

家猫的胚胎工程*

文端成 刘忠华 陈大元**

(中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室 北京 100080)

摘要: 家猫是惟一种没有被列为珍稀或濒危的猫科动物,通过家猫的胚胎工程研究,对保护其它濒危猫科物种有重要的借鉴意义。本文描述了家猫的一般生殖特点,着床前的胚胎在体内的发育概况;综述了近年来对家猫的超数排卵、卵母细胞的体外成熟、体外受精、胚胎的体外培养、胚胎移植、冷冻保存和胚胎克隆等方面的研究进展。

关键词: 家猫;超数排卵;体外成熟;体外培养;胚胎移植

中图分类号: Q492 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2002)03-97-06

Embryo Engineering in Domestic Cat

WEN Duan-Cheng LIU Zhong-Hua CHEN Da-Yuan

(Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences Beijing 100080, China)

Abstract: Domestic cat is the only one that is not classified as rare or endangered species in feline. To conserve these endangered feline species, it is helpful to study the embryo engineering of domestic cat as a model animal. This paper describes the general reproductive character, the outline of the preimplantation embryo development, and reviews recent advances in superovulation, *in vitro* maturation (IVM), *in vitro* fertilization (IVF), *in vitro* embryo culture (IVC), embryo transfer (ET), embryo cryopreservation and embryo cloning in domestic cat.

Key words: Domestic cat; Superovulation; *In vitro* maturation (IVM); *In vitro* culture (IVC); Embryo transfer (ET)

在现有的 37 种猫科动物中,除家猫外,其它 36 种都被列为珍稀或濒危物种,家猫是该科动物中较为特殊的一种动物,它容易饲养,并可大量繁殖。家猫不仅能成为人们喜爱的宠物,而且在生物医学研究中,也是一种十分重要的实验动物,有 36 种人类疾病是以家猫作为动物模型;由于大多数其它猫科动物都濒临灭绝,因而家猫在保护生物学研究上,是极具价值的模型动物和研究对象。现已证明,用于家猫的体外成熟-体外授精-胚胎移植(IVM-IVF-ET)技术也适合于其它猫科动物,如豹猫(Leopard cat),猎豹(Pumas),虎,印度沙漠猫(Indian desert cat)等,家猫还可作为多种野生小型猫科动物的胚胎受体,进行借腹怀胎,用以拯救濒危猫科物种^[1]。对家猫的生殖技术研究,对保护野生濒危猫科物种具有极为重要的借鉴意义。本文将对家猫的胚胎工程研究进行综述。

1 家猫的生殖特点

在自然状态下,家猫是季节性多次发情动物,每年可以生产 2~3 胎,每胎 1~5 只小猫。在白昼时间变长时家猫开始进入发情期,夜晚时间变长时则进入休情期。在实验室中,可以通过控制光照时间来控制猫的发情期,如把光照时间控制在每天 12~14 h,则可以减少甚至消除猫的休情期^[1]。家猫的季节性发情程度是受家猫的品种影响的,长毛猫比短毛猫更具有季节性

* 科技部攀登专项项目资助(No:95-专-08);

** 通讯作者;

第一作者介绍 文端成,男,38岁,在读博士生;研究方向:生殖生物学。

收稿日期:2001-05-15,修回日期:2001-09-03

发情的特点^[2]。家猫的发情周期一般为 21 ~ 23 d, 发情期为 5 ~ 7 d, 发情间期平均为 16 d。

家猫是典型的诱导排卵动物, 只有通过交配刺激才能排卵。交配刺激 LH 的释放, LH 促进卵泡排放。人工刺激猫的子宫颈或给予外源 LH 也可以诱导排卵。家猫在交配刺激 24 ~ 30 h 后, 开始排卵^[3], 但有些报道称, 交配刺激后要 48 h 后才能排卵^[4,5]。最近的研究显示, 在群养的雌性家猫中, 经常会出现未交配而排卵的现象, 现不清楚这种排卵现象是否是自发性的或是由于物理性的诱导而产生的^[6,7]。

正常情况下, 家猫平均每次排卵 5 ~ 6 枚, 受精后有 70% ~ 80% 的胚胎可以着床^[8]。家猫在交配后 64 h, 大部分受精卵完成第一次卵裂, 76 h 后, 胚胎发育到 5 ~ 8 细胞, 100 h 后, 发育到 9 ~ 16 细胞, 124 h 进入桑椹胚期, 这时胚胎进入子宫中, 148 h 后, 部分胚胎已发育成为囊胚^[8]。在交配后 12 d, 胚胎从透明带中逸出, 到 13 d 胚胎开始着床^[9]。家猫的孕妊期为 62 ~ 71 d, 平均为 66 d^[10,11]。猫的胚胎在两侧子宫中具有迁移的能力, 可从一侧子宫迁移到另一侧子宫, 使胚胎在两侧子宫中进行均匀分配和着床, 提高胚胎的存活率^[8,12]。

2 家猫的超数排卵

家猫的卵泡可被外源促性腺激素如卵泡刺激素 (FSH)、孕马血清 (PMSG)、马绒毛膜促性腺激素 (eCG) 等诱导发育, 并且能用外源的 GnRH 或 hCG 诱导排卵。目前, 对家猫进行人工超数排卵方案主要有 PMSG/hCG^[13-15], FSH/hCG^[16,17] 和 eCG/hCG^[18,19] 等 3 种。从目前的资料来看, 3 种超排方案以 eCG/hCG 的超排效果较好。

PMSG 较早被用于调控猫的繁殖^[20], 后来被用于猫的超数排卵, 现仍然有不少的研究者使用 PMSG 对猫超排。Goodrowe 等给猫单次肌肉注射 PMSG 150 IU, 然后分别在 72 h、80 h 后肌肉注射 hCG 100 IU 或 200 IU, hCG 注射后 25 ~ 27 h 用腹腔镜从卵巢上的卵泡中取卵, 平均每只猫有成熟卵泡 (11.7 ± 0.7) 个, 取得卵子 (10.7 ± 0.7) 枚。他们在实验中发现, hCG 的剂量和与 PMSG 的间隔时间对得卵率没有影响^[21]。

FSH 也能诱导家猫的卵泡进行发育。Verstegen 用超纯化的、完全无黄体激素活性的猪卵泡刺激素 (pFSH) 对家猫进行超排, 连续 5 天注射总量分别为 2.5, 10, 30 IU 的 pFSH, 然后, 再连续 2 天注射 hCG 诱导排卵, 并与公猫交配, 一个星期后检查卵巢上未排的卵泡和排卵点。在 9 只未成年母猫中, 8 只母猫的卵巢上有 20 ~ 90 个较大的卵泡, 但只有 2 只有排卵点; 在成年母

猫中, 所有猫的卵巢都有反应并且排卵, 每只猫有 3 ~ 40 个大的卵泡, 6 ~ 35 个黄体, 卵泡数和黄体数量与 FSH 的剂量成正相关^[16]。

eCG 是目前用来刺激家猫卵泡发育较好的激素, 用 eCG/hCG 组合超排家猫获得了比正常排卵多 4 倍的卵子 (23.3 ± 2.3)。Donoghue 等分别在注射 eCG 后 84、88、92 和 96 h 后再注射 hCG, 注射 hCG 25 ~ 27 h 后, 从卵泡中抽取卵子进行 IVF。结果表明, eCG 和 hCG 注射间隔时间在 80 ~ 92 h 之间, 成熟卵子获得率没有明显差异 (17.2 ~ 21.1), 但稍高于 96 h 组 (10.3)^[22]。

hCG 可以有效地刺激家猫排卵。Howard 等比较了不同剂量的 hCG (75 IU 和 100 IU) 对家猫的排卵效果, 发现 2 种剂量的 hCG 对家猫的排卵数、卵泡数和黄体数都没有差异, 受精 6 d 后的胚胎回收率以及孕妊率也十分相似^[15]。

外源激素的给药方式对家猫超排效果没有显著影响。Swanson 等使用不同剂量 (75 IU, 100 IU) 的 eCG 通过静脉注射和肌肉注射方式给药, 结果表明, 不同的给药方式对卵泡的发育不产生显著影响 (成熟卵泡数: 10 ± 2.9 ~ 17.7 ± 5.6), 但 eCG 通过静脉注射比通过肌肉注射的猫要早 1 d 出现发情^[18]。作者用 PMSG 通过肌肉注射和皮下注射对家猫的超排效果进行了比较, 结果也表明, 两种给药方式对超排效果并没有显著的影响 (作者未发表资料)。从现有的资料来看, 多数作者都采用肌肉注射的方式给家猫超排, 这种给药方式对家猫的刺激较大, 而且不便操作, 如果要多次给药, 家猫会产生较大的应激反应而影响超排的效果。在小鼠、大鼠、绵羊和猪中, 过多的应激反应会造成动物胚胎数和孕妊率降低^[23-26]。Howard 等也发现, 用腹腔镜对家猫进行人工授精时, 麻醉对猫的排卵有较大的影响, 在排卵前进行麻醉比在排卵后麻醉, 卵巢上的黄体数要少许多倍 (2.8 ± 1.5 vs 18.9 ± 3.3), 这可能是由于麻醉等操作引起家猫的应激反应, 分泌较多的皮质酮 (cortisol), 对排卵产生了抑制作用^[15]。因此, 在对家猫进行超排时, 作者认为采用皮下给药方式较好。

进行超排的家猫一般应处于发情间期。鉴定猫是否发情通常采用 3 种方法: 一是观察猫是否出现发情的行为如: 啼叫、四脚抓扒地面、弓背和蹬后脚等^[5]; 二是通过腹腔镜观察卵巢的活动情况, 卵巢上的卵泡直径 < 2 mm, 或完全没有卵泡或黄体结构存在, 则可判定为发情间期^[14]; 三是通过阴道涂片的方法进行检查^[17]。

3 家猫卵子的体外成熟和体外受精

3.1 家猫卵子的收集和分类 收集猫的卵母细胞可通

过超排注射 hCG 后 34 ~ 40 h 从输卵管中冲取, 这段时间冲得的卵有 70% ~ 80% 已排出第一极体(作者未发表资料); 也可在注射 hCG 24 ~ 26 h 后用腹腔镜或开腹直接从卵巢表面上抽取卵母细胞^[14,17], 这样取得的卵子会有部分是未成熟的卵子; 如果卵母细胞是来自于因作绝育手术或因病而被摘除的猫卵巢, 这些卵母细胞一般都未成熟。通过不同途径所获取的卵母细胞, 通常都可分为 3 类: 第一类是成熟的卵母细胞, 标志是放射冠和卵丘细胞已经分散并且扩展开来; 第二类是未成熟的卵母细胞, 放射冠和卵丘细胞紧密围绕着卵母细胞。Wood 将这种未成熟的卵母细胞又分为 4 级: I 级和 II 级具有均匀的黑色胞质和可辨别的生发泡, I 级具有 5 层以上的卵丘细胞, II 级则少于 5 层卵丘细胞。III 级和 IV 级为部分胞质已退化或碎裂化, 有少量或完全无卵丘细胞。未成熟的卵母细胞经过体外成熟培养后可用于体外受精。第三类是已退化的卵母细胞, 这类细胞无放射冠, 形状不规则, 颜色呈灰白^[27]。

不同来源的卵母细胞体外成熟的能力有所不同。Johnston 发现, 卵母细胞体外成熟率与其来源有关, 卵母细胞来源于不活跃(54%)或是处于卵泡阶段(56%)的卵巢, 其成熟率要显著高于来源于黄体期(29%)或妊娠期(35%)的卵巢^[28]。

3.2 家猫卵母细胞的体外成熟 许多培养液都能支持家猫的卵母细胞体外成熟。如: EMEM、TCM199 和 MEM 等。在体外成熟过程中, 培养液中通常加入促性腺激素可以促进未成熟的猫卵母细胞体外成熟, 通常使用的激素有 FSH、eCG、PMSG、LH、hCG 等。Pope 根据卵母细胞的形态对未成熟的猫卵母细胞分为三级(A = good(好), B = fair(一般), C = poor(差))^[19], 在 M199 中分别加入 eCG、FSH、hCG 或 FSH/hCG 体外培养, 结果不同类型的激素对 A 型和 B 型卵母细胞体外成熟率没有显著影响, 而在 hCG 或 FSH/hCG 中 C 型卵的成熟率比在只含有 eCG 或 FSH 中要多一倍。Johnston 用 MEM + FSH/LH + 3 mg/ml BSA + 1% FBS 培养家猫的卵母细胞, 在培养 48 h 后, 有超过 60% 的卵母细胞出现第一极体^[28]。但培养液中如含有牛血清^[29-31]和发情猫血清^[32], 对猫的卵母细胞体外成熟没有帮助, 反而会产生负作用。在培养液中加入表皮生长因子 EGF, 可以提高受精率和囊胚发育率。Gomez 培养液中加入 10 ng/ml 的 EGF, 成熟后进行受精, 实验组和对照组的卵裂率分别为 43.4% 和 32.4%, 两者有极显著差异, 囊胚率分别是 49.3% 和 42.3%, 也有显著差异^[33]。

3.3 家猫卵母细胞的体外受精 家猫精液可以采用电刺激^[21-34]或假阴道的方法收集^[27]。收集到的精液用

Ham's-F10 另加入 0.026 g/L 丙酮酸钠, 0.292 g/L L-谷氨酸, 100 IU/ml 青霉素, 100 IU/ml 链霉素和 5% (v/v) FBS^[27], 或用 mKRB 溶液^[21]进行稀释(1:1 v/v), 在室温下, 300 g 离心 8 min, 去掉上清, 用 100 ~ 150 μ l 新鲜的 Ham's-F10 或 mKRB 溶液轻轻放在精液的上层, 让精子上游 1 h, 取上层精子用于体外受精。猫科动物体外受精时, 精子需是 3 级以上, 并且有 80% 以上的精子是直线运动^[21]。

把上游的精子用 Ham's F10 稀释到运动精子浓度为 2×10^5 /ml, 精卵在受精液中共培养 15 h 后, 把卵从受精液中移出, 洗去精子和卵丘细胞, 转移到培养液进行培养^[27]。在猫的体外受精过程中, 精子都不另外进行获能处理, 这可能是由于精子在上游处理时已经获能, 或是在共培养过程中得到获能。

在含 BSA 或牛血清的受精液中, 卵裂率一般有 50% ~ 80%, 但 Kanda 等(1998)使用改良的 Earle's 溶液中加入 10% 人血清, 获得了 95% 以上的卵裂率。精子开始穿透卵子一般是在授精后 0.5 h, 也即精、卵共培养 0.5 h 后, 90% 以上的卵子在 0.5 ~ 3 h pi(授精后)内被精子穿透^[15,35]。精、卵共培养 6 h 或 15 h, 对卵裂率不产生显著影响^[36], 因此, 精、卵共培养 6 h 已可保证卵子受精。

4 家猫胚胎的体外培养和胚胎移植

4.1 家猫胚胎的体外培养 猫胚胎在桑椹胚前, 其发育进程在体内和在体外基本上相似, 但体内来源的胚胎有 70% 以上可以发育成为囊胚, 而体外受精得到的胚胎, 在体外培养都不能发育到囊胚^[10], 这说明, 猫胚胎在体外培养时, 从桑椹胚到囊胚阶段有一个发育阻滞, 采用不同的培养液类型、蛋白质种类、温度、气体以及输卵管共培养等方法都未能突破这一阻滞^[10,37-39]。最近, 有人通过改良培养基和培养方法, 成功突破了这一阻滞, 在体外获得了囊胚。Kanda 等采用改良的 Eagle's 溶液(mK) + 10% 人血清(HS)进行培养, 有 50% 的胚胎可体外发育到囊胚。培养方式对囊胚获得率也有影响, 用悬浮式培养碟(suspension culture dish, SCD)比组织培养碟(tissue culture dish, TDS), 在 mK + 10% HS 中, 受精后 144 h 的囊胚率分别为 71.7% 和 22.2%。两者有极显著差异^[39]。Pope 采用另外一种培养系统体外培养猫的胚胎, 也得到了高于 50% 囊胚发育率。他们使用改良的 Tyrode's 溶液(mTy), 补充 MEM 的必需(EAA)和非必需氨基酸(NEAA), 以及 BSA 或 FBS。胚胎首先在 mTy + BSA + NEAA 中培养 2 d, 再转入到 mTy + 10% FBS + NEAA/EAA 培养液中, 在含 5% CO₂ 的系统中培

养,7 d 后有超过 50% 的胚胎达到囊胚^[40]。

4.2 家猫的胚胎移植 Goodrowe 第一个成功地进行了家猫胚胎移植^[21]。目前,家猫的胚胎移植在多个实验室都获得了成功。家猫早期囊胚前的任何阶段的胚胎都能进行胚胎移植,IVM、IVF、ISCI、SUZI 以及冷冻保存等所获得的胚胎,经移植也能正常产仔。移植入受体的胚胎数对妊娠率有一定的影响,每只受体移植入的胚胎数大于 12 枚比小于 12 枚时的受孕率要高。由于家猫的胚胎能在子宫中进行迁移,使在两侧子宫中均匀分配,因而家猫的胚胎移植只需进行单侧移植。有些研究人员使用经激素处理后的卵供体作为胚胎受体,认为这种受体与供体的同步性是非常精确的,有些甚至采用自体移植^[41]。

在非生殖季节,家猫也可以进行胚胎移植。Tsutsui 等人在非生殖季节用生殖激素诱导家猫发情,在与公猫交配后,在 6~8 d 冲出囊胚进行移植,受体猫用 hCG 同步处理,每只受体猫移植 1~9 枚囊胚,实验组中的所有受体都怀孕,但在 22~25 d,有 2 只猫出现死胎,3 只流产。只有注射了外源孕激素的 1 只猫怀孕 66 d,产下 2 只小猫^[12]。

家猫可以作为其它野生猫科动物的胚胎受体,进行借腹怀胎。Pope 等(1993)把 4 枚印度沙漠猫桑椹胚,连同 10 枚家猫桑椹胚一起移植到经同期处理的家猫子宫内,产下 2 只印度沙漠猫小仔,但其中 1 只是死胎^[17]。最近 Pope 又报道,他们把 8 枚经体外受精的非洲野猫(*Felis sylvestrus lybica*)桑椹胚移植到家猫子宫内,产下 3 只死胎,其中,2 只是经剖腹产获得^[1]。

5 家猫卵母细胞和胚胎的冷冻保存

家猫的卵巢可在 4℃ 下保存一段时间不影响卵母细胞的成熟。但对其受精率和胚胎发育率有影响。Wolfe 把切下的卵巢在 4℃ 下分别保存 24、48 和 72 h 后吸取卵母细胞,体外成熟 32 h 后,进行体外受精,卵巢保存 48 h 和 72 h 后,其受精率均显著低于 24 h 组,24 h 组的卵子经体外受精后,有 9.1% 的受精卵可发育到囊胚^[41]。

Dresser 首次成功地冷冻保存了源于体内发育的家猫桑椹和囊胚。冷冻液使用 PBS + 15% FBS + 10% 甘油,胚胎慢速降温到 -34℃,再投入液氮中保存。冷冻的胚胎在 28℃ 或 37℃ 下进行解冻,用 Ham's F-10 + 20% FBS 培养过夜,再移植到经激素处理的受体猫中,11 只受体中有 5 只产仔^[42]。适用于家猫胚胎冷冻的冷冻剂有甘油^[42]、丙二醇^[43]和乙二醇^[44]和 DMSO^[45]。Pope 用 1.4 mol/L 的丙二醇,0.125 mol/L 的蔗糖成功地

冷冻了源于体外受精的 2~4 细胞的家猫胚胎,解冻后有 73%~82% 的胚胎发育到桑椹或囊胚^[43]。最近研究结果显示,防冻剂的种类对冷冻家猫的早期胚胎有显著影响,乙二醇比丙二醇和甘油更适合于冷冻保存家猫的卵子和早期胚胎^[45]。

6 家猫克隆

自从多莉羊诞生以来,现已有多种哺乳动物的体细胞克隆取得了成功。Skrzyzowska 报道,他们以猫胎儿成纤维细胞作为核供体,分别用体外成熟 35 h 和 43 h 的卵子作为受体,采用两次 2.0 kV/cm 直流电 25 μs 的电融合条件融合,成熟 35 h 和 43 h 组融合率分别为 74.6% vs 57.5%,囊胚率是 8.5% vs 0%,卵裂率(55.3% vs 60.8%)和桑椹胚率(25.5% vs 28.2%)没有显著差异,他们认为,卵母细胞在体外成熟培养时间过长,会降低核移植胚胎的体外发育能力^[46]。不同的培养系统对猫的核移植胚胎的体外培养效果有一定的影响,重构胚在 MK1 + 5% BSA 培养液中的桑椹胚率显著高于在 Crlaa + 5% BSA 培养液中^[47]。

2002 年 2 月,Shin T 等在 Nature 杂志上报道,他们用卵丘细胞构建 3 枚克隆胚胎,用成纤维细胞构建了 2 枚克隆胚,将 5 枚胚胎移植到一只受体中,66 d 后,通过剖腹,获得了一只克隆猫,从毛色观察和 DNA 检测证明,该克隆猫是来源于卵丘细胞克隆胚胎^[48]。家猫成为第 6 个被克隆的动物。

7 结 语

家猫胚胎工程的研究,近年来已有了长足的进展。由于家猫在猫科动物中所处的特殊位置,已成为研究其它猫科动物的一个重要模型动物,在家猫上应用的 IVM-IVF-ET 技术,已证明可以移植到其它猫科动物上使用。随着异种克隆和异种妊娠技术的出现,家猫更有可能成为一些小型濒危猫科动物的胚胎受体,在濒危物种的保护上发挥作用。

参 考 文 献

- [1] Pope C E. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology*, 2000, **53**(1):163~174.
- [2] Johnstone I. Reproductive patterns of pedigree cats. *Journal of Australian Veterinary*, 1987, **64**:197~200.
- [3] Shille V M, Munro C, Farmer S W *et al.* Ovarian and endocrine responses in the cat after coitus. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1983, **68**:29~39.
- [4] Schramm R D, Bavister B D. Effects of gonadotrophins, growth hormone and prolactin on developmental competence of

- domestic cat oocytes matured *in vitro*. *Reproduction, Fertility, Development*, 1995, 7(5): 1 061 ~ 1 066.
- [5] Wildt D E, Chan S Y W, Seager S W J H *et al.* Ovarian activity, circulating hormones, and sexual behavior in the cat. I. Relationship during the coitus—induced luteal phase and the estrous period without mating. *Biology of Reproduction*, 1981, 25: 15 ~ 28.
- [6] Gudermuth D F, Newton L, Daels P *et al.* Incidence of spontaneous ovulation in young, group—housed cats based on serum and faecal concentrations of progesterone. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1997, 51(Suppl): 177 ~ 184.
- [7] Lawler D F, Johnson S D, Hegstad R L *et al.* Ovulation without cervical stimulation in domestic cats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1993, 47 (Suppl.): 203 ~ 207.
- [8] Swanson W F, Roth T, Wildt D E. *In vivo* embryogenesis, embryo migration and embryonic mortality in domestic cat. *Biology of Reproduction*, 1994, 51: 452 ~ 464.
- [9] Denker H W, Eng L A, Hamner C E. Studies on the early development and implantation in the cat. *Acta Embryology*, 1978, 154: 39 ~ 54.
- [10] Roth T L, Donoghue, A M, Brers A P *et al.* Influence of oviductal cell monolayer coculture and the presence of corpora hemorrhagica at the time of oocyte aspiration of gamete interaction *in vitro* in the domestic cat. *Journal of Assistant Reproduction and Genetics*, 1993, 10: 523 ~ 529.
- [11] Tsutsui T, Stabenfeldt G H. Biology of ovarian cycles, pregnancy and pseudopregnancy in the domestic cat. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1993, 47(Suppl): 29 ~ 35.
- [12] Tsutsui T, Amano T, Murao I *et al.* Evidence of transuterine migration of embryos in domestic cat. *Japanese Journal of Veterinary Science*, 1989, 51: 613 ~ 617.
- [13] Goodrowe K L, Wildt D E. Ovarian response to human chorionic gonadotropin or gonadotropin releasing hormone in natural and induced estrus cats. *Theriogenology*, 1987, 27: 811 ~ 817.
- [14] Goodrowe K L, Howard J G, Wildt D E. Comparison of embryo recovery, embryo quality, estradiol-17 β and progesterone profiles in domestic cats at natural or induce oestrus. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1988, 82: 553 ~ 561.
- [15] Howard J G, Barone M A, Donoghue M *et al.* The effect of pre-ovulatory anaesthesia on ovulation in laparoscopically inseminated domestic cats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1992, 96(1): 175 ~ 86.
- [16] Verstegen J P, Onclin K, Silva L D *et al.* Superovulation and embryo culture *in vitro* following treatment with ultra-pure follicle-stimulating hormone in cats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1993, 47(Suppl): 209 ~ 218.
- [17] Pope C E, Keller G L, Dresser B L. *In vitro* fertilization in domestic and non-domestic cats including sequences of early nuclear events, development *in vitro*, cryopreservation and successful intra- and inter-species embryo transfer. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1993, 47 (Suppl): 189 ~ 201.
- [18] Swanson W F, Wolfe B A, Brown J L *et al.* Pharmacokinetics and ovarian-stimulatory effects of equine and human chorionic gonadotropins administered singly and in combination in the domestic cat. *Biology of Reproduction*, 1997, 57(2): 295 ~ 302.
- [19] Pope C E, McRae M A, Plair B L *et al.* *In vitro* and *in vivo* development of embryos produced by *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization of cat oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1997, 51(Suppl): 69 ~ 82.
- [20] Cline E M, Jennings L L, Sojka N J. Breeding laboratory cats during artificially induced estrus. *Laboratory Animal Science*, 1980, 30: 1 003 ~ 1 005.
- [21] Goodrowe K L, Wall R J, O'Brien S J *et al.* Developmental competence of domestic cat follicular oocyte after fertilization *in vitro*. *Biology of Reproduction*, 1988, 39: 355 ~ 372.
- [22] Donoghue A M, Johnson L A, Goodrowe K L *et al.* Influence of gonadotropin treatment interval on follicular maturation *in vitro* fertilization, circulating steroid concentrations and subsequent luteal function in the domestic cat. *Biology of Reproduction*, 1992, 46: 972 ~ 980.
- [23] Euker J S, Riegler G D. Effects of stress on pregnancy in the rat. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1973, 34: 343 ~ 346.
- [24] Doney J M, Smith W F, Gunn R G. Effects of post-mating environmental stress or administration of ACTH on early embryonic loss in sheep. *Journal of Agricultural Science*, 1976, 87: 133 ~ 136.
- [25] Kittinger J W, Gutierrez-Cernosek R M, Cernosek S F Jr *et al.* Effects of adrenocorticotrophin on pregnancy and prolactin in mice. *Endocrinology*, 1980, 107: 616 ~ 621.
- [26] Hemsworth P H, Barnett J L, Hansen C. The influence of handling by humans on the behavior, reproduction and corticosteroids of male and female pigs. *Applied Animal Behavior Science*, 1986, 15: 303 ~ 314.
- [27] Wood T C, Wildt D E. Effect of the quality of the cumulus-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1997, 110(2): 355 ~ 360.
- [28] Johnston L A, O'Brien S J, Wildt D E. *In vitro* maturation and fertilization of domestic cat follicular oocytes. *Gamete Research*, 1989, 24: 343 ~ 356.
- [29] Johnston L A, Donoghue A M, O'Brien S J *et al.* Influence of culture medium and protein supplementation on *in vitro* oocyte

- maturation and fertilization in the domestic cat. *Theriogenology*, 1993, **40**: 829 ~ 839.
- [30] Luvoni G C, Oliva O. Effect of medium-199 and fetal calf serum on *in vitro* maturation of domestic cat oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1993, **47**(suppl.): 203 ~ 207.
- [31] Wood T C, Byers A P, Jennette B E *et al.* Influence of protein and hormone supplementation on *in vitro* maturation and fertilization of domestic cat eggs. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1995, **104**: 315 ~ 323.
- [32] Goodrowe K L, Hay M, King W A. Nuclear maturation of domestic cat ovarian oocyte *in vitro*. *Biology of Reproduction*, 1991, **45**: 466 ~ 470.
- [33] Gomez M C, Pope C E, Davis A M *et al.* Addition of epidermal growth factor(EGF) during *in vitro* maturation of domestic cat oocytes enhances fertilization frequency and blastocyst development *in vitro*. *Theriogenology*, 2001, **55**(1): 472 (abstr.).
- [34] Wildt D E, Bush M, Howard J G *et al.* Unique seminal quality in South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. *Biology of Reproduction*, 1983, **29**: 1 019 ~ 1 025.
- [35] Niwa K, Ohara K, Hosoi Y *et al.* Early events of *in vitro* fertilization of cat eggs by epididymal spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1985, **74**: 657 ~ 660.
- [36] Pope C E, Gelwicks E J, Wachs K B *et al.* *In vitro* fertilization in the domestic cat (*Felis catus*): a comparison between freshly collected and cooled semen. *Theriogenology*, 1989, **31**: 241 (abstr.).
- [37] Johnson L A, Donoghue A M, O'Brien S J *et al.* Culture medium and protein supplementation influence *in vitro* fertilization and embryo development in the domestic cat. *Journal of Experimental Zoology*, 1991, **257**: 350 ~ 359.
- [38] Swanson W F, Roth T L, Godke R A. Persistence of the developmental block of *in vitro* fertilized domestic cat embryo to temporal variations in culture conditions. *Molecular Reproduction and Development*, 1996, **43**: 298 ~ 305.
- [39] Kanda M, Miyazaki T, Kanda M *et al.* Development of *in vitro* fertilized feline embryos in a modified Earle's balanced salt solution: influence of protein supplements and culture dishes on fertilization success and blastocyst formation. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 1998, **60**: 423 ~ 431.
- [40] Pope C E, Johnson C A, McRae M A *et al.* Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. *Animal Reproduction Science*, 1998, **53**: 221 ~ 236.
- [41] Wolfe B A, Wildt D E. Development to blastocysts of domestic cat oocytes matured and fertilized *in vitro* after prolonged cold storage. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1996, **106**(1): 135 ~ 141.
- [42] Dresser B L, Gelwicks E J, Wachs K B *et al.* First successful transfer of cryopreserved feline (*Felis catus*) embryos resulting in live offspring. *Journal of Experimental Zoology*, 1988, **246**(2): 180 ~ 186.
- [43] Pope C E, McRae M A, Plair B L *et al.* Successful *in vitro* and *in vivo* development of *in vitro* fertilized two to four cell cat embryos following cryopreservation, culture and transfer. *Theriogenology*, 1994, **42**: 513 ~ 525.
- [44] Swanson W F, Mcrae M A, Wildt D E *et al.* Cryoprotectant toxicity and cryopreservation success in IVF-derived domestic cat embryos after embryo transfer. *Theriogenology*, 1999, **51**: 174(abstr.).
- [45] Luvoni G C, Ellizzari P. Embryo development *in vitro* of cat oocytes cryopreserved at different maturation stages. *Theriogenology*, 2000, **53**(8): 1 529 ~ 1 540.
- [46] Skrzyszowska M, Katska L, Smorag Z *et al.* *In vitro* development of somatic nuclear transferred cat embryos. *Theriogenology*, 2001, **55**(1): 292(abstr.).
- [47] Fahrudin M, Otoi T, Murakami M *et al.* The effects of culture medium on *in vitro* development of domestic cat embryos reconstructed by nuclear transplantation. *Theriogenology*, 2001, **55**(1): 268(abstr.).
- [48] Shin T, Kraemer D, Pryor J *et al.* A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*, 2002, **514**: 859.