

# 体细胞克隆牛：供体细胞和受体的影响

陈大元<sup>①\*</sup> 李劲松<sup>①③\*</sup> 韩之明<sup>①</sup> 雷蕾<sup>①</sup> 刘忠华<sup>①</sup> 寇朝辉<sup>①</sup> 马世援<sup>②</sup>  
杜启科<sup>②</sup> 孙青原<sup>①</sup>

(①中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080; ②山东中大动物胚胎工程中心, 曹县 274400;

③扬州大学畜牧兽医学院, 扬州 225009. \* 同等贡献. E-mail: chendy@panda.ioz.ac.cn)

**摘要** 利用体外培养的成年母牛(GN)和公牛(GLV)的外耳成纤维细胞作为核供体, 进行了规模较大的克隆牛研究, 并成功地获得了一批成年体细胞克隆牛犊. 经核移植构建的重构胚的囊胚发育率分别为 23.98%(GN, 123/513)和 29.55%(GLV, 138/467). 然而, 雌性重构胚(GN)发育满期的比例却明显高于雄性重构胚(GLV), 分别为 8.02%和 1.82%. 比较了鲁西黄牛、青年 Holstein 奶牛及经产 Holstein 奶牛 3 种不同受体牛的移植效果. 在移植 GN 重构胚时, 3 种受体牛的妊娠率无显著差异, 但黄牛的流产率高达 85.71%, 显著高于青年奶牛及经产奶牛的流产率(分别为 14.29%和 0%,  $P < 0.05$ ). 黄牛受体生产的克隆牛犊占移植胚胎总数的 1.54%, 显著低于青年 Holstein 奶牛及经产 Holstein 奶牛(分别是 10.39%及 20.0%,  $P < 0.05$ ). 而移植 GLV 重构胚时, 3 种受体牛的妊娠率、流产率及产犊比率均无显著差异.

**关键词** 牛 体细胞 核移植 重构胚 克隆

核移植是一种评估核发育潜能以及分析供核与受体胞质相互关系的有效技术. 用培养的蛙皮肤角质形成细胞核进行核移植, 可以支持个体发育到蝌蚪阶段, 但尚无发育到成体的报道<sup>[1]</sup>. 这就提出一个问题, 即已分化的成体细胞核是否能被完全重新编程? 首例来源于分化细胞的克隆个体是用绵羊胚胎来源的细胞系作为供核细胞进行核移植获得的<sup>[2]</sup>. 1997 年, 来源于成体乳腺细胞的克隆绵羊“多莉”诞生<sup>[3]</sup>. 这些结果表明, 已分化的体细胞并没有发生遗传物质不可逆转的改变, 仍具有发育的全能性. 随后, 用胎儿或成体细胞作为供体的核移植在小鼠<sup>[4]</sup>、山羊<sup>[5]</sup>、牛<sup>[6]</sup>、猪<sup>[7]</sup>、猫<sup>[8]</sup>和兔<sup>[9]</sup>等动物中获得了克隆个体. 因此, 用核移植技术大量复制高产家畜、转基因动物和珍稀动物, 不仅会产生巨大的经济价值, 对拯救濒危动物也有非常重要的意义. 但目前动物克隆存在很多问题, 如: 克隆胚胎的胎盘异常、胎儿流产率高和新生仔死亡率高, 都是动物克隆有待解决的问题. 本研究的一个目的是要证明成年体细胞核移植可以对高产优质家畜进行复制, 另一个目的是比较不同性别供核体细胞和不同受体牛的克隆效率.

## 1 材料与方法

(i) 供体细胞的培养. 供体细胞来源于两头优质牛的外耳成纤维细胞. 一头是 18 号成年 Galoway

公牛(GLV), 另一头是 603 号成年雌性高产 Holstein 奶牛(GN). 取外耳皮肤充分剪碎, 并用 0.25%胰蛋白酶(Gibco) 4℃消化 2 h 后, 37℃消化 0.5 h, 根据文献<sup>[10]</sup>所描述的方法在含 20%胎牛血清(FBS, Gibco)的 D-MEM/F-12 培养基(Gibco)中进行原代及传代培养.

(ii) 卵母细胞的体外成熟. 从山东曹县屠宰场收集性成熟的鲁西黄牛卵巢, 放入 30℃含有 1%青霉素和链霉素的无菌生理盐水中, 在 4 h 内运送至实验室. 用 18 号注射针头抽取直径为 2~10 mm 的卵泡内的卵泡液, 以获取卵丘-卵母细胞复合体(cumulus-oocyte complexes, COCs). 将 COCs 收集在 DPBS 中, 选择至少包裹 3 层以上卵丘细胞 COCs 进行成熟培养. 用含 10%FBS 的 M199 洗 2 次, 再用成熟培养液(10%FBS, 0.5 μg/mL FSH, 0.01 IU/mL LH 和 1.0 μg/mL 雌二醇的 M199, Gibco)洗 2 次, 然后进行体外成熟培养(*in vitro* maturation, IVM). 每 10 个 COCs 移入 100 μL 成熟培养液中. 将放有卵母细胞的培养皿覆盖石蜡油后置于 38.5℃, 5%CO<sub>2</sub>, 饱和湿度的培养箱中培养 19 h 后取出. COCs 经含 0.5%透明质酸酶(Sigma)的 DPBS 消化 3~5 min, 然后用玻璃细管反复吹吸去除卵丘细胞, 选择刚形成第 1 极体的卵母细胞用于核移植.

(iii) 体细胞的准备. 用于核移植的供核细胞为培养第 1 代到第 5 代的牛外耳成纤维细胞. 细胞用

0.5% FBS 饥饿 2~7 d 以诱导其进入 G<sub>0</sub> 期. 贴壁生长的细胞层用 0.25% 的胰蛋白酶于 39℃ 消化 2~3 min 后, 加入 D-MEM/F-12 终止消化, 用微量移液器反复吹打, 以获得单个的供核体细胞.

(iv) 核移植. 核移植方法按文献[11]报道操作. 将卵母细胞在含 7.5 μg/mL 细胞松弛素 B(cytochalasin B, CB, Sigma)的 M2 中预处理 15 min. 用持卵针固定刚排出第 1 极体的卵母细胞, 先用注射针在透明带极体稍下部位戳一个孔, 然后用注射针在小孔下方挤压卵母细胞, 将极体与其下的纺锤体及部分胞质挤出(挤压法去核). 供体细胞注入透明带后, 即放入电融合液(EFS)中平衡 1~2 min, 融合液含有 0.28 mol/L 甘露醇, 0.5 mmol/L Hepes, 0.05 mmol/L CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 和 0.1 mmol/L MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O. 然后移入覆盖有 EFS 的融合槽中, 通入两个直流脉冲(DC, 2.0 kV/cm, 10 μs/次, 间隔 1 s)以诱导融合. 在含 10%FBS 的 M199 中培养 0.5 h 后, 检查融合情况, 未融合的卵在 1 h 后进行另一次电融合处理.

(v) 化学活化. 所有融合卵在成熟培养后 24 h (开始进行成熟培养为 0 h)进行活化处理. 重构卵先在含 5 μmol/L A23187 的 CR1-aa(NaCl 114.7 mmol/L, KCl 3.1 mmol/L, NaHCO<sub>3</sub> 26.2 mmol/L, L-谷氨酰胺 1.0 mmol/L, 丙酮酸钠 0.4 mmol/L, 乳酸半钙 5.0 mmol/L, BSA 3 mg/mL, 酚红 10 μg/mL, 必需氨基酸 2%(体积比), 非必需氨基酸 1%(体积比))中 39℃ 处理 4 min. 用 CR1-aa 洗 5 min 后移入含 10 μg/mL 放线菌酮(cycloheximide, CHX, Sigma), 3 μg/mL 细胞松弛素 D(cytochalasin D, CD, Sigma)和 10%FBS 的 CR1-aa 中培养 1 h. 经 CR1-aa 洗 3 次后移入仅含 10 μg/mL CHX 的 CR1-aa 中继续培养 4 h.

(vi) 重构胚的体外培养. 活化好的重构胚, 每 10 枚放入一个 100 μL 含 10%FBS 的 CR1-aa 培养微滴中, 覆盖石蜡油, 在含 5%CO<sub>2</sub>, 39℃ 的饱和湿度培养箱中培养 48 h. 从第 3 天(进行核移植操作为第 1 天)开始, 将克隆胚胎与小鼠胎儿成纤维细胞共培养, 每 48 h 换一半培养液. 培养第 6 天时, 在培养液滴中加入葡萄糖使其终浓度达到 1 mg/mL. 培养至第 7, 8 和 9 天时, 统计桑葚胚和囊胚的数量. 用  $\chi^2$  检验统计组间的差异(下同).

(vii) 胚胎移植. 将 1~3 枚形态良好的囊胚移入自然发情第 7 天(发情当天为第 0 天)的受体牛子宫内, 总共将 230 枚重构胚移入 112 头受体牛内. 重构胚中

有 60 枚来源于 GLV 供核细胞, 170 枚来源于 GN 供核细胞. 采用 3 种受体牛, 分别是鲁西黄牛、青年 Holstein 奶牛和经产 Holstein 奶牛.

(viii) 微卫星 DNA 分析. 应用微卫星 DNA 分析法检测体细胞克隆牛的基因型是否与供体细胞核一致. DNA 样品来源于 GN 和 GLV 供体的外耳部组织和细胞、5 头存活的克隆牛犊的外耳部组织、9 头死亡的克隆牛犊的肌肉组织及 11 头受体牛的耳部组织. DNA 样品提取液含 10 mmol/L Tris(pH 8.0), 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1% SDS 和 0.5 mg/mL 蛋白酶 K(AMRESCO). 选取 12 对用于牛亲子鉴定微卫星引物(ETH3, ETH225, BM1824, BM2113, TGLA126, TGLA53, ETH10, MGTG4B, TGLA227, TGLA122, INRA23 和 SPS113), 根据引物的 T<sub>m</sub> 值和扩增片段的长度将 PCR 反应分为 3 组进行, 每组 4 对引物, 分别用 FAM 和 HEX 两种荧光标记. PCR 反应产物经变性处理后电泳检测(ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

## 2 结果

### 2.1 核移植胚胎体外发育的潜能

共收集了 5278 枚 COCs, 经体外成熟培养 19 h 后, 共有 2897 枚排出第 1 极体, 成熟率为 54.89%. 选择其中 2016 枚 MⅡ 卵母细胞进行核移植. 核移植结果和胚胎发育情况见表 1. GLV 体细胞与卵胞质的融合率与 GN 的无差异. 电融合的效率也不受细胞传代次数(1~5 代)以及血清饥饿天数(2~7 d)的影响. 来源于 GLV 和 GN 的重构胚体外发育到囊胚的比例无显著差异.

### 2.2 重构胚移植至不同受体的体内发育潜能

共 55 枚来源于 GLV 的重构胚移入 26 头受体牛子宫内, 胚胎移植 60 d 后有 6 头受体牛妊娠, 妊娠率为 23.08%(表 2). 随后 5 头牛先后流产, 流产率为 83.33%, 1 头受体牛怀孕到期并产下 1 头克隆 Galaway 公牛(图 1(a)), 不同受体牛对于移植 GLV 重构胚的妊娠率、流产率及产犊率均无差异. 162 枚 GN 的重构胚移入 80 头受体牛子宫内, 60 d 时有 17 头受体牛妊娠(21.25%), 随后 7 头受体牛流产, 流产率为 41.18%, 10 头受体牛共产下 13 头克隆 Holstein 奶牛, 占移植胚胎数的 8.02%. 移植 GN 重构胚后, 3 种不同受体牛的妊娠率无显著差异, 但鲁西黄牛的流产率(85.71%)显著高于青年 Holstein 奶牛及经产 Holstein 奶牛(14.29%,

表 1 高产 Holstein 奶牛(GN)及 Galoway 公牛(GLV)体细胞核移植重构胚的体外发育结果

| 供核体细胞来源 | 核移植卵数 | 融合数  | 培养数 | 2-细胞胚数(%)   | 4~8 细胞胚数(%) | 囊胚数(%)      |
|---------|-------|------|-----|-------------|-------------|-------------|
| GLV     | 982   | 548  | 467 | 365 (78.16) | 322 (68.95) | 138 (29.55) |
| GN      | 1034  | 623  | 513 | 424 (82.65) | 349 (68.03) | 123 (23.98) |
| 总计      | 2016  | 1171 | 980 | 789 (80.50) | 671 (68.47) | 261 (26.63) |

表 2 不同重构胚移植到不同受体牛的体内发育结果

| 供核体细胞来源 | 受体牛类型          | 胚胎数 | 移植头数 | 妊娠牛(%) <sup>a)</sup>   | 流产牛(%) <sup>b)</sup>    | 产犊数(%) <sup>c)</sup>   |
|---------|----------------|-----|------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| GLV     | 黄牛             | 29  | 14   | 4 (28.57) <sup>a</sup> | 3 (75.00) <sup>a</sup>  | 1 (3.45) <sup>a</sup>  |
|         | 青年 Holstein 奶牛 | 20  | 9    | 1 (11.10) <sup>a</sup> | 1 (100.00) <sup>a</sup> | 0 (0.00) <sup>a</sup>  |
|         | 经产 Holstein 奶牛 | 6   | 3    | 1 (33.33) <sup>a</sup> | 1 (100.00) <sup>a</sup> | 0 (0.00) <sup>a</sup>  |
|         | 小计             | 55  | 26   | 6 (23.08)              | 5 (83.33)               | 1 (1.82)               |
| GN      | 黄牛             | 65  | 29   | 7 (24.14) <sup>a</sup> | 6 (85.71) <sup>a</sup>  | 1 (1.54) <sup>a</sup>  |
|         | 青年 Holstein 奶牛 | 77  | 40   | 7 (17.50) <sup>a</sup> | 1 (14.29) <sup>b</sup>  | 8 (10.39) <sup>b</sup> |
|         | 经产 Holstein 奶牛 | 20  | 11   | 3 (27.27) <sup>a</sup> | 0 (0.00) <sup>b</sup>   | 4 (20.00) <sup>b</sup> |
|         | 小计             | 162 | 80   | 17 (21.25)             | 7 (41.18)               | 13 (8.02)              |
| GLV+GN  | 黄牛             | 6   | 3    | 3 (100.0) <sup>a</sup> | 2 (66.67)               | 0 <sup>*</sup> (0.00)  |
|         | 青年 Holstein 奶牛 | 5   | 2    | 0 (0.0) <sup>b</sup>   | 0 (0.00)                | 0 (0.00)               |
|         | 经产 Holstein 奶牛 | 2   | 1    | 0 (0.0) <sup>b</sup>   | 0 (0.00)                | 0 (0.00)               |
|         | 小计             | 13  | 6    | 3 (50.0)               | 2 (66.67)               | 0 (0.00)               |
| 总计      |                | 230 | 112  | 26 (23.21)             | 14 (53.85)              | 14 (6.09)              |

a) 胚胎移植后 60 d 直肠检查确定怀孕, b) 与妊娠头数比, c) 与移植胚胎数比. \*示产下干尸, a~c 示同栏内组间有显著差异( $P < 0.05$ )

0%;  $P < 0.05$ ), 且黄牛产犊率(1.54%)也显著低于青年 Holstein 奶牛与经产 Holstein 奶牛(10.39%, 20.0%;  $P < 0.05$ ), 而青年 Holstein 奶牛与经产荷 Holstein 牛间差异不显著. 有 13 枚来源于 GLV 和 GN 的囊胚混合移入 6 头受体牛子宫内, 60 d 时有 3 头妊娠(50%), 但有 2 头先后流产, 另一头怀孕到期产下一干尸.

12 头受体牛在怀孕 276~95 d 之间, 经剖腹产、助产或自然分娩产下 14 头克隆牛, 其中 1 头来源于 GLV 供体细胞(为雄性黄牛犊), 13 头来源于 GN 供体细胞(为雌性奶牛犊). 9 头在出生前后死亡(图 1(b)), 5 头奶牛犊存活至今(图 1(c)).

2.3 克隆牛犊的分析

除 1 头黄牛受体产下 1 头干尸外, 其余 11 头受体牛共产下 14 头克隆牛. 这 14 头克隆牛中有 1 头是来源于 GLV 的克隆个体, 在产后 1 个月死于急性胃出血; 其余 13 头来源于 GN 的克隆个体中, 8 头分别死于胎膜破裂(1 对双胞胎)、胎位不正(1 对双胞胎)、发育不完全(出生 1.5 h 后死亡)、助产不当、急性肺炎(出生 3 d 后死亡)和肠扭转(出生 7 d 后死亡). 其余 5 头存活至今, 其中有一对为双胞胎.

除 2 头黄牛受体提前经剖腹产下克隆个体外, 其余 9 头受体奶牛均比预产期(286 d)延迟 5~9 d 产下后

代. 7 头 GN 的克隆个体(不包括 3 对双胞胎)的平均初生体重为(54.14 ± 5.65)kg, 高于同期该牛场诞生的正常雌性奶牛后代个体平均初生体重(43.46 ± 3.13)kg.

2.4 克隆牛的表现

所有克隆奶牛的头颈部黑白花纹都与供体奶牛 603 号(GN)完全一致, 躯体部分的花纹有一些差异(图 1(b)~(d)).

2.5 克隆牛的微卫星 DNA 分析

微卫星 DNA 分析结果确认 13 头雌性克隆奶牛犊和 1 头雄性克隆 Galoway 黄牛犊的基因型分别与供体 GN 和 GLV 完全一致, 而与代孕受体母牛无关(图 2).

3 讨论

实验结果证明, 培养的牛外耳皮肤成纤维细胞能够在去核的 MII 卵母细胞中重新程序化, 并指导重构胚发育为成活的个体. 已经有许多类型的体细胞<sup>[12~15]</sup>作为核移植的供核体细胞产生了克隆牛. 然而, 克隆动物的成功率却各不相同, 这与许多因素有关, 其中细胞类型也是一个因素. 到目前为止, 还不能确定哪种成体细胞用于核移植的效率最高. 本研究中, 我们采用来自雄性和雌性牛外耳成纤维细胞



图 1

(a) 克隆 Galway 黄牛, (b) 7 头死亡的克隆 Holstein 奶牛, (c) 5 头存活的克隆 Holstein 奶牛, (d) 供体 603 号 Holstein 奶牛

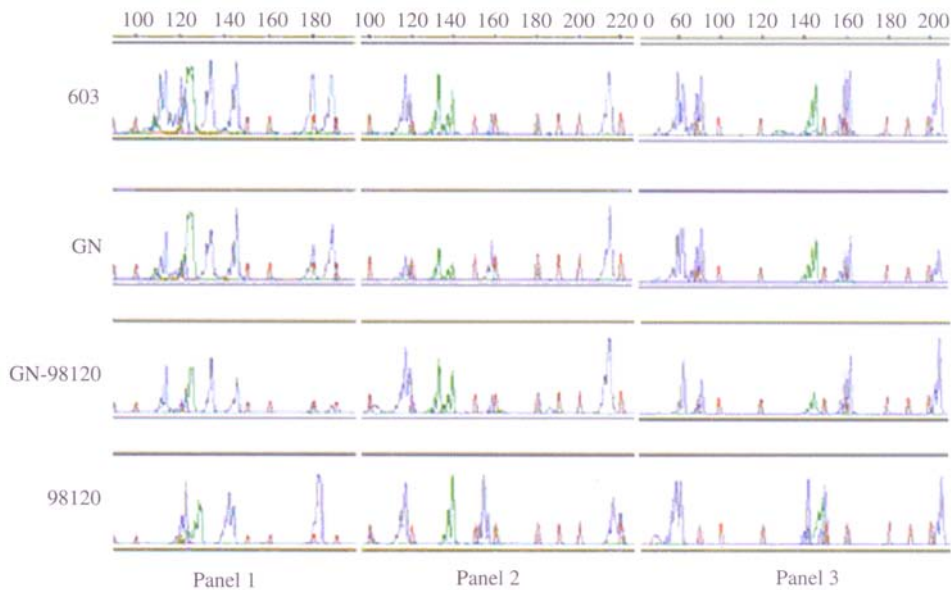


图 2 克隆 Holstein 奶牛的微卫星 DNA 分析图

GN-98120 示克隆牛犊, 603 示供体牛组织, GN 示供体细胞, 98120 示代孕受体牛. 红色曲线为标准分子量, 蓝色(B)和绿色(G)曲线为扩增产物. Panel 1 示引物 ETH3 (B), BM2113 (G), ETH225 (B)和 BM1824 (B)的扩增结果. Panel 2 示引物 TGLA126 (B), MGTG4B (G), TGLA53 (B)和 ETH10 (B)的扩增结果. Panel 3 示引物 TGLA227 (B), SPS113 (G), TGLA122 (B)和 INRA23 (B)的扩增结果. 其他克隆牛犊 DNA 分析也获得了相同的结果

进行核移植. 用同步到  $G_0$  期的细胞或未同步的细胞均获得了多种克隆动物. 但是在牛的克隆中, 用非同步的胎儿成纤维细胞<sup>[16]</sup>仅获得 10%~12%的囊胚发育率, 而休眠的成体<sup>[12]</sup>或胎儿<sup>[16]</sup>细胞却获得 51%~52%的囊胚率. 本研究中, 用  $G_0$  期细胞作为供核体细胞获得了 26.63%的囊胚发育率.

虽然在用雄性(GLV)及雌性(GN)牛外耳成纤维细胞进行核移植的研究中, 重构胚的早期囊胚发育率没有显著差异, 但雌性重构胚发育满期的比例却高于雄性重构胚(8.02%和 1.82%, 表 2). 据我们所知, 用不同类型的雄性或雌性体细胞进行核移植均已获得成功, 但却未见有对不同性别的体细胞的克隆效率进行比较的报道. 本研究中, 我们在同一实验中使用来源于 GLV 及 GN 的成纤维细胞进行了核移植研究, 结果显示, 重构胚早期发育率没有显著差异, 但来源于雌性动物成纤维细胞的重构胚发育到期的比例却明显高于雄性重构胚. 这一结果与最近克隆猫的报道相似<sup>[8]</sup>, 在这一研究中, 研究人员移植了 84 枚来源于雄性猫口腔黏膜成纤维细胞的重构胚后, 仅有 1 头猫妊娠, 并且没有妊娠满期, 而在移植了 3 枚来源于卵丘细胞的重构胚后, 获得了 1 只克隆猫.

由于卵母细胞成熟后, 极体和中期纺锤体的位置会发生变化, 因而通过观察极体的位置来判断卵母细胞核的位置并进行去核的效率较低. 为了提高去核的准确性, 根据受精生物学原理, 我们将卵母细胞的体外成熟时间从 22~24 h 缩短到 19 h, 此时大部分成熟卵母细胞的极体刚排出, 甚至极体与卵间纺锤体的中体还未完全断开. 因此, 能将极体与卵间的纺锤体连带少部分胞质一起去掉. 这样做可大大提高去核的准确性, 同时也减少了对卵母细胞的损伤. 这是在本研究中首次提出的新改进去核法.

卵母细胞活化是核移植中的一个关键步骤. Wells 等人<sup>[12]</sup>报道, 在卵母细胞成熟培养后(hours post maturation, hpm, 指从卵母细胞放入成熟培养液开始计算的时间)22~24 h, 用电融合仅会使极少数重构卵被激活(大约 1%). Wells 等人还发现, 当休眠的牛胎儿成纤维细胞<sup>[16]</sup>在融入活化前的 24 hpm 或 30 hpm M II 卵母细胞后, 胚胎发育率显著高于融合与活化同时进行的重构胚. 这表明延长供核在卵母细胞胞质因子中作用时间可能会加速核重构和重编程. 本研究中, 重构卵在 21~22 hpm 融合, 在 24 hpm 活化, 因此供核有 2~3 h 的时间暴露在 M II 卵胞质中, 这有利

于胚胎的发育, 囊胚率达到了 26.63%, 显著高于已有的一些报道<sup>[6,17]</sup>.

我们用 3 种不同的受体牛, 分别是鲁西黄牛、青年 Holstein 奶牛和经产 Holstein 奶牛. 在移植 GLV 重构胚时, 3 种受体牛在妊娠率、流产率及产犊比率上均无显著差异. 在移植 GN 重构胚时, 3 种受体牛的妊娠率无显著差异, 但鲁西黄牛的流产率高达 85.71%, 显著高于青年 Holstein 奶牛及经产 Holstein 奶牛(分别是 14.29%和 0.00%,  $P < 0.05$ ). 黄牛产下克隆牛犊占移植胚胎的比率为 1.54%, 显著低于青年 Holstein 奶牛及经产荷 Holstein 牛(分别是 10.39%及 20.00%,  $P < 0.05$ ), 而青年 Holstein 奶牛与经产 Holstein 奶牛之间差异不显著. 这说明, 鲁西黄牛不适合用作重构胚的移植受体, 而青年 Holstein 奶牛与经产 Holstein 奶牛均是理想的移植受体. 据我们所知, 这是第 1 次对不同受体牛在牛核移植中的效率进行比较.

到目前为止, 体细胞克隆的成活率较低, 约为 0%~10%<sup>[14]</sup>, 这可以用胎儿流产率高和新生仔死亡率高来解释. 在本研究中, 流产率为 53.84%, 死亡率为 64.3%, 这个结果与现有的克隆牛报道基本一致<sup>[6,13,14,18]</sup>. 但早期和后期流产及新生仔死亡的确切机制仍未阐明. 最近的报道指出胎儿流产与胎盘异常有关<sup>[19,20]</sup>. 也有可能是由于尿囊液过量滞留和新生仔的体重增加(例如大后代综合症)而导致流产和新生仔死亡<sup>[12,19]</sup>. 在本研究中, 有 1 对双胞胎在分娩前死于胎膜破裂, 另有 1 对双胞胎由于尿囊液过量滞留而流产. 来源于 GN 的雌性克隆牛的平均出生体重比该品系的正常雌性个体的平均出生体重高 25%. 除了克隆方法本身存在尚未知晓的一些机理外, 也不排除一些克隆牛犊死于不恰当的护理. 我们的结果与以前牛、绵羊<sup>[3,21]</sup>和小鼠<sup>[22]</sup>克隆的研究结果都证明了, 高流产率、高新生儿死亡率和大后代综合症等问题在核移植研究中仍然存在, 但在克隆山羊<sup>[23~25]</sup>的研究中, 却尚无此类的报道.

微卫星 DNA 分析是对体细胞克隆动物进行鉴定的主要方法<sup>[7,14,26]</sup>. 微卫星 DNA 分析结果证明, 所有克隆牛个体的核遗传物质完全来自于供核体细胞. 虽然克隆 Holstein 奶牛头部的黑白花纹与供体牛一致, 但躯体部分的黑白花纹却有所不同, 这些差异可能是由于胎儿皮肤发育过程中, 黑色素细胞的表达和迁移受到了子宫环境的影响<sup>[27]</sup>.

综上所述, 在本研究中, 我们发现克隆雌性牛比

克隆雄性牛更容易,受体动物的品种和状态是影响重构胚发育到期效率的重要因素,青年奶牛与经产奶牛均是理想的移植受体,而鲁西黄牛不适合用作核移植胚胎的移植受体。

**致谢** 感谢中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室受精生物学研究组各位同仁、中国科学院昆明动物研究所张亚平、聂龙先生以及中国农业科学院畜牧研究所朱裕鼎先生的帮助。本工作为国家自然科学基金(批准号:39830280)资助项目。

参 考 文 献

1 Gurdon J B, Laskey R A, Reeves O R. The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs. *J Embryol Exp Morph*, 1975, 34: 93~112

2 Campbell K H S, McWhir J, Ritchie W A, et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 1996, 380: 64~66

3 Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385: 810~813

4 Wakayama T, Perry A C, Zuccotti M, et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 1998, 394: 369~374

5 王玉阁, 邹贤刚, 成国祥, 等. 由胎儿成纤维细胞而来的克隆山羊(*Capra hircus*). *科学通报*, 1999, 44(21): 2319~2323

6 Cibelli J B, Stice S L, Golucke P J, et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 1998, 280: 1256~1258

7 Polejaeva I A, Chen S H, Vaught T D, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 2000, 407: 505~509

8 Shin T, Kraemer D, Pryor J, et al. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*, 2002, 415: 859

9 Chesne P, Adenot P G, Viglietta C, et al. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol*, 2002, 20: 366~369

10 Frehney R I. *Culture of Animal Cells*. 3rd ed. New York: Wiley-Liss Inc, 1994. 127~147

11 陈大元, 孙青原, 刘冀龙, 等. 大熊猫供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): 324~329

12 Wells D N, Misica P M, Tervit H R, et al. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. *Reprod Fertil Dev*, 1998, 10: 369~378

13 Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, et al. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 1998, 282: 2095~2098

14 Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki T, et al. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 990~995

15 安晓荣, 苟克勉, 朱士恩, 等. 卵丘细胞核移植技术生产克隆牛犊. *中国科学, C 辑*, 2002, 32(1): 69~76

16 Wells D N, Misica P M, McMillan W H, et al. Production of cloned bovine fetuses following nuclear transfer with cells from a fetal fibroblast cell line. *Theriogenology*, 1998, 49: 330

17 Lanza R P, Cibelli J B, Blackwell C, et al. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science*, 2000, 288: 665~669

18 Kato Y, Tani T, Tsunoda Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J Reprod Fertil*, 2000, 120: 231~237

19 Hill J R, Roussel A J, Cibelli J B, et al. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology*, 1999, 51: 1451~1465

20 Hill J R, Burghard R C, Jones K, et al. Evidence for placental abnormality as a major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol Reprod*, 2000, 63: 1787~1794

21 Sousa P A D, King T, Harkness L, et al. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. *Biol Reprod*, 2001, 65: 23~30

22 Amano T, Kato Y, Tsunoda Y. Full-term development of enucleated mouse oocytes fused with embryonic stem cells form different cell lines. *Reproduction*, 2001, 121: 729~733

23 Keefer C L, Baldassare 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

24 Keefer C L, Keyston R, Lazaris A, et al. Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. *Biol Reprod*, 2002, 66: 199~203

25 郭继彤, 安志兴, 李煜, 等. 成年耳细胞克隆山羊. *中国科学, C 辑*, 2002, 32(1): 77~83

26 Betthausen J, Forsberg E, Augenstein M, et al. Production of cloned pigs from *in vitro* systems. *Nat Biotechnol*, 2000, 18: 1055~1059

27 Olsen T A. The genetic basis for piebald patterns in cattle. *J Hered*, 1981, 72: 113~116

(2002-10-28 收稿, 2003-02-17 收修改稿)