

## 利用体细胞核移植技术生产优秀种公猪

薛振华<sup>1</sup> 潘登科<sup>2</sup> 朱振营<sup>3</sup> 罗学明<sup>2</sup> 云鹏<sup>1</sup> 王晓凤<sup>1</sup> 肖炜<sup>1\*</sup>

(1. 北京市畜牧兽医总站, 北京 100107; 2. 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所, 北京 100193;  
3. 中国检验检疫科学研究院 动植物检疫研究所, 北京 100029)

**摘要** 为探讨体细胞核移植技术用于种公猪的实际生产, 复制优秀种公猪的可行性, 精选优秀种公猪作为供体, 取其耳组织成纤维细胞作核供体, 体外成熟的猪卵母细胞为核受体构建克隆胚胎, 胚胎体外培养后进行移植。试验先后移植了 3 437 枚 1~4 细胞期克隆胚胎到 18 头受体母猪的输卵管内, 28 d 经 B 超检测, 有 16 头受体母猪妊娠 (88.89%), 11 头妊娠足月 (68.75%) 分娩产下 53 头仔猪, 体细胞克隆猪的生产效率为 2.80% (出生仔猪/移植胚胎)。早期生长性状测定结果显示, 0 和 7 d 时克隆猪的体质量和体尺与普通公猪无显著差异 ( $P>0.05$ )。利用体细胞核移植技术生产克隆种公猪, 可以延伸种公猪的利用时间和空间, 放大优秀种猪的利用价值。

**关键词** 种公猪; 体细胞核移植; 胚胎移植; 克隆

中图分类号 S 828.9; Q 819

文章编号 1007-4333(2012)04-0118-05

文献标志码 A

## High performance boar cloned from somatic cell nuclear transfer

XUE Zhen-hua<sup>1</sup>, PAN Deng-ke<sup>2</sup>, ZHU Zhen-ying<sup>3</sup>, LUO Xue-ming<sup>2</sup>,  
YUN Peng<sup>1</sup>, WANG Xiao-feng<sup>1</sup>, XIAO Wei<sup>1\*</sup>

(1. Beijing Municipal Animal Husbandry and Veterinary General Station, Beijing 100107, China;

2. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;

3. Institute of Animal and Plant Quarantine, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100029, China)

**Abstract** To investigate the feasibility of the cloned high performance breeding boar by the technology of somatic cell nuclear transfer in actual production. The nuclear donors were selected from boars, ear organization cells, and the nuclear receptors come from some oocytes through *in-vitro* maturation. There are 3 437 pieces of 1~4 cells cloned embryos were transplanted to 18 receptors successively. Sixteen receptors were pregnancy (88.89%) at 28 d by B ultrasonic detection, and 53 piglets were obtained from 11 pregnancy receptors (68.75%). The cloned production efficiency was 2.80% (birth piglet/embryos). The determination results of growth characteristics showed that there is no significant difference in the measurement of cloned bodyweight and length ( $P>0.05$ ) from ordinary boars at 0 and 7 d. Therefore, the cloned boars from the technology of somatic cell nuclear transfer can extend the space and span of a boar and enlarge the use value of the outstanding boar.

**Key words** boar; somatic cell nuclear transfer; embryo transfer; clone

为加快我国养猪业的发展, 应用体细胞克隆技术, 在没有遗传材料的情况下也能生产出优秀种猪, 更重要的是可以使优良个体得以复制, 扩大其利用范围。猪的体细胞克隆相对于牛、羊等家畜难度大,

直到 2000 年才获得世界首例体细胞克隆猪<sup>[1]</sup>, 截止到目前生产克隆猪的总效率不到 1%<sup>[2]</sup>, 直接导致了制作克隆猪的成本高, 严重束缚着应用推广。我国已掌握克隆猪的制作方法<sup>[3]</sup>, 但在实际生产中, 应

收稿日期: 2012-02-27

基金项目: 北京市农业科技项目(20090612); 北京市优秀人才资助项目(2010D002006000004); 生猪产业技术体系北京市创新团队

第一作者: 薛振华, 畜牧师, 主要从事畜禽良种繁育研究, E-mail: xue1928@163.com

通讯作者: 肖炜, 高级畜牧师, 主要从事畜禽良种繁育研究, E-mail: w84929053@126.com

用克隆猪及其安全性评价方面还处于起步阶段<sup>[4-5]</sup>。本研究将体细胞核移植技术用于实际生产,旨在探讨复制优秀种公猪的可行性,为我国克隆猪的生产和应用提供技术支持。

## 1 材料与方 法

除特别注明外,所有化学试剂均购自 Sigma-Aldrich 公司(美国);细胞培养相关耗材为 BD Falcon(美国)产品;卵母细胞体外成熟以及胚胎培养耗材为 Nunc 公司(丹麦)产品。

### 1.1 供体选择及其供体细胞系的建立

依据北京市 2008 年种猪遗传评估报告,结合种公猪精液实际生产情况,以父系指数、达 100 kg 体质量校正日龄、达 100 kg 体质量校正背膘厚和平均每月生产合格精液数量 4 个生产性能指标为依据,制定大白猪和杜洛克 2 个品种的种公猪选择标准(表 1)。

表 1 供体种公猪选择标准

Table 1 Selection criteria of donor boar

| 选择项目               | 品 种 | 标 准  |
|--------------------|-----|------|
| 父系指数               | 大白  | >130 |
|                    | 杜洛克 | >130 |
| 100 kg 体质量校正日龄/d   | 大白  | <150 |
|                    | 杜洛克 | <155 |
| 100 kg 体质量校正背膘厚/mm | 大白  | <11  |
|                    | 杜洛克 | <12  |
| 月生产合格精液/头份         | 大白  | >100 |
|                    | 杜洛克 | >100 |

无菌操作取所选供体猪的耳部组织,采用常规组织块接种培养,建立细胞系,原代细胞用 DMEM 添加 20% 胎牛血清贴壁培养,传代细胞用 DMEM 添加 10% 胎牛血清培养,培养条件为 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的环境;细胞在体外经 3~5 次传代用于核移植。

### 1.2 卵母细胞体外成熟

从屠宰场采集初情期前母猪卵巢,放入含青、链霉素的 35 °C 生理盐水中,2 h 内运回实验室。用配有 18 号针头的 10 mL 注射器抽吸卵巢上 3~6 mm 的卵泡。体视镜下挑选卵丘包裹 3 层以上、致密、胞质均匀的卵丘细胞-卵母细胞复合体(cumulus-

oocyte-complexes, COCs), 卵母细胞体外成熟液(IVM 液)为 NCSU-23 添加 10% 猪卵泡液(pFF)、0.57 mmol/L 半胱氨酸、10 ng/mL 表皮生长因子(EGF)、10 U/mL 人绒毛膜促性腺激素(hCG)和 10 U/mL 孕马血清促性腺激素(eCG),培养条件为 38.5 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的环境。将 COCs 先在 IVM 液中培养(20±2) h,之后转移到无 hCG 和 eCG 的 IVM 液中继续培养(20±2) h;在 IVM 液中 40~44 h 后,将 COCs 转移到含 1 mg/mL 透明质酸酶中脱去卵丘细胞,挑选排出第一极体、卵黄膜完整、卵周隙清晰和胞质均匀的 M II 卵母细胞为核受体<sup>[6]</sup>。

### 1.3 体细胞核移植制作克隆胚胎

采用显微操作结合 spindle-view 系统去核和电融合法进行体细胞核移植:显微操作液为添加 7.5 μg/mL 细胞松弛素 B(CB)的 HEPES 缓冲无钙 NCSU-23。在 spindle-view 系统下去除 M II 卵的纺锤体及第一极体,选取 1 个体细胞注射到透明带下,并使之与卵母细胞质膜紧密接触,用 ECM2001 融合仪(BTX)施加 1 DC、2.0 kV/cm、30 μs 的直流电脉冲诱导融合并同时激活,融合/激活液为 0.28 mol/L 甘露醇、0.1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>、0.1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.5 mmol/L 的 HEPES 及 0.01% PVA 组成,融合的重构胚放入含 10 μg/mL CB 和 10 μg/mL 放线菌酮(Cycloheximide, CHX)的胚胎培养液 PZM-3 溶液中进行 2 次激活处理 4 h,最后转入胚胎培养液 PZM-3 内培养,体外发育到囊胚后进行早期移植<sup>[7]</sup>。

### 1.4 胚胎移植及妊娠检测

克隆胚胎体外培养 1~2 d 后,挑选形态和发育较好的胚胎进行移植,自然发情第 1 天或第 2 天的母猪用作受体(以出现压背静立反射为发情的第 0 天),移植方法为手术法输卵管深部移植。胚胎移植后 28 d,进行超声波妊娠检测。妊娠母猪每月超声波检测一次,跟踪胎儿发育情况,调整饲养管理,直至克隆猪出生。

### 1.5 微卫星 DNA 分析

应用微卫星 DNA 分析法检测体细胞克隆猪的基因型是否与供体细胞一致,DNA 样品来源于供体细胞系、6 头克隆猪和 3 头代孕母猪的耳部组织。选取 6 对分布于不同染色体的荧光标记的微卫星引物(SW24、SW72、SW857、SW122、S0070 和 S0226),对上述基因组进行 PCR 扩增,PCR 扩增产物在 ABI

377 全自动测序仪上进行电泳,以软件 Genescan3.1 对电泳结果进行基因型分析,计算出微卫星等位基因片段大小。

## 1.6 克隆后代生产性能测定

### 1.6.1 早期生长性状测定

在克隆猪出生 0 和 7 d 时,对克隆公猪和普通公猪进行生长性状的测定,测量项目包括体质量、体长、体高和胸围。

### 1.6.2 生产性能测定

在克隆后代体质量达到 80~105 kg 时,进行生产性能测定后计算 100 kg 体质量校正日龄和 100

kg 体质量校正背膘厚。

## 1.7 数据处理

应用 SPSS 13.0 软件,采用  $\chi^2$  确切概率法检验 28 d 妊娠率、妊娠足月率和克隆生产效率;对生长性状的测定值进行 *t* 检验和单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 供体种公猪选择及细胞系建立情况

共选择出符合标准的优秀种公猪 6 头作为供体(表 2),成功建立耳组织细胞系 5 个。其中,大白猪细胞系 3 个,杜洛克细胞系 2 头,并建立个体信息档案。

表 2 供体种公猪的性能指标

Table 2 Performance of the donor boar

| 供体编号 | 品种品系  | 100 kg 体质量<br>校正日龄/d | 100 kg 体质量校正<br>背膘厚/mm | 生产合格精液/<br>(份/月) | 细胞建系情况<br>(+/-) |
|------|-------|----------------------|------------------------|------------------|-----------------|
| 1#   | 美系大白  | 143                  | 9.3                    | 105              | +               |
| 2#   | 英系大白  | 143                  | 11.0                   | 105              | -               |
| 3#   | 英系大白  | 143                  | 10.2                   | 102              | +               |
| 4#   | 英系大白  | 140                  | 9.2                    | 110              | +               |
| 5#   | 台系杜洛克 | 154                  | 9.9                    | 110              | +               |
| 6#   | 美系杜洛克 | 155                  | 11.0                   | 130              | +               |

注: + 为建系成功, - 为建系失败。

## 2.2 克隆胚胎的体内发育

如表 3 所示,共向 18 头受体移植克隆胚胎 3 437 枚,妊娠受体接受的克隆胚胎全部来自 1#、5# 和 6# 3 个供体细胞系,情期受胎率(28 d 妊娠率)为 88.89%,妊娠分娩率为 68.75%,共产仔 53 头。当选择经产母猪作为受体时,情期受胎率、妊娠分娩率和克隆生产效率分别 92.31%、75% 和 2.91%,与选用后备母猪作为受体时的 80.0%、50.0% 和 2.26% 均无显著差异( $P>0.05$ )。在分娩的 11 头受体中,最早的胎次产仔 5 头,最多的胎次产仔 11 头(图 1)。



图 1 利用体细胞核移植技术获得的克隆猪  
Fig. 1 Cloned pig from SCNT

表 3 克隆胚胎移植后的体内发育

Table 3 *In-vitro* development of cloned embryos after transplantation

| 受体状况 | 移植受体<br>数量/头 | 移植克隆胚胎<br>数量/枚 | 28 d 妊娠数<br>(所占百分率/%) | 妊娠足月数<br>(所占百分率/%) | 产仔数(所占百分率/%,<br>产仔数/移植胚胎数) |
|------|--------------|----------------|-----------------------|--------------------|----------------------------|
| 经产母猪 | 13           | 2 421          | 12(92.31)             | 9(75.00)           | 46(2.91,46/1 581)          |
| 后备母猪 | 5            | 1 016          | 4(80.00)              | 2(50.00)           | 7(2.26,7/310)              |

2.3 微卫星分析鉴定

所产后代全部来自 1#、5# 和 6# 细胞系,微卫星鉴定结果如表 4 所示,6 对微卫星 DNA 分析证

实,抽测的 6 头克隆猪(4001-2、4001-3、4157-1、4157-2、4000-2 和 4003-1)和供体细胞系的基因型一致,而与代孕母猪(受体 a、b 和 c)无相关性,说明克

表 4 微卫星位点检测  
Table 4 Detection of the microsatellite loci

| 样品      | SW24    | SW72    | SW857   | SW122   | S0070   | S0226   |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1# 供体细胞 | 96/115  | 98/98   | 148/150 | 110/113 | 262/262 | 182/194 |
| 4157-1  | 96/115  | 98/98   | 148/150 | 110/113 | 262/262 | 182/194 |
| 4157-2  | 96/115  | 98/98   | 148/150 | 110/113 | 262/262 | 182/194 |
| 4000-2  | 96/115  | 98/98   | 148/150 | 110/113 | 262/262 | 182/194 |
| 受体 b    | 96/115  | 106/108 | 143/147 | 110/115 | 270/277 | 182/194 |
| 5# 供体细胞 | 94/108  | 98/108  | 154/154 | 110/111 | 283/294 | 180/194 |
| 4001-2  | 94/108  | 98/108  | 154/154 | 110/111 | 283/294 | 180/194 |
| 4001-3  | 94/109  | 98/108  | 154/154 | 110/111 | 283/294 | 180/194 |
| 受体 a    | 115/115 | 98/100  | 143/143 | 109/109 | 293/293 | 194/200 |
| 6# 供体细胞 | 94/108  | 98/114  | 154/154 | 115/117 | 285/285 | 180/194 |
| 4003-1  | 94/109  | 98/114  | 154/154 | 115/117 | 285/285 | 180/194 |
| 受体 c    | 109/115 | 98/106  | 139/152 | 115/117 | 273/273 | 182/194 |

隆猪的遗传物质来自供体细胞。

按照国家标准<sup>[8]</sup>,随机抽取 6 头仔猪证实全部为克隆猪,可间接证实抽样总体 53 头仔猪全部为克隆猪。

2.4 克隆猪早期的生长性状

在出生 0 和 7 d 时,克隆仔猪的体质量、体长、体高和胸围均与普通仔猪的测量结果无显著差异 ( $P>0.05$ )(表 5)。

表 5 克隆仔猪与普通仔猪 0 和 7 d 的生长性状比较  
Table 5 Determination of growth characteristics at 0 and 7 d

| 试验对象 | 出生后时间/d | 体质量/kg    | 体长/cm      | 体高/cm      | 胸围/cm      |
|------|---------|-----------|------------|------------|------------|
| 克隆仔猪 | 0       | 1.22±0.08 | 23.10±0.67 | 16.50±0.45 | 23.60±0.66 |
|      | 7       | 2.16±0.12 | 27.70±1.06 | 20.30±0.61 | 29.20±1.32 |
| 普通仔猪 | 0       | 1.43±0.08 | 23.50±0.85 | 17.30±0.58 | 24.90±0.82 |
|      | 7       | 2.44±0.14 | 28.30±1.12 | 21.80±0.62 | 31.40±1.62 |

注:0 d 时,克隆仔猪  $n=16$ ,普通仔猪  $n=17$ ;7 d 时,克隆仔猪  $n=5$ ,普通仔猪  $n=9$ 。 $P>0.05$ 。

2.5 克隆猪生产性能

以编号为 11104 的供体及其克隆后代为例,生产性能指标见表 6。

表 6 克隆种公猪的生产性能

Table 6 Performance of the cloned boar

| 试验对象* | 样品数 | 100 kg 体质量校正日龄/d | 100 kg 体质量校正背膘厚/mm |
|-------|-----|------------------|--------------------|
| 克隆后代  | 7   | 148.82±2.79      | 9.8±0.3            |
| 供体    | 1   | 143.00           | 9.3                |

注:\* 品种为美系大白。

3 讨论

本研究移植 3437 枚 1~4 细胞期克隆胚胎到 18 头受体母猪的输卵管内,28 d 时 B 超检测有 16 头受体母猪妊娠,11 头妊娠足月并分娩,共产仔 53 头,体细胞克隆猪的生产效率为 2.80% (出生仔猪/移植胚胎),超过了公认 1%。利用体细胞核移植技术生产克隆动物是一个系统工程,要获得较为理想的生产效率,需要从胚胎生产、甄别选择、胚胎移植、受体选择和妊娠维持等一系列环节进行把控,本研究小组已就胚胎生产和甄别选择问题单独发文论

述<sup>[7]</sup>,故本试验仅就胚胎移植和受体选择进行探讨。

胚胎移植是生产克隆种公猪的关键环节,也是检测体外生产胚胎质量的有效途径之一。前期研究认为<sup>[9]</sup>,体细胞克隆猪胚胎在受体母猪排卵前进行胚胎移植可使体细胞克隆猪胚胎适应输卵管和子宫的环境,增加其受孕率,最佳时期是受体母猪卵泡发育处于即将排卵时进行胚胎移植,排卵后的受体母猪不适合作为培养1~2 d胚胎的移植受体。本试验按此思路进行胚胎移植,受体的情期受胎率(28 d妊娠率)为88.89%,妊娠分娩率为68.75%。Petersen等<sup>[10]</sup>采用体细胞克隆猪胚胎的发育程度与受体母猪的排卵状况不同步时(移植后24 h排卵)进行胚胎移植,12头受体母猪25 d的妊娠率为75%,妊娠足月率为75%。Harrison等人<sup>[11]</sup>采取受体母猪的发情比胚胎迟1 d的胚胎移植方案,10头受体母猪4头妊娠足月(40%)并产仔18头。当选择经产母猪作为受体时,情期受胎率和妊娠分娩率分别92.31%和75%,原因可能是将受体母猪卵泡发育状况作为判断体细胞克隆胚胎移植时机的标准,可以较准确地找出输卵管和子宫的环境适应体细胞克隆猪胚胎移植的最佳时机。本研究中,由于选择后备母猪做受体的数量较少,使统计学分析显示与选择经产母猪时的情期受胎率、妊娠分娩率和克隆生产效率均无显著差异,但要注意,选择使用经产母猪时,各项统计指标的绝对值均大于选用后备母猪。所以在实际生产中建议使用经产母猪,以获得较高的情期受胎率、妊娠分娩率和克隆生产效率,并且会在产后哺育方面和提高仔猪成活率上较有优势。

针对克隆猪出生后早期的个体发育研究报道较少。本研究比较了克隆公猪和普通公猪分别在0和7 d时的体质量、体长、体高和胸围,发现二者并无显著差异。Bashir等<sup>[12]</sup>分别对5只克隆母猪及其后代,在15和27周龄时的体质量和血液进行了检测,结果显示,与对照组正常猪的体质量和血液指标相比,均无显著差异。本研究的研究结果与Bashir等<sup>[12]</sup>的结论基本一致,同时也丰富了克隆猪出生早期个体发育方面的资料。

## 4 结 论

本研究将体细胞核移植技术用于实际生产,通

过选择优秀供体、胚胎移植时机和受体母猪,建立了制作克隆猪的技术平台,为我国生产克隆种公猪奠定基础并提供技术支持。

## 参 考 文 献

- [1] Polejaeva I A, Chen S H, Vaught T D, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells[J]. Nature, 2000, 407: 86-90
- [2] Martinez Diaz M A, Suzuki M, Kagawa M, et al. Effects of cycloheximide treatment on *in vitro* development of porcine parthenotes and somatic cell nuclear transfer embryos[J]. Jpn J Vet Res, 2003, 50(4): 147-155
- [3] 潘登科,张运海,孙秀柱,等. 低氧培养早期胚胎克隆小型猪[J]. 科学通报, 2006, 51(4): 415-419
- [4] EFSA Scientific Committee. Food safety, animal health and welfare and environmental impact of animals derived from cloning by somatic cell nucleus transfer (SCNT) and their offspring and products obtained from those animals[J]. The EFSA Journal, 2008, 767: 1-49
- [5] Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services U S. Animal Cloning: A Draft Risk Assessment[R]. Rockville: Center for Veterinary Medicine, 2006
- [6] 张运海,潘登科,孙秀柱,等. 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[J]. 中国科学 C 辑, 2005, 35(5): 439-445
- [7] 罗学明,肖炜,冯冲,等. 初次卵裂时间是猪克隆胚胎发育潜能的重要标识[J]. 生物化学与生物物理进展, 2010, 37(12): 1339-1345
- [8] 国家技术监督局. GB/T15482—1995 产品质量监督小总体计数一次抽样检验程序及抽样表[S]. 北京: 中国标准出版社, 1995
- [9] 潘登科,张莉,周艳容,等. 体细胞核移植生产转  $\omega$ -3 脂肪酸去饱和酶基因 sFat-1 克隆猪[J]. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2009, 39(3): 295-302
- [10] Petersen B, Lucas-Hahn A, Oropeza M, et al. Development and validation of a highly efficient protocol of porcine somatic cloning using preovulatory embryo transfer in peripubertal gilts[J]. Cloning Stem Cells, 2008, 10(3): 355-362
- [11] Harrison S, Boquest A, Grupen C, et al. An efficient method for producing alpha (1,3)-galactosyl transferase gene knock out pigs[J]. Cloning Stem Cells, 2004, 6(4): 327-331
- [12] Bashir M, Gretchen Z, Greg S, et al. Progeny of somatic cell nuclear transfer (SCNT) pig clones are phenotypically similar to non-cloned pigs[J]. Cloning Stem Cells, 2005, 7(2): 119-125