

中国红系冀南黄牛的克隆及其繁殖性能

戴蕴平 连正兴 朱化彬 龚国春 王莉莉 王海萍 赵志辉
朱庆鸿 费菁 李宁*

(中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094; 中国农业大学动物科学技术学院, 北京 100094; 中国农业科学院畜牧研究所, 北京 100094. * 联系人, E-mail: ninglbau@public3.bta.net.cn)

摘要 以濒临灭绝的中国红系冀南黄牛的颗粒细胞为核供体进行了体细胞克隆研究. 共操作卵母细胞 211 枚, 去核 166 枚(79%), 构建重构胚 112 枚(67.4%), 其中分裂的重构胚为 94 枚(83%), 第 7 天发育成囊胚数为 48 枚(43%). 共移植荷斯坦奶牛受体 6 头, 妊娠 2 头(33%), 其中 1 头流产, 另 1 头产出一头健康牛犊. 比较了不同融合液(甘露醇和 Zimmerman 融合液)对克隆胚胎融合率和囊胚发育率的影响以及不同激活方法(钙离子载体(A23187)+6-DMAP 和放线菌酮+CB)对克隆胚胎囊胚发育率的影响. 结果表明: () 在电场强度为 2.5 kV/cm, 脉冲时间为 10 ms, 脉冲次数为 2 的条件下, 克隆胚胎在甘露醇融合液中的电融合率比在 Zimmerman 融合液中的电融合率高(71% vs 61%, $P < 0.05$), 且囊胚发育率差异不显著(36% vs 39%, $P > 0.05$); () 以钙离子载体(A23187)+6-DMAP 激活组与放线菌酮+CB 激活组处理的克隆胚胎囊胚发育率无明显差别(42% vs 46%, $P > 0.05$). 依据牛的 28 个微卫星位点对供体牛、克隆牛和代孕母牛进行微卫星分析, 结果表明, 克隆牛与供体牛的遗传物质完全相同, 而与代孕母牛在遗传上无任何相关. 目前, 该克隆冀南黄牛已经产犊, 克隆冀南黄牛的各项繁殖性能指标均与正常冀南牛犊相符, 所产牛犊的生长发育正常.

关键词 冀南黄牛 体细胞克隆 家畜保种 胚胎激活

自克隆羊多莉诞生以来, 体细胞克隆技术有了飞速的发展, 它在阐明细胞全能性和核质相互作用以及细胞核的再程序化方面都有十分重要的意义. 目前, 人们已将该技术应用于转基因动物的培育^[1~4]、治疗性克隆和组织再生等方面的研究^[5,6]. 动物克隆技术的另一重要用途就是对珍稀濒危动物进行保种, 如日本克隆出一大批日本河牛^[7,8]、韩国克隆出一大批特有的韩牛^[9]、新西兰克隆出了几乎已经灭绝的“涯牛”^[10]. 近年来, 应用异种克隆保护珍稀物种也正在发展和尝试^[11,12]. 冀南黄牛为我国特有的珍稀畜种, 主要分布在我国华北邯郸一带. 冀南黄牛的主要特点是抗逆性强、耐粗饲、肉质鲜美等, 但生长速度缓慢. 由于近十几年来利用国外肉牛进行杂交改良, 导致冀南黄牛的数量急剧减少^[13,14]. 本研究利用中国红系冀南黄牛的颗粒细胞为核供体, 培育出了我国第一头体细胞克隆红系冀南黄牛, 为利用体细胞克隆技术保护珍稀畜种的保护进行了新的有效探索.

1 材料与方法

() 化学试剂与实验材料. 培养血清购自

Hyclone 公司, M199 和 PBS 为 Gibco 产品, 其余药品除特别注明外均为 Sigma 公司产品.

() 供体细胞的制备. (1) 活体采卵. 利用超声波活体采卵(OPU)技术, 从一头 6 年龄的红系冀南黄牛(冀南牛分红系和黄系两类, 目前黄系已经绝灭)卵巢采集卵丘-卵母细胞复合体(COCs). 以含 M199 + 10 mmol/L Hepes + 2% FBS + 0.006%肝素的采集液收集 COCs, 以 39 °C 预热的 PBS + 0.2% FBS 液洗涤几次并转到成份为 M199 + 10% mmol/L Hepes + 10% FBS 的运输液中带回实验室. (2) 颗粒细胞系建立. 以 0.1%透明质酸酶对离心后的沉淀轻轻吹打 3 min, 再以 DMEM/F12(Gibco) + 10% FBS 离心(485g)洗涤 2 次, 每次 5 min, 弃上清液, 放入 10 mL DMEM/F12 (Gibco) + 10% FBS + 1 mmol/L 丙酮酸钠 + 100 U/mL 青霉素 + 100 μg/mL 链霉素的培养液重悬细胞至 10 mL, 取 2 mL 移入 35 mm 细胞培养皿中, 在 5% CO₂ 培养箱 37 °C 培养. 待细胞生长汇合后, 以 0.25% 胰蛋白酶消化传代 2~3 次, 分批以 DMEM/F12 + 20% FBS + 10% DMSO 冻存. (3) 供体细胞的同期化处理. 常规培养细胞生长至汇合后, 将培养液中 FBS 从 10%降至 0.5%对细胞进行血清饥饿处理, 在 5% CO₂

培养箱中 37 °C 培养 3~4 d 后细胞用作核供体进行核移植操作。

() 卵母细胞的成熟培养. 从屠宰厂收集成年牛的卵巢, 置于 30 °C 的生理盐水在 4 h 内送到实验室, 37 °C 的 PBS 液中清洗 3 遍后, 以直径为 0.7 mm 针头抽取直径为 2~8 mm 的卵泡, 回收形态均匀、结构致密的 COCs, 以成熟液(M199 + 10% FBS + 0.01 U/mL bFSH + 0.01 U/mL bLH + 1 µg/mL 雌二醇)洗涤 2 遍, 然后将 COCs 以 50~60 枚/孔放入含 500 µL 成熟液的四孔板, 在 5% CO₂ 培养箱中 38.5 °C 成熟培养 18~20 h 后, 将成熟的卵母细胞放入 0.1%透明质酸酶的管内振荡 2~3 min 后, 再用玻璃管轻轻吹打, 使卵丘细胞与卵母细胞完全脱离, 选择形态完整、细胞质均匀并排出第一极体的卵母细胞为胞质受体。

() 卵母细胞的去核. 卵母细胞的去核详见文献[15~17], 简述如下: 将带有第一极体的卵母细胞移入 M199 + 10% FBS + 7.5 µg/mL 细胞松弛素 B(CB) + 1 µg/mL Hoechst33342 操作液中, 在 20 倍显微镜下用 1 玻璃针将极体上方透明带切一小口, 再用 20 µm 直径的玻璃管将第一极体以及其下方的卵母细胞内的染色体一并吸除, 并在 UV 光下检查, 确保去核完全。将去核卵母细胞放入 M199 + 20% FBS 的溶液中洗 3 遍, 放入 5% CO₂ 箱中 38.5 °C 培养备用。

() 移核与融合. 将血清饥饿 4 d 的颗粒细胞用 0.1%胰蛋白酶消化 4 min, 选择细胞直径为 12~15 µm 的颗粒细胞用 20 µm 直径玻璃管将其移入去了核的卵母细胞透明带内, 并使供体细胞与卵母细胞膜紧密接触, 然后将其放入 0.3 mol/L 甘露醇, 0.15 mmol/L CaCl₂, 0.15 mmol/L MgSO₄ 或 Zimmerman 液 [18] 中平衡(现用现配)3~5 min 后放入融合槽内, 转动卵细胞使供体细胞与卵母细胞接触而与电场垂直。同时在直流脉冲的场强为 2.5 kV/cm, 脉冲时间为 10 µs, 脉冲次数为 2 次, 脉冲间隔为 1 s 的条件下融合(融合仪为 BTX 公司的 ECM-2001)后, 迅速将重构胚移入 M199 + 10% FBS 液中, 放置 0.5 h 后观察融合率, 挑选融合胚进行下一步激活处理。

() 激活与培养. 将重构胚放入 5 µmol/L A23178 液中 5 min 后换到 1.9 mmol/L 6-DMAP 液中 4 h, 或 5 µg/mL 细胞松弛素 B(CB) + 10 µg/mL 放线菌酮液中 5 h。激活的重构胚放入 CR1aa + 5% FBS 液中培养 7 d 后观察核移植胚的囊胚发育率, 并移植于激素诱导同期发情受体母牛子宫角内。

() 胚胎移植与妊娠检测. 将形态优良的第 7 天的克隆囊胚移入已同期的受体黄牛的子宫角内(每头受体移植 2 枚克隆囊胚), 分别在移植后的第 60 天和第 90 天进行直肠检测以确定妊娠率。

() 克隆牛的分子检测. 卵母细胞的去核详见文献[19], 简述如下: 提取核供体细胞、克隆黄牛、2 头流产克隆胎儿、克隆黄牛的代孕母亲和随机抽样获得的 1 头荷斯坦奶牛的基因组 DNA, 依据国际牛基因组图谱 (<http://www.ri.bbsrc.ac.uk/bovmmap/bovmmap.html>) 选用 28 对基本覆盖牛基因组的微卫星标记用于分子鉴定。微卫星标记的 PCR 扩增程序依据国际牛基因组图谱网站提供的条件, 核基因型分析在 PE377 全自动测序仪上完成, 分析软件为 Genotyper 2.5 版。耦合率定义为 2 头随机选择的动物拥有相同基因型的概率, 其计算方法根据参考文献[20,21]。

() 克隆牛的繁殖性能测定. 克隆母牛第一次出现明显的接受爬跨(站立发情)的月龄为克隆牛初情期, 发情周期是指两次发情之间的间隔时间。

() 克隆牛的人工授精. 克隆牛正常发情后以冷冻精液进行人工授精, 所用精液为红色安格斯肉牛冷冻精液。克隆牛站立发情后 10~12 h 人工输精 1 次, 每头牛每次 1 支细管冷冻精液, 间隔 10~12 h 再输精一支细管冷冻精液。

() 克隆牛及其后代牛的体尺测定. 克隆牛及其后代牛的体尺测定依据文献[22]。

() 统计分析. 统计结果用 *t* 检验进行分析, $P < 0.05$ 时为有显著差异。

2 结果

2.1 冀南黄牛颗粒细胞系的建立

经过原代培养、继代培养、冷冻保存等细胞体外培养操作, 建立了冀南黄牛颗粒细胞系(图 1(a))。

2.2 不同融合液对克隆胚胎融合率和囊胚发育率的影响

在电场强度为 2.5 kV/cm, 脉冲时间为 10 µs, 脉冲次数为 2 的条件下, 克隆胚胎在甘露醇融合液中的电融合率比在 Zimmerman 融合液中的电融合率高 (71% vs 61%, $P < 0.05$), 且囊胚发育率差异不显著 (36% vs 39%, $P > 0.05$) (表 1)。

2.3 不同激活方法对克隆胚胎囊胚发育率的影响

以钙离子载体(A23187)+6-DMAP 激活组处理的克隆胚胎的分裂率高于放线菌酮+CB 激活组(71% vs

61%, $P < 0.05$), 但囊胚发育率差异不显著(42% vs 46%, $P > 0.05$) (表 2).

2.4 克隆胚胎的发育情况

实验共操作卵母细胞 211 枚, 去核 166 枚(79%), 构建重构胚 112 枚(67.4%, 图 1(b)), 其中分裂的重构胚为 94 枚(83%, 图 1(c)), 第 7 天发育成囊胚数为 48 枚(43%, 图 1(d)). 共移植荷斯坦奶牛受体 6 头(每头受体移植 2 枚第 7 天克隆囊胚), 妊娠 2 头(33%). 其中 1 头妊娠母牛于移植 187 d 后流产双胞胎, 病理解剖

表 1 不同融合液对克隆胚胎发育的影响^{a)}

融合液	注核后卵母细胞数	融合数(%)	囊胚数(%)
甘露醇	133	94(71%)a	33(36%) a
Zimmerman	120	73(61%)b	28(39%)a

a) 实验共重复 6 次, 同列内不同字母示差异显著, $P < 0.05$, 下同

表 2 不同激活方法对克隆胚胎发育的影响

激活方法	融合数	分裂数(%)	囊胚数(%)
A23187+6-DMAP	75	66(88%)a	31(42%)a
放线菌酮+CB	37	28(76%)b	17(46%)a

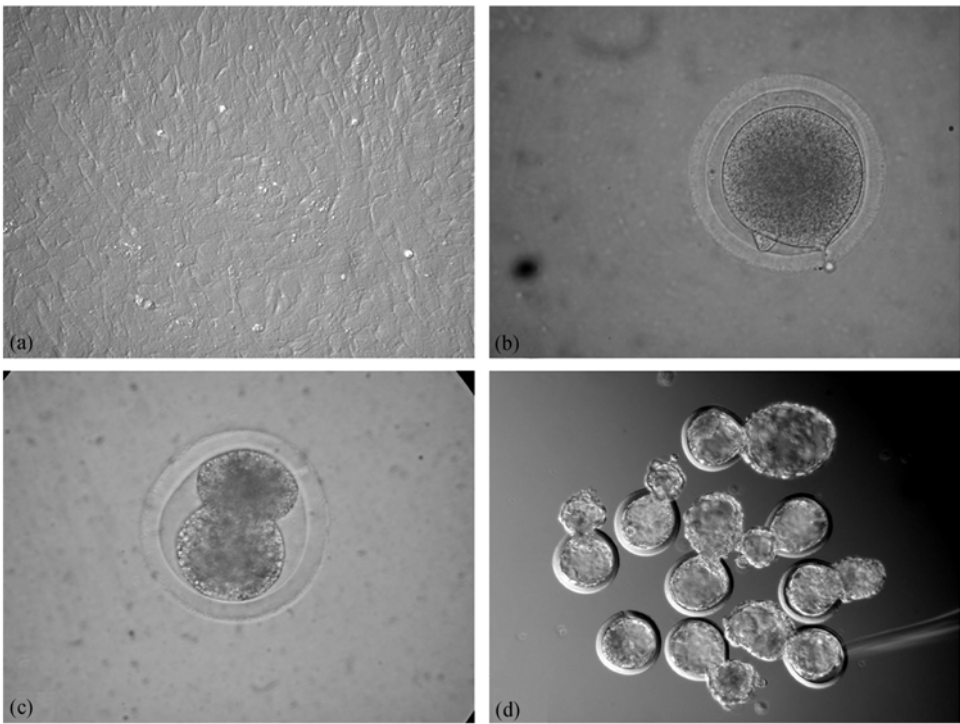


图 1 体外培养的颗粒细胞和克隆胚胎

(a) 冀南黄牛颗粒细胞($\times 100$); (b) 融合前去核卵母细胞与供体细胞组合体($\times 400$); (c) 2-细胞克隆胚胎($\times 400$); (d) 第 7 天克隆囊胚($\times 200$)



图 2 克隆冀南黄牛“波娃”及其后代

(a) 克隆冀南黄牛“波娃”及其代孕 Holstein 奶牛; (b) 2 岁的波娃及其所产的牛犊

并未发现胎儿发育异常,但是胎盘上子叶的数量只有 32 个,少于正常数量,而且子叶的面积较大,并在胎儿胎盘上附着有大量的片状白色晶状体物;另一头妊娠母牛于移植 280 d,经剖腹产后得到 1 头重 31 公斤的健康母牛犊“波娃”(图 2(a)).

2.5 克隆牛的微卫星鉴定

对覆盖全基因组的 28 对微卫星标记座位的基因型分析结果表明(表 3),供体冀南黄牛和克隆黄牛“波娃”以及 2 头流产克隆胎儿的耦合率均为 3.45×10^{-15} . 在所检测的 28 个微卫星标记中,供体冀南黄牛、克

隆黄牛、2 头流产克隆胎儿同代孕母亲及随机抽样的荷斯坦奶牛的基因型至少在 18 个微卫星标记座位上不同.

按照国内外血缘鉴定标准,当偶合率小于 1×10^{-12} 时,则认定它们的遗传物质完全相同;当 3 个标记基因型不匹配时,可以排除其亲子关系. 因此得出以下结论: () 供体冀南黄牛与克隆黄牛“波娃”、及 2 头流产克隆胎儿的遗传物质在 28 个微卫星基因座上完全相同,认定它们为相同来源; () 供体冀南黄牛与克隆黄牛“波娃”、及 2 头流产克隆胎儿与代孕母亲及随机抽样的荷斯坦奶牛分属不同来源.

表 3 微卫星鉴定中各个体 28 个位点的基因型

位点序号	位点名称	等位基因 ^{a)}	等位基因 ^{b)}	供体牛	波娃	流产胎儿 1	流产胎儿 2	代孕母牛	随机奶牛 ^{c)}
1	INRA063	4	2	176/178	176/178	176/178	176/178	178/178	178/178
2	INRA005	4	3	139/148	139/148	139/148	139/148	139/141	139/141
3	ETH225	10	3	138/142	138/142	138/142	138/142	144/144	142/144
4	ILSTS005	4	3	184/194	184/194	184/194	184/194	186/186	184/186
5	HEL51	6	5	149/151	149/151	149/151	149/151	155/167	155/163
6	HEL1	6	4	107/111	107/111	107/111	107/111	103/103	113/113
7	INRA035	5	3	101/101	101/101	101/101	101/101	99/117	101/101
8	ETH152	7	4	197/203	197/203	197/203	197/203	197/203	199/205
9	INRA023	8	4	215/215	215/215	215/215	215/215	207/207	207/211
10	ETH10	10	2	217/219	217/219	217/219	217/219	217/217	217/219
11	HEL9	9	4	155/155	155/155	155/155	155/155	165/167	159/167
12	CSSM663	12	5	177/183	177/183	177/183	177/183	186/194	179/183
13	INRA0325	6	4	180/184	180/184	180/184	180/184	182/186	182/184
14	ETH3	8	3	114/116	114/116	114/116	114/116	116/116	116/126
15	BM2113	11	5	132/136	132/136	132/136	132/136	134/138	134/140
16	BM1824	6	5	180/190	180/190	180/190	180/190	182/188	178/182
17	HEL135	5	3	193/193	193/193	193/193	193/193	191/193	189/189
18	INRA037	7	4	120/128	120/128	120/128	120/128	132/132	126/126
19	BM1818	8	2	266/266	266/266	266/266	266/266	263/266	263/266
20	ILSTS006	6	5	291/293	291/293	291/293	291/293	295/295	289/297
21	MM12	9	2	119/119	119/119	119/119	119/119	131/131	131/131
22	CSRM60	7	4	97/99	97/99	97/99	97/99	93/95	95/95
23	ETH185	8	3	234/236	234/236	234/236	234/236	232/234	232/234
24	SPS115	4	4	251/253	251/253	251/253	251/253	251/255	247/253
25	HAUT24	6	4	117/123	117/123	117/123	117/123	107/119	107/123
26	TGLA227	13	5	84/86	84/86	84/86	84/86	86/92	82/94
27	TGLA126	6	5	116/120	116/120	116/120	116/120	144/144	118/126
28	TGLA122	16	3	154/154	154/154	154/154	154/154	152/152	154/156

a) 为国际牛基因图谱中该微卫星标记座位的等位基因数量; b) 为本研究中微卫星标记座位的等位基因数量; c) 为随机抽样的荷斯坦奶牛

表 4 克隆冀南黄牛“波娃”及其后代的生长发育情况

	时间	进食量/kg		体重/kg	体尺/cm				
		精料	粗料		体长	体高	体斜长	胸围	管围
克隆牛	2 岁	2.5	3.0	350	122	123	135	170	19
克隆牛后代	出生	哺乳		25.5	—	—	—	—	—
	3 月	0.5	自由采食	100	87	85	95	111	15

2.6 克隆冀南黄牛的 生长和繁殖性能

克隆冀南黄牛波娃于出生后 15 月龄初次发情,发情周期平均 21 d,发情持续期为 2 d.在第 4 个发情期以安格斯肉牛精液进行人工授精 2 次,90 d 进行直肠检测确定已经妊娠,并于配种 272 d 后顺产一头健康母牛犊(图 2(b)).目前,该牛犊已到 4 月龄.克隆冀南黄牛及其后代在不同发育时期的体重、体尺和进食量见表 4.结果显示,克隆冀南黄牛波娃的各项生长指标和繁殖性能指标与正常冀南牛犊相符^[23],所产牛犊的生长发育正常.

3 讨论

体细胞克隆技术的成功,阐明了这样一个事实,那就是一个高度分化了的体细胞在一定条件下仍然能够恢复其全能性.从理论上讲,动物体细胞的数量几乎是无限的.从 20 世纪以来,世界范围内珍稀、濒危动物的退化灭绝速度在逐步加快.新兴的动物克隆技术作为保护珍稀动物并保持其物种纯系的有效方法之一^[24],已经受到了人们的广泛关注.但是,由于目前人们对动物克隆的相关机理并不十分清楚,特别是对供体细胞核内物质再程序化过程知之甚少,所以克隆动物的总体效率还不是很高.即便在克隆效率相对较高的克隆牛的培育过程中,克隆胚胎的流产率也高达 20%~50%,是正常胚胎的 2 倍以上,而且流产现象发生在克隆牛妊娠的全过程^[25].目前,导致克隆牛流产的原因尚不明确.但流产克隆胎儿的胎盘普遍异常^[26].在本研究中,我们对妊娠 187 d 后流产的克隆牛双胞胎的进行了病理解剖,并未发现胎儿发育异常.但是,胎盘上子叶的数量只有 32 个,远较正常的少.而且,子叶的面积较大,并在胎盘上附着有大量的不知名的片状白色晶状体.导致克隆牛初生的死亡率高的因素主要有难产、巨婴症和妊娠期延长^[27]等.克隆牛分娩经常表现出分娩信号不足,冀南黄牛的妊娠期在 272 d 左右,但克隆冀南黄牛“波娃”的代孕母亲在 280 d 时仍无任何产前症状,所以

进行了剖腹产分娩.

从目前的研究结果看,相当一部分的克隆动物某些器官的发育不正常也是导致克隆动物出生后死亡的一个重要原因^[28].人们发现导致这些发育异常的因素很可能是克隆动物体内的某些基因不正常表达和细胞核的甲基化异常^[29,30].一般认为,重构胚的激活方法和激活是否完全对克隆胚胎的发育有十分重要的影响^[31],所以我们对重构胚的激活过程进行了研究.结果表明,以钙离子载体(A23187) + 6-DMAP 激活组处理的克隆胚胎的分裂率高于放线菌酮+CB 激活组(71% vs 61%, $P < 0.05$),但囊胚发育率差异不显著(42% vs 46%, $P > 0.05$),说明两种方法激活效果相似.因此,寻找克隆胚胎更加高效的激活方式是完全必要的.影响克隆效率的另一个因素是核供体细胞与去核卵母细胞的融合效率,由于实验所用细胞系不同,融合方式不同,都会影响到融合的效率.目前世界上核与卵母细胞复合体的总体融合效率为 20%~90%.本研究在电场强度为 2.5 kV/cm,脉冲时间为 10 μ s,脉冲次数为 2 的条件下,比较了不同融合液(甘露醇和 Zimmerman 融合液)对克隆胚胎融合率和囊胚发育率的影响.实验结果显示,克隆胚胎在甘露醇融合液中的电融合率比在 Zimmerman 融合液中的电融合率高(71% vs 61%, $P < 0.05$),且重构胚的囊胚发育率差异不显著(36% vs 39%, $P > 0.05$).

致谢 感谢河北芦台农场新华奶牛场的大力配合;感谢公安部物证鉴定中心郑秀芬博士对克隆牛的微卫星鉴定.本工作为国家高技术研究发展计划(批准号: 2001AA213091, 2002AA206111)和北京市自然科学基金(批准号: 5030001)资助项目.

参 考 文 献

1 Schnieke A E, Kind A J, Ritchie W A, et al. Human factor transgenic sheep produced by transfer of nuxlei from transfected fetal fibroblast. Science, 1997, 278: 2130~2133[DOI]
2 McCreath K J, Howcroft J, Campbell K H S, et al. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. Nature, 2000, 405: 1066~1069[DOI]

- 3 Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J, et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 1998, 280: 1256~1258[DOI]
- 4 Keefer C L, Baldassare H, Keyson 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[DOI]
- 5 Surani M A. Reprogramming a somatic nucleus by trans-modification activity in germ cells. *Semin Cell Dev Biol*, 1999: 10: 273~277[DOI]
- 6 Kuroiwa Y, Kasinathan P, Choi Y J, et al. Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin. *Nat Biotechnol*, 2002, 20: 889~894[DOI]
- 7 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[DOI]
- 8 Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, et al. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long term culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 990~995[DOI]
- 9 Han Y M, Kang Y K, Koo D B, et al. Nuclear reprogramming of cloned embryos produced *in vitro*. *Theriogenology*, 2003, 59(1): 33~44[DOI]
- 10 Well D N, Misticam P M. Adult somatic all nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderly Island cattle breed. *Reproduction Fertilization Development*, 1998, 10: 369~378[DOI]
- 11 陈大元, 孙青原, 刘冀珑, 等. 大熊猫供核体细胞在兔卵胞质中可去分化而支持早期重构胚发育. *中国科学, C 辑*, 1999, 29(3): 324~330
- 12 Vogel G. Cloned gaurus with a short-lived success. *Science*, 2001, 291: 409[DOI]
- 13 陈幼春, 曹红鹤. 中国黄牛品种多样性及其保护. *生物多样性*, 2001, 9(3): 275~283
- 14 马月辉, 陈幼春, 冯维祺. 中国家养动物多样性概况. *畜牧兽医学报*, 2000, 31(5): 397~398
- 15 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[摘要][PDF]
- 16 龚国春, 戴蕴平, 樊宝良, 等. 利用体细胞核移植技术生产转基因牛. *科学通报*, 2003, 48(24): 2528~2533
- 17 龚国春, 戴蕴平, 朱化彬, 等. 供体细胞类型对体细胞克隆牛生产效率的影响. *中国科学, C 辑*, 2004, 34(3): 257~262[摘要]
- 18 Zimmermann U, Vienken J. Electric field-induced cell-to-cell fusion. *J Membr Biol*, 1982, 67(3): 165~182[DOI]
- 19 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 Develop*, 2004, 69(3): 278~288
- 20 Heaton M P, Harhay G P, Bennett G L, et al. Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U. S. beef cattle. *Mammalian Genome*, 2002, 13: 272~281[DOI]
- 21 Holt C L, Stauffer C, Wallin J M, et al. Practical applications of genotypic surveys for forensic STR testing. *Forensic Sci Int*, 2000, 112: 91~109[DOI]
- 22 冀一伦, 编. 实用养牛科学. 北京: 中国农业出版社, 2001
- 23 中国牛品种志编写组, 编. 中国牛品种志. 上海: 上海科学技术出版社, 1991
- 24 Lanza R P, Cibelli J B, Diaz F, et al. Cloning of an endangered species. *Cloning*, 2000, 2: 79~90[DOI]
- 25 Heyman Y, Chavatte-Palmer P, LeBourhis D, et al. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol Reprod*, 2002, 66, 6~13[DOI]
- 26 Hill J R, Burghard 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, 1787~1794[DOI]
- 27 Wilson J M, Williams J D, Bondioli K R, et al. Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. *Anim Reprod Sci*, 1995, 38: 73~83[DOI]
- 28 Garry F B, Adams R, McCann J P, et al. Postnatal characteristic of calves produced by nuclear transfer cloning. *Theriogenology*, 1996, 45: 141~152[DOI]
- 29 Kang Y K, Koo K B, Park J S, et al. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat Genet*, 2001, 28: 173~177[DOI]
- 30 Kato Y, Tani T, Tsunoda Y, et al. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nat Genet*, 2002, 31: 216~219[DOI]
- 31 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[DOI]

(2005-05-17 收稿, 2005-08-24 收修改稿)