



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106591374 B

(45)授权公告日 2019.08.09

(21)申请号 201611270683.8

(22)申请日 2016.12.30

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106591374 A

(43)申请公布日 2017.04.26

(73)专利权人 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号
中国农业科学院北京畜牧兽医研究所

(72)发明人 李奎 刘志国 牟玉莲 郑新民
毕延震

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 何叶喧

(51)Int.Cl.

C12N 15/877(2010.01)

C12N 5/071(2010.01)

(56)对比文件

WO 2016044271 A2,2016.03.24,

CN 105543230 A,2016.05.04,

CN 103550222 A,2014.02.05,

审查员 张娟

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种提高猪体细胞核移植胚胎发育效率的方法

(57)摘要

本发明公开了一种提高猪体细胞核移植胚胎发育效率的方法。本发明提供了毛壳素的应用,为如下(a1)-(a5)中的至少一种:(a1)制备用于动物体细胞核移植的供核细胞培养液;(a2)制备用于动物体细胞核移植的重构胚胎培养液;(a3)培养用于动物体细胞核移植的供核细胞;(a4)培养用于动物体细胞核移植的重构胚胎;(a5)促进动物体细胞核移植中的重构胚形成囊胚。本发明通过利用小分子药物毛壳素对体细胞核移植中的供核细胞或者重构胚胎进行处理,促进体细胞核移植重编程的发生,显著提高克隆胚胎的囊胚发育率和囊胚细胞数,最终提高猪体细胞核移植技术的整体效率。本发明对提高猪体细胞核移植技术的整体效率有重要意义。

1. 一种动物体细胞核移植的方法,包括如下步骤:用供核细胞培养液培养供核细胞;所述供核细胞培养液中含有10nM毛壳素;所述供核细胞培养液包括毛壳素和基础细胞培养液;所述基础细胞培养液为DMEM培养液;

所述供核细胞为猪胎儿成纤维细胞;

所述方法为非疾病治疗方法。

2. 一种动物体细胞核移植的方法,其特征在于:所述方法包括两个阶段的培养;第一阶段,用重构胚胎培养液培养重构胚胎;第二阶段,在不含有毛壳素的培养液中培养重构胚胎;所述重构胚胎培养液中含有0.5nM毛壳素;

所述第一阶段为16h;

所述重构胚胎的制备方法为:将一个供核细胞注入至去核后的卵母细胞的卵周隙中,电击融合并激活重构胚胎;

所述电击融合的条件为:150v/mm、100 μ s、2DC的直流电脉冲;

所述“去核后的卵母细胞”的制备方法为:采用盲吸法去除猪成熟卵母细胞第一极体和细胞核;

所述猪成熟卵母细胞的制备方法包括如下步骤:(c1)-(c3):

(c1) 取离体猪卵巢,抽取卵泡中的卵泡液,从中挑选出包裹有3-5层卵丘细胞的卵丘卵母细胞复合体(COCs);

(c2) 将步骤(c1)得到的卵丘卵母细胞复合体(COCs)转移到IVM液中,在39°C、饱和湿度、5% CO₂培养箱中培养42h;

(c3) 完成步骤(c2)后,用0.1%透明质酸酶消化后去除卵丘细胞,挑选具有第一极体且胞质均匀致密的成熟卵母细胞;

所述IVM液由溶剂和溶质组成,所述溶质及其在IVM液中的浓度为:199培养基0.987g/100mL、卵泡液10mL/100mL、表皮生长因子1 μ g/100mL、促卵泡激素50mg/100mL、促黄体激素50mg/100mL、半胱氨酸7 μ g/100mL;所述溶剂为纯水;

所述重构胚胎培养液包括毛壳素和基础胚胎培养液;所述基础胚胎培养液为PZM-3培养液;

所述方法为非疾病治疗方法。

一种提高猪体细胞核移植胚胎发育效率的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及胚胎发育以及动物生物技术领域,具体涉及一种提高猪体细胞核移植胚胎发育效率的方法。

背景技术

[0002] 体细胞核移植技术诞生于1997年,最先在绵羊中获得成功。其主要方法是通过显微操作和细胞融合技术,将已经分化完全的供核细胞移入去核的卵母细胞中构成重构胚,激活重构胚后进行培养和移植,最后获得完整个体。因为获得的个体与供核细胞的基因型完全一致,所以该技术也称为体细胞克隆技术。因其独特的技术优势,体细胞克隆技术在动物育种、疾病模型构建、濒危动物保护、治疗性克隆以及药用蛋白生产等方面具有巨大的应用价值。自1997年第一只克隆羊“多莉”出生以来,体细胞克隆技术相继在猪、牛、狗、兔、猫等多种哺乳动物中获得成功。尽管经过二十年的发展,克隆技术已经相对成熟,有一套包括卵母细胞采集、培养、供核细胞分离、培养、卵的激活、胚胎体外培养和胚胎移植等整体技术,但是到目前为止,猪体细胞克隆的整体效率还很低,大约在1%左右。另外克隆猪常出现不健全的发育异常表现,如大舌头、肺部发育不全等。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种提高猪体细胞核移植胚胎发育效率的方法。

[0004] 本发明提供了毛壳素的应用,为如下(a1)-(a5)中的至少一种:

[0005] (a1) 制备用于动物体细胞核移植的供核细胞培养液;

[0006] (a2) 制备用于动物体细胞核移植的重构胚胎培养液;

[0007] (a3) 培养用于动物体细胞核移植的供核细胞;

[0008] (a4) 培养用于动物体细胞核移植的重构胚胎;

[0009] (a5) 促进动物体细胞核移植中的重构胚形成囊胚。

[0010] 本发明还保护一种用于动物体细胞核移植的供核细胞培养液,其中含有10nM毛壳素。

[0011] 所述供核细胞培养液包括毛壳素和基础细胞培养液。

[0012] 所述基础细胞培养液具体可为DMEM培养液。

[0013] 所述供核细胞培养液还包括15% (体积百分比) 胎牛血清。

[0014] 所述供核细胞培养液还包括100U/mL氨苄青霉素和100U/mL硫酸链霉素。

[0015] 本发明还保护一种用于动物体细胞核移植的重构胚胎培养液,其中含有0.5nM毛壳素。

[0016] 所述重构胚胎培养液包括毛壳素和基础胚胎培养液。

[0017] 所述基础胚胎培养液具体可为PZM-3培养液。

[0018] 本发明还保护一种动物体细胞核移植的方法,包括如下步骤:用以上任一所述的供核细胞培养液培养供核细胞。

- [0019] 所述培养时间具体可为24h。
- [0020] 所述方法还包括取培养结束的供核细胞用于制备重构胚胎。
- [0021] 所述重构胚胎的制备方法具体可为：将一个经过所述方法培养得到的供核细胞注入至去核后的卵母细胞的卵周隙中，电击融合并激活重构胚胎。
- [0022] 本发明还保护一种动物体细胞核移植的方法，包括如下步骤：用以上任一所述的重构胚胎培养液培养重构胚胎。
- [0023] 所述方法包括两个阶段的培养；第一阶段，用以上任一所述的重构胚胎培养液培养重构胚胎；第二阶段，在不含有毛壳素的培养液中培养重构胚胎。
- [0024] 所述不含有不含有毛壳素的培养液具体可为以上任一所述基础胚胎培养液。
- [0025] 所述第一阶段为14-16h，具体为16h。
- [0026] 所述重构胚胎的制备方法具体可为：将一个供核细胞注入至去核后的卵母细胞的卵周隙中，电击融合并激活重构胚胎。
- [0027] 以上任一所述电击融合的条件具体可为：150v/mm、100 μ s、2DC的直流电脉冲。
- [0028] 以上任一所述“去核后的卵母细胞”的制备方法具体可为：采用盲吸法去除动物成熟卵母细胞第一极体和细胞核。
- [0029] 以上任一所述供体细胞具体可为动物胎儿成纤维细胞。
- [0030] 所述动物胎儿成纤维细胞的制备方法具体可包括如下步骤 (b1) 和步骤 (b2)：
- [0031] (b1) 取离体胎儿，剪去除头、四肢和内脏，将剩余部分剪碎并转移到培养皿中，在37 $^{\circ}$ C、饱和湿度、5%CO₂的培养箱中培养4-6小时；
- [0032] (b2) 完成步骤 (b1) 后，向所述培养皿中加入含有15% (体积百分含量) 胎牛血清的DMEM培养液进行培养并传代，取传代至第3-5代 (具体可为第3代) 的接触抑制的胎儿成纤维细胞。
- [0033] 以上任一所述动物成熟卵母细胞的制备方法具体可包括如下步骤：(c1)-(c3)：
- [0034] (c1) 取离体动物卵巢，抽取卵泡中的卵泡液，从中挑选出包裹有3-5层卵丘细胞的卵丘卵母细胞复合体(COCs)；
- [0035] (c2) 将步骤 (c1) 得到的卵丘卵母细胞复合体(COCs) 转移到IVM液中，在39 $^{\circ}$ C、饱和湿度、5%CO₂培养箱中培养42h。
- [0036] (c3) 完成步骤 (c2) 后，用0.1%透明质酸酶消化后去除卵丘细胞，挑选具有第一极体且胞质均匀致密的成熟卵母细胞。
- [0037] 所述IVM液由溶剂和溶质组成，所述溶质及IVM液中的浓度为：所述溶质及其在IVM液中的浓度为：199培养基0.987g/100mL、卵泡液10mL/100mL、表皮生长因子1 μ g/100mL、促卵泡激素50mg/100mL、促黄体激素50mg/100mL、半胱氨酸7 μ g/100mL；所述溶剂为纯水。
- [0038] 以上任一所述动物具体可为哺乳动物，更具体可为猪。
- [0039] 毛壳素(chametocin) 是分离自毛壳属(Chaetomium) 真菌的一种天然代谢产物，对肿瘤细胞的生长具有一定的抑制作用，因此被作为一种潜在的肿瘤治疗药物。毛壳素在体细胞重编程领域一直没有应用，目前未有毛壳素用于促进胚胎发育方面的报道。
- [0040] 本发明通过利用小分子药物毛壳素对体细胞核移植中的供核细胞或者重构胚胎进行处理，从而促进体细胞核移植重编程的发生，进而能显著提高克隆胚胎的囊胚发育率和囊胚细胞数，最终提高猪体细胞核移植技术的整体效率。本发明对提高猪体细胞核移植

技术的整体效率有重要意义。

附图说明

[0041] 图1为毛壳素对猪胎儿成纤维细胞的活性影响。

具体实施方式

[0042] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。

[0043] 199培养基:Gibco,货号:31100-035。

[0044] 表皮生长因子:Promega,货号:G5021。

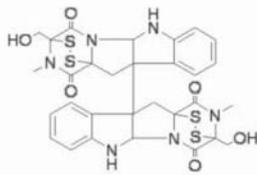
[0045] 促卵泡激素:Sigma,货号:F8174。

[0046] 促黄体激素:Sigma,货号:L5269。

[0047] IVM液(体外成熟培养液)由溶剂和溶质组成,所述溶质及其在IVM液中的浓度为:199培养基0.987g/100mL、卵泡液10mL/100mL、表皮生长因子1 μ g/100mL、促卵泡激素50mg/100mL、促黄体激素50mg/100mL、半胱氨酸7 μ g/100mL;所述溶剂为纯水。

[0048] 毛壳素:Sigma,货号:C9492;毛壳素的分子式为 $C_{30}H_{28}N_6O_6S_4$,CAS号:28097-03-2,结构式如下:

[0049]



[0050] DPBS缓冲液:Sigma,货号:D5652。

[0051] 实施例1、猪卵母细胞的体外成熟培养

[0052] 从屠宰场取猪卵巢,用含有100U/mL青霉素和100U/mL链霉素的生理盐水冲洗三遍,然后用10mL规格的一次性注射器和18号针头抽取直径为3-6mm的卵泡中的卵泡液,从中挑选出包裹有3-5层卵丘细胞的卵丘卵母细胞复合体(COCs)。COCs用含有100U/mL青霉素和100U/mL链霉素的生理盐水冲洗两遍,然后转移到IVM液中,在39 $^{\circ}$ C、饱和湿度、5%CO₂培养箱中培养42h。

[0053] 实施例2、猪胎儿成纤维细胞的分离和培养

[0054] 依次按照如下步骤制备猪胎儿成纤维细胞:

[0055] 1、从妊娠35天的怀孕母猪的子宫中取出胎儿,用含有100U/mL青霉素和100U/mL链霉素的DPBS缓冲液冲洗。

[0056] 2、取步骤1得到的胎儿,在超净工作台中用眼科剪去除头、四肢和内脏,将剩余部分用DPBS缓冲液冲洗后用灭菌的眼科剪剪碎并转移到100mm培养皿中,在37 $^{\circ}$ C、饱和湿度、5%CO₂的培养箱中培养4-6小时。

[0057] 3、完成步骤2后,向所述培养皿中加入含有15%(体积百分含量)胎牛血清的DMEM培养液,在37 $^{\circ}$ C、饱和湿度、5%CO₂的培养箱中培养至细胞汇合度为90%时传代培养。传代

培养采用的培养液为含有15% (体积百分含量) 胎牛血清的DMEM培养液。

[0058] 4、用传代至第3代的猪胎儿成纤维细胞进行后续实验。

[0059] 实施例3、毛壳素对猪胎儿成纤维细胞的影响

[0060] 1、将实施例2制备的对数生长期的猪胎儿成纤维细胞接种至96孔板 (每孔 5×10^4 个细胞), 采用含有15% (体积百分含量) 胎牛血清的DMEM培养液37℃静置培养直至细胞贴壁。

[0061] 2、完成步骤2后, 取所述96孔板, 进行如下分组处理:

[0062] 药物组1: 吸弃培养上清, 加入含20nM毛壳素的DMEM培养液 (15% 胎牛血清+100U/mL氨苄青霉素+100U/mL硫酸链霉素), 37℃静置24小时;

[0063] 药物组2: 吸弃培养上清, 加入含40nM毛壳素的DMEM培养液 (15% 胎牛血清+100U/mL氨苄青霉素+100U/mL硫酸链霉素), 37℃静置24小时;

[0064] 药物组3: 吸弃培养上清, 加入含50nM毛壳素的DMEM培养液 (15% 胎牛血清+100U/mL氨苄青霉素+100U/mL硫酸链霉素), 37℃静置24小时;

[0065] 药物组4: 吸弃培养上清, 加入含100nM毛壳素的DMEM培养液 (15% 胎牛血清+100U/mL氨苄青霉素+100U/mL硫酸链霉素), 37℃静置24小时;

[0066] 对照组: 吸弃培养上清, 加入DMEM培养液 (15% 胎牛血清+0.1% 双抗)。

[0067] 分别在处理后第12h和第24h时检测细胞活性。

[0068] 结果如图1所示。结果表明, 高于40nM浓度的毛壳素对猪胎儿成纤维细胞的毒性较大。40nM的毛壳素处理猪胎儿成纤维细胞24h后, 细胞活性仅剩余50%左右。

[0069] 实施例4、猪体细胞核移植

[0070] 一、毛壳素处理猪胎儿成纤维细胞

[0071] 1、将实施例2得到的猪胎儿成纤维细胞接种至6孔培养皿中 (每皿 1×10^6 个细胞), 采用含有15% (体积百分含量) 胎牛血清的DMEM培养液37℃静置培养直至细胞长至90%汇合度。

[0072] 2、完成步骤2后, 取所述培养皿, 进行如下分组处理:

[0073] 对照组: 吸弃培养上清, 加入含0nM毛壳素的DMEM培养液 (15% 胎牛血清+100U/mL氨苄青霉素+100U/mL硫酸链霉素), 37℃静置24小时;

[0074] 药物组1: 吸弃培养上清, 加入含10nM毛壳素的DMEM培养液 (15% 胎牛血清+100U/mL氨苄青霉素+100U/mL硫酸链霉素), 37℃静置24小时;

[0075] 药物组2: 吸弃培养上清, 加入含20nM毛壳素的DMEM培养液 (15% 胎牛血清+100U/mL氨苄青霉素+100U/mL硫酸链霉素), 37℃静置24小时;

[0076] 药物组3: 吸弃培养上清, 加入含40nM毛壳素的DMEM培养液 (15% 胎牛血清+100U/mL氨苄青霉素+100U/mL硫酸链霉素), 37℃静置24小时。

[0077] 3、取实施例1得到的COCs, 用0.1%透明质酸酶消化后去除卵丘细胞, 然后在IVM液中清洗三遍, 挑选具有第一极体且胞质均匀致密的成熟卵母细胞。

[0078] 4、取步骤3得到的“具有第一极体且胞质均匀致密的成熟卵母细胞”, 去除第一极体及其周围的细胞质, 然后注入一个供核细胞 (供核细胞即步骤2通过分组处理培养得到的猪胎儿成纤维细胞), 并使其位于卵周隙中。

[0079] 5、完成步骤4后, 将注入供核细胞的卵母细胞移到融合槽中, 采用150v/mm、100μs、

2DC的直流电脉冲电击融合并激活重构胚胎。

[0080] 6、将步骤3得到的重构胚胎放入PZM-3培养液中培养7天(培养条件为:39℃、饱和湿度、5%CO₂)。

[0081] 7、在培养的第48小时观察记录卵裂数,第7天时观察记录卵裂数囊胚数。结果如表1所示。

[0082] 表1不同组别卵裂数和囊胚数统计结果

[0083]

分组	重复数	重构胚胎总数	48h 分裂数	48h 分裂率 (%)	7d 囊胚数	7d 囊胚率 (%)
对照组	3	201	124	65.32±14.37	29	14.39±0.74 ^a
毛壳素 (10 nM)	3	161	113	72.19±12.32	38	24.50±2.70 ^b
毛壳素 (20 nM)	3	178	149	81.99±7.55	20	11.39±1.08 ^a
毛壳素 (40nM)	3	210	141	72.00±8.87	13	6.11±1.61 ^c

[0084] 注:统计分析3次重复试验数据,计算其平均值±标准误。所有百分率数据经过反正弦转换后进行t-检验,同一列中的不同小写字母上标代表差异显著(P<0.05)。

[0085] 结果表明,采用10nM毛壳素处理猪胎儿成纤维细胞(供核细胞),第7天时囊胚率显著高于对照组和其它药物组。

[0086] 二、毛壳素处理重构胚胎

[0087] 1、取实施例1培养的COCs,用0.1%透明质酸酶消化后去除卵丘细胞,然后在IVM液中清洗三遍,挑选具有第一极体且胞质均匀致密的成熟卵母细胞。

[0088] 2、取步骤1得到的“具有第一极体且胞质均匀致密的成熟卵母细胞”,去除第一极体及其周围的细胞质,然后注入一个供核细胞(供核细胞即实施例2得到的胎儿成纤维细胞),并使其位于卵周隙中。

[0089] 3、完成步骤2后,将注入供核细胞的卵母细胞移到融合槽中,采用150v/mm、100μs、2DC的直流电脉冲电击融合并激活重构胚胎。

[0090] 4、将步骤3得到的重构胚胎按照进行如下分组培养(培养条件为:39℃、饱和湿度、5%CO₂):

[0091] 对照组:将重构胚胎放入PZM-3培养液中培养7天。

[0092] 实验组A:将重构胚胎放入含有0.5nM毛壳素的PZM-3培养液中培养16h,之后转移至PZM-3培养液中培养7天。

[0093] 实验组B:将重构胚胎放入含有1.0nM毛壳素的PZM-3培养液中培养16h,之后转移至PZM-3培养液中培养7天。

[0094] 3、在培养的第48小时观察记录卵裂数,第7天时观察记录卵裂数囊胚数。结果如表2所示。

[0095] 表2不同组别卵裂数和囊胚数统计结果

[0096]

分组	重复数	重构胚胎总数	48h 分裂数	48h 分裂率 (%)	7d 囊胚数	7d 囊胚率 (%)
对照组	4	456	202	40.47±7.19	63	13.29±1.05 ^a
毛壳素 (0.5 nM)	4	458	195	42.34±5.12	77	16.75±0.97 ^b
毛壳素 (1.0 nM)	4	475	176	39.25±8.23	50	10.30±2.01 ^a

[0097] 注:统计分析4次重复试验数据,计算其平均值±标准误。所有百分率数据经过反正弦转换后进行t-检验,同一列中的不同小写字母上标代表差异显著 ($P < 0.05$)。

[0098] 结果表明,采用0.5nM毛壳素处理处理重构胚胎,第7天时囊胚率显著高于对照组和1.0nM毛壳素组。

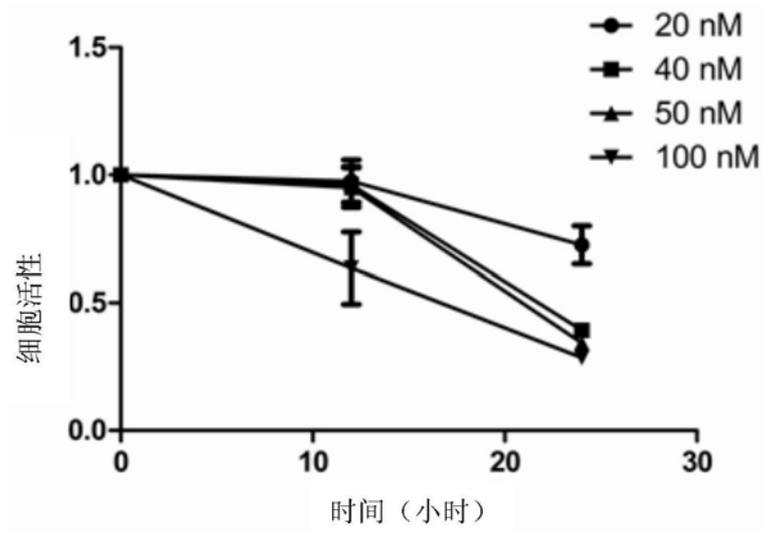


图1