

猪克隆胚胎激活方法优化与转人溶菌酶基因克隆猪的生产*

卫恒习^{1, 2)} 李俊^{2, 3)} 童佳²⁾ 马育芳²⁾ 高凤磊¹⁾

李秋艳²⁾ 张守全¹⁾ 李 宁^{2)**}

⁽¹⁾ 广东省农业动物基因组学与分子育种重点实验室, 华南农业大学动物科学学院, 广州 510642;

⁽²⁾ 农业生物技术国家重点实验室, 中国农业大学生物学院, 北京 100193;

⁽³⁾ 河北医科大学第一医院生殖医学中心, 石家庄 050031)

摘要 为了提高转基因克隆效率和获得转人溶菌酶基因克隆猪, 研究了不同电激活参数和化学辅助激活方法对猪克隆胚胎和孤雌胚胎体外发育的影响。结果发现: 电场强度会显著影响克隆胚胎的融合率和体外发育能力($P < 0.05$), 电脉冲次数对克隆胚胎体外发育促进作用不显著($P > 0.05$), 而相同电激活条件下克隆胚胎和孤雌胚胎的体外发育能力变化趋势不同; 电激活后再利用放线菌酮+细胞松弛素 B(CHX+CB)处理 4 h 能显著提高克隆胚胎的囊胚率($P < 0.05$), 而用二甲基氨基嘌呤(6-DMAP)处理没有提高克隆胚胎囊胚率($P > 0.05$), 但 6-DMAP 或 CHX+CB 处理均可显著提高孤雌胚胎的囊胚率($P < 0.05$)。上述结果表明, 最佳的孤雌激活条件并不一定是克隆胚胎的最佳激活条件。本研究中猪克隆胚胎的最佳激活方法为 1.6 kV/cm、100 μ s、2 次直流电脉冲间隔 100 μ s, 再辅以 CHX+CB 处理 4 h。利用优化的激活条件成功获得了乳腺特异表达人溶菌酶的转基因猪, 为猪转基因育种奠定了基础。

关键词 体细胞克隆, 胚胎激活, 转基因, 人溶菌酶, 猪

学科分类号 Q819, S828.9

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00082

在当前养猪业, 致病菌的感染会严重影响到仔猪的生长和成活, 且容易产生抗药性, 是全世界范围内亟待解决的重要问题之一。溶菌酶是一种天然的广谱抗菌素, 对细菌、真菌和病毒都具有很好的抑制作用, 已经广泛应用于食品和医药等领域^[1]。有研究报道, 给仔猪饲喂表达人溶菌酶(human lysozyme, hLY)的转基因羊奶, 可改善断奶仔猪的胃肠道功能, 抵抗致病性大肠埃希菌(EPEC)的感染, 且不会引起炎症反应^[2-3]。人乳中溶菌酶的含量和杀菌活性远远高于牛和猪^[1, 4]。因此, 如果在猪乳中高水平表达人溶菌酶, 将有助于提高仔猪的抗病性和成活率。为了验证这一想法, 需要制备在乳腺中特异表达人溶菌酶基因的转基因猪。

目前, 转基因克隆技术是制备转基因家畜最为有效的方法^[5]。自世界首例体细胞克隆猪诞生以来, 已经获得了多种转基因的克隆猪^[6-11], 但转 hLY 基因猪尚未见报道。当前体细胞克隆猪的效率仍然较低(1%~2%)^[12-13], 严重制约着转基因克隆猪

在畜牧业和科学研究中的应用。猪体细胞克隆技术是一项复杂的技术体系, 受到供体细胞、受体胞质、融合与激活、胚胎培养、胚胎移植和显微操作等多个技术环节的影响^[12], 其中融合与激活是克隆胚胎制备和启动发育的关键因素, 在很大程度上决定着克隆胚胎的发育能力。当卵母细胞的核被体细胞核置换以后, 必须进行激活才能够使胚胎启动发育。关于猪克隆胚胎激活的报道较多, 最常用的方法是电激活^[14]。为了提高激活效果, 一些化学药物如二甲基氨基嘌呤(6-DMAP)、放线菌酮(CHX)、细胞松弛素 B(CB)、二硫苏糖醇(DTT)、蛋白酶体

* 国家转基因育种重大专项(2008ZX08006-001), 国家重点基础研究发展计划(973)(2011CB944202)和广东省自然科学基金(S2011040001123)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-62733323, E-mail: ninglcu@cau.edu.cn

收稿日期: 2012-02-17, 接受日期: 2012-07-24

抑制剂 MG132 等分别被用于电激活后的联合辅助激活^[12, 14-19]。但是, 大多数优化激活条件的研究是利用猪卵母细胞孤雌激活进行的, 最佳孤雌激活条件是否就是最佳克隆胚胎激活条件呢? 该问题尚无明确答案。因此, 本研究比较了不同电激活和化学辅助激活条件下, 猪孤雌激活胚胎和克隆胚胎的体外发育效果, 并利用优化的激活条件生产乳腺特异表达人溶菌酶的转基因猪, 以期探索提高仔猪成活率的转基因猪新品种培育提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

除特别注释外, 所有化学试剂购自 Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA)。基础成熟液 TCM199 购自 Gibco 公司, 成熟培养时添加 10% 猪卵泡液 (porcine follicular fluid, pFF), 10 $\mu\text{g/L}$ 表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF), 10 U/ml 人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotrophin, hCG), 10 U/ml 孕马血清促性腺激素 (pregnant mare serum gonadotropin, PMSG) 和 0.57 mol/L 的 L- 半胱氨酸。pFF 为自制^[20]。采卵液为 DPBS, 添加 0.1% 聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, PVA)。电融合激活液为 (0.25 mol/L 甘露醇, 0.1 mmol/L CaCl_2 , 0.1 mmol/L MgCl_2 , 0.5 mmol/L HEPES 和 0.01% PVA)。胚胎培养液为添加 0.3% 无脂肪酸 BSA 的 PZM3 (Porcine zygote medium 3) 液。转基因载体 pBC1-hLY-GFP-NEO 由农业生物技术国家重点实验室构建^[21]。由上海生工合成公司 PCR 检测引物: 人溶菌酶基因 PCR 上游引物 5' CAAGTAATACGCTGTTTCCTC 3', 下游引物 5' TGGTACACACCTGTAGTCAC 3'; 绿色荧光蛋白基因 PCR 上游引物 5' TGCAGTGCTTCAGCCGCTAC 3', 下游引物 5' CTCAGGTAGTGGTTGTCGGG 3'。

1.2 试验方法

1.2.1 猪卵母细胞的采集与体外成熟培养。从屠宰场获取初情期前母猪卵巢放入 37℃ 含青、链霉素的生理盐水中, 3 h 内运回实验室。用连接 18 号针头的 10 ml 注射器抽吸直径 3~6 mm 的卵泡, 将抽取液倒入培养皿中, 在体视显微镜下捡取胞质均匀、卵丘细胞 3 层以上且包裹紧密的卵丘-卵母细胞复合体 (cumulus oocyte complex, COCs)。用成熟培养液洗涤 3 次后, 转移到每孔含 500 μl 成熟培养液的 4 孔板中, 每孔培养 60~100 枚 COCs, 并覆盖 400 μl 石蜡油。培养条件为 39℃、5% CO_2 、

95% 空气和饱和湿度。经过 42~44 h 成熟培养后, 用 1 g/L 的透明质酸酶 (Gibco 公司) 脱去卵丘细胞, 在体视镜下 (SMZ1000, Nikon) 挑选形态正常并且排出第一极体的卵母细胞, 放入 Hepes 缓冲的 NCSU-23 液^[19]中置于培养箱中备用。

1.2.2 转人溶菌酶基因猪胎儿成纤维细胞的准备。

取妊娠 25 天的中国实验用小型猪胎儿, 建立猪胎儿成纤维细胞系, 方法见参考文献[22], 利用建立的雌性 Sw8 细胞系进行转基因操作, 待细胞生长至 70%~80% 汇合时, 利用脂质体 Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司) 介导的方法将线性化的 pBC1-hLY-GFP-NEO 乳腺特异表达载体转染至细胞, 筛选得到转基因细胞阳性率 95% 以上的细胞系, 并进行冻存, 方法见参考文献[21, 23]。在核移植前 5 天左右解冻转基因细胞, 使细胞密度达到 100% 汇合, 再继续培养 1~2 天后便可用于核移植。用 0.1% 胰蛋白酶消化并收集细胞, 放置 4℃ 备用。利用荧光显微镜和 PCR 方法对转基因细胞进行鉴定与检测。

1.2.3 猪克隆胚胎制备、融合激活与孤雌激活。

猪卵母细胞成熟培养后, 在装有显微操作仪的倒置显微镜下去核, 然后与一个成纤维细胞进行重构, 制备重构胚胎, 操作方法见参考文献[22]。将恢复 1 h 左右的重构胚分批转移到融合液中洗涤平衡 2~3 min, 再转移到充满融合液的融合槽内, 调整重构胚的位置使供体细胞和受体卵细胞接触面与电场方向垂直, 随后用电融合仪 CUY-21 (BEX, Nepa, Japan) 进行融合并同时激活。猪孤雌激活条件与克隆胚融合激活条件一致。

试验 1: 比较了不同电场强度 (0.8, 1.2, 1.6, 2.0 kV/cm)、相同脉冲时间 (100 μs) 下, 猪孤雌胚胎和克隆胚胎的体外发育效果。试验 2: 比较了不同化学辅助激活处理对猪孤雌胚胎和克隆胚胎体外发育的影响, 胚胎激活后随机分为 3 组, 第 1 组不作处理作为对照, 第 2 组用 2 mmol/L 6-DMAP 处理 4 h, 第 3 组用 10 mg/L CB 和 10 mg/L CHX 处理 4 h, 之后转移到胚胎培养液中进行培养。实验 3: 比较了 1.6 kV/cm、100 μs 条件下, 1 次电脉冲和 2 次电脉冲对克隆胚胎体外发育的影响, 2 次电脉冲间隔时间为 100 μs 。

1.2.4 胚胎体外培养与囊胚细胞计数。将激活后的胚胎转入预先平衡 2 h 以上的胚胎培养液滴 PZM3 中继续培养, 培养条件为 39℃、5% O_2 、5% CO_2 、90% N_2 和饱和湿度。在培养第 2 天和第 7 天分别

观察记录卵裂和囊胚发育情况. 将第 7 天的囊胚用 4% 多聚甲醛固定 10 min, 再用 DPBS 洗涤 3 次后, 转移到 10 mg/L Hoechst33342 中染色 10 min, 压片后在荧光显微镜下观察记录囊胚细胞数.

1.2.5 胚胎移植与妊娠诊断. 制备的猪克隆胚胎在融合激活 12~48 h 后, 经手术法将胚胎移植到自然发情 1~3 天的受体母猪输卵管内(以出现压背反应为发情第 0 天), 每头受体猪移植克隆胚胎 100~200 枚. 胚胎移植后第 30 天, 对未返情的受体母猪进行首次超声波妊娠检测, 之后定期跟踪胎儿发育情况, 调整饲养管理, 直至受体母猪分娩.

1.2.6 转基因克隆猪的鉴定. 克隆猪出生后第 2 天, 剪取耳组织带回实验室进行克隆猪耳成纤维细胞建系, 方法见参考文献[22], 在荧光显微镜下观察克隆猪耳组织细胞 GFP 表达情况. 提取克隆猪耳成纤维细胞 DNA, 用 PCR 方法检测 *hLY* 和 *GFP*

基因整合情况, 并利用 Southern 杂交和 Western blot 技术检测 *hLY* 基因整合和表达情况, 参见文献[24]. 同时, 对转 *hLY* 基因的克隆猪进行微卫星标记检测, 方法参见文献[25].

1.2.7 统计分析. 所有实验重复 3 次以上, 利用 SAS9.0 软件进行 *t* 检验和单因素方差分析, 利用 *Q* 法进行多重比较. $P < 0.05$ 表示差异显著.

2 结 果

2.1 转入溶菌酶基因(pBC1-hLY-GFP-NEO)细胞系的筛选与鉴定

通过筛选得到了表达绿色荧光蛋白的转 *hLY* 基因的细胞系 Sw8-*hLY* (图 1a), 在荧光显微镜下检测 GFP 阳性率达到 95.3%(286/300). 并对 2 个 GFP 阳性细胞克隆进行了 *hLY* 基因 PCR 检测, 结果均为阳性(图 1b).

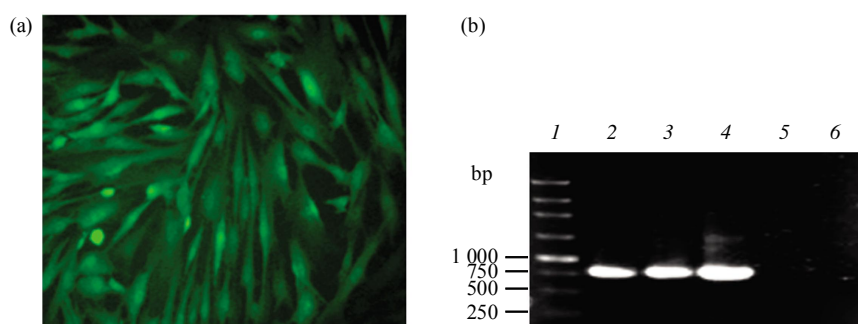


Fig. 1 Identification of Sw8-*hLY* transgenic cell lines

(a) Representative image of GFP expression of Sw8-*hLY* cells under fluorescent microscope. (b) The integration of *hLY* gene was identified in two clones of Sw8-*hly* cells by PCR analysis, bands of product length is 780 bp. DNA of pBC1-*hLY*-GFP-NEO plasmid served as positive control, DNA of non-transfection Sw8 cells as negative control and distilled water as blank (non-template control). The same as below. 1: Marker; 2: Sw8-*hLY*-clone 1; 3: Sw8-*hLY*-clone 2; 4: Positive control; 5: Negative control; 6: Blank.

2.2 不同电场强度和脉冲次数对猪孤雌胚胎和克隆胚胎体外发育的影响

由图 2 可见, 不同电场强度激活的猪克隆胚胎和孤雌激活胚胎体外发育的变化趋势并不完全一致(图 2a, 图 2b). 孤雌激活胚胎在 0.8 kV/cm 电场强度下的卵裂率显著低于 1.2 kV/cm、1.6 kV/cm 和 2.0 kV/cm 组($P < 0.05$, 图 2a), 而克隆胚胎的卵裂率在 4 组之间差异不显著(图 2b). 从囊胚率来看, 孤雌激活胚胎在 1.6 kV/cm 和 2.0 kV/cm 之间没有显著差异($P > 0.05$), 但它们均显著高于 0.8 kV/cm 和 1.2 kV/cm 组($P < 0.05$, 图 2a), 而克隆胚胎囊胚

率在 0.8 kV/cm、1.2 kV/cm 和 2.0 kV/cm 之间差异不显著, 1.6 kV/cm 组的囊胚率显著高于 0.8 kV/cm 和 1.2 kV/cm 组($P < 0.05$, 图 2b). 不同电场强度对克隆胚胎的融合率具有显著影响, 1.6 kV/cm 和 2.0 kV/cm 组的融合率显著高于 0.8 kV/cm 和 1.2 kV/cm 组($P < 0.05$, 图 2c). 2 次电脉冲具有提高克隆胚胎体外发育能力的趋势, 但统计分析差异不显著($P > 0.05$, 图 2d). 通过综合比较, 可以得出 1.6 kV/cm、100 μ s、2 次电脉冲间隔 100 μ s 是最佳的克隆胚胎融合激活参数.

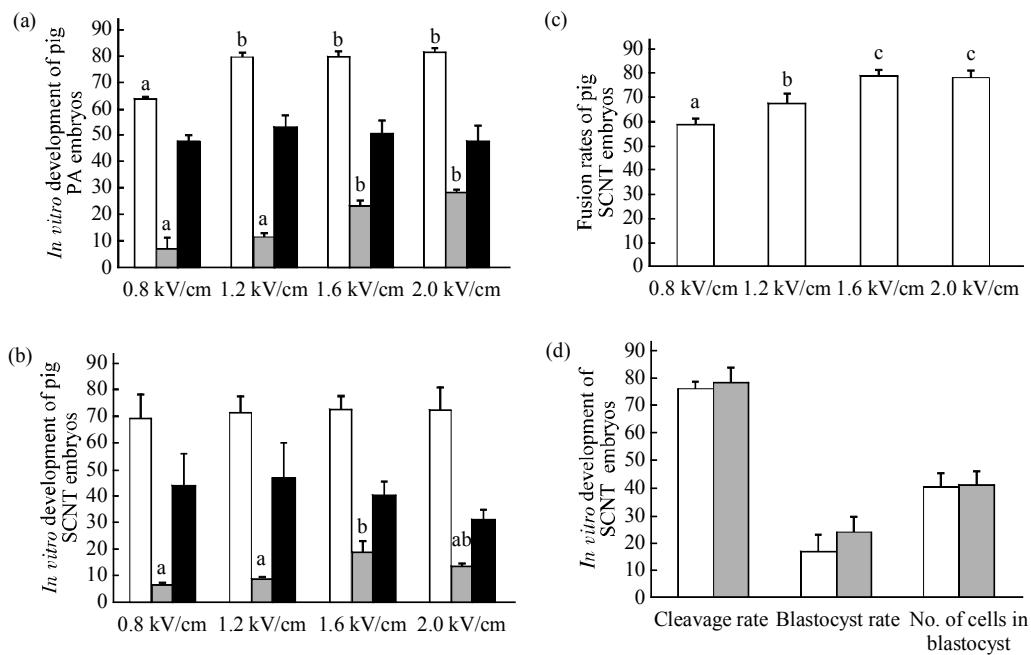


Fig. 2 *In vitro* development of embryos derived from PA and SCNT at different electric activation parameters
Columns without common letters were significantly different ($P < 0.05$). The same as below. (a, b) □: Cleavage rate; ▒: Blastocyst rate; ■: No. of cells in blastocyst. (c) □: Fusion rate. (d) □: One electric pulse; ▒: Two electric pulse.

2.3 不同化学辅助激活对猪孤雌胚胎和克隆胚胎体外发育的影响

由图 3 可见, 电激活后联合 6-DMAP 或 CHX+CB 化学辅助激活能够显著提高猪孤雌胚胎的卵裂率和囊胚率, 而且 CHX+CB 处理的囊胚率

显著高于 6-DMAP 组($P < 0.05$, 图 3a). CHX+CB 辅助激活处理能够显著提高猪克隆胚胎囊胚率($P < 0.05$), 并且其卵裂率和囊胚细胞数也有增加的趋势(图 3b). 因此, 电激活后用 CHX+CB 处理 4 h 是最佳的辅助激活方法.

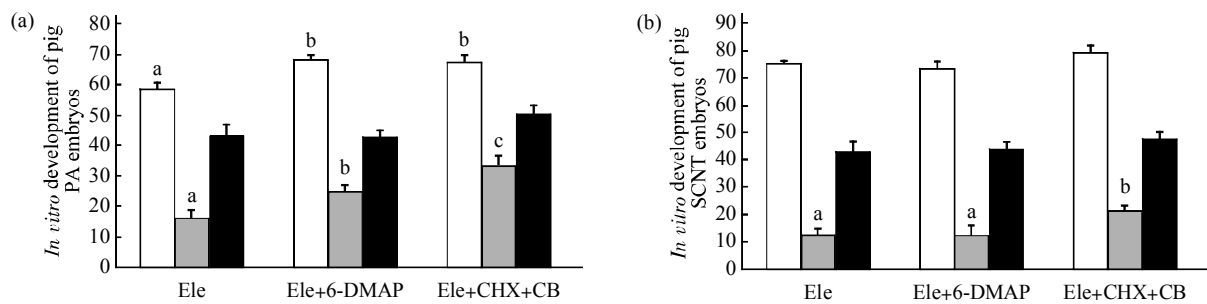


Fig. 3 Development of PA(a) and SCNT(b) embryos activated by electroporation(Ele)
Electroporation followed by incubation in the presence of 6-DMAP (Ele+6-DMAP) and electroporation followed by CHX (Ele+CHX) treatment. □: Cleavage rate; ▒: Blastocyst rate; ■: No. of cells in blastocyst.

2.4 转基因克隆猪的生产与鉴定

将 680 枚克隆胚胎移植到 5 头受体母猪的输卵管中, 在移植后第 30 天用 B 超检测有 4 头妊娠,

移植妊娠率 80%, 其中 3 头怀孕到期, 移植分娩率 60%, 出生了 5 头克隆猪(其中 1 头为死胎).
分别采克隆猪的耳组织, 在荧光显微镜下均可

观察到 GFP 蛋白表达, 且大部分 GFP 阳性细胞分布于毛囊(图 4b). 通过 PCR 检测发现, 5 头克隆猪 *GFP* 基因检测结果均为阳性(图 4c), 但是只有 3 头克隆猪为 *hLY* 基因阳性, 表明另外 2 头克隆猪的 *hLY* 基因丢失(图 4d). 微卫星检测结果表明, 3 头

hLY 转基因阳性克隆猪的遗传组成与供体细胞完全一致, 而与代孕母猪没有亲缘关系(表 1). 而 Southern 印迹 和 Western blot 的检测结果进一步表明, 我们得到了转 *hLY* 基因的克隆猪, 并且能够在乳腺中表达, 参见文献[24].

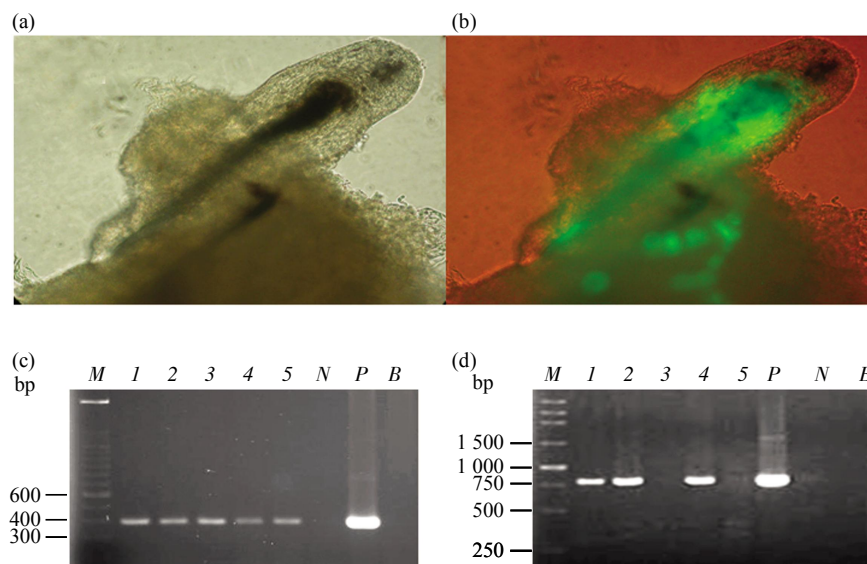


Fig. 4 Identification of transgenic cloned piglets

(a, b) Representative images of tissues from ear skin of cloned piglets under fluorescent microscope in white light (a) and white light plus blue light (b). (c, d) PCR analysis of *GFP* gene (c) and *hLY* (d) gene integration in cloned piglets. 1~5: The bands amplified from DNA of different cloned piglets, the PCR product length is 403 bp (c) and 780 bp (d) respectively. P: Positive control; N: Negative control; B: Blank control; M: Marker.

Table 1 Microsatellite analysis of *hLY* transgenic cloned piglets

Microsatellites	One surrogate mother	Donor cell	Piglet Sw8-1	Piglet Sw8-2	Piglet Sw8-4
SW940	150/154	146/156	146/156	146/156	146/156
S0089	142/146	143/154	143/154	143/154	143/154
SW742	205/205	199/213	199/213	199/213	199/213
SW2540	95/106	106/106	106/106	106/106	106/106
SW2049	94/96	90/94	90/94	90/94	90/94
SW1856	195/197	179/191	179/191	179/191	179/191
SW1473	168/170	168/170	168/170	168/170	168/170
SW1987	164/164	158/164	158/164	158/164	158/164

3 讨 论

人乳中溶菌酶的含量和活性均远远高于猪、牛、羊等动物^[1, 4]. 为了探索在猪乳中表达人溶菌酶是否有助于提高仔猪成活率, 本研究利用 *pBC1-hLY-GFP-NEO* 表达载体和体细胞克隆技术, 成功生产了能在乳腺中表达 *hLY* 基因的转基因中

国实验用小型猪, 为提高仔猪成活率的转基因猪品种培育打下良好基础. 同时, 对猪克隆胚胎的激活方法进行了优化, 并比较了不同激活条件下猪孤雌胚胎和克隆胚胎的体外发育能力. 结果发现, 电场强度会显著影响克隆胚胎融合率和孤雌胚胎与克隆胚胎的囊胚率, 而电脉冲次数对克隆胚胎发育影响不显著(图 2), 电激活后再利用 CHX+CB 处理 4 h

能够显著提高猪孤雌胚胎和克隆胚胎的囊胚发育率(图 3), 但是猪孤雌胚胎和克隆胚胎发育能力在不同激活条件下的变化趋势并不完全一致, 为克隆胚胎激活条件的进一步优化提供了参考依据。通过综合比较, 得出 1.6 kV/cm、100 μ s、2 次电脉冲间隔 100 μ s, 再辅助以 CHX+CB 处理 4 h 是最佳的猪克隆胚胎激活方法。

提高转基因猪的生产效率对人类疾病模型、异种器官移植研究和提高养猪业生产效益等方面具有重要的意义。影响体细胞克隆效率的因素很多, 其中融合与激活是关键因素之一。克隆胚胎的激活是一个受精模拟过程。在受精胚胎, 精卵结合会引起细胞内钙库释放 Ca^{2+} , 产生钙波或钙振荡, 引发一系列磷酸化和去磷酸化事件, 其中有丝分裂酶原激活蛋白激酶(MAPK)的去磷酸化可使 MPF 活性迅速降低, 从而使卵子活化^[12-19]。而电激活是在高压直流脉冲作用下, 使激活液中的 Ca^{2+} 进入细胞, 引起细胞内 Ca^{2+} 升高, 从而激活胚胎发育^[14]。电场强度、电脉冲时间和电脉冲次数均可影响胚胎激活效果^[26-27]。1 次电激只能引起卵子中 Ca^{2+} 升高 1 次, 多次电激可诱导卵子 Ca^{2+} 浓度多次升高^[28]。本研究发现, 1.6 kV/cm 电场强度组的克隆胚胎融合率和囊胚率显著高于 0.8 kV/cm 和 1.2 kV/cm 组(图 2), 虽然 2 次电脉冲的克隆胚胎发育能力有所提高, 但与对照组差异不显著, 与 Lee 等^[27]的报道相似, 说明电场强度是重要的电激活参数, 而电脉冲次数对猪克隆胚胎的激活促进作用不明显。另外, 本研究还发现, 猪孤雌胚胎囊胚率随着电场强度的升高而增加, 而猪克隆胚胎囊胚率随着电场强度的升高先升后降(图 2), 表明最佳的孤雌激活参数不一定是最佳的克隆胚胎激活参数, 应该利用克隆胚胎, 而不是孤雌激活胚胎, 进行克隆胚胎最佳激活条件的筛选, 为进一步完善克隆胚胎激活条件指明了方向。虽然一次电刺激足以引起猪卵母细胞的活化^[27], 但是卵子的活化程度可能与胚胎的发育能力密切相关。大量的研究表明, 电激活后再联合化学辅助激活有助于提高克隆胚胎或孤雌激活胚胎的发育能力^[14-19]。6-DMAP 是一种蛋白激酶抑制剂, 它能够降低 MAPK 的活性而使 MPF 失活。CHX 是一种蛋白质合成抑制剂, 能够有效抑制 MPF 的合成。本研究结果表明, 利用 6-DMAP 或 CHX+CB 进行辅助激活处理均能显著提高猪孤雌胚胎囊胚率, 其中 CHX+CB 处理效果更加显著, 而且能够显著提高克隆胚胎囊胚率(图 3), 与前人的报道结果相

一致^[19, 27]。

溶菌酶是一类天然非特异性免疫蛋白, 具有抗菌、抗病毒和增强免疫力的功能。在乳腺中特异表达人溶菌酶的研究已经在小鼠、牛、羊上获得成功^[3, 21, 29], 但在猪上尚未见报道。本研究利用改良的乳腺特异表达载体 *pBCI-hLY-GFP-NEO* 成功获得了 5 头雌性转基因猪, 其中有 3 头检测到有 *hLY* 和 *GFP* 基因同时整合, 另外 2 头则只检测到 *GFP* 基因整合(图 4)。其原因可能是在基因转染前转基因载体发生降解或者在基因整合时 *hLY* 基因片段被破坏所致。据报道, 随着转基因猪生长和传代, 也会产生外源基因拷贝数减少或丢失的现象^[30], 但其具体机制仍然未知。另外, 获得高纯度的转基因阳性细胞是生产转基因克隆猪的重要前提条件, 虽然本研究使用的转基因细胞系 GFP 阳性率达到 95%以上, 但它是多个细胞克隆的混合体, 这也可能造成所获得的克隆猪外源基因整合情况不完全一致。本研究获得的 *hLY* 转基因猪有 2 头存活到成年并配种产仔, 通过 DNA 印迹和蛋白质印迹检测结果进一步表明我们成功获得了能够在乳腺中表达 *hLY* 的转基因猪^[24]。但是, 猪乳中表达 *hLY* 能否提高仔猪免疫力和成活率, 还有待于进一步研究。

总之, 本研究对融合激活条件进行了优化, 提高了猪克隆胚胎的体外发育能力, 同时指出了孤雌胚胎最佳激活条件并不一定是克隆胚胎的最佳激活条件。利用优化的猪克隆胚胎激活条件首次成功获得了在乳腺中特异表达 *hLY* 基因的转基因中国实验用小型猪, 为提高仔猪成活率的转基因猪品种培育奠定了坚实的基础。

参 考 文 献

- [1] Benkerroum N. Antimicrobial activity of lysozyme with special relevance to milk. *African J Biotechnology*, 2008, **7** (25): 4856-4867
- [2] Cooper C A, Brundige D R, Reh W A, et al. Lysozyme transgenic goats' milk positively impacts intestinal cytokine expression and morphology. *Transgenic Res*, 2011, **20** (6): 1235-1243
- [3] Brundige D R, Maga E A, Klasing K C, et al. Lysozyme transgenic goats' milk influences gastrointestinal morphology in young pigs. *J Nutr*, 2008, **138** (5): 921-926
- [4] Shahani K M, Kwan A J, Friend B A. Role and significance of enzymes in human milk. *Am J Clin Nutr*, 1980, **33** (8): 1861-1868
- [5] Piedrahita J A, Olby N. Perspectives on transgenic livestock in agriculture and biomedicine: An update. *Reproduction Fertility and Development*, 2011, **23** (1): 56-63
- [6] Dai Y F, Vaught T D, Boone J, et al. Targeted disruption of the alpha 1, 3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol*,

- 2002, **20** (3): 251–255
- [7] Lai L, Park K W, Cheong H T, *et al.* Transgenic pig expressing the enhanced green fluorescent protein produced by nuclear transfer using colchicine-treated fibroblasts as donor cells. *Molecular Reproduction and Development*, 2002, **62** (3): 300–306
- [8] Lai L, Kang J X, Li R, *et al.* Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. *Nat Biotechnol*, 2006, **24** (4): 435–436
- [9] Ahn K S, Won J Y, Park J K, *et al.* Production of human cd59-transgenic pigs by embryonic germ cell nuclear transfer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, **400** (4): 667–672
- [10] Sommer J R, Estrada J L, Collins E B, *et al.* Production of elovl4 transgenic pigs: A large animal model for stargardt-like macular degeneration. *British J Ophthalmology*, 2011, **95** (12): 1749–1754
- [11] Kim Y J, Ahn K S, Kim M J, *et al.* Targeted disruption of ataxia-telangiectasia mutated gene in miniature pigs by somatic cell nuclear transfer. *Reproduction Fertility and Development*, 2012, **24** (1): 124–124
- [12] Vajta G, Zhang Y H, Machaty Z. Somatic cell nuclear transfer in pigs: Recent achievements and future possibilities. *Reproduction Fertility and Development*, 2007, **19** (2): 403–423
- [13] Lai L X, Prather R S. Production of cloned pigs by using somatic cells as donors. *Cloning Stem Cells*, 2003, **5** (4): 233–241
- [14] Whitworth K M, Li R, Spate L D, *et al.* Method of oocyte activation affects cloning efficiency in pigs. *Molecular Reproduction and Development*, 2009, **76** (5): 490–500
- [15] Song K, Hyun S H, Shin T, *et al.* Post-activation treatment with demecolcine improves development of somatic cell nuclear transfer embryos in pigs by modifying the remodeling of donor nuclei. *Molecular Reproduction and Development*, 2009, **76** (7): 611–619
- [16] Sugimura S, Kawahara M, Wakai T, *et al.* Effect of cytochalasins b and d on the developmental competence of somatic cell nuclear transfer embryos in miniature pigs. *Zygote*, 2008, **16** (2): 153–159
- [17] Nanassy L, Lee K, Javor A, *et al.* Effects of activation methods and culture conditions on development of parthenogenetic porcine embryos. *Anim Reprod Sci*, 2008, **104** (2–4): 264–274
- [18] De Sousa P A, Dobrinsky J R, Zhu J, *et al.* Somatic cell nuclear transfer in the pig: Control of pronuclear formation and integration with improved methods for activation and maintenance of pregnancy. *Biol Reprod*, 2002, **66** (3): 642–650
- [19] 马育芳, 卫恒习, 李 燕, 等. 化学激活和季节对克隆猪出生率的影响. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2009, **39** (4): 384–391
- Ma Y F, Wei H X, Li Y, *et al.* *Science in China Series C: Life Sciences*, 2009, **39** (4): 384–391
- [20] 卫恒习, 李 俊, 李秋艳, 等. 瘦素对猪卵母细胞体外成熟及克隆猪妊娠率的影响. *自然科学进展*, 2008, **18** (11): 1320–1324
- Wei H X, Li Jun, Li Q Y, *et al.* *Progress in Natural Science*, 2008, **18** (11): 1320–1324
- [21] 于政权, 樊宝良, 戴蕴平, 等. 转基因小鼠乳腺表达重组人溶菌酶. *科学通报*, 2003, **48** (20): 2149–2153
- Yu Z Q, Fan B L, Dai Y P, *et al.* *Chin Sci Bull*, 2003, **48** (20): 2149–2153
- [22] 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. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2005, **35** (5): 439–445
- Zhang Y H, Pan D K, Sun X Z, *et al.* *Science in China Series C: Life Science*, 2005, **35** (5): 439–445
- [23] 李秋艳, 卫恒习, 郭 英, 等. 利用体细胞核移植技术生产表达增强绿色荧光蛋白(egfp)的转人溶菌酶基因(hly)的猪克隆胚胎. *自然科学进展*, 2008, **18** (10): 1157–1162
- Li Q Y, Wei H X, Guo Y, *et al.* *Prog Natural Science*, 2008, **18** (10): 1157–1162
- [24] Tong J, Wei H, Liu X, *et al.* Production of recombinant human lysozyme in the milk of transgenic pigs. *Transgenic Res*, 2011, **20** (2): 417–419
- [25] 潘登科, 张运海, 孙秀柱, 等. 低氧培养早期胚胎克隆小型猪(sus scrofa). *科学通报*, 2006, **51** (4): 415–419
- Pan D K, Zhang Y H, Sun X Z, *et al.* *Chin Sci Bull*, 2006, **51** (4): 415–419
- [26] Zimmermann U. Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. *Biochim Biophys Acta*, 1982, **694** (3): 227–277
- [27] Lee J W, Tian X C, Yang X. Optimization of parthenogenetic activation protocol in porcine. *Molecular Reproduction and Development*, 2004, **68** (1): 51–57
- [28] Collas P, Fissore R, Robl J M, *et al.* Electrically induced calcium elevation, activation, and parthenogenetic development of bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 1993, **34** (2): 212–223
- [29] Yang B, Wang J, Tang B, *et al.* Characterization of bioactive recombinant human lysozyme expressed in milk of cloned transgenic cattle. *PLoS One*, 2011, **6** (3): e17593
- [30] Kong Q, Wu M, Huan Y, *et al.* Transgene expression is associated with copy number and cytomegalovirus promoter methylation in transgenic pigs. *PLoS One*, 2009, **4** (8): e6679

Optimizing of Activation Protocols and Production of Transgenic Pigs Expressing Human Lysozyme by Somatic Cell Nuclear Transfer*

WEI Heng-Xi^{1,2)}, LI Jun^{2,3)}, TONG Jia²⁾, MA Yu-Fang²⁾, GAO Feng-Lei¹⁾,

LI Qiu-Yan²⁾, ZHANG Shou-Quan¹⁾, LI Ning^{2)**}

⁽¹⁾ Guangdong Provincial Key Laboratory of Agro-Animal Genomics and Molecular Breeding, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

²⁾ State Key Laboratory for Agrobiotechnology and Department of Animal Physiology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

³⁾ Reproductive medical center, 1st hospital of Hebei medical university, Shijiazhuang 050031, China)

Abstract In order to improve the cloning efficiency and obtain human lysozyme (*hLY*) gene transgenic pigs, the present study was carried out to investigate the effects of different electric activation parameters and chemicals on *in vitro* development of embryos derived from parthenogenesis (PA) and somatic cell nuclear transfer (SCNT). The results showed that the electric strength could influence the fusion rate and developmental ability of SCNT embryos ($P < 0.05$), and number of electric pulses had no significant effect on SCNT embryos development ($P > 0.05$), yet different variation tendency was found in developmental ability between PA and SCNT embryos under same activation parameters. The blastocyst rate of SCNT embryos was improved when treated with CHX+CB for 4 h after electric activation ($P < 0.05$), whereas 6-DMAP did not ($P > 0.05$). On the contrary, either CHX+CB or 6-DMAP treatment after electric pulses could improve the blastocyst rate of PA embryos, indicating that the best activation method for PA was not necessarily the best for SCNT. The best activation protocol of SCNT embryos in our study is two pulses of 100 μ s, direct current of 1.6 kV/cm electric strength with 100 μ s interval, and followed by CHX+CB treatment for 4 h. With the activation protocol, the mammary gland expressed *hLY* transgenic pigs were generated. It could help for improving piglets survival rate in transgenic breeding.

Key words somatic cell nuclear transfer, embryo activation, transgene, human lysozyme, pig

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00082

*This work was supported by grants from The National Transgenic Breeding Program of China (2008ZX08006-001), National Basic Research Program of China (2011CB944202) and Guangdong Natural Science Foundation (S2011040001123).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-62733323, E-mail: ninglcu@cau.edu.cn

Received: February 17, 2012 Accepted: July 24, 2012