

猪体外受精胚胎、孤雌激活胚胎以及体细胞核移植胚胎的体外培养

张运海¹, 潘登科^{1,2}, 孙国杰¹, 孙秀柱¹, 李燕³, 戴蕴平¹, 李宁¹

(¹ 中国农业大学生物学院农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094; ² 中国农业大学动物科技学院, 北京 100094; 北京济普霖生物技术公司, 北京 100094)

摘要: 【目的】本研究系统比较了体外受精胚 (IVFEs)、孤雌激活胚 (PAEs) 以及体细胞核移植胚 (NTEs) 的发育率和囊胚质量, 同时还比较了 PZM-3 和 NCSU-23 两种培养基培养对 PAEs 以及 NTEs 发育的影响。【方法】利用体细胞核移植技术、体外受精技术和孤雌激活技术分别生产猪的 NTEs、IVFEs 和 PAEs, 开展体外培养。【结果】(1) IVFEs、PAEs 和 NTEs 的卵裂率分别为 72.0%, 66.0% 和 63.5%, 各组间没有显著差异 ($P>0.05$); 囊胚形成率分别为 11.0%, 22.6% 和 16.9%, 也不存在明显不同 ($P>0.05$); 然而, 在囊胚质量, 即 ICM 细胞数/总细胞数的比例上, IVFEs 和 NTEs 均优于 PAEs (0.448%, 0.356% vs 0.122%, $P<0.05$)。 (2) 对 PAEs 来讲, 以 PZM-3 为基础培养基时囊胚率明显高于以 NCSU-23 为基础培养基时的处理组 (35.4% vs. 22.6%, $P<0.05$); 而对 NTEs 而言, 两种培养基在支持胚胎形成囊胚方面的效果相当 (26.6% vs. 21.1%, $P>0.05$), 虽然 PZM-3 培养时胚胎卵裂率显著低于 NCSU-23 培养组 (47.5% vs. 63.5%, $P<0.05$)。【结论】(1) PAEs 的囊胚质量在 3 种来源的胚胎中最差; (2) 对 PAEs 理想的培养基, 当用于 NTEs 培养时却不一定是最佳的选择。

关键词: 猪; 体外受精; 体细胞核移植; 孤雌激活; 体外培养

Preimplantational Development of Porcine Embryos Derived from *in vitro* Fertilization, Parthenogenetic Activation and Somatic Cell Nuclear Transfer

ZHANG Yun-hai¹, PAN Deng-ke^{1,2}, SUN Guo-jie¹, SUN Xiu-zhu¹, LI Yan³, DAI Yun-ping¹, LI Ning¹

(¹ State Key Laboratory for Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094; ² College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094; ³ Beijing Gene-Protein Biotech Company, Beijing 100094)

Abstract: 【Objective】The present study were designed to examine the developmental competence of preimplantational embryos derived from *in vitro* fertilization, parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transfer in pig, and to evaluate the quality of porcine blastocysts derived from IVF, PA and SCNT. In addition, the effects of porcine zygote medium 3 (PZM-3) and North Carolina State University Medium 23 (NCSU-23) on the developmental potential on the porcine PA embryos (PAEs) and SCNT (NTEs) embryos was also investigated. 【Methods】NTEs, IVFEs and PAEs were produced by using somatic cell nuclear transfer, *in vitro* fertilization and parthenogenetic activation methods, followed by *in vitro* culture until use. 【Results】(1) for the cleavage rate, no significant difference was observed among IVF embryos (IVFEs), PAEs and NTEs (72.0%, 66.0% and 63.5%, $P>0.05$), meanwhile for the blastocyst formation rate, no significant difference was obtained neither (11.0%, 22.6% and 16.9%, $P>0.05$). However, for the quality of blastocysts, i.e. the ratio of the cell number of inner cell mass (ICM) to total cell number, the IVFEs and NTEs were both superior to PAEs (0.448%, 0.356% vs. 0.122%, $P<0.05$). (2) as for PAEs, the blastocyst rate was

收稿日期: 2005-11-11; 接受日期: 2006-06-30

基金项目: 国家高技术研究发展规划“863”(2003AA205102), 国家重点基础研究发展计划“973”(G20000161)和北京市自然科学基金重大项目(5030001)

作者简介: 张运海(1973-), 男, 安徽涡阳人, 博士, 研究方向为哺乳动物胚胎生物技术。E-mail: Yunhai.Zhang@agrsci.dk; 通讯作者李宁(1962-), 男, 江西南昌人, 教授, 研究方向为动物分子遗传与生物技术。Tel: 010-62733323; Fax: 010-62733904; E-mail: ningbau@public3.bta.net.cn

significantly higher when cultured in PZM-3 than cultured in NCSU-23 (35.4% vs. 22.6%, $P<0.05$); while as for NTEs, similar results of PZM-3 and NCSU-3 in supporting blastocyst formation were observed (26.6% vs. 21.1%, $P>0.05$), although the cleavage rate was obviously higher in PZM-3 group than NCSU-23 group (47.5% vs. 63.5%, $P<0.05$). 【Conclusion】 (1) the poorest quality of blastocysts was generally observed in PAEs; (2) the ideal culture medium for PAEs may not be necessarily beneficial to NTEs.

Key words: Pig; *In vitro* fertilization; Somatic cell nuclear transfer; Parthenogenetic activation; *In vitro* culture

0 引言

【研究意义】猪体外胚胎生产 (IVP)、体细胞核移植 (SCNT) 以及孤雌激活 (PA) 等现代胚胎生物技术对于开展抗病育种、提高肉质、生产转基因或者基因组修饰猪为人类器官移植开辟异源供体、制备人类疾病模型以及生物学基础研究诸多方面的探索提供了强大的技术支撑。体外培养是猪 IVP 的关键环节。近年来在体外成熟/体外受精、孤雌激活以及体细胞核移植各种来源胚胎的培养方面已经取得了很大的进展。但是, 和体内生产的胚胎相比, 这些体外方式生产的胚胎早期发育率还很低。造成这种情况的主要原因之一就是体外培养相关环节还没有体内的发育环境理想^[1]。【前人研究进展】NTEs 和 IVFEs 由于生产方式不同, 在着床前发育期间卵裂球细胞内部, 和/或者细胞之间发生的各种事件不尽相同。因此, 很容易让人以为, NTEs 和 IVFEs 对各种培养环境的反应以及适应能力也不会完全相同。最近的研究表明, 牛 NTEs 和 IVFEs 确实对培养基的需求不同^[2]。另外, Gao 等^[3]发现小鼠 NTEs 在类似培养体细胞的培养基中培养, 其发育效率比常规的 IVFEs 培养基高。研究发现囊胚总细胞数影响猪胚胎的体内发育, 细胞数高的胚胎比较容易着床^[4]。体外培养的胚胎总细胞数往往低于体内胚, 但是体外培养的胚胎仍可以发育到期。Koo 等比较了牛^[5]体外受精囊胚和克隆囊胚的总细胞数、内胚团细胞数 (ICM) 与滋养层细胞 (TE) 细胞数间的比例 (ICM/TE), 发现 NTEs 胎的总细胞数以及 ICM/TE 都明显低于 IVFEs。因而认为体细胞克隆效率低的原因之一可能是克隆囊胚的这种异常发育。最近他们又比较了猪^[6]的 IVFEs 以及 NTEs 之间的囊胚细胞分布。和牛不同之处在于: 猪的 NTEs 以及 IVFEs 的细胞数相似, 都明显低于体内胚胎; 而且 NTEs 和 IVFEs 的 ICM/TE 彼此间也差别不大, 也都没有体内胚的高。【本研究切入点】因此, 这一方面有可能反映了猪的体外培养体系还不理想, 另一方面则说明了物种间胚胎发育差异的客观存在。然而, 截至目前, 对猪 IVFEs、PAEs 及 NTEs 三者进行系统研究的报道

极少。【拟解决的关键问题】本研究旨在对猪体外受精胚胎、孤雌激活胚胎以及体细胞核移植克隆胚胎的附植前发育效率以及囊胚质量进行系统的比较研究, 期望能找到相对比较适合各种胚胎体外培养条件, 以提供更多的体外胚胎, 从而便于开展更为深入的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

除特别标识外, 所有化学试剂均购自 Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA); 细胞培养相关耗材为 BD Falcon (France) 产品; 卵母细胞体外成熟 (IVM) 以及胚胎培养耗材为 Greiner (German) 公司产品。

1.2 溶液

细胞培养液为添加 1% (体积比) 非必须氨基酸 (NEAA), $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 青霉素, $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 硫酸链霉素, 10% (体积比) 胎牛血清 (FBS, Gibco) 的高糖 DMEM (Gibco); 细胞消化用 0.25% (质量体积比) Trypsin+0.02% (质量体积比) EDTA; 抽卵液为 HEPES 缓冲并添加了 0.1% (质量体积比) 聚乙烯醇 (PVA) 的台氏液 (PVA-TL-HEPES); 卵母细胞 IVM 液为添加 10% (体积比) 猪卵泡液 (pFF), $0.57 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ L-半胱氨酸, $10 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 表皮生长因子 (EGF), $10 \text{ IU}\cdot\text{ml}^{-1}$ 人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 和 $10 \text{ IU}\cdot\text{ml}^{-1}$ 孕马血清促性腺激素 (eCG) 的无 BSA NCSU-23; pFF 的制备, 抽取卵巢上 4~8 mm 直径的卵泡, 将抽取液放入 50 ml 离心管, $1600\times \text{g}$ 离心 30 min, 取上清液并用 $0.45 \mu\text{m}$ 针头过滤器过滤分装到 1.5 ml 离心管中, 而后放入 -20°C 保存备用。显微操作液为添加 $7.5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 细胞松弛素 B (CB) 和 $4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 牛血清白蛋白 (BSA) 的 HEPES 缓冲的无钙 NCSU-23; 融合/激活液由 $0.25 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇, $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钙, $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化镁, $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES 以及 0.01% PVA 组成; 精子洗涤液为含 0.1% (w/v) BSA 的 DPBS; 体外受精液为 mTBM (Abeydeera et al., 1997); 胚胎培养液为 NCSU-23+ $4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ BSA。

1.3 方法

1.3.1 猪卵母细胞 IVM 从屠宰场取卵巢, 放入 28~

35℃含青霉素和硫酸链霉素的生理盐水中, 2 h 内运回实验室。用配有 18 号针头的 20 ml 注射器抽取卵巢上 3~6 mm 的卵泡, 经 PVA-TL-HEPES 洗涤 3 遍后挑选卵丘包裹 2 层以上, 致密且胞质均匀的卵丘细胞-卵母细胞复合体 (Cumulus-Oocyte complexes, COCs), 再用 IVM 培养液洗涤 3 遍。将洗涤好的 COCs 转入 IVM 培养液中培养 (20±2) h 后, 把 COCs 转移到无 hCG 以及 eCG 的 IVM 培养液中继续培养 (20±2) h。

COCs 在 39℃, 5%CO₂, 100%湿度的 CO₂ 培养箱中 IVM 42~44h 后, 用含 1 mg·ml⁻¹ 透明质酸酶的 DPBS (无钙镁, Gibco) 脱除包裹在其周围的卵丘细胞, 选择卵周隙明显, 卵细胞膜完整, 且排出第一极体的卵母细胞备用。

1.3.2 卵母细胞孤雌激活 取上述脱去卵丘的 MII 卵母细胞, 用激活液洗涤 3 遍。再将卵母细胞转移到已经铺满激活液, 电极宽度为 0.5 mm 的融合槽中, 电融合参数设定为 1 个 10v, 5s 的交流电 (AC) 刺激, 紧接着是 1 个 1.2~2.0kv·cm⁻¹, 30~100μs 的直流脉冲 (DC)。之后, 用 NCSU-23+4mg·ml⁻¹+5μg·ml⁻¹ CB 将卵母细胞洗涤 5 遍, 洗涤后将卵母细胞转移到 NCSU-23+4mg·ml⁻¹+5μg·ml⁻¹ CB 液滴内 39℃, 5% CO₂, 100%湿度培养 3~5 h, 然后再转移到不含 CB 的胚胎培养液中进行培养。

1.3.3 体外受精 从北京中荷示范种猪场购买 2 份达兰猪个体新鲜采集的精液, 从 2 份猪的精液中各取出 5 ml 混合, 再用含抗生素的 DPBS (含 0.1% BSA, fraction V), 400×g, 4min 离心洗涤; 用不含抗生素的 mTBM 稀释调整精液密度为 10×10⁶ml⁻¹, 然后于 39℃, 5%CO₂, 100%湿度条件下 CO₂ 培养箱中孵育 90 min。取脱去卵丘的 MII 卵母细胞, 于 IVF 前转移到 mTBM 液滴 (在 5% CO₂, 100%湿度的 CO₂ 培养箱中预先平衡至少 48 h, 石蜡油覆盖, 大小为 50 μl) 内培养 30 min。将孵育好的精子转移到卵母细胞所在的受精液滴内, 使得 mTBM 液滴内精子密度为 1.5~5×10⁵个/ml。受精液滴在 39℃, 5% CO₂, 100%湿度的 CO₂ 培养箱中共培养 6 h。将所有可能已经受精的卵转移到胚胎培养液中, 39℃, 5% CO₂, 100%湿度的 CO₂ 培养箱中培养。

1.3.4 体细胞核移植 供体细胞来自于张运海等^[14]所建立的中国实验用小型猪胎儿成纤维细胞。待传代 5~10 次的细胞生长至 80%汇合时, 进行血清饥饿处理, 即把培养液中的 FBS 浓度从 20%降至 0.5%继续培养 2~5 d 后, 按常规方法消化, 离心洗涤, 最后加

1 ml 显微操作液重悬细胞沉淀备用。重构卵/胚胎构建: 将供体细胞以及成熟卵母细胞同时转入显微操作液滴, 于 39℃, 5%CO₂, 100%湿度平衡 15 min, 然后在装配有显微操作仪 (Narishige) 及恒温台 (Tokhai) 的倒置显微镜 (TE2000U, Nikon) 上用固定吸管 (内径 25~35 μm, 外径 100~120 μm) 吸持卵母细胞, 用内径 15~25 μm 的去核/注射针将第一极体调整到钟表 1 点钟位置, 紧接着从 3 点钟处进针, 吸取第一极体及其临近 10%~20%可能含有卵母细胞核的胞质。挑选直径 15~20 μm, 折光性强, 圆形, 光滑的体细胞, 从去核切口放入卵周隙。操作结束后将供体细胞-卵胞质构成的细胞对 (重构卵) 转移到 NCSU-23+4 mg·ml⁻¹BSA 中, 在 39℃, 5%CO₂, 100%湿度培养箱中恢复 1.5 h。将恢复好的重构卵分批转移到融合液中平衡 3 min, 用融合/激活液洗涤 3 遍后, 每批 5 个放入已经铺满融合液的融合槽内, 用拉制的且尖端很细的实心玻璃针拨动重组卵, 使供体细胞-受体卵细胞膜接触面与电极平行, 用 ECM2001 (BTX, USA) 融合仪施加一个 30 μs, 2.0 kv·cm⁻¹ 的直流电脉冲诱导融合同时激活, 用 NCSU-23%+4mg·ml⁻¹BSA 洗涤 5 遍, 立即转入矿物油覆盖的胚胎培养液中, 39℃, 5%CO₂, 100%湿度培养 0.5~1 h 后取出, 在体视显微镜 (SMZ1000, Nikon) 下判定融合。将融合的重构卵/胚用胚胎培养液洗涤 3 遍后转入胚胎培养液滴内 (每个 30 μl 的液滴培养 8~10 个重构胚)。

1.3.5 囊胚差异染色 将囊胚放入 0.5% pronase 中去透明带后用 PVA-TL-HEPES 或者 PBS-PVA 洗涤 5 min×3 遍, 再放入 1:5 稀释的兔抗猪全血清中作用 1 h 取出, 放入 PVA-TL-HEPES 或者 PBS-PVA 中洗涤 5 min×3 遍, 然后转入含 10 μg·ml⁻¹PI 和 10 μg·ml⁻¹bisbenzimidazole 的 1:10 稀释的豚鼠补体液滴内作用 1 h, 接下来再用 PVA-TL-HEPES 或者 PBS-PVA 中洗涤 3 遍。最后, 将上述胚胎转移到干净的载玻片上的甘油液滴内, 尽量少带原液, 以胚胎所在处为中心, 在盖玻片大小范围内的四角做 4 个由凡士林/石蜡油组成的柱, 盖上盖玻片, 再轻轻压盖玻片, 最后用指甲油封片。然后在 Nikon E800 荧光显微镜下利用 UV 激发, 照相, 记录, 计数。ICM 呈蓝色, TE 呈粉红色到红色。

1.4 试验设计与统计分析

试验 1 不同来源的猪胚胎体外早期发育能力以及囊胚质量的比较。选择同批 MII 卵母细胞分别进行 IVF, SCNT 和 PA。培养 2 d 和 7 d 分别统计卵裂以及囊胚效率, 并对囊胚进行差异染色, 计算 ICM 细胞数

/总细胞数比例。

试验 2 比较了不同的胚胎培养基对孤雌激活胚的体外发育之影响。分别将同一激活方法处理的 MII 卵母细胞分别放在 PZM-3 和 NCSU-23 中培养。比较卵裂以及囊胚率以及囊胚质量即 ICM 细胞数/总细胞数。

试验 3 比较不同培养基对克隆胚胎的体外早期发育之影响。将所构建的克隆胚胎随机放入 PZM-3 或者 NCSU23 为基础培养基的胚胎培养液, 控制其它条件一致的情况下, 在 CO₂ 培养箱内培养 2 d 和 7 d 时分别记录卵裂以及囊胚形成的胚胎, 比较二组间卵裂率、囊胚率及胚胎细胞数异同。

对于卵裂率, 囊胚率使用 SPSS (Version 11.0) 进行 χ^2 分析, $P < 0.05$ 时即认为差异显著。对于囊胚总细胞数以及 ICM 细胞数/总细胞数比值利用方差分析检验有无显著差异, $P < 0.05$ 时认为有明显差异。

2 结果与分析

2.1 不同类型胚胎的体外发育以及囊胚 (图 1) 质比较

如表 1 所示, 体外培养的各种胚胎的卵裂, 囊胚形成基本接近, 囊胚总细胞数也相差无几。而在囊胚的细胞分布上, 体外受精囊胚的 ICM 细胞数/总细胞数

A. IVF 囊胚, 300 \times ; A'. IVF 囊胚差异染色, 400 \times ; B. SCNT 囊胚, 200 \times ; B'. SCNT 囊胚差异染色, 400 \times ; C. PA 囊胚, 200 \times ; C'. PA 囊胚差异染色, 400 \times 。蓝色表示内细胞团细胞; 粉红色示滋养外胚层细胞
A. IVF blastocyst, 300 \times ; A'. differential staining of IVF blastocyst, 400 \times ; B. SCNT blastocyst, 200 \times ; B'. differential staining of SCNT blastocyst, 400 \times ; C. PA blastocyst, 200 \times ; C'. differential staining of PA blastocyst, 400 \times . Blue are inner cell masses and Pink are trophoblast cells

图 1 通过 IVF, SCNT 以及 PA 方式获得的囊胚以及各种囊胚的差异染色

Fig. 1 Blastocyst derived from IVF, SCNT and PA and differential staining of them

比例和克隆囊胚相近, 二者都明显高于孤雌激活囊胚。

2.2 不同胚胎培养基对孤雌胚体外发育的影响

PZM-3 培养孤雌胚胎可以使囊胚率以及总细胞数都有明显提高 (表 2) 虽然卵裂率没有明显改善。

2.3 不同胚胎培养基对克隆胚体外发育的影响

PZM-3 培养胚胎卵裂率明显低于 NCSU-23 的培养效果, 尽管到囊胚阶段的发育相近。如表 3 所示, NCSU-23 培养克隆囊胚比 PZM-3 高, 虽然没有统计学意义上的差异。

3 讨论

本研究比较了 NCSU-23+4 mg·ml⁻¹ BSA 培养所获

体外受精胚、孤雌激活胚和核移植克隆胚的发育情况, 三者之间在卵裂率, 囊胚率方面差异不显著, 但囊胚细胞分布即内胚团细胞 (ICM) 占总细胞数的比例不同: 体外受精囊胚和核移植囊胚比例相近, 都比孤雌激活囊胚高 (图 1)。在 Koo 等^[6]的研究中, 体外受精胚和核移植胚也无论是囊胚率还是总细胞数都没有差异, 但是都比体内胚胎的囊胚率, 总细胞数以及 ICM 细胞数/总细胞数比例差。关于孤雌细胞数研究的比较多, 但是就其细胞分布 (ICM 细胞数/总细胞数比例) 研究较少。本试验发现孤雌激活囊胚的 ICM 细胞数变化很大, 有的胚胎甚至在染色后观察不到。所以, 孤雌胚胎在体内发育能力差可能和 ICM 很少, 不稳定有关。

表 1 不同类型胚胎的体外发育以及囊胚质量比较

Table 1 Effects of embryos origin on *in vitro* developmental competence and on integrity of blastocysts

胚胎类型 Embryos resource	培养数 No. embryos cultured	卵裂数 ¹⁾ (卵裂率) No. embryos cleaved(%) ^a	囊胚数 ²⁾ (囊胚率) No. blastocyst (%)	总细胞数 Total cell number of BL (mean±S.D.)	ICM 细胞数/总细胞数比例 Ratio of ICM to total cell number (mean±S.D.)
克隆胚 NTEs	526	334(63.5)	89(16.9)	32±10(n=25)	0.356±0.079(n=6) ^c
孤雌胚 PAEs	716	472(66.0)	162(22.6)	34±11(n=40)	0.122±0.117(n=10) ^d
体外受精胚 IVFEs	210	151(72.0)	24(11.0)	35±9(n=12)	0.448±0.086(n=6) ^c

¹⁾卵裂率=卵裂数/培养数; ²⁾囊胚率=囊胚数/培养数; 同栏内不同字母表示有显著差异。下同

¹⁾Percentage of cleaved embryos to embryos cultured; ²⁾ Percentage of Blastocysts to embryos cleaved; Values with different superscripts in the same column are significantly different. The same as below

表 2 不同胚胎培养基对孤雌胚体外发育的影响

Table 2 Effects of embryo culture media on PAE's *in vitro* developmental competence

基础培养基 Basic culture media	激活处理卵数 No. oocytes activated	卵裂数(卵裂率) No. embryos cleaved(%)	囊胚数(囊胚率) No. Blastocyst(%)	囊胚总细胞数 Total cell number of BL (mean±S.D.)
PZM +BSA	557	356(63.9)	197(35.4) c	49±17(n=44)c
NCSU-23+BSA	716	472(65.9)	162(22.6) d	34±11(n=40) d

表 3 不同胚胎培养基对克隆胚体外发育的影响

Table 3 Effects of culture media on *in vitro* developmental competence of pig NTEs

胚胎培养基 Embryo culture media	培养胚胎数 No. embryos cultured	卵裂数(卵裂率) No. embryos cleaved(%)	囊胚数(囊胚率) No. Blastocysts(%)
PZM-3	40	19 (47.5)c	4 (21.1)
NCSU-23	526	334 (63.5)d	89 (26.6)

笔者所得到的体外受精胚囊胚率为 11%。此结果和 Betthausen 等^[7] 14%的囊胚率相近。卢晟盛等^[8]用 PVA 取代 BSA 添加到 NCSU-23 中, 体外受精胚囊胚率为 34%~38%, 囊胚细胞数为 41~48。但卢晟盛等在国内用 FBS 添加到 NCSU-23 中, IVF 胚囊胚率也只有 4%~6%。在孤雌激活方面, 笔者的培养体系 NCSU-23+BSA 支持胚胎卵裂为 65.9%, 囊胚率为 22.6%。而吴中红等^[9,15]得到的卵裂率为 73%, 囊胚率为 25%; 邢凤英等^[16]得到的卵裂率为 21%~80%, 囊胚率为 0~47%; 囊胚总细胞数则变动在 14~28 之间。Lee 等^[10]的囊胚率曾经达到 56.3%; Zhu 等^[11]也得到过 50%的孤雌激活囊胚率。当然, 孤雌激活发育的结果不仅仅受胚胎培养体系的影响, 还在很大程度上取决于卵母细胞质量、体外成熟的优劣以及激活方式或者电激活参数等等^[15,16]。核移植胚胎发育方面, 笔者得到了 63.5%的卵裂率和 16.9%的囊胚发育率, 总细胞数为 32 左右。而在密苏里哥伦比亚大学 Prather 研究组^[12], 利用 IVM 卵母细胞为受体, 胎儿成纤维细胞供体, 运用电刺激激活, 则克隆胚在体外培养 24~36h 卵裂率为 60%~80%; 7 d 后囊胚率 10%~40%, 囊胚总细胞数在 25~35。Betthausen 等^[7]得到核移植囊

胚率为 4%~8% (72/995)。

笔者比较了不同培养基对孤雌激活胚胎发育以及体细胞核移植胚胎发育的影响。发现对孤雌激活胚胎来讲, PZM-3 (PZM+3 mg·ml⁻¹ BSA) 培养的卵在激活后卵裂率虽然和 NCSU-23+4 mg·ml⁻¹ BSA 相近, 但是随后的囊胚率以及囊胚总细胞数都有明显增加。而在培养体细胞核移植胚胎时, 笔者发现 PZM-3 培养时卵裂率显著下降, 而囊胚率虽然看上去也比 NCSU-23 低, 虽然没有统计学意义。Im 等^[13]比较了 NCSU-23 和 PZM-3 培养孤雌胚和克隆胚的效果, 在孤雌激活胚上的结果是 PZM-3 好于 NCSU-23, 和笔者的结果相似。但他们发现在克隆胚培养上, PZM-3 仍然要优于 NCSU-23, 这与笔者的结果不一致。推测可能是由于笔者在卵母细胞成熟, 胚胎培养所用的 BSA 批号, 以及克隆胚胎电激活方面都不同所致。就笔者的结果而言, 似乎培养基在支持胚胎发育上具有依赖性。因此, 在今后的试验中, 利用孤雌激活胚来检验胚胎培养基的优劣时应保持谨慎。因为在牛上的研究^[2]表明, 克隆胚和体外受精胚对胚胎营养的需求不同, 而 Gao 等^[3]也在小鼠克隆胚胎培养上发现核移植胚对培养基的反应和体外受精胚不一致。所以, 有可能对孤

雌胚或者体外受精胚理想的培养基,当用于克隆胚胎培养时却不一定是最佳的选择。

4 结论

(1)PAEs 的囊胚质量在 3 种来源的胚胎中最差;

(2)对 PAEs 理想的培养基,当用于 NTEs 培养时却不一定是最佳的选择。

致谢:衷心感谢农业生物技术国家重点实验室费菁老师,中国科学院遗传与发育研究所博士后李彦欣,北京济普霖生物技术公司王刚在试验取材方面提供的帮助。

References

- [1] Prather R S, Day B N. Practical considerations for the *in vitro* production of pig embryos. *Theriogenology*, 1998, 49: 23-32.
- [2] Mastro Monaco G F, Semple E, Robert C, Rho C J, Betts D H, King W A. Different culture media requirements of IVF and nuclear transfer bovine embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, 2004, 39: 462-467.
- [3] Gao S, Chung Y G, Williams J W, Riley J, Moley K, Latham K E. Somatic cell-like features of cloned mouse embryos prepared with cultured myoblast nuclei. *Biology of Reproduction*, 2003, 69(1): 48-56.
- [4] Machaty Z, Day B N, Prather R S. Development of early porcine embryos *in vitro* and *in vivo*. *Biology of Reproduction*, 1998, 59: 451-455.
- [5] Koo D B, Kang Y K, Choi Y H, Park J S, Kim H N, Oh K B, Son D S, Park H, Lee K K, Han Y M. Aberrant allocations of inner cell mass and trophectoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. *Biology of Reproduction*, 2002, 67: 487-492.
- [6] Koo D B, Kang Y K, Park J S, Park J K, Chang W K, Lee K K, Han Y M. A paucity of structural integrity in cloned porcine blastocysts produced *in vitro*. *Theriogenology*, 2004, 62: 779-789.
- [7] Betthausen J, Forsberg E, Augenstein M, Childs L, Eilertsen K, Enos J, Forsythe T, Golueke P, Jurgella G, Koppang R, Lesmeister T, Mallon K, Mell G, Misica P, Pace M, Pfister-Genskow M, Strelchenko N, Voelker G, Watt S, Thompson S, Bishop M. Production of cloned pigs from *in vitro* systems. *Nature Biotechnology*, 2000, 18: 1055-1059.
- [8] 卢晟盛, 卢克焕. 早期胚胎无蛋白质培养液的建立. *广西农业生物科学*, 2003, 22 (1): 41-45.
- Lu S S, Lu K H. Establishment of a chemically defined medium for culture of porcine early embryos. *Journal of Guangxi Agricultural and Biological Science*, 2003, 22(1): 41-45.
- [9] 吴中红, 邢凤英, 曾申明, 刘国世, 朱士恩, 张忠诚. 猪体外成熟卵母细胞激活方法的比较. *自然科学进展*, 2003, 485-489.
- Wu Z H, Xing F Y, Zeng S M, Liu G S, Zhu S E, Zhang Z C. Comparison of different activation methods of porcine *in vitro* matured oocytes. *Progress in Natural Science (Chinese edition)*, 2003, 13: 485-489.
- [10] Lee J W, Tian X C, Yang X. Optimization of parthenogenetic activation protocol in porcine. *Molecular Reproduction and Development*, 2004, 68(1): 51-57.
- [11] Zhu J, Telfer E E, Fletcher J, Springbett A, Dobrinsky J R, De Sousa P A, Wilmut I. Improvement of an electrical activation protocol for porcine oocytes. *Biology of Reproduction*, 2002, 66: 635-641.
- [12] Lai L, Prather R S. Production of cloned pigs by using somatic cells as donors. *Cloning Stem Cells*, 2003, 5: 233-241.
- [13] Im G S, Lai L, Liu Z, Hao Y, Wax D, Bonk A, Prather R S. *In vitro* development of preimplantation porcine nuclear transfer embryos cultured in different media and gas atmospheres. *Theriogenology*, 2004, 61: 1125-1135.
- [14] 张运海, 潘登科, 孙秀柱, 孙国杰, 王晓波, 刘晓辉, 李燕, 戴蕴平, 李宁. 利用体细胞核移植技术生产表达绿色荧光蛋白的猪转基因克隆胚胎. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2005, 35: 439-445.
- Zhang Y H, Pan D K, Sun X Z, Sun G J, Wang X B, Liu X H, Li Y, Dai Y P, Li N. Production of porcine cloned transgenic embryos expressing green fluorescent protein by somatic nuclear transfer. *Science in China: Series C*, 2005, 35: 439-445. (in Chinese)
- [15] 吴中红, 邢凤英, 刘国世, 曾申明, 朱士恩, 张忠诚, 伏彭辉. 猪体外成熟卵母细胞的电激活及其激活后的体外培养. *中国农业科学*, 2002, 35: 1537-1542.
- Wu Z H, Xing F Y, Liu G S, Zeng S M, Zhu S E, Zhang Z C, Fu J H. Studies on electrical activation of porcine oocytes matured *in vitro* and embryo culture systems. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, 35: 1537-1542. (in Chinese)
- [16] 邢凤英, 吴中红, 曾申明, 刘国世, 朱士恩, 张忠诚, 陈学进. 猪卵母细胞体外成熟和孤雌激活效率影响因素分析. *中国农业科学*, 2004, 37: 125-129.
- Xing F Y, Wu Z H, Zeng S M, Liu G S, Zhu S E, Zhang Z C, Chen X J. Effects of age of donors and conditions of preserving ovaries on porcine oocytes maturation *in vitro* and efficiency of parthenogenetic activation. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, 37: 125-129. (in Chinese)

(责任编辑 闫龙凤)