



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01823919.6

[43] 公开日 2005 年 2 月 16 日

[11] 公开号 CN 1582332A

[22] 申请日 2001.12.29 [21] 申请号 01823919.6

[86] 国际申请 PCT/KR2001/002304 2001.12.29

[87] 国际公布 WO2003/089632 英 2003.10.30

[85] 进入国家阶段日期 2004.6.29

[71] 申请人 Seoul 大学校产学协力财团

地址 韩国汉城

[72] 发明人 黄寓锡 李柄千 姜成根 韩在容

林正默 李昌奎 李殷松 郑义培

赵钟基 金大暎 玄尚桓 李甲相

金惠洙 李昭炫 李成哲 廉受清

[74] 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

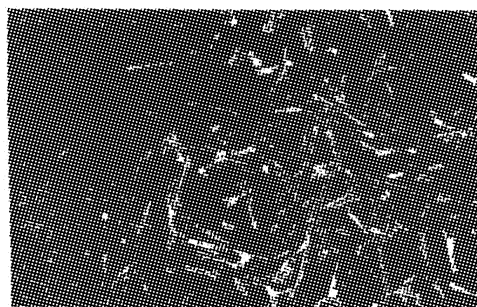
代理人 丁香兰

权利要求书 2 页 说明书 24 页 附图 9 页

[54] 发明名称 转染 GFP 的克隆猪、敲除 GT 的克隆猪及其生产方法

[57] 摘要

本发明公开了表达绿色荧光蛋白(GFP)的克隆猪和敲除 1, 3 - 半乳糖基转移酶(GT)基因的克隆猪。本发明还公开了生产这些克隆猪的方法,该方法包括下列步骤:建立体细胞系;制备转染 GFP 或敲除 GT 基因的核供体细胞;用核供体细胞和受体卵母细胞产生转基因核移植胚胎;将转基因核移植胚胎移植到代孕母猪体内。本发明中表达 GFP 的克隆猪有利于大规模生产动物疾病模型,而且敲除 GT 基因的克隆猪可以被用作器官供体,使人体中不产生超急性免疫排斥的异种移植成为可能。



1. 一种表达绿色荧光蛋白基因的克隆猪的生产方法，该方法包括如下步骤：
  - 5 (a) 通过培养来源于猪的细胞系制备核供体细胞；
  - (b) 将携带绿色荧光蛋白 (GFP) 基因的 DNA 构建体和脂组分或非脂阳离子聚合体介质混合，以形成脂 (或阳离子聚合体) -DNA 复合物，将得到的复合物加到核供体细胞的培养基中并进一步培养所述核供体细胞，以将所述 GFP 基因导入所述核供体细胞并在其中表达 GFP 基因；
  - 10 (c) 将转染的核供体细胞转移到去核的猪受体卵母细胞中，以产生转基因的核移植胚胎，并激活所述核移植胚胎；以及
  - (d) 将所述核移植胚胎移植到代孕母猪体内，以产生成活后代。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其中在步骤 (a) 中所述来源于猪的细胞系是胎成纤维细胞。
- 15 3. 如权利要求 1 所述的方法，其中在步骤 (b) 中所述携带 GFP 基因的 DNA 构建体是 pEFGP-N1。
4. 如权利要求 1 所述的方法，其中在步骤 (b) 中所述的脂组分是 FuGENE 6 或 LipofectAmine Plus。
5. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述非脂阳离子聚合体是 ExGen 500。
- 20 6. 一种猪核移植胚胎“SNU-P1[猪 NT 胚胎]”，该猪核移植胚胎按照权利要求 1 中的步骤 (a) 到 (c) 制备并被保藏在 KCTC (韩国典型培养物保藏中心)，保藏编号为 KCTC 10145BP。
7. 一种表达绿色荧光蛋白基因的克隆猪，该克隆猪是通过实施权利要求 1 中的步骤 (d) 由权利要求 6 所述的猪核移植胚胎“SNU-P1[猪 NT 胚胎]”而产生的。
- 25 8. 一种敲除  $\alpha$ -1, 3-半乳糖基转移酶基因的克隆猪的生产方法，该方法包括如下步骤：
  - (a) 通过培养来源于猪的体细胞系制备核供体细胞；
  - (b) 从猪基因组 BAC 文库中分离  $\alpha$ -1, 3-半乳糖基转移酶 (GT) 基因

克隆，并用分离的 GT 基因构建基因寻靶载体，其中，该载体携带经过修饰的 GT 基因，以抑制正常 GT 蛋白的表达，所述经过修饰的 GT 基因是通过同源重组用编码选择性标记的基因取代野生型 GT 基因的一部分而得以修饰的；

5 (c) 将载体与脂或非脂组分混合以形成脂（或非脂）-DNA 复合物，并将得到的复合物加到核供体细胞的培养基中，通过在核供体细胞中导入重组的 GT 基因实现基因寻靶；

(d) 将转染了重组 GT 基因的核供体细胞转移到去核的猪受体卵母细胞中以产生转基因的核移植胚胎，并激活所述核移植胚胎；以及

10 (e) 将核移植胚胎移植到代孕母猪体内，产生成活后代。

9. 如权利要求 8 所述的方法，其中在步骤（a）中所述来源于猪的细胞系是胎成纤维细胞。

10. 如权利要求 8 所述的方法，其中在步骤（b）中所述的基因寻靶载体通过启动子陷阱方法构建为不含外源启动子的载体。

15 11. 如权利要求 8 所述的方法，其中在步骤（b）中所述的基因寻靶载体含有与 GT 基因的部分第 8 内含子、第 9 外显子及部分第 9 内含子对应的核酸序列，其中用编码连有 SV40 聚腺苷酸序列的嘌呤霉素抗性基因的核酸序列代替所述第 9 外显子的 AvaI-DraIII 片段。

20 12. 如权利要求 8 所述的方法，其中在步骤（c）中所述的脂组分是 FuGENE 6。

13. 一种猪的核移植胚胎“SNU-P2[猪 NT 胚胎]”，该猪核移植胚胎按照权利要求 8 中的步骤(a)到(d)制备，并被保藏在 KCTC(韩国典型培养物保藏中心)，保藏号为 KCTC 10146BP。

25 14. 一种敲除  $\alpha$ -1, 3-半乳糖基转移酶基因的克隆猪，该克隆猪是通过权利要求 8 中的步骤(e)由权利要求 13 所述的猪核移植胚胎“SNU-P2[猪 NT 胚胎]”产生的。

15. 一种载体，该载体携带与 GT 基因的部分第 8 内含子、第 9 外显子及部分第 9 内含子对应的核酸序列，其中用编码连有 SV40 聚腺苷酸序列的嘌呤霉素抗性基因的核酸序列代替所述第 9 外显子的 AvaI-DraIII 片段。

## 转染 GFP 的克隆猪、敲除 GT 的克隆猪及其生产方法

### 5 技术领域

概括地说，本发明涉及一种生产克隆猪的方法和使用这种方法生产的猪，所述方法通过将所需的基因导入体细胞的基因寻靶技术和体细胞核移植技术而使所述克隆猪具有特定的遗传特性。

### 10 背景技术

在过去的 20 年中转基因动物技术一直备受瞩目。转基因技术在提供高价值的产品方面极其重要，并被广泛应用于生物医学和生物学研究。在工业上可将转基因技术广泛应用于生产高质量家畜产品、高附加值的药用活性物质、增强了抗多种病原物的抗性的动物和动物疾病模型以及

15 基因治疗。

在生产转基因动物的基因寻靶步骤中通常使用绿色荧光蛋白 (GFP)，由于它具有以下特征：便于标记染色体蛋白及标记染色体 DNA 的特定区域，并可与许多细胞质蛋白结合且是无毒的，所以将其广泛用于在活体细胞中表达同源的细胞骨架丝。1994 年，Chalfie 等使用从水母 (*Aequorea*

20 *victoria*) 中获得的 GFP 作为荧光指示剂在包括猪胚胎在内的活体细胞中观察到多种分子生物学变化。从那以后，开发了增强型 GFP (EGFP)，并将其作为在多种转基因动物中使用的标记。

由 Gordon 等提出的原核显微注射是一种将异源基因导入细胞以产生转基因动物的技术，其特征是将异源基因直接注射到受精的卵母细胞的原核中，已将其广泛应用于包括小鼠在内的实验动物中。然而，如下所述，原核显微注射方法有明显的缺点。当将原核显微注射应用于工业动物时，转基因动物的产量非常低（牛为 0.5%、猪为 1.5%、羊为 2.5%）。另外，经常发生遗传镶嵌现象。为了克服这些问题，提出一种替代的动物克隆技术，它采用转染了异源基因的体细胞。这种转基因动物克隆技

25

术以 100%的转染效率产生重组的受精胚胎，且由于只对转染了异源基因的体细胞进行核移植而消除了遗传镶嵌现象，然后将重组的胚胎移植到代孕母体内，由此能有效地产生转基因克隆动物。另外，通过预先分析经转染的体细胞的性染色体，可人工决定转基因动物的性别，因此最大程度发挥其工业应用性。

当用体细胞核移植技术生产转基因猪时，优选地，应分离所需的基因，并应构建携带该所需基因的载体，除了体细胞克隆技术外，还应使用能将所需的基因导入体细胞的分子生物学技术。典型地，所述基因是从猪基因组 DNA 文库中通过筛选分离出来。根据预期应用，在考虑了外源启动子、所需基因的大小、及正或负选择性标记等因素情况下制备载体。可使用生化方法、物理方法或病毒介导的基因转染的方法，通过转染将基因导入核供体细胞。所述生化方法的例子包括使用钙离子作为媒介的钙沉淀法、使用质膜组分的阳离子脂的脂转染法和使用非脂阳离子聚合体的方法。由于这些转染方法简单、有效且稳定，所以得到了广泛应用。物理方法包括电穿孔、基因枪和胞质内显微注射方法。病毒介导的基因转染方法是通过将所需的 DNA 克隆到腺病毒或反转录病毒的病毒基因组中，然后用获得的病毒侵染细胞而完成的。本申请人于 2000 年 6 月 30 日提交的国际专利申请号 PCT/KR00/00707 中公开了体细胞克隆技术，发明名称是“生产克隆母牛的方法”，其中体细胞克隆是通过下述方法完成的：从母牛卵母细胞中除去含有遗传物质的细胞核，然后将来源于另一不同细胞的细胞核注射到去核的未受精的卵母细胞中。将得到的受精胚胎称为“重组胚胎”。重组胚胎经过后激活和体外培养后，被转移到代孕母体内以产生成活后代。

人类器官移植是治疗与器官相关的不可治愈疾病的有用工具，并在过去大约 10 年中得到不断的发展。然而在这期间，相对于器官移植方法的这种发展，需要接受器官移植的病人数目增加了三倍。这是由于供求的不平衡造成的，意味着用于外科移植手术的人体器官的短缺。虽然器官供应来源严重缺乏，至今还没有令人满意的方法能解决这个问题。已经尝试各种努力来克服这种人类外科移植手术用器官的缺乏，其中包括

使用医学工程方法开发人造器官及生产转基因动物。当从转基因动物获得可替代人类患病器官的器官时，通常选择猪作为器官供体，这是因为它和人类在生理特征、血管系统的大小甚至在红血球直径方面类似。另外，与灵长类比较，使用猪器官没有伦理问题。

5           然而，当将猪器官移植到人体内，由于对异种移植物的超急性免疫排斥，移植一般来说并不成功，因此会在受体患者体内引起严重的副作用。人血液中的抗半乳糖抗体结合到猪细胞或组织的异种抗原 gal（半乳糖）抗原决定簇上，诱导了超急性免疫排斥。已经提出了几种克服这种免疫排斥反应的方法，这些方法包括进行遗传操作以抑制人体内补体蛋白的活性以及持续施用能降低人类免疫系统活性的药物。然而，证明上述方法并不安全，因为免疫系统的严重损害使病人易受病原体微生物或病毒的侵染。相反，在本发明中，通过基因寻靶技术预先破坏了负责形成异种抗原的  $\alpha$ -1,3-半乳糖基转移酶（GT）基因，因此可以将异源移植

10 物从获得的转基因猪成功地移植到人体中，而不产生对异种移植物的超急性免疫排斥，同时也不会损害人体内的保护性免疫反应。

15

### 发明内容

基于传统技术，本发明通过使用转染方法的基因寻靶技术和体细胞核移植，提供表达绿色荧光蛋白（GFP）的克隆猪和敲除  $\alpha$ -1,3-半乳糖基转移酶（GT）基因的克隆猪的生产方法以及用该方法生产的猪。

20

更具体地说，本发明涉及含有特定基因的克隆猪和生产这种猪的方法，所述特定基因，即绿色荧光蛋白（GFP）基因编码在特定波长的光下发出绿色的蛋白。本发明还涉及一种克隆猪及生产这种猪的方法，在所述克隆猪中，敲除了与猪异种移植物的超急性排斥有关的基因即  $\alpha$ -1,3-半乳糖基转移酶（GT）基因。

25

另外，本发明涉及一种基因寻靶方法，该方法包括将 GFP 基因或遗传操作的 GT 基因有效地导入细胞中。

本发明还涉及能有效移除 GT 基因的载体。

本发明将异源 GFP 基因成功地导入猪，显示出大规模生产动物疾病

模型的潜在性，并且能生产敲除 GT 基因的猪，因此可将猪的器官可以移植到人体中而不会发生超急性异种移植排斥。

#### 附图说明

5 结合附图，从下列具体描述中将更清楚地理解本发明的上述或其他目的、特性和其他优点，其中，

图 1 是表达 GFP 的体细胞的照片；

图 2 是通过将表达 GFP 的体细胞转移到受体卵母细胞而获得的核移植 (NT) 胚胎的照片；

10 图 3 是表达 GFP 的核移植 (NT) 胚胎在胚泡期的照片；

图 4 是显示将转基因核移植胚胎移植到代孕母体输卵管中的照片；

图 5 是显示在猪基因组初级 BAC (细菌人工染色体) 文库中筛选 GT 基因的结果的照片；

图 6 是显示在猪基因组次级 BAC 文库筛选 GT 基因的结果的照片；

15 图 7 是显示在猪基因组三级 BAC 文库筛选 GT 基因的结果的照片；

图 8 是显示克隆的 GT 基因的限制性图谱结果的照片；和

图 9 是用于 GT 基因寻靶的载体的示意图。

#### 具体实施方式

20 本发明的特征是提供表达所需基因或敲除另一个所需基因的转基因克隆猪，其中所述克隆猪通过使用转染方法的基因寻靶技术和体细胞核移植方法获得。

具体来说，本发明通过以下方法提供了表达 GFP 或敲除 GT 基因的转基因克隆猪：使用转染方法产生表达 GFP 或敲除 GT 基因的体细胞，用核移植技术产生重组胚胎并将重组胚胎转移到代孕母体内。

25 首先，表达 GFP 基因的克隆猪的生产方法包括下列步骤：(a) 通过培养来源于猪的细胞系制备核供体细胞；(b) 将携带 GFP 基因的 DNA 构建体和脂组分或非脂阳离子聚合体介质混合，以形成脂 (或阳离子聚合体) -DNA 复合物，将得到的复合物加到核供体细胞的培养基中并进一步

培养所述核供体细胞，以将所述 GFP 基因导入所述核供体细胞并在其中表达 GFP 基因；(c) 将转染的核供体细胞转移到去核的猪受体卵母细胞中，以产生转基因的核移植 (NT) 胚胎，并激活所述 NT 胚胎；和 (d) 将所述 NT 胚胎移植到代孕母猪中，以产生成活后代。

5 依照各个步骤以下将具体描述表达 GFP 基因的克隆猪的生产方法：

步骤 1：核供体细胞的制备、体外培养和保存

在使用体细胞核转移技术产生表达 GFP 的转基因动物时需要核供体细胞。包括体细胞衍生的细胞和受精胚胎衍生的细胞在内的几种细胞可以用作在核移植方法中提供细胞核的核供体细胞。在这些细胞中，通常  
10 使用从胎猪分离的体成纤维细胞。成纤维细胞具有如下优点：在分离其的最初步骤中就能获得大量细胞，并且相对来说易于体外培养和操作。

对从怀孕母猪体内获得的胎猪的头-尾长度进行测量，根据其生育史计算母猪妊娠时间的长短，从而分离主要用作核供体的胎猪成纤维细胞。通过除去胎膜，然后靠近胎猪切开脐带来分离胎猪。随后，用含有抗生  
15 素和牛血清白蛋白 (BSA) 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 将胎猪洗涤几次。然后通过手术除去胎猪的四肢、头部和内脏，再用 PBS 洗几次胎体。将剩余组织用机械方法细细磨碎，制备外植体培养物，或在磨碎的组织中加入胰蛋白酶-EDTA (乙二胺四乙酸) 来释放细胞，从而从组织中获得成纤维细胞。

20 然后，将分离的胎猪成纤维细胞在 95%湿度、5% CO<sub>2</sub> 和 38°C 的条件下培养，从而制成核供体细胞。当培养物的铺满率达到 90%-100%时，继代培养细胞并冷藏剩余的细胞。

步骤 2：通过将 GFP 基因导入体细胞来实现基因寻靶

将市售 pEGFP-N1 载体 (Clontech Laboratories 公司, Palo Alto, 加拿大) 用于 GFP 基因的寻靶。pEGFP-N1 载体表达野生型 GFP 的一种修饰形式，这种修饰的 GFP 表达水平高且发出亮荧光。用生化媒介如 FuGENE  
25 6 (Roche Diagnosis 公司, 美国印第安那州)、LipofectAmine Plus (Life Technologies) 或 ExGen 500 (MBI Fermentas) 将所述载体导入体细胞。FuGENE 6 转染试剂是一种多组分脂试剂，其优点包括在多种细胞类型中

转染效率高且细胞毒性低、血清存在与否都有功能并且易于以极小的体积与 DNA 形成复合物。LipofectAmine Plus 是阳离子脂，ExGen 500 是非脂阳离子聚合体，据报道它们在多种细胞类型中都具有高的转染效率。

5 将待导入 GFP 基因的细胞培养在合适的条件下，然后用胰蛋白酶-EDTA 处理进行继代培养以将粘附的细胞分散成单个细胞。转染前一天，用新鲜的培养基培育继代细胞，在转染前 4 小时再次更换为新鲜培养基。根据生化介质的不同，当培养物达到与之相对应的最适细胞密度时，将 GFP 基因导入培养的细胞中。

10 在本发明中，脂和非脂生化介质通过将 GFP 基因导入核供体细胞而被用于 GFP 基因的寻靶。将 GFP 基因与脂或非脂介质混合，形成复合物，将这种复合物导入核供体细胞。为了有效地将 GFP 基因导入细胞中，选择几个参数并对其进行优化，这些参数包括 GFP 基因 DNA 的数量、介质的体积、细胞的密度、转染时间及是否加入血清，由此可以最大限度地提高 GFP 基因的导入效率和表达水平。

15 步骤 3：对转染 GFP 基因的核供体细胞进行选择、增殖及冷藏

20 转染了 GFP 基因后，将核供体细胞培养 3-5 天直到培养物完全铺满，在其中 GFP 基因被整合到细胞的染色体上。然后用胰蛋白酶处理细胞，在带有紫外线 (UV) 滤光片的荧光显微镜下观察获得的单个细胞，以选择只带绿色的细胞。另外，在特定的抗生素存在的情况下，通过体外培养选择转染了 GFP 基因的核供体细胞。带有 GFP 基因的 pEGFP-N1 载体含有作为正选择性标记的新霉素抗性基因。将新霉素抗性基因和 GFP 基因一起导入细胞中，在细胞中表达新霉素抗性蛋白。因此，当在含有新霉素的培养基中培养靶向细胞 (targeted cell) 时，只有转染了该载体的细胞可以存活，没有转染该载体的细胞由于新霉素的作用而死亡，因此  
25 在培养皿中只有转染的细胞可以增殖 (图 1)。

通过确定抗生素的最佳处理浓度，可以有效地使用抗生素进行这种筛选。用新霉素处理 2-3 周后选出靶向细胞，其中每 4-5 天在培养基中加入浓度为 200-800  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的新霉素。依据细胞类型，细胞增殖模式会有所不同。然而，因为细胞都是从一个细胞增殖出来的，应使该靶向细

胞至少增殖到下一步所需的水平。

完成靶向细胞的选择后，在正常的培养基中培养选出的细胞，其中在所述培养基中加入合适的生长因子和抑制凋亡的试剂，从而诱导快速增殖并降低由凋亡造成的无谓的细胞损失。为有效地保存增殖的细胞，

5 建立了保存细胞的最佳条件，冷藏在一代代过程中增殖的细胞。

#### 步骤 4: 用体细胞核移植方法产生重组胚胎

为了生产转基因动物，该转基因动物具有转染的核供体细胞的遗传特性，本发明采用体细胞核移植的克隆技术，由此产生重组胚胎。首先，使未成熟的卵母细胞在体外成熟而制成受体卵母细胞，方法如下。主要

10 从屠宰场收集猪的卵巢，检测是否畸形，用合适的洗涤液洗三次。然后，将未成熟的卵母细胞在可使其成熟的培养基中培养，使其在体外成熟，这种培养基是不含牛血清白蛋白的 NCSU23 培养基 (North Carolina State University 23 (NCSU23-M)，见表 1)，其含有 10% 猪卵泡液 (PFF)、促性腺激素 (GTH)、怀孕母马血清促性腺激素 (PMSG) (Intervet Folligon)、

15 人绒毛膜促性腺激素 (hCG) (Intervet Chorulon) 和 10ng/ml 表皮生长因子 (EGF)。

为进行核移植，需准备受体卵母细胞、核供体细胞和用于切开、去核及注射的吸液管。用 NCSU23 (NCSU23-W，见表 2) 洗涤培养基作为基础来制备培养基。将每个受体卵母细胞放到添加 0.1% 透明质酸酶的 NCSU23-W

20 培养基中以除去卵母细胞周围的卵丘细胞。用 NCSU23-W 培养基的微滴洗涤完全裸露的卵母细胞。

用固定吸液管固定裸露的卵母细胞，用尖的吸液管切开第一极体上部透明带的一部分，产生一条裂缝。

用切透明带的吸液管挤压细胞，使含有第一极体的一部分细胞质从

25 裂缝处挤出，从而产生去核卵母细胞。用 NCSU23-W 培养基洗涤去核卵母细胞，并将其置于 NCSU23-W 培养基的微滴中，直到进行核移植。将卵母细胞透明带上的裂缝与固定吸液管置于一条直线上后，用注射吸管抽吸供体细胞，并通过裂缝将每个供体细胞注射到各去核卵母细胞的卵周隙中，从而使准备好的核供体细胞被转染到去核受体卵母细胞中，由此产

生核移植胚胎（图 2）。

核移植胚胎需用电融合方法处理，其中用 BTX 电细胞操纵装置（BTX Electro Cell Manipulator, ECM2001, BTX, 美国）产生 30 微秒、1.8kV/cm 的单向直流电脉冲，使去核卵母细胞与供体细胞电融合。用 NCSU23-W 培养基洗涤电融合的重组胚胎，在 NCSU23 培养基（NCSU23-D，见表 3）中  
5 培养。培养后第 4 天，在 NCSU23 培养基中添加 10%血清。在第七天，对重组胚胎的胚泡期发育和 GFP 表达进行评估（图 3）。

表 1 NCSU-M 的组成

组分	浓度
NaCl	108.73 mM
KCl	4.78 mM
HEPES (N-2-羟乙基哌嗪 -N'-2-乙磺酸)	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	1.70 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.19 mM
MgSO <sub>4</sub>	1.19 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25.07 mM
葡萄糖	5.55 mM
谷氨酰胺	1.00 mM
FCS (胎牛血清)	10% (体积比)

20

表 2 NCSU-W 的组成

组分	浓度
NaCl	108.73 mM
KCl	4.78 mM
HEPES	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	1.70 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.19 mM
MgSO <sub>4</sub>	1.19 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25.07 mM
葡萄糖	5.55 mM
牛磺酸	7.00 mM
亚牛磺酸	5.00 mM
谷氨酰胺	1.00 mM
FCS	10%(体积比)

表 3 NCSU-D 的组成

组分	浓度
NaCl	108.73 mM
KCl	4.78 mM
CaCl <sub>2</sub>	1.70 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.19 mM
MgSO <sub>4</sub>	1.19 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25.07 mM
葡萄糖	5.55 mM
牛磺酸	7.00 mM
亚牛磺酸	5.00 mM
谷氨酰胺	1.00 mM
FCS	10%(体积比)

**步骤 5: 将重组胚胎移植到代孕母猪体内并产生成活后代**

选择出适用于重组胚胎移植并能使重组胚胎发育成正常胎猪的代孕母猪。通过监测所选的母猪的动情周期决定移植的最佳时机。一般来说,在母猪显出动情信号后约 30-40 小时进行受精比较合适。因此,根据适

合的受精时期，并考虑重组胚胎在体外发育所需时间，可计算出胚胎移植的最适时间。

通过剖腹术打开代孕母猪的腹部，靠近子宫将重组胚胎注射到输卵管 2cm 深处，从而将重组胚胎移植到代孕母猪体内（图 4）。胚胎移植 4 周后，用超声波对母猪的妊娠情况进行评价。此后，每两周进行一次超声波检测以监控代孕母猪的妊娠情况和胎猪的生长情况。

如果生产过程超过 30 分钟还没有生出小猪，应该用有经验的助手帮助母猪生产。当预期的生育期过去时，给母猪注射激素或进行如剖腹产这样的外科手术来促使生产。

基于上述方法，本发明人使用胎猪成纤维细胞作为核供体细胞，将转染了 GFP 基因的体成纤维细胞采用核移植方法移植到去核的受体胚胎中，产生表达 GFP 的重组胚胎；在体外培养得到的核移植胚胎 7 天，使其发育到胚泡期。将重组胚胎称为“SNU-P1[猪核移植胚胎, Porcine NT Embryo]”，并于 2001 年 12 月 27 日将其保藏于国际保藏机构：KCTC（韩国典型培养物保藏中心（Korean Collection for Type Cultures）；KRIBB, 52, Oun-dong, Yusong-ku, Taejon, 韩国），保藏编号为 KCTC 10145BP。本发明人将重组胚胎移植到代孕母猪体内，获得了正常的克隆后代。

另一方面，生产敲除 GT 基因的克隆猪的方法包括下列步骤：（a）通过培养来源于猪的体细胞系制备核供体细胞；（b）从猪基因组 BAC 文库中分离 GT 基因，用分离的 GT 基因构建基因寻靶载体，其中该载体携带经过修饰的 GT 基因，以抑制正常 GT 蛋白的表达，所述经过修饰的 GT 基因是通过同源重组用编码选择性标记的基因取代野生型 GT 基因的一部分而得以修饰的；（c）将载体与脂或非脂组分混合，形成脂（或非脂）-DNA 复合物，并将该复合物加到核供体细胞的培养基中，在核供体细胞中导入重组的 GT 基因，由此实现基因寻靶；（d）将转染了重组 GT 基因的核供体细胞移植到去核的猪受体卵母细胞中以产生转基因的核移植（NT）胚胎，并激活所述 NT 胚胎；（e）将所述 NT 胚胎移植到代孕母猪体内以产生活活后代。

如下，依照各个步骤具体描述敲除 GT 基因的克隆猪的生产方法：

### 步骤 1: 核供体细胞的制备、体外培养和保存

在使用体细胞核移植技术生产敲除 GT 基因的转基因动物时需要核供体细胞。核供体细胞的制备与生产表达 GFP 基因的克隆猪的方法的步骤 1 相同。

### 5 步骤 2: GT 基因的分离

对总共含有三个库 (pool) 的猪基因组 BAC 文库进行筛选, 分离 GT 基因 (人类基因组作图计划公司 Human Genome Mapping Project Inc., 英国)。用已知的猪 GT cDNA 序列 (GeneBank 编号:AF221517) 设计用于筛选的引物。为检测引物和使用所述引物的 PCR 方法的特异性, 用猪基因组 DNA 和所述引物进行 PCR 反应, 得出阳性 PCR 结果。通过 PCR 方法用所述引物对猪基因组 BAC 文库的三个库进行筛选, 得到一个单克隆, 在其中可用 PCR 扩增出预期大小的 DNA 片段。然后, 用 Southern 印迹 (DNA 印迹) 验证获得的 GT 基因克隆。

### 15 步骤 3: 构建含有敲除 GT 基因基因寻靶载体, 并将该载体导入核供体细胞

用获得的 GT 基因克隆制备基因寻靶载体。通过同源重组, 用编码选择性标记的基因取代 GT 基因的一部分, 破坏了 GT 基因, 由此阻止正常的 GT 蛋白的产生。

为了有效地选择靶向细胞, 用启动子陷阱方法构建了不含外源启动子的载体。该载体含有与 GT 基因的部分第 8 内含子、第 9 外显子及部分第 9 内含子对应的核酸序列, 以及编码连有 SV40 聚腺苷酸 (SV40 poly(A)) 序列的嘌呤霉素抗性基因的核酸序列, 其中所述嘌呤霉素抗性基因取代了对应于第 9 外显子中 AvaI-DraIII 片段的核酸序列。通过同源重组, 将连有 SV40 聚腺苷酸的嘌呤霉素抗性基因的核酸序列插入 GT 基因的第 9 外显子, 由此破坏了 GT 基因 (图 9)。用在表达 GFP 的克隆猪的生产方法中提到的 FuGENE 6 将基因寻靶载体导入核供体细胞中。

将获得的核供体细胞在含有嘌呤霉素的培养基中培养 1-2 周以选择靶向的体成纤维细胞。此后, 用本领域常用的方法验证选出的体成纤维细胞, 所述方法包括 Southern 印迹和 PCR 方法。

#### 步骤 4: 用体细胞核移植方法产生重组胚胎

该步骤与生产表达 GFP 的克隆猪的方法中的步骤 4 相同。

#### 步骤 5: 将重组胚胎移植到代孕母猪中并产生成活后代

该步骤与表达 GFP 基因的克隆猪的生产方法中的步骤 5 相同。基于  
5 上述方法, 本发明人使用猪胎成纤维细胞作为核供体细胞, 用带有敲除  
GT 基因的载体转染体成纤维细胞并将所述转染的体成纤维细胞核移植到  
去核的受体胚胎中, 产生了敲除 GT 基因的重组胚胎。将得到的重组胚胎  
称为“SNU-P2[猪核移植胚胎], 并于 2001 年 12 月 27 日将其保藏于国际保  
藏机构: KCTC (韩国典型培养物保藏中心; KRIBB, 52, Oun-dong,  
10 Yusong-ku, Taejon, 韩国), 保藏编号为 KCTC 10146BP。本发明人将重  
组胚胎“SNU-P2”移植到代孕母猪体内, 获得了正常的克隆后代。

下面将结合附图并参照下列实施例更具体地解释本发明。然而, 对  
本领域技术人员来说, 很显然, 下列实施例只是用来阐明本发明, 本发  
明并不限于这些实施例。

#### 15 实施例 1: 核供体细胞的制备、体外培养和保存

收集怀孕猪的子宫后, 在无菌环境中进行下列操作。主要分离头-  
尾长大约 25mm 的 30 天大的胎猪。无菌操作分离被羊膜包围的胎猪。在  
除去头、四肢和内脏后用含有几种抗生素和抗真菌素的磷酸缓冲液洗涤  
胎猪几次。在含有 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 的培养皿中, 用手术剪从胎猪上  
20 分离胎组织。将分离的胎组织在 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中于 38°C 培养 30 分钟。此  
后用多次离心方法从胎猪组织中除去胰蛋白酶, 然后在含 10% FCS 的  
DMEM (Dulbecco 改进的 Eagle 培养基, Dulbecco' s Modified Eagle' s  
Medium) 中培养胎猪组织外植体。

当细胞达到 90%-100% 铺满率时, 继代培养细胞, 并冷藏剩余的细胞。  
25 在体细胞核移植技术中使用所述的冷藏细胞作为细胞核供体, 在含有生  
长因子和凋亡抑制剂的培养基中继代培养, 以刺激细胞生长并抑制细胞  
死亡。

#### 实施例 2: 在猪 BAC 基因组文库中筛选 GT 基因

在筛选猪 BAC 基因组文库前, 为获得阳性对照, 首先按如下方法制

备猪基因组 DNA。从怀孕六个月的丹麦母猪获取大约 5g 卵巢后，将其充分切割并在含液氮的研钵里研磨以破坏组织。用浓度为 11mg/ml 的蛋白酶 K 处理研磨好的组织，并用苯酚抽提，这样得到猪基因组 DNA。

用猪 BAC 基因组文库筛选猪 GT 基因。为获得单克隆，对含有三个库的文库依次进行筛选。初级库由 17 个小瓶组成，将这些小瓶按字母顺序标记为 A 到 R（不包括 K）。次级库由 96 孔板组成，每一个初级库的小瓶对应 15 个单独的库，三级库由 384 孔板组成，每一个板对应于次级库中的一个库。首先，用已知的猪 GT cDNA（GeneBank 编号 No:AF221517），制备含有正向引物和反向引物的 PCR 引物对：猪 GT5（5'-GAT CAA GTC CGA GAA GAG GTG GCA A-3'）；猪 GT3（5'-TCC TGG AGG ATT CCC TTG AAG CAC T-3'）。当用该引物对针对猪基因组 DNA 进行 PCR 时，预期的 PCR 产物大小是 342bp。为获得筛选中鉴定 GT 信号的阳性对照，使用下列 PCR 混合物，在下列条件下进行 PCR。PCR 混合物包括 1 单位 Taq DNA 聚合酶、10 mM dNTPs、200 mM Tris-Cl（pH 8.8）、100 mM KCl、100 mM(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、1% TritonX-100（粹通 X-100）、1mg/ml BSA、100ng/μl 猪基因组 DNA 和 2 μl 引物对（正向引物 40pmol/μl 和反向引物 40pmol/μl），总体积为 20 μl。PCR 条件包括 95℃变性 5 分钟，然后 40 个循环的 95℃变性 1 分钟、55℃退火 1 分钟和 72℃延伸 1 分钟 30 秒，最后 72℃延伸 15 分钟。得到的 PCR 反应混合物在琼脂糖凝胶上通过电泳分析。

用猪基因组 DNA（100ng/μl）进行 PCR，鉴定了大小为 342bp 的 PCR 产物，并在筛选猪 BAC 基因组文库中将其作为阳性对照。使用猪 BAC 基因组文库的初级库（从 A 到 R 的 17 个库，不含 K）时，用猪引物对 GT5 和 GT3 进行 PCR，该 PCR 条件与用猪基因组 DNA 时的 PCR 条件相同。在 F 和 G 库中获得与猪基因组 DNA 的 PCR 产物大小相同的 PCR 产物，即 342 bp（图 5）。用 PCR 法对与初级库中显示阳性信号的 F 和 G 库相对应的次级库（F:76 号库到 90 号库；G:91 号库到 105 号库，F 和 G 库分别由 15 个库构成）进行筛选，PCR 条件与上述一致，结果产生与猪基因组 DNA 的 PCR 扩增产物大小相同的扩增产物。筛选次级库时，在 F 库的 81 和 82 号库、G 库的 91 号库中发现 342bp 大小的 PCR 产物（图 6）。在选出的库中，

88号库显示出最强的信号。当用对应于88号的三级库进行PCR反应时，在8F中获得了与用猪基因组DNA进行PCR中的信号相同的信号（图7），所述对应于88号库的三级库由384孔板构成（1A到24P），其中每一个孔包含一个单克隆。

5 实施例3：构建带有敲除GT基因的载体

用Webcutter程序（<http://www.firstmarket.com/firstmarket/cutter/>）获得猪GT基因（GeneBank登记号：AF221517）的粗略的限制性酶切图谱。按照如下方法制备以下用于southern杂交（DNA杂交）的探针。通过PCR方法并在8%PAGE凝胶上进行电泳（聚丙烯酰胺凝胶电泳）后电洗脱纯化，获得与猪GT基因的一部分对应的351bp长的DNA片段，然后用随机引物标记试剂盒（Life Technologies, 美国）将其标记上 $\alpha$ - $^{32}\text{P}$  [dCTP]。

为分离含有猪GT基因的BAC DNA，从实施例2中鉴定的三级库8F中取1  $\mu\text{l}$  克隆的大肠杆菌（*E. coli*），先将其接种到3ml LB肉汤培养基（CM+）中，在37°C条件下300rpm震荡培养12小时。然后，再将培养的大肠杆菌接种到500ml LB肉汤培养基（CM+）中，在同样条件下培养16小时。用大剂量构建试剂盒（large construct kit, Qiagen, 德国）从大量培养的大肠杆菌中纯化BAC DNA。此后，用10个单位的EcoRI、HindIII、BamHI和NotI消化5 $\mu\text{g}$ 得到的BAC DNA，消化时间为3小时，在50V电压下用1%的琼脂糖凝胶电泳12小时。将得到的凝胶浸入变性液中（0.5M NaOH, 1.5M NaCl）15分钟，然后浸入中和液中（0.5 M Tris-Cl, 1.5 M NaCl, pH 8.0）15分钟，用真空转移法将凝胶上已分离的DNA片段转移到尼龙膜上。预杂交3小时后，使尼龙膜与已制备的探针杂交16小时。然后，将膜曝光在X-射线胶片上以鉴定含有猪GT基因的BAC DNA片段。

按照如下方法将鉴定的BAC DNA片段克隆到pUC19。用EcoRI消化pUC19载体1小时30分，通过酚/氯仿抽提纯化，使用前储存在-20°C。在微管中将BAC DNA片段与100ng EcoRI消化过的pUC19载体、10 $\times$ 连接缓冲液及2 $\mu\text{l}$  T4 DNA连接酶（10个单位/ $\mu\text{l}$ ）混合，然后在15-16°C

温育 16 小时以进行连接。

在 10 $\mu$ l 连接混合物中加入 200 $\mu$ l 感受态细胞，将混合物放于冰上 30 分钟，42 $^{\circ}$ C 热激 90 秒，添加 800  $\mu$ l LB 肉汤培养基，然后 37 $^{\circ}$ C 培养 45 分钟。此后，将细胞涂于含有氨苄青霉素、IPTG（异丙基硫代- $\beta$ -D 半乳糖苷）和 X-gal（5-溴-4-氯-3-吡啶- $\beta$ -D-半乳糖苷）的 LB 平板上并在 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。选择白色菌落并培养，通过 PCR 鉴定是否含有所需的 DNA 片段。

根据克隆猪 GT 基因的限制性酶切图谱，发现第 9 外显子没有 EcoRI、HindIII 和 NotI 的限制性酶识别位点，而只含有 BamHI 位点。克隆出来的含有猪 GT 基因的 BAC DNA 片段用 EcoRI、HindIII、BamHI 和 NotI 的各个酶处理，在 1%琼脂糖凝胶上分离，发现各种大小的 DNA 带（图 8）。将所述凝胶进行 Southern 杂交。结果发现，除了 BamHI 消化的片段外，含有猪 GT 基因第 9 外显子的 DNA 片段以单一条带存在，分子量大约 8-12kb 左右。特别是，EcoRI 片段大约 8kb 长，其含有猪 GT 基因的第 9 外显子及第 9 外显子相邻的两个内含子的一部分。

因此，用 EcoRI 切割克隆出的猪 BAC DNA 后，亚克隆得到的 EcoRI 片段。此后，按照如下方法用亚克隆的 EcoRI 片段制备用于基因寻靶的载体。为了更有效地选择靶向细胞，用启动子陷阱策略制备用于基因寻靶载体。亚克隆的猪 GT 基因（1  $\mu$ g）和带有 puro cassette (Clontech) 的质粒分别用 AvaI 和 DraIII 及 HindIII 和 BamHI 在 37 $^{\circ}$ C 消化 2 小时以上。用 Klenow 片段 DNA 聚合酶和 dNTP 处理消化的产物以产生平端，然后在 1%琼脂糖凝胶上电泳，再用 DNA 洗脱试剂盒纯化 (Qiagen, 德国)。用 T4 DNA 连接酶在嘌呤霉素抗性基因-SV40 多聚 (A) 片段上连上所述纯化的 GT 基因片段，由此得到基因寻靶载体（图 9）。

25 实施例 4：将 GFP 基因和被破坏的 GT 基因导入胎成纤维细胞中的基因寻靶技术

按照如下方法制备用于基因寻靶的猪胎成纤维细胞。当猪胎成纤维细胞在 60mm 培养皿中生长至完全铺满时，除去培养基后用磷酸盐缓冲液洗涤一次，用 0.25%胰蛋白酶-EDTA 处理，重悬浮于含 10% FCS 的 2ml 培

培养基中，置于 35mm 培养皿中。第二天，当培养物达到 50%-90%铺满率时，用 GFP 基因转染成纤维细胞。

如使用 FuGENE 6，在含有成纤维细胞的 35mm 培养皿的每个孔中加入 1 $\mu$ g DNA 样品和 3 $\mu$ l FuGENE 6。首先，在 Eppendorf 管中等量加入 97 $\mu$ l 5 的不含血清的培养基。在每管中依次加入 1  $\mu$ g 的 pEGFP-N1 载体 DNA 和 3 $\mu$ l 的 FuGENE 6，然后在 3000rpm 快速离心 10 秒。在室温培养 15 分钟后，将 100  $\mu$ l 该混合物加入 35mm 培养皿的每个孔中，在 CO<sub>2</sub> 培养箱中涡旋并培养。即使用很少量的 DNA，阳离子脂质体 LipofectAmin plus (Life Technologies) 仍具有转染效率高的优点。使用前将磷酸盐缓冲液和不含 10 FCS/抗生素的培养基在 37 $^{\circ}$ C 预热 30 分钟。在干净的实验台上，向 Eppendorf 管中加入 pEGFP-N1 载体 DNA，将 100  $\mu$ l 不含血清的培养基或 Opti-MEM 与 4  $\mu$ l Plus 试剂混合，并将其加到管中。用吸液管充分混合后，将混合物在室温培养 15 分钟。在 DNA 混合物的培养期间，将含有铺满率为 90%的胎成纤维细胞的 6 孔板用磷酸盐缓冲液洗两次。在每个孔中 15 加入 0.8ml 不含血清的培养基后，将上述 DNA 混合物加到各孔中，然后旋转平板，接着在 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。另外，如果使用阳离子多聚体试剂 ExGen 500 ( MBI Fermentas) 时，将 2  $\mu$ l pEGFP-N1 载体 DNA 与 100  $\mu$ l 150mM NaCl 混合，然后加入 6.6  $\mu$ l ExGen 500 并混合，将所述 DNA 混合物在 3000rpm 快速离心 10 秒。在室温培养 10 分钟后，将 DNA 混合物加到含有 20 猪胎成纤维细胞的 35mm 培养皿的每个孔中，所述猪胎成纤维细胞的生长到铺满率达 60%，然后在 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

#### 实施例 5：转染了 GFP 基因的核供体细胞的选择、增殖和冷藏

将使用三种不同的转染试剂转染 GFP 基因的胎猪成纤维细胞培养 3-5 天直到完全铺满，然后通过胰蛋白酶作用将其分开并分离成单个的细 25 胞。在带有 UV 滤光片的显微镜下观察这些单个细胞以鉴定表达 GFP 蛋白的细胞。

为了只选择表达 GFP 蛋白的细胞，将细胞在添加有新霉素的培养基中培养 3 周，其中每隔 4-5 天在培养基中加入 400  $\mu$ g/ml 的新霉素。选出细胞后，用胰蛋白酶处理形成的克隆，稀释到合适浓度后在 96 孔板中

培养。将在 96 孔板各孔中增殖的细胞转移到 24 孔板，然后转移到 12 孔板，再转移到 6 孔板，然后进行培养。为研究 GFP 基因是否整合到猪胎成纤维细胞的染色体 DNA 中，从鉴定的克隆中分离基因组 DNA。设计一组引物，序列如下：5' -GCGATGCCACCTACGGCAAGCTGA-3' 和 5' -

- 5 GAGCTGCACGCTGCCGTCCTCGAT-3'，用这组引物对所述分离的基因组 DNA 进行 PCR 扩增，并用 GFP 探针对所述分离的基因组 DNA 进行 Southern 印迹，发现 GFP 基因已整合到所述克隆的染色体 DNA 中。通过以下方法冷藏鉴定的克隆猪胎成纤维细胞：用含 10% FCS 的培养基和 15% FCS 制备冷冻培养基，将增殖的细胞悬浮于其中，将所述悬浮细胞在 4℃ 放置 2 小时，  
10 然后在 -70℃ 放置 12 小时，然后将冷冻的细胞 -150℃ 保存。

#### 实施例 6：受体卵母细胞的制备

- 从屠宰场收集猪的卵巢，用带有 18 号针的 5ml 注射器从卵巢中吸出直径大约 3-6mm 的卵泡。将卵泡转移到带有平方格 (1×1 cm) 线的 100mm 培养皿中，选择被大量卵丘细胞包围的带有同质细胞质的卵母细胞。在  
15 35mm 培养皿中用 2ml NCSU23-W 培养基洗涤所述的选择的卵母细胞三次，最后用 NCSU23-M 培养基洗涤。之后，用 10% 的猪卵泡液 (PFF)、GTH、PMSG、hCG 和 10ng/ml EGF 添加不含 FCS 的 NCSU23-M 培养基，在四孔板的各孔中等量加入 480 μl 所述培养基。在各孔中放入 50-60 个未成熟的卵母细胞，并在 5% CO<sub>2</sub> 中培养 22 小时。然后，卵母细胞在如上所述不含  
20 激素的 NCSU23-M 培养基中体外成熟 20-22 小时。

#### 实施例 7：体细胞核移植

- 将实施例 6 中制备的受体卵母细胞用 NCSU23-W 培养基洗涤一次，并转移到含 0.1% 透明质酸酶的 NCSU23-W 培养基中。然后，从受体卵母细胞上除去卵丘细胞。将裸露的卵母细胞转移到细胞松弛素 B 溶液中，该细胞  
25 松弛素 B 溶液的制备方法如下：将浓度为 7.5mg/ml 溶解于 DMSO (二甲基亚砷) 的 1μl 细胞松弛素 B (Sigma Chemical Co., 美国)，与 1ml 添加有 10% FCS 的 NCSU23-W 培养基混合。使用显微操作器固定裸露的卵母细胞，利用固定吸液管与尖的微量吸液管配合，刺破卵母细胞的透明带形成一条裂缝。然后，用尖的微量吸液管挤压卵母细胞上部，使 10%-15%

的细胞质被挤出，由此产生去核的卵母细胞。

将预先制备的核供体细胞移植到去核的受体卵母细胞中。首先，将 5mg PHA-P（植物凝集素）溶解到 10ml NCSU23-W 培养基中制成 PHA-P 母液，取 100  $\mu$ l PHA-P 母液与 400  $\mu$ l NCSU23-W 培养基混合制成 PHA-P 溶液，用该 PHA-P 溶液在工作盘上方的中间放置 4  $\mu$ l 的注射微滴。然后，用 4  $\mu$ l 含有 0.5% FCS 的 PBS，在所述工作盘中注射微滴上下滴加两个核供体细胞的微滴。用矿物油覆盖所述微滴，将工作盘置于显微操纵器的平板上。将 NCSU-W 培养基中的去核卵母细胞用 NCSU-W 培养基洗涤三次并转移到注射微滴中。然后使用注射吸液管将所述核供体细胞转移到注射微滴中。通过裂缝，用注射吸液管将已鉴定表达 GFP 的细胞或敲除 GT 基因的细胞注射到去核受体卵母细胞的卵周隙中（图 3）。将得到的转基因核移植（NT）胚胎用 NCSU-W 培养基洗涤三次，然后将其放置于 NCSU-W 培养基中。

#### 实施例 8 细胞的融合和激活

将转基因 NT 胚胎用 BTX 电细胞操纵装置（BTX, 美国）进行电融合，方法如下。为了进行清洗，用口吸管（mouth pipette）在含有 NT 胚胎的 NCSU23-W 培养基中加入 15  $\mu$ l 甘露醇溶液（见表 4），然后培养 1 分钟。在含有 NCSU23-W 培养基的甘露醇溶液中培养 NT 胚胎 1 分钟，使用口吸管使其悬浮在用于清洗的甘露醇溶液中。将所述 NT 胚胎放在含有甘露醇溶液的小室中，该小室的两端带有电极，并与 BTX 电细胞操纵装置相连，放置方向为核供体细胞面向阴极。之后，施加一次 30 微秒的 1.8kV/cm 的单向直流电脉冲来促进 NT 胚胎的细胞融合。电刺激过后 20 分钟内，在显微镜下观察 NT 胚胎以确定细胞融合是否完成，而未融合的 NT 胚胎再进行一次电融合。将已鉴定为融合的 NT 胚胎转移到 NCSU23-W 培养基中，在该培养基中 NT 胚胎被激活。

表 4

甘露醇溶液

组分	浓度
甘露醇	280 mM
HEPES	0.5 mM
CaCl <sub>2</sub>	0.1 mM
MgSO <sub>4</sub>	0.1 mM
BSA	0.05%(质量/体积比)

#### 实施例 9：核移植胚胎的体外培养

电融合的转基因 NT 胚胎在 NCSU23-W 培养基中被激活后，将其培养在 NCSU23-D 培养基中。培养 4 天后，在 NCSU23-D 培养基中添加 10% FCS。在第 7 天，对转各基因 NT 胚胎的胚泡期发育和 GFP 表达进行评估，其中在紫外光照射下观察 GFP 表达（图 4）。

实施例 10：根据是否使用转染了 GFP 基因的核供体细胞，对 NT 胚胎的发育水平进行比较

为了评价在核供体细胞中导入 GFP 基因对核移植胚胎的发育产生负影响还是正影响，根据实施例 6 到 9 中的相同方法，对在实施例 4 制备的转染了 GFP 基因的核供体细胞和正常的体成纤维细胞进行体细胞核移植。

在获得的核移植胚胎中，分析分裂比率、发育到胚泡期的比率和处于胚泡期的细胞的数目（见表 5）。如表 5 所示，发现在供体细胞中无论是是否导入 GFP 基因，核移植胚胎的发育水平没有明显的差别，表明将 GFP 基因导入成纤维细胞并不会影响核移植胚胎的发育。

表 5

根据是否使用转染了 GFP 基因的核供体细胞，比较核移植胚胎的发育水平

	融合的卵母细胞的数目	分裂比率 (%)	发育到胚泡期的比率 (%)	处于胚泡期的细胞数目
导入 GFP 基因	5031	2388 (47.5)	357 (15.0)	44.3±15.1
未导入 GFP 基因	6681	3106(46.5)	437(14.1)	46.3±6.4

实施例 11: 根据将 GFP 基因导入核供体细胞中的方法, 对 NT 胚胎的发育水平进行比较

为了评价向核供体细胞中导入 GFP 基因时使用的转染试剂对核移植胚胎的发育水平的影响, 分别使用实施例 4 的三种转染试剂中的一种将 GFP 基因转染到核供体细胞中, 再根据实施例 6 到 9 中的相同方法进行体细胞核移植。

在获得的核移植胚胎中, 分析分裂比率、发育到胚泡期的比率和处于胚泡期的细胞的数目 (见表 6)。如下表 6 所示, 发现这三种情况中核移植胚胎的发育水平没有明显的差别, 表明使用不同的转染试剂和转染方法并不会影响核移植胚胎的发育水平。

表 6

根据将 GFP 基因导入核供体细胞的不同方法, 比较核移植胚胎的发育水平

转染试剂	融合的卵母细胞的数目	分裂比率 (%)	发育到胚泡期的比率 (%)	处于胚泡期的细胞数目
未转染的细胞	6681	3106(46.5)	437 (14.1)	47.4±13.1
LipofectAmine	1041	502(48.2)	70(13.9)	53.3±11.3
FuGENE 6	2967	1401(47.2)	221(15.7)	54.4±12.7
ExGen 500	1023	485(47.4)	67(13.8)	46.3±6.4

实施例 12: 将 NT 胚胎移植到代孕母体内

为了将实施例 1 到 11 制备的带有 GFP 基因或敲除 GT 基因的核移植胚胎转移到代孕母体内, 从没有母性疾病并动情周期有规律的母猪中选出正常的猪的个体。

从体外培养的转基因核移植胚胎中选出高质量的胚胎, 然后将选出的核移植胚胎与含有 20% FCS 的磷酸盐缓冲液一起注射到输卵管 2cm 深处, 靠近卵巢的位置 (图 5)。具体地说, 使用常规麻醉剂阿托品, 以 1mg/kg 体重的剂量对代孕母猪进行肌肉注射, 然后注射 2-4mg/kg 剂量的镇定剂阿扎哌隆 (azaperone) (stresnil, P/M; Mallinckrodt), 10 分钟后注射 20mg/kg 的盐酸克他命。注射 2%利多卡因使待切口的皮肤周围的区域局部麻醉。根据常规剖腹术方法, 在母猪腹部中间纵向切开大约 7cm 长的

切口，打开腹腔，但不允许血流到腹腔里。用手刺激腹腔内部，将卵巢、输卵管和子宫拉到腹腔打开的区域。找到输卵管的开口后，小心地操作卵巢，将具有 1.0 ml 结核菌素注射器(Latex free, Becton Dickinson & CO. Franklin lakes, NJ 07417)的胚胎移植管 (Tom cat catheter, 50cm, 5 French (弗伦奇), 末端开口的导液管, Williams A Cook, MO 63103) 插到输卵管 2cm 深处 (图 5)。

确保插入的胚胎移植管前端留出足够的空间后，通过该胚胎移植管将转基因 NT 胚胎注射进去。用显微镜观察，确定转基因 NT 胚胎被成功注射后，将 500ml 含有抗生素的生理盐水溶液注射到腹腔内部。然后，用可生物吸收的缝合线缝合打开的腹腔。手术后，给代孕母猪施用多种抗生素，施用 5 天，以防止感染。

实施例 13: 评价代孕母猪的妊娠情况，及表达 GFP 的成活后代的产生和带有敲除的 GT 基因的成活后代的产生

将转基因 NT 胚胎移植到代孕母猪体内 4 周后，用超声波诊断系统评价母猪的妊娠情况。

此后，每两周进行一次超声波诊断以监测代孕母猪的妊娠情况。在胚胎移植 114 天后，表达 GFP 的代孕母猪生产出 7 头克隆小猪，敲除 GT 基因的代孕母猪生产出 3 头克隆小猪。

实施例 14: 转基因克隆猪的遗传分析

用分子生物学方法对实施例 13 中的成活后代进行遗传分析，用肉眼观察它们的表型。

通过用肉眼观察、以及进行 Southern 印迹、Western 印迹 (蛋白质印迹) 和用成活后代的组织进行细胞培养等方法，鉴定所述成活后代中 GFP 的表达情况和敲除 GT 基因的导入情况。

首先，用肉眼观察所述后代的皮肤、嘴和舌头上绿色的诱导情况来鉴定 GFP 的表达。为鉴定所述后代中 GFP 的表达，也可以使用 Southern 印迹方法分析后代的基因组 DNA 以及用 Western 印迹方法分析一些组织的蛋白样品。另外，用 Southern 印迹方法分析代孕母体 (带有敲除的 GT 基因) 产生的成活后代，发现它们也带有敲除的 GT 基因。

### 工业适用性

如前所述，本发明用 GFP 基因或被破坏的 GT 基因转染体细胞，并将得到的体细胞利用核移植方法移植到受体卵母细胞中，从而提供表达 GFP 的克隆猪和携带敲除 GT 基因的克隆猪，因此使大规模生产动物疾病模型成为可能，并使动物能提供可用于人类移植的器官，而不会产生超急性免疫排斥。

已采用示例性形式描述了本发明，应理解，希望所用的术语本质上是描述性的而非限制性的。根据上述教导，本发明还存在许多修改和变化。因此，应理解，在所附权利要求的范畴中，可以不同于上述特定方法的其他方法实施本发明。

申请人或代理机构的案卷号 OP020077	国际申请号 PCT/KR01/02304
-----------------------	----------------------

有关保藏的微生物或其他生物材料的说明  
(PCT Rule 13bis)

A. 下面的说明涉及保藏的微生物或其他生物材料，该微生物或其他生物材料描述于说明书第 <u>12</u> 页，第 <u>23-26</u> 行	
B. 保藏物的鉴定 <input type="checkbox"/> 其他的保藏物在附页 <input type="checkbox"/>	
保藏机构的名称	
韩国典型培养物保藏中心	
保藏机构的地址（包括邮编和国家）	
#52, Oun-dong, Yusong-ku, Taejon 305-333, 韩国	
保藏日期	保藏编号
27/12/2001	KCTC 10145BP
C. 附加说明（如果没有，保留空白） <input type="checkbox"/> 在附加页上继续此信息 <input type="checkbox"/>	
D. 进行说明的指定国家（如果该说明不是针对所有指定的国家）	
E. 单独提供说明（如果没有，保留空白）	
以后会将下列的说明提交到国际局（具体表明该说明的一般性质，如“保藏编号”）	

仅供受理局填写
<input type="checkbox"/> 随国际申请一起收到本页
负责人

仅供国际局填写
<input type="checkbox"/> 国际局在： 收到本页
负责人

申请人或代理机构的案卷号 OP020077	国际申请号 PCT/KR01/02304
-----------------------	----------------------

有关保藏的微生物或其他生物材料的说明  
(PCT Rule 13bis)

A. 下面的说明涉及保藏的微生物或其他生物材料，该微生物或其他生物材料描述于说明书第 <u>15</u> 页，第 <u>5-8</u> 行	
B. 保藏物的鉴定	其他的保藏物在附页 <input type="checkbox"/>
保藏机构的名称	
韩国典型培养物保藏中心	
保藏机构的地址（包括邮编和国家）	
#52, Oun-dong, Yusong-ku, Taejon 305-333, 韩国	
保藏日期	保藏编号
27/12/2001	KCTC 10146BP
C. 附加说明（如果没有，保留空白）	在附加页上继续此信息 <input type="checkbox"/>
D. 进行说明的指定国家（如果该说明不是针对所有指定的国家）	
E. 单独提供说明（如果没有，保留空白）	
以后会将下列的说明提交到国际局（具体表明该说明的一般性质，如“保藏编号”）	

仅供受理局填写
<input type="checkbox"/> 随国际申请一起收到本页
负责人

仅供国际局填写
<input type="checkbox"/> 国际局在： 收到本页
负责人

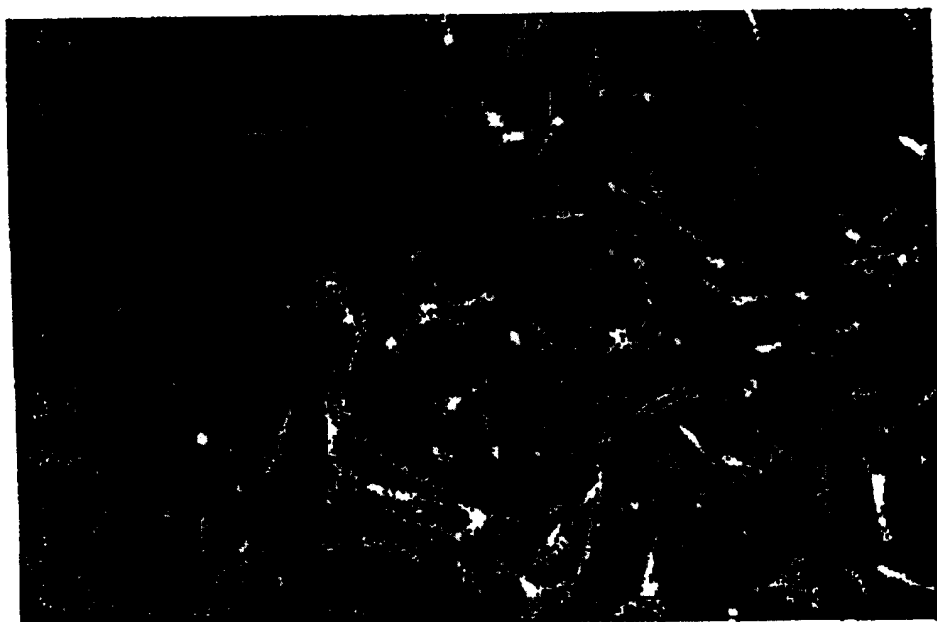


图1

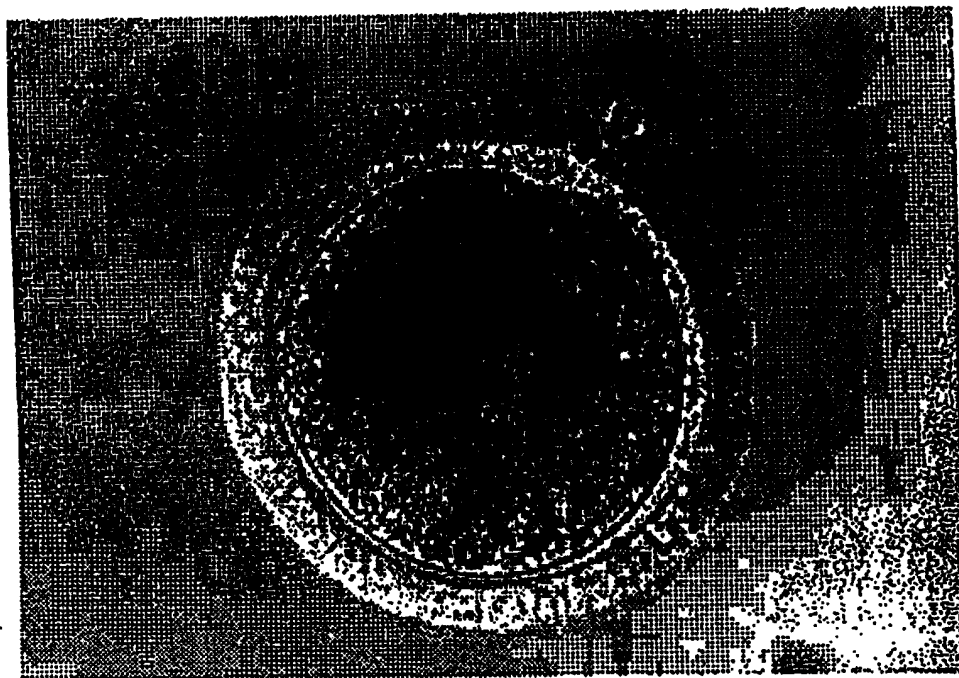


图2

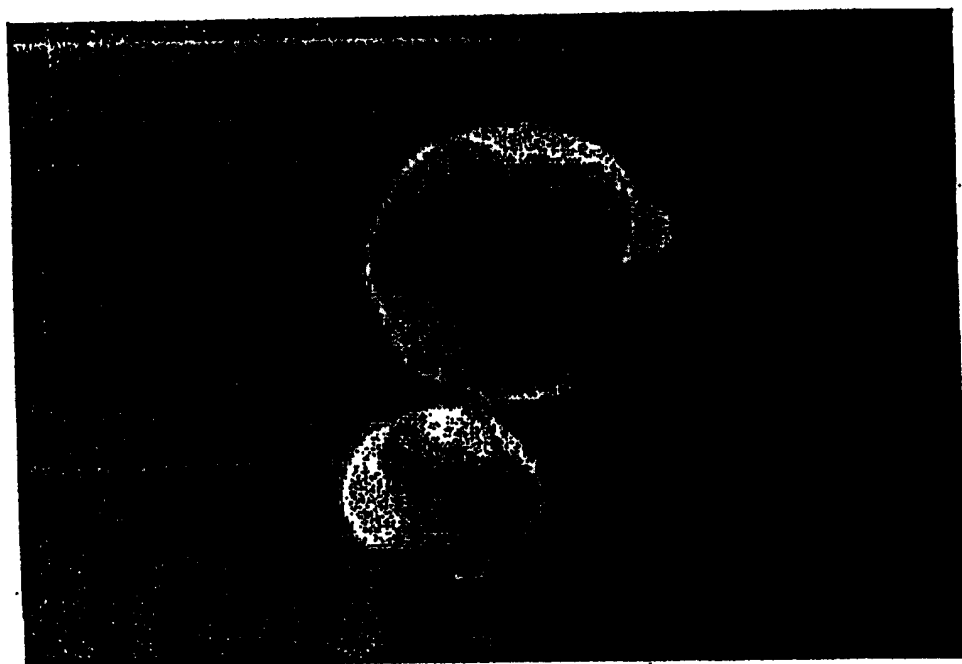


图3



图4

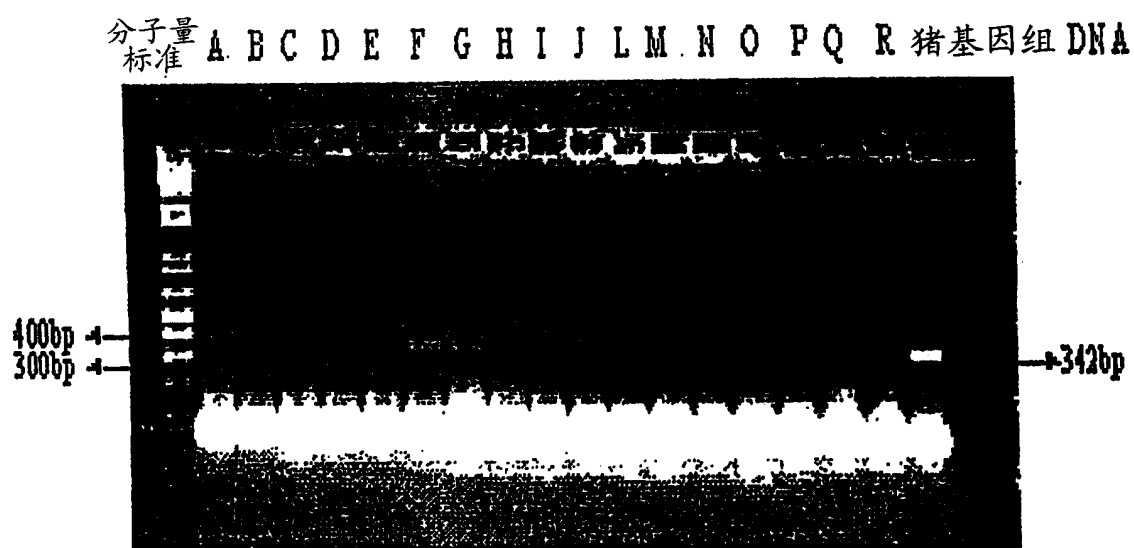


图5

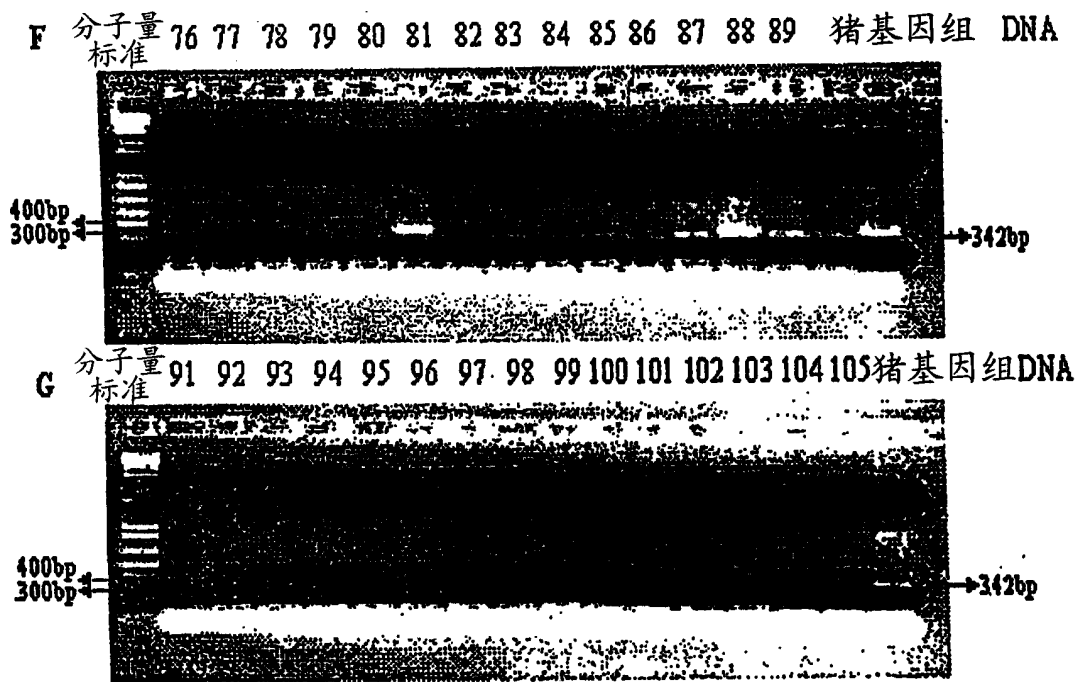


图6

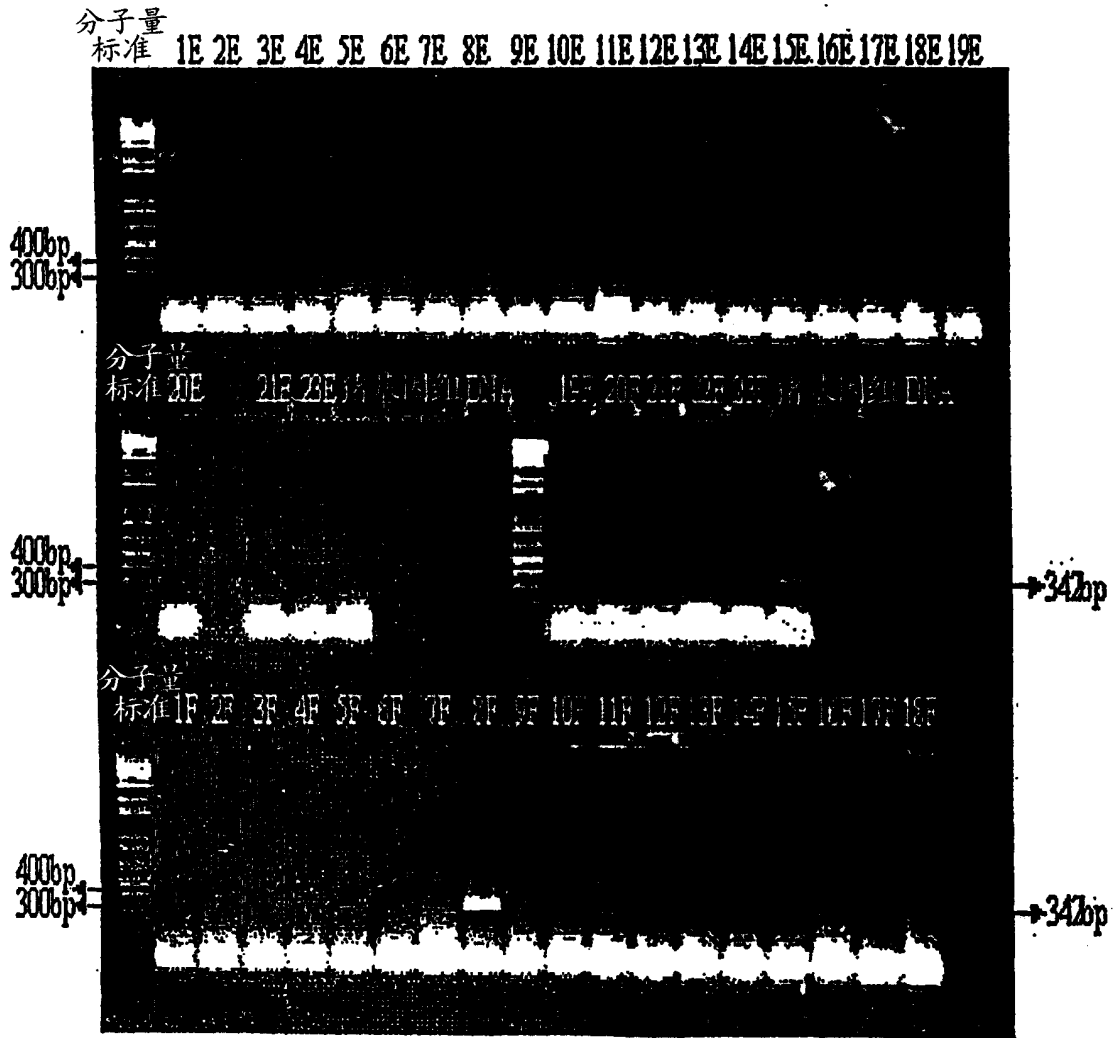


图7

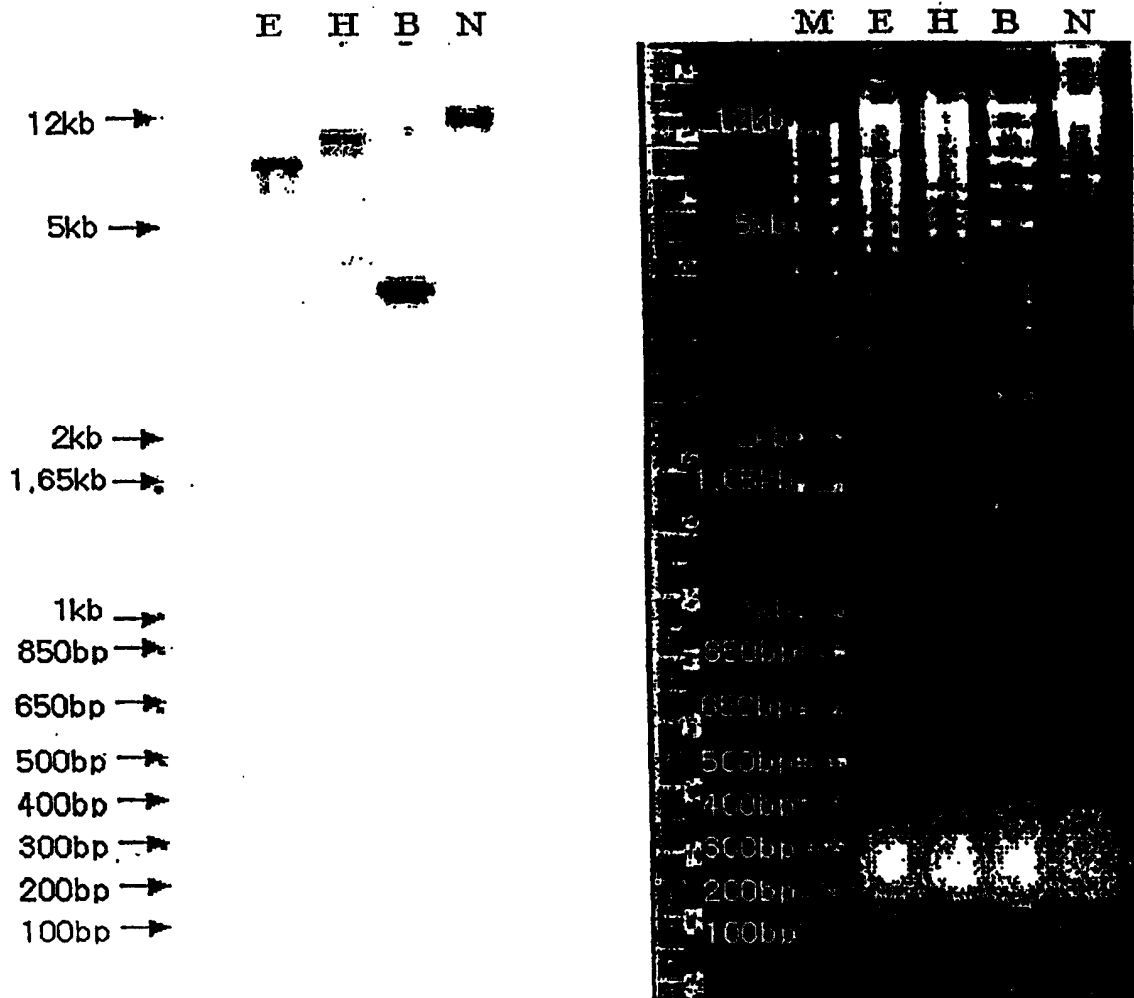


图8

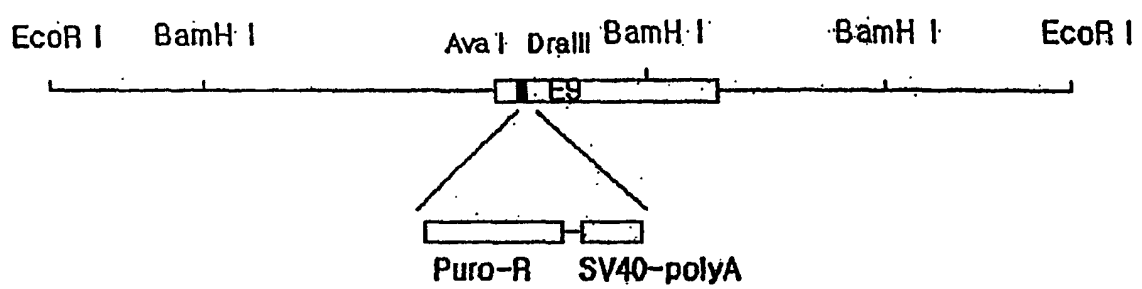


图9