC 细胞仅用 G0 期，而 J1 细胞仅用细胞周期的 G1 期。但是，本实施例的资料予以综合，因为两种细胞系来自滤泡细胞并且重建胚胎是在相同的培养基配方上培养。在这些实验中，培养基是标准的 AgR SOF 培养基，但是补充了 Sigma 的牛血清清蛋白 (Sigma Chemical Company; 产品编号 A-7073) 而不是如上述实施例 1 中的 Life Technologies 的牛血清清蛋白。

J1 细胞是在第 3-6 代传代细胞时用于细胞核移植的，供体细胞是在有丝分裂完成后的 1-3 小时里融合的。EFC 细胞是在培养的 3-8 代间使用并在培养的 9-18 天之间使用含有 0.5% 的血清同步化在 G0 期。

体外发育结果见表 2，表明对于滤泡供体细胞，在细胞周期的 G0 期和 G1 期之间发育到胚泡期的融合胚胎的比例没有不同。

表 2 用处于细胞周期 G0 期或 G1 期的滤泡细胞重建、并在补充了 Sigma 牛血清清蛋白的 AgR SOF 培养基中培养的克隆胚胎的体外发育

| 细胞系 | 细胞周期的阶段 | 融合率 | 1-2 级胚泡期 | 总发育率 |
|-----|-------------|---------|----------|---------|
| J1 | G1 (n=576) | 82±3.8% | 38±3.6% | 67±1.8% |
| EFC | G0 (n=1108) | 78±2.3% | 37±2.3% | 59±3.3% |

实施例 3 核移植后，滤泡供体细胞同步化在 G0 或 G1 期对核移植后体内发育的影响。

图 1 中的数据表示用处于细胞周期的 G0 或 G1 期滤泡细胞重建的克隆牛胚胎在移植到受体母牛后的整个妊娠期的存活率。图 1 中的数据是从上面的实施例 1 和 2 所阐明的实验产生的胚胎数据汇总而来。这包括从两种滤泡细胞系产生的克隆胚胎，即 J1 和 EFC。并且，包括补充了 Sigma 的牛血清清蛋白或 Life Technologies 的牛血清清蛋白的同

一 AgR SOF 培养基配方中产生克隆胚胎。这些数据汇总进来，因为两种滤泡细胞系或者两种来源的牛血清清蛋白对移植后的生存能力没有影响（虽然对于发育到胚泡期有显著影响）。

图 1 中的数据表示移植到同步化受体母牛的生殖道的用 G0 供体细胞重建的 85 个胚胎和用 G1 早期供体细胞重建的 95 个胚胎。

图 1 图示用常规超声波扫描术、直肠触诊和产犊所定的自胚胎移植的第 7 天到分娩的整个妊娠过程中存在的胚胎/胎儿的百分率。最显著的是，使用 G1 滤泡细胞导致完全分娩的活牛犊的出生。与 G0 供体细胞相比，从妊娠的第 30 天开始一直到完全分娩完成，用 G1 细胞重建的克隆化胚胎的胚胎存活率有下降的趋势，但是，这里报道的移植数量没有达到统计学意义。

对于 G1 滤泡细胞，9%的移植胚胎（9/95）导致完全分娩的小牛的出生。但是，这些小牛中的 4 个在出生时或出生后死了，导致从 G1 细胞产生的活克隆小牛总效率是 5%。相反，G0 供体滤泡细胞导致 20%发育到完全分娩（17/85），由于 3 个牛犊在出生时死亡，最终所产活小牛的总效率是 16%（14/85）。

实施例 4 将雌性成体皮肤成纤维细胞（Age+和 Age-细胞系）同步化于 G0 或 G1 对细胞核移植后、在补充有 Life Technologies 牛血清清蛋白的培养基上培养的体外和体内发育的影响。

数据来自于用两种独立的成体皮肤成纤维细胞的原代细胞系。这两个细胞系定义为“Age+”和“Age-”。它们都是来自挑选地相应或迟或早进入青春期的安格斯肉牛的雌性细胞系。由于这两种相似的细胞系在体内和体外发育上没有显著的不同，所以数据合编于下面的表 3 和图 2 中。

细胞周期的两个阶段在这些实验中进行比较：

(1) G1，在有丝分裂完成后的 1-3 小时内，供体细胞和细胞质融合。

(2) G0，供体细胞在补充 0.5%FCS 的培养基中培养 3-12 天。对于移植到受体母牛的重建胚胎，细胞遭受 4-5 天的血清缺乏。

来自两种细胞系和两种细胞周期处理的细胞是在培养的第 7 代用于细胞核移植。重建胚胎是在补充了 Life Technologies 牛血清清蛋白

(Life Technologies 产品编号 30036-578) 的标准 AgR SOF 培养基中培养的。

表 3 中所列数据表明 G0 细胞在低血清中的时间长度对融合效率的影响，但是，一旦与细胞质融合就不会对随后的体外发育产生影响，所以，G0 细胞质数据予以汇总。G0 和 G1 细胞周期阶段对到胚泡期的发育没有影响。

表 3 用处于 G0 或 G1 的雌性成体皮肤成纤维细胞 (Age+和 Age-细胞系) 重建、在补充有 Life Technologies 牛血清清蛋白的 AgR SOF 培养基上培养的克隆牛胚胎的体外发育。

| 细胞周期的阶段 | 融合率 | 1-2 级胚泡期 | 总发育率 |
|-----------------|-----------------------|----------|---------|
| G0 3-5 天(n=411) | 66±1.9% ^a | | |
| | | 19±3.0% | 58±4.5% |
| 12 天(n=107) | 41±6.9% ^b | | |
| G1 (n=401) | 59±2.5% ^{ab} | 19±5.0% | 67±6.6% |

ab P<0.05

图 2 的数据表明挑选的 G1 成体皮肤成纤维细胞能产生完全分娩的活牛犊。与图 1 的数据相似，存在的完全分娩生存率趋势比 G0 大，但是，就这里进行的移植数量而言没有统计学意义。使用 G1 供体细胞，移植的胚胎最终 4%产生了活牛犊 (1/25)。相比，G0 供体细胞导致最终 14%活胚胎发育到分娩 (3/22)。在本实验中，所有生产的 4 个牛犊经过了出生后发育。

实施例 5 成体皮肤成纤维细胞 (LJ801 和 3XTC 细胞系) 同步化于 G0 或 G1 期对细胞核移植后、在补充了 ICP 牛血清清蛋白的培养基中培养的体内和体外发育的影响

另外用两种独立的成体皮肤成纤维细胞系做了比较 G0 和 G1 细胞周期阶段的实验。这两种细胞系表示为“LJ801”和“3XTC”。LJ801 是来自一个 Limousine X Jersey 公牛的雄性细胞系，而 3XTC 是来自一种三次产生三体牛犊的杂交母牛。

两个细胞周期阶段予以比较：

(1) G0 细胞，两种细胞系的供体细胞是在含有 0.5%FCS 的培养基中培养 4-5 天；和

(2) G1 细胞，有丝分裂完成后的 1-3 小时内，供体细胞与细胞质融合。

负 5-溴脱氧尿苷标记法确认有丝分裂的 3 小时内融合的成体皮肤成纤维细胞没有进入 S 期。

LJ801 和 3XTC 细胞系都是在培养的 3-4 代用于细胞核移植实验的。

由于 LJ801 和 3XTC 细胞之间在发育到胚泡期的效率上没有差别、并且来自两种细胞系的重建胚胎是在补充了牛血清清蛋白的相同标准 AgR SOF 培养基,但是这一次牛血清清蛋白来自 ICP(Immuno-Chemical Products,Auckland,新西兰; 产品编号 ABFF-002)。胚胎移植后,整个妊娠期的胚胎存活率是以相应的细胞系 3XTC 和 LJ801 表示在图 3 和 4 中。

表 4 的数据表明成体皮肤成纤维供体细胞的细胞周期同步化在 G0 或 G1 对发育到胚泡期没有影响。

表 4 用处于细胞周期 G0 或 G1 的成体皮肤成纤维细胞 (LJ801 和 3XTC) 重建并在补充了 ICP 牛血清清蛋白的 AgR SOF 培养基中培养的克隆胚胎的体外发育。

| 细胞周期的阶段 | 融合率 | 1-2 级胚泡期 | 总发育率 |
|------------|---------------|---------------|---------------|
| G0 (n=145) | 72 \pm 7.8% | 36 \pm 6.1% | 61 \pm 5.0% |
| G1 (n=200) | 60 \pm 3.1% | 37 \pm 6.0% | 57 \pm 5.0% |

图 3 中的数据表明用 3XTC 重建的胚胎至少在生存到第 150 天上没有差异。对于处于细胞周期 G1 的供体细胞第 150 天的胚胎存活率是 25% (3/12), 而 G0 的供体细胞是 27% (3/11)。

图 4 中的数据表明用 LJ801 成纤维细胞重建胚胎存在使用 G0 供体细胞的胚胎在妊娠的第 210 天成活趋势更大,但是这不具备统计学意义。对于处于细胞周期 G1 的供体细胞第 210 天的胚胎存活率是 23% (3/13), 而 G0 的供体细胞是 39% (7/18)。

实施例 6 核移植后遗传修饰的牛胎儿成纤维细胞同步化在 G0 或 G1 对体外和体内发育的影响。

用遗传修饰的雌性牛胎儿肺成纤维细胞也进行了研究细胞周期的阶段对细胞核移植后的发育的影响。遗传改变包括牛 β 和 κ 酪蛋白基

因的附加拷贝的随机插入。转基因细胞系表示为“酪蛋白+5110”。

两个细胞周期阶段予以比较：

(3) G0 细胞，两种细胞系的供体细胞是在含有 0.5%FCS 的培养基中培养 3-6 天；和

(4) G1 细胞，有丝分裂完成后的 1-3 小时内，供体细胞与细胞质融合。

重建胚胎是在补充了 ICP 牛血清清蛋白（Immuno-Chemical Products,Auckland,新西兰；产品编号 ABFF-002）的标准 AgR SOF 培养基中培养的。

胚胎体外发育的数据见表 5。当用于细胞核移植的酪蛋白+5110 供体细胞是 G1 期时，相比 G0 期，发育到胚泡期显著降低了。这一结果与上面所述的以前的实施例中其他细胞系形成了对照。

表 5 用处于细胞周期 G0 或 G1 阶段的转基因雌性胎儿肺成纤维细胞（酪蛋白+5110 细胞系）重建并在补充了 ICP 牛血清清蛋白的 AgR SOF 培养基中培养的克隆化牛胚胎的体外发育。

| 细胞周期的阶段 | 融合率 | 1-2 级胚泡期 | 总发育率 |
|------------|---------|----------------------|----------------------|
| G0 (n=150) | 90±8.1% | 52±1.8% ^a | 72±2.9% ^c |
| G1 (n=73) | 77±6.5% | 26±5.1% ^b | 43±2.2% ^d |

ab P<0.05;cd P<0.01

图 5 所示的胚胎存活数据表明对酪蛋白+5110 细胞系而言，细胞周期的阶段对发育到第 90 天至少没有影响。对于处于细胞周期 G1 的供体细胞第 90 天的胚胎存活率是 38% (9/24)，而 G0 的供体细胞是 27% (6/22)。

实施例 7 不增殖的、衰老供体细胞（在 G1 后期）对核移植后的体外和体内发育的影响

做了研究不增殖的、衰老的牛供体细胞对发育影响的核移植实验。本实验中用到的细胞是雌性胎儿肺成纤维细胞并且经过了遗传修饰（标记为 561 细胞）。起初，细胞在活跃生长，但是，在培养过程中，生长日益变慢，到了后期，细胞进入非增殖期，即本技术领域技术人员所知的衰老期，此时细胞分裂停止。衰老细胞是抑制在细胞周期的 G1，具体地是在 G1/S 期的分界点（Sherwood 等，1988）。当细胞进入

衰老期，响应于生理性的有丝分裂原，它们阻滞在 G1 晚期，不能进入 S 期。所以，衰老期不同于静止期，在后一种情况下，细胞可以诱导再次进入细胞周期，一旦回到合适条件就能增殖（例如在血清缺乏的细胞培养物中加入血清）。

转基因衰老细胞重建的胚胎是在补充了 ICP 牛血清清蛋白的 AgR SOF 培养基中培养的。

体外胚胎发育的数据见表 6。使用衰老供体细胞发育到胚泡期的比率低于前面实施例阐明的对 G0 或 G1 早期的期望值。

表 5 用不增殖的、衰老的转基因成纤维细胞（561 细胞）重建、在补充了 ICP 牛血清清蛋白的 AgR SOF 培养基中培养的克隆牛胚胎的体外发育。

| 细胞系 | 细胞周期的阶段 | 融合率 | 1-2 级胚泡期 | 总发育率 |
|-----|-------------|-----|----------|------|
| 561 | 衰老的 (n=158) | 88% | 12% | 35% |

图 6 所示胚胎存活率的数据提示抑制在 G1 晚期的不增殖衰老细胞的克隆效率低，只有 4% 的胚胎发育到第 90 天（1/26）。

结论

1. 挑选细胞周期的一定阶段的单个细胞，优选 G1 早期，是可能的。这相对于以前使用所谓增殖细胞的技术具有优势，在以前的技术中，使用于核移植的单个细胞的实际细胞周期的阶段并不精确知晓。
2. 由于细胞核移植后产生了活的牛犊，所以有丝分裂后处于细胞周期的 G1 早期的细胞是全能的。
3. 所以，G0 不是与核移植后的发育相容的细胞周期的唯一一个阶段，用分化的培养细胞和 G1 细胞，优选地 G1 早期细胞，细胞核也能够被功能性地重编。
4. 有丝分裂后的 G1 早期细胞在核移植后如同 G0 细胞一样促进向胚泡期发育到相似水平。
5. 用 G0 或 G1 早期供体细胞核重建的克隆化胚胎在移植后的存活率上没有显著差别。

工业应用

本发明可能在建立动物的克隆化畜群/牧群上有用，包括能产生药

学上有用的蛋白、农业上有用产品例如肉、奶和纤维的转基因动物和人体应用，特别是在克隆性治疗领域。

应该理解本描述本意不是将本发明的范围限制到上述实施例中，对于本领域技术人员来说显而易见的许多变化是可能的，而不偏离所附权利要求书的范围。

参考文献

Barnes F L; Collas P; Powell R; King W A; Westhusin M 和 Shepherd D (1993).在核移植牛胚胎中,受体卵母细胞所处细胞周期的阶段对 DNA 合成、核摸解体、染色体重组和发育的影响.分子生殖和发育学 (Molecular Reproduction and Development) 36:33-41.

Boquest A C; Day B N 和 Prather R S (1999). 流式细胞计分析培养的猪胎成纤维细胞的细胞周期.生殖生物学 (Biology of reproduction) 60:1013-1019.

Campell K H S; Loi P; Cappai P 和 Wilmut I (1994).用推测处于 S 期的去核激活卵母细胞重建的绵羊核移植胚胎发育到胚泡期的改良.生殖生物学 (Biology of reproduction) 50:1385-1393.

Campell K; Mc Whir J; Ritchie B 和 Wilmut I (1995).培养的胚胎盘细胞核移植后产生活羊羔.动物生殖学(Theriogenology) 43:181.

Campell K H S; Loi P; Otaegui P J 和 Wilmut I (1996a).使用核移植的胚胎克隆中细胞周期的协调.生殖评论 (Reviews of Reproduction)1:40-46.

Campell K; Mc Whire J; Ritchie W A 和 Wilmut I (1996b).从培养细胞系进行核移植克隆的绵羊.自然 380:64-66.

Cibelli J B; Stice S L; Golueke P J; Kane J J; Jerry J; Blackwell C; Ponce De Leon F A 和 Robl J M(1998). 从非静止胎儿成纤维细胞产生克隆化的转基因牛犊.科学 280:1256-1258.

Collas P; Balise J J 和 Robl J M(1992a).供体细胞核的细胞周期阶段对核移植兔子胚胎的发育影响.生殖生物学 (Biology of reproduction) 46:492-500.

Collas P; Pinto-Correia C; Ponce De Leon F A 和 Robl J M(1992b).供体细胞周期阶段对核移植兔子胚胎的染色质和纺锤体形态学的影响.生殖生物学 (Biology of reproduction) 46:501-511.

Czolowska R; Modlinski J A 和 Tarkowski A K (1984).胸腺淋巴细胞核在未激活或激活的小鼠卵母细胞中的行为.细胞科学杂志(Journal of Cell Science)69:19-34.

Gadbois D M, Crissman H A, Tobey R A 和 Brodbury E M(1992).非

转化哺乳动物细胞的 G1 期多个激酶抑制位点在转化细胞中缺省.美国科学院院报(Proceedings of the National Academy of Sciences, USA) 89:8626-8630.

Gardner D K; Lane M; Spitzer A 和 Batt P (1994).缺乏血清和体细胞提高了绵羊受精卵卵裂和体外培养到胚泡期的发育比例:氨基酸、维生素和培养中的胚胎刺激了发育. 生殖生物学 (Biology of reproduction) 50:390-400.

Pedersen R A (1999).医用胚胎干细胞.科学美国人(Scientific American) 四月, 1999:44-49.

Perry ACF, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y 和 Yanagimachi R (1999).用细胞质内精子注射法进行哺乳动物基因转移.科学 284:1180-1183.

Schnieke A E; Kind A J; Ritchie W A; Mycock K; Scott A R; Ritchie M; Wilmut I; Colman A 和 Campbell KHS(1997).从转染的胎儿成纤维细胞移植细胞核产生含有人IX因子的转基因绵羊.科学 278:2130-2133.

Sherwood S W, Rush D, Ellsworth J L 和 Schimke R T (1988).在 IMR-90 细胞中确定细胞衰老:一种流式细胞分析法.美国科学院院报(Proceedings of the National Academy of Sciences, USA) 85:9086-9090.

Stice S L; Strelchenko N S; Keefer C L 和 Matthews L (1996).多潜能牛胚胎细胞系指导核移植后的胚胎发育. 生殖生物学 (Biology of reproduction) 54:100-110.

Susko-Parrish J L; Leibfried-Rutledge M L; Northey D L; Schutzkus V 和 First N L(1994).诱导的瞬间钙现象对蛋白激酶的抑制引起没有完成减数分裂的牛卵原细胞向胚胎周期的转变.发育生物学 (Developmental Biology)166:729-739.

Tada M, Tada T, Lefebvre L, Barton S C 和 Surani M A(1997).杂合体细胞中, 胚胎生殖细胞诱导体细胞核的后生重编.欧洲分子生物学杂志(The EMBO Journal)16:6510-6520.

Thompson J G E; Simpson A C; Pugh P A; Donnelly P E 和 Tervit H R (1990).氧浓度对植入前绵羊和牛胚胎的体外发育的影响.生殖和受精杂志(Journal of Reproduction and fertility) 89:573-578.

Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel

JJ, Marshall VS 和 Jones JM (1998).从人胚泡中获得的胚胎干细胞系. 科学 282:1145-1147.

Vignon X; Chesne P; Le Bourhis D; Flechon J E; Heyman Y 和 Renard J P (1998).用去核成熟的卵母细胞与培养的体细胞融合重建的牛胚胎的发育潜能.C R Academy of Science,Paris 321:735-745.

Vignon X; Le Bourhis D; Chesne P; Marchal J; Heyman Y 和 Renard J P (1999).用静止和增殖的皮肤成纤维细胞重组的牛核移植胚胎的发育. 动物生殖学(Theriogenology) 51:216.

Wakayama T 和 Yanagimachi R (1999).从成体尾尖细胞克隆成体雄性小鼠. 自然遗传学(Nature Genetics) 22:127-128.

Wall RJ, Kerr DE 和 Bondioli KR (1997).转基因奶牛: 大规模遗传工程.乳牛科学杂志(Journal of Dairy Science) 80:2213-2224.

Wells D N; Misica P M; McMillan W H 和 Tervit H R (1998). 用来自胎儿成纤维细胞系的细胞进行核移植后产生克隆化的牛胎儿. 动物生殖学(Theriogenology)49:330.

Wells D N; Misica P M; Tervit H R 和 Vivanco W H(1999). 成体体细胞核移植用于保存最后一头恩德比地种母牛. 生殖、受精和发育 (Reproduction, Fertility and Development) 10:369-378.

Wilmot I, Schnieke A E; McWhir J; Kind A J 和 Campbell K H S (1997).从哺乳动物胎儿和成体细胞获得活的后代.自然 385:810-813.

Zakhartchenko V; Durchova-Hills G; Stojkovic M; Schenthaner W; Prella K; Steinborn R; Muller M; Brem G 和 Wolf E (1999).血清饥饿和再次克隆对牛胎儿成纤维细胞的核移植效率的影响.生殖和受精杂志 (Journal of Reproduction and Fertility)115:325-331.

所有参考资料是全面的引述于此进行参考。

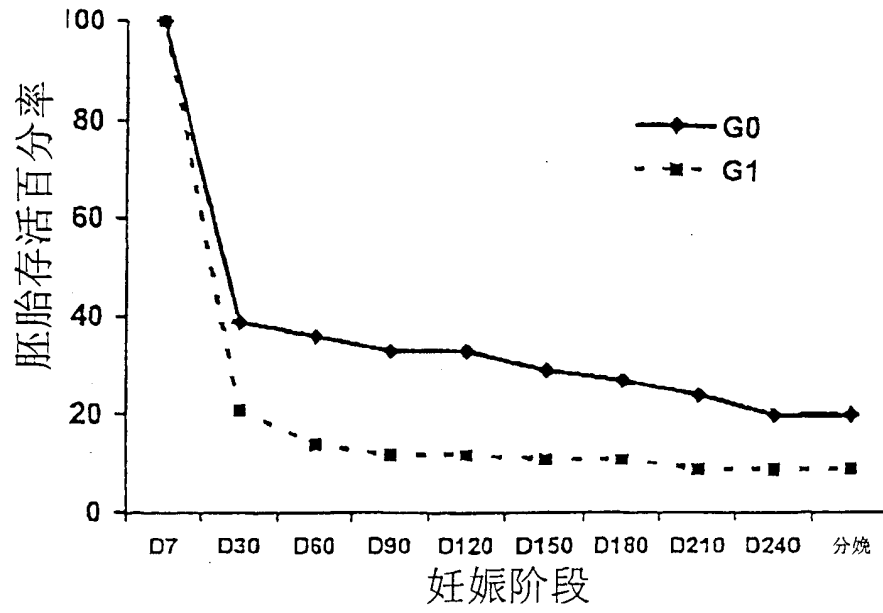


图 1

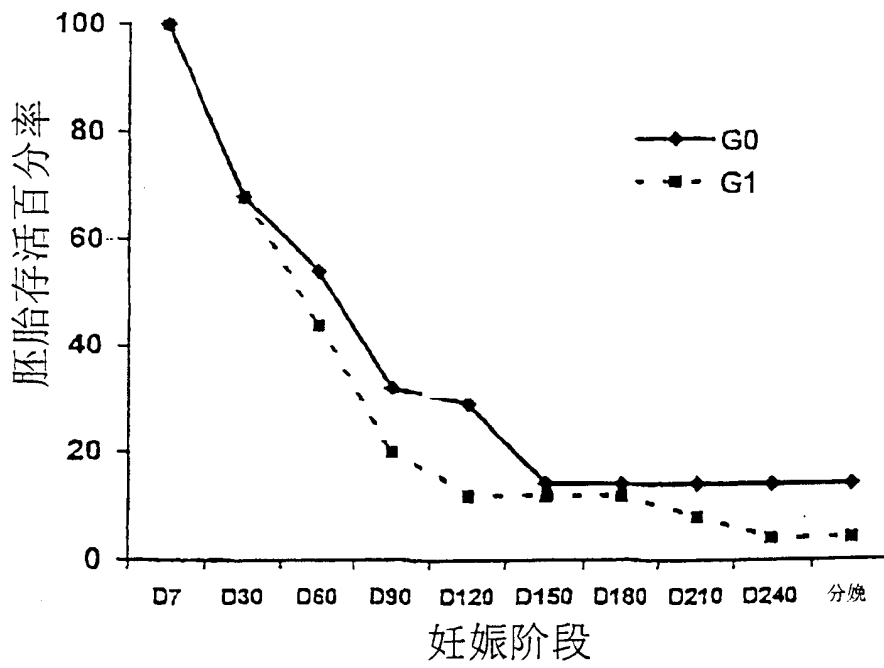


图 2

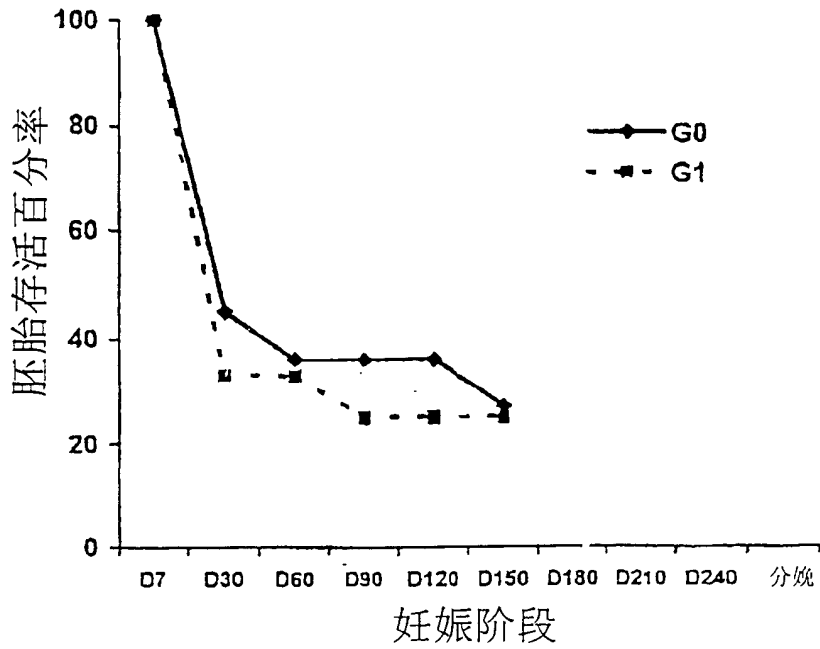


图 3

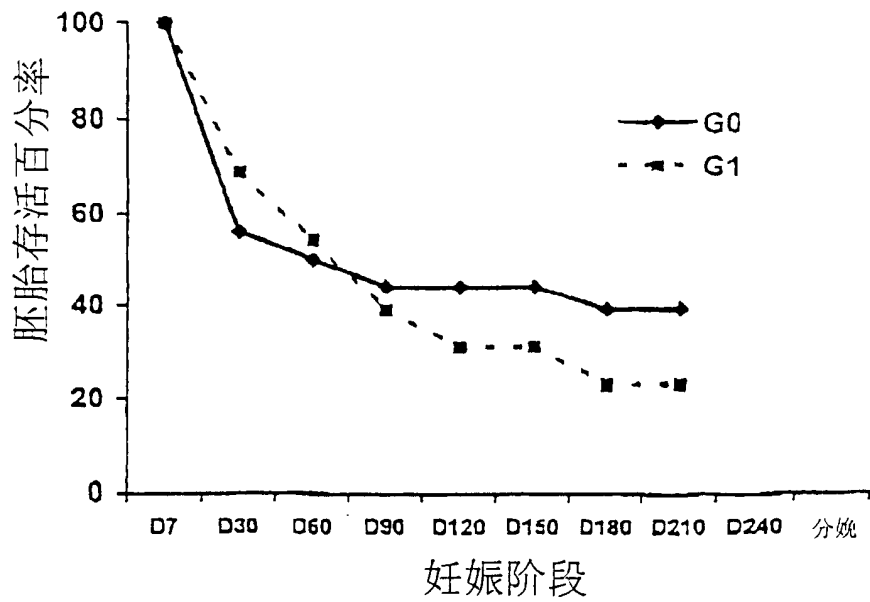


图 4

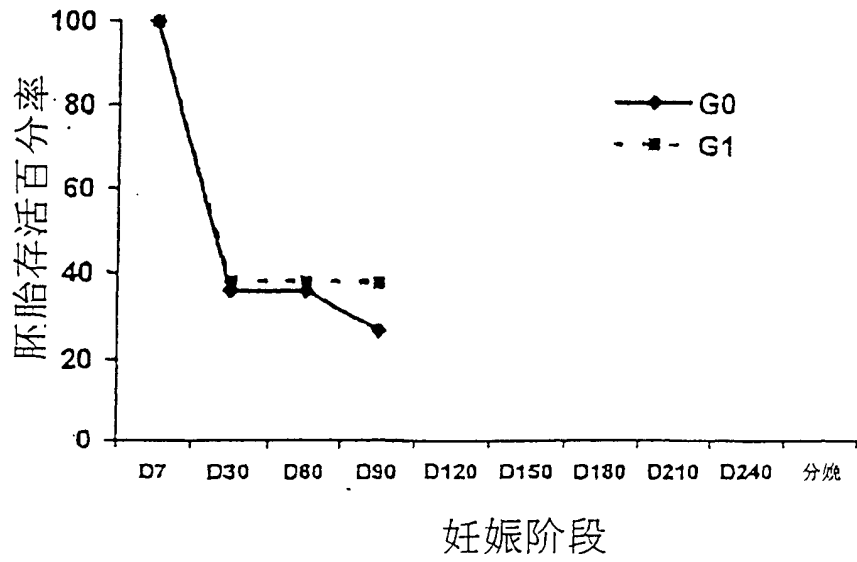


图 5

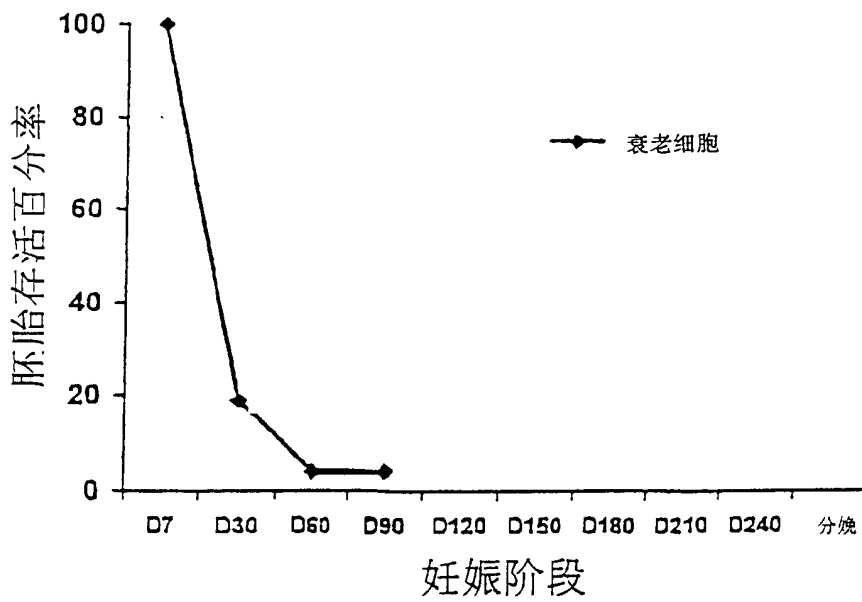


图 6