

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

A01K 67/00

A01K 67/027 C12N 5/00

C12N 15/00

# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00813714.5

[43] 公开日 2002 年 10 月 30 日

[11] 公开号 CN 1377225A

[22] 申请日 2000.9.13 [21] 申请号 00813714.5

[30] 优先权

[32] 1999.9.13 [33] US [31] 09/394,902

[86] 国际申请 PCT/US00/24958 2000.9.13

[87] 国际公布 WO01/19181 英 2001.3.22

[85] 进入国家阶段日期 2002.4.1

[71] 申请人 马萨诸塞大学

地址 美国马萨诸塞

[72] 发明人 S·L·斯蒂斯 J·赛贝利

J·罗贝尔

P·格鲁克

[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 唐伟杰

权利要求书 4 页 说明书 38 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 使用来自分化细胞的供体细胞或细胞核  
克隆猪以及多能猪的生成

[57] 摘要

本发明提供了用于核移植的改进方法,包括将供体分化猪细胞核移植到去核猪卵母细胞中。产生的核移植单位可用于通过生成胎儿和子代来增殖基因型和转基因基因型。本发明有助于生成遗传工程或转基因的猪胚胎、胎儿、和子代,因为可遗传修饰并克隆增殖供体细胞核的分化细胞来源。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

## 权利要求书

---

1. 克隆猪胎儿或活的子代的方法，包括：
  - a) 在适合于形成核移植 (NT) 单位的条件下，将期望的分化猪细胞或细胞核嵌入任选去核的猪卵母细胞或卵裂球中；
  - b) 若先前未除去，则由所述卵母细胞或卵裂球除去内源细胞核；
  - c) 激活产生的NT单位；
  - d) 任选培养所述NT单位；并
  - e) 将所述任选培养的NT单位移植到宿主哺乳动物中，使之发育成猪胎儿或动物。
2. 权利要求1的方法，其产生活的子代。
3. 权利要求1的方法，其中在所述分化猪细胞或细胞核中插入、除去、或修饰期望的DNA，由此生成遗传改变的NT单位。
4. 权利要求3的方法，还包括将胎儿发育成子代。
5. 权利要求1的方法，其包括培养所述激活的核移植单位直至超过2细胞发育阶段。
6. 权利要求1的方法，其中移植的NT单位是单细胞。
7. 权利要求6的方法，其中移植是在激活的同一天进行的。
8. 权利要求1的方法，其中在导入所述分化细胞或细胞核后将卵母细胞去核。
9. 权利要求1的方法，其中分化细胞或细胞核是增殖中（非休眠）细胞的。
10. 权利要求9的方法，其中所述分化细胞处于G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、或M期。
11. 权利要求1的方法，其中猪卵母细胞在体外成熟。
12. 权利要求1的方法，其中猪卵母细胞在体内成熟。
13. 权利要求1的方法，其中所述分化猪细胞或细胞核得自体细胞。
14. 权利要求1的方法，其中所述分化猪细胞或细胞核得自生殖细胞。
15. 权利要求1的方法，其中宿主动物包含一个或多个辅助胚胎。



16. 权利要求1的方法，其中分化细胞包含一处或多处当在人体内移植所述克隆胎儿或动物的细胞、组织、或器官时可抑制排斥的遗传修饰。

17. 权利要求1的方法，其中分化猪细胞或细胞核得自中胚层。

18. 权利要求1的方法，其中分化猪细胞或细胞核得自外胚层。

19. 权利要求1的方法，其中分化猪细胞或细胞核得自内胚层。

20. 权利要求1的方法，其中分化猪细胞或细胞核是成纤维细胞或细胞核。

21. 权利要求1的方法，其中分化猪细胞或细胞核是成熟的分化细胞或由其衍生的细胞核。

22. 权利要求1的方法，其中分化猪细胞或细胞核是胚胎或胎儿细胞或者细胞核。

23. 权利要求1的方法，其中分化猪细胞或细胞核是直接得自猪的增殖中细胞。

24. 权利要求1的方法，其中所述分化细胞或细胞核得自己在组织培养中扩增的增殖中细胞。

25. 权利要求1的方法，其中在核移植前将所述分化细胞或细胞核在体内增殖。

26. 权利要求25的方法，其中所述增殖猪细胞得自己注射猪细胞的SCID小鼠。

27. 权利要求25的方法，其中所述增殖细胞经过遗传修饰。

28. 权利要求27的方法，其中所述遗传修饰是使用重组病毒、病毒载体、裸露的DNA、或质粒载体进行的。

29. 权利要求1的方法，其中使去核卵母细胞在去核前成熟。

30. 权利要求1的方法，其中融合的核移植单位通过暴露于一次或多次电脉冲而得到激活。

31. 权利要求1的方法，其中融合的核移植单位通过暴露于离子霉素和DMAP而得到激活。

32. 权利要求1的方法，其中融合的核移植单位通过暴露于至少一

种衍生自精细胞的激活因子而得到激活。

33. 权利要求3的方法，其中将显微注射用于嵌入所述异源DNA。

34. 权利要求3的方法，其中将电穿孔用于嵌入异源DNA。

35. 依照权利要求1的方法获得的克隆的、任选转基因的猪胎儿或动物，其中所述胎儿或动物具有与先前存在的非胚性分化猪细胞相同的基因型，所述分化猪细胞任选已被遗传修饰。

36. 权利要求1的方法，还包括将克隆的NT单位与受精胚胎联合使用以生成嵌合胚胎。

37. 权利要求36的方法，其中包括将嵌合胚胎发育成子代。

38. 依照权利要求36的方法得到的嵌合胎儿。

39. 依照权利要求37的方法得到的嵌合子代。

40. 权利要求39的嵌合子代的后代。

41. 生成猪CICM（多能）细胞系的方法，包括：

a) 在适合于形成核移植（NT）单位的条件下，将期望的分化猪细胞或细胞核嵌入任选去核的猪卵母细胞中；

b) 若先前未进行，则除去内源卵母细胞细胞核；

c) 激活产生的NT单位；

d) 培养得自所述培养NT单位的细胞以获得猪CICM细胞系，它是多能的且可在组织培养中无限期维持。

42. 权利要求41的方法，其中包括培养所述激活的核移植单位直至获得可辨别的滋养外胚层和内细胞团。

43. 依照权利要求41的方法获得的CICM细胞系，其中所述细胞系是多能的且具有与先前存在的非胚性分化细胞相同的基因型。

44. 权利要求41的方法，其中在所述分化猪细胞或细胞核中插入、除去、或修饰期望的DNA，由此产生遗传改变的NT单位。

45. 依照权利要求44的方法获得的转基因CICM细胞系，其中所述细胞系具有与先前存在的经过遗传修饰的猪分化细胞相同的基因型。

46. 权利要求41的方法，其中对产生的CICM细胞系进行诱导而分化。

47. 权利要求44的方法，其中使CICM细胞发生分化。
48. 依照权利要求46的方法获得的分化细胞。
49. 克隆猪胎儿或活的子代的方法，包括：
  - a) 激活任选去核的猪卵母细胞；
  - b) 在所述激活步骤a之后或接近同时，将期望的分化猪细胞或细胞核移植到所述猪卵母细胞中以生成NT单位；
  - c) 若卵母细胞先前未去核，则除去内源卵母细胞细胞核；并任选经培养步骤，然后将所述NT单位移植到雌猪中以生成猪胎儿或动物。

## 说明书

---

### 使用来自分化细胞的供体细胞或细胞核克隆猪以及多能猪的生成

#### 相关申请的相互参考

本申请是1997年7月3日提交的美国流水号08/888,057的部分继续申请,而后者又是1997年1月10日提交的美国流水号08/781,752的部分继续申请,本文收入它们的内容作为参考。

#### 发明领域

本发明涉及包括将由分化猪细胞衍生的细胞核移植到去核猪卵母细胞或卵裂球中的克隆操作。细胞核被重新编程以指导克隆胚胎的发育,然后可将其移植到受体雌畜中以生成胎儿和子代,或者用于生成多能培养内细胞团细胞(CICM)。克隆胚胎还可联合受精胚胎以生成嵌合胚胎、胎儿、和/或子代。

#### 发明背景

将有蹄类内细胞团(ICM)细胞用于核移植的应用也已经有报导。例如,Collas等人,*Mol. Reprod. Dev.*, 38: 264-267, 1994,公开了将经裂解供体细胞显微注射到去核成熟卵母细胞中进行牛ICM核移植。Collas等人公开了将胚胎在体外培养7天以生成15个胚泡,在将其移植到牛受体中后导致4次怀孕和2次出生。同样,Keifer等人,*Biol. Reprod.*, 50: 935-939, 1994,公开了将牛ICM细胞在核移植操作中作为供体细胞核用于生成胚泡,在将其移植到牛受体中后生成7个活的子代。此外,Sims等人,*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6143-6147, 1993,公开了将细胞核由短期体外培养的牛ICM细胞移植到去核成熟卵母细胞中从而生成小牛。

还已经报导了在将细胞核移植到培养胚盘细胞中后生成活的小羊

(Campbell等人, *Nature*, 380: 64 - 68, 1996)。还有, 已经报导了牛多能胚胎细胞在核移植和生成嵌合胎儿中的应用 (Stice等人, *Biol. Reprod.*, 54: 100 - 110, 1996; Collas等人, *Mol. Reprod. Dev.*, 38: 264 - 267, 1994)。Collas等人证明了颗粒细胞 (成熟细胞) 可用于牛克隆操作而生成胚胎。然而, 没有证明发育经过早期胚胎阶段 (胚泡阶段)。同样, 颗粒细胞不容易培养, 而且只能由雌畜获得。Collas等人没有尝试在培养中增殖颗粒细胞或者遗传修饰那些细胞。Wilmut等人, *Nature*, 365: 810 - 813, 1997, 生成了由胎儿成纤维细胞衍生的核移植绵羊子代, 并由衍生自成年绵羊的一个细胞生成了一个子代。

与其它物种的细胞相比, 猪细胞的克隆更困难。下表例示了这种现象:

物种 (克隆难度由难至易)	克隆的细胞类型	生成的子代
猪 (Prather, 1989)	2和4细胞阶段的胚胎	是
猪 (Prather, 1989; Liu等人, 1995)	超过4细胞阶段	否
小鼠 (Cheong等人, 1993)	2、4、和8细胞阶段的胚胎	是
小鼠 (Tsunoda等人, 1993)	超过8细胞阶段	否
牛 (Kefer等人, 1994)	64 - 128细胞阶段 (ICM)	是
牛 (Stice等人, 1996)	来自ICM的胚胎细胞系	否
绵羊 (Smith等人, 1989)	64 - 128个细胞的阶段 (ICM)	是
绵羊 (Campbell等人, 1996)	来自ICM的胚胎细胞系	是
绵羊 (Wilmut等人, 1997)	胎儿和成熟细胞	是

生成转基因猪的领域也存在问题。通过目前的方法, 将异源DNA导入早期胚胎或在胎儿中分化成各种细胞类型的胚胎细胞系, 并最终发育成转基因动物。然而, 生成一只转基因动物需要许多早期胚胎, 因此这种操作是非常低效的。同样, 在经历将胚胎置于代孕雌畜中的时间和费用之前, 没有简单且有效的方法用于选择转基因胚胎。另外, 就早期胚胎转基因操作而言, 不容易实现基因打靶技术。

小鼠胚胎干细胞使得研究人员能够选择转基因细胞并进行基因打

靶。这能够比其它转基因技术实现更多的遗传工程。然而，必须将胚胎干细胞系和其它胚胎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。即使遵循这些防范措施，这些细胞也常常经历自发分化，从而不能通过目前可利用的方法用于生成转基因子代。同样，有些胚胎细胞系必须在不利于基因打靶操作的方式进行增殖。

用于在体外由早期植入前小鼠胚胎衍生胚胎干（ES）细胞系的方法是众所周知的（参阅如Evans等人，*Nature*, 29: 154 - 156, 1981; Martin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 7634 - 7638, 1981）。倘若存在成纤维细胞饲养层（Evans等人，*Id.*）或分化抑制源（Smith等人，*Dev. Biol.*, 121: 1 - 9, 1987），ES细胞可以未分化状态进行传代。

先前已经报导了ES细胞具有许多应用。例如，已经报导了ES细胞可作为体外分化模型，尤其是用于研究涉及早期发育调控的基因。在导入植入前小鼠胚胎后，小鼠ES细胞可生成种系嵌合体，由此证明了它们的多能性（Bradley等人，*Nature*, 309: 255 - 256, 1984）。

考虑到它们将基因组转移给下一代的能力，通过使用含或不含期望遗传修饰的ES细胞，ES细胞在家畜动物种系操作中具有潜在效用。此外，在家畜动物（如有蹄类）的情况下，来自像植入前家畜胚胎的细胞核支持去核卵母细胞发育至分娩期（Smith等人，*Biol. Reprod.*, 40: 1027 - 1035, 1989; Keefer等人，*Biol. Reprod.*, 50: 935 - 939, 1994）。这与来自超过8细胞阶段的小鼠胚胎的细胞核相反，据报导它在移植后不支持去核卵母细胞的发育（Cheong等人，*Biol. Reprod.*, 48: 958, 1993）。因此，来自家畜动物的ES细胞非常有价值，因为它们可以为核移植操作提供全能供体细胞核的潜在来源（经过或未经遗传修饰或其它）。

有些研究小组已经报导了据说多能的胚胎细胞系的分离。例如，Notarianni等人，*J. Reprod. Fert. Suppl.*, 43: 255 - 260, 1991，报导了由猪和绵羊胚泡建立据说稳定且多能的细胞系，它们展示的一



些形态学和生长特征与通过免疫手术由绵羊胚泡分离的内细胞团的原代培养细胞相似。同样, Notarianni等人, *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 41: 51-56, 1990, 公开了来自猪胚泡的推定多能的胚胎细胞系在培养中的维持和分化。Gerfen等人, *Anim. Biotech.*, 6(1): 1-14, 1995, 公开了由猪胚泡分离胚胎细胞系。在小鼠胚胎成纤维细胞饲养层中可以稳定维持这些细胞而不使用条件培养基, 而且据报导在培养过程中分化成几种不同的细胞类型。

此外, Saito等人, *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 201: 134-141, 1992, 报导了存活3代但在第4代后丧失的培养牛胚胎干细胞样细胞系。Handyside等人, *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 196: 185-190, 1987, 公开了将通过免疫手术分离的绵羊胚胎内细胞团在能够分离由小鼠ICM衍生的小鼠ES细胞系的条件下进行培养。Handyside等人报导了在这种条件下, 绵羊ICM贴壁、扩展、并发展ES细胞样细胞和内胚层样细胞区域, 但是在延长培养后只有内胚层样细胞是明显的。

最近, Cherny等人, *Theriogenology*, 41: 175, 1994, 报导了在长期培养中维持的据说多能的牛原始生殖细胞衍生细胞系。这些细胞在培养大约7天后生成ES样集落, 碱性磷酸酶(AP)染色阳性, 展示形成胚状体的能力, 并自发分化成至少两种不同的细胞类型。据报导这些细胞还表达转录因子OCT4、OCT6、和HES1的mRNA, 这是认为唯独由ES细胞表达的同源异型框基因模式。

同样在最近, Campbell等人, *Nature*, 380: 64-68, 1996, 报导了在对培养胚盘(ED)细胞(来自在促进在小鼠中分离ES细胞系的条件下培养9天的绵羊胚胎)进行核移植之后生成了活的小羊。作者得出结论, 来自第9天的绵羊胚胎的ED细胞在核移植中是全能的, 而且全能性在培养中得到维持。

Van Stekelenburg-Hamers等人, *Mol. Reprod. Dev.*, 40: 444-454, 1995, 报导了自牛胚泡内细胞团细胞分离和鉴定据说永久的细胞系。作者在不同条件下由第8或9天的牛胚泡分离并培养ICM, 以确定哪种饲养细胞和培养培养基对支持牛ICM细胞的贴壁和扩展最有效。他

们得出结论，培养ICM细胞的贴壁和扩展通过STO（小鼠成纤维细胞）饲养细胞（代替牛子宫上皮细胞）的使用和通过在培养培养基中添加经木炭吸收过的血清（而非普通血清）而得到增强。然而，Van Stekelenburg等人报导了他们的细胞系更像上皮细胞而非多能ICM细胞。

Smith等人，WO 94/24274，发表于1994年10月27日；Evans等人，WO 90/03432，发表于1990年4月5日；和Wheeler等人，WO 94/26889，发表于1994年11月24日，报导了据说可用于获得转基因动物的动物干细胞的分离、选择、和增殖。Evans等人还报导了由猪和牛物种衍生据说多能的胚胎干细胞，据说可用于生成转基因动物。另外，Wheeler等人，WO 94/26884，发表于1994年11月24日，公开了据说可用于生成嵌合和转基因有蹄类的胚胎干细胞。

因而，根据上文，由于ES细胞系在例如生成克隆或转基因胚胎和核移植中的潜在应用，显然许多小组已经试图生成ES细胞系。

因此，不管文献中先前已经报导了什么，仍然需要使用培养分化细胞作为供体细胞核来克隆猪的改进方法。

### 发明目的和概述

本发明的一个目的是提供使用分化细胞或由其衍生的细胞核作为供体细胞或细胞核通过核移植来生成克隆猪的新的且改进的方法。优选的是，这些分化细胞将包括处于G1、G2、或M期的活跃分裂中即非休眠（增殖中）的细胞，其任选可经过遗传修饰。

本发明的一个更具体目的是提供用于克隆猪的新方法，包括将分化猪细胞或其细胞核移植到去核猪卵母细胞或卵裂球中。

本发明的另一个目的是提供用于增殖具有经证明的遗传优势或其它期望性状的成年猪的方法。

本发明的另一个目的是，提供用于生成遗传工程或转基因猪（即NT单位、胎儿、子代）的改进方法。本发明还提供了遗传工程或转基因猪，包括由这种方法生成的那些猪。

本发明的一个更具体目的是，提供通过在将分化猪细胞或细胞核用于形成NT单位之前在该分化猪细胞或细胞核中插入、除去、或修饰期望的DNA来生成遗传工程或转基因猪的方法。本发明还提供了由这种方法生成的遗传工程或转基因猪。

本发明的另一个目的是提供用于生成猪CICM细胞的新方法，包括将分化猪细胞或细胞核移植到去核猪卵母细胞或卵裂球中，然后使用产生的NT单位生成多能CICM细胞。本发明还提供了由这种方法生成的多能猪CICM细胞和细胞系。

本发明的另一个目的是将这种猪CICM细胞用于治疗或诊断。

本发明的一个具体目的是将这种猪CICM细胞用于治疗或诊断在治疗上或在诊断上将受益于细胞、组织、或器官移植的任何疾病。CICM细胞可用于相同物种或交叉物种，如用于人类治疗。

本发明的另一个目的是将由猪NT单位、胎儿、或子代衍生的细胞或组织用于治疗或诊断在治疗上或在诊断上将受益于细胞、组织、或器官移植的任何疾病。这类疾病和损伤包括帕金森氏病、亨廷顿氏病、阿尔茨海默氏病、ALS、脊髓损伤、多发性硬化症、肌肉营养不良症、糖尿病、肝病、心脏病、软骨代换、烧伤、血管疾病、泌尿道疾病，以及用于治疗免疫缺陷、骨髓移植、癌症、其它疾病。可使用相同物种或交叉物种的组织。

本发明的另一个具体目的是将由依照本发明生成的猪NT单位、胎儿、或子代衍生的细胞或组织或者猪CICM细胞用于生成分化细胞、组织、或器官。

本发明的另一个具体目的是将由依照本发明生成的猪NT单位、胎儿、或子代衍生的细胞或组织或者猪CICM细胞在体外用于例如细胞分化研究和化验用途（如用于药物研究）。例如，可将猪CICM导入SCID小鼠。

本发明的另一个目的是将得自由猪NT单位、胎儿、或子代衍生的组织产生的细胞、组织、或器官或者猪CICM细胞用于提供移植疗法的改进方法。这种疗法包括例如治疗下列疾病和损伤：帕金森氏病、亨

廷顿氏病、阿尔茨海默氏病、ALS、脊髓损伤、多发性硬化症、肌肉营养不良症、糖尿病、肝病、心脏病、软骨代换、烧伤、血管疾病、泌尿道疾病，以及用于治疗免疫缺陷、骨髓移植、癌症、其它疾病。

本发明的另一个目的是提供由通过在将分化猪细胞或细胞核用于形成NT单位之前在该分化猪细胞或细胞核中插入、除去、或修饰期望的DNA序列而生成的猪NT单位、胎儿、或子代衍生的遗传工程或转基因组织或者猪CICM细胞。

本发明的另一个目的是将由依照本发明生成的猪NT单位、胎儿、或子代衍生的遗传工程或转基因组织或者猪CICM细胞用于基因疗法，特别是用于治疗和/或预防上文确定的疾病和损伤。

本发明的另一个目的是将由依照本发明生成的猪NT单位、胎儿、或子代衍生的组织或者猪CICM细胞，或者由依照本发明生成的猪NT单位、胎儿、或子代衍生的遗传工程或转基因组织或者猪CICM细胞作为细胞核供体用于核移植。

本发明的另一个目的是将依照本发明生成的遗传工程或转基因猪子代用于生产制药学上重要的蛋白质。

因此，本发明在一个方面提供了用于克隆猪（如胚胎、胎儿、子代）的方法，包括：

- a) 在适合于形成核移植（NT）单位的条件下，将期望的分化猪细胞或细胞核嵌入任选去核的猪卵母细胞或卵裂球中；
- b) 若受体猪卵母细胞或卵裂球先前未去核，则由所述猪卵母细胞或卵裂球除去内源细胞核；
- c) 激活产生的 NT 单位；并
- d) 将所述培养 NT 单位移植到宿主猪中，使之发育成胎儿。

任选地，培养激活的核移植单位直至超过2细胞的发育阶段。培养培养基将包含促进NT胚胎发育的已知成分，如激素、盐类，还可任选在抑制凋亡的化合物存在下进行培养，如caspase抑制剂。然而，这不是必需的，因为事实上可以在NT激活后立即移植一个细胞的NT胚胎而完成胎儿发育。

此外，宿主猪将任选包含“辅助胚胎”，如普通猪胚胎、单性胚胎、或四倍体胚胎，以促进克隆胚胎的发育。优选的是，辅助胚胎的数目是2-大约100个，优选2-50个，更优选2-10个。

胎儿的细胞、组织、和/或器官将可有利的用于细胞、组织、和/或器官移植领域，或者用于生成期望的基因型。

本发明还包括用于克隆遗传工程或转基因猪的方法，由此在将分化猪细胞或细胞核嵌入任选去核的卵母细胞或卵裂球中之前在分化猪细胞或细胞核中插入、除去、或修饰期望的DNA序列。通过这种方法生成的遗传工程或转基因猪将有利的用于细胞、组织、和/或器官移植领域，用于生成期望的基因型，和用于生产药用蛋白质。

若将克隆的胚胎、胎儿、或子代用于生成用于移植的细胞、组织、或器官，则还希望导入一种或多种遗传修饰以抑制排斥的风险。例如，已知特定的碳水化合物表位涉及排斥应答，即血管内皮上的Gal $\alpha$ 1-Gal。因此，可能有利的是敲除编码这些表位的基因，或者用人类蛋白质中存在的其它碳水化合物表位（“竞争性糖基化”）取代这些表位（如掩蔽）。具体而言，一种选择是导入人类组织学血液O(H)抗原（90%的人不引发针对它的抗体）以删除90%的 $\alpha$ Gal表达。或者，可通过导入 $\alpha$ 半乳糖苷酶的cDNA，并优选在可调控或组成性强启动子的控制下表达，从而在体内酶促消除 $\alpha$ Gal表位。还有另一个选择是消除半乳糖基转移酶的表达，如通过同源重组。同样，由于这将导入新的碳水化合物表位，因此可能希望同样通过敲除或酶促消除这些表位。

同样，由于已知主要组织相容性复合物（MHC）I型抗原引发免疫应答，因此可能希望消除涉及这种表达的基因的表达，如 $\beta$ 2-微球蛋白（形成I型分子中装配和表达必需部分的肽）、蛋白酶体亚基LMP-2和LMP-7、和/或肽转运蛋白TAP-1和/或TAP-2（TAP-1和TAP-2在肽片段开始它们细胞表面之旅时跨内质网膜转运这些肽片段）。

还有，上文所述的供体组织中抑制性细胞因子（诸如IL-4、可溶性CTLA-4、CTLA4-Ig、抗CD40、抗CD40-L（CD154）、受体-配体对的其它抑制剂、或Fas配体）局部表达的生理性下调可抑制排斥，例如通

过诱导对异种移植物的耐受性。同样，通过增强保护性基因的表达以抑制与内皮细胞激活有关的促炎药疗法和保护供体细胞、组织、或器官免于凋亡，由此预防或抑制排斥。例如，应激反应基因血红素加氧酶（HO-1）的表达可加强异种移植物的存活。同样，可过度表达抗凋亡基因（如抑制转录激活的基因）以增强异种移植物的存活。已经克隆了抑制凋亡的许多基因并测序。

还有，可消除内源猪逆转录病毒以预防这些序列插入宿主基因组的危险。

同样，由于补体激活是超急性排斥的关键媒介，因此可通过遗传修饰来抑制这种途径。具体而言，已知补体级联受到一组内皮蛋白质的紧密调控，包括衰变加速因子（DAF, CD55）、膜辅助因子蛋白（MCP, CD46）、和CD59，它们通常在补体级联的多个点担当抑制剂。这些蛋白质具有限制性活性，即它们只作用于同源（相同物种）靶分子。因此，可能有利的是在猪组织的血管内皮上导入编码人类补体抑制蛋白质（如DAF、MCP）的基因。同样，可能有利的是联合这些遗传方法以获得最佳结果，即生成引发排斥应答能力很低的细胞、组织、或器官。

还有，可以在移植到受体中之前在体外存在供体细胞和其它试剂（如CTLA4-Ig、免疫毒素、抗CD40-L）的情况下培养细胞、组织、或器官，从而在移植前诱导耐受性。

当然，可能仍然必需在移植后施用抗排斥试剂，包括例如环孢菌素、糖皮质激素、FK-506、雷帕霉素、硫唑嘌呤、及其衍生物。

本发明还提供了依照上述方法获得的猪及其子代。

本发明在另一方面提供了用于生成猪CICM（多能）细胞的方法，包括：

- a) 在适合于形成核移植（NT）单位的条件下，将期望的分化猪细胞或细胞核嵌入任选去核的猪卵母细胞或卵裂球中；
- b) 若先前未去核，则任选由卵母细胞或卵裂球除去内源细胞核；
- c) 激活产生的NT单位；并
- d) 培养得自所述培养NT单位的细胞以获得猪CICM细胞。

任选的是，培养激活的核移植单位直至超过2细胞的发育阶段。产生的猪CICM细胞可有利的用于细胞、组织、和器官移植领域。

随着本发明的上述和其它目的、优势、和特征将在下文中变得清晰，通过参考下文本发明优选实施方案的详细描述和所附权利要求，可以更清除的理解本发明的本质。

### 发明详述

本发明提供了通过核移植来克隆猪的改进操作。在本申请中，核移植或NT可互换使用。

依照本发明，将由分化猪细胞衍生的细胞核移植到去核猪卵母细胞或卵裂球中。细胞核被重新编程以指导克隆胚胎的发育，然后可将其移植到受体雌畜中以生成胎儿和子代，或者用于生成CICM细胞。克隆胚胎还可联合受精胚胎使用，以生成嵌合胚胎、胎儿、和/或子代。

本领域现有方法已经在克隆操作中使用了胚胎细胞类型。这包括Campbell等人 (*Nature*, 380: 64 - 68, 1996) 和Stice等人 (*Biol. Reprod.*, 54: 100 - 110, 1996) 的工作。在这两项研究中，胚胎细胞系是由怀孕少于10天的胚胎衍生的。在这两项研究中，在饲养层上维持细胞以防止将要用于克隆操作的供体细胞的明显分化。本发明使用分化细胞。

据说，来自绵羊的成熟细胞和胎儿成纤维细胞已经用于生成绵羊子代 (Wilmut等人, 1997)。然而，研究显示，猪的克隆比绵羊克隆更难。事实上，在研究的哺乳动物物种中，绵羊的克隆显得最容易，而猪的克隆显得最困难。因此，依照本发明使用分化细胞类型 (优选活泼分裂中的非休眠细胞，即处于G1、G2、或M期细胞) 实现的猪的成功克隆是意料外的成果。

因此，依照本发明，对猪的优越基因型进行增殖是可能的。这将能够增殖具有经证明的遗传优越性或其它期望性状的成年猪。猪的遗传进步将得到加速。通过本发明，潜在的可收获数以十亿计的胎儿或成年猪细胞，并用于克隆操作。这将在短期内生成许多相同子代。

本发明还能够通过使用可克隆增殖的细胞来源来简化转基因操作。这不需要将细胞维持在未分化状态。因此，更容易实现遗传修饰，包括随机整合和基因打靶。同样，通过使核移植联合在体外修饰并选择这些细胞的能力，该操作比先前的转基因胚胎技术更有效。依照本发明，这些细胞可克隆增殖而无需细胞因子、条件培养基、和/或饲养层，这进一步简化和便于转基因操作。在依照本发明将转染细胞用于克隆操作时，能生成可发育成胎儿和子代的转基因猪胚胎。同样，这些转基因克隆胚胎可用于生成CICM细胞系或其它胚胎细胞系。因此，本发明不需要在体外衍生和维持有益于遗传工程技术的未分化细胞系。

在特别适用于复杂遗传修饰的一个优选实施方案中，将遗传修饰期望的分化细胞，优选组织培养中的细胞，将这些遗传修饰细胞用于生成克隆胎儿或动物，然后由克隆胎儿或动物衍生分化细胞，进行另外的遗传修饰，并将产生的二次遗传修饰细胞在克隆中用作细胞或细胞核供体。这个过程（发明人称为“再克隆”）可用于生成需要大量时间的复杂遗传修饰。本质上，通过在不同步骤进行这种遗传修饰及随后的克隆，有可能生成期望遗传修饰而没有在进行所有期望遗传修饰前细胞潜在老化的问题。理论上，可根据需要数次重复这个过程。

可在体外无限维持依照本发明生成的转基因CICM细胞，由此可为稍后生成期望的分化细胞类型提供未分化多能细胞的无限供应。在优选的实施方案中，将依照共同转让的美国专利号5,905,042（完整收入本文作为参考）中公开的方法，将这些CICM维持于未分化状态。

本发明还可用于生成克隆猪胎儿、子代、或CICM细胞，它们可用于例如细胞、组织、和器官移植。通过由猪采集胎儿或成熟细胞，并将其用于克隆操作，可以在它们发育经过器官形成时由克隆胎儿获得多种细胞、组织、可能还有器官。也可以由克隆子代分离细胞、组织和器官。这种方法可以为许多医学和兽医治疗（包括细胞和基因疗法）提供“材料”来源。若将细胞移植回动物（该细胞是由该动物衍生的），则避免了免疫排斥。同样，因为可以由这些克隆分离许多细胞类型，



所以可使用其它方法学（诸如造血嵌合状态）在相同物种以及物种间的动物中避免免疫排斥。

因此，本发明在一个方面提供了用于克隆猪的方法。一般而言，将通过包括下列步骤的核移植方法生成猪：

- a) 获得期望的分化猪细胞作为供体细胞核或供体细胞的来源；
- b) 获得猪卵母细胞或卵裂球；
- c) 任选将所述卵母细胞或卵裂球去核；
- d) 例如通过融合或注射，将期望的分化细胞或细胞核移植到任选去核的卵母细胞或卵裂球中，以形成 NT 单位；
- e) 将 NT 单位去核以除去内源卵母细胞或卵裂球的细胞核（若先前未去核）；
- f) 激活产生的 NT 单位；并
- g) 将所述培养 NT 单位移植到宿主猪体内，使之发育成胎儿。

任选的是，培养激活的核移植单位直至超过2细胞的发育阶段。同样，任选宿主猪将包含一个或多个“辅助”胚胎，如普通猪胚胎、四倍体胚胎、或单性猪胚胎，以促进克隆胚胎的发育。

本发明还包括用于克隆遗传工程或转基因猪的方法，由此在将分化猪细胞或细胞核嵌入任选去核的卵母细胞或卵裂球中之前，在分化猪细胞或细胞核中插入、除去、或修饰期望的DNA序列（可以在嵌入供体细胞或细胞核之后进行去核）。

本发明还提供了依照上述方法获得的克隆猪及其子代。与先前的转基因和配种猪相反，这些克隆将包含与先前存在的用作核移植供体的分化细胞或细胞核相同的基因型。

除了上述用途以外，本发明的遗传工程或转基因猪可用于生产期望蛋白质，诸如制药学重要的蛋白质。然后可以由转基因猪的乳汁或其它流体或者组织分离所述期望蛋白质。或者，外源DNA序列可赋予转基因猪以农业有用性状，诸如疾病抵抗力、体脂肪减少、瘦肉产量增加、饲料转化改进、或后代性别比例改变。同样，外源DNA可编码一种或多种抑制异源宿主（如人）排斥这些细胞的DNA。在特别优选的实施

方案中，猪将表达一种或多种人基因，如那些编码结构蛋白（诸如胶原）、免疫蛋白、激素、酶、凝结因子的基因，优选插入在猪对应物中。这将有助于稍后的人蛋白质回收，因为这将不需除去同源猪蛋白质（如若在其中表达人因子VIII，则是猪因子VIII）。

本发明还提供了NT胎儿以及NT和嵌合子代在细胞、组织、和器官移植领域中的用途。

本发明在另一方面提供了用于生成猪CICM细胞的方法，包括：

- a) 在适合于形成核移植（NT）单位的条件下，将期望的分化猪细胞或细胞核嵌入任选去核的猪卵母细胞或卵裂球中；
- b) 除去内源卵母细胞或卵裂球细胞核（若先前未去核）；
- c) 激活产生的 NT 单位；并
- d) 培养得自所述培养 NT 单位的细胞以获得猪 CICM 细胞。

如上所述，优选培养操作公开于美国专利号5,905,042（完整收入本文作为参考）。任选培养激活的核移植单位直至超过2细胞的发育阶段。

猪CICM细胞可有利的用于细胞、组织、和器官移植领域，或者用于生成胎儿或子代，包括转基因胎儿或子代。

在用于本文时，胎儿指在胎生动物的子宫中已成形的未出生幼仔。在猪中，胎儿阶段指妊娠后30天直至出生。哺乳动物指由出生至死亡的成体。

任选的是，培养NT单位至大小为至少2-400个细胞，优选4-128个细胞，最优选大小为至少大约50个细胞。

核移植技术在文献中是已知的，且描述于发明背景中引用的许多参考文献中。特别是参阅Campbell等人，*Theriogenology*, 43: 181, 1995; Collas等人，*Mol. Repord. Dev.*, 38: 264 - 267, 1994; Keefer等人，*Biol. Reprod.*, 50: 935 - 939, 1994; Sims等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6143 - 6147, 1993; WO 94/26884; WO 94/24274; 和WO 90/03432（完整收入本文作为参考）。同样，美国专利号4,944,384和5,057,420描述了用于牛核移植的操作。

分化指细胞具有与周围结构或起源细胞不同的特征或功能。分化猪细胞指那些晚于胚胎早期的细胞。更具体的说，分化细胞是那些来自至少晚于胚盘期（牛胚胎形成第10天）的细胞。分化细胞可衍生自外胚层、中胚层、或内胚层。

在优选的实施方案中，分化细胞将是活泼增殖中（非休眠）细胞，即处于G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、或M期。这些细胞可由成年或胎儿猪直接获得，或者可由体外培养物分离。还有，这些分化中细胞可衍生自非猪动物，如移植了猪免疫细胞的SCID小鼠。可作为供体细胞或细胞核使用的合适分化细胞包括体细胞和生殖细胞，以及由其衍生的细胞核。

可通过众所周知的方法来获得猪细胞。可用于本发明的猪细胞包括例如上皮细胞、卵丘细胞（cumulus cells）、神经细胞、表皮细胞、角质细胞、造血细胞、黑素细胞、软骨细胞、淋巴细胞（B和T淋巴细胞）、红细胞、树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、单核的细胞、和其它免疫细胞、成纤维细胞、心肌细胞、和其它肌细胞等等。此外，用于核移植的猪细胞可得自不同器官，如皮肤、肺、胰、肝、胃、肠、心、生殖器官、膀胱、肾、尿道、和其它泌尿器官等等。同样，特定分化细胞类型的干细胞可能是有用的供体细胞，如造血干细胞。这些只是合适供体细胞的范例。合适供体细胞，即可用于本发明的细胞，可得自机体的任何细胞或器官。如上所述，供体细胞意欲包括体细胞和生殖细胞二者。

例如，在生殖细胞的情况中，这将特别包括原始生殖细胞。

成纤维细胞是理想的细胞类型，因为它们可由发育中胎儿和成年猪大量获得。成纤维细胞稍有分化，因而先前认为它是用于克隆操作的较差细胞类型。重要的是，这些细胞易于在体外增殖，倍增时间短，而且可克隆增殖，以用于基因打靶操作。再次指出，本发明是新的，因为使用了分化细胞类型。本发明比较有利，因为这些细胞易于在体外增殖、遗传修饰、和选择。

用于分离卵母细胞的方法在本领域是众所周知的。本质上，这将包括由猪的卵巢或生殖道分离卵母细胞。容易获得的猪卵母细胞来源

是屠宰场材料。

为了诸如遗传工程、核移植、和克隆等技术的成功应用，在将这些细胞作为受体细胞用于核移植之前，可以使卵母细胞在体外成熟。该过程通常需要从猪卵巢（如在屠宰场得到的猪卵巢）收集未成熟（前期I）卵母细胞，并在授精或去核之前使卵母细胞在成熟培养基中成熟直至卵母细胞达到中期II，在猪卵母细胞的情况中，这通常发生于抽吸后大约35-45小时。为了本发明的目的，将这段时间称为“成熟期”。在用于本文计算时长时，“抽吸”指由卵巢滤泡抽吸未成熟卵母细胞。目前优选的猪卵巢滤泡抽吸方案公开于下文实施例。

另外，已在体内成熟的中期II卵母细胞已经成功的用于核移植技术。例如，在动情期开始或者注射人绒毛膜促性腺激素（hCG）或类似激素35-48小时后，通过手术由未超排卵或超排卵的母牛或小母牛收集成熟中期II卵母细胞。类似操作也可用于猪。合适操作描述于下文实施例。

据报导，去核和核移植时卵母细胞的成熟阶段对NT方法的成功是重要的（参阅如Prather等人，*Differentiation*, 48: 1-8, 1991）。然而，预计未成熟卵母细胞也可与分化细胞或细胞核融合并用于生成核移植胚胎。例如，可在融合后在体外使卵母细胞成熟。然而，一般而言，成功的哺乳动物胚胎克隆实践使用中期II卵母细胞作为受体卵母细胞，因为认为在这个阶段卵母细胞可以是或者是充分“激活的”，从而像对授精精子一样对待导入的细胞核。在家畜中，卵母细胞激活期的范围通常为抽吸后大约16-52个小时，优选大约35-45个小时。

例如，可在体外在合适成熟培养基中使未成熟卵母细胞成熟。优选而非必需的是，在体外使猪卵母细胞成熟，如通过将卵母细胞置于添加pFF、 $\beta$ -巯基乙醇、半胱氨酸、EGF（表皮生长因子）、HCG/PMSG、和cAMP的NCSU37培养基（成份见下文）中大约22小时，然后用HECM/HEPES和蔗糖清洗，优选3次，再然后置于不含激素的相同NCSU37培养基中达大约20小时。这优选在4孔Nunc板中进行。

还优选在去核前处理成熟卵母细胞，其中成熟可在体外（如上所

述)或体内进行。这是为了除去卵丘细胞而进行的。这可优选通过透明质酸酶处理及随后的旋涡震荡来进行。

如上所述,可在体内使卵母细胞成熟随后旋涡震荡,通过诱导卵母细胞体内成熟的形成并收集这些成熟卵母细胞。例如,可给母猪注射PG600,并收集成熟卵母细胞,通常在大约5-6天后,即动情期后24-36小时。这可如下进行,由送到屠宰场的动物切下生殖道,由此解剖输卵管,优选用合适培养基冲洗,然后由卵丘细胞剥离卵母细胞。这可通过用于体外成熟卵母细胞的相同方法进行,如通过透明质酸酶处理及随后旋涡震荡。

成熟后(若在体外进行,通常需要大约30-50小时,优选大约40小时),优选将卵母细胞去核。然而,这不是必需的,因为去核也可在移植供体细胞或细胞核后进行。优选对通过上述或其它操作获得的剥离卵母细胞筛选极体,并优选将选择的中期II卵母细胞(通过极体的存在来确定)用于核移植。去核可在导入供体分化细胞或细胞核之前或之后进行。去核可通过已知方法进行,诸如描述于美国专利号4,994,384,收入本文作为参考。在优选的实施方案中,卵母细胞将暴露于NCSU23培养基(含0.2567mg/10ml蔗糖)和HXT达20分钟或更长。然后优选在添加松胞菌素B的HECM/HEPES和蔗糖(0.2567mg/10ml)培养基中进行去核。去核后,将卵母细胞置于合适培养基中,如含蔗糖(0.2567mg/10ml)的NCSU23。或者,对于立即去核,可将中期II卵母细胞置于HECM中,任选含7.5 $\mu$ g/ml松胞菌素B(CB)和0.15M蔗糖。任选地,可在合适培养基中(例如胚胎培养培养基诸如NCSU23,见实施例中的表)于39 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>维持这些卵母细胞,稍后去核,优选不超过稍后24小时。

可通过显微手术使用微量移液管除去极体及附近细胞质来进行去核。筛选卵母细胞以鉴定那些已经成功去核的卵母细胞。该筛选优选通过在合适培养基(如NCSU23)中用合适染料(如1 $\mu$ g/ml 33342 Hoechst染料)给卵母细胞染色达20分钟,然后目测是否实现去核(如在少于10秒钟的紫外线照射下观察)来进行。然后可将已经成功去核

的卵母细胞置于合适培养基中，如NCSU23和蔗糖（0.2567mg/10ml）、HECM和0.15M蔗糖。

在本发明中，受体卵母细胞将优选在成熟开始后大约30小时 - 大约50小时的时间范围内进行去核，更优选成熟开始后大约38小时 - 大约46小时，最优选成熟开始后大约42小时进行去核。

然后将单个猪分化细胞，如体细胞或生殖细胞，猪细胞或细胞核移植到用于生成NT单位的优选去核的卵母细胞或卵裂球的卵周隙中。然而，如上所述，如果需要，可在融合后进行去核。依照本领域已知方法，将猪细胞和去核卵母细胞用于生成NT单位。例如，可通过电融合来融合细胞。电融合是通过提供足以引起细胞质膜瞬时降解的电脉冲来进行的。这种细胞质膜降解的时间非常短，因为膜快速重构。因此，若两片邻近膜被诱导降解并在重构脂双层时混合，则在这两个细胞之间将打开小通道。由于这些小开口的热力学不稳定性，它将扩大直至这两个细胞成为一个细胞。该过程的进一步讨论参考Prather等人的美国专利号4,997,384（完整收入本文作为参考）。可使用多种电融合培养基，包括如蔗糖、甘露醇、山梨醇、和磷酸盐缓冲液。还可使用Sendai病毒作为融合剂来进行融合（Graham, *Wister Inot. Symp. Monogr.*, 9: 19, 1969）。用于下文实施例的优选融合培养基包括0.28M甘露醇、10  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>、100  $\mu$ M MgSO<sub>4</sub>、和10mM 组氨酸，pH7.0。

在有些情况中（如小型供体细胞核），可能优选直接将细胞核注射到卵母细胞中而非使用电穿孔融合。这些技术公开于Collas和Barnes, *Mol. Reprod. Dev.*, 38: 264 - 267, 1994, 完整收入本文作为参考。

或者，在导入融合槽前，通过在以2:1、1:2、和0:1的比例含HECM的融合培养基中3次保温，可将NT单位逐步暴露于融合培养基。可通过多种方法使猪细胞和卵母细胞电融合，如在卵母细胞开始成熟后大约44小时，在500  $\mu$ m槽中应用90-120V、大约30  $\mu$ sec的电脉冲。融合后，将产生的融合NT单位在融合培养基中维持5分钟，然后置于HECM中10分钟，再然后是置于NCSU23+7.5mg/ml CB中直至激活。通常稍后进行

激活，通常稍后24小时以内，优选稍后大约1-9小时，最优选稍后大约2小时。

目前，优选方案是移植任选去核的经链霉蛋白酶处理（优选大约400  $\mu$  l/孔）的卵母细胞，在合适培养基（如HECM/HEPES）中稀释，离心（优选大约6000rpm达4分钟），并重悬于合适培养基（如HECM/HEPES）。或者，使用与上文相同的解离条件用TE处理卵母细胞。

在目前优选的方案中，供体细胞核或细胞的移植是在合适培养基中进行的，如HECM/HEPES+蔗糖（0.2567mg/10ml）。进行移植后，将产生的NT胚胎转移到合适培养基中，如含蔗糖（0.2567mg/10ml）的NCSU23。然后融合NT胚胎，优选通过在合适融合培养基中应用110V、大约30  $\mu$  sec的电流。如上所述，目前优选的融合培养基包含500ml Sigma水、0.28M甘露醇（25.51g）、100  $\mu$  M MgSO<sub>4</sub>（0.0123g）、和100mM 组氨酸（0.776g）。然而，也可用其它已知融合培养基替代。优选的是，然后将融合NT单位置于合适培养基（如HECM/HEPES）中，然后置于NCSU23和松胞菌素B（3  $\mu$  l/2ml）中在激活前进行大约2小时。

任选在成熟、操作（剥离卵丘细胞）、和/或激活过程中可使用一种或多种caspase抑制剂，以增强胚泡发育和活的子代的生成。它们的范例包括caspase3、caspase8、和caspase9。

可通过已知方法激活NT单位。可以在融合之前、同时、或之后进行激活。这些方法包括如在亚生理温度培养NT单位，本质上是对NT单位应用冷的或实际上凉的温度休克。最便利的是于室温培养NT单位，这相对于胚胎通常暴露的生理温度条件而言属于较冷。

合适激活方案包括：

#### 1. 离子霉素和DMAP的激活

- 1- 将卵母细胞置于5  $\mu$  M 离子霉素和2mM DMAP中达4分钟；
- 2- 将卵母细胞转移到含2mM DMAP的培养培养基中达4小时；
- 3- 漂洗4次并进行培养。

#### 2. 离子霉素DMAP和Roscovitin的激活

- 1- 将卵母细胞置于5  $\mu$  M 离子霉素和2mM DMAP中达4分钟；

2- 将卵母细胞转移到含2mM DMAP和200  $\mu$ M Roscovitin的培养培养基中达3小时;

3- 漂洗4次并进行培养。

### 3. 暴露于离子霉素随后是松胞菌素和环己酰亚胺的激活

1- 将卵母细胞置于5  $\mu$ M 离子霉素中达4分钟;

2- 将卵母细胞转移到含5  $\mu$ g/ml松胞菌素B和5  $\mu$ g/ml环己酰亚胺的培养培养基中达5小时;

3- 漂洗4次并进行培养。

### 4. 电脉冲的激活

1- 将卵细胞置于含100  $\mu$ M  $\text{CaCl}_2$ 的甘露醇培养基中;

2- 进行3次1.0kV $\text{cm}^{-1}$ 、20  $\mu$ sec的脉冲, 各隔22秒钟;

3- 将卵母细胞转移到含5  $\mu$ g/ml松胞菌素B的培养培养基中达3小时。

### 5. 暴露于乙醇随后是松胞菌素和环己酰亚胺的激活

1- 将卵母细胞置于7%乙醇中达1分钟;

2- 将卵母细胞转移到含5  $\mu$ g/ml松胞菌素B和5  $\mu$ g/ml环己酰亚胺的培养培养基中达5小时;

3- 漂洗4次并进行培养。

### 6. 显微注射adenophostin的激活

1- 给卵母细胞注射10-12pl含10  $\mu$ M adenophostin的溶液;

2- 将卵母细胞进行培养。

### 7. 显微注射精子因子的激活

1- 给卵母细胞注射10-12pl由灵长类、猪、牛、绵羊、山羊、马、小鼠、大鼠、兔、或仓鼠分离的精子因子;

2- 将卵细胞进行培养。

### 8. 显微注射重组精子因子的激活

### 9. 其它DMAP/离子霉素方案

通常在成熟后大约22-28小时, 将卵母细胞或NT单位置于大约2mM DMAP中大约1小时, 随后在5  $\mu$ g/ml松胞菌素B和20  $\mu$ g/ml环己酰亚胺中



保温大约2-12小时，优选大约8小时。

目前优选的激活方法是在含1mg/ml BSA的HECM/HEPES (H/H) 培养基中进行的3步激活方案。第一步，将所述NT融合体置于还含10 μM 离子霉素 (4 μl/2ml) 的所述H/H BSA培养基中达大约4分钟，随后用所述H/H培养基漂洗，并将NT融合体置于含DMAP (1 μl/ml) 的NCSU23培养基中达大约30分钟。第二步，再次将NT融合体置于含1mg/ml BSA且还含5 μM 离子霉素的H/H培养基中达大约4分钟，随后用H/H漂洗，并将经漂洗的卵母细胞置于NCSU23和DMAP(1 μl/ml) 中达大约30分钟。第三步，再次将NT融合体置于含1mg/ml BSA且还含5 μM 离子霉素和DMAP (1 μl/ml) 的H/H中达大约2小时。在这种激活方案之后，优选将激活的NT单位转移到合适培养基中，如NCSU23培养基。根据需要，通常在大约第3天，更换这种培养基或其它合适培养基。第5天，优选加入大约5% FBS，并将NT单位培养使形成胚胎。然而，如上所述，可在生成后几乎立即移植NT胚胎，即在第1天（处于单细胞阶段）移植可能会成功。

或者，可以如下在500 μm槽中激活猪NT单位：在包含0.28M 甘露醇、100 μM CaCl<sub>2</sub>、100 μM MgSO<sub>4</sub>、和10mM 组氨酸 (pH7.0) 的激活培养基中应用30V、30 μsec的电脉冲；1小时后，应用15V、30 μsec的第二次电脉冲。在两次脉冲之间，将NT单位维持于含CB的NCSU23中，39℃，5% CO<sub>2</sub>。

或者，还可以通过应用已知激活剂来进行激活。例如，受精过程中精细胞对卵母细胞的侵入或精细胞所含激活因子可激活NT单位。同样，诸如电学或化学休克、钙离子载体、蛋白激酶抑制剂等处理可在融合后用于激活NT胚胎。

还有，可在融合后大约1-2小时，将NT单位置于含5 μM离子霉素的HECM/HEPES 中达4分钟，随后用HECM/HEPES清洗3次，然后置于HECM/HEPES+松胞菌素B和离子霉素中达大约4分钟，用HECM/HEPES清洗3次，并置于含2mM DMAP (6-二甲基氨基嘌呤) 的NCSU23中达大约3小时，由此进行化学激活。然后，优选用HECM/HEPES将NT单位清洗大

约3-4次，并在胚胎移植前置于NCSU23中。

还有，激活后可将NT单位在NCSU23+CB中培养3-4小时，然后在不含CB的NCSU23中培养。如上所述，可在激活后任何时间将NT单位移植到受体雌畜中。

或者，此后可以在合适体外培养培养基中培养激活的NT单位，以生成CICM细胞和细胞集落。适用于培养和维持胚胎的培养培养基在本领域是众所周知的。已知培养基的范例包括Ham'S F-10+10%胎牛血清(FCS)、组织培养培养基-199(TCM-199)+10%胎牛血清、Tyrodes-清蛋白-乳酸-丙酮酸(TALP)、Dulbecco氏磷酸盐缓冲液(PBS)、Eagle氏和Whitten氏培养基。用于收集卵母细胞和使之成熟的最常用培养基之一是添加1-20%血清的TCM-199，包括胎牛血清、新生血清、动情期母牛血清、小羊、猪、或阉牛血清。优选的维持培养基包括含Earl盐、10%胎牛血清、0.2mM丙酮酸钠、和50 $\mu$ g/ml硫酸庆大霉素的TCM-199。更优选的是，所用培养基是NCSU23，而且激活后2-5天，在新鲜NCSU23+5-10%胎牛血清中培养NT单位。任何上述方法还包括与多种细胞类型的共培养，诸如颗粒细胞、输卵管细胞、BRL细胞、子宫细胞、和STO细胞。

另一种维持培养基描述于Jr. Rosenkrans等人的美国专利号5,096,822，收入本文作为参考。这种称为CR1的胚胎培养基包含支持胚胎所必需的营养物质。

可以在NCSU23+5-10%FCS中培养NT单位，直至NT单位达到期望的大小，然后将它们移植到受体雌畜中，或者用于生成CICM细胞或细胞集落。例如，可培养这些NT单位，直至至少大约2-400个细胞，更优选大约4-128个细胞，最优选至少大约50个细胞。或者，可将单细胞NT胚胎（即激活后第1天生成的胚胎）导入受体雌畜。在合适条件下进行培养，即大约38.5 $^{\circ}$ C，5%CO<sub>2</sub>，通常大约每2-5天、优选大约每3天更换培养培养基以优化生长。

可使用胚胎移植工业中使用的标准操作进行本发明中用于胚胎移植和受体动物管理的方法。比较希望是同步移植，即NT胚胎的阶段与

受体雌畜的动情周期同步。这种优势和如何维持受体描述于Wall等人，“离心后能够呈现前核和细胞核的猪卵子的发育”（Development of porcine ova that were centrifuged to permit visualization of pronuclei and nuclei），*Biol. Reprod.*，32: 645-651, 1985，将它的内容收入本文作为参考。

如上所述，比较希望受体雌畜还包含“辅助”胚胎，但并非必需如此。这些辅助胚胎包括普通猪胚胎（如通过天然或人工方法生成的胚胎）、单性胚胎（不会生成活的子代的已激活、未受精的胚胎）、和四倍体胚胎。已发现这可增强克隆猪的发育和维持。

这些辅助胚胎的数目可显著变化，即由大约1-2个至多达100个。猜测这些辅助胚胎可生成增强胚胎发育和/或克隆胚胎移植的物质，如激素和生长因子。单性辅助胚胎或四倍体辅助胚胎的优势是会发育成活子代的唯一子代是克隆胚胎。然而，可通过遗传分析来确认克隆子代的生成，如通过PCR或通过检测克隆DNA序列的表达或存在（如通过原位杂交），或者通过检测克隆DNA的表达（如通过使用放射性标记抗体或其它探针）。

如上所述，本发明特别可用于生成遗传工程或转基因的克隆猪。本发明的优势在于通过使用可克隆增殖的分化细胞来源可简化转基因操作。具体而言，用作供体细胞核的分化细胞已经插入、除去、或修饰了期望DNA序列。然后将那些遗传改变的分化细胞与去核卵母细胞一起用于核移植。

用于在哺乳动物细胞中插入、除去、或修饰期望DNA序列的任何已知方法可用于改变将用作细胞核供体的分化细胞。这些操作可除去所有或部分DNA序列，而且DNA序列可以是异源的。所包括的有能够在细胞基因组中特定位点插入、删除、或修饰DNA序列的同源重组技术。在优选的实施方案中，将“敲除”内源猪基因，并“敲入”人同源物，如编码免疫学蛋白质、激素、结构蛋白、凝结因子、酶、受体、或其它克隆基因的DNA。

本发明因而可用于提供具有期望基因型的成年猪。具有经证明的

遗传优越性或其它期望性状的成年猪的增殖特别有用，包括转基因或遗传工程动物和嵌合动物。因此，本发明将能够生成一种性别的子代，而且能够生成具有改进的肉产量、生殖性状、和疾病抵抗力的猪。此外，来自NT胎儿（包括转基因和/或嵌合胎儿）的细胞和组织可以用于细胞、组织、和器官移植，治疗下文就CICM细胞的用途所述的许多疾病。因此，转基因猪的用途包括疾病模型、细胞和器官的异种移植、和药用蛋白质的生产。

如上所述，在一个优选的实施方案中，将用人结构基因（如胶原）取代内源基因如胶原基因。在另一个优选的实施方案中，将用人血清清蛋白（HSA）基因取代猪血清清蛋白基因。

为了生成CICM细胞和细胞系，在获得期望大小的NT单位后，机械的由该区域取出细胞并使用。优选如下进行：取出包含NT单位（通常包含至少大约50个细胞）的细胞块，清洗这些细胞，并将细胞置于饲养层（如经照射成纤维细胞）上。通常，用于获得干细胞或细胞集落的细胞将得自培养NT单位（大小优选至少50个细胞）的最内层部分。然而，细胞数目较少或较多的NT单位以及来自NT单位其它部分的细胞也可用于获得ES细胞和细胞集落。将细胞在饲养层中在合适生长培养基中维持，如添加10% FCS和0.1mM  $\beta$ -巯基乙醇（Sigma）和L-谷氨酰胺的 $\alpha$  MEM。根据优化生长所需频繁更换生长培养基，如大约每2-3天。

这种培养过程导致CICM细胞或细胞系的形成。本领域熟练技术人员可根据需要改变培养条件，以优化特定CICM细胞的生长。同样，依照本发明可生成遗传工程或转基因猪CICM细胞。即，上文所述的方法可用于生成导入期望DNA序列或者除去或修饰所有或部分内源DNA序列的NT单位。然后，那些遗传工程或转基因NT单位可用于生成遗传工程或转基因CICM细胞。如先前所述，美国专利号5,905,042（收入本文作为参考）中讨论了用于在培养中将CICM维持于未分化状态的优选方法。

产生的CICM细胞和细胞系具有许多治疗性和诊断性应用。最特别的是，这些CICM细胞可用于细胞移植疗法。

在这点上，已知小鼠胚胎干（ES）细胞能够分化成几乎任何细胞类型，如造血干细胞。因此，依照本发明生成的猪CICM细胞应当具有相似的分化能力。可以依照已知方法诱导本发明的CICM细胞分化，以获得期望细胞类型。例如，通过在分化培养基中在提供细胞分化的条件下培养这些细胞，可诱导本发明的猪CICM细胞分化成造血干细胞、神经细胞、肌细胞、心肌细胞、肝细胞、软骨细胞、上皮细胞、尿道细胞、神经细胞等。本领域知道导致CICM细胞分化的培养基和方法以及合适的培养条件。

例如，Palacios等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7530 - 7537, 1995，讲授了通过对干细胞进行诱导操作来由胚胎细胞系生成造血干细胞，包括：首先在不含视黄酸的悬浮培养培养基中培养这些细胞的聚集体，然后在含视黄酸的相同培养基中培养，再然后将细胞聚集体转移到提供细胞贴壁的基底上。

此外，Pedersen, *J. Reprod. Fertil. Dev.*, 6: 543 - 552, 1994，在这篇回顾性论文参考的许多论文中，公开了使胚胎干细胞体外分化以生成多种分化细胞类型的方法，包括造血细胞、肌肉、心肌、神经细胞、及其它。

此外，Bain等人，*Dev. Biol.*, 163: 342 - 357, 1995，讲授了胚胎干细胞体外分化成具有神经元特性的神经细胞。这些参考文献例示了用于由胚胎或干细胞获得分化细胞的方法。将这些参考文献完整收入本文作为参考，特别是其中涉及胚胎干细胞分化方法的公开内容。

因此，使用已知方法和培养培养基，本领域熟练技术人员可培养本发明CICM细胞，包括遗传工程或转基因CICM细胞，以获得期望分化细胞类型，如神经细胞、肌细胞、造血细胞、等。嵌合动物（猪和牛）的成功生成已经证明，美国专利号5,905,042中公开的培养方法能够生成多能CICM细胞。

本发明CICM细胞可用于获得任何期望的分化细胞类型。这些分化细胞的治疗性用法是前所未有的。例如，造血干细胞可用于需要骨髓移植的医学治疗。这些操作可用于治疗许多疾病，如癌症晚期（诸如

卵巢癌和白血病)以及危害免疫系统的疾病(诸如AIDS)。可如下获得造血干细胞,例如融合癌症或AIDS患者的成熟体细胞(如上皮细胞或淋巴细胞)与去核卵母细胞,如上所述获得CICM细胞,并在有助于分化的条件下培养这些细胞直至获得造血干细胞。这些造血细胞可用于疾病治疗,包括癌症和AIDS。

本发明可用于取代缺陷型基因,如缺陷型免疫系统基因,或者用于导入可引起治疗有益蛋白质表达的基因,诸如生长因子、淋巴因子、细胞因子、凝结因子、受体、酶、等。

可导入本发明CICM细胞的DNA序列包括例如编码表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、神经胶质衍生神经营养性生长因子、胰岛素样生长因子(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 $\alpha$ 和 $\beta$ 、等)、治疗性酶等的那些基因。

本发明包括猪细胞在治疗人疾病中的用途。因此,猪CICM细胞、NT胎儿、以及NT和嵌合子代(转基因或非转基因)可用于治疗批准进行细胞、组织、或器官移植的人疾病状况。一般而言,本发明的CICM细胞、胎儿、和子代可用于相同物种(自体、同基因、或同种异体移植)或不同物种(异种移植)。例如,来自猪NT胎儿的脑细胞可用于治疗帕金森氏病。

同样,本发明的CICM细胞可用作体外分化模型,特别是用于研究涉及早期发育调控的基因。同样,使用本发明CICM细胞的分化细胞、组织、和器官可用于药物研究。

另外,本发明CICM细胞可作为细胞核供体用于生成其它CICM细胞和细胞集落。

为了更清晰的描述本发明而提供下列实施例。

## 实施例

### 用于猪克隆的材料和方法

### 修改后的NCSU37培养基 (mNCSU37)

成份	分子量	浓度 (mM)	g/l
NaCl	58.45	108.73	6.3553
NaHCO <sub>3</sub>	84.00	25.07	2.1059
KCl	74.55	4.78	0.3563
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136.09	1.19	0.1619
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	246.50	1.19	0.2933
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> 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
enicillin G	---	100 IU/l	0.0650
链霉素	---	50 mg/l	0.0500

使用 18mΩ、RO、DI 水。

pH 应当是 7.4, 检查渗透摩尔浓度并记录。

通过真空过滤 (0.22 μm) 除菌, 并在瓶子上注明日期和编号。

保存于 4℃ 并在 10 天内使用。

### 修改后的TL-HEPES-PVA培养基 (Hepes-PVA)

成份	分子量	浓度 (mM)	g/l
NaCl	58.45	114.00	6.6633
KCl	74.55	3.20	0.2386
NaHCO <sub>3</sub>	84.00	2.00	0.1680
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	120.00	0.34	0.0408
乳酸钠**	112.10	10.00	1.868 ml
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	203.30	0.50	0.1017
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> 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

\*最后慢慢加入  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  以防止沉淀

使用 18m $\Omega$ 、RO、DI 水。

pH 调至 7.4, 检查渗透摩尔浓度并记录。

通过真空过滤 (0.22  $\mu\text{m}$ ) 除菌, 并在瓶子上注明日期和编号。

保存于 4 $^{\circ}\text{C}$  并在 10 天内使用。

### NCSU23培养基

成份	分子量	浓度 (mM)	g/l
NaCl	58.45	108.73	6.3553
NaHCO <sub>3</sub>	84.00	25.07	2.1059
KCl	74.55	4.78	0.3563
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136.09	1.19	0.1619
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	246.50	1.19	0.2933
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> 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	0.0500

使用 18m $\Omega$ 、RO、DI 水。

pH 应当是 7.4, 检查渗透摩尔浓度并记录。

使用红色 Nalgene 滤器通过真空过滤 (0.22  $\mu\text{m}$ ) 除菌, 并在瓶子上注明日期和编号。

保存于 4 $^{\circ}\text{C}$  并在 10 天内使用。



注意：BSA 类型是重要的。优选使用 Sigma 公司的 BSA，目录#A-7906。还有，青霉素 G/链霉素是任选的。

### 成熟培养基 (MAT)

- 18.0ml mNCSU37
- 2.0ml 猪滤泡液 (pFF)
- 7.0  $\mu$ l 稀释的  $\beta$ -巯基乙醇 (将 10  $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇在 990  $\mu$ l mNCSU37 中稀释；终浓度 50  $\mu$ M)
- 0.002g 半胱氨酸 (终浓度 0.6mM)
- 20  $\mu$ l EGF 原液 (来自 10ng/ $\mu$ l EGF 原液的表皮生长因子)

### 用于抽吸猪卵巢滤泡的方案

通过目测对滤泡的大小评级。认为 3mm x 3mm 至 7mm x 7mm 的滤泡是抽吸的好候选者。相反，更大的滤泡，尤其是超过 1cm x 1cm 的滤泡，是抽吸的差候选者。

优选使用配备 18 号针头的 10cc 注射器吸取 1ml 肝素 (浓度为 100IU/ml)，保持直立，并将肝素溶液抽到 10cc 线，以包被注射器内腔。由注射器推出肝素。一只手握着卵巢，另一只手握着注射器。

将针头斜插到滤泡中，并轻轻拉起注射器，直至滤泡塌陷，即随同卵泡一起吸取所有滤泡液。发现在抽吸过程中在滤泡内轻轻前后摆动可促进滤泡的塌陷和所有滤泡内含物的吸取。

继续抽吸以获得尽可能多的卵泡，直至达到 10cc 标志。由注射器除去针头，并将滤泡液存放于收集管中。

在将滤泡液存放于管中时，应当注意除去针头，以避免剥离卵丘细胞和损伤卵母细胞。同样，希望在每一个卵巢中吸取尽可能多的大小合适的卵泡。为了获得最佳结果，比较理想的是对每一批生殖道更换包被肝素的注射器。

### 猪滤泡液的制备

由青春期前小母猪收集猪滤泡液 (pFF), 通常是大约3-6mm的滤泡。通过例如静置大约5-10分钟, 卵母细胞和卵泡细胞能够由此沉淀。然后吸取pFF并转移到15ml锥形管中。将锥形管在Sorvall上于4℃以3000rpm离心30分钟。取出锥形管, 由沉淀以上收集pFF, 合并, 并先后用0.8 μm和0.45 μm滤器 (Sterivex) 过滤。将过滤后的材料分装到1.5ml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) 及制备

100 μg EGF

10ml 含0.1% BSA的mNCSU37

混匀。分装成25 μl, 并冻存于-20℃。

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

ECG (PMSG 6000; Intervet 公司, Millsboro; DE 19966)

加入3ml dH<sub>2</sub>O将这种材料由6000IU稀释至2000IU/ml。

hCG (Chorulon; Intervet 公司)

加入5ml dH<sub>2</sub>O将这种材料由10000IU稀释至2000IU/ml。

然后, 混合1ml稀释的PMSG和1ml稀释的hCG, 使得每种激素达到1000IU/ml。分装成50 μl并冻存于-20℃。剩余PMSG和hCG原液也冻存。

### db-cAMP 100mM原液及制备

25mg db-cAMP (保存于-20℃干燥器中)

0.509ml dH<sub>2</sub>O

将上述材料混匀, 分装成50 μl, 并冻存于-20℃。

### 激活培养基

除了包含1mg/ml BSA以外, 其余与HECM/HEPES相同。

### 抗生素/抗霉菌剂 (Ab/Am)

100U/1 青霉素、100  $\mu$ g/1 链霉素、和 0.25  $\mu$ g/1 两性霉素B (Gibco#15240-062)

每升盐水中加入上述材料的10ml分装液。每毫升加入10  $\mu$ l这种混合液。

### 卵母细胞 - 卵丘复合物 (OCC) 的收集

于25  $^{\circ}$ C将卵巢运送至实验室，并立即用含抗生素/抗霉菌剂 (10ml/L; Gibco #600-5240g) 的0.9%盐水清洗。使用连接真空系统 (GEML牛系统) 的18号针头和50ml Falcon管抽吸3-6mm的滤泡。装满一个管后，使OCC沉淀5-10分钟。抽吸滤泡液 (pFF)，并保存用于培养系统 (如果需要) (参阅下文pFF制备方案)。

### 用于核移植猪胚胎的体内卵母细胞回收和转移的优选方案

给225-275磅的Landrance x York或Landrance x Hampshire小母猪注射PG600，并在5-6天后 (动情期开始后24-36小时) 将动物送去屠宰。回收生殖道并置于隔热容器中，运送至实验室。

由子宫解离输卵管，并用缓冲培养基冲洗。然后，如上所述由卵丘细胞剥离卵母细胞，用于制备体外成熟的卵母细胞。

激活后，将卵细胞装到5 $\frac{1}{2}$ 英寸的Tom Cat导管中 (Sovereign, 目录#8890-703021)，并通过手术移植到同步受体小母猪 (相同品种且200-300磅) 的输卵管中。将胚胎总数的一半移植到每个输卵管中，通常每只动物移植不超过100个NT。在有些情况中，与NT一起移植10-20个天然生成的2-4细胞胚胎作为“辅助”胚胎。缓冲液中可任选包含caspase抑制剂以增强胚胎发育和维持。每50磅使用1ml混合物 (250mg 赛拉嗪 (Xylazine)、250mg 氯胺酮 (Ketamine)、和500mg Telazol 重溶成5ml溶液) 麻醉小母猪。灌输后，优选将受体小母猪转移至新的隔离设备。

优选在手术后30天进行怀孕检查，通常通过超声波。那时可通过

C-切开术回收胎儿，并通过PCR和Southern印迹进行分析，以鉴定它们中哪一个是通过核移植而生成的。或者，可使克隆胎儿发育至足月分娩期，并通过天然方法或C-切开术来出生。

### OCC清洗

将OCC重悬于20ml HEPES-PVA并进行沉淀；重复2次。最后一次清洗后，将OCC转移至栅盘并选择用于培养。将选择的OCC在60mm盘中用HEPES-PVA清洗2次。所有抽吸和卵母细胞回收都在室温进行（大约25℃）。

### 体外成熟（IVM）

将清洗后的OCC（大约50个）置于每个孔装有0.5ml成熟培养基（如上所述）的4孔Nunc板中大约22小时。然后，将卵母细胞置于不含激素的相同培养基中大约20小时。

### 猪胚胎和成熟成纤维细胞原代培养物的分离

由受精后30-114天（优选35天）的猪胎儿获得猪成纤维细胞的原代培养物。无菌除去头、肝、心、和消化道，将胎儿切碎，并在预热的胰蛋白酶EDTA溶液中（0.05% 胰蛋白酶/0.02% EDTA；GIBCO, Grand Island, NY）于37℃保温30分钟。将成纤维细胞置于组织培养板中，并在成纤维细胞生长培养基（FGM）（含添加10%胎牛血清（FCS）（Hyclone, Logan, UT）、青霉素（100IU/ml）、和链霉素（50 μl/ml）的α-MEM培养基（BioWhittaker, Walkersville, MD））中培养。在含5% CO<sub>2</sub>的潮湿空气中于37℃培养并维持成纤维细胞。

由猪的肺和皮肤分离成熟成纤维细胞。将切碎的肺组织在胰蛋白酶EDTA溶液（0.05% 胰蛋白酶/0.02% EDTA；GIBCO, Grand Island, NY）中于10℃保温过夜。次日，将组织和解离细胞在预热的胰蛋白酶EDTA溶液（0.05% 胰蛋白酶/0.02% EDTA；GIBCO, Grand Island, NY）中于37℃保温1小时，并进行3次连续清洗和胰蛋白酶保温（1小时）。

将成纤维细胞置于组织培养板中，并在添加10%胎牛血清（FCS）（Hyclone, Logan, UT）、青霉素（100IU/ml）、和链霉素（50 $\mu$ l/ml）的 $\alpha$ -MEM培养基（BioWhittaker, Walkersville, MD）中培养。事实上可在发育的任何时间分离成纤维细胞，大致从胚盘阶段后至动物的整个成年期（猪是由受精后9-10天至5岁或更长）。

### 用于核移植的成纤维细胞的制备

可作为供体细胞核的胎儿成纤维细胞的范例是：

1. 不在任何单细胞阶段或血清饥饿或静止中同步化的增殖中成纤维细胞都可作为细胞核供体。用胰蛋白酶EDTA处理来自上述培养物的细胞达10分钟，并用100%胎牛血清清洗3次。然后将成纤维细胞的单细胞置于HbT培养基（Bavister等人，1983）的显微操作液滴中。这是在将成纤维细胞移植到去核猪卵母细胞中之前10-30分钟进行的。优选的是，将具有CMV启动子和绿色荧光蛋白基因的增殖中转基因成纤维细胞（第9代）用于生成NT单位。

2. 第二种方法是，使成纤维细胞同步在细胞周期的G<sub>1</sub>或G<sub>0</sub>。将成纤维细胞生长至汇合。然后，连续4天将FCM中的胎牛血清浓度降低一半（第0天 = 10%，第1天 = 5%，第2天 = 2.5%，第3天 = 1.25%，第4天 = 0.625%）。第5天用胰蛋白酶EDTA处理细胞达10分钟，并用100%胎牛血清清洗3次。然后将成纤维细胞的单细胞置于HbT培养基的显微操作液滴中。这是在将成纤维细胞移植到去核猪卵母细胞中之前15分钟内进行的。

或者，供体细胞（如成纤维细胞）可直接得自活的动物（如成年猪）、组织、或流体来源。

### 除去卵丘细胞

成熟期（范围为大约30-50小时，优选大约42小时）后，可优选将卵母细胞去核。优选在去核前，使细胞接触含0.68mg/ml透明质酸酶的H/H培养基，随后旋涡震荡大约3分钟，由此除去卵丘细胞。或者，在

去核前，可以在除去卵丘细胞前取出卵母细胞，并置于含1mg/ml透明质酸酶的HECM（Seshagiri和Bavister, 1989）中。这可以通过用孔很细的移液管反复吸取或者通过简短旋涡震荡（大约3分钟）来实现。然后对剥离的卵母细胞筛选极体，并将选择的中期II卵母细胞（通过极体的存在来确定）用于核移植。

### 去核

当前优选的操作包括将卵母细胞暴露于NCSU23+蔗糖+HXT达至少20分钟，随后在含蔗糖和松胞菌素B的H/H培养基中进行去核。去核后，优选在移植前将卵母细胞置于含蔗糖的NCSU23中。

### 移植

优选用链霉蛋白酶或TE处理用于移植的细胞。在链霉蛋白酶的情况下，每个孔用400  $\mu$  l处理细胞，保温，在H/H中稀释，以6000rpm离心4分钟，并重悬于H/H供使用。

在TE的情况下，使用相同方案。然后优选在含蔗糖的H/H中进行移植，并在完成后将细胞置于含蔗糖的NCSU23中供融合。

### 融合培养基

配方：

500ml            Sigma水

0.28M甘露醇 25.51g

100  $\mu$  M MgSO<sub>4</sub> 0.0123g

10mM 组氨酸 0.776g

### 融合

优选使核移植单位通过H/H与甘露醇的梯度1:2、1:1、和0:2，然后在600  $\mu$  m槽中融合，并注满甘露醇。

将细胞置于大约100V下达30微秒，对细胞进行电融合。融合后，

将NT单位置于纯H/H中，然后置于NCSU23+松胞菌素B（ $3\mu\text{l}/2\text{ml}$ ）中，优选在激活前进行达2小时。

## 激活

可使用的激活方法的范例包括本申请先前鉴定的如下操作，通常在成熟后大约47-49小时进行。正如所述，可以在融合之前、接近、或之后进行激活。

### 1. 离子霉素/DMAP操作

将NT单位置于含 $1\text{mg}/\text{ml}$  BSA+ $10\mu\text{M}$  离子霉素（ $4\mu\text{l}/2\text{ml}$ ）的H/H培养基中达4分钟，用H/H漂洗，然后置于NCSU23+DMAP（ $1\mu\text{l}/\text{ml}$ ）中达30分钟。然后，将NT单位置于含 $1\mu\text{l}/\text{ml}$  BSA和 $5\mu\text{M}$ 离子霉素的相同H/H培养基中并处理30分钟。

然后，将NT单位置于含 $1\text{mg}/\text{ml}$ BSA+ $2.5\mu\text{M}$ 离子霉素和DMAP的相同H/H培养基中再过2小时。

然后漂洗NT单位以除去DMAP，并在NCSU23中培养。在第3天更换培养基，并在第5天加入5% FBS，培养NT单位直至形成胚胎。

### 2. 一次激活脉冲

由NCSU23+CB中取出NT单位，并用激活培养基清洗3次。平衡后，将NT单位置于注满融合操作中所述激活培养基的融合槽（ $500\mu\text{m}$ 缺口）中。应用30V、 $30\mu\text{sec}$ 的脉冲。然后立即用HECM HEPES清洗NT单位3次，并在NCSU23中继续培养（ $39^\circ\text{C}$ ，5%  $\text{CO}_2$ ）2小时，直至胚胎移植或体外培养（ $39^\circ\text{C}$ ，5%  $\text{CO}_2$ ，在NCSU23中）。如果进行培养，在培养的第2天将NT单位置于新鲜NCSU23+5%胎牛血清中。表1中的结果指出，可使用该操作激活卵母细胞，而且它们具有发育能力。

### 3. 两次激活脉冲

由NCSU23+CB中取出NT单位，并用激活培养基清洗3次。平衡后，将NT单位置于注满融合操作中所述激活培养基的融合槽（ $500\mu\text{m}$ 缺口）中。应用30V、 $30\mu\text{sec}$ 的脉冲。然后立即用HECM HEPES清洗NT单位3次，放回NCSU23+CB中，并在此培养基中于 $39^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 继续培养，直

至下一次脉冲（1小时后）。1小时后，这次重复激活培养基平衡步骤，并应用15V、30  $\mu$  sec的脉冲。然后立即用HECM HEPES清洗NT单位3次，放回NCSU23+CB中，并在此培养基中于39℃、5% CO<sub>2</sub>继续培养2-6小时。然后使用上文1中所述操作培养NT单位。表1中的结果指出，可使用该操作激活卵母细胞，而且它们具有发育能力。核移植胚胎也是一样。两次脉冲激活操作产生了4个胚泡期NT单位。

#### 4. 精子因子

最初由Stice和Robl (*Mol. Reprod. Dev.*, 25: 272 - 280, 1990) (本文收入它的内容作为参考) 描述于哺乳动物精子，该因子引起卵母细胞的激活。由猪精细胞分离精子因子和显微注射的方法描述于Fissore等人, *Mol. Reprod. Dev.*, 46: 176 - 189, 1997 (本文收入它的内容作为参考)。由NCSU23+CB取出NT单位，并置于上文所述的显微操作板中用于去核和成纤维细胞移植。使用吸满精子因子的显微注射针头（1  $\mu$ m开口），将因子投递到NT单位的细胞质中后，卵母细胞发生激活。显微注射后，用HECM HEPES清洗NT胚胎，并置于NCSU23+CB中达2-6小时，然后保存在NCSU23中，直至胚胎移植。

表 1: 使用不同激活操作激活的卵母细胞和 NT 单位的发育

	给予激活 刺激的数目	裂开的数目 (开始发育) [%]	胚泡阶段的数目 (8日龄胚胎) [%]
一次脉冲卵母细胞	52	6[12]	1[2]
两次脉冲卵母细胞	85	8[10]	3[4]
两次脉冲NT单位	55	10[18]	4[7]
精子因子卵母细胞	49	4[8]	2[4]

#### 胚胎移植

在猪中进行单细胞胚胎移植的方法是众所周知的（参阅例如Pinkert等人，1993，本文收入它的内容作为参考）。通常将20-30个



NT (可多达100个NT) 同步移植到已配种或未配种小母猪的输卵管中。怀孕29天后,可以由受体小母猪回收核移植胎儿(转基因或非转基因)。或者,允许胎儿发育至分娩期(怀孕114天)并生成克隆猪子代。正如所述这些小母猪也将优选包含“辅助”胚胎,如普通猪胚胎、单性猪胚胎、或四倍体胚胎。辅助胚胎的数目可在1-大约50个的范围内变化,通常是2-4个。

### caspase抑制剂在体外成熟、卵母细胞剥离、或激活过程中的使用

如上所述,已经发现,加入caspase抑制剂(如caspase3、8、或9)可增强由NT操作生成的胚泡的数目。下表提供了支持这种发现的一些数据。

处理	n	胚泡	% 胚泡	平均细胞数目
剥落和激活过程中使用caspase				
对照	44	1	2	39
caspase3	47	6	13	30.3
caspase9	30	3	10	41
对照	76	3	4	33.6
caspase3	94	10	11	20
caspase8	283	5	2	14
成熟过程中使用caspase				
对照	114	0	0	0
caspase3和9	125	9	7	29

同样,为了方便读者,下文概述了发明人正在使用的当前优选的猪卵母细胞移植方案。

### 优选克隆方法和材料的概述

#### 猪卵母细胞的核移植方案

### 体外成熟

在运送途中在NCSU23+pFF+ $\beta$ -巯基乙醇+半胱氨酸+EGF+1000IU HCG/PMSG&cAMP中放置22小时，用H/H漂洗3次。

在4孔Nunc板中在不含激素的上述培养基中放置20小时。

### 对猪卵母细胞的处理

用0.68mg/ml透明质酸酶 (Hyal) 进行剥离，并旋涡震荡3次，每次3分钟。

### 所需培养基

HECM/HEPES+蔗糖 (0.2567mg/10ml)

NCSU23+蔗糖 (0.2567mg/10ml)

NCSU23

### 融合培养基

10  $\mu$ M 甘露醇

配方:

500ml Sigma水

0.28甘露醇 25.51g

100  $\mu$ M MgSO<sub>4</sub> 0.0123g

10mM 组氨酸 0.776g

### 融合

使核移植单位通过H/H与甘露醇的梯度1:2、1:1、和0:2，然后在600  $\mu$ m槽中融合，并注满甘露醇。

通过应用100V、30  $\mu$  sec电脉冲进行融合。立即将融合体置于纯H/H中，然后置于NCSU23+Cyto B (3  $\mu$ l/2ml) 中，在激活前进行2小时。

## 去核

将卵母细胞暴露于NCSU23+蔗糖+HXT达至少20分钟。

在H/H+蔗糖+ Cyto B中进行去核。

然后在移植前将卵母细胞置于NCSU23+蔗糖中。

## 移植

用链霉菌蛋白酶或TE制备细胞。

链霉菌蛋白酶 -- 每个孔400  $\mu$  l, 搁置, 在H/H中稀释, 以6000rpm离心4分钟, 并重悬于H/H供使用。

TE -- 用于细胞解离的相同方案。

在H/H+蔗糖中进行移植, 并在完成后放回NCSU23+蔗糖中供融合。

## 激活培养基

H/H Z1 (与H/H相同, 但含1mg/ml BSA)。

3次处理间隔30分钟。

1. 置于H/H Z1+10  $\mu$  M离子霉素 (4  $\mu$  l/2ml) 中达4分钟, 用H/H漂洗, 然后置于NCSU23+DMAP (1  $\mu$  l/ml) 中达30分钟。

2. 再置于H/H Z1+5  $\mu$  M离子霉素然后是DMAP中达2小时。

漂洗激活后的NT单位以除去DMAP, 然后在NCSU23中培养。

第3天更换培养基, 第5天加入5% FBS, 并培养直至形成胚泡。

虽然已经通过某些具体实施方案描述了本发明, 但是应当领会, 本领域熟练技术人员可由此进行许多修改和变化, 而不违背本发明的精神。因此, 所附权利要求意欲覆盖属于本发明真实精神和范围之内  
的所有修改和变化。