

影响兔胚胎细胞核移植效率的因素

崔奎青, 刘庆友, 谢英, 韦精卫, 石德顺

(广西大学动物繁殖研究所, 南宁 530005)

摘要: 对兔胚胎细胞核移植 (NT) 的有关影响因素进行了系统研究。结果发现电场强度 $100 \text{ V}\cdot\text{mm}^{-1}$, 脉冲时间 $15 \mu\text{s}$, 电脉冲 3~4 次的融合率显著高于其它组 ($P<0.05$); 融合前激活卵母细胞, 分裂率和囊胚率显著高于融合后激活 ($P<0.05$); 当用 8~16-细胞胚胎的卵裂球作供核时, 卵裂率和囊胚率显著高于致密桑椹胚卵裂球为供核组; 当重组胚在含 3% 发情牛血清 (OCS) 的 TCM199 中培养 48 h 后, 转入含 10% FCS 的 TCM199 中继续培养, 卵裂率和囊胚率显著高于一直在 3% OCS 或 10% 胎犊血清 (FCS) 中培养的重组胚 ($P<0.05$)。将 22 枚 2~4-细胞期重组胚移入同期发情的受体母兔输卵管内, 34 d 后产下 NT 仔兔 1 只。结果表明, 电融合参数和供体胚胎的发育阶段以及受体卵母细胞的状态对 NT 效果有显著影响, 在 NT 胚胎的不同发育阶段采用不同的血清种类和浓度可提高其胚胎发育能力。

关键词: 兔; 核移植; 胚胎

Studies on the Nuclear Transfer of Rabbit

CUI Kui-qing, LIU Qing-you, XIE Ying, WEI Jing-wei, SHI De-shun

(Animal Reproduction Institute, Guangxi University, Nanning 530005)

Abstract: Factors affecting the efficiency of nuclear transfer (NT) in rabbits were examined in the present study. When $100 \text{ V}\cdot\text{mm}^{-1}$ of pulse strength and $15\mu\text{s}$ of pulse duration were employed, 3 and 4 electronic pulses resulted in significantly more cytoplasts fused with donor cells compared with 2 electronic pulses ($P<0.05$), but no significant difference was found in the cleavage rate of reconstructed embryos among the three groups ($P>0.05$). When the duration and number of electronic pulse were fixed at $15\mu\text{s}$ and 3 times, increase of pulse intensity from $100 \text{ V}\cdot\text{mm}^{-1}$ to $150 \text{ V}\cdot\text{mm}^{-1}$ and $200 \text{ V}\cdot\text{mm}^{-1}$ resulted in a significantly decrease in the cleavage rate of reconstructed embryos ($P<0.05$), although the fusion rate did not significantly differ among the three groups ($P>0.05$). Significantly more reconstructed embryos cleaved and developed to blastocysts when they were derived from donor embryos at the 8-16-cell stage, in comparison with the reconstructed embryos derived from donor embryos at the compact morulae stage ($P<0.05$), although the fusion rate was similar ($P>0.05$). Activation of cytoplasts prior to fusion increased the cleavage rate ($P<0.05$) and blastocyst development ($P<0.05$) of reconstructed embryos, but decreased the fusion rate ($P<0.05$) compared with cytoplasts activated post fusion. More reconstructed embryos developed to blastocysts when they were cultured in TCM+3%OCS at the first 48 h and then cultured in TCM199+10% FCS, in comparison with the reconstructed embryos cultured in either TCM199+10%FCS or TCM199+3%OCS ($P<0.05$). When 22 NT embryos were transferred into the oviducts of one recipient rabbit, one rabbit was delivered to birth. In conclusion, either electrofusion parameter or developmental stage of donor embryos have a significant effect on the efficiency of NT, NT embryos require different concentration of serum at their different development stages.

Key words: Rabbit; Nuclear transfer; Embryo

细胞核移植 (NT) 是获得大批同质动物的有效途径, 而兔是 NT 研究的理想模型动物, 因其繁殖性能强, 妊娠期短, 很快便可获得研究结果。兔的胚胎细

胞 NT 起步较早, Stice 和 Robl 早在 1988 年就已获得世界首批 6 只基因型完全相同的 NT 兔^[1]。随后, Collas 和 Robl 改进 NT 技术程序, 获得了 10% 的移植产仔率

收稿日期: 2004-08-18

基金项目: 国家“863”计划资助项目 (2002AA206651)

作者简介: 崔奎青 (1975-), 女, 山东菏泽人, 博士研究生, 主要从事动物胚胎工程研究工作, E-mail: kqcui@gxu.edu.cn。石德顺为通讯作者, Tel: 0771-3238709; E-mail: ardsshi@gxu.edu.cn

(230 枚重组胚胎移植后, 23 只仔兔出生), 是到目前为止效率最高的报道^[2]。虽然兔胚胎细胞克隆早已出生, 但仍然存在移植妊娠率和产仔率低等问题, 且体细胞克隆兔的问世明显晚于其它物种^[3]。特别是关于受体卵母细胞胞质状态、融合参数以及重组胚胎的培养方法对 NT 胚胎后续发育的影响报道不一^[2,4-6]。基于上述问题, 本研究对兔胚胎细胞 NT 的相关影响因素进行了系统研究, 以期为体细胞 NT 打下良好的基础。

1 材料与方 法

1.1 受体卵母细胞和供体胚胎的收集

母兔超数排卵(超排)及卵母细胞回收选择 3 月龄以上新西兰和北京大耳兔, 试验前单笼饲养 15 d。对超排母兔皮下注射促卵泡素(FSH, 中国科学院动物研究所), 总剂量为 0.7~0.8 mg/只, 分 6 次递减注射, 以人绒毛膜促性腺激素(HCG, 南京动物激素制品厂) 75 IU 诱发排卵, 然后手术法收集卵母细胞。供体胚胎来自自然交配后 42~43 h 的母兔, 回收方法同上。

1.2 试剂配制

除 TCM199 购自 Gibco 公司外其余大部分购自美国 Sigma 公司。冲卵液为 TCM199+5.0 mmol·L⁻¹ HEPES+5.0 mmol·L⁻¹ NaHCO₃+3% 发情牛血清(OCS), 卵母细胞体外培养液(CM)为 TCM199+5 mmol·L⁻¹ HEPES+26.2 mmol·L⁻¹ NaHCO₃+3% OCS 或 10% 胎犊血清(FCS)。所有培养液均添加抗生素并过滤除菌。

1.3 供体胚胎卵裂球的分离

将胚胎置于 0.2% 链霉蛋白酶中消化粘蛋白层, 当透明带变成一薄层时, 及时取出胚胎, 在 CM 中充分洗净后转入无 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 PBS 中 15~20 min。然后在倒置显微镜下用固定管(内径 40~50 μm) 轻轻反复吹吸分离单个卵裂球。将单个的卵裂球置于 TCM199+10%FCS 中备用。

1.4 受体卵母细胞的去核与激活

卵母细胞先在 0.2% 透明质酸酶中除去周围的卵

丘细胞, 然后置于含 5.0 mg·L⁻¹ CB 的操作液中, 在 Spindle view 系统辅助下(Nikon) 调整纺锤体位置, 用 Piezo-driven 系统(Piezo impact micro-manipulator, Japan) 打孔, 从打孔处吸出包含纺锤体的少量细胞质。去核的卵母细胞在 CM 中洗涤 2 次后, 先用 5 μmol·L⁻¹ 离子霉素激活处理 5 min, 然后置于含 2 mmol·L⁻¹ DMAP 的 CM 中继续处理 3 h。

1.5 注核

注核在含 1% PVA 的操作液中进行。用内径 30~35 μm 的注核管吸入 1 个卵裂球, 沿去核时在透明带上留下的孔将卵裂球置于卵周隙内并与质膜紧贴。

1.6 供体胚胎细胞与受体卵母细胞的融合

本研究所用的电融合仪为 ECM-2001。用铂金电极调整卵裂球与去核卵母细胞的接触面与电场方向垂直, 然后对其施加电脉冲。电融合参数依试验设计而定。

1.7 重组胚的体外培养

将重组胚转移到 37℃ 平衡的 CM 微滴内, 在 37℃, 5%CO₂ 和最大饱和湿度的培养箱中培养 5 d, 观察统计重组胚的发育情况。培养液每 24 h 更换 1 次。

1.8 核移植胚胎移植

将电融合后发育到 2~4-细胞的 NT 胚胎移入同期发情的受体母兔(在供体母兔诱发排卵时注射 HCG 75 IU) 输卵管内, 同时注射孕酮以降低母兔应激反应。

1.9 统计分析

所有试验组至少重复 3 次, 所得试验数据均用卡方进行统计分析, 确定差异的显著性。

2 结果与分析

2.1 电脉冲次数对融合效果的影响

从表 1 可以看出, 在 100 V·mm⁻¹, 15 μs 的电场条件下, 电脉冲 2 次的融合率显著低于 3 次。当脉冲次数增加到 4 次时, 融合率略有上升, 但融合后胚胎死亡率有升高趋势。各组之间的重组胚卵裂率无显著差异。由此表明, 当电场强度为 100 V·mm⁻¹, 15 μs 时, 3 次电脉冲较合适。

表 1 不同脉冲次数对融合效果的影响

Table 1 Effects of pulse number on the fusion and development of reconstructed rabbit embryos

| 脉冲次数 | NT 卵数 | 试验次数 | 融合数(率, %) | 死亡数(率, %) | 卵裂数(率, %) |
|--------------|------------|--------|-------------|-----------|-------------|
| Pulse number | NT oocytes | Number | Fused | Daeth | Cleaved |
| 2 | 39 | 2 | 25 (64.1)a | 0 (0)a | 20 (80.0)a |
| 3 | 1137 | 35 | 929 (81.7)b | 36 (3.2)a | 719 (77.4)a |
| 4 | 124 | 6 | 106 (85.5)b | 7 (5.6)a | 90 (84.9)a |

a: b, P<0.05 下同 The same as below

2.2 脉冲电压对融合效果的影响

如表 2 所示, 随着电压的增加, 融合率随之增加, 但各组之间融合率差异不显著。当场强大于 $150 \text{ V}\cdot\text{mm}^{-1}$ 时, 卵裂球碎裂率显著升高, 同时卵裂率下降。电激后可以看出卵裂球和卵母细胞胞质颜色变暗。这一结果表明, $100 \text{ V}\cdot\text{mm}^{-1}$, $15\mu\text{s}$, 3 次的电融合参数比较适合于兔卵母细胞与供体胚胎细胞的融合。

2.3 融合前后激活的重组胚发育能力比较

如表 3 所示, 虽然融合后 3 h 激活的重组胚融合率显著高于融合前 3 h 激活的重组胚, 但其卵裂率和囊胚发育率均显著下降 ($P < 0.05$)。由此表明, 融合前激活受体卵母细胞更有利于随后的胚胎发育。

2.4 供体胚胎的不同发育阶段对 NT 效率的影响

从表 4 可以看出, 来自 8~16-细胞胚胎和桑椹胚的卵裂球, 其 NT 后的融合率没有显著差异 ($P > 0.05$), 但致密桑椹胚卵裂球作为核供体的 NT 胚胎卵裂率和发育率则显著低于致密前的 8~16-细胞胚胎卵裂球。由此表明, 胚胎细胞的发育潜能随着发育程度的延伸而逐步下降。

2.5 培养液和培养方法对重组胚体外发育的影响

如表 5 所示, 在培养液中添加 10% 的 FCS 可显著提高 NT 胚胎的桑椹胚发育率和囊胚发育率。如果在最初的 48 h 将 NT 胚胎培养在含 3% OCS 的培养液, 然后在含 10% FCS 的培养液中继续培养, 囊胚发育率显著提高。由此可见, 兔 NT 胚胎在不同发育阶段对血清的种类和浓度具有不同要求。

表 2 不同场强对融合效果的影响

Table 2 Effects of electrical field strength on the fusion and development of reconstructed embryos

| 电压 Voltage ($\text{V}\cdot\text{mm}^{-1}$) | NT 卵数 NT oocytes | 试验次数 Number | 融合数 (率, %) Fused | 死亡数 (率, %) Death | 卵裂数 (率, %) Cleavage |
|---|---------------------|----------------|---------------------|---------------------|------------------------|
| 100 | 180 | 6 | 143 (79.4) | 4 (2.2)a | 110 (76.9)a |
| 150 | 84 | 3 | 69 (82.1) | 8(9.5b) | 39 (56.5)b |
| 200 | 76 | 3 | 66 (86.8) | 9 (11.8)b | 38 (57.6)b |

表 3 融合前后激活对兔 NT 效率的影响

Table 3 Effects of activation before and after fusion on the NT efficiency of rabbit

| 组别 Group | NT 卵数 NT oocytes | 试验次数 Number | 融合数 (率, %) Fused | 卵裂数 (率, %) Cleaved | 桑椹胚发育数 (率, %) Morulae developed | 囊胚发育数 (率, %) Blastocysts developed |
|-------------|---------------------|----------------|---------------------|-----------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| 融合前激活 ATBF | 444 | 12 | 343 (79.8)a | 288 (84.0)a | 176 (61.1)a | 97 (33.6)a |
| 融合后激活 ATAF | 110 | 4 | 100 (95.2)b | 62 (62.0)b | 25 (40.3)b | 13 (21.0)b |

ATBF: activation before fusion, ATAF: activation after fusion.

表 4 不同发育阶段供体胚胎的核移植效果

Table 4 The effect of nuclear transfer with donor cells at different development stages

| 供体胚胎 Donor embryo | NT 卵数 NT oocytes | 试验次数 Number | 融合数 (率, %) Fused | 卵裂数 (率, %) Cleaved | 桑椹胚发育数 (率, %) Morulae developed | 囊胚发育数 (率, %) Blastocysts developed |
|----------------------|---------------------|----------------|---------------------|-----------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| 8~16-细胞 8-16-cell | 853 | 28 | 651 (76.3)a | 520 (79.9)a | 260 (50.0)a | 125 (24.0)a |
| 桑椹胚 Morulae | 164 | 5 | 123 (75.0)b | 82 (66.7)b | 39 (47.6)b | 8 (9.8)b |

表 5 培养液和培养方法对 NT 胚胎体外发育的影响

Table 5 Effects of media and culture methods on the *in vitro* development of NT embryos

| 培养液与培养方法 Media & methods | NT 胚数 NT embryos | 试验次数 Number | 卵裂数 (率, %) Cleaved | 桑椹胚发育数 (率, %) Morulae developed | 囊胚发育数 (率, %) Blastocysts developed |
|-------------------------------------|---------------------|----------------|-----------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| TCM199+3%OCS | 109 | 5 | 86 (78.9)ab | 39 (45.3)b | 7 (8.0)a |
| TCM199+5%FCS | 65 | 3 | 55 (84.6)ab | 28 (50.9)ab | 5 (9.1)a |
| TCM199+10%FCS | 237 | 10 | 182 (76.8)a | 115 (63.2)a | 47 (25.8)b |
| 两步培养 ¹⁾ Two-step culture | 318 | 15 | 268(84.3)b | 161 (60.1)a | 90 (33.6)c |

¹⁾ 重组胚先在 TCM199+3%OCS 中培养 48h, 然后在 TCM199+10%FCS 中继续培养 3 d

Reconstructed embryos were cultured in TCM199+3%OCS for 48 h, and then cultured in TCM199+10%FCS for 3 d

2.6 核移植胚胎的移植结果

将电融合后的 62 枚 2~4-细胞重组胚移植到同期发情的受体母兔输卵管内, 其中一只移入 22 枚 2~4-细胞期重组胚的受体母兔妊娠, 经 34 d 妊娠后产下 1 只雌性仔兔, 其初生重为 82 g, 2 d 后体重为 125 g, 生长发育正常。

3 讨论

研究表明, 适宜的电融合参数是保证 NT 效果的前提; 融合前激活受体卵母细胞能显著提高兔胚胎细胞 NT 的效果; 供体胚胎的发育阶段对 NT 效果有显著影响, 应选择致密前的胚胎卵裂球作为核移植供体; 在核移植胚胎的不同发育阶段采用不同的血清种类和浓度可提高其胚胎发育能力。

供体胚胎卵裂球质膜的完整性对其核移植效果有显著影响, 因卵裂球破损直接影响其与受体卵母细胞的融合。常用的卵裂球分离方法是在无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 PBS 处理后, 用内径很细的玻璃管反复吹打。本研究发现, 机械法打散卵裂球时, 常导致其死亡, 并且因玻璃管太细, 毛细管现象严重, 容易造成卵裂球或胚胎的丢失, 分离效果不能保证, 所需时间长, 增加了污染机会。也有的在 PBS 中加入一定量的胰蛋白酶, 但质膜因受到酶的消化作用而损伤较大, 影响供体核的活力及其与卵母细胞的融合。本研究将去掉透明带的供体胚胎置于无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 PBS 中, 直接用内径为 50 μm 的固定管吹吸胚胎几次, 卵裂球很快散开, 几分钟即可完成, 避免了对膜的机械性损伤和其它副作用。无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} PBS 的作用是使细胞间连接松散, 但如果处理时间过长, 质膜通透性增强, 卵裂球膨胀, 注射时容易碎裂。处理时间过短, 细胞间连接松散程度不足, 又难以得到单个完整的卵裂球。研究表明, 在无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 PBS 中处理 10~15 min 为宜, 加入 0.1% 的 EDTA 能增强 PBS 效果, 加入 10% 的 FCS 对卵裂球有保护作用。

受体卵母细胞的激活亦是 NT 的一个关键环节。早在 20 世纪 70 年代就已经发现, 处于间期的细胞与处于分裂期的细胞杂交, 会导致间期核的染色质过早凝集 (premature chromosome condensation, PCC)。卵裂球细胞处于间期的时间很短, 而 S 期和 G2 期较长, 故不经同期化处理的卵裂球大多处于 S 期和 G2 期。当将 S 期和 G2 期的细胞核移入 M II 期的卵母细胞后, 由于 MPF (maturation promoting factor) 的作用, 会导致 DNA 的再次合成, 进而产生四倍体的重组胚,

中途停滞死亡。但如果移入激活后的受体卵母细胞, 则由于 MPF 的活性下降, DNA 不再复制而形成正常的二倍体重组胚。因此, 用不经同期化处理的胚胎卵裂球作为 NT 供体细胞时, 大多采用激活后的卵母细胞作为受体卵母细胞^[7]。有研究表明, 采用激活后的兔卵母细胞作为受体的 NT 胚胎融合率和发育率低于未激活卵母细胞^[2,4]。但其它多种动物胚胎细胞的 NT 研究结果则表明, 受体卵母细胞融合前激活的 NT 效果要优于融合后激活。Campbell 等先激活羊卵母细胞质, 明显提高羊 NT 胚胎的囊胚发育率^[8]。牛细胞核移植研究结果亦表明, 当用激活后的卵母细胞作核受体时, 重组胚的融合率和发育率均优于融合、激活同时进行的重组胚^[9]。Piotrowska 等^[10]也证明, 融合前激活兔卵母细胞使胚胎发育率从 15% 提高到 56%, 与本研究结果相似, 表明未经同期化处理供体细胞采用激活的卵母细胞作为 NT 受体细胞较为合适。

受体卵母细胞与供体卵裂球的融合是 NT 非常重要一步, 直接关系到 NT 的效率。电融合是目前常用的方法, 但各实验室所用的融合参数变化范围较大, 从 0.6kV·cm⁻¹ 到 3.6 kV·cm⁻¹ 不等, 并且有不少采用交流电自动排列的报道。本研究发现, 在本实验室的条件下, 不适合采用高电压。当电压高于 200 V·mm⁻¹ 时, 卵裂球和卵母细胞出现死亡崩解, 尤其卵裂球的崩解现象更为严重, 同时融合后死亡率升高。当使用交流电时, 交流电刺激后卵母细胞和卵裂球几分钟之内就出现崩解现象。在使用 100 V·mm⁻¹, 15 μs , 3 次电脉冲后, 10 min 内所有可以融合的都发生融合, 融合速度明显快于报道中的 30 min。未融合部分施加第二次电脉冲, 融合率明显下降, 与周琪等^[4]的研究结果一致。作者认为, 在保证高融合率的前提下, 应尽可能地降低电压和电场作用的时间。不适合使用交流电的原因, 可能是电场产生的严重热效应导致细胞死亡。

供体胚胎的发育阶段亦是 NT 效果的重要影响因素之一。本研究结果表明, 随着供体胚胎发育, 虽然融合率下降不明显, 但 NT 胚胎的囊胚发育率则显著下降。Prather 等^[11]的研究也得出相似的结果。随着供核分化程度增加, 其基因组被卵母细胞质调控的成功率就越低。因此, 为保证 NT 效果, 供体胚胎的发育阶段应控制在致密化之前。

重组胚的培养是 NT 的最后一个环节。胚胎在体内的发育是处于一种不断变化的微环境之中, 随着发育阶段的不同, 其所处的环境条件也在不断变化。传

统的胚胎培养均是静态培养方式, 自始至终使用同一种培养液。Chung 等^[12]用不同培养液和培养方法培养小鼠胚胎时发现, 不连续培养法的效果要好于单一培养液的效果。本研究的结果亦表明, 将重组胚先在含 3% OCS 的培养液中培养 48 h, 然后在含 10% FCS 的培养液中继续培养, 可显著提高分裂率和囊胚发育率。Tao 等^[5]培养兔早期胚胎卵裂球时发现, 培养液中加入适量血清的培养效果好于 BSA, 能明显提高囊胚发育率。但 Gardner 等^[6]指出, 血清中的某些物质可能会影响早期胚胎的发育, 致密化前胚胎在无血清培养液中发育效果更好, 但之后的发育依赖于血清。本研究结果表明, 在培养的初期, 可使用低浓度的血清, 而后期则需提高血清的浓度。

兔胚胎在 32-细胞以前(即在受精后 48 h 之前)位于输卵管, 桑椹胚之后则进入子宫。在进行兔的胚胎移植时, 亦须将相应发育阶段的胚胎移植到相应的部位。如进行输卵管移植, 可将胚胎通过伞部注入到输卵管中, 对输卵管没有损伤, 且操作容易; 而子宫移植则需在宫管连接部作一切口, 损伤较大。本研究虽取得了较高的 NT 胚胎囊胚发育率, 但为便于移植操作, 减少对受体母兔的损伤, 保证移植效果, 故仍将 2~4-细胞期的 NT 胚胎移植到输卵管中, 并妊娠产仔。

总之, 影响兔细胞核移植的因素是多方面的。Shi 等发现兔早期胚胎的甲基化和去甲基化模式与其它物种有区别, 并推断早期胚胎细胞有丝分裂错误可能是导致克隆胚胎发育率低的原因之一^[13]。将核移植技术推广向实用化, 需要更深入的探讨核移植的分子机制。

References

- [1] Stice S L, Robl J M. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biology of Reproduction*, 1988, 39: 657-664.
- [2] Collas P, Robl J M. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. *Biology of Reproduction*, 1990, 43:877-884.
- [3] Chesne P, Adenot P G, Viglietta C, Baratte M, Boulanger L, Renard J P. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature Biotechnology*, 2002, 20 (4): 366-369.
- [4] 周琪, 谭景和, 贺桂馨, 张秋明, 刘瑞祥. 家兔胚胎细胞核移植的研究. 东北农业大学学报, 1995, 26 (3):256-260.
- [5] Zhou Q, Tan J H, He G X, Zhang Q M, Liu R X. Studies on nuclear transplantation in rabbit embryos. *Journal of Northeast Agricultural University*, 1995, 26 (3):256-260. (in Chinese)
- [6] Tao T, Niemann H. Cellular characterization of blastocysts derived from rabbit 4-, 8- and 16-cell embryos and isolated blastomeres cultured *in vitro*. *Human Reproduction*, 2000, 15 (4): 881-889.
- [7] Gardner D K. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology*, 1998, 49 (1): 83-102.
- [8] Campbell K H, Ritchie W A, Wilmut I. Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: implications for deoxyribonucleic acid replication and development. *Biology of Reproduction*, 1993, 49 (5): 933-942.
- [9] Campbell K H, Loi P, Cappai P, Wilmut I. Improved development to blastocyst of ovine nuclear transfer embryos reconstructed during the presumptive S-phase of enucleated activated oocytes. *Biology of Reproduction*, 1994, 50(6): 1 385-1 393.
- [10] Wells D N, Misica P M, Tervit H R. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulose cells. *Biology of Reproduction*, 1999, 60: 996-1 005.
- [11] Piotrowska K, Modlinski J A, Korwin-Kossakowski M, Karasiewicz J. Effects of preactivation of ooplasts or synchronization of blastomere nuclei in G1 on preimplantation development of rabbit serial nuclear transfer embryos. *Biology of Reproduction*, 2000, 63 (3): 677-682.
- [12] Prather R S, Sims M M, First N L. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biology of Reproduction*, 1989, 41 (3):414-418.
- [13] Chung Y G, Mann M R, Bartolomei M S, Latham K E. Nuclear-cytoplasmic "tug of war" during cloning: effects of somatic cell nuclei on culture medium preferences of preimplantation cloned mouse embryos. *Biology of Reproduction*, 2002, 66 (4): 1 178-1 184.
- [14] Shi W, Dirim F, Wolf E, Zakhartchenko V, Haaf T. Methylation reprogramming and chromosomal aneuploidy in *in vivo* fertilized and cloned rabbit preimplantation embryos. *Biology of Reproduction*, 2004, 71(1): 340-347.

(责任编辑 林鉴非)