



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104994728 B

(45)授权公告日 2019.02.15

(21)申请号 201380066450.4

(22)申请日 2013.10.18

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104994728 A

(43)申请公布日 2015.10.21

(30)优先权数据
61/716294 2012.10.19 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.06.18

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/065618 2013.10.18

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/063016 EN 2014.04.24

(73)专利权人 移卵基因有限公司
地址 美国爱荷华州

(72)发明人 P.K.卡西纳桑 H.魏 M.F.艾伦
D.C.法伯

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 初明明 黄希贵

(51)Int.Cl.
A01K 67/02(2006.01)

(56)对比文件
CN 1715401 A,2006.01.04,
CN 101024829 A,2007.08.29,
WO 01/50848 A2,2001.07.19,
CA 2368620 A1,2000.11.23,
BRAUDE et al..PREIMPLANTATION GENETIC
DIAGNOSIS.《nature reviews genetics》.2002,
第3卷
BRAUDE et al..PREIMPLANTATION GENETIC
DIAGNOSIS.《nature reviews genetics》.2002,
第3卷

审查员 单芝丹

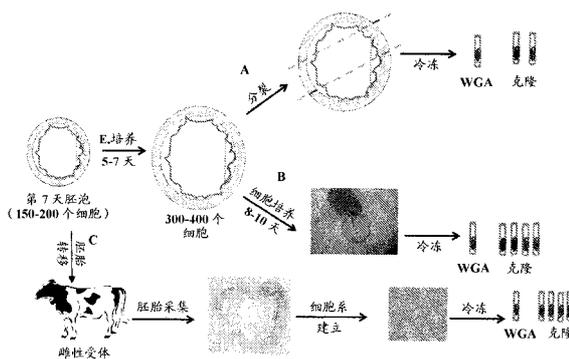
权利要求书3页 说明书10页 附图1页

(54)发明名称

用于产生遗传上优质的动物的方法

(57)摘要

遗传检验,例如全基因组分析(WGA)已经用于鉴定遗传上优质的胚胎。在等待对胚胎的一部分实施的遗传检验的结果的时候,本公开的方法延长所述胚胎的体外培养时间。在植入受体之前,本公开的方法还帮助扩充各个胚胎中的细胞的数量。



1. 一种用于在小牛中选择遗传上需要的性状的方法,其包括:

(a) 在体外培养小牛胚胎至少7天,其中在步骤(a)开始时所述小牛胚胎包含1-500个细胞,其中在步骤(a)之后并且在步骤(b)之前,将所述小牛胚胎转移入雌性受体并且从所述雌性受体中采集所述小牛胚胎,以建立细胞系,

(b) 将步骤(a)的细胞系分成两个或更多个等分部分,

(c) 对步骤(b)的两个或更多个等分部分的至少一个进行遗传分析,和

(d) 基于从步骤(c)得到的结果,选择来自步骤(b)的一个或多个等分部分,其中所选择的一个或多个等分部分携带遗传上需要的性状。

2. 一种用于在小牛中选择遗传上需要的性状的方法,其包括:

(a) 在体外培养小牛胚胎至少7天以建立胚胎细胞系,其中在步骤(a)开始时所述小牛胚胎包含100-200个细胞,

(b) 将步骤(a)的小牛胚胎分成两个或更多个等分部分,

(c) 对步骤(b)的两个或更多个等分部分的至少一个进行遗传分析,和

(d) 基于从步骤(c)得到的结果,选择来自步骤(b)的一个或多个等分部分,其中所选择的一个或多个等分部分携带遗传上需要的性状。

3. 一种用于在小牛中选择遗传上需要的性状的方法,所述方法包括:

(a) 在体外培养小牛胚胎至少7天以建立胚胎细胞系,其中在步骤(a)开始时所述小牛胚胎包含1-500个细胞,以及在步骤(a)结束时包含400-800个细胞,

(b) 将步骤(a)的小牛胚胎分成两个或更多个等分部分,

(c) 对步骤(b)的两个或更多个等分部分的至少一个进行遗传分析,和

(d) 基于从步骤(c)得到的结果,选择来自步骤(b)的一个或多个等分部分,其中所选择的一个或多个等分部分携带遗传上需要的性状。

4. 权利要求1的方法,其中在转移后10-40天之后自所述雌性受体采集所述小牛胚胎。

5. 权利要求1的方法,其中在转移后21-26天之后自所述雌性受体采集所述小牛胚胎。

6. 权利要求1的方法,其中在转移后21天之后自所述雌性受体采集所述小牛胚胎。

7. 权利要求1-3的任一项的方法,其另外包括步骤(e):使用来自步骤(d)的选择的等分部分的一个或多个细胞以生产具有所述遗传上需要的性状的小牛。

8. 权利要求7的方法,其中步骤(e)包括核转移的步骤。

9. 权利要求7的方法,其另外包括步骤(f):将步骤(c)的没有经过遗传分析的等分部分冷冻,和任选的步骤(g):将所述冷冻小牛胚胎解冻。

10. 权利要求1-3中任一项的方法,其中所述遗传分析包括选自以下的一种或多种测定:全基因组分析(WGA)、使用微阵列的基因表达分布分析、基因的编码区的测序、基因的非编码区的测序和全基因组测序。

11. 用于在小牛中选择遗传上需要的性状的方法,其包括:

(a) 将来自多个小牛胚胎的每一个的一个或多个细胞取出,任选地其中将所述多个胚胎培养在含有15% FCS的培养基中,

(b) 将所述一个或多个细胞培养2-6天,

(c) 对步骤(b)的培养的细胞进行遗传分析,

(d) 在将所述一个或多个细胞取出之后,培养步骤(a)的多个小牛胚胎,和

(e) 基于从步骤(c)获得的结果,从步骤(d)的多个小牛胚胎选择一个或多个小牛胚胎,其中所选择的一个或多个胚胎具有发育成携带遗传上需要的性状的哺乳动物的潜力,和其中当所述多个小牛胚胎在受精后2天-6天的年龄时进行步骤(a)。

12. 权利要求11的方法,其另外包括步骤(f):将步骤(d)的小牛胚胎冷冻,和任意的步骤(g):将所述冷冻小牛胚胎解冻。

13. 权利要求11的方法,其中所述遗传分析包括选自以下的一种或多种测定:全基因组分析(WGA)、使用微阵列的基因表达分布分析、基因的编码区的测序、基因的非编码区的测序和全基因组测序。

14. 一种用于在哺乳动物中选择遗传上需要的性状的方法,包括:

(a) 在体外培养哺乳动物胚胎,其中在步骤(a)开始时所述哺乳动物胚胎包含100-200个细胞,以及在步骤(a)结束时包含400-800个细胞,

(b) 将步骤(a)的哺乳动物胚胎分成两个或更多个等分部分,

(c) 对步骤(b)的两个或更多个等分部分的至少一个进行遗传分析,和

(d) 基于从步骤(c)得到的结果,选择来自步骤(b)的一个或多个等分部分,其中所选择的一个或多个等分部分携带遗传上需要的性状。

15. 权利要求2、3和14中任一项的方法,其中所述两个或更多个等分部分的大小大约相同。

16. 一种用于在哺乳动物中选择遗传上需要的性状的方法,包括:

(a) 在体外培养哺乳动物胚胎,其中在步骤(a)结束时所述哺乳动物胚胎包含400-800个细胞,

(b) 将步骤(a)的哺乳动物胚胎分成两个或更多个大约相同大小的等分部分,

(c) 对步骤(b)的两个或更多个等分部分的至少一个进行遗传分析,和

(d) 基于从步骤(c)得到的结果,选择来自步骤(b)的一个或多个等分部分,其中所选择的一个或多个等分部分携带遗传上需要的性状。

17. 权利要求14或16的方法,其中在步骤(a)期间培养哺乳动物胚胎至少5天。

18. 权利要求14或16的方法,其中在步骤(a)期间培养哺乳动物胚胎至少7天。

19. 权利要求14或16的方法,其中所述哺乳动物胚胎的细胞被分为2-10个等分部分。

20. 权利要求14或16的方法,其另外包括步骤(e):使用来自步骤(d)的选择的等分部分的一个或多个细胞以生产具有所述遗传上需要的性状的哺乳动物。

21. 权利要求20的方法,其中步骤(e)包括核转移的步骤。

22. 权利要求21的方法,其另外包括步骤(f):将步骤(c)的没有经过遗传分析的等分部分冷冻,和任意的步骤(g):将所述冷冻的哺乳动物胚胎解冻。

23. 权利要求20的方法,其另外包括步骤(f):将步骤(c)的没有经过遗传分析的等分部分冷冻,和任意的步骤(g):将所述冷冻的哺乳动物胚胎解冻。

24. 一种用于在哺乳动物中选择遗传上需要的性状的方法,包括:

(a) 在体外培养哺乳动物胚胎,其中在步骤(a)开始时所述胚胎包含100-200个细胞,

(b) 将步骤(a)的哺乳动物胚胎分成两个或更多个大约相同大小的等分部分,

(c) 对步骤(b)的两个或更多个等分部分的至少一个进行遗传分析,和

(d) 基于从步骤(c)得到的结果,选择来自步骤(b)的一个或多个等分部分,其中所选择

的一个或多个等分部分携带遗传上需要的性状。

用于产生遗传上优质的动物的方法

[0001] 发明背景

[0002] 本发明的公开内容涉及用于动物生产的方法。更具体而言,所述公开内容涉及具有某些需要的性状的动物的选择性的生产。

[0003] 选择遗传上优质的动物的传统方法一般涉及使两只动物繁殖并检验产生的子代以鉴定用于普遍用途的最佳种畜。虽然此方法是可靠的,但它具有较大的缺点。例如,子代检验从构想到完成一般花费若干年。传统方法还与高度的浪费和高成本相关,因为仅仅10%的公牛被选为终产品。基因组选择技术的出现允许饲养员在比传统方法的年龄更早的年龄鉴定遗传上优质的动物。例如,可在出生前的不同阶段进行各种分子检验以鉴定具有需要的性状的子代。

[0004] 有若干实用的方法,用以改进选择具有重要性状的优质的雄性和雌性牛的过程。这些方法包括,例如,(1) 增加选择的准确性;(2) 增加选择的强度;和/或(3) 减少世代间隔。世代间隔一般指当子代降生时母体的平均年龄。世代间隔是在育种计划中影响遗传进展速率的最重要的因素。最短可能的世代间隔是性成熟年龄和世代长度的总和。许多技术可用于规避由世代间隔强加的限制。例如,先进的生殖技术例如从青春期前的幼年小母牛取出卵、体外受精(IVF)和对产生的胚胎进行全基因组评价,已经用于缩短世代间隔。

[0005] 尽管自青春期前的小母牛的卵母细胞采集可用于缩短世代间隔,但以这样的方式采集的卵母细胞的质量通常差,并趋向于产生低质量胚胎。大部分的全基因组分析需要通过胚胎活检采集胚胎的一些胚胎细胞,所述胚胎活检可以是侵入性的并可损害胚胎的发育潜力。此外,活检样本的全基因组分析可花费数星期,这需要在知道全基因组分析的结果之前冷冻胚胎或将胚胎转移到受体。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明提供用于选择具有需要的性状的胚胎的改进的方法。在一个实施方案中,公开了扩充胚胎的细胞数量用于基因组评价和子代产生的方法。

[0008] 因为冷冻正在发育的胚胎影响产仔效率,胚胎通常被新鲜地(即,不冷冻)转移至受体动物用于子代的产生。在体外受精(IVF)之后通常将胚胎体外培养约7天。当在此阶段将胚胎转移至同步化的受体时,每个胚胎一般含有约100 - 200个细胞。具有这种类型的胚胎转移的产仔效率是大约40%,并且从这些子代获得优质的动物的速度是非常低的。在本文中公开用于体外培养胚胎的改进的方法以帮助解决此问题。更具体而言,可将用于体外培养胚胎的时间延长一个星期、两个星期、三个星期、一个月或更长以扩充每个胚胎中的细胞数量(图1)。

[0009] 因此,在一方面中,本发明的特征在于用于在哺乳动物中选择遗传上需要的性状的方法。该方法可包括以下步骤:(a) 体外培养胚胎,其中在步骤(a)开始时所述胚胎包含1-约500个细胞(例如,约100-约200个细胞,例如,约150-约200个细胞);(b) 将步骤(a)的胚胎分成两个或更多个等分部分;(c) 对步骤(b)的所述两个或更多个等分部分的至少一个进行遗传分析;和(d) 基于从步骤(c)中获得的结果选择来自步骤(b)的一个或多个等分部分,其中所述选择的一个或多个等分部分携带遗传上需要的性状。

[0010] 在一个实施方案中,在步骤(a)之后,所述方法可包括将胚胎(即,体外培养的胚胎)转移入雌性受体。在一些实施方案中,在约10-40天之后(例如,在转移后约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40天后)自所述雌性受体采集胚胎。在一些实施方案中,在转移后约21 - 26天之后自所述雌性受体采集所述胚胎。在一些实施方案中,在转移后约21天之后自所述雌性受体采集所述胚胎。在其它实施方案中,在转移后超过40天的时期之后自所述雌性受体采集所述胚胎。

[0011] 在另一实施方案中,所述方法另外包括步骤(e):使用来自步骤(d)的选择的等分部分的一个或多个细胞以产生遗传上优质的哺乳动物。在一些实施方案中,步骤(e)包括核转移步骤。在一些实施方案中,所述方法另外包括步骤(f):将没有经历遗传分析的上一步骤(c)的等分部分冷冻。在另一方面中,所述方法还可包括步骤(g):将步骤(f)的冷冻等分部分/胚胎解冻。

[0012] 在另一实施方案中,在受精后可将胚胎用改良的组织培养基(例如,无任何饲养细胞)在一个或多个多孔板中单独在体外培养两个星期或更久。在此阶段,胚胎可以附着于组织培养板的表面并且每个孔可含有数千个细胞。在一个实施方案中,这些细胞可以通过酶的处理(例如,胰蛋白酶消化)被分成若干部分。所述分开的部分可被冷冻于若干个小瓶中并保存在液氮里。

[0013] 在一个实施方案中,在冷冻之前可使一个部分的细胞经历遗传检验。在另一实施方案中,在经历遗传检验之前所述部分的细胞可被冷冻和解冻。遗传检验的结果可用于确定是否进一步继续来自相同胚胎的剩余部分的冷冻细胞。在一个实施方案中,如果来自遗传检验的结果表明胚胎具有某些需要的遗传性状,则剩余细胞可用于使用标准的核转移技术产生子代,所述子代会很可能表现出这种表型。

[0014] 在一个实施方案中,用于步骤(a)的培养基可含柠檬酸三钠、肌醇和氨基酸(例如,SOFaaci),所述培养基补充有15%胎牛血清。在另一实施方案中,用于步骤(a)培养基是胚胎细胞培养基(EC1)。在一个实施方案中,EC1用于培养细胞直到细胞附着于板。在另一实施方案中,EC1可含有50%的标准合成的输卵管流体(SOF,例如,SOFaaci)培养基和50%的组织培养基,其含有补充有0.1% (v/v) 2-巯基乙醇、1% (v/v) 非必需氨基酸、1% (v/v) ITS(10 μ g/ml胰岛素、5.5 μ g/ml转铁蛋白和6.7 ng/ml硒)、5 ng/ml人白血病抑制因子、10 ng/ml人碱性成纤维细胞生长因子、10 ng/ml人表皮生长因子、0.5%青霉素-链霉素溶液和20%胎牛血清的D-最低必需培养基(D-MEM)。

[0015] 在另一实施方案中,在细胞附着于板之后可以使用用于维持培养的胚胎细胞培养基(EC2)。在一个实施方案中,EC2可含有D-MEM,其补充有0.1% (v/v) 2-巯基乙醇、1% (v/v) 非必需氨基酸、1% (v/v) ITS(10 μ g/ml胰岛素、5.5 μ g/ml转铁蛋白和6.7 ng/ml硒)、5 ng/ml人白血病抑制因子、10 ng/ml人碱性成纤维细胞生长因子、10 ng/ml人表皮生长因子、0.5%青霉素-链霉素溶液和20%胎牛血清。

[0016] 在另一实施方案中,冷冻培养基可以是含有20%二甲亚砜(DMSO)和40%-80%的FCS的EC2。例如,可将200 μ l的DMSO和600 μ l的FCS加入1ml的EC2以形成冷冻培养基。

[0017] 在另一实施方案中,在步骤(a)开始时步骤(a)的胚胎可含有约100 - 约200个细胞。在另一实施方案中,在步骤(a)结束时胚胎可含有约300 - 约600个细胞。在另一实施方

案中,在步骤(a)结束时胚胎可含有约400 - 约800个细胞。

[0018] 在另一方面中,本发明的特征在于用于在哺乳动物中选择遗传上需要的性状的方法,其包括以下步骤:(a)从多个胚胎的每一个取出一个或多个细胞;(b)培养所述一个或多个细胞约2-6天;和(c)使步骤(b)的培养细胞经历遗传分析;(d)在取出所述一个或多个细胞之后培养步骤(a)的多个胚胎;和(e)基于从步骤(c)中获得的结果自步骤(d)的多个胚胎选择一个或多个胚胎,其中所述选择的一个或多个胚胎具有发展成携带所述遗传上需要的性状的哺乳动物的潜力。

[0019] 在一个实施方案中,当所述多个胚胎在受精后约2天-约6天的年龄时进行步骤(a)。

[0020] 在另一实施方案中,所述方法另外包括步骤(f):将步骤(d)的胚胎冷冻。在另一实施方案中,所述方法另外包括步骤(g):将步骤(f)的冷冻胚胎解冻。

[0021] 在另一实施方案中,在步骤(a)期间将胚胎培养在包含约15% FCS的培养基中。

[0022] 在以上方面任意一项的实施方案中,在IVF之后将胚胎体外培养至少约5天(例如,至少约5、6、7、8、9、10、11、12、13或14或更多天)。在一些实施方案中,在IVF后已培养至少约5天(例如,至少约5、6、7、8、9、10、11、12、13或14或更多天)的胚胎可进一步培养至少约5天(例如,约5、6、7、8、9、10、11、12或更多天)。在至少约5天(例如,约5、6、7、8、9、10、11、12或更多天)的所述另外的培养期之后,每个胚胎可含有大约300 - 400个细胞。在此阶段,所述胚胎可以被分成若干个等分部分(例如,2、3、4、5、6、7、8、9或10或更多个等分部分)。在一个实施方案中,显微操作技术可用于将胚胎分开(例如,通过分裂)。在另一实施方案中,等分部分可以分别地冷冻在冷冻培养基中并储藏于例如液氮里用于进一步的下游分析(例如,另外的遗传分析)和/或使用(例如,用于克隆的使用,例如使用核转移)。

[0023] 在以上方面任意一项的实施方案中,可使所述胚胎的至少一个等分部分经历一个或多个遗传检验,包括但不限于全基因组分析(WGA)、基因表达分布分析(例如,使用微阵列的基因表达分布分析)、基因的编码区测序、基因的非编码区测序和全基因组测序。可分析遗传检验的结果以确定是否使用来自相同胚胎的另一个等分部分。在一个实施方案中,如果来自遗传检验的结果表明胚胎具有需要的遗传性状,则来自相同胚胎的其它等分部分就可用于产生子代。在这样的情况下,产生的子代可能表现出需要的性状。在另一实施方案中,如果来自遗传检验的结果表明胚胎很可能不具有需要的遗传性状,则剩余的等分部分可以不进一步继续。

[0024] 遗传检验可涉及分析胚胎的细胞中的DNA。在一个实施方案中,微卫星标志物组可用于鉴定遗传性状,所述遗传性状是高度多态的,并可在实施这些检验的实验室间修正以标准化。参见,例如,Sherman等人Anim Genet. 35 (3) : 220 - 6;Heyen等人Anim Genet. 28 (1) 21 - 27;美国专利号5,874,217;Ostrander等人Mammalian Genome. 6 : 192 - 195;Francisco等人Mammalian Genome. 7 : 359 - 362)。在另一实施方案中,单核苷酸多态性(SNP)可用于遗传检验。

[0025] 在以上方面任意一项的实施方案中,遗传分析可包括下面列出的一种或多种测定:用于家畜(包括但不限于肉牛、奶牛、猪和绵羊)的遗传评价程序的全基因组分析(WGA);使用微阵列的基因表达分布分析;和基因的编码区或非编码区的测序,其包括单个动物的全基因组测序。

[0026] 在以上方面任意一项的实施方案中,所述性状可以是毛色、发色、毛发长度、眼睛的颜色、花纹、柔嫩性、质量等级、肌肉含量、脂肪厚度、饲料效率、红肉收率、平均每日的重量增加、抗病性、疾病易感性、摄食量、蛋白质含量、骨含量、维持能量需求、成年体尺、氨基酸概况、脂肪酸概况、产奶量、奶质量、生育力、排卵率、受孕率和对病原体感染的易感性。

[0027] 附图简述

[0028] 图1A - 1C说明了培养全胚胎用于扩充胚胎中的细胞数量的方法。

[0029] 图2说明了胚胎活检和培养方法。

[0030] 发明详述

[0031] 本发明的公开内容提供了在用于克隆的核转移或胚胎的移植之前用于挑选具有需要的性状的胚胎的方法。还公开了用于胚胎的延长培养的方法。胚胎的延长培养允许使用遗传检验以选择具有需要的性状的胚胎。遗传检验,例如全基因组分析(WGA)可用于鉴定具有需要的遗传特征的胚胎。WGA及可用于基因组选择的其它遗传检验公开于,例如, Humblot等人 *Vet. Med. Int.* 2010, Article ID 192787; Ponsart等人第28界AETE年会, Saint Malo, 法国,2012年9月7-8日; Schefers和Weigel. *Animal Frontiers.* 2 (1): 4-9, 2012。在本文中公开的方法可应用于许多哺乳动物,例如牛,以及在马、狗、猫、山羊、绵羊、野牛、鹿、驴、骡、猪、肉猪和其它哺乳动物中。

[0032] 在一个实施方案中,雌性动物可被诱发过量排卵,卵可从所述过量排卵的雌性动物采集。采集的卵可使用来自合适的雄性动物的精子体外受精。可将受精的卵体外培养以允许在胚胎中扩充细胞数量。

[0033] 在一个实施方案中,当正对来自相同胚胎的一部分细胞进行遗传检验的时候,可培养胚胎。如果检验结果是阳性的,可将所述培养的胚胎转移至受体用于产生子代。或者,来自这些阳性的胚胎的细胞可被用来克隆以产生遗传上优质的动物。在另一实施方案中,公开了用于扩充和冷冻胚胎细胞的方法。可对扩充细胞的一部分进行遗传检验。如果检验结果是阳性的,就可将来自相同胚胎的剩余细胞解冻并将其用于产生子代。

[0034] 在另一实施方案中,活检样本可从受精后已经培养了约3-7天的胚胎中获得。胚胎活检的一般方法是本领域已知的并公开于例如, Polisseni等人 *Fertility and Sterility.* 93 (3): 783-788, 2010; Lopes等人 *Theriogenology.* 56 (9): 1383-1392, 2001。活检细胞可单独培养约2- 10天或甚至更长以扩充细胞。可使自活检样本的扩充的细胞经历遗传检验,例如全基因组分析(WGA),并培养剩余的胚胎。多重置换扩增(MDA)是一种WGA技术,其可用于增加来自活检的DNA的量用于分析(参见,例如, Lauri等人 *Genomics.* 101 (1): 24-29, 2013)。在进行WGA之后,基于来自相应活检样本的WGA结果可选择优质的胚胎以产生小牛。在进行活检之后所述胚胎可继续培养,例如,直到完成对活检样本的WGA。在活检之后所述胚胎可培养约1星期(或,在一些情况下,更长,例如,2或3星期),然后将它们冷冻。冷冻胚胎的命运可依据来自活检样本的WGA的结果而决定。如果遗传检验表明相应胚胎可发育成具有优质的性状的动物,所述冷冻胚胎就可被用来克隆或植入以产生具有这样的性状的子代。

[0035] 在另一实施方案中,在大约7天的受精后的培养期之后完整的胚胎可体外培养额外的5 - 7天。在此阶段,每个胚胎一般含有大约300 - 400个细胞。可使用显微操作技术将这些胚胎分成若干个等分部分,并将其分别冷冻在冷冻培养基中并保存在液氮里用于进一

步的下游分析和使用(参见图1A)。

[0036] 在另一实施方案中,胚胎可用改良的组织培养基在含有有丝分裂上停滞的单层饲养细胞的多孔板中单独培养约2-6个星期(参见图1B)。在此阶段,胚胎附着于组织培养板的表面并且每个孔含有数千个细胞。这些细胞可通过酶的处理被分成若干部分并冷冻在若干个小瓶中和保存在液氮里。

[0037] 因此,若干个小瓶的冷冻细胞可来源于相同孔并克隆地扩充自相同胚胎。这些小瓶之一可被用于遗传检验,例如全基因组分析(图1)。

[0038] 在另一实施方案中,在培养中经5-9天(例如,7天)的胚胎可使用标准的非外科手术胚胎移植方法转移入同步化的雌性受体(参见图1C)。可在此转移之后约10 - 40天(例如,约21 - 26天,例如,约21天)时采集这些胚胎以建立细胞系。可通过酶的处理将这些细胞系的每一个分成若干个部分,冷冻在若干个小瓶中,并保存在液氮里用于将来使用。

[0039] 基于此分析的结果,可选择遗传上优质的冷冻小瓶并将其用作核的供体细胞以使用确立的核转移程序克隆小牛。培养所述胚胎和通过核转移产生小牛的这些方法可通过以下显著地减少遗传上价值较低的动物的产生:增加(例如,至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%或更多)选择的强度和选择的准确性和减少(例如,至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%或更多)世代间隔。

[0040] 为了本公开内容的目的,遗传检验可包括分析与单独的胚胎或从单独的胚胎中获得的细胞中的一个或多个遗传特征相关的数据。在一个实施方案中,本发明的公开内容的方法和系统可利用从单独的胚胎中获得的遗传信息以鉴定可具有需要的性状的胚胎。遗传信息可包括但不局限于单核苷酸多态性(SNP)、插入、删除、倒位及其它突变。

[0041] 本文中使用的术语“多态性”指存在于种群中的等位基因变体,其可以是存在于基因座的单核苷酸差异,或一个、几个或许多个连续的核苷酸的插入或删除,或倒位。单核苷酸多态性(SNP)可表征为在某个种群中基因组的特定基因座上的某些核苷酸占优势。在大部分情况下,在特定的基因座上绝非所有四种核苷酸(即,腺苷、胞苷、鸟苷或胸苷)都占优势。例如,给定种群的基因组中的特定基因座可在多态性的位点含有胞苷或胸苷,并由此四种核苷酸的两种在此特定的基因座占优势。然而,一种、两种、三种或四种核苷酸的多态性可存在。应该意识到的是,虽然在本文中公开的方法通过SNP的检测例示,但公开的方法或本领域已知的其它方法同样可用于鉴定其它类型的多态性,例如插入或者删除,其一般涉及超过一个核苷酸。

[0042] “单核苷酸多态性”或“SNP”一般发生在由单核苷酸占据的多态性位点,其为在等位基因的序列之间变化的位点。所述位点通常侧接等位基因的高度保守的序列。例如,所述高度保守的序列可能在种群的少于1/100或1/1000的成员中改变。单核苷酸多态性通常由于一个核苷酸取代在多态性位点的另一个核苷酸而产生。单核苷酸多态性也可由相对于参考等位基因的核苷酸的删除或核苷酸的插入而产生。

[0043] 根据本发明的公开内容的一个方面,遗传检验可包括检测和某些遗传性状有牵连的一个或多个基因中的至少一种SNP。例如,所述方法可包括确定在一个或多个基因的一个或多个特定位置的核苷酸的身份,并将所述身份与在参考等位基因的相应位置的核苷酸身份进行比较。

[0044] 术语“单倍体”指单个染色体的遗传成分。单倍体可指仅一个基因座或全基因组。

术语“单倍体”也可指统计上相关的一组SNP。

[0045] 为了本公开内容的目的,术语基因分型可用于指确定单个动物在基因组的一个或多个位置上携带的遗传信息的过程。例如,基因分型可包括针对单个SNP确定个体携带哪个等位基因或哪些等位基因,或针对多个SNP确定个体携带哪个等位基因或哪些等位基因。

[0046] 可进行遗传检验以确定一个或多个遗传特征或性状。例如,多个测定组成可用于鉴定多个核苷酸标志物,例如SNP。在一个实施方案中,核苷酸多态性的存在或不存在可通过聚合酶链反应(PCR)接着核苷酸测序而检测。多个核苷酸多态性的存在或不存在可通过使用一组引物进行PCR测定接着核苷酸测序而检测。在另一实施方案中,多态性可至少部分地通过使用聚合酶链反应无需测序而鉴定。

[0047] PCR反应可使用测定板或平-块热循环仪同时地进行。PCR引物可使用荧光染料预标记使得荧光输出可使用基于计算机的成像系统读取。使用这样的设计,数百或数千的多肽性位点的高通量、成本有效的分析可同时测定。

[0048] 用于实施本发明的公开内容的方法的样本可从胚胎的细胞、一部分或活检,或从其中培养胚胎的培养基中获得。任选地,可使用本领域已知的标准技术(参见,例如,Lewis和Knight. Cold Spring Harbor Protoc. 297 - 306, 2012)而确定PCR扩增DNA样本的访问速率以评价在WGA中的基因分型质量(例如基因分型精确度)。在一个实施方案中,样本为核酸样本。所述核酸样本可为脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)。DNA可为基因组DNA或逆转录的cDNA。DNA可为单个哺乳动物的基因或全基因组序列的编码或非编码序列。可包括但不局限于PCR、DNA杂交、DNA测序、载体构建、重组DNA技术的基因工程的方法可见于以下文献:例如Maniatis等人Molecular Cloning A Laboratory Manual(分子克隆:实验手册). Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989),其通过引用以其整体并入本文中。举例来说,用于WGA的测定可包括但不局限于使用用于产生基因组增强的遗传评价的Illumina Bovine SNP50和Bovine LD测定(Illumina, Inc., San Diego, CA)。

[0049] 应当注意的是,术语“a”或“an”指一个或多个实体;例如,“一只动物”被理解为表示一只或多只动物。因而,术语“a”(或“an”)、“一个或多个”和“至少一个”在本公开内容中可互换地使用。

[0050] 术语“约”意指基本上相同,具有不超过10 - 20%的偏差。

实施例

[0051] 提供以下实施例仅仅用于说明实施方案的目的,而非意图限制。试剂、化学品及其它材料作为例示性的组分或试剂给出,并且各种修改可鉴于在本公开内容的范围内的前述讨论而作出。除非在本公开内容中另有规定,否则如描写于实施例中的用于所述系统和所述测定的组分、试剂、方案及其它方法仅仅用于说明的目的。应该理解的是,尽管将青春期前的小母牛用于实施例,但所公开的方法也可应用于成熟的小母牛。

[0052] 实施例1. 全胚胎体外培养和胚胎的分裂

[0053] 自青春期前的小母牛采集卵母细胞。在7天培养窗(其为本领域中的标准实践)之后,让胚胎在标准胚胎培养基(例如,合成的输卵管流体(SOF),例如具有氨基酸、柠檬酸钠和肌醇的SOF (SOFaaci))和15%胎牛血清中体外培养另外5-7天。在此阶段,每个胚胎含有大约300 - 400个细胞(图1)。使用显微操作技术将这些胚胎分成三个等分部分(图1A)。将

所述三个等分部分分别冷冻在冷冻培养基(具有20% DMSO和60% FCS的EC2)中和保存在液氮里用于进一步的下游分析和使用。

[0054] 使用上述方法,生成来自相同胚胎的细胞的若干个等分部分。将这些等分部分的一个或多个用于全基因组分析(WGA)或其它类型的遗传分析(图1A)。基于所述遗传检验的结果,选择与具有需要的性状的细胞相对应的冷冻细胞,并将其用作核供体细胞以使用公认的核转移程序克隆小牛。培养胚胎和通过核转移产生小牛的此方法可通过增加选择的强度和选择的准确性以及减少世代间隔而减少价值较低的动物的产生。

[0055] 实施例2. 延长的全胚胎体外培养

[0056] 使雌性泽西牛(Jersey)过量排卵,并将卵母细胞吸出并按照标准方案使其在体外成熟。在成熟之后,使用来自不同的泽西公牛的精液使卵母细胞体外受精。在受精之后,将推定的接合子培养7-8天。随后选择扩充的胚泡阶段胚胎并在含有改良的组织培养基(不含任何饲养细胞)的多孔板中单独培养大约10天(参见图1B)。一旦培养的胚胎附着于组织培养板的表面并开始分裂,培养基每4天更换一次直到细胞集落单层被建立。以下表1显示用使用此方法培养的完整的泽西牛胚胎建立的细胞系的数量。

[0057] 表1. 用泽西牛胚胎的细胞系建立

卵母细胞吸出的日期	种畜/供体组合	培养的胚胎的数量	在 8-10 天中建立的细胞系的数量
03/22/12	Camilo/6528	6	4
	Camilo/6810	9	9
04/05/12	Zuma/6528	6	3
	Zuma/6810	2	1
4/12/12	Camilo/7242	1	1
	Camilo/7005	2	0
	Camilo/7124	14	4
总和		40	22

[0058] 在培养大约10天之后,建立的细胞集落单层通过反复移液机械地破坏成细胞块。将这些细胞块沉淀,并且将所述沉淀溶解于含有20% DMSO和40%血清的冷冻培养基中。将具有块的此悬浮液分入3-5个小瓶并使用缓慢冷冻而冷冻。将这些冷冻小瓶储存于液氮里。

[0060] 使用上面描述的方法,生成由一个胚胎克隆地扩充的细胞的若干个小瓶。将这些小瓶的一个或多个用于WGA。基于此分析的结果,选择遗传上优质的冷冻小瓶并将其用作核供体细胞以使用公认的核转移程序克隆小牛。

[0061] 实施例3. 胚胎转移至受体母亲

[0062] 使雌性泽西牛过量排卵,并将卵母细胞吸出并按照确立的方案在体外使其成熟。在成熟之后,使用来自不同的泽西公牛的精液使卵母细胞体外受精。在受精之后,将推动的接合子培养7天。在第7天时,将胚胎选择、定级并转移至受体母亲,每个受体母亲接受3-5个胚胎(1-3个胚胎/子宫角)。

[0063] 在妊娠第21-26天之间采集胚胎。简单而言,将受体母亲限制在牛斜槽中并给与2%普鲁卡因的硬膜外阻滞。非外科手术地,将无菌的24-规Foley导管通过宫颈插入子宫体,并且将补充有16 μ l/ml的抗生素-抗真菌药(Gibco, Grand Island, NY)和8 μ l/ml两性霉素B洗剂(Gibco, Grand Island, NY)的ViGro完全冲洗溶液(Bioniche Animal Health Inc.,

Pullman, WA) 通过子宫冲洗。在回收时,在立体显微镜下从子宫冲洗介质中分离胚胎。

[0064] 按如下建立泽西牛细胞系。简单而言,将冲洗的胚胎在具有16 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 的抗生素-抗真菌药(Gibco, Grand Island, NY)、5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 青霉素链霉素(Sigma, St. Louis, MO)和8 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 两性霉素B洗剂(Gibco)的Dulbecco磷酸盐缓冲溶液(DPBS)中运送至实验室。将胚胎在DPBS中漂洗并用解剖刀片细细地剁碎成块。通过标准的胰酶消化程序使用TrypLE (Gibco)将成纤维细胞从组织块中分离。将细胞在补充有10% FCS (胎牛血清, Hyclone, Logan, UT)、0.003% β -巯基乙醇(Gibco)和青霉素/链霉素溶液(Sigma)的DMEM (Gibco)中接种在25-cm透气的组织培养瓶(BD)上。在接种的第4天,使用TrypLE溶液收获细胞并重新接种在75 cm^2 组织培养瓶上。在培养3-4天之后,收获细胞并将大约十万个细胞用于DNA分离。将剩余的细胞冷冻于具有10% FCS和DMSO (Sigma)的DMEM中。

[0065] 以下表2概述通过此胚胎转移方法建立的泽西牛胚胎细胞系的数量。

[0066] 表2. 胚胎转移、采集和细胞系建立的概述

[0067]

转移日期	胚胎的数量	受体的数量	采集的胚胎的数量	建立的细胞系的数量	可用的冷冻细胞系的数量
2013年1月24日	19	5	10	10	*8
2013年1月31日	9	3	7	7	7
2013年2月14日	12	3	3	3	3
2013年2月20日	16	4	10	10	10
2013年3月07日	18	5	8	8	8
2013年3月13日	3	1	2	2	2
2013年3月21日	6	2	2	2	2
2013年3月27日	3	1	5	5	5
2013年4月10日	12	3	6	6	6
2013年4月24日	17	4	8	8	8
2013年5月08日	9	2	6	6	6
2013年5月10日	11	3	3	3	3
2013年5月24日	17	4	3	3	3
2013年6月07日	3	1	0	0	0
总和	155	41	73	73	71

[0068] *在建立之后在两个细胞系中观察到真菌污染并且将它们丢弃。

[0069] 将从细胞系分离的DNA样本通过Geneseek, Inc. (Lincoln, NE)提交至USDA的动物改进计划实验室进行全基因组分析(WGA)和基因分型。结果概述于以下表3中。

[0070] 表3. DNA样本分析和细胞系的选择

[0071]

样本提交的日期	DNA样本的数量	成功分析的样本的数量(%)	具有JPI >210的细胞系的数量(%)
2013年4月04日	28	23 (82.14)	1 (4.3)
2013年4月29日	17	17 (100)	1 (5.9)
2013年5月29日	13	13 (100)	0
2013年6月24日	13	13 (100)	3 (23.1)
总和	71	66 (92.95)	5 (7.6)

[0072] 在将这些细胞系基因分型之后,基于在表4中的一般泽西牛性能指标(JPI)选择了5个细胞系。这些细胞系(FL065、FL062、FL064、FL017和FL036)的每一个被确定具有210或更大的有利的JPI得分。

[0073] 表4. 最优的5个选择的细胞系的概述

细胞系 ID	JPI Gen	CM Gen	NM Gen	PTA T Gen	MIL K Gen	FAT Gen	PRO Gen	PL Gen	SCS Gen	DPR Gen	UDC Gen	单倍体
FL065	251	750	680	2.1	880	75	41	6.5	2.86	1.2	6.13	JHIT JHI_PC.N JHPT JHP_PC.N
FL062	224	688	623	1.8	669	65	34	6.2	2.86	1.6	5.02	JHIT JHI_PC.N JHPT JHP_PC.N
FL064	221	708	618	1.0	501	63	33	6	2.73	1.5	4.92	JHIT JHI_PC.N JHPT JHP_PC.N
FL017	215	692	607	0.9	470	60	31	5.8	2.72	1.9	4.35	JHIT JHI_PC.N JHPT JHP_PC.N
FL036	210	594	571	1.4	909	32	29	6.6	2.76	1.1	5.76	JHIT JHI_PC.N JHPT JHP_PC.N

[0075] 使用如早先所述的标准核转移程序将两个细胞系用于建立克隆的胚胎。这些细胞系的体外胚胎发育与其它成纤维细胞的细胞系的体外胚胎发育看起来类似(表5)。

[0076] 表5. 用一些建立的细胞系的克隆胚胎体外发育

[0077]

细胞系ID	重建的总数	融合的偶联体的数量 (%)	在第7天发育的成纤维细胞的数量 (%)
FL010	224	150 (66.9)	26 (17.3)
FL010	103	68 (66.0)	14 (20.6)
FL065	165	115 (69.7)	11 (9.6)
FL065	156	92 (58.9)	38 (41.3)
总和	648	425 (65.6)	89 (20.9)

[0078] 在2013年9月4日和18日时,将来自细胞系FL065的全部16个胚胎转移至同步化的雌性受体(表5)。这些受体的妊娠状况在受孕的大约40天和60天时使用超声波检查法和此后每隔一个月通过直肠触诊来确认。

[0079] 表6. 用细胞系FL065的胚胎转移和妊娠

细胞系 ID	植入的受体的数量	在以下时间妊娠(%)	
		40 天	60 天
FL065	11	6 (55)	ND
FL065	5*	ND	ND
总和	16		

[0081] *这些动物将在2013年10月22日进行妊娠检查。ND: 没有检测到并在进展中。

[0082] 实施例4. 胚胎活检和培养

[0083] 获得来自第2-7天胚胎的活检样本并且将活检细胞(例如,来自每个胚胎的4-6个细胞)单独培养。还将剩余的胚胎与活检细胞分开培养。使用标准SOFaaci培养基。允许活检细胞扩充1-6天。因为少数细胞产生有限数量的基因组DNA,所以仅有限量的标志物可以被检验。为评价此,使用Bovine SNP50珠芯片和在活检之后收集的细胞和在活检之后培养1天或2天的细胞确定扩增的DNA样本的访问速率(表7)。将自全胚胎和胎儿成纤维细胞系扩增的DNA用作对照。

[0084] 表7. 分析的样本的访问速率

[0085]

样本ID	由以下扩增的DNA	访问速率 (%)
F21	成纤维细胞	99.0
E11	全胚胎	94.6
B1	活检6-8个细胞	79.8
B2	活检6-8个细胞	81.9
B3	活检6-8个细胞	36.7
B4	在培养两天之后的活检	75.5
B5	在培养两天之后的活检	80.0

[0086] 当将活检样本的访问速率针对精确的遗传分析进行优化(例如,一律是大于80%)时,我们可将来自活检的扩充的细胞用于WGA,同时冷冻活检的胚胎。基于来自WGA的结果,优质的胚胎被选择以产生小牛。

[0087] 其它实施方案

[0088] 尽管上面描述的实施方案的每一个用具有特定的各个定向的各种组分进行了说明,应该理解的是,在本发明的公开内容中描述的系统和方法可以各种组分(位于各种位置和相互定向)呈现各种具体的配置,并且仍然保持在本公开内容的精神和范围内。此外,合适的同等物可用于代替各种组分或与其附加使用,这些替代物或附加的组分的功能和用途被认为对于本领域技术人员是熟悉的,并因此被认为落入本发明公开内容的范围内。因此,本发明的实施例被认为是说明性的而非限制性的,本发明的公开内容并不限于本文给定的细节,而是可以在随附权利要求的范畴内进行修改。

[0089] 在本说明书中引用或提及的所有专利、专利申请、专利申请公布和其它出版物通过引用并入本文,达到如同每一个独立的专利、专利申请、专利申请公布或出版物特定地和单独地通过引用并入的相同程度。这样的专利申请具体包括提交于2012年10月19日的美国临时专利申请号61/716,294,本申请要求从其中的权益。

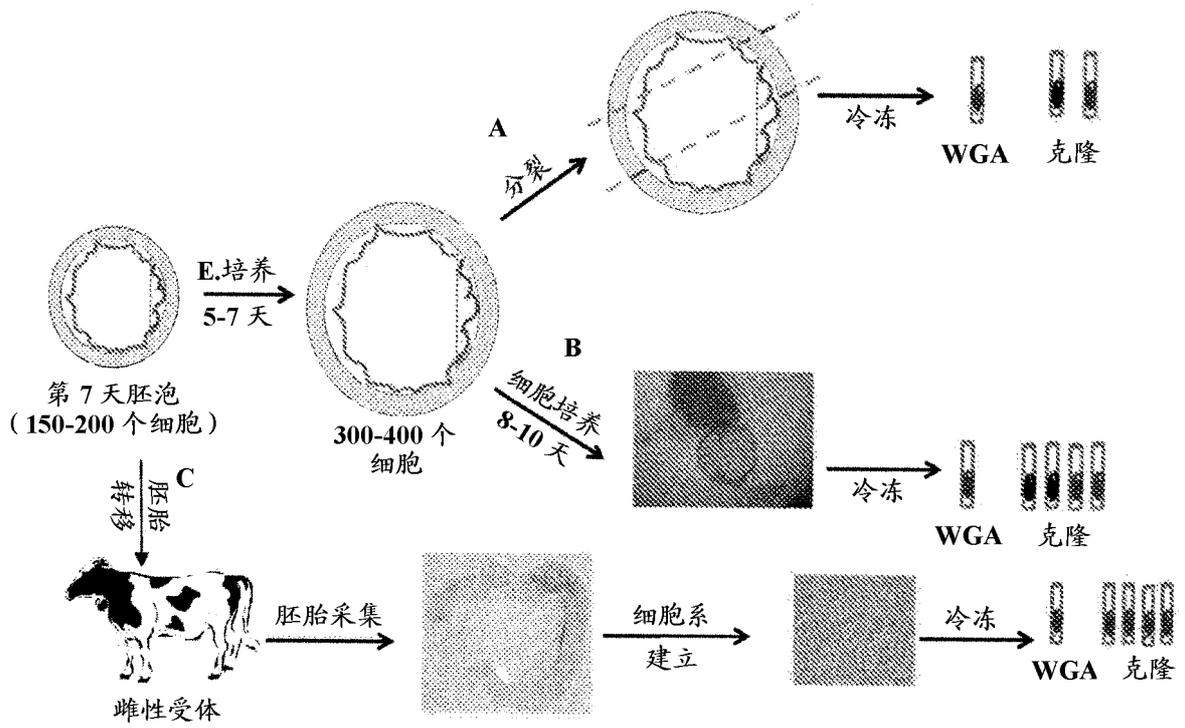


图 1A-1C

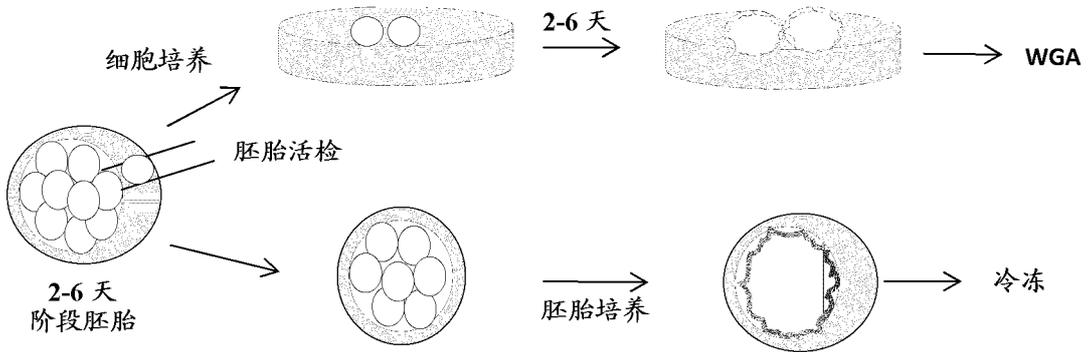


图 2