

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00725

人精母细胞重组频率和年龄相关性的分析

段涛¹, 杨庆岭², 王刘², 史庆华², 于德新¹

1. 安徽医科大学第一附属医院泌尿外科, 合肥 230022;
2. 中国科学技术大学生命科学学院分子细胞遗传学实验室, 合肥微尺度物质科学国家实验室, 合肥 230027

摘要: 减数分裂遗传重组对同源染色体的正确分离和单倍体的正确形成起至关重要的作用, 但人们对人精母细胞减数分裂遗传重组机制了解的还很少。通过免疫荧光染色技术标记减数分裂 I 联会复合体上的 MLH1(DNA 错配修复蛋白)位点可以检测人精母细胞的重组。文章对 10 例可育男性进行分析, 发现每个细胞中重组位点数平均为 49.4 ± 4.4 , 范围为 33~63, 具有显著的个体差异, 只有 0.4% (1/220) 的常染色体 SC 上缺少 MLH1 位点。进一步通过 Spearman 相关性分析, 分析了年龄因素与个体间重组位点差异的相关性, 结果提示年龄因素对常染色体及性染色体的重组均无影响。

关键词: 减数分裂; 联会复合体; 遗传重组; 精母细胞; 年龄

Correlation analysis between meiotic recombination frequencies and age in human spermatocyte

DUAN Tao¹, YANG Qing-Ling², WANG Liu², SHI Qing-Hua², YU De-Xin¹

1. Department of Urology, First Affiliated Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230022, China;
2. Hefei National Laboratory for Physical Sciences at Microscale, School of Life Science, University of Science Technology of China, Hefei 230027, China

Abstract: Faithful meiotic recombination is essential for the segregation of homologous chromosomes and the formation of normal haploid gametes. Little is known about the mechanism of meiotic recombination in human germ cells. MLH1 (a DNA mismatch repair protein) foci on synaptonemal complexes (SCs) at prophase I of meiosis can be used to examine recombination frequency. In 10 fertile men, the mean number of MLH1 foci per cell in all donors was 49.4 with a range from 33 to 63. There was significant variation in the recombination frequency found among 10 normal individuals: the mean frequencies of chromosomal recombination foci ranged from 47 to 52.7. The bivalents without recombination focus were rare, with a frequency of only 0.4%. Thus, achiasmate chromosomes appeared to be rare in human male meiosis. Spearman correlation analysis between age and the frequencies of recombination foci failed to get any significantly statistical correlation, suggesting that aging contributes nothing to the variation among individuals.

Keywords: meiosis; synaptonemal complex; genetic recombination; spermatocyte; age

收稿日期: 2011-03-16; 修回日期: 2011-04-09

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973 计划)项目(编号: 2006CB504003), 中国科学院知识创新工程重要方向性项目(编号: KSCX1-YW-R-51)和国家重大科学研究计划项目(编号: 2007CB947401)资助

作者简介: 段涛, 硕士研究生, 住院医师, 研究方向: 男性不育。E-mail: 330605700@qq.com

通讯作者: 于德新, 硕士, 教授, 博士生导师, 主任医师, 研究方向: 泌尿系肿瘤及男性不育。E-mail: urology_2010@hotmail.com

减数分裂前期 I 同源染色体的配对、联会和重组不仅确保了生物的遗传多样性,也对同源染色体在第一次减数分裂时的正确分离起至关重要的作用^[1]。在偶线期,同源染色体开始

配对、联会,形成一种蛋白复合结构—联会复合体(Synaptonemal complexes, SC)^[2]。在粗线期,联会完成,同源染色体之间发生重组。至双线期,联会复合体解体。同源染色体相互分离,但在个别区域被重组后形成的交叉相连接。

传统的硝酸银染色 SC(联会复合体)结合电镜观察,由于着丝粒不嗜银无法观察到 SC 上的着丝粒^[3]。近年发展起来的免疫荧光染色技术,能够用于标记减数分裂蛋白,使减数分裂重组研究进入了一个新阶段。本文利用 SCP3(联会复合体蛋白 3,为联会复合体侧轴成分)抗体、MLH1 抗体和 CREST 抗血清(标记着丝粒蛋白),可以研究粗线期精母细胞同源染色体的配对和重组的频率及分布,为人类精母细胞减数分裂遗传重组研究提供了快速和可靠的分析方法。我们以行睾丸切除术的 10 例可育男性的睾丸组织为材料,运用染色体铺展法制备联会复合体,并进行免疫荧光染色,对同源染色体减数分裂重组进行分析,以探讨男性同源染色体的重组模式。

1 材料和方法

1.1 标本收集

8 例来自老年男性前列腺癌患者去势手术行双侧睾丸切除术睾丸组织标本,2 例(C1,C2)来自睾丸肿瘤,年龄范围 27~74 岁,平均 69.2 岁,均曾经具有正常生育能力,病理学检查证实具有正常生精过程。睾丸样本存放于 PBS 溶液中,置冰上,30 min 内运回实验室,用于制备精母细胞联会复合体并行免疫荧光染色。

1.2 方法

1.2.1 联会复合体制备和免疫荧光染色

LI 等^[4]的铺展法制备联会复合体,首先将新鲜睾丸组织置于低渗液中轻轻撕开组织疏松曲细精管,置于室温 1 h,然后将低渗好的曲细精管在 0.1 mol/L 蔗糖中撕拉制备精母细胞单细胞悬液;取 10 μ L 上述细胞悬液均匀铺于载玻片(表面覆盖 0.2%Triton X-100 的 1%多聚甲醛)上,水平湿盒中放置 10 h,晾干,用

0.04%Photo-Flo 洗涤玻片 4 min,于室温晾干后置于 ADB 湿盒中封闭,0.5 h 后取出于室温干燥 0.5 h。在载玻片吸取 40 μ L 用 ADB 稀释的一抗混合液(兔抗-SCP3,鼠抗-MLH1,人抗 CREST 血清)并用盖玻片覆盖。用胶浆(rubber cement)封片封片,37 $^{\circ}$ C 过夜孵育。TBS 洗涤载玻片 3 次,每次 10 min。加二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5 h,用 TBS 洗涤 3 次,分别洗 10、20、30 min,加 20 μ L 封片剂(vectashield)封片,观察。

1.2.2 细胞分析

用荧光显微镜 Olympus BX61 拍摄细胞,软件分析系统采用 Image Pro-Plus versions 5.1 鉴定精母细胞减数分裂前期 I 的各个阶段。粗线期细胞用于分析同源染色体的重组(图 1):常染色体全部完成配对,性染色体配对不完全,免疫荧光信号清楚,二价体的数目正确,联会复合体形态良好无较多重叠、扭曲、拉伸,便于分析重组位点。在粗线期细胞的常染色体 SC 上,我们统计每个细胞 MLH1 位点的数目和含有相同 MLH1 位点数目的 SC 及其变化的范围,而在性染色体 XY 上,我们统计含有 MLH1 位点的细胞比例。

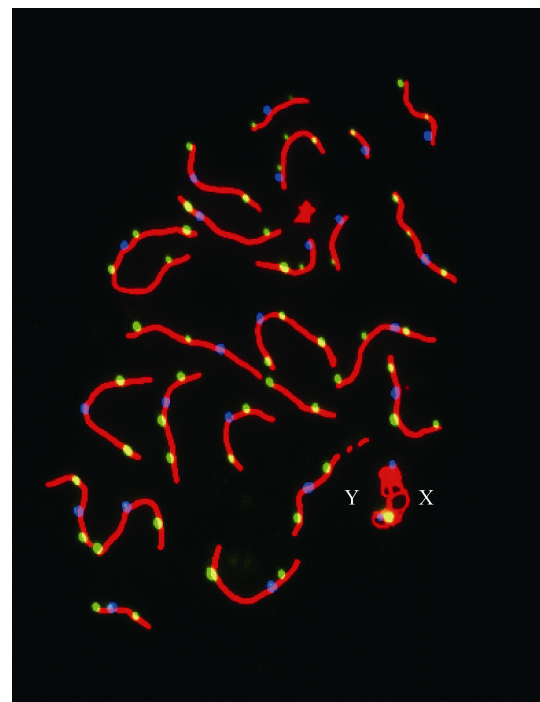


图 1 可育男性减数粗线期精母细胞中联会复合体 红色: SCP3; 绿色: MLH1; 蓝色: 着丝点。X Y 染色体被标记。

1.2.3 数据分析

统计分析用 SPSS 13 软件。方差分析采用 Kruskal

Wallis 检验, 百分比采用 Pearson χ^2 test, 相关性分析采用 Spearman 相关性分析, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 重组位点分析

10 例精母细胞粗线期重组情况见表 1, 共分析 839 个粗线期精母细胞, 每个精母细胞中重组位点数平均为 49.4 ± 4.4 , 范围为 33~63。XY 染色体上有 MLH1 位点的细胞比例 68%~93%, 平均为 76.2%, 未发生重组的细胞比例 7%~32%, 在 10 例标本中, 通过对个体间粗线期细胞的平均 MLH1 数目和 XY 染色体上有 MLH1 位点的细胞比例分析发现: 常染色体 SC 和 XY 染色体上的重组均存在显著个体间差异, 差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.2 SC 未发生交换的分析

共统计分析 839 个粗线期精母细胞上的 18 458 条常染色体 SC 的重组(表 2): 细胞中具有 0~5 个 MLH1 位点的常染色体 SC 的平均数分别为 0.1、3.5、11.5、5.7、1.2 和 0.1, 只有 0.4%(1/220)的常染色体 SC 上缺少 MLH1 位点, 缺乏 MLH1 位点的联会复合体频率和细胞的整体重组频率没有相关性($P>0.05$)。XY 染色体上有 MLH1 位点的细胞比例 68%~93%, 平均为 76.2%, 未发生重组的细胞比例 7%~32%。

2.3 遗传重组与年龄因素的相关性分析

相关性分析采用 Spearman 相关性分析分别分析了常染色体和 XY 重组情况与年龄的相关性, 分别见图 2 和图 3, 结果表明年龄因素对常染色体及性染色体的重组均无显著关联。($P>0.05$)。

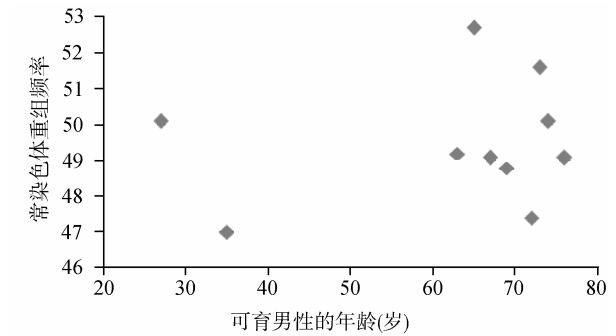


图 2 常染色体重组频率与年龄相关性分析($r=0.2, P=0.6$)

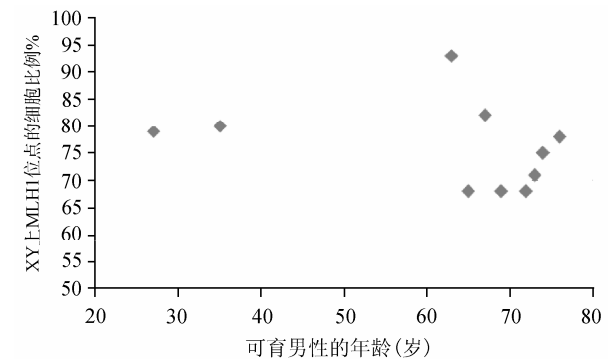


图 3 性染色体重组与年龄相关性分析($r=-0.3, P=0.4$)

表 1 可育男性粗线期精母细胞中 MLH1 平均数目和 XY 上 MLH1 位点的细胞比例(%)

供体	年龄(岁)	分析的细胞数	MLH1 位点			XY 上含有 MLH1 位点的细胞比例(%)
			每细胞平均数	标准差	范围	
C1	27	100	50.1	5.3	34~63	79
C2	35	100	47.0	3.8	36~55	80
C3	63	100	49.2	3.7	41~57	93
C4	69	100	48.8	4.0	38~59	68
C5	65	100	52.7	4.4	39~62	68
C6	73	100	47.4	4.1	37~55	68
C7	72	92	51.6	4.3	40~60	71
C8	76	50	49.1	6.0	33~58	78
C9	67	49	49.1	4.2	35~55	82
C10	74	48	50.1	4.5	40~57	75
Mean	69.2	—	49.4	4.4	33~63	76.2
±SD	—	—	1.7	—	—	7.9
P 值	—	—	0.000 ^a	—	—	0.000 ^b

注: ^a Kruskal-Wallis test; ^b pearson χ^2 test.

表 2 MLH1 数目为 0~5 的 SC 平均数目

供体	常染色体 MLH1 数目为 0~5 的 SC 平均数目					
	0	1	2	3	4	5
C1	0.2	3.4	10.8	6.0	1.4	0.0
C2	0.1	4.0	12.7	4.4	0.7	0.1
C3	0.1	3.7	12.0	4.9	1.3	0.1
C4	0.1	3.5	11.9	5.2	1.2	0.0
C5	0.0	2.8	10.5	6.6	1.8	0.2
C6	0.1	3.6	12.1	5.3	1.0	0.1
C7	0.1	3.3	10.4	6.4	1.6	0.3
C8	0.2	3.8	12.0	5.8	0.2	0.1
C9	0.1	3.4	11.5	6.0	0.9	0.1
C10	0.1	3.3	11.1	6.1	1.4	0.1
Mean	0.1	3.5	11.5	5.7	1.2	0.1
±SD	0.1	0.3	0.8	0.7	0.5	0.1
P 值	0.964	0.139	0.086	0.074	0.058	1.094

3 讨论

减数分裂是有性生殖的生物体产生单倍体生殖细胞的一种特殊分裂方式,在减数分裂 I 前期伴随 SC 的产生同源染色体完成联会,同时在这条蛋白质结构上同源染色体开始发生重组。人和小鼠 MLH1 具有 DAN 错配蛋白修复的功能^[5,6],其数目和位置可以用来标记重组位点,这大大方便了重组的分析。

本研究用免疫荧光染色技术对可育男性粗线期精母细胞减数分裂重组进行了分析,每个细胞中 MLH1 位点的平均数为 $47 \pm 3.8 \sim 52.7 \pm 4.4$,每个细胞中平均 MLH1 的数目存在显著的个体差异,这与文献报道一致^[7~9]。我们还观察到常染色体上的重组位点数目越低,其 SC 上的低重组位点比例就越高,高重组位点的比例就越低,反之亦然。这与 Sun 等^[10]的报道较为相似。Sun 等^[10]用免疫荧光染色技术对 10 例可育男性的 1 000 个粗线期精母细胞重组进行分析,发现个体间存在显著差异个体间的重组位点 $46.4 \pm 5.5 \sim 53.2 \pm 4.9$,每个细胞中平均 MLH1 的数目为 49.7,差异率为 13%。Lynn 等^[11]用同样的方法对 14 例可育男性的重组进行分析,也观察到重组频率存在个体差异 $46.2 \pm 3.3 \sim 52.8 \pm 4.8$,差异率 15%。Codina-Pascual 等^[12]报道的两例精母细胞的重组频率的个体间差异更大。理论上单个粗线期精母细胞正常范围内重组位点频率 33~74。我们测得的每个细胞中 MLH1 位点的平均数尚在理论值的正常范围之内。但

是,本研究中 MLH1 位点最大值与理论最大值间的差距表明重组位点之间存在着正干涉,这种正干涉可以使减数分裂的交换事件减少到最低程度。

年龄因素对重组频率的影响一直是一个有争议的问题。一些研究发现小鼠的卵母细胞中的重组频率伴随年龄的增加重组频率相对减少^[13~15],特别是在人 21 号染色体的端粒部位的重组频率随母方的年龄的增加而减少^[16]。现有的证据表明在哺乳动物中重组的频率不受父亲的年龄影响。Shi 等^[17]利用 PCR 分析精母细胞异染色质区重组事件,发现男性年龄对精母细胞异染色质区重组频率没有影响。Lynn 等^[11]通过置换检验分析精母细胞重组频率的个体差异,发现受试者的年龄与重组频率间的差异没有关系。Broman 等^[7]通过连锁分析生育时父亲的年龄与其所有的重组事件的关系发现,重组事件间的个体差异与父亲的年龄不存在依赖性。我们通过 Spearman 相关性分析年龄因素对常染色体及性染色体的重组频率相关性发现,年龄因素对常染色体及性染色体的重组频率均无显著关联。

对 839 条常染色体上的 SC 分析发现,发现仅有 0.4% 的常染色体上的 SC 缺乏重组位点,常染色体 SC 上缺少 MLH1 位点的比例在 0~0.4%。Sun 等^[10]运用多重免疫荧光染色发现 21 和 22 号染色体上联合复合体缺乏重组位点的比例更高。XY 染色体上有 MLH1 位点的细胞比例 68%~93%,平均为 76.2%,这与文献报道的平均为 51%~81% XY 基本一致^[7,10,12,18]。XY 染色体上未发生重组的细胞比例 7%~32%。减数分裂中交换的减少可以导致减数分裂的停滞或者非整倍体的形成^[19~21]。相关研究发现重组频率的减少是导致非梗阻性无精的一个因素^[22~24]。MLH1 位点的减少可能与不育男性精子发生停止有关,重组位点少于同源染色体正常分离的下限时可以导致男性不育的发生。在基因敲出 MLH1 和 MLH3 的小鼠中,我们发现可以激活重组检测点从而使减数分裂停止于减数分裂 I 期的粗线期^[25~27]。我们未发现细胞的整体重组频率和缺乏 MLH1 位点的 SC 频率有相关性这与 Sun 等^[10]的报道是一致的。但是 Codina-Pascual 等^[12]研究发现 XY 染色体上有 MLH1 位点的细胞比例和细胞的整体重组频率呈正相关,并且认为 XY 染色体上有 MLH1 位点的细胞的水平可以标志细胞整体的重组水平。Sun 等^[28]发现 XY 上重组事件的

减少增加非梗阻性无精子症患者非整倍体的发生, 更深入的研究发现, 父方精母细胞遗传重组显著减少可导致的 21 三体综合征^[29]。同样发现克氏综合征 (47XXY) 与精母细胞 XY 重组减少有关^[30,31]。Shi 等^[17]利用 PCR 分析人精母细胞发现拟常染色区缺乏重组事件导致 X Y 不分离的重要原因。由此可见染色体上重组的减少和缺失是引起染色体不分离的一个危险的因素, 最终导致非整倍体的发生和精子发生的停止。

综上所述, 本文对 10 可育男性的减数分裂重组事件进行了详尽的描述, 发现中国人可育男性的遗传重组频率具有显著的个体差异, 这些差异可能是由于基因的调节作用, 重组位点的分布或者是由于染色体结构的不同形成的。更好的了解重组的调节机制需要深入研究这些因素的作用并确定这些作用对减数分裂重组的影响。

参考文献(References):

- [1] Hassold T, Sherman S, Hunt P. Counting cross-overs: characterizing meiotic recombination in mammals. *Hum Mol Genet*, 2000, 9(16): 2409–2419.
- [2] von Wettstein D, Rasmussen SW, Holm PB. The synaptonemal complex in genetic segregation. *Annu Rev Genet*, 1984, 18(1): 331–413.
- [3] 刘静宇, 张传善. 褐家鼠精母细胞中联会复合体的研究. 表面铺展联会复合体的 PTA 染色. 遗传, 1995, 17(2): 17–19.
- [4] Li J, Leng M, Ma T, Yu D, Shi H, Shi Q. Cryopreservation has no effect on meiotic recombination and synapsis in testicular tissues. *Fertil Steril*, 2009, 91(Suppl.4): 1404–1407.
- [5] Tease C, Hartshorne GM, Hultén MA. Patterns of meiotic recombination in human fetal oocytes. *Am J Hum Genet*, 2002, 70(6): 1469–1479.
- [6] Baker SM, Plug AW, Prolla TA, Bronner CE, Harris AC, Yao X, Christie DM, Monell C, Arnheim N, Bradley A, Ashley T, Liskay RM. Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nat Genet*, 1996, 13(3): 336–342.
- [7] Barlow AL, Hultén MA. Crossing over analysis at pachytene in man. *Eur J Hum Genet*, 1998, 6(4): 350–358.
- [8] Sun F, Trpkov K, Rademaker A, Ko E, Martin RH. Variation in meiotic recombination frequencies among human males. *Hum Genet*, 2005, 116(3): 172–178.
- [9] Lyrakou S, Mantas D, Msaouel P, Baathalah S, Shrivastav P, Chrisostomou M, Mihalopoulos Y, Hasiakos D, Baka S. Crossover analysis using immunofluorescent detection of MLH1 foci in frozen-thawed testicular tissue. *Reprod Biomed Online*, 2007, 15(1): 99–105.
- [10] Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T, Starke H, Turek P, Ko E, Rademaker A, Martin RH. Variation in MLH1 distribution in recombination maps for individual chromosomes from human males. *Hum Mol Genet*, 2006, 15(15): 2376–2391.
- [11] Lynn A, Koehler KE, Judis L, Chan ER, Cherry JP, Schwartz S, Seftel A, Hunt PA, Hassold TJ. Covariation of synaptonemal complex length and mammalian meiotic exchange rates. *Science*, 2002, 296(5576): 2222–2225.
- [12] Codina-Pascual M, Campillo M, Kraus J, Speicher MR, Egozcue J, Navarro J, Benet J. Crossover frequency and synaptonemal complex length: their variability and effects on human male meiosis. *Mol Hum Reprod*, 2006, 12(2): 123–133.
- [13] Jagiello G, Fang JS. Analyses of diplotene chiasma frequencies in mouse oocytes and spermatocytes in relation to ageing and sexual dimorphism. *Cytogenet Cell Genet*, 1979, 23(1–2): 53–60.
- [14] Luthardt FW, Palmer CG, Yu P. Chiasma and univalent-frequencies in aging female mice. *Cytogenet Cell Genet*, 1973, 12(1): 68–79.
- [15] Speed RM. The effects of ageing on the meiotic chromosomes of male and female mice. *Chromosoma*, 1977, 64(3): 241–254.
- [16] Tanzi RE, Watkins PC, Stewart GD, Wexler NS, Gusella JF, Haines JL. A genetic linkage map of human chromosome 21: analysis of recombination as a function of sex and age. *Am J Hum Genet*, 1992, 50(3): 551–558.
- [17] Shi QH, Spriggs E, Field LL, Rademaker A, Ko E, Barclay L, Martin RH. Absence of age effect on meiotic recombination between human X and Y chromosomes. *Am J Hum Genet*, 2002, 71(2): 254–261.
- [18] Ferguson KA, Wong EC, Chow V, Nigro M, Ma S. Abnormal meiotic recombination in infertile men and its association with sperm aneuploidy. *Hum Mol Genet*, 2007, 16(23): 2870–2879.
- [19] Bascom-Slack CA, Ross LO, Dawson DS. Chiasmata, crossovers, and meiotic chromosome segregation. *Adv Genet*, 1997, 35: 253–284.
- [20] Roeder GS, Bailis JM. The pachytene checkpoint. *Trends Genet*, 2000, 16(9): 395–403.

- [21] Shi QH, Spriggs E, Field LL, Ko E, Barclay L, Martin RH. Single sperm typing demonstrates that reduced recombination is associated with the production of aneuploid 24, XY human sperm. *Am J Med Genet*, 2001, 99(1): 34–38.
- [22] Gonsalves J, Sun F, Schlegal PN, Hopps CV, Turek PJ, Greene C, Martin RH, Reijo-Pera RA. Defective recombination in infertile men. *Hum Mol Genet*, 2004, 13(22): 2875–2883.
- [23] Sun F, Kozak G, Scott S, Trpkov K, Ko E, Mikhaail-Philips M, Bestor TH, Moens P, Martin RH. Meiotic defects in a man with non-obstructive azoospermia: case report. *Hum Reprod*, 2004, 19(8): 1770–1773.
- [24] Ma S, Arsovska S, Moens P, Nigro M, Chow V. Analysis of early meiotic events and aneuploidy in nonobstructive azoospermic men: a preliminary report. *Fertil Steril*, 2006, 85(3): 646–652.
- [25] Edelmann W, Cohen PE, Kane M, Lau K, Morrow B, Bennett S, Umar A, Kunkel T, Cattoretti G, Chaganti R, Pollard JW, Kolodner RD, Kucherlapati R. Meiotic pachytene arrest in MLH1-deficient mice. *Cell*, 1996, 85(7): 1125–1134.
- [26] Edelmann W, Cohen PE, Kneitz B, Winand N, Lia M, Heyer J, Kolodner R, Pollard JW, Kucherlapati R. Mammalian MutS homologue 5 is required for chromosome pairing in meiosis. *Nat Genet*, 1999, 21(1): 123–127.
- [27] Lipkin SM, Moens PB, Wang V, Lenzi M, Shanmugarajah D, Gilgeous A, Thomas J, Cheng J, Touchman JW, Green ED, Schwartzberg P, Collins FS, Cohen PE. Meiotic arrest and aneuploidy in MLH3-deficient mice. *Nat Genet*, 2002, 31(4): 385–390.
- [28] Sun F, Mikhaail-Philips M, Oliver-Bonet M, Ko E, Rademaker A, Turek P, Martin RH. Reduced meiotic recombination on the XY bivalent is correlated with an increased incidence of sex chromosome aneuploidy in men with non-obstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod*, 2008, 14(7): 399–404.
- [29] Savage AR, Petersen MB, Pettay D, Taft L, Allran K, Freeman SB, Karadima G, Avramopoulos D, Torfs C, Mikkelsen M, Hassold TJ, Sherman SL. Elucidating the mechanisms of paternal non-disjunction of chromosome 21 in humans. *Hum Mol Genet*, 1998, 7(8): 1221–1227.
- [30] Lorda-Sanchez I, Binkert F, Maechler M, Robinson WP, Schinzel AA. Reduced recombination and paternal age effect in Klinefelter syndrome. *Hum Genet*, 1992, 89(5): 524–530.
- [31] MacDonald M, Hassold T, Harvey J, Wang LH, Morton NE, Jacobs P. The origin of 47, XXY and 47, XXX aneuploidy: heterogeneous mechanisms and role of aberrant recombination. *Hum Mol Genet*, 1994, 3(8): 1365–1371.

• 综合信息 •

2011 年第 7 期《遗传》封面说明

不完全的表观遗传重编程是造成转基因克隆动物效率低下的主要原因, 组蛋白修饰作为表观遗传修饰的一个重要部分, 可以直接影响克隆胚胎的发育和外源基因的表达情况。TSA(Trichostatin A)作为一种组蛋白去乙酰化抑制剂, 可以改变组蛋白的乙酰化水平, 促进表观遗传重编程, 提高克隆动物的效率。同时 TSA 能改变染色质结构, 使转录因子易于与 DNA 序列结合, 促进外源基因的表达。本研究确定了 TSA 处理转基因猪成纤维细胞和核移植胚胎的最佳条件, 分别为 250 nmol/L、24 h 和 40 nmol/L、24 h, 而且, 供体细胞和克隆胚胎都用 TSA 处理可以显著的提高核移植胚胎的体外发育能力, 促进外源基因表达。封面图片显示的是各时期 GFP 转基因克隆胚胎在荧光镜下的照片, 蓝色为细胞核, 绿色为 GFP。由图可见, 在胚胎发育的各个时期, 均有 GFP 蛋白的表达, 随着胚胎的发育, GFP 的表达水平逐渐降低, 且由靠近核的胞质部分逐渐向外周胞质分散。详见本期第 749~756 页孔庆然, 朱江, 黄波, 郇延军, 王峰, 石永乾, 刘仲凤, 武美玲, 刘忠华的文章“TSA 促进转基因猪体细胞核移植胚胎发育和外源基因表达”一文。

(孔庆然, 刘忠华)