

水牛体细胞核移植方法比较及激活前的时间间隔对全细胞胞质内注射法核移植效果的影响

杨素芳¹, 陈自洪^{1,2}, 韦精卫¹, 陆凤花¹, 石德顺^{1*}

(1. 广西大学动物繁殖研究所, 南宁 530005; 2. 广西壮族自治区人口和计划生育研究中心, 南宁 530021)

摘要: 本研究旨在比较水牛 2 种体细胞核移植(Somatic Cell Nuclear Transfer, SCNT)方法的效果以及激活前的时间间隔对全细胞胞质内注射法(Whole-Cell Intracytoplasmic Microinjection, WCICSI)核移植效果的影响。采用水牛胎儿成纤维细胞作为供核, 比较了透明带下注核法(Perivitelline Microinjection, PM)和 WCICSI 核移植效果。另外, 试验了不同类型的供体细胞进行全细胞胞质内注射后与激活前的受体胞质的最适宜作用时间。结果, WCICSI 构建核移植重构胚的成功率显著高于 PM(87.1% vs 81.1%, $P < 0.05$), 虽然其重构胚的分裂率显著低于 PM(49.5% vs 71.8%, $P < 0.01$), 但囊胚率、核移植的效率无显著差异($P > 0.05$)。卵丘细胞和胎儿成纤维细胞在注射后 3 h 激活, 重构胚的囊胚发育率最高; 颗粒细胞注射后与激活前的最佳时间间隔可在 1.5~3 h, 但 3 h 是最佳的作用时间。结果表明, (1) WCICSI 可用于水牛体细胞核移植的研究; (2) 水牛胞质内注射供体细胞后 3 h 进行激活, 核移植重构胚的发育效果最好。

关键词: 水牛; 核移植; 透明带下注核法; 全细胞胞质内注射法; 激活前时间间隔

中图分类号: S823.83; S814.8

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)12-1735-06

Comparison of Somatic Cell Nuclear Transfer of Buffalo and the Effects of Time Interval before Activation on Nuclear Transfer by Whole-Cell Intracytoplasmic Microinjection

YANG Su-fang¹, CHEN Zi-hong^{1,2}, WEI Jing-wei¹, LU Feng-hua¹, SHI De-shun^{1*}

(1. *Animal Reproduction Institute, Guangxi University, Nanning 530005, China*; 2. *Population and Family Planning Research Centre of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China*)

Abstract: The aim of the study was to compare two methods of somatic cell nuclear transfer(SCNT), and explore the effects of time interval before activation on nuclear transfer(NT) by Whole-Cell Intracytoplasmic Microinjection(WCICSI). NT effect of Perivitelline Microinjection(PM) and WCICSI are compared, when the fetus fibroblasts were used for donor cells. And effect of activation time interval after donor cell by WCICSI on buffalo SCNT was also examined. The results showed that the embryo reconstructing efficiency by WCICSI was higher than that by PM(87.1% vs 81.1%, $P < 0.05$), but the cleavage rate of reconstructed embryos was lower in former than that in latter(49.5% vs 71.8%, $P < 0.01$). The blastocyst development rate of reconstructed embryos and the total efficiency of nuclear transfer were not significantly different each other(21.6% vs 19.3%, $P > 0.05$; 18.8% vs 15.7%, $P > 0.05$). The blastocyst development rate of reconstructed embryos derived from cumulus cells and fibroblasts were the highest when the reconstructed embryos were activated at 3 h after injection. There was no significant difference in the development of blastocyst derived from granular cells between the time interval

收稿日期: 2008-12-25

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2007AA100505; 2008AA101006)

作者简介: 杨素芳(1972-), 女, 广西兴安人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事动物繁殖学的教学和科研工作, E-mail: ysfang3511@163.com; 陈自洪(1979-), 男, 广西岑溪人, 博士生, 主要从事动物克隆研究, E-mail: chen_zihong@163.com

* 通讯作者: 石德顺, E-mail: ardsshi@gxu.edu.cn

from 1.5 to 3 h, but the best time interval before activation was 3 h. The results indicated the WCICSI method can be employed in buffalo SCNT. Development rate of reconstructed embryos is best when activation at 3 h after buffalo cytoplasmic injection of donor cells.

Key words: buffalo; nuclear transfer; Perivitelline microinjection; Whole-cell intracytoplasmic microinjection; time interval before activation

1986年, Willadsen等^[1]利用透明带下注核法(Perivitelline Microinjection, PM)在绵羊上获得核移植后代,这是细胞核移植首次在家畜上获得成功。1997年, Wilmut等^[2]进一步对该方法进行改进,成功生产了世界首例成年体细胞克隆羊——多莉,并建立起一整套绵羊体细胞核移植程序,成为全世界同行公认的哺乳动物体细胞核移植技术的基本程序。此后 Kato等^[3]和 Wells等^[4]利用该方法克隆出牛犊。胞质内注核法(Intracytoplasmic Microinjection, IM)的发展得益于精子细胞胞质注射的成功^[5-6]。Goto等^[7]研究结果证实,IM法也可以用于早期胚胎细胞核移植进行生产胚胎克隆牛。这种方法同样也可以应用到体细胞核移植。1998年, Wakayama等^[8]运用这项技术结合 Piezo 一显微操作仪获得了高达 66.9%的囊胚率。在这种核移植方法中,注入的实际上是从供体细胞获得的核胞体。核胞体是用注核管反复抽吸吹打去掉供体核细胞大部分细胞质后留下的细胞核。这种技术要求比较高,劳动强度大,可能会损伤细胞核,降低核移植的效率。Lee等^[9]通过将保持完整的体细胞直接注入到去核的猪卵母细胞中,获得了高达 37%的囊胚率和 67%的妊娠率,其中 3 头受体母猪共生下了 4 只转基因猪。他们把此方法称之为全细胞胞质内注射法(Whole-cell Intracytoplasmic Microinjection, WCICSI)。科学家们在 2004 和 2008 年分别获得了大熊猫-兔的种间克隆胚胎^[10]和猪克隆囊胚^[11]。本试验旨在利用 WCICSI 法在水牛体细胞核移植上进行研究,并探讨了水牛全细胞胞质内注射后与激活前时间间隔对核移植效果的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂的配制

本研究所用试剂除 TCM-199 购自 Gibco 公司外,其余均购自 Sigma 公司。

洗卵液和胚胎培养液为: TCM-199 + 5 mmol · L⁻¹ HEPES + 26.2 mmol · L⁻¹ NaHCO₃ + 3% OCS; 卵母细胞(COC)体外成熟培养液为: TCM199

+ 5 mmol · L⁻¹ HEPES + 26.2 mmol · L⁻¹ NaHCO₃ + 5% OCS + 0.1 μg · mL⁻¹ 促卵泡素(FSH); 所有的培养液均添加 60 mg · L⁻¹ 青霉素和 100 mg · L⁻¹ 链霉素,用 1 mol · L⁻¹ 的 NaOH 溶液将 pH 调至 7.4,并用孔径 0.22 μm 的微孔滤膜过滤消毒。

1.2 卵母细胞的收集、体外成熟和去核

卵母细胞的收集、体外成熟和去核依照文献[12]所描述的方法进行。

1.3 供体细胞的准备

1.3.1 水牛颗粒细胞的培养与准备 参考文献[13]。选一质量好的卵巢抽取上面的卵泡,检出其中的卵母细胞,把剩下的液体和颗粒细胞混合液进行离心清洗,加入含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 制成悬浮液、接种和传代培养。传至 5 代时经含 1 mL · L⁻¹ FBS 的 DMEM 处理 3 d 后用于核移植。

1.3.2 水牛胎儿皮肤成纤维细胞的培养与准备

参考文献[14],从 5 月龄左右的水牛胎儿身上采集一小块皮肤,进行消化和传代培养。传至 5 代时经含 1 mL · L⁻¹ FBS 的 DMEM 处理 3 d 后用于核移植。

1.3.3 水牛卵丘细胞的准备 选一个形态正常的卵巢抽取其上面的卵泡,检出其中的卵丘细胞—卵母细胞复合体。将卵母细胞复合体置于已经在 38 °C 预热的含 0.1% 透明质酸酶的 CM 里用捡卵吸管反复吹打,使得卵丘细胞从其上脱落。然后把含有卵丘细胞的 CM 离心后去上清,待用。

1.4 SCNT 方法

1.4.1 PM 法 以成纤维细胞作供核,采取透明带下注核法。用去核管吸取成纤维细胞注入去核卵母细胞的卵周隙中,使供核细胞与卵膜紧贴在一起,以便有利于融合。电融合参数为, 100 V · mm⁻¹、15 μs 和 3 次电脉冲。

1.4.2 WCICSI 法 参考 Lee 等^[9]的方法,并略作修改。先将供体细胞放入含有 15% 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)的杜氏磷酸缓冲液液滴中,而去核的卵母细胞放在显微操作滴,采用 45° 斜口的注射针在显微操作仪下吸取供体细胞,在显微操作滴中将完

整的供体细胞直接注入卵母细胞胞质内。

1.5 重构胚的激活和培养

将构建的重构胚用 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的离子霉素激活处理 5 min, 然后用含 $2 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二甲氨基嘌呤的 CM 培养 3~4 h, 或依据试验设计在激活前在 CM 培养 1.5、3、5 h。之后移入已准备好的颗粒细胞单层细胞微滴中进行体外培养。

1.6 试验设计

1.6.1 为了探讨 WCICSI 核移植效果, 以胎儿成纤维细胞为供体细胞, 分别采用 PM 和 WCICSI 法进行核移植。将构建的重构胚用 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的离子霉素激活处理 5 min, 然后用含 $2 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二甲氨基嘌呤的 CM 培养 3~4 h。结果以培养 24 h 的分裂率和 7 d 以后的囊胚率来评定。

1.6.2 为了探讨全细胞胞质内注射后与激活前的

时间间隔对核移植效果的影响, 分别用卵丘细胞、颗粒细胞、胎儿成纤维细胞作供核进行 WCICSI 核移植, 激活前在 CM 培养 1.5、3、5 h。结果以 24 h 分裂率和 7 d 以后的囊胚率来评定。

1.7 统计分析

所得试验数据均用卡方 (χ^2) 分析, 确定差异的显著性。

2 结果

2.1 PM 和 WCICSI 法核移植效果比较

如表 1 所示, WCICSI 法构建核移植重构胚的成功率显著高于 PM 法 (87.1% vs 81.1%, $P < 0.05$), 虽然其重构胚的分裂率极显著低于 PM (49.5% vs 71.8%, $P < 0.01$), 但囊胚率、核移植的效率无显著差异 ($P > 0.05$)。

表 1 PM 和 WCICSI 核移植效果比较

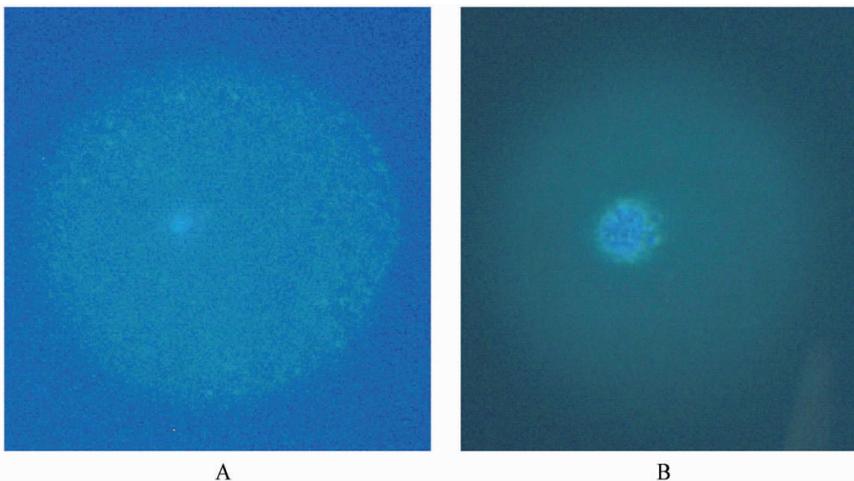
Table 1 Comparison of NT Effects of PM and WCICSI

核移植方法	NT 卵数	成功率(个数)/%	分裂率(个数)/%	囊胚率(个数)/%	效率/%
NT Method	NT oocytes	Successfully NT	Cleaved	Blastocysts	Efficiency
透明带下注核法 PM	644	81.1(522) ^a	71.8(375) ^c	19.3(101)	15.7
全细胞胞质内注射法 WCICSI	325	87.1(283) ^b	49.5(140) ^d	21.6(61)	18.8

列内具不同上标的值差异显著: a, b. $P < 0.05$; c, d. $P < 0.01$
Significant difference; a, b. $P < 0.05$; c, d. $P < 0.01$

另外, 我们还观察了水牛卵丘细胞经过 WCICSI 法移入到去核受体卵母细胞中, 供体细胞核在受体胞质中的早期形态变化。试验发现, 完整的卵丘细胞在胞质内注射 1.5 h 后, 供体细胞核发生了早

熟染色体凝集 (Premature Chromosome Condensation, PCC) (图 1A); 激活后 10 h, 供体核发生了膨大 (图 1B)。



A. 注射后 1.5 h, 核发生 PCC; B. 激活后 10 h, 核膨大
A. 1.5 h after injection, PCC; B. 10 h after activation, full nucleus swelling

图 1 完整卵丘细胞胞质内注射后核的形态变化 (200×)

Fig. 1 Changes of the nuclear shape after a cumulus was wholly microinjected into the recipient cytoplasm (200×)

2.2 激活前时间间隔对 WCICSI 核移植效果的影响

如表 2 所示,在卵丘细胞组,重构胚在激活前培养 1.5 h 的分裂率和囊胚率都显著低于激活前培养 3 和 5 h (17.2% vs 38.6%, 40.2%; 0.0% vs 17.1%, 12.4%, $P < 0.01$); 而重构胚在激活前培养 3 和 5 h 的分裂率和囊胚率没有显著差异 ($P > 0.05$),前者分裂率虽稍微低于后者但囊胚率高于后者。在颗粒细胞组,重构胚在激活前培养 1.5、3 和 5 h 的分裂率都没有显著差异 ($P > 0.05$),重构胚在

激活前培养 1.5 和 3 h 的囊胚发育率没有显著差异 ($P > 0.05$),而重构胚在激活前培养 5 h 的囊胚发育率显著低于在激活前培养 1.5 和 3 h (12.8% vs 28.4%, $P < 0.05$; 12.8% vs 27.7%, $P < 0.01$)。在胎儿成纤维细胞组,重构胚在激活前培养 1.5、3 和 5 h 的分裂率没有显著差异,但在囊胚发育率方面,激活前培养 1.5 h 显著低于激活前培养 3 h (13.6% vs 27.4%, $P < 0.05$),激活前培养 3 h 和激活前培养 5 h 无显著差异但前者高于后者 (27.4% vs 16.4%)。

表 2 激活间隔时间对 WCICSI 核移植效果的影响

Table 2 NT effects of time interval before activation on WCICSI

细胞类型 Cell type	时间间隔/h Time before activation	NT 卵数/个 NT oocytes	成活率(个数)/% Survived	分裂率(个数)/% Cleaved	囊胚率(个数)/% Blastocysts
卵丘细胞 Cumulus cell	1.5	135	94.8 (128)	17.2 (22) ^a	0.0 (0) ^c
	3	82	85.4(70)	38.6(27) ^b	17.1 (12) ^d
	5	101	96.0 (97)	40.2 (39) ^b	12.4(12) ^d
颗粒细胞 Granular cell	1.5	87	77.0 (67) ^e	56.7 (38)	28.4(19) ^g
	3	133	89.5 (119) ^f	47.9 (57)	27.7 (33) ^{gi}
	5	101	93.1 (94) ^f	60.6(57)	12.8 (12) ^{hj}
胎儿成纤维细胞 Fetus fibroblast	1.5	73	80.8 (59)	40.7 (24)	13.6(8) ^k
	3	108	88.0 (95)	54.7 (52)	27.4(26) ^{lm}
	5	94	77.7 (73)	47.9 (35)	16.4(12) ^{km}

列内具不同上标的值差异显著:a,b, c,d, i,j. $P < 0.01$; e,f, g,h, k,l. $P < 0.05$

Significant difference: a, b,c,d,i,j. $P < 0.01$; e,f,g,h,k,l. $P < 0.05$

3 讨论

3.1 WCICSI 法核移植效果

目前,细胞核移植的方法主要还是使用 Willadsen 于 1986 年改进的 PM 法^[1],使用电融合技术的核移植方法。由于此种方法重复性好,效果稳定,已成为细胞核移植的普遍性技术^[3,15-17]。然而,这项核移植技术也有自身的不足,如体细胞与卵母细胞的体积比例相差很大,融合率很低,加大了不少的工作量。1998 年,Wakayama 等^[8]采用 IM 大大提高了重构胚的生产效率,且可用于多种动物的体细胞克隆^[18-19]。人们一度认为,用 IM 进行核移植时,供体细胞必须完全破膜,如果供体细胞未完全破膜,则会导致注入的细胞核不能发生发育程序重编,进而导致卵裂率和囊胚发育率明显下降^[20]。然而 Lee 等^[9]研究表明,完整的未经破膜的猪体细胞注射到去核的卵胞质内照样能发生重编程,并获得很高的

囊胚发育率(37%)以及 4 头转基因克隆猪。本试验,以胎儿成纤维细胞为核供体细胞,比较了 WCICSI 与 PM 法的核移植效果。结果发现,WCICSI 法核移植构建重构胚的效率显著高于 PM 法 ($P < 0.05$),虽然其重构胚的分裂率极显著低于 PM 法 ($P < 0.01$),但囊胚率和核移植的效率无显著差异 ($P > 0.05$)。IM 与 PM 法的核移植的总体效率虽然没有差异^[21],但 IM 法由于反复抽吸供体细胞做成核体会增加工作量,从而降低核移植的效率。由此可见,WCICSI 法可作为构建水牛体细胞核移植重构胚的一种新方法。但是本试验结果与 Lin 等^[22]、王二耀等^[23]的不一致,前者认为注入不完整细胞膜的供核有利于核移植重构胚的核重编程,后者认为完整的卵丘细胞膜阻碍了卵胞质对体细胞核的重编程作用,造成碎裂;注入卵胞质的供体细胞膜和胞质成分影响了克隆胚的体外发育。作者认为,试验结果不一样的原因也许是由于不同物种、不

同供核所致,还有待进一步研究。

关于供体细胞核在受体胞质中的早期形态变化,目前已经研究清楚。当供体细胞移入未激活的受体胞质内后,由于卵胞质内有高浓度的成熟促进因子(Maturation Promoting Factor, MPF)使得移入的核会核膜破裂(Nucleus Membrane Break-down, NEBD)、PCC、核仁分散、核膜重新出现和类原核的形成以及原核膨大等的供体核重塑过程^[24-25],并在供体细胞核和受体胞质间出现某些蛋白质的交换。陆凤花^[26]研究表明,在水牛的PM法核移植中,融合后供体核在受体胞质中发生了NEBD和PCC,而且在0.5~1 h出现的PCC率最高(75%);重构胚激活后,染色体逐渐去凝集,在2~4 h出现新的核膜重建,并形成原核样结构,体积为原来的1~2倍;激活后6~12 h,核发生进一步膨化,体积为原来的2~5倍。如此看来,WCICSI法发生的重塑过程与PM法核移植大体相似,此法也适用于水牛的体细胞核移植。

3.2 完整供体细胞胞质内注核后与激活前时间间隔对核移植效果的影响

供体核的重塑过程对于移植核在卵质环境下的再程序化和重构胚的正常发育都是至关重要的^[27-28]。如果过早的激活重构胚,供体核与卵母细胞质中的MPF作用时间太短,融入或注入的供体核重塑就不完全,从而影响供体核的重编程,对胚胎的进一步发育不利。因此,注核后延长核质相互作用时间可能会促进核重塑和发育程序重编。Stice等^[29]发现,在牛的核移植中,供体细胞与MII期的去核卵母细胞融合后4 h再激活重构胚,对于提高核移植胚胎的发育率有很大作用。在小鼠体细胞核移植研究中也发现,间隔时间在1~3 h和3~6 h的重构胚囊胚发育率显著高于注核与激活同时进行的重构胚,并且有助于植入后胚胎的发育^[8]。在猪的体细胞核移植研究中,囊胚率随间隔时间延长呈上升趋势,2 h达到最高(11.6%),后又随时间延长而下降^[30]。其他的核移植研究也得到了相似的结果^[31-33],表明延长核质相互作用时间有利于核的重塑和再程序化。

本试验研究了水牛不同类型细胞完整注核后与激活前的受体胞质的最适宜作用时间。结果发现,卵丘细胞和胎儿成纤维细胞在注射后3 h激活,重构胚的囊胚发育率最高;在此之前的1.5 h和在此之后的5 h激活,重构胚的发育能力都下降,且1.5 h的时间间隔与3 h的时间间隔重构胚的囊胚发育率差异显

著(卵丘细胞, $P<0.01$;胎儿成纤维细胞, $P<0.05$)。同时,颗粒细胞在注射后1.5与3 h的时间间隔重构胚的囊胚发育率没有显著差异($P>0.05$),但与5 h时间间隔重构胚的发育效果显著($P<0.05$);并且,3与5 h时间间隔重构胚的囊胚发育率差异极显著($P<0.01$)。表明,颗粒细胞注射后与激活前的最佳时间间隔可在1.5~3 h,但3 h是最佳的作用时间,时间超过3 h后激活,重构胚的发育能力将会呈下降趋势。Lee等^[9]首先运用此项核移植技术表明,在猪的核移植中,卵丘细胞、颗粒细胞和耳部成纤维细胞注射后与激活前的最佳时间间隔分别为1.5、1.5、3 h。水牛的卵丘细胞与猪的卵丘细胞注射后与激活前的最佳时间间隔不同,可能是由于种间差异造成的。石德顺等^[34]认为水牛耳部成纤维细胞经IM法核移植后,至少要间隔3~4 h再激活。陆凤花^[23]的研究表明,水牛耳部成纤维细胞经PM法注核电融合后,激活前间隔3 h重构胚的发育效果最好。由此可见,水牛体细胞核移植以后,激活前的最佳时间间隔为3 h,供体细胞的类型和核移植的方法可能对此影响不大。

4 结论

综上所述,可见WCICSI法可用于水牛体细胞核移植的研究;另外,水牛胞质内注射供体细胞后3 h进行激活,核移植重构胚的发育效果最好。

参考文献:

- [1] WILLADSEN S M. Nuclear transplantation in sheep embryos[J]. *Nature*, 1986, 320(6057): 63-65.
- [2] WILMUT I, SCHNIEKE A E, McWHIR J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells[J]. *Nature*, 1997, 385(6619): 810-813.
- [3] KATO Y, TANI T, SOTOMARU Y, et al. Eight calves cloned from somatic cells of single adult[J]. *Science*, 1998, 282(5396): 2095-2098.
- [4] WELLS D N, MISICA P M, DAY T A, et al. Production of cloned lambs from an established embryonic cell line: a comparison between *in vivo*- and *in vitro*-matured cytoplasts[J]. *Biol Reprod*, 1997, 57(2): 385-393.
- [5] KIMURA Y, YANAGIMACHI R. Development of normal mice from oocytes injected with secondary spermocyte nuclei[J]. *Biol Reprod*, 1995, 53(4): 855-862.
- [6] KIMURA Y, YANAGIMACHI R. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse[J]. *Biol Reprod*, 1995, 52

- (4): 709-720.
- [7] GOTO K, TANAKA M, OOKUTSU S, et al. Production of a nuclear transfer calf by the intercytoplasmic injection of donor cells[J]. *Reprod Dev*, 1997, 43(3): 257-260.
- [8] WAKAYAMA T, PERRY A C, ZUCCOTTI M, et al. Full-term development of mice from nucleated oocyte injected with cumulus cell nuclei[J]. *Nature*, 1998, 394(6691): 369-374.
- [9] LEE J W, WU S C, TIAN X C, et al. Production of cloned pigs by whole-cell intracytoplasmic microinjection [J]. *Biol Reprod*, 2003, 69(3):995-1001.
- [10] JIANG M X, YANG C X, ZHANG L S, et al. The effects of chemical enucleation combined with whole cell intracytoplasmic injection on panda rabbit interspecies nuclear transfer[J]. *Zygote*, 2004, 12(4): 315-320.
- [11] 孔庆然, 罗一博, 田江天, 等. 全细胞胞质内注射法生产猪重构胚的研究(简报)[J]. *分子细胞生物学报*, 2008, 41(1):70-74.
- [12] 杨素芳, 石德顺, 韦精卫, 等. 水牛卵母细胞去核方法的摸索[J]. *草食家畜*, 2003, 4:19-22.
- [13] 杨素芳, 石德顺, 冯贵雪, 等. 供体细胞的培养处理方法对水牛核移植效果的影响[J]. *中国兽医学报*, 2004, 24(6):612-616.
- [14] 陈自洪, 杨素芳, 谢 英, 等. 水牛卵母细胞去核方法的比较[J]. *中国兽医科学*, 2006, 36(6):493-496.
- [15] BAGUISI A, BEHBOODI E, MELICAN D T, et al. Production of goats by somtic cell nuclear transfer[J]. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(5): 456-461.
- [16] POLEJAEVA I A, CHEN S H, VAUGHT T D, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells[J]. *Nature*, 2000, 407(6800): 86-90.
- [17] CHESNE P, ADENOT P G, VIGLIETTA C, et al. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(4): 366-369.
- [18] ONISHI A, IWAMOTO M, AKITA T, et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei[J]. *Science*, 2000, 289(5482): 1188-1190.
- [19] 郭继彤, 安志兴, 李 煜, 等. 成年耳细胞克隆山羊 (*Capra hircus*) [J]. *中国科学(C辑)*, 2002, 32(1): 77-83.
- [20] 李雪峰, 王新庄, 安志兴, 等. 不同核移植方法对牛体细胞核移植效率的影响[J]. *中国兽医学报*, 2003, 23(4):400-402.
- [21] 陆凤花. 水牛体细胞核移植的研究[D]. 南宁:广西大学, 2004.
- [22] LIN T A, TSAY C, CHEN C H, et al. Nuclear and cytoskeletal dynamics during oocyte maturation and development of somatic cell cloned pig embryos injected with membrane disintegrated donor cells[J]. *Animal Reproduction Science*, 2008, 103(1-2):107-119.
- [23] 王二耀, 于 洋, 李雪梅, 等. 完整的供体细胞膜及供体胞质对小鼠体细胞克隆胚发育的影响[J]. *遗传*, 2007, 29(2): 218-224.
- [24] SMITH L C, WILMUT I, HUNTER R H F. Influence of cell cycle stage at nuclear transplantation on the development of mouse embryos[J]. *J Reprod Fertil*, 1988, 84(2): 619-624.
- [25] SMITH S D, SOLOY E, AVERY B, et al. Nucleus remodeling in reconstructed cattle embryos[J]. *Theriogenology*, 1994, 41:298-304.
- [26] 陆凤花. 水牛体细胞核移植的研究[D]. 南宁:广西大学, 2001.
- [27] COLLAS P, ROBL J M. Relationship between nuclear remodeling and development in nuclear transplant rabbit embryos[J]. *Biol Reprod*, 1991, 45(3): 455-465.
- [28] SUN F Z, MOOR R M. Nuclear transplantation in mammalian eggs and embryos[C]. In "Cuurent Topics in Development Biology". Pedersen R A, Schatten G P ed. Academic Press, San Diego, California, 1995, 30: 147-176.
- [29] STICE S L, STRELCHENKO N S, KEEFER C L, et al. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic developemnt following nuclear transfer[J]. *Biol Reprod*, 1996, 54(1): 100-110.
- [30] KOO D B, KANG Y K, CHOI Y H, et al. *In vitro* development of reconstructed porcine oocytes after somatic cell nuclear transfer[J]. *Biol Reprod*, 2000, 63(4):986-992.
- [31] WELLS D N, MISICA P M, TERVIT H R, et al. Future opportunities in livestock production and biomedicine from advances in animal cloning[J]. *Proc N Z soc Anim Prod*, 1998, 58: 32-35.
- [32] SHIN S J, LEE B C, PARK J I, et al. A separate procedure of fusion and activation in an ear fibroblast nuclear-transfer program improves preimplantation development of bovine reconstituted oocytes[J]. *Theriogenology*, 2001, 55(8): 1697-1704.
- [33] BOOTH P J, VIUFF D, TAN S J, et al. Numerical chromosome errors in day 7 somatic nuclear transfer bovine blastocysts[J]. *Biol Reprod*, 2003, 68(3): 922-928.
- [34] 石德顺, 陆凤花, 韦精卫, 等. 水牛成纤维细胞核移植的研究[J]. *草食家畜*, 2001, (增刊):191-196.