

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 49/00

C12N 5/00

C12N 15/00



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 98807956.9

[45] 授权公告日 2005 年 7 月 13 日

[11] 授权公告号 CN 1210066C

[22] 申请日 1998.7.1 [21] 申请号 98807956.9

[30] 优先权

[32] 1997. 7. 3 [33] US [31] 08/888,057

[86] 国际申请 PCT/US1998/012806 1998.7.1

[87] 国际公布 WO1999/001164 英 1999.1.14

[85] 进入国家阶段日期 2000.2.3

[71] 专利权人 马萨诸塞大学,马萨诸塞州高等教育
公立研究所

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 S·L·斯迪司 J·M·罗伯尔

J·斯比里 P·格路克

审查员 刘菊芳

[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 李 瑛

权利要求书 4 页 说明书 27 页

[54] 发明名称 用来自分化细胞的供体核克隆猪的
方法

[57] 摘要

本发明提供包括将作为供体的分化的猪细胞的核移植入去核的卵母细胞的核转移的改进方法。获得的核转移单位通过产生胎儿和子代在增加基因型和转基因基因型方面是有用的。通过本方法有利于遗传工程或转基因猪的胚、胎儿和子代的产生,因为供体核的分化细胞来源能进行遗传修饰并能克隆繁殖。

ISSN 1008-4274

1. 一种克隆猪的方法，包括：
 - (i) 在适于核转移单位形成的条件下，将所需的增殖分化猪细胞或细胞核插入去核的猪卵细胞中；
 - (ii) 活化获得的核转移单位；及
 - (iii) 将所说的克隆的核转移单位转移到猪中从而使核转移单位发育成胎儿。
2. 根据权利要求1所述的方法，其中所说的增殖分化细胞是生殖细胞或体细胞。
3. 根据权利要求2所述的方法，其中所说的增殖分化细胞已在体外得到扩充。
4. 根据权利要求1所述的方法，其中所说的增殖分化细胞来自外胚层、内胚层或中胚层。
5. 根据权利要求1所述的方法，其中所说的分化细胞选自上皮细胞、神经细胞、表皮细胞、角化细胞、造血细胞、黑色素细胞、软骨细胞、B和T淋巴细胞、红细胞、巨噬细胞、单核细胞、单核的细胞、成纤维细胞、心肌细胞和其它肌肉细胞。
6. 根据权利要求1所述的方法，其中所说的增殖分化细胞从选自下列器官的器官中获得：皮肤、肺、胰脏、肝脏、胃、肠、心脏、生殖器官、膀胱、肾脏、尿道和其它泌尿器官。
7. 根据权利要求1所述的方法，其中进一步包括使胎儿发育成子代。
8. 根据权利要求1所述的方法，其中在所说的分化的猪细胞或细胞核中插入、去除或修饰所需的DNA，从而导致产生遗传改变的核转移单位。
9. 根据权利要求3所述的方法，该方法进一步包括使胎儿发育成子代。
10. 根据权利要求1所述的方法，该方法包括培养所说的活化的

核转移单位直至大于2细胞的发育阶段。

11. 根据权利要求1所述的方法，其中分化的猪细胞或细胞核来自中胚层。

12. 根据权利要求1所述的方法，其中分化的猪细胞或细胞核来自外胚层。

13. 根据权利要求1所述的方法，其中分化的猪细胞或细胞核来自内胚层。

14. 根据权利要求1所述的方法，其中分化的猪细胞或细胞核是成纤维细胞或细胞核。

15. 根据权利要求1所述的方法，其中分化的猪细胞或细胞核是成熟的细胞或细胞核。

16. 根据权利要求1所述的方法，其中分化的猪细胞或细胞核是胚或胎儿细胞或细胞核。

17. 根据权利要求1所述的方法，其中去核的卵母细胞在去核之前成熟。

18. 根据权利要求1所述的方法，其中经融合的核转移单位通过接受两次电脉冲活化。

19. 根据权利要求1所述的方法，其中经融合的核转移单位通过接受一次电脉冲活化。

20. 根据权利要求1所述的方法，其中融合的核转移单位通过暴露于至少一种来自精子细胞的活化因子而活化。

21. 根据权利要求8所述的方法，其中异源DNA用显微注射插入。

22. 根据权利要求8所述的方法，其中异源DNA用电穿孔插入。

23. 根据权利要求1所述的方法，该方法进一步包括使克隆的核转移单位与受精胚结合以产生嵌合胚。

24. 根据权利要求23所述的方法，该方法进一步包括使胎儿发育成子代。

25. 一种产生培养的内细胞团的方法，包括：

(i)在适于核转移单位形成的条件下，将所需的增殖分化猪细胞

或细胞核插入去核的猪卵母细胞中；

(ii) 活化获得的核转移单位；及

(iii) 在饲养层上培养从含有内细胞团的克隆的核转移单位获得的细胞，以得到猪的培养的内细胞团。

26. 根据权利要求 25 所述的方法，该方法包括培养所说的活化的核转移单位直至大于 2 细胞的发育阶段。

27. 根据权利要求 25 所述的方法，其中在所说的分化的猪细胞或细胞核中插入、去除或修饰所需的 DNA，从而导致产生遗传改变的核转移单位。

28. 根据权利要求 25 所述的方法，其中诱导所获得的培养的内细胞团发生分化。

29. 权利要求 28 所述方法制备的猪分化细胞用来制备治疗选自以下的疾病或病症：帕金森综合症、亨廷顿氏舞蹈症、阿尔茨海默氏病、ALS、脊髓缺陷或损伤、多发性硬化、肌肉萎缩、囊性纤维化、肝病、糖尿病、心脏病、软骨缺陷或损伤、烧伤、足溃疡、血管疾病、尿道疾病、艾滋病和癌症细胞移植治疗药物的用途。

30. 权利要求 1 所述方法制备的胎儿获得的猪细胞用来制备治疗选自以下的疾病或病症：帕金森综合症、亨廷顿氏舞蹈症、阿尔茨海默氏病、ALS、脊髓缺陷或损伤、多发性硬化、肌肉萎缩、囊性纤维化、肝病、糖尿病、心脏病、软骨缺陷或损伤、烧伤、足溃疡、血管疾病、尿道疾病、艾滋病和癌症细胞移植治疗药物的用途。

31. 权利要求 7 所述方法制备的子代获得的猪细胞用来制备治疗选自以下的疾病或病症：帕金森综合症、亨廷顿氏舞蹈症、阿尔茨海默氏病、ALS、脊髓缺陷或损伤、多发性硬化、肌肉萎缩、囊性纤维化、肝病、糖尿病、心脏病、软骨缺陷或损伤、烧伤、足溃疡、血管疾病、尿道疾病、艾滋病和癌症细胞移植治疗药物的用途。

32. 权利要求 8 所述方法制备的转基因胎儿获得的猪转基因细胞用来制备治疗选自以下的疾病或病症：帕金森综合症、亨廷顿氏舞蹈症、阿尔茨海默氏病、ALS、脊髓缺陷或损伤、多发性硬化、肌肉萎

缩、囊性纤维化、肝病、糖尿病、心脏病、软骨缺陷或损伤、烧伤、足溃疡、血管疾病、尿道疾病、艾滋病和癌症细胞移植治疗药物的用途。

33. 权利要求 9 所述方法制备的转基因子代获得的猪转基因细胞用来制备治疗选自以下的疾病或病症：帕金森综合症、亨廷顿氏舞蹈症、阿尔茨海默氏病、ALS、脊髓缺陷或损伤、多发性硬化、肌肉萎缩、囊性纤维化、肝病、糖尿病、心脏病、软骨缺陷或损伤、烧伤、足溃疡、血管疾病、尿道疾病、艾滋病和癌症细胞移植治疗药物的用途。

34. 一种产生药物活性蛋白的方法，包括分离由权利要求 9 所述方法制备的转基因子代表达的药物活性蛋白。

35. 根据权利要求 25 所述的方法，该方法进一步包括使克隆的核转移单位与受精胚结合以产生嵌合体。

36. 根据权利要求 35 所述的方法，该方法进一步包括使嵌合的培养的内细胞团发育成嵌合胚。

37. 根据权利要求 23 所述的方法，该方法进一步包括使嵌合胚发育成嵌合胎儿。

38. 根据权利要求 37 所述的方法，该方法进一步包括使嵌合胎儿发育成嵌合子代。

39. 根据权利要求 35 所述的方法，其中在所说的分化的猪细胞或细胞核中插入、去除或修饰所需的 DNA，从而导致产生遗传改变的核转移单位。

40. 根据权利要求 39 所述的方法，该方法进一步包括使嵌合的培养的内细胞团发育成嵌合胚。

41. 根据权利要求 40 所述的方法，该方法进一步包括使嵌合胚发育成嵌合胎儿。

42. 根据权利要求 41 所述的方法，该方法进一步包括使嵌合胎儿发育成嵌合子代。

用来自分化细胞的供体核克隆猪的方法

1. 发明领域

本发明涉及将来自分化的猪细胞的细胞核移植入与供体核相同物种的去核的哺乳动物卵母细胞的克隆方法。核得到程序重排以指导克隆胚的发育，然后将克隆胚转移到雌性受体中产生胎儿和子代，或将其用于产生培养的内细胞团细胞(ICM)。克隆胚也可用于与受精胚结合产生嵌合胚、胎儿和/或子代。

2. 发明背景

已有报道使用有蹄动物的内细胞群(ICM)细胞进行核移植。例如，Collas等在*Mol. Reprod. Dev.* 38:264-267(1994)中公开了通过将裂解的供体细胞显微注射入去核的成熟卵母细胞进行牛ICMs的核移植。Collas等公开了将胚在体外培养七天产生的十五个胚细胞转移入牛受体时使其四头怀孕及两头生产。并且，Kefer等在*Biol. Reprod.*, 50:935-939(1994)中公开了在核转移方法中将牛的ICM细胞作为供体核产生的胚细胞移植入牛的受体时，产生了一些可存活的子代。并且，Sims等在美国国家科学院院报 90: 6143-6147(1993)中公开了通过将在体外短期培养的牛ICM细胞的核转移入去核的成熟卵母细胞可生产小牛。

也有报道称转移培养的胎盘细胞的核后可产生能存活的小羊(Campbell等, *自然*, 380:64-68(1996))。更进一步地，核转移中牛多能胚细胞的使用和嵌合胎儿的产生已有报道(Stice等, *Biol. Reprod.*, 54:100-110(1996); Collas等, *Mol. Reprod. Dev.*, 38:264-267(1994))。Collas等证明肉芽肿细胞(成体细胞)可用于牛克隆方法中以产生胚。但是，未能证明其发育可超过早期胚阶段(胚泡阶段)。并且，肉芽肿细胞不易培养并仅能从雌性获得。Collas等未尝试在培养中繁殖肉芽肿细胞或试图遗传修饰那些细胞。Wilmut等(*自然*, 365:810-813(1997))从胎儿

成纤维细胞产生核转移绵羊子代，从成体绵羊细胞也产生一个子代。

克隆猪细胞与其它物种的细胞相比更为困难。

此现象可由下表进行说明：

物种 (从最难克隆到最易克隆的)	克隆的细胞类型	产生的子代
猪 (Prather, 1989)	2 和 4 细胞阶段的胚	是
猪 (Prather, 1989; Liu 等, 1995)	大于 4 细胞的阶段	否
小鼠 (Cheong 等, 1993)	2、4 和 8 细胞阶段的胚	是
小鼠 (Tsunoda 等, 1993)	大于 8 细胞的阶段	否
牛 (Keefer 等, 1994)	64 到 128 细胞的阶段 (ICM)	是
牛 (Stice 等, 1996)	来自 ICM 的胚细胞系	否
绵羊 (Smith 等, 1989)	64 到 128 细胞的阶段 (ICM)	是
绵羊 (Campbell 等, 1996)	来自 ICM 的胚细胞系	是
绵羊 (Wilmut 等, 1997)	胎儿和成体细胞	是

在产生转基因猪的领域中也存在问题。通过现有方法，将异源 DNA 引入在胎儿中分化成各种细胞类型并最终发育成转基因动物的早期胚或胚细胞系。但是，产生一个转基因动物需要许多早期胚，因此该方法是非常低效的。并且，没有在花费时间和经费将胚放入代理雌性体内之前筛选转基因胚的简单及有效的方法。此外，基因寻靶技术不易于用早期胚转基因技术完成。

小鼠中的胚胎干细胞使研究人员能够筛选转基因细胞并进行基因寻靶。这导致与其它转基因技术相比将更多地使用遗传工程。但是，必需将胚胎干细胞系和其它胚细胞系维持在未分化状态，这需要饲养层和/或在培养基中添加细胞因子。即使采取了这些预防措施，这些细胞仍会经常发生自发分化并且不能通过现有可获得的方法产生转基因子代。并且，一些胚细胞系必须以不利于基因寻靶方法的方式进行繁殖。

从早先预移植的小鼠胚中体外获得胚胎干 (ES) 细胞系的方法为大家所熟知。(见，例如 Evans 等，自然，29:154-156(1981); Martin, 美国国家科学院院报，78:7634-7638(1981))。假如由于成纤维细胞的饲养层 (Evans 等, Id.) 或分化抑制源 (Smith 等, 生物学进展，121:1-9(1987))

存在的话,能使ES细胞以未分化状态传代。

以前已报道ES细胞具有许多应用。例如,已报道ES细胞可用作分化的体外模型,特别可用于研究早期发育调节中涉及的基因。当将小鼠ES细胞引入预移植的小鼠胚时可产生种系嵌合体,从而证明了它们的多能性(Bradley等,自然,309:255-256(1984))。

由于ES细胞的可将其基因组传递到下一代的能力,它们具有通过使用带有或不带有所需的遗传修饰的ES细胞进行家畜动物种系操作的潜在用途。并且,在家畜动物如有蹄动物中,来自如预移植家畜胚的核可促进去核卵母细胞的发育(Smith等, Biol.Reprod., 40:1027-1035(1989);和 Keefer等, Biol.Reprod., 50: 935-939(1994))。相反,据报道来自小鼠超过8细胞阶段的胚的核在转移后并不促进去核卵母细胞的发育(Cheong等, Biol.Reprod., 48:958(1993))。因此,来自家畜动物的ES细胞是非常所需的,因为它们可提供经遗传操作的全能性供体核的潜在来源或用于核转移方法。

一些研究小组已报道了称为多能性胚细胞系的分离。例如,Notarianni等在J.Reprod.Fert.Suppl., 43:255-260(1991)中报道了来自猪和绵羊胚泡的认为是稳定的全能性细胞系的建立,该细胞系表现出一些与从绵羊胚泡中免疫外科分离出的内细胞群的初级培养物的细胞相似的形态学和生长特性。同时,Notarianni等也在J.Reprod.Fert.Suppl., 41:51-56(1990)中公开了来自猪胚泡的推定是全能性胚细胞系的培养物的维持和分化。Gerfen等在动物生物技术,6(1):1-14(1995)中公开了从猪胚泡中分离胚细胞系。这些细胞可在不使用条件培养基的小鼠胚的成纤维细胞饲养层中稳定维持,并且据报道在培养过程中分化成几种不同的细胞类型。

并且,Saito等在Roux's Arch.Dev.Biol.,201:134-141(1992)中报道培养的牛胚胎干细胞样的细胞可存活三代,但在第四次传代后死亡。Handyside等在Roux's Arch.Dev.Biol.,196:185-190(1987)中公开了在分离来自小鼠ICMs的小鼠ES细胞系的条件下培养免疫外科分离的绵羊胚的内细胞群。Handyside等报道在这样的条件下,绵羊ICMs附着、扩

散并发育出 ES 细胞样和内胚层细胞样细胞的区域,但在进行更长时间的培养后仅有内胚层样的细胞明显可见。

近来,Cherny 等在 *Theriogenology*, 41:175(1994)中报道了来自称为多能性牛原生殖细胞的细胞系可在长期培养过程中维持。这些细胞,在培养约 7 天后,产生碱性磷酸酶(AP)染色为阳性的 ES 样的集落,表现出形成胚状体的能力,并自发分化成至少两种不同的细胞类型。据报道这些细胞还表达转录因子 OCT4、OCT6 和 HES1 的 mRNA,这确信是专门由 ES 细胞表达的同源异型框基因的模式。

并且,近来 Campbell 等在 *Nature*, 380:64-68(1996)中报道了将来自在促进小鼠中 ES 细胞系分离的条件下培养的 9 天龄绵羊胚的培养的胎盘(ED)细胞进行核转移之后,可产生存活的小羊。作者得出结论来自 9 天龄绵羊胚的 ED 细胞在经过核转移后是全能性的,并且这种全能性可在培养过程中得到维持。

Van Stekelenburg-Hamers 等在 *Mol. Reprod. Dev.*, 40:444-454(1995)中报道了来自牛胚泡内细胞团细胞的称为永久细胞系的分离和特性描述。作者在不同的条件下分离并培养来自 8 或 9 天龄的牛胚泡的 ICM 以测定哪一种滋养细胞和培养基在促进牛 ICM 细胞的附着和生长中最为有效。他们得出结论培养的 ICM 细胞的附着和生长可通过使用 STO(小鼠成纤维细胞)滋养细胞(代替牛的子宫内皮细胞)和使用补充以活性碳解吸的血清(而不是标准血清)的培养基得到增强。然而, Van Stekelenburg 等报道了他们的细胞系更类似于上皮细胞而不是多能性 ICM 细胞。

Smith 等于 1994 年 10 月 27 日公开的 WO 94/24274、Evans 等于 1990 年 4 月 5 日公开的 WO 90/03432 和 Wheeler 等于 1994 年 11 月 24 日公开的 WO 94/26889 报道了认为可用于获得转基因动物的动物干细胞的分离、筛选和繁殖。Evans 等也报道了来自猪和牛物种的认为对产生转基因动物是有用的称为多能性干细胞的衍生。并且, Wheeler 等于 1994 年 11 月 24 日公开的 WO 94/26884 也公开了认为对制备嵌合的和转基因有蹄动物有用的胚胎干细胞。

因此,基于前面所述的内容,可明显看出许多小组由于 ES 细胞系在

克隆或转基因胚的产生中和核移植中的潜在应用，已尝试产生 ES 细胞系。

因此，尽管已在文献中有所报道，仍然需要使用培养的分化细胞作为供体核克隆猪的改进方法。

发明目的和概述

发明的目的是提供使用培养的分化细胞作为供体核来产生克隆猪的新的和改进的方法。

本发明的更具体的目的是提供包括将分化的猪细胞核移植入去核的猪卵母细胞的克隆猪的新方法。

本发明的另一个目的是提供繁殖具有被证实的遗传优势或其它所需性状的成体猪的方法。

本发明的另一个目的是提供产生遗传工程或转基因猪(即 NT 单位、胎儿、子代)的改进方法。本发明还提供遗传工程或转基因的猪，包括通过所说的方法制备的猪。

本发明的更具体的目的是提供通过在将分化的细胞或细胞核用于形成 NT 单位之前在分化的猪细胞或细胞核中插入、去除或修饰目的 DNA 序列以产生遗传工程或转基因猪的方法。本发明还提供通过所说的方法制备的遗传工程或转基因的猪。

本发明的另一个目的是提供产生猪 CICM 细胞的新方法，包括将分化的猪细胞核移植入去核的猪卵母细胞中，然后用获得的 NT 单位产生 CICM 细胞。本发明还提供用所说的方法产生的猪 CICM 细胞。

本发明的另一个目的是将所说的猪 CICM 细胞用于治疗或诊断。

本发明的具体目的是将所说的猪 CICM 细胞用于任何其中细胞、组织或器官的移植在治疗或诊断中有益的疾病的治疗或诊断。CICM 细胞可在相同物种中使用或者跨物种使用。

本发明的另一个目的是将来自猪的 NT 单位、胎儿或子代的细胞或组织用于任何其中细胞、组织或器官的移植在治疗或诊断中有益的疾病的治疗或诊断。这些疾病和损伤包括帕金森综合症、亨廷顿氏舞蹈症、阿尔茨海默氏病、ALS、脊髓损伤、多发性硬化、肌肉萎缩、糖尿病、肝病、

心脏病、软骨替换、烧伤、血管疾病、尿道疾病及免疫缺陷的治疗、骨髓移植、癌症等疾病。组织可在相同物种中使用或者跨物种使用。

本发明的另一个具体目的是将来自猪的 NT 单位、胎儿或子代的细胞或组织，或根据本发明产生的猪 CICM 细胞用于产生分化的细胞、组织或器官。

本发明的另一个具体目的是将来自猪的 NT 单位、胎儿或子代的细胞或组织，或根据本发明在体外产生的猪 CICM 细胞用于研究细胞分化和用于分析目的，如进行药物研究。

本发明的另一个目的是用由来自猪的 NT 单位、胎儿或子代的所说的组织产生的细胞、组织或器官，或猪的 CICM 细胞来提供移植治疗的改进方法。这些治疗包括对例如以下疾病和损伤的治疗：帕金森综合症、亨廷顿氏舞蹈症、阿尔茨海默氏病、ALS、脊髓损伤、多发性硬化、肌肉萎缩、糖尿病、肝病、心脏病、软骨替换、烧伤、血管疾病、尿道疾病及免疫缺陷的治疗、骨髓移植、癌症等疾病。

本发明的另一个目的是在用分化的细胞或细胞核形成 NT 单位之前通过在分化的猪细胞或细胞核中插入、去除或修饰目的 DNA 序列来提供来自猪的 NT 单位、胎儿或子代、或猪的 CICM 细胞的遗传工程或转基因组织。

本发明的另一个目的是将来自猪的 NT 单位、胎儿或子代、或来自根据本发明产生的猪 CICM 细胞的转基因或遗传工程组织用于基因治疗，特别是用于所说的疾病和损伤的治疗和/或预防。

本发明的另一个目的是将来自猪的 NT 单位、胎儿或子代的组织，或根据本发明产生的猪 CICM 细胞，来自猪的 NT 单位、胎儿或子代、或来自根据本发明产生的猪 CICM 细胞的转基因或遗传工程组织用作核移植的核供体。

本发明的另一个目的是用根据本发明产生的转基因或遗传工程的猪子代生产药理学上重要的蛋白。

因此，在一个方面，本发明提供克隆猪(例如胚、胎儿、子代)的方法。该方法包括：

- (i) 在适于核转移(NT)单位形成的条件下, 将所需的分化的猪细胞或细胞核插入去核的猪卵母细胞中;
- (ii) 活化所获得的核转移单位; 及
- (iii) 将所说的培养的 NT 单位转移到宿主猪中从而使 NT 单位发育成胎儿。

可选择地, 将活化的核转移单位培养至大于 2 细胞的发育阶段。

胎儿的细胞、组织和/或器官有利于用于细胞、组织和/或器官移植的领域, 或用于所需的基因型的产生。

本发明还包括克隆遗传工程或转基因猪的方法, 其中在将分化的猪细胞或细胞核插入去核的卵母细胞之前, 在分化的猪细胞或细胞核中插入、去除或修饰目的 DNA 序列。通过所说的方法产生的遗传工程或转基因猪有利于用于细胞、组织和/或器官移植的领域、所需的基因型的产生和药用蛋白的产生。

本发明还提供根据所说的方法获得的猪和那些猪的子代。

在另一方面, 本发明提供产生猪 CICM 细胞的方法。该方法包括:

- (i) 在适于核转移(NT)单位形成的条件下, 将所需的分化的猪细胞或细胞核插入去核的猪卵母细胞中;
- (ii) 活化所获得的核转移单位; 及
- (iii) 培养从所说的培养的 NT 单位获得的细胞以获得猪的 CICM 细胞。

可选择地, 将活化的核转移单位培养至大于 2 细胞的发育阶段。

猪的 CICM 细胞有利于用于细胞、组织和/或器官移植的领域。

基于本发明的所说的和其它目的, 优点和特征在下文将是非常明显的, 通过参考下面对本发明的优选实施方案的详述和所附的权利要求可更清楚地理解本发明的性质。

发明详述

本发明提供通过核转移或核移植克隆猪的改进方法。在本主题的申请中, 核转移或核移植或 NT 可交换使用。

根据本发明，将来自分化的猪细胞的细胞核移植入去核的卵母细胞中。核得到程序重排以指导克隆胚的发育，然后将克隆胚转移到受体雌性体内以产生胎儿和子代，或用于产生 CICM 细胞。克隆胚也可与受精胚结合产生嵌合胚、胎儿和/或子代。

现有技术的方法已在克隆方法中使用胚细胞类型。这包括 Campbell 等(自然, 380:64-68, 1996)和 Stice 等(Biol. Reprod., 54:100-110, 1996)的工作。在这些研究中, 胚细胞系来自妊娠少于 10 天的胚。在这两个研究中, 细胞在饲养层上维持以防止用于克隆方法的供体细胞的明显的分化。本发明使用分化的细胞

来自绵羊的成体细胞和胎儿成纤维细胞被认为已用于产生绵羊子代(Wilmot 等, 1997)。然而研究已表明, 猪的克隆比克隆羊更为困难。事实上, 在研究的哺乳动物中, 羊的克隆看来是最容易的, 而猪的克隆看来是最困难的。根据本发明用分化的细胞类型对猪的成功克隆是完全出乎意料的。

因此, 根据本发明, 猪的优良基因型的增加是可能的。这使带有确定的遗传优势或其它的优良性状的成体猪得到增加。遗传进展可在猪中加速。通过本发明, 可能有数十亿的胎儿或成体猪的细胞得到收获并用于克隆方法中。这可能导致在短期内产生许多完全相同的子代。

已有推测 Wilmot 等的方法可导致转基因动物的生殖(见, MacQuitty, Nature Biotech., 15:294(1997))。但是, 没有理由可推测, 例如, 来自成体细胞的已转染了外源 DNA 的核能在核转移的过程中存活。考虑到这一点, 可知体外的操作可改变小鼠胚胎干(ES)细胞的特性从而使它们产生形成可存活的嵌合胚的能力。因此, 在本发明之前, 转基因动物的克隆是不可预测的。

本发明还可通过对能克隆繁殖的细胞来源进行操作来简化转基因方法。这排除了将细胞维持在未分化状态的需要, 因此, 包括随机整合和基因寻靶的遗传修饰更易于完成。此方法还通过将核转移与在体外修饰和筛选这些细胞的能力相结合变得比以前的转基因胚技术更有效。根据本发明, 这些细胞能在无细胞因子、条件培养基和/或饲养层时克隆繁殖,

进一步简化并有利于转基因方法。当根据本发明将转染的细胞用于克隆方法时，可产生能发育成胎儿和子代的转基因猪胚。并且，这些转基因的克隆胚可用于产生 CICM 细胞系或其它胚细胞系。因此，本发明排除了为有利于遗传工程技术在体外衍生和维持未分化的细胞系的需要。

本发明还可用于产生能用在例如细胞、组织和器官移植中的克隆猪的胎儿、子代或 CICM 细胞。通过取出来自猪的胎儿或成体的细胞并将其用于克隆方法中，多种的细胞、组织和可能的器官由于通过器官形成发育可从克隆的胎儿中获得。同样，也可从克隆的子代中分离细胞、组织和器官。此方法可提供包括细胞和基因治疗在内的许多医学和兽医治疗的“材料”的来源。如果将细胞转移回它们所来源的动物中，免疫排斥就得到避免。并且，由于许多细胞类型可从这些克隆中分离，其它方法学如生血嵌合状态可用于在同物种动物间及物种之间避免免疫排斥。

因此，在一个方面，本发明提供克隆猪的方法。一般地，猪将通过包括以下步骤的核转移方法产生：

- (i) 获得用作供体核来源的所需的分化的猪细胞；
- (ii) 获得来自猪的卵母细胞；
- (iii) 去除所说的卵母细胞的核；
- (iv) 将所需的分化的猪细胞或细胞核转移入去核的卵母细胞，例如通过融合或注射，形成 NT 单位；
- (v) 活化所获得的 NT 单位；及
- (vi) 将所说的培养的 NT 单位转移入宿主猪中从而使 NT 单位发育成胎儿。

可选择地，将活化的核转移单位培养至大于 2 细胞的发育阶段。

本发明还包括克隆遗传工程或转基因猪的方法，其中在将分化的猪细胞或细胞核插入去核的卵母细胞之前，在分化的猪细胞或细胞核中插入、去除或修饰目的 DNA 序列。

本发明还提供根据所说的方法获得的猪，和那些猪的子代。

除了上面所述的用途之外，根据本发明所述的遗传工程或转基因猪还可用于产生所需的蛋白，如在药理学上重要的蛋白。然后可从转基因

猪的乳汁或其它体液或组织中分离所需的蛋白。或者，外源 DNA 序列可将农业上有用的性状传递到转基因猪中，如疾病抗性、减少身体脂肪、增加瘦肉产量、改善饲料转化或改变子代中的性比。

本发明进一步提供细胞、组织和器官移植领域中的 NT 胎儿和 NT 和嵌合子代的使用。

在另一方面，本发明提供产生猪 CICM 细胞的方法。该方法包括：

(i) 在适于核转移单位形成的条件下，将所需的分化的猪细胞或细胞核插入去核的猪卵母细胞中；

(ii) 活化所获得的核转移单位；及

(iii) 培养从所说的培养的 NT 单位获得的细胞以得到猪的 CICM 细胞。

可选择地，将活化的核转移单位培养至大于 2 细胞的发育阶段。

猪的 CICM 细胞有利于用于细胞、组织和器官移植的领域，或用于胎儿或子代，包括转基因胎儿或子代的产生。

如这里所用到的，胎儿是在子宫中成形后胎生动物的未出生的幼小个体。在猪中，胎儿阶段发生在怀孕后 30 天直到出生。哺乳动物是从出生直到死亡的成体。

优选地，将 NT 单位培养到至少 2 到 400 个细胞大小，优选地为 4 到 128 个细胞，并且最优选地是到至少约 50 个细胞大小。

核转移技术或核移植技术在文献中有描述并在发明背景中引用的许多参考文献中也有描述。特别见：Campbell 等，*Theriogenology*, 43:181 (1995)；Collas 等，*Mol. Report. Dev.*, 38:264-267 (1994)；Keefer 等，*Biol. Reprod.*, 50:935-939 (1994)；Sims 等，美国国家科学院院报，90:6143-6147 (1993)；WO 94/26884；WO 94/24274 和 WO 90/03432，在这里将它们完全引用作为参考。并且，美国专利号为 4,944,384 和 5,057,420 的专利也描述了牛的核移植的方法。

分化的是指具有与周围的结构或原始的细胞不同的特点或功能的细胞。分化的猪细胞是那些经过了早期胚胎阶段的细胞。更具体地，分化的细胞是那些来自至少已经过胎盘阶段(牛胚胎发生的第 10 天)的细胞。分化的细胞可来自外胚层、中胚层或内胚层。

猪细胞可通过大家熟知的方法获得。在本发明中有用的猪细胞包括，例如上皮细胞、神经细胞、表皮细胞、角化细胞、造血细胞、黑色素细胞、软骨细胞、淋巴细胞(B和T淋巴细胞)、红细胞、巨噬细胞、单核细胞、单核的细胞、成纤维细胞、心肌细胞和其它肌肉细胞等。并且，用于核转移的猪细胞可从不同器官如皮肤、肺、胰脏、肝脏、胃、肠、心脏、生殖器官、膀胱、肾脏、尿道和其它泌尿器官等获得。这些仅是适当的供体细胞的例子。适当的供体细胞，即在本发明中有用的细胞可从身体的任何细胞或器官中获得。这包括所有的体细胞或生殖细胞。

成纤维细胞是所需的细胞类型，因为它们可大量地从发育的胎儿和成体猪获得。成纤维细胞有一定程度的分化，因此以前认为它们是用于克隆方法中的较差细胞类型。但重要地是，这些细胞能在体外以快速的倍增时间轻易繁殖并能够克隆繁殖以用于基因寻靶的方法中。本发明是新颖的也是因为使用了分化的细胞类型。本发明是有优点的因为细胞易于在体外繁殖、遗传修饰和筛选。

分离卵母细胞的方法为本领域所熟知。基本上，这包括从猪的卵巢或生殖道中分离卵母细胞。易于获得的猪卵母细胞的来源是屠宰场材料。

为使如遗传工程、核转移和克隆的技术成功使用，一般卵母细胞在用作核转移的受体细胞之前，及在它们可由精子细胞受精以发育成胚之前必须在体外成熟。此过程一般需要从猪的卵巢如在屠宰场获得的猪卵巢收集未成熟的(前期 I)卵母细胞，并使其在受精或去核之前在成熟培养基中成熟直至卵母细胞到达中期 II 阶段，这一般发生在吸取猪卵母细胞约 35-45 小时后。为达到本发明的目的，这一时间段称为“成熟期”。如这里所用到的，为了计算时间段，“吸取”是指从卵巢滤泡中吸取未成熟的卵母细胞。

并且，在体外已成熟的中期 II 阶段的卵母细胞已成功地用于核转移技术中。例如，成熟的中期 II 卵母细胞已从动情期开始后或注射人绒毛膜促性腺激素(hCG)或类似的激素后 35 到 48 小时的非超排卵或超排卵的母牛或小母牛中外科收集。在猪中可使用相似的方法。

已有报道称去核和核转移中的卵母细胞的成熟阶段对 NT 方法的成功

是重要的。(见例如, Prather 等, 分化, 48, 1-8, 1991)。一般地, 成功的哺乳动物胚克隆方法用中期 II 阶段的卵母细胞作为受体卵母细胞是因为确信在这一阶段的卵母细胞能够或足以得到“活化”以像处理受精的精子一样处理引入的核。在家畜中, 卵母细胞活化期一般是约 16-52 小时, 优选地是在吸取后约 35-45 小时。

例如, 可将未成熟的卵母细胞在成熟培养基(MAT-见实施例中的表)中洗涤。然后将卵母细胞置于 1 到 2 毫升 MAT 中并在 db-cAMP 和激素的存在下培养 22 小时。再次洗涤卵母细胞, 然后在无激素的 MAT 中再培养 18 小时。

在大约为 30 到 50 小时, 并优选地为约 40 小时的成熟期之后, 将卵母细胞去核。将卵母细胞去核前优选地将其在去除丘细胞之前移出并置于每毫升含有 1 毫克透明质酸酶的 HECM(Seshagiri 和 Bavister, 1989)中。这可通过用内径非常细的移液管重复吸取或通过短暂的旋涡离心(约 3 分钟)来实现。然后筛选剥离的卵母细胞的极体, 再将通过测定极体的存在选出的中期 II 卵母细胞用于核转移。然后去核。

去核可通过已知的方法来进行, 如在美国专利号为 4,994,384 的专利中所描述的方法, 在这里引用作为参考。例如, 可将中期 II 的卵母细胞置于选择性地每毫升含有 7.5 微克细胞松弛素 B(CB)和 0.15 M 蔗糖的 HECM 中立即去核, 或者可将其在 39°C 及 5% CO₂ 的条件下置于适当的培养基, 例如胚培养基如 NCSU 23(见实施例中的表)中, 然后晚一些去核, 优选地不超过 24 小时后, 并且更优选地立即去核。

可用微量移液管去除极体和周围细胞质来显微外科地完成去核。筛选鉴定出那些已成功去核的卵母细胞。此筛选过程可通过用每毫升 1 微克的 Hoechst 33342 染料将卵母细胞在 NCSU 中染色 20 分钟, 然后在紫外光照射下观察卵母细胞少于 10 秒来进行。然后可将已成功去核的卵母细胞置于适当的培养基, 例如 HECM 和 0.15 M 蔗糖中。

在本发明中, 受体卵母细胞优选地在开始在体外成熟后的约 30 小时到约 50 小时的某一个时间进行去核, 更优选地是在开始在体外成熟后的约 38 小时到约 42 小时的某一个时间, 并且最优选地是在开始在体外成

熟后的约 40 小时进行去核。

然后将单个猪细胞转移入用于产生 NT 单位的去核卵母细胞的卵周隙。猪细胞和去核的卵母细胞将根据本领域所知的方法用于产生 NT 单位。例如，细胞可通过电融合进行融合。电融合是通过提供足以使质膜发生瞬时破裂的电脉冲来完成的。这种质膜的破裂是非常短暂的因为膜会很快重建。因此，如果诱导两个相邻的膜破裂并与脂双层混合重建，将在两个细胞之间打开较小的通道。由于这种小开口的热力学不稳定性，它将扩大至两个细胞变成一个。可参考 Prather 等的美国专利号为 4,997,384 的专利(在这里完全引用作为参考)对此方法作进一步的讨论。可使用多种电融合培养基包括例如蔗糖、甘露醇、山梨醇和磷酸盐缓冲溶液。融合也可用仙台病毒作为融合剂来完成 (Graham, Wister Inot. Symp. Monogr., 9, 19, 1969)。优选的融合培养基是 0.28 M 甘露醇、10 μ M CaCl₂、100 μ M MgSO₄ 和 10 μ M 组氨酸, pH7.0。

并且，在某些情况下(例如用较小的供体核时)将核直接注射到卵母细胞中比用电融合来进行融合可能更为优选。此技术在 Collas 和 Barnes, Mol. Reprod. Dev., 38:264-267(1994)中公开，在这里完全引用作为参考。

在引入融合室之前，优选地将 NT 单位逐渐暴露于融合培养基，在含有 HECM 与融合培养基的比例为 2:1、1:2 和 0:1 的培养基中培养三次。优选地，猪细胞和卵母细胞通过外加 90 - 120V 的电脉冲约 30 微秒，在卵母细胞成熟开始后约 44 小时在 500 μ m 的室中进行融合。融合后，将获得的融合 NT 单位在融合培养基中维持 5 分钟，然后将其置于 HECM 中 10 分钟，再置于加入 7.5 mg/ml CB 的 NCSU 23 中直至活化。典型地，活化将在不久后发生，典型地在少于 24 小时后发生，并且优选地在 4 - 9 小时后发生。

NT 单位可通过已知的方法进行活化。这些方法包括，例如，在亚生理温度培养 NT 单位，实质上通过应用冷的，或实际上较凉的温度冷击 NT 单位。最方便地可通过在室温培养 NT 单位达到此目的，室温相对于胚所正常暴露的生理温度条件是比较冷的。

在优选的实施方案中，通过在含有 0.28 M 甘露醇、10 μ M CaCl₂、100

$\mu\text{M MgSO}_4$ 和 10 mM 组氨酸, pH7.0 的活化培养基中外加 30V 的电脉冲 30 微秒使猪的 NT 单位在 500 μm 的室中活化。1 小时后再外加 15V 的电脉冲 30 微秒。在两次脉冲之间将 NT 单位在 39°C 和 5% CO_2 的条件下维持在含有 CB 的 NCSU 23 中。

或者, 活化可通过应用已知的活化剂完成。例如, 在受精期间通过精子进入卵母细胞或精子细胞中所含的活化因子能活化 NT 单位。并且, 如电或化学休克、钙离子载体和蛋白激酶抑制剂的处理可用于在融合后活化 NT 胚。

优选地, 在活化之后将 NT 单位在加入 CB 的 NCSU 23 中培养 3 到 4 小时, 然后在不含 CB 的 NCSU 23 中培养。可将 NT 单位在活化后任何时候转移到受体雌性中。

或者, 可将活化的 NT 单位在适当的体外培养基中培养直至 CICM 细胞和细胞集落传代。适于胚的培养和成熟的培养基为本领域所熟知。已知的培养基的例子包括 Ham's F-10+10%胎牛血清、组织培养基-199(TCM-199)+10%胎牛血清、台罗德-清蛋白-乳酸盐-丙酮酸盐(TALP)、Dulbecco's 磷酸盐缓冲盐水(PBS)、Eagle's 和 Whitten's 培养基。用于卵母细胞的收集和成熟的最普通的培养基之一是 TCM-199, 再补充 1% 到 20% 的血清, 包括胎牛血清、新生小牛血清、动情的母牛血清、小羊、猪或公牛血清。优选的维持培养基包括带有 Earl 盐、10% 胎牛血清、0.2 mM 丙酮酸钠和 50 $\mu\text{g/ml}$ 硫酸庆大霉素的 TCM-199。更优选地, 所用的培养基是 NCSU 23, 并且将 NT 单位在活化 2 到 5 天后培养于新鲜的 NCSU 23 和 5% 到 10% 的胎牛血清中。所说的任何培养也可包括与多种细胞类型如肉芽肿细胞、输卵管细胞、BRL 细胞和子宫细胞及 STO 细胞的共培养。

另一种维持培养基在 Rosenkrans 等的美国专利号为 5,096,822 的专利中有所描述, 在这里引用作为参考。这种胚培养基, 称为 CR1, 含有促进胚所需要的营养物质。

典型地, 将 NT 单位在加入 5% 到 10% FCS 的 NCSN 23 中培养至 NT 单位达到适于转移到受体雌性中的大小, 或适于获得可用于产生 CICM 细胞或细胞集落的大小。优选地, 这些 NT 单位将培养至至少约 2 到 400 个细

胞，更优选地约 4 到 128 个细胞，并且最优选地至少约 50 个细胞。培养过程在适当的条件，即约 38.5℃ 和 5% CO₂ 下进行，典型地约每 2-5 天更换一次培养基以利于生长，优选地约每 3 天更换一次。

本发明中胚转移和处理受体动物的方法是用于胚转移工业的标准方法。同步转移对于本发明的成功是重要的，即 NT 胚的阶段与受体雌性的动情周期相一致。此优点和如何维持受体在 Wall 等的“离心以观察前核和核的猪卵细胞的发育”，*Biol. Reprod.*, 32:645-651(1985)中讨论，其内容在这里引用作为参考。

本发明还可用于克隆遗传工程或转基因猪。如上面所解释的，本发明具有优点是因为转基因方法可通过对能克隆繁殖的分化的细胞来源进行操作加以简化。特别地，用作供体核的分化细胞带有插入、去除或修饰的所需的 DNA 序列。然后将那些遗传改变的、分化的细胞用于去核卵母细胞的核移植。

任何已知的用来插入、去除或修饰来自哺乳动物细胞的所需的 DNA 序列的方法都可用于改变欲用作核供体的分化的细胞。这些方法可去除所有或部分的 DNA 序列，并且 DNA 序列可以是异源的。所包括的技术有同源重组，可在细胞基因组中的一个或多个特定位点插入、去除或修饰 DNA 的一个或多个序列。

本发明因此可用于提供带有所需的基因型的成体猪。带有确定的遗传优势或其它所需的性状的成体猪的增加是特别有用的，包括转基因或遗传工程动物，和嵌合动物。因此，本发明可产生单种性别的子代，也可产生肉产量增加、具有复现的性状和疾病抗性的猪。并且，来自 NT 胎儿，包括转基因和/或嵌合胎儿的细胞和组织可用于治疗如下所述的与使用 CICM 细胞相关联的多种疾病的细胞、组织和器官移植。因此，转基因猪具有作为包括疾病、细胞和器官的异种移植和生产药用蛋白的模型的用途。

为产生 CICM 细胞和细胞系，在获得理想大小的 NT 单位之后，手工操作从区域中去除细胞，然后使用。此过程优选地通过以下步骤进行：取含有 NT 单位的细胞团，该 NT 单位典型地包含至少约 50 个细胞，洗涤

这些细胞，并将细胞平板接种于饲养层上，例如扩散的成纤维细胞。典型地，用于获得干细胞或细胞集落的细胞可从培养的优选地有至少 50 个细胞大小的 NT 单位的最靠内部分得到。但是，较少或较大数目细胞的 NT 单位或来自 NT 单位的其它部分的细胞也可用于获得 ES 细胞和细胞集落。将细胞维持在适当的生长培养基，例如，补充以 10% FCS 和 0.1 mM β -巯基乙醇(Sigma)和 L-谷氨酰胺的 α -MEM 中的饲养层里。为了有利于生长每当需要时可更换培养基，例如大约每 2-3 天更换一次。

此培养方法导致 CICM 细胞或细胞系的形成。当需要时本领域技术人员可改变培养条件以利于特定的 CICM 细胞的生长。并且，可根据本发明产生遗传工程或转基因猪的 CICM 细胞。即，所说的方法可用于产生引入了一个或多个所需的 DNA 序列的 NT 单位，或者产生其中一个或多个内源 DNA 序列的全部或部分已去除或修饰的 NT 单位。然后那些遗传工程或转基因 NT 单位可用于产生遗传工程或转基因 CICM 细胞。

获得的 CICM 细胞和细胞系具有许多治疗和诊断用途。最特别地，这些 CICM 细胞可用于细胞移植治疗。

考虑到这一点，已知小鼠的胚胎干(ES)细胞能分化成几乎任何细胞类型，例如造血干细胞。因此，根据本发明产生的猪的 CICM 细胞应具有相似的分化能力。本发明所述的 CICM 细胞可经诱导而分化，以根据已知方法得到所需的细胞类型。例如，通过在分化培养基中和在供细胞分化的条件下培养这些细胞，可诱导试验的猪 CICM 细胞分化成造血干细胞、神经细胞、肌肉细胞、心肌细胞、肝细胞、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为本领域所知，称为适当的培养条件。

例如，Palacios 等在美国国家科学院院报 92:7530-7537(1995)中教授了通过对干细胞进行如下诱导从胚细胞系中产生造血干细胞，该诱导方法包括：首先将这些细胞的聚集体培养在缺乏视黄酸的悬浮培养基中，然后再培养于含有视黄酸的相同培养基中，再将细胞聚集体转移到使细胞附着的基质上。

并且，Pedersen, J. *Reprod. Fertil. Dev.*, 6:543-552(1994)是参

考了大量文章的综述文章，所参考的文章公开了胚胎干细胞在体外分化产生多种分化的细胞类型包括造血干细胞、肌肉、心肌、神经细胞等的方法。

并且，Bain 等在生物学进展，168:342-357(1995)中教授了使胚胎干细胞在体外分化产生具有神经元特性的神经细胞的方法。这些参考文献是已报道的从胚或干细胞中获得分化细胞的方法的范例。这些参考文献特别是其中所公开的涉及使胚胎干细胞分化的方法的内容在这里完全引用作为参考。

因此，使用已知的方法和培养基，本领域技术人员可培养本主题的 CICM 细胞，包括遗传工程或转基因的 CICM 细胞，以获得所需的分化细胞类型，例如神经细胞、肌肉细胞、造血细胞等。

本主题的 CICM 细胞可用于获得任何所需的分化细胞类型。这些分化细胞的治疗用途是前所未有的。例如，造血干细胞可用在需要骨髓移植的医学治疗中。此方法可用于治疗多种疾病，例如晚期癌症如卵巢癌和白血病，及调和免疫系统的疾病如艾滋病。造血干细胞是可获得的，例如可通过将癌症或艾滋病病人的成熟体细胞如上皮细胞或淋巴细胞与去核的卵母细胞融合，获得如上所述的 CICM 细胞，并在利于分化的条件下培养该细胞，直至获得造血干细胞。这样的造血干细胞可用在包括癌症和艾滋病的疾病的治疗中。

本发明可用于替换有缺陷的基因，例如有缺陷的免疫系统基因，或用于引入可导致对治疗有益的蛋白如生长因子、淋巴因子、细胞因子、酶等的表达的基因。

可引入本主题的 CICM 细胞的 DNA 序列包括，例如，那些编码表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、神经胶质衍生的神经营养性生长因子、胰岛素样的生长因子(I 和 II)、神经营养蛋白-3、神经营养蛋白-4/5、睫状神经营养因子、AFT-1、细胞因子(白介素、干扰素、集落刺激因子、肿瘤坏死因子(α 和 β)等)、治疗用的酶等的 DNA 序列。

本发明包括在人类疾病的治疗中使用猪细胞。因此，猪的 CICM 细胞、NT 胎儿和 NT 及嵌合的子代(转基因的或非转基因的)可用于应进行细胞、

组织或器官移植的人类病症的治疗。一般地，根据本发明所述的 CICM 细胞、胎儿和子代可在相同物种内使用(自体的、同源的或同种异体移植)或跨物种使用(异种移植)。例如，来自猪的 NT 胎儿的脑细胞可用于治疗帕金森综合症。

并且，本主题的 CICM 细胞也可用作分化，特别是与早期发育调节相关的基因的研究的体外模型。并且，用本主题的 CICM 细胞分化出的细胞、组织和器官也可用于药物研究中。

并且，本主题的 CICM 细胞可用作产生其它 CICM 细胞和细胞集落的核供体。

为了更清楚地描述本发明，提供了下面的实施例。

实施例：

用于猪克隆的材料和方法

修饰的 NCSU 37 培养基 (mNCSU 37)

成分	分子量	浓度 (mM)	g/l
NaCl	58.45	108.73	6.3553
NaHCO ₃	84.00	25.07	2.1059
KCl	74.55	4.78	0.3563
KH ₂ PO ₄	136.09	1.19	0.1619
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.50	1.19	0.2933
CaCl ₂ ·2H ₂ O	147.00	1.70	0.2499
葡萄糖	180.20	5.55	1.0000
谷氨酰胺	146.10	1.00	0.1461
山梨醇	182.20	12.00	2.1864
胰岛素	——	5 mg/l	0.0050
青霉素 G	——	100 IU/l	0.0650
链霉素	——	50 mg/l	0.0500

使用 18 mohm, RO, DI 水。

pH 应为 7.4, 检查摩尔渗透压浓度并记录。

通过真空过滤(0.22 μm)消毒, 在瓶上标注日期和缩写。

贮存于 4℃ 并在 10 日内使用。

修饰的 TL-Hepes-PVA 培养基 (Hepes-PVA)

成分	分子量	浓度 (mM)	g/l
NaCl	58.45	114.00	6.6633
KCl	74.55	3.20	0.2386
NaHCO ₃	84.00	2.00	0.1680
NaH ₂ PO ₄	120.00	0.34	0.0408
乳酸钠**	112.10	10.00	1.868 ml
MgCl ₂ ·6H ₂ O	203.30	0.50	0.1017
CaCl ₂ ·2H ₂ O*	147.00	2.00	0.2940
山梨醇	182.20	12.00	2.1864
HEPES	238.30	10.00	2.3830
丙酮酸钠	110.00	0.20	0.0220
庆大霉素	————	————	500 μl
青霉素 G	————	————	0.0650
PVA	10,000	————	0.1000

**60%糖浆

*最后加入 CaCl₂·2H₂O, 慢慢加入防止沉淀

使用 18 mohm, RO, DI 水。

调节 pH 至 7.4, 检查摩尔渗透压浓度并记录。

通过真空过滤(0.22 μm)消毒, 在瓶上标注日期和缩写。

贮存于 4℃ 并在 10 日内使用。

NCSU 23培养基

成分	分子量	浓度 (mM)	g/l
NaCl	58.45	108.73	6.353
NaHCO ₃	84.00	25.07	2.1059
KCl	74.55	4.78	0.3563
KH ₂ PO ₄	136.09	1.19	0.1619
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.50	1.19	0.2933
CaCl ₂ ·2H ₂ O	147.00	1.70	0.2499
葡萄糖	180.20	5.55	1.0000
谷氨酰胺	146.10	1.00	0.1461
牛磺酸	125.10	7.00	0.8757
亚牛磺酸	109.10	5.00	0.5455
BSA	——	0.4%	4.0000
青霉素 G	——	100 IU/l	0.0650
链霉素	——	50 mg/l	0.500

使用 18 mohm, RO, DI 水。

pH 应为 7.4, 检查摩尔渗透压浓度并记录。

通过真空过滤(0.22 μm)消毒, 在瓶上标注日期和缩写。

贮存于 4℃ 并在 10 日内使用。

注意: BSA 的类型是重要的。优选地使用 Sigma 公司货号为 # A-7906 的 BSA。并且, 青霉素 G/链霉素是可任选的。

培养基的制备

成熟培养基 (MAT):

18.0 ml mNCSU 37

2.0 ml 猪的滤泡液 (pFF)

7.0 μl 稀释的 β-巯基乙醇 (将 10 μl β-巯基乙醇稀释到 990 μl mNCSU 37 中; 终浓度为 50 μM)

0.002 g 半胱氨酸(终浓度为 0.6 mM)

20 μ l EGF 原液(来自 10 ng/ μ l EGF 原液的表皮生长因子)

经 0.22 μ m 过滤至 10 ml 的培养管。标注日期和缩写,在 CO₂ 培养箱中平衡。

猪滤泡液的制备

从前青春期的小母猪的 3-6 mm 滤泡中收集滤泡液并使卵母细胞和滤泡细胞沉降 5-10 分钟。吸取 pFF 并移到 15 ml 的圆锥形管中。在 Sorvall 离心机上于 4℃ 以 3000 rpm 离心 30 分钟。取出管,收集沉淀上方的 pFF,使其汇集并用 0.8 μ m 的过滤器过滤,然后用 0.45 μ m 的过滤器(Sterivex 公司)过滤。分装至 1.5 ml 的无菌微量离心管中并冻存于 -20℃ 直至使用。

表皮生长因子原液(EGF)

100 μ g EGF

含 0.1% BSA 的 10 ml mNCSU 37

混合均匀。分装至 25 μ l,冻存于 -20℃。

用于 MAT 的马绒毛膜促性腺激素和人绒毛膜促性腺激素原液(PMSG/hCG)

ECG(PMSG 6000; Intervet Inc., Millsboro; DE 19966)

加 3ml dH₂O 将 6000 IU 稀释到 2000 IU/ml。hCG(Chorulon; Intervet Inc.)

加 5ml dH₂O 将 10,000 IU 稀释到 2000 IU/ml。混合 1 ml PMSG 和 1 ml hCG 以获得 1000 IU/ml 的每种激素。制备 50 μ l 的分装液并冻存于 -20℃。同样冻存剩余的 PMSG 和 hCG 原液。

db-cAMP 的 100 mM 原液

25mg db-cAMP(于 -20℃ 贮存于干燥器中)

0.509 ml dH₂O

混合均匀。制备 50 μ l 的分装液并冻存于 -20℃。

融合培养基

0.28 M 甘露醇

10 μ M CaCl_2

100 μ M MgSO_4

10 mM 组氨酸

调节 pH 至 7.0

活化培养基

0.28 M 甘露醇

100 μ M CaCl_2

100 μ M MgSO_4

10 mM 组氨酸

调节 pH 至 7.0

抗生素/抗真菌剂 (Ab/Am)

100 U/l 青霉素, 100 μ g/l 链霉素和 0.25 μ g/l 两性霉素 B, (Gibco #15240-062)

在每升盐溶液中加入 10 ml 等分试样。

在每 ml 精液中加入 10 μ l 等分试样。

卵丘复合体 (OCC) 的收集

将卵巢于 25 $^{\circ}$ C 转运至实验室并立即用含有抗生素/抗真菌剂 (10 ml/L; Gibco #600-5240g) 的 0.9% 盐溶液洗涤。3-6 mm 之间的滤泡用 18g 的针和 50 ml 连于真空系统 (GEML 牛系统) 的 Falcon 管吸取。管装满后, 使 OCC 沉降 5-10 分钟。吸取滤泡液 (pFF) 并贮存下来在需要时用于培养系统 (见下面的 pFF 制备方法)。

OCC 的洗涤

将 OCCs 重悬于 20 ml HEPES-PVA 中并使其沉降；重复 2 次。最后一次洗涤后，将 OCCs 移至带有格子的碟中并选出用于培养的 OCC。选出的 OCCs 在 HEPES-PVA 的 60 mm 碟中洗涤两次。所有的吸取和卵母细胞的回收均在室温(约 25℃)下进行。

体外成熟 (IVM)

50 个 OCCs 在 MAT 中洗涤 3 次之后，将其移至 4 孔 Nunc 板中(内区室含有 1-2 ml MAT 或 mNCSI 37)的 0.5 ml MAT 中。在每孔 OCC 中加入 5 μ l 100 mM 的 db-cAMP(在水中)。在含有激素的情况下培养 22 小时。用不含激素的新鲜 MAT 洗涤 3 次并将其移至新鲜 MAT 的 0.5 ml 孔，大约 50 个卵母细胞/孔。在 39℃、5.0% CO₂ 气氛中培养 22 小时，在 MAT 中总共培养约 40 小时。

猪胚的和成熟的成纤维细胞初级培养物的分离

猪成纤维细胞的初级培养物从受精后 30 到 114 天，优选地为 35 天的猪胎儿获得。无菌地去除头、肝脏、心脏和消化道，将胎儿绞碎并于 37℃ 在预热的胰蛋白酶 EDTA 溶液(0.05% 胰蛋白酶/0.02% EDTA; GIBCO, Grand Island, NY)中温育 30 分钟。将成纤维细胞平板接种于组织培养皿中并在含有 α -MEM 培养基(BioWhittaker, Walkersville, MD)并补充以 10% 胎牛血清(FCS)(Hyclone, Logan, UT)、青霉素(100 IU/ml)和链霉素(50 μ l/ml)的成纤维细胞生长培养基(FGM)中培养。成纤维细胞于 37℃ 及含有 5% CO₂ 的潮湿空气中生长并维持。

从猪的肺和皮肤中分离成熟的成纤维细胞。将绞碎的肺组织于 10℃ 在胰蛋白酶 EDTA 溶液(0.05% 胰蛋白酶/0.02% EDTA; GIBCO, Grand Island, NY)中温育过夜。过夜后的组织及任何分离的细胞于 37℃ 在预热的胰蛋白酶 EDTA 溶液(0.05% 胰蛋白酶/0.02% EDTA; GIBCO, Grand Island, NY)中温育 1 小时并经 3 次连续洗涤和胰蛋白酶温育(1 小时)进行加工。将成纤维细胞平板接种于组织培养皿中并在补充以 10% 胎牛血清(FCS)(Hyclone, Logan, UT)、青霉素(100 IU/ml)和链霉素(50 μ l/ml)

的 α -MEM 培养基 (BioWhittaker, Walkersville, MD) 中培养。成纤维细胞可在发育中的任何时候进行分离, 从约后胎盘期到动物的成体生活期 (猪受精后 9 到 10 天至 5 岁或更长时间) 均可。

制备用于核转移的成纤维细胞

可用作供体核的胎儿成纤维细胞的实施例为:

1. 在任何单细胞阶段不同步的或血清饥饿的或休眠的增殖成纤维细胞可作为核的供体。来自所说的培养物的细胞用胰蛋白酶 EDTA 处理 10 分钟并在 100% 的胎牛血清中洗涤 3 次。然后将单细胞的成纤维细胞置于 HbT 培养基 (Bavister 等, 1983) 的显微操作液滴中。此过程在将成纤维细胞转移到去核的猪卵母细胞之前的 10 到 30 分钟完成。优选地, 将具有 CMV 启动子和绿色荧光蛋白基因的增殖转基因成纤维细胞 (第 9 代) 用于产生 NT 单位。

2. 通过第二种方法, 使成纤维细胞同步于细胞周期的 G1 或 G0 期。使成纤维细胞长满。然后将 FGM 中的胎牛血清浓度连续 4 天依次减半 (第 0 天 = 10%, 第 1 天 = 5%, 第 2 天 = 2.5%, 第 3 天 = 1.25%, 第 4 天 = 0.625%)。在第 5 天细胞用胰蛋白酶 EDTA 处理 10 分钟并在 100% 的胎牛血清中洗涤 3 次。然后将单细胞的成纤维细胞置于 HbT 培养基的显微操作液滴中。此过程在将成纤维细胞转移到去核的猪卵母细胞之前的 15 分钟内完成。

去除丘细胞

在成熟期后, 即从约 30 到 50 小时, 并优选地为约 40 小时, 将卵母细胞去核。在去核前优选地将卵母细胞在去除丘细胞之前移出并置于每毫升含有 1 毫克透明质酸酶的 HECM (Seshagiri 和 Bavister, 1989) 中。这可通过用内径非常细的移液管反复吸取或通过短暂的旋涡离心 (约 3 分钟) 来实现。然后筛选剥离的卵母细胞的极体, 再将通过测定极体的存在选出的中期 II 卵母细胞用于核转移。然后去核。

成纤维细胞的去核、转移及融合

不含丘的猪卵母细胞在成熟后约 40 小时 (hpm) 用成斜角的微量移液管去核。此方法在以前已由 Prather 等, 1989 描述, 该内容在这里引用作为参考。卵母细胞在 HECM HEPES 和加入 0.15 M 蔗糖的 7.5 mg/ml CB 中去核。去核在卵母细胞在加入 Hoechst 33342 (3 μ g/ml; Sigma) 的 NCSU 23 培养基中温育超过 20 分钟后得到证实。然后用 HECM 加入 0.15 M 蔗糖和 CB (7.5 mg/ml) 的 HEPES 中的成斜角的微量移液管将单独的供体细胞 (成纤维细胞) 置于受体卵母细胞的卵周隙。通过电融合技术将猪卵母细胞的细胞质与供体核 (NT 单位) 融合在一起。将 NT 单位在增加量的融合培养基中 (HECM HEPES 与融合培养基的比例为 2:1, 1:2 和 0:1) 洗涤 3 次。融合室含有两条平行的直径为 200 μ m 的线, 之间的距离为 500 μ m。用手工操作使每个 NT 单位排成一线从而使将要融合的膜与两条线平行。将一个 100 V 30 微秒的融合脉冲外加于电融合室中的 NT 单位。这发生在 44 到 45 hpm。NT 单位在融合培养基中温育 5 分钟, 然后在 HECM HEPES 中温育 10 分钟。将 NT 单位放回加入 CB 的 NCSU 23 培养基中直至 47 到 49 hpm。

活化

可以在活化后 47 到 49 小时使用的活化方法的实施例为:

1. 单活化脉冲 从加入 CB 的 NCSU 23 中取出 NT 单位并在活化培养基中洗涤 3 次。平衡之后, 将 NT 单位置于如融合步骤中所述的装满活化培养基的融合室 (500 μ m 距离) 中。外加 30V 30 微秒的脉冲。然后将 NT 单位在 HECM HEPES 中洗涤 3 次并在 NCSU 23 中再培养 (39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂) 2 小时直至胚转移或体外培养 (39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 于 NCSU 23 中)。如果经培养, 将 NT 单位在培养的第二天置于加入 5% 胎牛血清的新鲜 NCSU 23 中。表 1 中的结果表明可用此方法活化卵母细胞并表明卵母细胞具有发育能力。

2. 双活化脉冲 从加入 CB 的 NCSU 23 中取出 NT 单位并在活化培养基中洗涤 3 次。平衡之后, 将 NT 单位置于如融合步骤中所述的装满活化培养基的融合室 (500 μ m 距离) 中。外加 30V 30 微秒的脉冲。然后立

即将 NT 单位在 HECM HEPES 中洗涤 3 次, 放回加入 CB 的 NCSU 23 中, 并于 39℃, 5% CO₂ 在此培养基中培养, 直至 1 小时后的下一次电脉冲。1 小时后重复此次活化培养基平衡步骤并使用 15V 30 微秒的脉冲。然后立即将 NT 单位在 HECM HEPES 中洗涤 3 次, 放回加入 CB 的 NCSU 23 中, 并于 39℃, 5% CO₂ 在此培养基中再培养 2 到 6 小时。然后用上面 1. 中描述的相同方法培养 NT 单位。表 1 中的结果表明可用此方法活化卵母细胞并表明卵母细胞具有发育能力。核转移胚的情况是相同的。通过双脉冲活化方法产生了 4 胚泡阶段的 NT 单位。

3. 精子因子 由 Stice 和 Robl (Mol. Reprod. Dev., 25:272-280(1990)) 在哺乳动物精子中首次描述 (其内容在这里引用作为参考), 该因子在卵母细胞中引起活化。从猪的精子细胞中分离精子因子及显微注射的方法在 Fissore 等 (Mol. Reprod. Dev., 46:176-189(1997)) 中描述, 其内容在这里引用作为参考。从加入 CB 的 NCSU 23 中取出 NT 单位并将其置于所说的的显微操作板以进行去核和成纤维细胞转移。使用装满精子因子的显微注射针 (1 μm 开口) 将因子传送到 NT 单位的细胞质中之后, 卵母细胞得到活化。显微注射后, 将 NT 胚在 HECM HEPES 中洗涤 3 次并保持于加入 CB 的 NCSU 23 中 2 到 6 小时, 然后置于 NCSU 23 中直至胚转移。

表 1. 使用不同的活化方法时活化的卵母细胞和 NT 单位的发育。

	给予活化刺激的卵母细胞数	裂解的卵母细胞数 (开始发育) [%]	发展到胚泡阶段的卵母细胞数 (8 天龄胚) [%]
单脉冲卵母细胞	52	6[12]	1[2]
双脉冲卵母细胞	85	8[10]	3[4]
双脉冲 NT 单位	55	10[18]	4[7]
精子因子卵母细胞	49	4[8]	2[4]

胚转移

猪的胚（单细胞胚）转移方法为大家所熟知（见，例如，Pinkert 等，1993，其内容在这里引用作为参考）。简言之，将 20 到 30 个 NT 单位同时转移到生育或未生育过的小母猪的输卵管中。怀孕超过 29 天后，受体小母猪可产生核转移胎儿（转基因的或非转基因的）。或者，使胎儿进入分娩期（怀孕 114 天）产生克隆猪的子代。