

* 学术论文 *

利用体细胞核移植技术生产黄牛和水牛同种、异种转基因克隆囊胚*

韦精卫^{1,2} 孟凡丽¹ 韦英明¹ 杨素芳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. 北京大学深圳医院生殖医学科, 深圳 518036

摘要 以含 neo 和 GFP 基因双标记的水牛、黄牛胎儿成纤维细胞进行牛转基因体细胞核移植, 结果发现: 阿菲迪霉素可有效将胎儿成纤维细胞同步于 G0/G1 期; 以 GFP 阳性细胞进行核移植, 其卵裂率、囊胚率与对照组间无显著差异 ($P > 0.05$), 所构建的重组胚, 2-细胞阶段观察不到 GFP 的表达, 4-细胞以后 GFP 的表达逐渐增强, 在囊胚的内细胞团和滋养层细胞均可检测到 GFP 的表达, 将黄牛同种转基因克隆囊胚进行移植, 获得 1 例妊娠; 黄牛卵母细胞—水牛供核细胞构建异种重组胚囊胚率显著高于黄牛供核细胞—水牛卵母细胞构建的异种重组胚 ($P < 0.05$), 并且异种核移植重组胚中可检测到 GFP 表达, GFP 可作为异种核移植胚胎来源的一种新标记。

关键词 水牛 黄牛 绿色荧光蛋白(GFP) 转基因体细胞 种间核移植

随着“多莉”羊的诞生, 体细胞核移植于山羊^[1], 牛^[2-4], 猪^[5,6], 小鼠^[7]和水牛^[8]等动物先后取得了成功, 动物体细胞核移植技术效率有了一定提高, 这使转基因克隆成为了可能. 各国学者正结合转基因技术, 对多种动物的转基因克隆进行尝试, 并取得了长足进展. 1997年 Schnieke 获得整合人凝血因子 IX 的克隆绵羊^[9], 1998年 Cibelli 成功获得整合 neomycin 基因的克隆牛^[10]; 2001年 Keefer 等获得整合 GFP 的克隆山羊^[11]; 2006年 Lai 等培育出含有丰富“omega-3”型不饱和脂肪酸的家猪新品种^[12]. 在我国, 基因转移和克隆技术的结合也取得了一定的进展, 获得了转基因克隆牛后代^[13], 但目前转基因克隆效率仍较低, 仍需进一步进行探讨. 本实验以含 neo 和 GFP 基因双标记的胎儿成纤维细胞进行转基因体细胞核移植, 尝试以转基因克隆技术生产同种、异种转基因克隆囊胚, 为

下一步的转基因克隆水牛生产奠定基础.

1 实验材料与试剂的准备

所用试剂除 TCM199 购自 Gibco 公司外, 其余均来自 Sigma 公司. 细胞松弛素 B 和离子霉素先溶于二甲基亚砷(DMSO)中, 再用培养液稀释至工作浓度, 并使 DMSO 在培养液中最终含量低于 0.1%. 洗卵液和胚胎培养液(CM)以 TCM199 为基础液配置, 卵母细胞的成熟培养液(M): TCM199 + 26.2 mmol/L NaHCO₃ + 5 mmol/L Hepes + 5% 发情牛血清(OCS) + 2% 卵泡液 + 0.1 μg/mL FSH, 胚胎培养液(CM)为改良 TCM199 加 3% OCS, 显微操作基础(MM): TCM199 + 6 mmol/L NaHCO₃ + 5 mmol/L Hepes + 5% OCS, 所有培养液均添加 60 μg/mL 青霉素 100 μg/mL 链霉素, 用 1 mol/L 的 NaOH 溶液将 pH 调至 7.4, 并用孔径 0.22 μm 的

2007-12-10 收稿, 2008-01-28 收修改稿

* 国家“八六三”高科技研究发展计划(2007 AA 100505)、广西青年科学基金(桂科青 0640008)和广西大学博士启动基金(DD150034)资助

** 通信作者, E-mail: ardsshi@gxu.edu.cn; weijw99@sina.com

©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

微孔滤膜过滤消毒。

阳离子脂质体(LipofectaminTM 2000)为 Invitrogen 公司产品; pEGFP 质粒由中国农业大学李宁教授馈赠; D-MEM/F-12 购自 Gibco 公司; 胎牛血清(FBS)购自 Hyclone 公司; G418 购自 promega 公司。

1.1 供体细胞的准备

1.1.1 牛胎儿成纤维细胞的培养 3—5 月龄的黄牛胎儿取自南宁市屠宰场, 将整个子宫运回实验室, 取出胎儿, 以 PBS 和 75% 酒精清洗数次后取胎儿皮肤组织样, 剪碎成 1 mm³ 左右的小块, 以 DMEM 清洗两次后植块于 50 mL 的细胞培养瓶中, 倒置培养瓶, 待组织块贴壁牢固后翻转细胞培养瓶, 加入 DMEM+10% FBS, 于 38.5 °C, 5% CO₂ 的培养箱培养 6—7 d, 隔天换一次培养液, 等细胞生长汇合后, 以 0.25% trypsin 消化传代 2—3 次, 并以 DMEM+20% FBS+10% DMSO 冻存。

1.1.2 牛胎儿成纤维细胞的转染和筛选 采用脂质体介导的方法将质粒 pEGFP 转染到牛胎儿成纤维细胞, 即按照试剂盒 LipofectamineTM 2000 所附说明书进行转染: 将传代 1 次的细胞接种到 35 mm 培养皿, 待其在无抗生素的细胞培养液中汇合 50%—70% 时进行转染, 每个平皿加入 200 μL 含 4 μg pEGFP 和 10 μL 脂质体, 并预先在室温孵育 20 min 的无血清 DMEM, 接着轻轻晃动平皿, 混匀转染培养液, 在室温下静置 15—45 min 之后, 混合液中加入 0.8 mL D-MEM/F-12 混匀, 将混合好的 1 mL DNA/脂质体混合液加入到细胞表面, 放入 38.5 °C, 5% CO₂, 饱和湿度下培养 6—8 h, 再换用含 20% FBS 的高糖 DMEM 培养。待细胞汇合 90% 时, 细胞消化后转细胞培养瓶, 加入含 0.5 mg/mL G418 的细胞培养液连续筛选 10 d, 之后再无 G418 的细胞培养液继续培养, 接下来以 DMEM+20% FBS+10% DMSO 冻存。

1.1.3 阳性牛胎儿成纤维细胞的制备 待传代 5—10 次的细胞生长至 80% 汇合时, 开始血清饥饿处理, 即把细胞培养液中 FBS 浓度从 20% 降至 0.5% 继续培养 2—5 d, 再按常规方法消化, 离心, 最后加 1 mL 显微操作液重悬细胞沉淀备用。倒置显微镜下打开荧光, 选择蓝光激发呈绿色的细胞用作供体

水牛胎儿成纤维细胞的培养, 传代, 外源基因转染及阳性细胞筛选同 1.1.1, 1.1.2, 1.1.3。

1.2 受体卵母细胞的准备

从屠宰场收集中国沼泽型水牛、黄牛的卵巢, 并将其置于含有 25—30 °C PBS 的保温瓶内在 4 h 内送回实验室, 然后, 用 10 mL 的注射器和 12 号针头穿刺抽吸卵巢上面 2—6 mm 卵泡内的卵母细胞, 将那些具有完整卵丘细胞层和均匀细胞质的卵母细胞用来进行成熟培养, 经挑选的黄牛、水牛卵母细胞经用 CM 清洗两次后, 置于含 1.5 mL MM 的玻璃培养皿中, 在 5% CO₂ 及温度为 38.5 °C 的培养箱中培养 20—22 h。体外成熟后的卵母细胞用 0.2% 的透明质酸酶去掉其周围的卵丘细胞, 将含有极体的卵母细胞用 Hoechst 33342 (1 μg/mL) 染色 15 min, 然后置于含 5 μg/mL 细胞松弛素的 MM 中, 在显微操作仪下用外径为 30 mm 的去核针吸取极体及其周围约 1/4 的细胞质进行去核。吸取的细胞质在荧光显微镜下观察是否含有极体和中期染色体, 以保证去核率。

1.3 卵母细胞的核移植与激活

用于核移植的供体细胞为最终传代后至少培养 5 d 的成纤维细胞。部分成纤维细胞在核移植前, 用 DMEM+0.5% FBS+0.2 μg/mL 阿菲迪霉素 (Aphidicolin, APD) 的培养液培养 1 或 2 d。注核前, 供体细胞用 0.2% 的胰蛋白酶消化制成细胞悬液, 然后置于 MM+8% 聚乙烯吡咯烷酮+0.2 mmol/L 蔗糖的 100 μL 微滴中。用内径为 10 μm 的注核针反复抽吸供体细胞, 使其质膜破裂, 而后转移到另一滴含有去核卵母细胞的 100 μL MM+0.1% 聚乙烯乙醇微滴中, 将供体细胞核直接注入到卵母细胞质中。卵母细胞注核后, 约在成熟培养后的 28 h 用 5 μmol/L 的离子霉素 (Ionomycin, ION) 激活处理 5 min, 然后在含有 2 mmol/L 6-DMAP 的 CM 中培养 3 h。

1.4 核移植胚胎的体外培养

经激活处理后, 将重组胚转移到含有颗粒细胞单层细胞的 30 μL CM 培养微滴中, 在 38.5 °C, 5% CO₂ 的培养箱中进行体外培养, 颗粒细胞单层细胞在移入 2 d 前制备, 移入时, 换入新鲜培养液, 移入后, 隔天换液 1 次, 重组胚培养 2 d 后, 检查其

分裂率, 培养 6 d 后记录囊胚发育情况.

1.5 阿菲迪霉素对供体细胞周期同步化的效果及流式细胞仪分析结果

以 10^5 个/mL 的浓度接种第 3 代的牛胎儿成纤维细胞, 待其生长至对数生长期 (80%—85% 汇合) 时, 分别对细胞进行不同的处理. 吸出原 DMEM (含 10% FBS) 培养液, 加入含 0.5% FBS + 0.2 μ g/mL 阿菲迪霉素或 10% FBS + 0.2 μ g/mL 阿菲迪霉素的 DMEM 培养液, 间隔 24 h 后依次更换相对应的 DMEM 培养液, 共处理 3 d, 用含 0.02% EDTA 的 0.25% 胰酶消化对数生长期的传代细胞和经各实验处理的细胞, 收集于 5 mL 的离心管中, 用 PBS 洗涤 2 次 ($1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min) 去上清液, PBS 调节细胞浓度为 1.5×10^7 /mL, 把 15 mL 95% 乙醇 (-20°C 预冷) 加入到 5 mL 的待测细胞悬液中, 使其终浓度为 70%, 立即振荡混匀, 冰浴 20—30 min, 分析时, 用 50 μ g/mL 碘化丙啶 (PI) 荧光染色 30 min, 然后上流式细胞仪检测 G0, G1, S, G2, M 各期的细胞比例.

1.6 统计分析

细胞周期检测的结果均用 SAS 软件单因素方差分析 (one way ANOVA) 统计分析, 显著性差异以 $P < 0.05$ 为标准. 除细胞周期数据分析用 SAS 软件单因素方差分析外, 其他所得数据均用 χ^2 精确检验确定差异的显著性.

2 结果

2.1 阿菲迪霉素处理对成纤维细胞的细胞周期分布影响

如表 1 所示, 经 0.5% FBS + 0.2 μ g/mL APD, 10% FBS + 0.2 μ g/mL APD 的 DMEM 培养液处理 3 d 的成纤维细胞 G0+G1 细胞比例分别达 80.77% 和 82.93%, 两组细胞间差异不显著 ($P > 0.05$).

表 1 阿菲迪霉素处理对成纤维细胞的细胞周期同期化效果 ($n=3$)

处理组	G0+G1/ %	S/ %	G2+M/ %
APD+0.5% FBS 3d	80.77±2.40	7.33±1.77	11.90±0.79
APD+10% FBS 3d	82.93±2.3	6.94±1.37	10.13±0.95

结果表明, 0.2 μ g/mL 阿菲迪霉素可有效调控成纤维细胞的细胞周期.

2.2 转染外源基因 (GFP) 胎牛成纤维细胞的核移植效果

表达 GFP 的牛胎儿成纤维细胞通过显微注射的方法构建同种重组胚, 结果如表 2 所示, GFP 阳性胎儿成纤维细胞构建重组胚卵裂率和囊胚发育率与对照组无显著差异 (65.6% vs 67.1%; 12.5% vs 13.2%, $P > 0.05$), 并将 6 枚 GFP 表达的囊胚移植到 2 头处于同期的受体奶牛体内, 胚移植后 60 d 进行直肠检查, 结果发现有一头受体奶牛妊娠. 研究结果初步表明, 以 GFP 转染的胎儿成纤维细胞进行核移植, 可支持核移植重组胚的早期发育, 供体细胞的转基因与否对牛克隆胚胎的体外早期发育影响不明显, 转基因克隆囊胚移植后可进一步进行发育.

表 2 转染外源基因 (GFP) 胎牛成纤维细胞核移植效果

供体细胞	培养数	卵裂数/ %	囊胚数/ %	妊娠情况
GFP 阳性胎牛成纤维细胞	64	42(65.6%)	8(12.5%)	1/6(16.7%)
对照组	76	51(67.1%)	10(13.2%)	0

2.3 GFP 阳性细胞构建的同种重组胚外源基因表达的观察

以表达绿色荧光蛋白的牛胎儿成纤维细胞通过显微注射的方法构建同种重组胚, 并在荧光显微镜下, 以蓝光激发, 观察构建的同种重组胚外源基因 (GFP) 表达情况. 结果发现, 经过 0.25% 的胰蛋白酶消化后, 选择表达绿色荧光的体细胞 (图 1 所示), 构建的重组胚在 2-细胞阶段观察不到绿色荧光蛋白的表达, 在 4-细胞后可观察到绿色荧光蛋白表达, 绿色荧光蛋白在每个卵裂球中均匀表达 (图

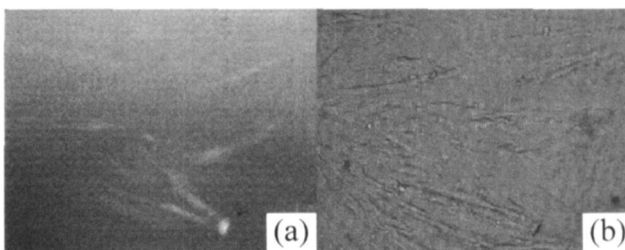


图 1 GFP 转染 24—48 h 后阳性细胞

(a) (蓝光激发)(200 倍); (b) (常光下)(200 倍)

2), 随着胚胎发育, 其荧光强度有所增强, 并在囊胚阶段的内细胞团部位、滋养层细胞中都检测到绿色荧光蛋白的表达(图3)。

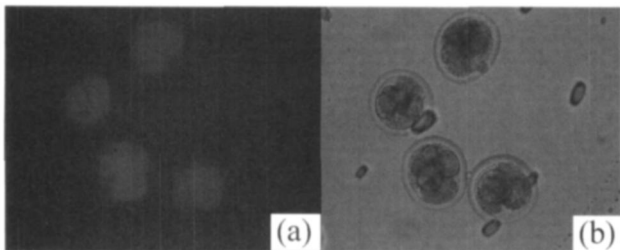


图2 GFP表达的4-细胞期重组胚

(a) (蓝光下, 200倍); (b) (常光下, 200倍)

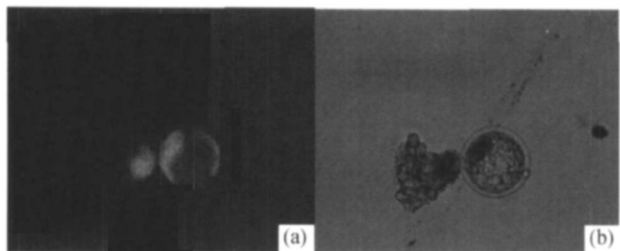


图3 GFP表达的重组囊胚

(a) (蓝光下, 200倍); (b) (常光下, 200倍)

2.4 异种(水牛—黄牛)转基因体细胞核移植效果及囊胚中外源基因表达

以表达绿色荧光蛋白的黄牛、水牛胎儿成纤维细胞通过显微注射的方法构建异种重组胚, 结果如表3所示, 水牛供核—黄牛受体胞质异种重组胚的囊胚率显著地高于黄牛供核—水牛受体胞质组(11.2% vs 1.5%, $P < 0.05$)。部分发育到囊胚的重组胚中观察到外源基因的表达(图4)。研究表明, 以表达绿色荧光蛋白的黄牛、水牛胎儿成纤维细胞构建异种重组胚, 外源基因可在异种胞质中进行表达。

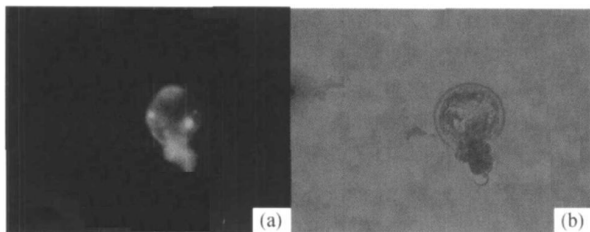


图4 GFP表达的水牛—黄牛异种重组囊胚

(a) (蓝光下, 200倍); (b) (常光下, 200倍)

表3 异种(水牛—黄牛)转基因体细胞核移植效果^{a)}

异种胚胎来源	培养数	卵裂数/ %	囊胚数/ %	囊胚外源基因表达数/ %
黄牛转基因供核、水牛受体胞质	65	43(66.2%)	1(1.5%)*	0
水牛转基因供核、黄牛受体胞质	98	71(72.4%)	11(11.2%)	4(36.4%)

a) 列内 * 上标有显著差异, $P < 0.05$ 。

3 讨论

世界上第一只体细胞核移植动物是用处于G0期(静止期)的绵羊乳腺上皮细胞作供体获得的, Wilmut等^[14]认为处于G0期细胞可发生发育程序重编, 并发育到后期。此后, 供核细胞和受体卵母细胞的细胞周期协调性在核移植中的作用引起了人们的广泛关注, 许多研究也证实供体细胞处于G0/G1状态下有利于核移植重组胚发育^[15, 16], 研究人员也一直在寻找使供体细胞静止于G0/G1期的有效方法。目前一般使用血清饥饿法以及一些抑制DNA合成或微管形成的药物来进行细胞周期调控。阿菲迪霉素是一种DNA合成抑制剂, 可与DNA聚合酶 α 结合, 进而抑制DNA的合成, 使之处于G1期^[17]。Kues等^[18]进行猪的成纤维细胞血清饥饿培养48h后, 再以 $6\mu\text{mol/L}$ APD(含10% FBS)的DMEM培养14h, 经流式细胞仪进行细胞周期检测, 有 $(81.9 \pm 4.9)\%$ 的细胞处于G1/S期。结果表明, 以0.5% FBS+0.2 $\mu\text{g/mL}$ 阿菲迪霉素或10% FBS+0.2 $\mu\text{g/mL}$ 阿菲迪霉素的DMEM培养液处理成纤维细胞3d, G0/G1细胞比例分别达80.77%和82.93%, 说明阿菲迪霉素可有效进行胎儿成纤维细胞的细胞周期调控。在培养液中同时存在阿菲迪霉素和血清时, 培养液中的血清浓度对细胞周期的调控影响甚小, 不足以改变阿菲迪霉素对细胞周期的主调控作用。

以转GFP胎儿成纤维细胞进行核移植研究, GFP阳性胎儿成纤维细胞所构建重组胚的卵裂率、囊胚发育率与未转染外源基因的对照组间差异不显著, 这也初步表明, 本研究中脂质体介导的绿色荧光蛋白转染体细胞, 经G418短期筛选后获得的阳性细胞, 可用于核移植研究, 并可获得较好的重组胚发育率。此结果与龚国春等^[19]以转基因颗粒细胞

进行核移植的结果一致, 他们发现转基因与未转基因颗粒细胞作为核供体用于核移植, 二者重组胚胎的融合率, 分裂率, 囊胚率和妊娠率均没有显著差异. 但与徐营^[20]等的研究结果有所不同, 在研究中, 转基因体细胞所构建的重组胚体外发育能力降低, 其认为可能与转基因成纤维细胞经过 G418 筛选后, 细胞的生长状态等有所改变有关. 近期相关研究表明, 经过长时间药物筛选所获得的转基因细胞的体细胞克隆效率明显降低^[21, 22]. 实验中, 为了尽可能减少长时间药物筛选对转基因细胞带来的风险, 转基因阳性细胞未进行单克隆的挑选, 而将所有的克隆点混合培养. 使用时, 将转基因体细胞消化后, 做成供核操作微滴, 在荧光显微镜的蓝光激发下, 利用显微操作针挑选瞬时转染的 GFP 阳性细胞进行核移植. 此细胞只经过短时间、高浓度 G418 筛选, 细胞遗传物质、形态和生长状态未发生改变, 从而 GFP 阳性细胞核移植效果未有显著影响, 获得与对照组相近的核移植效果, 但其对胚胎后期发育是否有影响, 仍需进一步研究.

在进行转基因克隆研究的同时, 也探讨了同种转基因体细胞构建重组胚发育各阶段外源基因表达情况. 结果发现, GFP 阳性细胞注入受体胞质后, 由于牛卵母细胞中脂肪滴较多, 卵子颜色较深, 观察不到 GFP 基因表达. 激活后并进行培养, 2-细胞阶段仍观察不到绿色荧光蛋白的表达, 在 4-细胞后可观察到绿色荧光蛋白在重组胚进行表达. 囊胚阶段, 在内细胞团, 滋养层细胞中都可检测到绿色荧光蛋白的表达. Roh 等^[23]在应用表达 GFP 的体细胞进行同种克隆牛的研究中也发现相同的结果, 其在合子核期和 2-细胞早期未发现绿色荧光蛋白的表达, 而在 2-细胞晚期可以检测到 GFP 的表达, 牛的合子核基因的表达一般认为是在 8—16 细胞阶段^[24], 但也有人认为在 2-细胞阶段即已经开始由母源基因向合子核基因表达的转变^[25, 26]. 实验中, 我们发现同种克隆胚胎在发育至 4-细胞阶段可观察到供核中的 GFP 基因开始表达, 这就意味着 4-细胞阶段的重组胚合子核基因已开始表达. 与牛的合子核基因的表达一般认为是在 8—16 细胞阶段的说法有相违背的地方, 因此认为牛重组胚合子核基因的表达可能存在着一种时间程序, 可能不是所有的基因都同时开启表达, 有些基因可能合子核基因表达

开始的时间较早; 另外也可能由于体细胞核移植中的程序化不完全, 而导致基因表达与正常的胚胎发育不同. 具体情况如何, 尚需要进一步的深入研究.

本研究尝试以 GFP 阳性细胞进行异种核移植, 构建黄牛胞质—水牛供核、水牛胞质—黄牛供核异种重组胚胎, 结果发现第一组异种重组胚发育效果好于后者, 并获得了 11.2% 的囊胚发育率. 为了证明此异种核移植囊胚来源于水牛供核, 在荧光显微镜下观察异种核移植囊胚中 GFP 基因表达情况, 发现有 4 枚黄牛胞质—水牛供核异种核移植囊胚中有 GFP 表达, 从而确定此异种核移植囊胚来源于 GFP 表达阳性水牛成纤维细胞, 因此也认为以黄牛胞质—水牛供核的模式进行水牛异种核移植研究是可行的, 黄牛卵母细胞可支持异种重组胚完成早期发育. 以表达 GFP 的阳性体细胞构建的异种核移植重组胚, 在发育过程中可以观察到 GFP 的表达, 可以简化异种核移植胚胎的鉴定工作, 从而也为黄牛、水牛异种核移植研究的深入开展提供新的方法和手段, 为异种克隆的研究找到一种便捷的判定方法, 这有助于异种核移植的研究.

GFP 作为一种可见的基因转移标记已广泛用于转基因动物的研究与生产中, 但对于它是否会影响转基因克隆胚胎的发育研究者们观点不一. Roh 等^[23]的研究显示 GFP 不会影响到转基因克隆胚胎的发育, 而 Arat 等^[27]的研究结果则相反. 本文将 6 枚同种转基因体细胞克隆囊胚移植到处于同期的受体奶牛体内, 移植 60d 后, 进行妊娠检查, 结果在移植的两头受体母牛中, 发现有一头已妊娠, 表明 GFP 阳性细胞构建的重组胚移植后可以进一步进行发育, 绿色荧光蛋白不会影响到转基因克隆胚胎的体内早期发育.

参 考 文 献

- 1 Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, et al. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Na Biotechnol*, 1999, 17: 456—461
- 2 Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, et al. Six cloned calves produced from adult fibroblast cell after long-term culture. *Proc Natl Acad Sc USA*, 2000, 97: 990—995
- 3 Shiga K, Fujita T, Hirose K, et al. Production of calves by transfer of nuclei from cultured somatic cells obtained from Japa

- nese black bulls. *Theriogenology*, 1999, 52: 527—535
- 4 Wells DN, Misica PM, Tervit HR, et al. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulose cells. *Biol Reprod*, 1999, 60: 996—1005
 - 5 Bethausen J, Forsberg E, Augenstein M, et al. Production of cloned pigs from *in vitro* systems. *Na Bio technol*, 2000, 18: 1055—1059
 - 6 Polejaeva IA, Chen Sh H, Vaught TD, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 2000, 407: 8690
 - 7 Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 1998, 394: 369—374
 - 8 Shi DS, Lu FH, Wei YM, et al. Buffalos (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. *Biology of Reproduction* 2007; 77: 285—291
 - 9 Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, et al. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 1997, 278: 2130—2133
 - 10 Cibelli JB, Stice S T, Golueke PJ, et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 1998, 280: 1256—1258
 - 11 Keefer CL, Baldassarre H, Keyston R, et al. Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and nontransfected fetal fibroblasts and *in vitro*-matured oocytes. *Biol Reprod*, 2001; 64(3): 849—856
 - 12 Lai L, Kang JX, Li R, et al. Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. *Nat Biotechnol*, 2006; 24(4): 435—436
 - 13 Gong G, Dai Y, Fan B, et al. Birth of calves expressing the enhanced green fluorescent protein after transfer of fresh or vitrified/ thawed blastocysts produced by somatic cell nuclear transfer. *Mol Reprod Dev*, 2004; 69(3): 278—288
 - 14 Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385: 810—813
 - 15 Beyhan Z, Mitaljpova M, Chamy T, et al. Developmental potential of bovine nuclear transfer embryos produced using different types of adult donor cells. *Theriogenology*, 2000, 53: 210
 - 16 Ono Y, Shimozawa N, Ito M, et al. Cloned mice from fetal fibroblast cells arrested at metaphase by serial nuclear transfer. *Biol Reprod*, 2001, 64(1): 44—50
 - 17 Techakumphu M, Adenot P, Chense P, et al. Viability of bovine blastomeres after metaphase arrest with nocodazole. *Theriogenology*, 1993, 39: 328
 - 18 Kues WA, Anger M, Carnwath JW, et al. Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts: Effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors. *Biol Reprod*, 2000, 62(2): 412—419
 - 19 龚国春, 戴蕴平, 樊宝良, 等. 以不同类型的转基因细胞为核供体生产牛的转基因克隆胚胎. *中国科学, C辑*, 2003, 33(6): 532—538
 - 20 徐 营. 兔卵胞质为受体的异种核移植研究. 南京农业大学博士论文, 2002
 - 21 Ogura A, Inoue K, Ogonuki N, et al. Production of male cloned mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature Sertoli cells. *Biol Reprod*, 2000, 62(6): 1579—1584
 - 22 Zakhartchenko V, Mueller S, Alberio R, et al. Nuclear transfer in cattle with non-transfected and transfected fetal or cloned transgenic fetal and postnatal fibroblasts. *Mol Reprod Dev*, 2001, 60(3): 362—369
 - 23 Roh S, Shim H, Hwang W, et al. *In vitro* development of green fluorescent protein(GFP) transgenic bovine embryos after nuclear transfer using different cell cycles and passages of fetal fibroblasts. *Reprod Fertil Dev*, 2000, 12: 1—6
 - 24 Barnes FL, Eyestone WH. Early cleavage and the maternal Zygotic transition in bovine embryos. *Theriogenology*, 1990, 33: 149—152
 - 25 Hyttel P, Viuff D, Avery B, et al. Transcription and cell cycle dependent development of intranuclear bodies and granules in two-cell bovine embryos. *J Reprod fertile*, 1996, 108: 263—270
 - 26 Memili E, Dominko T, First NL. Onset of transcription in bovine oocytes and pre-implantation embryos. *Mol Reprod Dev*, 1998, 51: 36—41
 - 27 Arat S, Gibbons J, Ruzicidlo SJ, et al. *In vitro* development of bovine nuclear transfer embryos from transgenic clonal lines of adult and fetal fibroblast cells of the same genotype. *Biol Reprod*, 2002, 66(6): 1768—1774