

体细胞核移植克隆民猪: 培养液对卵母细胞成熟及胚胎发育的影响

刘忠华^{①*} 田江天^① 郑 重^① 王振坤^① 宋 军^① 尹 智^① 高 力^②
马海鹏^② 孔庆然^① 孙 爽^① 李玉田^③ 王洪斌^②

(① 东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030; ② 东北农业大学动物医学学院, 哈尔滨 150030; ③ 哈尔滨市三元畜牧实业有限公司, 哈尔滨 150030)

摘要 体外培养成熟的卵母细胞是进行克隆猪研究所需受体卵母细胞的主要来源, 卵母细胞成熟质量与体细胞核移植胚胎发育能力关系密切. 为提高卵母细胞体外成熟率和成熟质量, 进而提高体细胞核移植猪的成功率, 本实验以改进的 TCM199 培养液为基础液(T), 分别添加 10% 的猪卵泡液(T+pFF)和 10% 的胎牛血清(T+FBS)后进行卵母细胞成熟培养, 以成熟率和体细胞核移植胚胎发育率等重要指标为标准, 研究了 pFF 和 FBS 对卵母细胞成熟及核移植胚胎发育能力的影响. T, T+pFF 和 T+FBS 组在成熟培养后 42 h 卵母细胞成熟率分别为(53.2±3.8)%, (69.7±3.8)%和(70.2±3.7)%, 添加 10% 的 pFF 和 FBS 显著($P<0.05$)提高了卵母细胞成熟率; 3 组不同成熟培养液获得的成熟卵母细胞在体细胞核移植后囊胚发育率差异不显著, 但 T+pFF 组的囊胚细胞数(34.5±2.24)显著($P<0.05$)高于 T 组的囊胚细胞数(26.6±1.25). 来自 T+pFF 组的体细胞核移植胚胎经手术法移植入发情周期为第 0 天或第 1 天的 18 头受体母猪输卵管, 其中有 3 头受体母猪妊娠发育到期, 获得克隆民猪 14 头, 其中有 6 头健康成活至今. 实验结果表明, 培养液中添加 10% pFF 可以有效提高卵母细胞成熟比例和成熟质量, 在含有 10% pFF 培养液中获得的成熟卵母细胞具有支持核移植胚胎全程发育的能力.

关键词 体细胞核移植 体外成熟 胎牛血清 猪卵泡液 猪

自从克隆羊“多莉”出生以来, 目前已经有 10 余种克隆哺乳动物出生^[1-12]. 而且基于体细胞核移植路线的转基因动物也在多个物种取得成功^[13-15]. 世界上首例克隆猪是在 2000 年出生的^[4], 之后又相继有多个基因修饰猪顺利出生^[16-19], 展示出克隆猪和转基因猪在人类器官移植领域、人类疾病模型动物以及家猪保种和育种等方面的强大应用潜力.

卵母细胞质量对体细胞核移植成功率的影响巨

大. 目前进行克隆猪和基因修饰猪研究所用的卵母细胞主要有两种来源: 体内成熟卵母细胞和体外成熟卵母细胞. 应用体内成熟卵母细胞的优点是卵母细胞成熟质量好, 核移植后重构胚发育潜能高; 缺点是数量有限, 获取成本高昂. 而体外成熟卵母细胞由于来自于屠宰场收集的卵巢, 因此数量大, 成本相对较低, 但是其成熟质量与体内成熟卵母细胞有很大差距.

卵母细胞体外成熟受很多因素的影响, 其中成熟培养液的组成成分是非常重要的影响因素. 采用化学成分明确培养液进行卵母细胞成熟培养便于研究各种不同因子对卵母细胞成熟的影响, 虽然有利用简单培养液培养成熟的卵母细胞作为核受体出生克隆猪的报道^[20], 但化学成分明确培养液所获得的成熟效果仍有待提高. 胎牛血清和卵泡液是两种最常用的卵母细胞成熟培养液添加成分, 由于其成分复杂, 具有多种生物活性因子, 因此在多种动物的卵母细胞体外成熟中都能够起到非常好的促进成熟质量的效果^[21-23]. 在猪的体外成熟培养体系中针对卵泡液的作用的研究很多, 但是针对胎牛血清作用的研究比较少. 这些研究所采用的往往是化学成分相对简单的培养基, 而很少有采用成分比较复杂的培养液作为基础液^[24,25]. 为了在前人研究的基础上尽快得到一个成熟比例高、卵母细胞成熟质量好的培养体系, 从而为猪的体细胞核移植和转基因猪研究提供大量高质量的卵母细胞, 本实验采用目前文献报道中成熟培养效果最为突出的化学成分明确培养液——改进型TCM199作为基础培养液, 研究了胎牛血清和卵泡液与其联合应用对卵母细胞成熟比例以及发育潜能的影响.

1 材料与方法

1.1 成熟培养液基础液配制及各种试剂来源

成熟培养液的基础液成分如下: TCM199(Gibco)添加 0.1% 聚乙烯醇(PVA)、3.05 mmol/L 葡萄糖、0.91 mmol/L 丙酮酸钠、0.57 mmol/L 的半胱氨酸、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的促卵泡素(FSH)、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 促黄体素(LH)、10 ng/mL 的表皮生长因子(EGF)、75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青霉素和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的链霉素; 猪卵泡液(pFF)取自直径 3~5 mm 的卵泡, 2000 r/min 离心去除细胞及组织碎片, 0.45 μm 微孔滤器过滤后冻存; 胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司(批号: 16000-044, 1333147). 本实验中所有化学试剂及生物试剂除特殊标明外均购自 Sigma 公司.

1.2 实验设计及 3 种不同培养液组成成分

实验采用成熟培养液基础液(T)为对照组, 在基础液中分别添加 10% 猪卵泡液(T+pFF)和 10% 胎牛血清(T+FBS)形成两种化学成分非确定培养液作为实验组, 以卵母细胞在成熟培养后 42 h 的成熟率、成熟卵母细胞在体细胞核移植后的体外囊胚发育率和囊胚

细胞核数作为衡量指标, 比较 pFF 和 FBS 对卵母细胞体外成熟的作用. 3 组培养液中经实验检验成熟效果最好的用于体细胞核移植胚胎全程发育实验.

1.3 卵母细胞的成熟培养及成熟判定标准

由屠宰场收集卵巢并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的生理盐水中运送回实验室, 抽取 3~5 mm 直径的有腔卵泡收集卵母细胞卵丘复合体, 实体显微镜下挑选具有完整的 3 层以上卵丘细胞的卵母细胞用于成熟培养; 成熟培养的培养条件为 38.5 $^{\circ}\text{C}$, 5% 二氧化碳, 95% 空气的气体环境, 饱和湿度; 成熟培养 42 h 后采用 0.5% 透明质酸酶去除卵丘细胞, 以第一极体释放作为卵母细胞成熟的判定标准, 挑选成熟卵母细胞并记录数据.

1.4 体细胞采集和培养

无菌操作取出生后 5 d 的民猪耳部组织, 采用常规 0.25% 胰蛋白酶(Gibco)消化法分离组织细胞, 原代细胞采用 DMEM(Gibco)添加 20% 胎牛血清贴壁培养, 传代细胞采用 DMEM 添加 10% 胎牛血清培养, 培养条件为 38.5 $^{\circ}\text{C}$, 5% 二氧化碳, 95% 空气的气体环境, 饱和湿度; 采用 3~5 代的接触抑制成纤维细胞用于核移植实验.

1.5 体细胞核移植

采用融合法进行体细胞核移植, 具体方法详见文献^[26], 简述过程如下: 先去除 M II 卵的纺锤体及第一极体, 注入一个体细胞于透明带下, 并使之与卵母细胞质膜紧密接触, 直流电电击(1.2 kV/cm, 30 μs , 2 次脉冲)诱导体细胞与去核卵母细胞融合形成重构胚并使之被激活; 所用工具、液体、仪器如下: 固定管内径为 30 μm , 注射管内径 25 μm ; 卵母细胞普通操作液为含 5 mg/mL 的改进型 TCM199, 卵母细胞显微操作液为添加 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 细胞松弛素 B(CB) 的卵母细胞普通操作液, 融合液为含 1.0 mmol/L 钙离子和 0.1 mmol/L 镁离子的 3% 甘露醇溶液; 显微操作系统为日本 Narishige 公司 NT-88NE 系统; 融合仪为美国 BTX 公司的 BTX2001 型电细胞融合仪.

1.6 胚胎体外培养、发育率计算和囊胚细胞计数

融合的重构胚培养于 PZM-3 培养液中, 培养条件为 38.5 $^{\circ}\text{C}$, 5% 二氧化碳、95% 空气的气体环境, 饱和湿度; 胚胎构建当天为第 0 天, 培养至第 6 天统计卵裂胚胎数(含两个及两个以上卵裂球的胚胎)和囊胚

数目, 然后对囊胚采用 5 mg/mL 的 Hoechst 33342 染色, 荧光镜下计数囊胚细胞核数。

1.7 胚胎移植

重构胚在电融合后 24 h 之内手术移入自然发情第 0 天或第 1 天的育成母猪输卵管深部(以出现压背静立反射为发情的第 0 天), 每头受体猪移植胚胎 120~220 枚胚胎。受体品种为长白猪、大白猪或者杜洛克猪。

1.8 妊娠诊断及饲养管理

胚胎移植后, 对未返情的受体于 28~30 d 进行首次超声波妊娠检测。之后每周定时检测 1 次, 跟踪胎儿发育情况, 调整饲养管理, 直至克隆猪出生。

1.9 体细胞、克隆猪和受体母猪的微卫星 DNA 鉴定

常规方法提取体细胞、克隆猪耳组织和代孕母猪的耳组织 DNA, 选取位于不同染色体上的 9 个微卫星多态性位点作为遗传标记, 进行遗传一致性的检测(由上海基康生物技术有限公司完成)。

实验所得数据采用 SAS 软件中通用线性分析程序中的 ONE WAY ANOVA 进行统计分析, 数据结果以平均值±变异系数表示。

2 结果

2.1 卵母细胞在 T, T+pFF 和 T+FBS 三种培养液中的体外成熟

卵母细胞在体外培养 42 h 后, 分别检测 3 种不同培养液中的卵母细胞成熟比例, 结果见表 1。T+pFF

和 T+FBS 两组的卵母细胞成熟比例分别为 69.7%和 70.2%, 显著($P<0.05$)高于 T 组中的卵母细胞成熟比例。

2.2 T, T+pFF 和 T+FBS 三种培养液培养成熟的卵母细胞核移植后重构胚的体外发育

在 3 种不同成熟培养液中获得的成熟卵母细胞分别作为核移植受体, 进行核移植实验。各组的融合率、卵裂率和囊胚率差异不显著($P>0.05$), 但 T+pFF 组囊胚细胞核数显著($P<0.05$)高于其他两组, 而 T 与 T+FBS 之间差异不显著($P>0.05$)(表 2)。

2.3 核移植胚胎体内发育结果

实验采用成熟比例高、核移植后囊胚细胞核数也高的 T+pFF 组培养液培养成熟的卵母细胞作为核移植受体, 以民猪成体体细胞作为核供体构建重构胚, 共移植受体母猪 18 头, 结果有 6 头母猪在手术后两个动情期内没有返情, 经 B 型超声波检测均可见清晰孕囊。其中 3 头受体, K11, K24 和 K09 妊娠到期, K11 和 K24 经剖腹手术分别产出 3 头(2006 年 10 月 12 日剖腹产)和 2 头(2006 年 12 月 17 日剖腹产)成活的克隆民猪, K09 自然分娩产出 9 头(2006 年 12 月 23 日分娩)克隆民猪, 其中有 2 头是干尸, 1 头出生时死亡, 其余 6 头成活(图 1(a))。在出生后的饲养过程中 K24-2 由于体弱在第 1 天内死亡, K11-2 出生后第 10 天死亡, K11-3 出生后第 24 天由于注射疫苗过敏死亡, K09-6 和 K09-1 分别在出生后第 21 天和 23 天因腹泻死亡, 其余 6 头均健康成活至今, K11-1 现为 5 月龄, K24-1, K09-2, K09-3, K09-4, K09-5 现为 3 月龄(图 1(b), (c))。3 头受体的胚胎移植出生率分别为 2.1%(3/140),

表 1 卵母细胞在培养液 T, T+pFF 和 T+FBS 中的成熟结果

培养液	重复次数	培养的卵母细胞数	成熟卵母细胞数 ^{a)} /%
T	10	1050	539 (53.2±3.8) ^a
T+pFF	10	847	587 (69.7±3.8) ^b
T+FBS	10	844	577 (70.2±3.7) ^b

a) 同一列中具有不同字母上标的数据间差异显著, $P<0.05$

表 2 培养液 T, T+pFF 和 T+FBS 中的成熟卵母细胞核移植后体外发育结果

培养液	重复次数	操作卵数	融合数/%	卵裂数/%	囊胚数/%	囊胚细胞核数 ^{a)}
T	5	174	139(79.2±6.18)	127(92.0±2.78)	35(24.3±4.80)	26.6±1.25 ^a
T+pFF	5	245	192(77.6±4.75)	168(86.9±2.11)	51(26.5±1.86)	34.5±2.24 ^b
T+FBS	5	217	176(81.1±4.33)	162(92.3±1.24)	45(27.1±5.48)	32.2±1.89 ^{ab}

a) 同一列中具有不同字母上标的数据间差异显著, $P<0.05$



图1 体细胞克隆民猪

(a) K09 产 6 头成活克隆民猪; (b) K11-3 五月龄照片; (c) K09-1, K09-2, K09-4, K09-5 三月龄照片

1.0%(2/192), 4.1%(9/220); 平均出生率为 2.5%.

2.4 不同季节对核移植胚胎体内发育的影响

为分析胚胎体内发育的影响因素, 核移植胚胎体内发育结果按照胚胎移植手术的季节进行分类统计后结果见表 3. 在 6 月份和 8 月底各移植了 3 头受体, 结果分别有 1 头和 3 头妊娠, 并且分别有 1 头和 2 头发育到期成功产出了克隆猪. 而 7 月份共移植了 12 头受体, 仅有 2 头妊娠, 但均未发育到期, 其中一头流产, 另一头胎儿退化.

2.5 胚胎的不同数量对核移植胚胎体内发育的影响

猪是多胎动物, 需要有足够数量的胚胎才能够顺利完成着床. 因此移植胚胎的数量对核移植胚胎的体内发育具有非常大的影响. 实验根据移植胚胎的具体数量将受体分为 3 组, 其接受移植胚胎的数量分别为少于 150, 150~200 和多于 200 枚(表 4). 接受胚胎数量小于 150 枚的受体母猪全未妊娠(0/5); 接受胚胎数量在 150~200 枚的受体有 1 头(1/9)怀孕并发育

到期, 产出 2 头克隆猪; 而移植胚胎数量大于 200 枚的受体有 3 头(3/4)妊娠, 并且其中 2 头(2/4)发育到期, 共出生 12 头克隆猪.

2.6 克隆民猪的微卫星 DNA 鉴定

实验对获得的 14 头克隆民猪中的 11 头成活的个体进行了遗传鉴定, 鉴定结果见表 5. 结果表明所有的克隆民猪个体均与供核细胞具有相同的微卫星多态性, 而与 3 头受体母猪无亲缘关系.

3 讨论

世界上首例出生的克隆猪所使用的核受体是体内成熟卵母细胞^[4], 首例直接注射法出生的克隆猪也是以体内成熟卵母细胞作为核受体获得的^[5]. 但是由于体内成熟卵母细胞的数量有限, 费用高昂, 目前开展猪的体细胞核移植实验以及核移植转基因猪实验多数采用的是体外成熟卵母细胞. 虽然已有实验室采用体外成熟卵母细胞作为核受体成功的获得了克隆猪和转基因猪^[15,17,20], 但是卵母细胞体外成熟培养体系仍有待完善. 本实验采用改进的TCM199 培养液

表3 季节对体细胞核移植胚胎后发育的影响

季节	受体数	妊娠受体数	发育到期受体数	出生仔猪数
6.14~6.24	3	1	1	3
7.6~8.1	12	2	0	0
8.25~8.31	3	3	2	11

表4 移植胚胎数量对核移植胚胎体内发育的影响

移植胚胎数量/受体	受体数	妊娠受体数	发育到期受体数	出生仔猪数
<150	5	0	0	0
150~200	9	1	1	2
>200	4	3	2	12

表 5 受体母猪、供核细胞与 11 头出生时成活克隆猪在 9 个多态性位点的微卫星检测结果^{a)}

	SW1311	SW1125	SW0059	SW45	SW72	S0070	SW1111	SW24	SW414
K11	171/171	117/125	133/155	195/195	96/96	289/289	164/172	95/114	140/142
K24	160/171	126	131/147	183/203	107/113	283	164/172	108/114	144
K09	160/171	114/139	127/147	200	107	281	172	102/108	144/157
供核细胞	173/173	109/129	131/133	183/191	98/98	269/269	178/178	102/114	142/142
K11-1	173/173	109/129	131/133	183/191	98/98	269/269	178/178	102/114	142/142
K11-2	173/173	109/129	131/133	183/191	98/98	269/269	178/178	102/114	142/142
K11-3	173/173	109/129	131/133	183/191	98/98	269/269	178/178	102/114	142/142
K24-1	173/173	109/129	131/133	183/191	98/98	269/269	178/178	102/114	142/142
K24-2	173/173	109/129	131/133	183/191	98/98	269/269	178/178	102/114	142/142
K09-1	173/173	109/129	131/133	183/191	98/98	269/269	178/178	102/114	142/142
K09-2	173/173	109/129	131/133	183/191	98/98	269/269	178/178	102/114	142/142
K09-3	173/173	109/129	131/133	183/191	98/98	269/269	178/178	102/114	142/142
K09-4	173/173	109/129	131/133	183/191	98/98	269/269	178/178	102/114	142/142
K09-5	173/173	109/129	131/133	183/191	98/98	269/269	178/178	102/114	142/142
K09-6	173/173	109/129	131/133	183/191	98/98	269/269	178/178	102/114	142/142

a) K11, K24 和 K09 为受体母猪, K11-1~K11-3 为 K11 产出的克隆猪, K24-1, K24-2 为 K24 产出的克隆猪, K09-1~K09-6 为 K11 产出的成活克隆猪

作为基础液, 添加pFF或FBS显著提高了卵母细胞的成熟比例, 由基础液中的 53.2%分别提高到 69.7%和 70.2%; 体细胞核移植后, 虽然重构胚的囊胚发育率在 3 组培养液间无显著差异, 但添加 10% pFF组的囊胚细胞数显著高于另外2组. 有研究表明, TCM199 改进液培养成熟的卵母细胞在核移植后可以成功获得克隆猪^[20], 但是本实验结果表明在这种培养基中添加pFF和FBS可以显著提高卵母细胞成熟比例, 因此可以在卵母细胞来源有限的情况下有效提高成熟卵母细胞数量. 而培养液中添加 10% pFF后所获得的成熟卵母细胞, 在核移植后体外发育至囊胚阶段可以具有更多的胚胎细胞数, 显然这对于核移植胚胎的着床非常有利. 因此在以获得体细胞核移植猪为目的的研究中, 建议采用TCM199 改进液添加 10%的 pFF作为卵母细胞体外成熟培养系统, 这更有利于克隆猪的出生.

卵泡液和胎牛血清是化学成分不明确的添加成分, 常用于卵母细胞体外成熟培养. 本实验所用的猪卵泡液取自直径 3~5 mm的猪生长卵泡, 其中含有各种卵泡细胞所分泌的细胞因子及激素^[27,28]. 实验表明, 卵泡细胞分泌的这些生物活性物质可以有效调节卵母细胞胞质成熟过程, 促进卵母细胞体外受精^[29]或核移植^[30]后胚胎的发育能力. 本实验室未发表的实验结果发现, 在添加 10% pFF的成熟培养液中卵母

细胞周围的卵丘细胞扩展更为充分, 卵丘细胞增殖率显著高于对照组, 而凋亡率显著低于对照组. 上述结果表明, 这些因子除直接作用于卵母细胞外, 还通过调节卵丘细胞的生理状态和生理功能进而调节卵母细胞的成熟. 虽然现有的各类实验结果都表明卵泡液中的生物活性因子确实可以有效调节卵母细胞成熟, 但具体的因子及作用途径仍有待于进一步研究.

本实验以添加 10% pFF的成熟培养体系获得的成熟卵母细胞为核受体, 以民猪仔猪体细胞为核供体, 经显微操作获得的重构胚移植入受体母猪后, 有 3 头受体成功生出发育完全的 14 头克隆民猪, 平均移植胚胎的出生率达 2.5%, 其中的K09 受体产出 9 头克隆猪, 胚胎移植出生率高达 4.1%, 这是目前各种文献记载中单窝克隆猪数目的最高纪录. 潘登科等人^[31]2006 年的研究获得了中国的首例克隆香猪, 胚胎移植出生率为 1.3%. 他们所采用的体细胞来自于妊娠 33 天的胎儿, 因此是胎儿成纤维细胞. 而本次所采用的体细胞来自于出生 5 d 的个体, 因此为仔猪的体细胞. 仔猪体细胞克隆民猪的成功出生以及相对较高的出生率证明, 我们所采用的卵母细胞体外成熟培养体系以及核移植体系是现实可行的, 也为这项技术在中国地方猪种保护和转基因猪生产等方面的应用打下坚实的基础.

猪是非季节性发情家畜, 常年可以繁殖生产, 但是其繁殖效率仍在很大程度上受到季节的影响. 尤其是夏季, 在气候持续保持高温的情况下(7月初到8月中旬), 情期妊娠率明显下降(哈尔滨三元畜牧实业有限公司猪场生产配种记录资料). 本次核移植胚胎的受体移植分别在3个不同的月份进行, 从妊娠和全程发育结果可以看出, 在7月份的移植实验中, 12头受体仅有2头妊娠, 而且后期分别流产和退化. 而在6和8月份的移植结果明显好于7月份, 而且都有成功产出克隆猪的受体. 造成7月份移植受体妊娠率低, 妊娠个体在早期流产或胎儿退化的主要原因, 我们认为除受体母猪由于高温引起的应激反应外, 另外一个重要原因很可能是屠宰的商品猪在运输过程中也受到不同程度的热激而影响卵母细胞质量.

猪是多胎动物, 有研究表明, 在胚胎着床阶段必须有足够的胚胎才能够成功完成这一过程, 因此在生产克隆猪的研究中往往需要通过移植大量的胚胎来保证着床. 而且有的研究人员还将孤雌发育胚胎、体外受精胚胎与核移植胚胎混合对受体进行移植, 以期提高着床几率^[32]. 也有的实验室采用向配种后的受体内移植核移植胚胎, 希望体内胚胎可以辅助核移植胚胎的着床^[31]. 本实验在向受体进行胚胎移植时, 为提高胚胎着床的几率, 每头受体的胚胎移植数量最少达120枚. 从妊娠和克隆猪的出生结果来看, 在当前的胚胎生产体系下, 不考虑季节因素, 在没有其他来源胚胎辅助共同移植的情况下, 每头受体移植200枚的重构胚是非常必要的, 而低于150枚很可能导致体内发育的失败.

参 考 文 献

- Wilmot I, Schnieke A E, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385: 810—813 [\[DOI\]](#)
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, et al. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 1998, 282: 2095—2098 [\[DOI\]](#)
- Baguisi A, Behboodi E, Melican D T, et al. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol*, 1999, 17: 456—461 [\[DOI\]](#)
- 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 [\[DOI\]](#)
- Onishi A, Iwamoto M, Akita T, et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 2000, 289: 1188—1190 [\[DOI\]](#)
- Shin T, Kraemer D, Pryor J, et al. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*, 2002, 415: 859 [\[DOI\]](#)
- Chesné P, Adenot P G, Viglietta C, et al. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol*, 2002, 20: 366—369 [\[DOI\]](#)
- Woods G L, White K L, Vanderwall D K, et al. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science*, 2003, 301: 1063 [\[DOI\]](#)
- Cesare G, Irina L, Gabriella C, et al. A cloned horse born to its dam twin. *Nature*, 2003, 424: 635
- Zhou Q, Renard J P, Fric G L, et al. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science*, 2003, 302: 1179 [\[DOI\]](#)
- Li Z, Sun X, Chen J, et al. Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. *Dev Biol*, 2006, 293: 439—448 [\[DOI\]](#)
- Lee B C, Kim M K, Jang G, et al. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature*, 2005, 436: 641 [\[DOI\]](#)
- Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J, et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 1998, 280: 1256—1258 [\[DOI\]](#)
- 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: 1066—1069 [\[DOI\]](#)
- Lai L, Kolber S D, Park K W, et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, 2002, 295: 1089—1092 [\[DOI\]](#)
- Dai Y, Vaught T D, Boone J, et al. Targeted disruption of the alpha 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol*, 2002, 20: 251—255 [\[DOI\]](#)
- Hao Y H, Yong H Y, Murphy C N, et al. Production of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) over-expressing piglets. *Transgenic Research*, 2006, 15: 739—750 [\[DOI\]](#)
- Phelps C J, Koike C, Vaught T D, et al. Production of alpha 1, 3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science*, 2003, 299: 411—414 [\[DOI\]](#)
- Donna K S, Liangxue L, Steven R W, et al. 1,3-galactosyltransferase null pigs via nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 7335—7340 [\[DOI\]](#)
- Lai L, Tao T, Machaty Z, et al. Feasibility of producing porcine nuclear transfer embryos by using G₂/M-stage fetal fibroblasts as donors. *Biol Reprod*, 2001, 65: 1558—1564 [\[DOI\]](#)
- Nagyova' E, Procha'zka R, Vanderhyden B C. Oocyctectomy does not influence synthesis of hyaluronic acid by pig cumulus cells: retention of hyaluronic acid after insulin-like growth factor- I treatment in serum-free medium. *Biol Reprod*, 1999, 61: 569—574 [\[DOI\]](#)
- Nagyova' E, Camaioni A, Procha'zka R, et al. Covalent transfer of

- heavy chains of inter- α -trypsin inhibitor family proteins to hyaluronan *in vivo* and *in vitro* expanded porcine oocyte-cumulus complexes. *Biol Reprod*, 2004, 71: 1838—1843 [\[DOI\]](#)
- 23 Suzuki M, Misumi K, Ozawa M, et al. Successful piglet production by IVF of oocytes matured *in vitro* using NCSU-37 supplemented with fetal bovine serum. *Theriogenology*, 2006, 65: 374—386 [\[DOI\]](#)
- 24 Abeydeera L R. *In vitro* fertilization and embryo development in pigs. *Reprod Suppl*, 2001, 58: 159—173
- 25 Tatemoto H, Muto N, Sunagawa I, et al. Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. *Biol Reprod*, 2004, 71: 1150—1157 [\[DOI\]](#)
- 26 Lai L, Prather R S. Production of cloned pigs by using somatic cells as donors. *Clon Stem Cells*, 2003, 5: 233—241 [\[DOI\]](#)
- 27 Byskov A G, Yding Andersen C, Hossaini A, et al. Cumulus cells of oocyte-cumulus complexes secrete a meiosis-activating substance when stimulated with FSH. *Mol Reprod Dev*, 1997, 46: 296—305 [\[DOI\]](#)
- 28 Makarevich A V, Sirotkin A V, Genieser H G. Action of protein kinase A regulators on secretory activity of porcine granulosa cells *in vitro*. *Anim Reprod Sci*, 2004, 81: 125—136 [\[DOI\]](#)
- 29 Abeydeera L R, Wang W H, Cantley T C, et al. Co-culture with follicular shell pieces can enhance the developmental competence of pig oocytes after *in vitro* fertilization: relevance to intracellular glutathione. *Biol Reprod*, 1998, 58: 213—218 [\[DOI\]](#)
- 30 Hoshino Y, Uchida M, Shimatsu Y, et al. Developmental competence of somatic cell nuclear transfer embryos reconstructed from oocytes matured *in vitro* with follicle shells in miniature pig. *Clon Stem Cells*, 2005, 7: 17—26 [\[DOI\]](#)
- 31 潘登科, 张运海, 孙秀柱, 等. 低氧培养早期胚胎克隆小型猪 (*Sus Scrofa*). *科学通报*, 2006, 51: 415—419
- 32 Lai L, Prather R S. A method for producing cloned pigs by using somatic cells as donors. *Methods Mol Biol*, 2004, 254: 149—164