

# 体细胞核移植的研究进展\*

肖文伍 付新巧 张苏明

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 武汉 430030)

**摘要:** 自从克隆羊多利问世以后,体细胞核移植有了较大的发展,陆续有新的动物克隆成功,但克隆的效率仍然较低。本文综述了体细胞核移植技术研究的进展情况,介绍了基因背景、核移植步骤、胚胎相关支持技术对核移植成功率的影响以及核移植技术中的基因修饰和对核重新程序化的最新认识。

**关键词:** 核移植;克隆;胚胎;卵母细胞

**中图分类号:** Q81 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2004)02-78-06

## The Progress in Somatic Nuclear Transfer

XIAO Wen-Wu FU Xin-Qiao ZHANG Su-Ming

(Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

**Abstract:** In recent years, the technology of somatic nuclear transfer has achieved much progress and new animal species has been cloned successfully in succession, but the overall cloning effect is still low. This paper summarizes the development of the technology and introduces the influence of gene background, nuclear transfer procedure, relative supporting technology. The genetic modification during nuclear transfer and some new knowledge related to nuclear "reprogramming" were also introduced.

**Key words:** Nuclear transfer; Clone; Embryo; Oocyte

随着体细胞核移植技术的发展,不断有新的克隆动物面世。尽管围绕这项技术的生物安全性的争论日渐增多,但是,人们兴趣的焦点还是集中在体细胞核移植技术在生物医药、农业及其它领域的应用。体细胞核移植技术和胚胎干细胞技术相结合的治疗性克隆使人们看到了治疗许多顽症希望。利用基因修饰的克隆猪进行异种移植,使得避免器官移植中的排斥反应成为可能<sup>[1]</sup>。本文将综述近年来体细胞核移植技术的新进展。

### 1 克隆成功的动物

自从利用分化的成年乳腺细胞得到第一只体细胞克隆绵羊多利<sup>[2]</sup>,其它物种的克隆也取得了很大的进展。体细胞克隆牛<sup>[3]</sup>、山羊<sup>[4]</sup>、鼠<sup>[5]</sup>、猪<sup>[6]</sup>和兔<sup>[7]</sup>相继获得成功。在目前的克隆试验中,不同物种间克隆的效率略有区别,但总的效率不高。相对而言,牛的克隆最为成功。牛的成功率高得力于胚胎培养、胚胎转移等一些相关技术的成熟度更高。其它物种因为这些技术还不是很完备,故而影响了克隆效率。最近,克隆猪的突破就是一

个很好的例子,要获得高的成功率,就要很好地解决与种属特异性有关的一些问题。利用连续核移植<sup>[8]</sup>,以受精卵取代人工激活的卵母细胞,利用细胞核注射而不是细胞融合<sup>[9]</sup>及更有效的体外成熟技术和激活方法<sup>[10]</sup>,导致了克隆猪的产生。在猪的实验中还有另外一个问题,就是子宫怀孕的维持需要一定数目的胚胎,King等人采用新的方法克服了维持怀孕的难题<sup>[6]</sup>。

种间核移植会产生线粒体DNA嵌合的问题,有人发现 *Bos indicus* 和 *Bos taurus* 的核移植重构胚,在早期胚胎发育中,供体的线粒体逐渐减少至完全消失<sup>[11]</sup>。自从第一例异种核移植报道后<sup>[12]</sup>,大量相关的研究结果随之产生,将老虎的细胞核移植到家猫的卵母细胞中就是一例<sup>[13]</sup>。总的来说,大多异种克隆都只支持核移胚发育到早期的几个分裂阶段<sup>[14]</sup>。

\* 国家自然科学基金资助项目(No. 39770810);

第一作者简介 肖文伍, 31岁,男,博士;从事转基因动物、核移植、老年性痴呆研究; E-mail: xdw517@yahoo.com.cn.

收稿日期: 2003-08-28, 修回日期: 2004-01-16

有几种动物的克隆到目前为止还不成功:克隆狗的失败一个很重要的原因是对其的相关生殖支持技术知之甚少;而猴、大鼠、水牛等即使有相关的知识却同样不成功,说明体细胞核移植还存在一些种属特异性的问题。

## 2 基因背景对核移植的影响

克隆试验中,胞质与外源核之间作用的生物机制还不清楚,供核细胞的基因源起对克隆鼠的成功率有明显的影响<sup>[15]</sup>。而绵羊的卵母细胞对核移植的成功率有明显的影响,提示基因效应使得克隆技术的应用更加复杂化<sup>[16]</sup>。进一步的研究需要澄清怎样的供体细胞和受体卵母细胞的结合才有最高的成功率,而这一结果在多大程度上适用于所有的动物。

最近在克隆鼠试验的有关报道中提到,来自于同一个细胞系的不同细胞作供体的克隆结果不一样<sup>[17]</sup>。在猪试验中,来源于同一个胎儿的转基因成纤维细胞的不同系的细胞产生的克隆胚的发育不一样<sup>[18]</sup>。

## 3 核移植步骤影响克隆的效率

核移植是一个复杂的过程,每一步都会影响总的成功率。因为卵母细胞和供核细胞的生理差异使得这项技术很难得到精确的控制,为了获得可重复性的结果,这些步骤的标准化很重要。这些步骤的改进对于后期胎儿的发育可能还有持久的作用。

### 3.1 去核和重构胚

核移植中,去核这一步很关键,最初是用尖的去核针,在鼠的实验中,压电去核装置的应用能很好地穿透柔韧的透明带,因而使核移植的效率有所改进<sup>[5]</sup>。相较细胞融合的方法而言,压电去核装置能去掉供核细胞的细胞膜,直接将细胞核注入去核后的卵母细胞中。但最近Zhou等<sup>[19]</sup>仍用去核针去核和不同的融合方法得到了克隆鼠,说明压电装置尽管很有用,但不一定必须。尽管很多动物克隆中均未用此装置而获得成功,然而它却能直接将细胞核注入卵母细胞胞浆中,使得胞浆的一些因子更好地发挥核重新程序化的效应。在猪的试验中,利用这种技术就成功地获得了克隆猪<sup>[9]</sup>。我们在实际操作过程中还用到了液体表面张力法去核,实践证明这种方法去核的速度和效率与直接用去核针进行去核操作相当。

显微去核需要高水平的视觉和手动控制。化学去核可能使这一过程简单化。在鼠试验中,Fulka和 Moor<sup>[20]</sup>利用化学去核方法就有一定程度上的成功,而且,最近Baguisi和 Overstrom<sup>[20]</sup>用秋水仙碱作用于后末期到末期转

换阶段的卵母细胞成功地进行了非侵袭性的化学去核。然而这一技术能否用于其它动物仍需进一步的研究,如果能成功,它对于核移植的影响将是巨大的。

核移植中尽管广泛地应用了人工激活的卵母细胞,但是由于缺乏诸如受精这些自然过程,受精卵的胞浆环境仍然被认为优于卵母细胞,连续核移植就是为了弥补这一缺陷。它包括两个步骤:第一步是将MII期的卵母细胞与供核细胞融合,第二步是将其形成的原核移入到去核后的原核期的胚胎。后者的目的是使克隆胚体细胞来源的原核进入自然受精的原核阶段的胞浆。在猪<sup>[8]</sup>和鼠<sup>[22]</sup>的实验中,连续核移植得到成功的应用。更有甚者,第二步中用受精后的两细胞阶段的胚胎分裂球作受体得到了克隆鼠<sup>[23]</sup>。

通常的核移植程序中,应用的卵母细胞外面包被透明带,但也有些学者采用无透明带的核移植方法。无透明带的核移植方法一般包括:①将卵母细胞切成两半;②在紫外光照射下选择无染色质的半卵,将包含母源染色体的一半胞质体丢弃;③将一个体细胞与两个半卵融合;④单个核移植胚胎的体外培养。这种方法产生的核移植囊胚与具有透明带的核移植囊胚有同等的质量,也验证了一个被早期研究证实的观点:透明带对于胚胎的体外发育不是必须的。但这种半卵法有其缺陷,其一是浪费了50%的卵母细胞胞浆,其二是将三种不同的线粒体置于一个细胞内,增加了线粒体异质体的发生率。Obach<sup>[24]</sup>改进了这一方法:①用一个前端平坦的吸管去核,这样去掉的胞质量少;②成批的去核胞质体-供体细胞对同时融合;③单个或三个核移植重构胚在微滴中进行培养。这种方法使得核移植胚胎产量得以加倍而并不影响整个的克隆效率。我们在小鼠胚胎的操作中,无透明带的卵在培养液滴中很难继续发育,即使是采取WOW<sup>[25]</sup>法培养,受精卵也很难发育超过两细胞。因而这些不要透明带的方法可能并不适合小鼠克隆,其应用可能有种属特异性。

MII期卵母细胞作为受体细胞,通常是在移入供体细胞核之前,去掉中期纺锤体和其周围的一部分胞浆,因去核方法的不同,去掉的胞浆量在5%~50%之间,可能导致对核重新程序化有重要作用的一些胞浆因子的丢失。尽管这些因子的特性和所在位置还不清楚,但它们可能就存在于中期染色体的附近,在去核的同时丢失掉。为此,有些学者认为,如果在去核之前将供体细胞核移入卵母细胞中,然后再去核,可能会使移入的核充分地重新程序化。Peura<sup>[26]</sup>等在绵羊的体细胞核移植实验中,就采用反向的无透明带的克隆方法,也就是将供体细胞核导入无透明带的未去核的卵母细胞

中,使供核与卵母细胞的核组织结构区短暂共存而后再去核,这一程序明显地提高了克隆胚胎的体外囊胚发育率。

**3.2 卵母细胞的激活** 核移植中,因缺乏精子介导的受精,为了使克隆胚胎进一步发育,卵母细胞的人工激活是非常必要的。各种激活方法都是为了创造一个短暂的  $Ca^{2+}$  的波动,但这个过程往往难以完全复制自然的过程,而只是导致细胞内  $Ca^{2+}$  一过性升高。作用于  $Ca^{2+}$  信号途径下游通路能导致卵母细胞激活,卵母细胞的激活对于克隆胚后续的发育有长久的作用。Ozil 和 Hunean<sup>[27]</sup> 认为  $Ca^{2+}$  波动的参数如幅度、数量、频度与胚胎移植后的发育的效率和质量有关系。有趣的是,早期胚胎的分裂不受这些参数的影响,说明  $Ca^{2+}$  的作用对后期基因激活很重要。

在猪中,激活方法的改进促进了克隆猪的产生<sup>[10]</sup>。然而,大多数的激活对细胞成份、卵母细胞的生理等多方面都有影响。为了寻找更特异而又非损伤性的激活方法,特异性激酶阻滞剂 butyrolactone I<sup>[28]</sup> 和 roscovitine<sup>[29]</sup> 得到了应用,然而这些化学物质对胚胎全程发育的影响有待进一步的研究。注射精源性因子可能会模拟自然过程的  $Ca^{2+}$  的波动,将猪精源性因子作为激活剂注射后导致了牛核移植胚胎的发育,然而此方法的结果较其它方法的效率低<sup>[30]</sup>。

**3.3 供体细胞与受体卵母细胞的细胞周期的同步化** 具有细胞周期同步化的认识是第一次体细胞核移植获得成功的重要因素<sup>[31]</sup>,而且首次认识到应用 G0 期细胞的必要。由于后来 G1 期细胞的核移植也获得了成功<sup>[3]</sup>,而且对于具体细胞周期的认识仅是基于一些统计的可能性,因而适合的细胞周期的观点仍未得到澄清<sup>[32]</sup>。研究是 G0 期还是 G1 期的细胞更宜于核移植,T 淋巴细胞可能是一个很好的模型,因为 CD25 基因在 G0 期和 G1 期细胞的表达模式不一样,能很容易将它们区分开<sup>[33]</sup>。更有甚者,最近发现使 ES 细胞处于 G2/M 期可能对核移植有利<sup>[23]</sup>,Ono 等就用处于 M 期的成纤维细胞产生了核移植的鼠<sup>[22]</sup>。

MII 期卵母细胞是应用最为广泛的受体胞质,然而有研究发现猪 MI 期卵母细胞也能支持核移植胚发育到囊胚<sup>[34]</sup>。在 Wakayama<sup>[35]</sup> 的核移植方法中,激活的鼠受精卵不适合作核移植(但他们意外的发现激活培养液中增加 DMSO 对克隆胚的发育有利)。但是 Vignon<sup>[36]</sup> 等发现老化的卵细胞也能支持牛胚胎的发育,并且产生了克隆牛。更有甚者,末 II 期去核卵细胞可以支持牛胚胎的发育<sup>[37]</sup>,而且还产生了克隆山羊<sup>[38]</sup> 和克隆鼠<sup>[21]</sup>。

核移植后染色体倍性的维持对胚胎的进一步发育很关键。小鼠试验中,细胞松弛素 B,细胞松弛素 D 和诺考达唑在维持染色体倍性方面都得到应用<sup>[35]</sup>。猪的实验中<sup>[6]</sup>,在细胞融合前后应用细胞松弛素和诺考达唑尽管在囊胚形成率方面没有改善,但促进了核的膨大和原核的形成。

## 4 胚胎相关支持技术影响核移植效率

胚胎体外成熟、移植等技术不仅具有巨大的实用价值,而且在克隆过程中发挥了关键作用。这些技术的进步对近年来核移植成功率的提高有很大的帮助。

**4.1 卵母细胞的体外成熟** 核移植技术要用于经济目的必须有一个前提,就是卵母细胞体外成熟技术的完善。牛的核移植研究客观上促使了这项技术的发展和完善。尽管卵母细胞体外成熟技术并不是在所有的动物中都必须应用,但在绵羊、猪、山羊的核移植研究中均成功地运用了这一技术。

**4.2 克隆胚胎的体外培养** 在猪的实验中,受体子宫中需要一定数目的胚胎数才能维持怀孕。但牛和绵羊多胎妊娠易致流产,所以应在稍迟的阶段作胚胎移植(在桑葚胚和囊胚的阶段,能更好的评估胚胎的质量)。胚胎的培养需要严格的控制,因为培养条件对胚胎的质量影响很大,而且能改变发育相关的重要基因的表达模式<sup>[39]</sup>。在绵羊中,培养基中血清的加入会导致与印记基因表达变化有关的异常,而利用胚胎在输卵管中短暂培养到囊胚能克服这一缺陷。体外培养(IVC)如果能得到改进,使之对胚胎的发育没有影响,又能减少克隆动物的表型异常,则这一技术无论是在价格方面还是动物伦理方面都是很优越的。

**4.3 卵母细胞与核移植胚胎的冻存** 卵母细胞的冻存技术可使核移植试验不受地理和气候的影响。牛核移植应用了玻璃化复温后的卵母细胞<sup>[28]</sup>,这种卵与新鲜卵母细胞有相似的成功率,然而移植后胚胎的发育能力仍须进一步的试验。克隆胚胎的冻存将对核移植技术的商业化有很重要的作用,采用冻存<sup>[40]</sup>或玻璃化<sup>[28]</sup>的核移植胚胎已经产生了克隆牛,但这一技术还没有用于其它动物。

**4.4 怀孕的维持与围产期护理** 克隆胚胎移植后的怀孕识别和维持对于产生活的后代有很关键的作用。在所有的动物中,核移植胚胎移植后都有很高的流产率。猪的特别之处是子宫中需要一定数目的胎儿,怀孕才能维持下去,这在怀孕的 11 或 12 d 是最重要,此时胚胎产生的雌激素发挥了母体对怀孕的识别作用,而且至少需要 4 到 5 个存活的胚胎怀孕才得以进一步维持,14

d 后胚胎数目就不重要了。为了帮助怀孕识别和维持,第一种办法是在 11 到 15 d 期间应用外源性的雌激素<sup>[42]</sup>。另一方法<sup>[44]</sup>是在第 9 d 和 12 d 时分别注 eCG 和 HCG,促使黄体分泌孕激素以支持怀孕。第三个办法是将孤雌活化的卵母细胞与一定数量的受精卵共同移植。孤雌发育的胚胎提供了一定数目的胚胎,有助于早期对怀孕的识别,其在后期退化而不与正常胚胎竞争营养,将这一方法应用到核移植胚胎已产生了克隆猪<sup>[6]</sup>。

核移植胚胎附植后经常出现不正常,通常分娩不能正常进行,需要剖腹产,因而监测很重要。超声检查能及早发现异常并给必要的兽医治疗提供帮助。Wells 等<sup>[43]</sup>在分娩前应用皮质激素促使牛胎儿成熟,产后给予吸氧处理,明显有助于克隆小牛的存活。然而常规的剖腹产和围产期的护理限制了它在农业上更广泛的应用。为了获得健康的克隆后代,导致这些不正常的机理仍有待弄清。

## 5 核移植技术中的基因修饰

小鼠 ES 细胞的获得使得各种基因操作和基因模型的生产成为可能,但大多数的动物因为 ES 细胞建系困难,限制了这些基因修饰的应用。核移植中基因修饰体细胞却使这一问题得到解决。McCreath 等<sup>[44]</sup>利用体细胞基因修饰策略生产了第一只基因打靶羊,它将人类治疗性基因打靶到绵羊  $\alpha_1$  前胶原基因位点中,试图生产人的治疗性蛋白。最近,第一只基因敲除的绵羊也产生了<sup>[45]</sup>,其中半乳糖基赖氨酸胶原转移酶基因的功能区被敲除,此基因主要与异种器官移植的超急性排斥反应有关。这种方法的主要问题是体细胞基因打靶的效率低,而且体细胞不象 ES 细胞那样能长久的扩增下去,但这种方法无疑值得期待。为克服这个问题,另一方法是应用类 ES 细胞作为打靶载体,这种细胞最近成功地用到克隆牛胚胎<sup>[47]</sup>和猪胚胎上,然而从这种细胞系得到怀孕的后代很困难。

利用端粒长度较短的细胞如成体细胞和体外传了很多代的细胞作供体,产生的后代会不会短寿这一问题受到人们的关注。最近克隆牛方面的研究显示随着后续胚胎的发育,端粒长度逐渐恢复<sup>[48]</sup>,克隆牛的体细胞的再克隆也获得了成功<sup>[49]</sup>,克隆鼠已经有了第 6 代的小鼠,证明克隆动物有很好的生殖潜能。

## 6 影响核移植效率的主要问题

核移植效率的低下限制了它的实际应用,其最基本的问题是核重新程序化(reprogramming)的不完善,为

了更好地理解 and 改善这一过程需要新的监测方法。最近有些研究报道了核重新程序化和后续基因表达过程中的一些变化。

核仁中核糖体 RNA(rRNA)基因的转录导致核糖体合成。rRNA 基因的激活和相应的核仁形成可作为胚胎基因组激活的一个有用的标志,是评价胚胎发育潜能的指标。Hytel 报道了牛和猪克隆胚胎中出现大量的核仁蛋白位置偏移,提示早期克隆胚胎的不正常。Wrenzychi<sup>[51]</sup>等用半定量 RT-PCR 的方法发现核移植胚胎较之正常体内和体外培养胚胎出现与滋养层功能和 DNA 甲基化有关的几个重要基因表达异常。

克隆子代通常不正常且出生后不能存活,De sous<sup>[52]</sup>等报道了核移植绵羊 35 d 胚胎的异常,核移植子代中功能缺陷几率很高,这些缺陷包括肝大、皮肤出血、胎盘血管发育不全。相似的,Hill<sup>[53]</sup>等研究了克隆兔怀孕期间胎儿和胎盘的一些特征。在 30 ~ 90 d 期间,82%核移植胎儿死亡,然而正常对照均存活,90 d 前能存活胎儿的头臂长度都较短,35 ~ 60 d 间的低存活状况与尿囊绒膜发育不良有关。这些现象提示克隆胚胎的不正常与促进胎盘和血管生长及胎盘附着和绒毛形成的一些因子有关。Humpherys<sup>[54]</sup>研究了鼠的印记基因表达与胎儿存活和生长的关系。他们发现 ES 细胞基因组状态很不稳定,供体细胞即使来源于同一 ES 细胞的亚克隆,大多数鼠的克隆子代印记基因的表达也不一样。某些克隆动物尽管有基因功能的失调,仍能生长到成年,说明哺乳动物发育过程中能承受某些表达畸形。这项研究很重要的发现就是正常 ES 细胞克隆鼠的基因表达方面也有轻微的异常。因而 Tamashiro 等<sup>[55]</sup>报道的源于颗粒细胞的克隆鼠初生体重高也不足为怪,克隆鼠断奶前某些行为表现有迟滞,然而学习和记忆、活动水平、运动技能与正常鼠比较并无差异。Eggan<sup>[15]</sup>等报道了 ES 细胞克隆鼠胎儿的各种表型异常,而且报道了四倍体胚胎与 ES 细胞的合并能减少这些异常的频度和程度,目前尚不清楚体细胞克隆鼠是否也有类似的一些表型异常。

## 参 考 文 献

- [1] Machaty Z, Bondioli K R, Ramsondar J, et al. The use of nuclear transfer to produce transgenic pigs. *Cloning and Stem Cells*, 2001, 4:21 ~ 27.
- [2] Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, et al. Viable offspring derives from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385:810 ~ 813.
- [3] Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J, et al. Cloned transgenic

- calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 1998, **280**:1 256 ~ 1 258.
- [ 4 ] Keefer C L, 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**:849 ~ 856.
- [ 5 ] Wakayama T, Perry A C F, Zuccotti M, *et al.* Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 1998, **394**:369 ~ 374.
- [ 6 ] De Sousa P A, Dobrinsky J R, Zhu J, *et al.* Somatic cell nuclear transfer in the pig: control of pronuclear formation and integration with improved methods activation and maintenance of pregnancy. *Biol Reprod*, 2002, **66**(3):642 ~ 650.
- [ 7 ] Chesne P, Adenot P G, Viglietta, *et al.* Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol*, 2002, **20**(4):366 ~ 369.
- [ 8 ] Polejaeva I A, Chen S H, Vaught T D, *et al.* Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 2000, **407**:86 ~ 90.
- [ 9 ] Onishi A, Iwamoto M, Akita T, *et al.* Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 2000, **289**:1 188 ~ 1 190.
- [ 10 ] Bethausser J, Forsberg E, Augenstein M, *et al.* Production of cloned pigs from *in vitro* systems. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**:1 055 ~ 1 059.
- [ 11 ] Meirelles F V, Bordignon V, Watanabe Y, *et al.* Complete replacement of the mitochondrial genotype in a *Bos indicus* calf reconstructed by nuclear transfer to a *Bos taurus* oocyte. *Genetics*, 2001, **158**: 351 ~ 356.
- [ 12 ] Dominko T, Mitalipova M, Haley B, *et al.* Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biol Reprod*, 1999, **60**:1 496 ~ 1 502.
- [ 13 ] Hwang W, Kim K, Kini G, *et al.* Interspecies somatic cell nuclear transfer for the production of endangered Korean tiger (*Panthera tigris altaica*). *Theriogenology*, 2001, **55**:271.
- [ 14 ] 王敏康等. 异种杂交及核移植. 动物学杂志, 2001, **36**(5):74 ~ 78.
- [ 15 ] Eggan K, Akutsu H, Loring J, *et al.* Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**:6 209 ~ 6 214.
- [ 16 ] Dinnyes A, King T, Wilmot I, *et al.* Sheep somatic cell nuclear transfer: effect of breed and culture system on embryonic and fetal development. *Theriogenology*, 2001, **55**: 264.
- [ 17 ] Amano T, Kato Y, Tsunoda Y. Full-term development of enucleated mouse oocytes fused with embryonic stem cells from different cell lines. *Reproduction*, 2001, **121**: 729 ~ 733.
- [ 18 ] Kuhholzer B, Prather R S. Synchronization of porcine fetal fibroblast cells with topoisomerase-inhibitor Hoechst 33342. *Anim Reprod Sci*, 2001, **66**: 109 ~ 116.
- [ 19 ] Zhou Q, Boulanger L, Renard J P. A simplified method for the reconstruction of fully competent mouse zygotes from adult somatic donor nuclei. *Cloning*, 2000, **2**:35 ~ 44.
- [ 20 ] Fulka J Jr, Moor R M. Noninvasive chemical enucleation of mouse oocytes. *Mol Reprod Dev*, 1993, **34**:427 ~ 430.
- [ 21 ] Baguisi A, Overstrom E W. Induced enucleation in nuclear transfer procedures to produce cloned animals. *Theriogenology*, 2000, **53**:209.
- [ 22 ] Ono Y, Shimosawa N, Ito M, *et al.* Cloned mice from fetal fibroblast cells arrested at metaphase by a serial nuclear transfer. *Biol Reprod*, 2001, **64**:44 ~ 50.
- [ 23 ] Amano T, Tani T, Kato Y, *et al.* Mouse cloned from embryonic stem (ES) cells synchronized in metaphase with nocodazole. *J Exp Zool*, 2001, **289**:139 ~ 145.
- [ 24 ] Oback B, Wiersema A T, Gaynor P, *et al.* Cloned cattle derived from a novel zona-free embryo reconstruction system. *Cloning Stem Cells*, 2003, **5**(1):3 ~ 12.
- [ 25 ] Vajta G, Peura T T, Holm P. New Method for Culture of zona-included or zona-free embryos: the well of the well (WOW) system. *Molecular Reproduction and Development*, 2000, **55**: 256 ~ 264.
- [ 26 ] Peura T T. Improved *in vitro* development rates of sheep somatic nuclear transfer embryos by using a reverse-order zona-free cloning method. *Cloning Stem Cells*, 2003, **5**(1):13 ~ 24.
- [ 27 ] Ozil J P, Huneau D. Activation of rabbit oocytes: the impact of the Ca<sup>2+</sup> signal regime on development. *Development*, 2001, **128**:917 ~ 928.
- [ 28 ] Dinnyes A, Hxao Y, Nagai T. Parthenogenetic activation of porcine oocytes by electric pulse and/or butyrolactone I treatment. *Cloning*, 2000, **4**:209 ~ 216.
- [ 29 ] Mitalipov S M, Nusser K D, Wolf D P. Parthenogenetic activation of rhesus monkey oocytes and reconstructed embryos. *Biol Reprod*, 2001, **65**: 253 ~ 259.
- [ 30 ] Knott J G, Kasinathan P, Wu H, *et al.* Effect of porcine sperm factor on intracellular calcium and activation of bovine oocytes and development of nuclear transfer embryos. *Theriogenology*, 2001, **55**:455.
- [ 31 ] Campbell K H, McWhir J, Ritchie W A, *et al.* Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 1996, **380**:64 ~ 66.
- [ 32 ] Boquest A C, Day B N, Prather R S. Flow cytometric cell

- cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells. *Biol Reprod*, 1999, **60**:1 013 ~ 1 019.
- [33] Pallante B A, Telfer E E, Ansell J, *et al.* Mouse lymphocytes as a model to compare the nuclear transfer efficiency of G0 and G1 cells. *Theriogenology*, 2001, **55**:282.
- [34] Miyoshi K, Rzucidlo S J, Gibbone J R, *et al.* Development of porcine embryos reconstituted with somatic cells and enucleated metaphase I and II oocytes matured in a protein-free medium. *BMC Dev Biol*, 2001, **1**:12.
- [35] Wakayama T, Yanagimachi R. Effect of cytokinesis inhibitors, DMSO and the timing of oocyte activation on mouse cloning using cumulus cell nuclei. *Reproduction*, 2001, **122**:49 ~ 60.
- [36] Vignon X, Chesne P, Le Bourhis D, *et al.* Developmental potential of bovine embryos reconstructed from enucleated matured oocytes fused with cultured somatic cells. *C R Acad Sci III*, 1998, **321**: 735 ~ 745.
- [37] Bordignon V, Smith L C. Telophase enucleation: an improved method to prepare recipient cytoplasts for use in bovine nuclear transfer. *Mol Reprod Dev*, 1998, **49**:29 ~ 36.
- [38] Baguisi A, Behboodi E, Melican D T, *et al.* Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol*, 1999, **17**:456 ~ 461.
- [39] Wrenzycki C, Herrmann D, Keskintepe L, *et al.* Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Hum Reprod*, 2001, **16**:893 ~ 901.
- [40] Shiga K, Fujita T, Hirose K, *et al.* Production of calves by transfer of nuclei from cultured somatic cells obtained from Japanese black bulls. *Theriogenology*, 1999, **52**:527 ~ 535.
- [41] Geisart R D, Zavy M T, Moffat R J, *et al.* Embryonic steroids and the establishment of pregnancy in pigs. *J Reprod Fertil*, 1990, **40**(suppl): 293 ~ 305.
- [42] Christenson R K, Day B N. Maintenance of unilateral pregnancy in the pig with induced corporalutea. *J Anim Sci*, 1971, **32**: 282 ~ 286.
- [43] Wells D N, Misica P M, Tervit H R. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod*, 1999, **60**:996 ~ 1 005.
- [44] McCreath K J, Howcroft J, Campbell K H, *et al.* Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*, 2000, **405**:1 066 ~ 1 069.
- [45] Denning C, Burl S, Ainslie A, *et al.* Deletion of the alpha (1, 3) galactosyl transferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**:559 ~ 562.
- [46] Urano K, Urakawa M, Aoyagi Y. Effect of post-fusion or pre-fusion activation on nuclear transfer results of bovine embryonic stem like cells. *Theriogenology*, 2001, **55**:295.
- [47] Deng M, Barber M, Yang J. *In vitro* development of porcine enucleated oocytes receiving nuclei from pig ES-like cell lines. *Biol Reprod*, 2001, **64**(suppl 1):125.
- [48] Betts D, Bordignon V, Hill J, *et al.* Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomere length in cloned cattle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**:1 077 ~ 1 082.
- [49] Hill J R, Winger Q A, Burghardt R C, *et al.* Bovine nuclear transfer embryo development using cells derived from a cloned fetus. *Anim Reprod Sci*, 2001, **67**:17 ~ 26.
- [50] Wakayama T, Shinkai Y, Tamashiro K L, *et al.* Cloning of mice to six generations. *Nature*, 2000, **407**:318 ~ 319.
- [51] Wrenzycki C, Wells D, Herrmann D, *et al.* Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. *Biol Reprod*, 2001, **65**: 309 ~ 317.
- [52] De Sousa P A, King T, Harkness L, *et al.* Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. *Biol Reprod*, 2001, **65**:23 ~ 30.
- [53] Hill J R, Burghardt R C, Jones K, *et al.* Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol Reprod*, 2000, **63**:1 787 ~ 1 794.
- [54] Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, *et al.* Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science*, 2001, **293**: 95 ~ 97.
- [55] Tamashiro K L K, Wakayama T, Blanchard R J, *et al.* Postnatal growth and behavioral development of mice cloned from adult cumulus cells. *Biol Reprod*, 2000, **63**:328 ~ 334.