

分类号_____

密 级_____

UDC_____

单位代码 10733

甘肃农业大学

博士学位论文

奶牛体外胚胎生产技术研究

Studies on Dairy Cattle Embryo Production in vitro

朱化彬

指导教师姓名 王宗礼 研究员 (甘肃农业大学 兰州 730070)

学科专业名称 动物遗传育种与繁殖 研究 方 向 动物生物技术

论文答辩日期 2011 年 6 月 3 日 学位授予日期 2011 年 6 月

答辩委员会主席 张改平 院 士

评 阅 人 杨章平 教 授

张家新 教 授

王在照 教 授

2011 年 6 月

Classification NO.: _____

Security Classification: _____

UDC: _____

School Code: 10733

Gansu Agricultural University
Dissertation for Doctoral Degree

Studies on Dairy Cattle Embryo Production in vitro

Doctor: Zhu Huabin

Supervisor: Wang Zongli

Speciality: Animal Genetics, Breeding and Reproduction

Research Field: Animal Biotechnology

Submitted Time: 3th, June, 2011

Address: Lanzhou

经费支持

本项目在研究中得到以下项目资助：

《国家奶牛产业技术体系项目》
(项目编号: nycytx-10)

《国家转基因专项》
(项目编号: 2009ZX08010—015B)

《国家转基因专项》
(项目编号: 2009ZX08011—031B)

This work was supported by the following funds:

The earmarked fund for Modern Agro-industry Technology Research System (MATRS; No. nycytx-10)

The National Transgenic Project (2009ZX08010—015B)

The National Transgenic Project (2009ZX08011—031B).

摘要

体外受精和体细胞克隆技术是提供牛胚胎移植胚胎来源的重要技术方法。本试验（论文）研究了影响牛体外性控胚胎影响因素（试验一）和体细胞克隆的影响因素（试验二），研究了不同冷冻方法对牛体外受精和体细胞克隆胚胎 ATP 含量和 ROS 水平的影响（试验三），利用实时定量 PCR 研究了马—牛异种体细胞克隆胚胎线粒体 DNA 情况（试验四），得到以下试验结果：

试验一：

本实验研究了卵母细胞体外成熟后卵丘细胞脱除程度、种公牛个体以及性控精液受精滴体积、性控精子密度等对牛体外性控胚胎生产的影响。试验结果表明：

1、卵丘细胞部分脱除组的卵裂率（ $67\pm 4.74\%$ ）显著性高于不脱除组（ $41\pm 2.23\%$ ）、完全脱除组（ $37.50\pm 2.88\%$ ）（ $P<0.05$ ）；

2、种公牛 B 的性控精液进行体外受精，囊胚率（ $26.53\pm 3.31\%$ ）要显著高于 A 公牛（ $17.65\pm 3.65\%$ ）和 C 公牛（ $16.67\pm 2.36\%$ ）（ $P<0.05$ ）；

3、 $50\mu\text{L}\sim 100\mu\text{L}$ 受精滴囊胚率（ $20.41\pm 4.33\%\sim 23.38\pm 4.47\%$ ）无显著性差异（ $P>0.05$ ），但显著性高于 $40\mu\text{L}$ 、 $30\mu\text{L}$ 的囊胚率（ $13.79\pm 2.02\%$ 、 $12.12\pm 3.73\%$ ）（ $P<0.05$ ）；

4、精子密度 0.5×10^6 个 / mL $\sim 1\times 10^6$ 个/mL 的囊胚率（ $22.58\pm 2.17\%\sim 27.27\pm 3.49\%$ ）相比无显著性差异（ $P>0.05$ ），但显著性高于 0.3×10^6 个/mL⁻¹ 组的囊胚率（ $16.13\pm 3.46\%$ ）（ $P<0.05$ ）。

试验二：

本试验研究了奶牛克隆重构胚不同化学激活方法、克隆重构胚体外培养条件和公牛和母牛供体细胞等对奶牛手工克隆和显微注射克隆效率的影响。试验结果表明：（1）建立了优秀种公牛体细胞系 20 个，高产奶牛体细胞系 4 个；（2）A23187+6-DMAP 和 A23187+放线菌酮组合处理激活体细胞克隆重构胚卵裂率（ 82.62% VS 78.15% ）和囊胚率（ 34.15% VS 30.21% ）差异不显著，但是 A23187+6-DMAP 囊胚质量较好；（3）克隆重构胚在 mCR1aa 培养液卵裂率（ 83.65% ）和囊胚率（ 34.36% ），均显著高于 SOF 和 CR1aa 两种培养液；（4）血清饥饿处理供体细胞的克隆重构胚融合率（ $90.52\%\pm 2.62$ ）、卵裂率 $81.27\%\pm 3.68$ 和囊胚率（ $31.46\%\pm 2.42$ ）和接触抑制的克隆重

构胚 (89.25%±1.92)、(82.44%±4.42)、(30.44%±2.77) 差异不显著; (5) 种牛克隆胚胎移植妊娠率37.0% (10/27), 其中青年荷斯坦母牛移植妊娠率 (46.2%) 显著高于经产西门塔尔杂交受体母牛 (28.6%)。西门答尔杂交受体母牛移植克隆胚胎后分别在妊娠的70~90d内流产, 1头荷斯坦母牛妊娠受体101天后屠宰, 1头荷斯坦母牛妊娠155天流产2个胎儿, 1头荷斯坦妊娠149天流产2个胎儿。

试验三:

本实验采用常规法或玻璃化法 (OPS 法) 冷冻保存牛 IVF 囊胚和 SCNT 囊胚, 利用 ATP Bioluminescence Assay Kit HS II 和 GENMED ROS Assay Kit 检测冷冻—解冻后囊胚 ATP 含量和 ROS 水平。试验结果表明:

1、IVF 和 SCNT 囊胚 OPS 法冷冻—解冻后存活率 (92.24±4.54%, 78.71±5.91%) 均显著高于常规冷冻法 (81.56±2.33%、47.89±5.83%) (P<0.05);

2、IVF 囊胚和 SCNT 囊胚 OPS 法冷冻—解冻后 ATP 含量(0.62±0.04 pmol, 0.30±0.01 pmol) 均显著高于常规冷冻法 (0.43±0.06 pmol, 0.21±0.02 pmol) (P<0.05); 但是均显著低于相应的 IVF 或 SCNT 对照组新鲜囊胚 (0.74±0.05 pmol, 0.39±0.01 pmol);

3、玻璃化冷冻 IVF 囊胚 (72.14±4.31 cps)、SCNT 囊胚 (40.11±5.73 cps) ROS 水平高于新鲜 IVF 囊胚 (47.33±3.56 cps)、SCNT 囊胚 (26.44±1.49 cps) (P<0.05), 常规冷冻组则与此相反 (34.41±3.32 cps vs.47.33±3.56 cps; 15.46±2.45 cps vs.26.44±1.49 cps) (P<0.05)。

试验四:

本试验研究了手工克隆和显微注射方法对马—牛异种克隆效率的影响, 利用实时荧光定量 RT-PCR 方法检测马—牛异种克隆胚胎不同发育阶段线粒体编码基因细胞色素 B 的转录水平。试验结果表明:(1)手工方法克隆马—牛异种重构胚融合率(95.12%)、卵裂率 (97.07%) 显著高于显微注射法的融合率 (70.25%) 和卵裂率 (85.21%), 但两者之间的囊胚率差异不显著 (2.64%±1.68 vs.2.36%±1.59); (2) 供体马 CYBT 基因的表达水平在 1-细胞期的重构胚中表达量最高, 而在囊胚期, 却没有检测到该基因的转录本。牛 CYBT 基因, 在 1-细胞期到 8-细胞期, 其表达量逐渐下降, 而在 16-细胞期的异种克隆胚中, 该基因的表达量急剧升高到最高值, 比 1-细胞期增加了 11 倍, 随后囊胚期表达水平锐减到为起始水平的 2 倍。

关键词: 牛卵母细胞, 体外受精, 体细胞克隆, 线粒体 DNA 遗传

Summary

Dairy embryos used for embryo transfer (ET) can be flushed from donors *in vivo*. But up to date, *in vitro* fertilization (IVF) and somatic cell nuclear transfer (SCNT) are becoming the alternative methods of production bovine embryos for ET. This study was composed of four experiments. Experiment 1 was carried out to investigate the factors which affected the efficiency of bovine oocytes *in vitro* fertilization with sex-sorted sperm; Experiment 2 was carried out to investigate the effects of activation method, synchronization of donor somatic cells and culture medium on the development of bovine SCNT embryos; Experiment 3 was carried out to investigate the effects of controlled freezing method (traditional) and open-pulled straw (OPS) vitrification method on the ATP content and reactive oxygen species (ROS) level of bovine IVF and SCNT blastocysts; and Experiment 4 was carried out to detect the expression level of CYBT gene encoded by the mitochondria in equine-bovine iSCNT embryos produced by HMC and microinjection with the quantitative RT-PCR.

The results were as followings:

Experiment 1

The present experiment was designed to investigate main factors that influenced the result of IVF with bovine sex-sorted sperm. The number of cumulus cells(intact, partial removal, complete removal), semen from different bulls (A, B and C), volume of IVF drops (30 μ l-100 μ l) and sperm concentration (0.3 $\times 10^6$ /mL -1 $\times 10^6$ /mL) were analyzed. The results showed that :(1) the cleavage rate of oocytes with partial removal of cumulus cells after fertilization *in vitro* (67 \pm 4.74%) was significantly higher than that of oocytes with intact cumulus cells (41 \pm 2.23%) or complete removal of cumulus cells (37.50 \pm 2.88%) (P <0.05); (2) the blastocyst rate (26.53 \pm 3.31%)of oocytes fertilized with sex-sorted sperm of bull B was significantly higher than those of bull A (17.65 \pm 3.65%)and C (16.67 \pm 2.36%)(P <0.05); (3) the blastocyst rate of oocytes fertilized in 100 μ l (23.38 \pm 4.47%), 80 μ l (21.05 \pm 3.70%),60 μ l (20.41 \pm 4.33%) and 50 μ l (21.67 \pm 3.92%) drops (P >0.05) showed no significant difference, but was significantly higher than those fertilized in 40 μ l (13.79 \pm 2.02%) or 30 μ l (12.12 \pm 3.73%) (P <0.05); (4) the blastocyst rate of oocytes fertilized with the sperm number of 1 $\times 10^6$ /mL (27.27 \pm 3.49%), 0.8 $\times 10^6$ /mL (24.68 \pm 2.34%),0.5 $\times 10^6$ /mL (22.58 \pm 2.17%) groups (P >0.05) showed no significant difference, but were significantly higher than those fertilized with 0.3 $\times 10^6$ /mL sperms (16.13 \pm 3.46%) group (P <0.05).

Experiment 2

In this experiment, the effects of activation method, synchronization of donor somatic

cells and culture medium on the development of bovine SCNT embryos were investigated. The results showed that: (1) twenty cell lines of dairy top-bulls and two cell lines of high-milk-yield Holstein cows were established, respectively. (2) the rate of cleavage and blastocyst of reconstructed embryos activated by A23187+6-DMAP and A23187+CHX had no significant difference. However the quality of blastocysts developed from cloned embryos activated by A23187+6-DMAP was better than that by A23187+CHX. (3) the cleavage rate (83.65%) and blastocyst rate (34.36%) of reconstructed embryos cultured in mCR1aa medium were significantly higher than that cultured in CR1aa and SOF, respectively. (4) there was no significant difference between the development rates of the reconstructed embryos cloned from donor cells of serum starvation and that of embryos cloned from contact-inhibited donor cells. (5) the pregnant rate of Day-7 bull cloned embryo was 37.0% checked by rectal palpation at 60 days after ET when two embryos were transferred to one recipient. Meanwhile, the pregnant rate of Holstein heifers recipients was higher than that of Simmental cows as recipients.

Experiment 3

This experiment was designed to investigate the influence of cryopreservation on ATP content and ROS level of bovine blastocysts produced by IVF and SCNT. The results showed that: (1) the survival rates of IVF and SCNT blastocysts culture *in vitro* after frozen-thawed by OPS vitrification method ($92.24 \pm 4.54\%$, $78.71 \pm 5.91\%$) were significant higher than that of controlled freezing method ($81.56 \pm 2.33\%$ and $47.89 \pm 5.83\%$) ($P < 0.05$), respectively. (2) The ATP contents of IVF blastocysts (0.62 ± 0.04 pmol) and SCNT blastocysts (0.30 ± 0.01 pmol) frozen-thawed by OPS vitrification method were significantly higher than that of controlled freezing method (0.43 ± 0.06 pmol, 0.21 ± 0.02 pmol), but were significantly lower than that of fresh IVF and SCNT (control) (0.74 ± 0.05 pmol and 0.39 ± 0.01 pmol) ($P < 0.05$), respectively. (3) The ROS level of fresh IVF blastocysts (47.33 ± 3.56 cps) and SCNT blastocysts (26.44 ± 1.49 cps) was significantly lower than that of blastocysts frozen-thawed by OPS vitrification method (72.14 ± 4.31 cps or 40.11 ± 5.73 cps) ($P < 0.05$), but higher than that of blastocysts frozen-thawed by controlled freezing method (34.41 ± 3.32 cps and 15.46 ± 2.45 cps) ($P < 0.05$).

Experiment 4

In this experiment two methods, HMC and microinjection, were employed to produce equine-bovine iSCNT embryos, which equine fetal fibroblast cells was used as donor nuclei and bovine oocytes used as recipient cytoplasts. The level of CYBT gene encoded by the mitochondria in iSCNT embryos was detected by the quantitative RT-PCR. The

results showed that: (1) the rates of fusion and cleavage of equine-bovine iSCNT embryos produced by HMC was significantly higher than that by microinjection. However there was no difference of blastocyst rates between these two methods. (2) the CYBT gene expression in early equine-bovine iSCNT embryos displayed heterogeneity. The equine CYBT gene expression had a gradually decreased trend from 1- cell stage to blastocyst period and the expression level at blastocyst stage had not been detected. The bovine CYBT copy number showed slow and gradual decrease trends from 1-cell to 8-cell stage, but the expression level sharply went up to the crest at 16-cell stage and increased to the 12-fold of that in 1-cell embryos, and then it decreased gradually at blastocyst stage.

Key Words: Bovine oocytes, IVF, SCNT, mtDNA inheritance

目 录

摘要.....	1
Summary.....	III
引 言.....	1
第一部分 文献综述.....	3
第一章 牛卵母细胞体外受精技术研究新进展.....	3
前言.....	3
1.1 影响牛卵母细胞体外受精效率的主要因素.....	4
1.2 牛卵母细胞体外受精技术研究新进展.....	9
1.3 奶牛体外性控胚胎生产.....	13
1.4 其他研究进展.....	15
1.5 牛卵母细胞体外受精存在的问题及对策.....	16
第二章 动物体细胞克隆研究进展.....	19
前言.....	19
2.1 体细胞克隆技术研究的主要成就.....	20
2.2 体细胞克隆技术程序与方法.....	28
第二部分 试验研究部分.....	44
第一章 奶牛体外性控胚胎生产影响因素的研究.....	44
1.1 材料和方法.....	45
1.2 结果与分析.....	48
1.3 讨论.....	50
1.4 结论.....	53
第二章 奶牛体细胞克隆技术的研究.....	54
前言.....	54
2.1 试验材料与方法.....	55
2.2 试验结果与分析.....	63
2.3 讨论.....	70
结论.....	72
第三章 不同冷冻方法对牛体外胚胎 ATP 含量与 ROS 水平的影响.....	73
3.1 试验材料与试验方法.....	74
3.2 结果.....	77
3.3 讨论.....	79
结论.....	82
第四章 马-牛异种克隆胚胎线粒体遗传分析.....	83
前言.....	83
4.1 试验材料与试验方法.....	84
4.2 试验结果.....	89
4.3 讨论.....	95
结论.....	97
第五章 全文结论.....	98
致 谢.....	99
参考文献.....	100
作者 简 历.....	125
导 师 简 介.....	126

引言

奶业是我国现代畜牧业的重要组成部分，在畜牧业生产中所占的比重逐年增加，而 2007 年颁发的《国务院关于促进奶业持续健康发展的意见》和 2006 年开始实施的全国奶牛良种补贴和中国荷斯坦奶牛群体遗传改良计划，极大地促进了我国奶业快速、健康发展。据中国奶业协会统计，2009 年全国奶牛存栏头数达到 1218 万头，奶类总产量 3650 万吨，产值 1065 亿元。

但是，与畜牧业发达国家相比，我国的奶业无论整体水平还是奶牛单产水平都存在很大的差距。我国奶牛生产存在的突出问题主要包括（1）奶牛头数少，尤其是良种奶牛头数少。2009 年我国奶牛存栏头数虽然达到 1218 万头，但不足世界总量的 2%，按人口平均计算，我国每 110 人才拥有一头奶牛，而畜牧业发达的国家，如新西兰平均每人拥有一头奶牛，荷兰每 9 人拥有一头奶牛，美国每 23 人拥有一头奶牛。因此，从 2000 年开始我国每年都从澳大利亚和新西兰等国家大量引进奶牛；（2）单产水平低。奶牛单产水平是国际上衡量奶牛饲养业质量效益的主要指标。近年来发达国家奶业发展趋势是奶牛存栏数下降，奶类总产量稳中有增，但我国奶业近年来的发展基本依赖奶牛数量的增加而非单产水平的提高。从 1999 年到 2006 年，全国奶牛存栏增加了 2.9 倍，但成年母牛年平均单产为 3900 公斤，只增长了 18%，而世界平均水平为 6000 公斤，发达国家在 8000 公斤以上。同时我国奶牛的牛奶中的干物质总量、乳脂肪率和乳蛋白率等营养成分含量普遍比发达国家低 15%~30%。（3）公牛后裔测定滞后。影响奶牛产奶性能的因素中，遗传因素占 40%以上。影响产奶的遗传基础来源于母牛和公牛，而公牛是影响和提高奶牛群体遗传质量的最重要因素，不同育种值估计方法估计公牛遗传性能的准确性不同。目前选择种公牛最有效和最准确的方法是公牛后裔测定，即通过测定公牛女儿后代的产奶性能计算公牛的育种值。但是由于种公牛后裔测定一般需要 5~6 年时间，而且需要花费大量的资金，虽然我国自 1983 年开始由中国奶业协会开展了全国联合荷斯坦种公牛后裔测定，但是获得的优秀验证公牛数量极为有限。

牛胚胎移植，尤其是奶牛性控胚胎移植是快速增加高产奶牛数量的有效方法（韩建永等，2003）。目前牛胚胎移植所需要胚胎的主要来源一是超数排卵技术生产的体内胚胎（*in vivo*），二是体外受精胚胎（*in vitro*）和体外受精性控胚胎（Brackett 等，1982；Lu 等，1999；Zhang 等，2003；Barceló-Fimbres 等，2010）。

随着研究不断深入和技术逐步完善，体细胞克隆技术将可能成为牛胚胎移植的重要

胚胎来源和快速增加良种奶牛头数的有效技术方法（韩建永等，2003）。利用体细胞克隆技术已经先后获得了高产母牛克隆后代（Wells 等，1999；杨向中等,1999）和优秀公牛克隆后代（Galli 等 1999；Hill 等 1999；Kubota 等 2000；Kato 等 2000）。

我国体细胞克隆牛研究也取得了很大进展（董亚娟等，2002；陈大元等，2002）。李宁等（2004）利用加拿大赠送给我国原总理朱镕基的荷斯坦公牛—龙耳缘皮肤细胞成功克隆了 2 头成活克隆后代并开展了克隆种公牛冷冻精液生产和人工授精的试验研究。

但是目前我国牛体外受精性控胚胎和体细胞克隆技术整体效率还比较低，限制了这些技术在奶牛生产中广泛应用。

本论文通过研究影响奶牛体外性控胚胎生产和体细胞克隆技术的主要因素，牛体外生产胚胎冷冻损伤机理，以及马—牛异种体细胞克隆胚胎中线粒体 DNA 遗传，以期提高奶牛体外性控胚胎生产和体细胞克隆技术效率，为我国快速增加高产奶牛头数和大量繁殖优秀荷斯坦种公牛提供技术方法。

第一部分 文献综述

第一章 牛卵母细胞体外受精技术研究新进展

摘要：体外胚胎生产为奶牛胚胎移植的产业化发展提供了廉价的胚胎来源，体外受精技术是体外胚胎生产的重要途径。大量研究表明，卵母细胞体外成熟、体外受精体系、精子质量、受精卵体外培养体系等诸多因素影响了体外受精的效率和体外受精胚胎的发育能力。本章综合了近年来体外受精的研究新进展，着重分析了影响卵母细胞体外成熟的因素、提高体外受精效率和体外受精胚胎发育能力的措施等。随着体外受精机理研究的进一步深入，体外受精技术将会进一步完善，并在生产实践中得到更广泛的应用。

前言

自从第一例体外受精动物—兔出生（Chang, 1959）以来，目前已经先后获得了小鼠（Mukherjee 和 Cohen, 1970）、大鼠（Toyoda 和 Chang, 1974）、兔（Chang, 1959）等试验动物，猪（Rath 等, 1997）、羊（Evans 等, 2004）、牛（Brackett 等, 1982）、水牛（Madan 等, 1991）农业动物，猫（Zambelli 等, 2006）等宠物，虎（Miller 和 Ax, 1990）等野生动物，以及灵长类狒狒（Clayton 和 Kuehl, 1984）和人（Steptoe 等, 1978）体外受精的后代。

牛体外受精技术是目前所有哺乳动物体外受精技术中研究最为广泛、技术最为完善、商业应用最广泛的体外受精技术（Brackett 等, 1982；刘俊平等, 2005；吴冬生等, 2009；Barceló-Fimbres 等, 2010）。而人类体外受精技术的研究进展和应用也十分迅速，在人类不孕不育症的治疗中起到关键作用。自英国科学家 Edwards 等在 1969 年培育出了第一枚人体外受精胚胎并在 1978 获得了第一例首例试管婴儿 Louise Brown 以来，目前据不完全估计全世界每年有 20 多万例体外受精婴儿出生，世界范围内已经诞生了超过 400 万试管婴儿。因为 Edwards 在人体外受精技术开拓性研究和其里程碑研究结果对人类医学的巨大贡献，获得 2010 年诺贝尔医学与生理学奖。

牛胚胎移植研究和应用，尤其是奶牛胚胎移植的商业化迅猛发展增加了对胚胎的大量需求。牛胚胎移植需要的胚胎来源一个是通过超排生产的体内胚胎（in vivo），而另外一个重要来源就是体外受精胚胎（in vitro）。自 1982 年 Brackett 等首次获得了体外受精犊牛以来，经过几十年的研究和发展，牛体外受精技术及其体外受精胚胎的冷冻保存研究获得到巨大进展。随着精液分离技术的研究进展，许多研究者还研究了体外性控胚

胎生产技术 (Lu 等, 1999; Zhang 等, 2003; Barceló-Fimbres 等, 2010)。

目前, 牛常规精液体外受精囊胚率达到 40% (Nedamb 等 2004), 性控精液体外受精囊胚率也由上世纪九十年代的 20%以下提高到 30%左右 (Lu 等, 1999, 2004; Xu 等, 2006, 2009)。为了提高体外胚胎生产效率, 许多研究者研究了颗粒细胞与卵母细胞互作以及影响体外受精效率的分子机制 (Fatehi 等, 2002; Tanghe 等, 2003; Iwata 等, 2008)。目前, 据不完全统计, 全世界每年生产和移植牛体外受精胚胎数量逐年增加, 2005 年达到 265000 枚 (http://www.iets.org/pdf/data_retrieval/December_2006.pdf)。

本章综述了近年来牛体外受精技术研究的最新进展, 以及体外受精中卵母细胞和颗粒细胞互作和影响体外受精因素的研究新进展。

1.1 影响牛卵母细胞体外受精效率的主要因素

1.1.1 牛卵母细胞体外受精主要技术环节

牛卵母细胞体外受精技术包括卵母细胞体外成熟 (*in vitro* Maturation, IVM)、成熟的卵母细胞与精子体外受精 (*in vitro* Fertilization, IVF) 和早期胚胎体外培养 (*in vitro* Culture, IVC) 三个主要技术环节。目前习惯上将体外受精技术 (包括体外成熟、体外受精和体外培养) 称为 IVF, 体外受精胚胎称为 IVF 胚胎, 体外胚胎生产称为 IVP (*in vitro*-Production)。

1.1.1.1 卵母细胞体外成熟

一般情况下哺乳动物出生前后卵原细胞停止增殖, 卵泡中的初级卵母细胞处于第一次减数分裂很长时间, 这一时期的染色质高度疏松, 称为核网期, 细胞核称为生发泡 (GV)。性成熟后在激素等作用下初级卵母细胞才可能恢复减数分裂, 发生生发泡破裂 (GVBD), 排出第一极体, 并发育到第二次减数分裂中期 (MII) 成为成熟卵母细胞。如果没有外界条件刺激 (如受精等), 卵母细胞维持在 MII 期数小时后退化。

体外受精的牛卵母细胞主要是来源于排卵前的卵泡, 卵母细胞处于 GV 期, 因此需要在体外培养一定的时间使之继续成熟。

卵母细胞体外成熟 (*in vitro* Maturation, IVM) 包括从恢复减数分裂到第二次减数分裂中期 (MII) 这一过程, 经历核成熟和细胞质成熟, 是一个复杂的包含核、质、细胞膜、透明带和卵丘细胞成熟变化的过程, 主要有生发泡破裂 (牛需要 8h)、染色体凝集、纺锤体形成、第一极体排出、透明带软化、卵丘细胞扩展等特征 (陈大元等, 2000)。

1.1.1.2 体外受精

体外受精是将哺乳动物的精子和卵子置于适宜的培养条件下使之完成受精的一种技术，一个完全成熟的卵子和一个获得受精能力的精子是这项技术的关键（杨利国等，2003）。

体外受精过程中，精子获能是关键，对卵母细胞受精和胚胎的发育的作用至关重要。体外获能是用特定化学成分培养液模仿体内获能环境时期获得受精能力的过程。目前，精子体外获能的主要方法有高离子强度溶液处理法、钙离子载体（IA）法、氨基多糖（GAGs）诱导获能和含血清蛋白的溶液长时间孵育法。其中肝素是常用的诱导获能物质，肝素浓度对 IVF 效率有重要作用（Parrish 等，1986）。

精子获能处理方式可以采用上浮法、Percoll 密度梯度离心法或者直接洗涤法。上浮法筛选的精子活力高，但精子的浓度却大大降低；与上浮法相比，Percoll 法的精子质量和利用率也较高，但受 Percoll 质量的影响较大，适用于较昂贵的精子进行 IVF；离心洗涤法操作简单，但对精子分选效果较差（胡林勇等，2008）。

体外受精的基础液主要有改良 mTyrode's 液和 BO 液，2 种基础液一般都添加 BSA、肝素、咖啡因。BO 液处理精子比较剧烈且获能快，TALP 液处理精子比较温和，但倪明等（2008）研究中，两种处理液对卵裂和囊胚发育没有显著差异。

1.1.1.3 体外培养

目前最常用体外胚胎培养体系是简单培养液培养法，培养液成分主要是盐类，另外添加血清或 BSA、其他生长因子等。牛胚胎体外培养常用 mCR1aa、合成输卵管液（SOF）和 KSOM 培养液三种培养液，不同的实验室采用的培养液可能不一样。此外，牛胚胎培养的气体主要有 CO₂ 和 O₂，5%—10%的氧是为了模仿母畜生殖道内 5%的氧气环境，CO₂ 浓度是 5%。温度为 39℃，饱和湿度，pH 值为 7.2-7.4 为宜。

IVF 后，在体外培养系统下受精卵要经历原核形成、第一次卵裂、胚胎基因组的激活、致密化等过程，才能发育成可供移植囊胚（Lonergan 等，2003）。

牛体外胚胎早期发育阻滞一般在 8~16 细胞期。早期胚胎发育受母源性 mRNA 和蛋白质调控，使得胚胎基因组激活并开始转录，若其中某一基因组或若干基因组不能表达，致使胚胎发育停滞，分裂受阻（Watson 等，2000；Telford 等，1990）。目前解决体外胚胎培养发育阻滞方法包括添加生长因子（Brackett 和 Zuelke，1993），或者与其他细胞共培养两种方式，颗粒细胞和输卵管上皮细胞是胚胎共培养常用的 2 种体细胞。

1.1.2 影响牛体外受精效率的因素及机制

在过去的半个多世纪中，许多研究者研究了影响牛体外受精效率的各种因素，这些

影响因素主要包括:

1.1.2.1 牛卵母细胞体外成熟影响因素

一般情况,牛卵母细胞体外成熟时间为 22~24h,但是关于其成熟机制目前还知之甚少。一般认为,此期间成熟促进因子(MPF)能够催化一些蛋白质发生磷酸化,促进细胞由间期向 M 期转化(Fraser, 1997),细胞静止因子(CSF)的作用是维持 MPF 活性,使 M 期能够得到维持,而卵母细胞成熟抑制因子(OMI)起负调控作用,使卵母细胞停止在第一次减数分裂前期的双线期(Tsafiri 等, 1982)。牛卵母细胞体外成熟中,细胞核成熟和胞质成熟不同步,核成熟以第一极体排出为标志,胞质成熟一般滞后于核成熟(Homa 等, 2002),胞质成熟过程具有重要意义,期间发生细胞器形态位置变化、功能建立以及 mRNA 转录和修饰,促进减数分裂和胚胎发育(章美玲,2010)。另外研究发现卵母细胞自身分泌因子(OSF)对调节颗粒细胞、卵丘细胞和卵母细胞自身具有重要作用,其中生长转化因子 9(GDF9)和骨形态形成蛋白 15(BMP15)具有激活卵丘细胞中的信号通路,调节卵丘细胞分化及维持其特殊表型过程中的关键基因表达及细胞进程的作用(Gilchrist 等, 2008)。

上述复杂因子调控作用及其他一些因素,共同促进卵母细胞体外成熟。

1.1.2.2 卵母细胞来源和质量影响因素

牛 IVF 的卵母细胞来源主要有 3 个:超数排卵后体内成熟的卵母细胞、屠宰场卵巢卵母细胞和 OPU 法(Ovum pick up)采集的卵母细胞。由于牛体内成熟卵母细胞成本高、需要手术等限制因素,目前在牛 IVF 中很少采用;虽然 OPU 可以非手术反复采集牛卵巢上未成熟卵母细胞,而且卵母细胞具有明确的系谱来源(刘云海等, 2001),但是成本还是较高;屠宰卵巢抽母细胞由于成本低,数量大,是目前牛 IVF 研究中卵母细胞的主要来源(朱珠等, 2004);

提供卵母细胞的牛年龄和所处发情周期对卵母细胞质量和受精能力有显著的影响(Gandolfi 等, 1998),而卵泡大小和颗粒细胞多少也是重要影响因素。研究证明,过小卵泡(小于 2mm)内抽取的 COCs,缺乏某些因子,可能限制了体外成熟和随后的发育(曾申明等, 2000)。

在牛 IVF 研究中,一般按照卵母细胞周围颗粒细胞的数量和形态将卵母细胞分为 4 个等级:A 级(包裹 3 层以上卵丘细胞层)、B 级(1-3 层卵丘细胞不完全)、C 级(裸露卵子)和 D 类(卵丘细胞层呈蜘蛛网状附着)(马学海, 2007)。

最近,幼畜超排和体外胚胎生产技术(juvenile in vitro embryo transfer, JIVET)也可

以为体外受精提供卵母细胞。犊牛 JIVET 技术就是将性成熟前的（1~3 个月龄）犊牛通过外源激素处理，使其卵巢上卵泡发育，采集卵母细胞。JIVET 是一项具有广阔应用前景的动物繁殖新型实用技术。Armstrong 等（1992）首次获得了 JIVET 活犊牛。白佳桦等（2010）采用 JIVET 技术，对 6 周龄的犊牛进行活体采卵，平均每头犊牛获得卵母细胞 31 枚，体外受精后囊胚率达 31.6%。

1.1.2.3 体外成熟培养体系影响因素

（1）培养液

目前，用于牛卵母细胞 IVM 的基础培养液有 TCM-199、Ham'sF10、Ham'sF12、MEM 等，最常用的是以 HEPES 或 NaHCO₃ 缓冲的 TCM-199（谷亚轻等，2008，孙韬等，2003）。Gandhi 等（2000）用添加氨基酸的 SOF 作为基础液进行 IVM 培养也获得了较好的效果。另外，基础培养基中一般需要添加胎牛血清（FBS），但由于其成分复杂，批次影响大，造成 IVF 体系不够稳定。

（2）激素

不论哪种基础培养液，成熟培养液中一般都添加激素，主要有 FSH、LH、E₂ 等。FSH 一般认为是对卵丘扩散促进胞质成熟起作用，进而显著提高卵母细胞成熟和体外受精能力（钱云等，2002）。关于 LH 的作用途径说法不一，有研究者认为是通过改变卵丘结构和增强卵母细胞存活力起作用（胡林勇，2008），而有些认为是通过调节营养环境和去除成熟分裂抑制因子对卵母细胞成熟起作用（Brackett 等，1993）。E₂ 是促进胞质成熟的重要因子，恢复卵母细胞成熟分裂，并对受精和胚胎发育起作用（郭建来等，2005）。

（3）培养条件

体外成熟培养条件，如温度、湿度、气相条件等，对卵母细胞成熟都有很大影响。一般而言，牛胚胎培养温度为 38.5℃~39℃，气体为 5%CO₂，饱和湿度，培养液 pH 值为 7.2-7.4。如果 pH 值偏离过大，会影响胚胎细胞质中活性物质作用。

1.1.2.4 体外获能与受精影响因素

（1）体外获能方式和获能液

精子获能预处理方式有上浮法、Percoll 密度梯度离心法和直接洗涤法等。上浮法筛选的精子活力高，但精子的浓度却大大降低；与上浮法相比，Percoll 法的精子质量和利用率也较高，但受 Percoll 质量的影响较大，适用于较昂贵的精子进行 IVF；离心洗涤法操作简单，但对精子分选效果较差（胡林勇，2008）。研究证明（丁向彬,2005）上浮法和 Percoll 法处理的牛 IVF 卵裂率均显著高于直接离心法，囊胚率与离心法相比也高。

但马云（2000）的研究中，三种方法的卵裂率没有差异，囊胚率上浮法显著高于离心法。

体外受精的基础液主要有改良 mTyrode's 液和 BO 液，2 种基础液一般都添加 BSA、肝素、咖啡因。BO 液处理精子比较剧烈且获能快，TALP 液处理精子比较温和，但倪明等（2008）研究中，两种处理液对卵裂和囊胚发育都没有显著差异。

（2）体外获能机制

体外受精过程中，精子获能是关键，对卵母细胞受精和胚胎的发育的作用至关重要。体内条件下，精子在雌性生殖道内完成获能过程，体外获能是用特定化学成分培养液模仿体内获能环境使精子获得体外与卵母细胞受精的能力。

精子体外获能是脱去精子表面的抗原物质和去获能因子的过程，获能后精子质膜胆固醇外流，增加膜的通透性， Ca^{2+} 通道激活，激活腺苷酸环化酶，cAMP 的浓度升高，导致膜蛋白重新分布，完成顶体反应（胡林勇，2008）。目前，精子体外获能的主要方法有高离子强度溶液处理法、钙离子载体（IA）法、氨基多糖（GAGs）诱导获能和含血清蛋白的溶液长时间孵育法。其中肝素是常用的诱导获能物质，是硫酸化程度最高的氨基多糖。其中肝素浓度对 IVF 效率有重要作用（Parrish 等，1986），牛体外受精中，咖啡因具有增强精子运动的作用，但一般不单独使用（倪明等,2008）。

1.1.2.5 早期胚胎体外培养

（1）胚胎体外培养体系

牛 IVF 胚胎受精后可以采用体内培养和体外培养方法。体内培养是将早期卵裂胚胎移入中间受体输卵管或子宫中培养一段时间后再行移植，操作复杂，容易造成胚胎丢失（Enright 等，2000），目前很少使用。

目前 IVF 胚胎培养最主要的方法是体外培养。牛 IVF 胚胎体外培养常用 mCR1aa、合成输卵管液（SOF）和 KSOM 培养液三种培养液。马学海等（2007）在体细胞共培养条件下，研究这 3 种培养液对胚胎发育的效果影响，结果各组之间卵裂率和囊胚率都没有显著差异，但 TCM199 组相对较低，说明共培养下，SOF 和 mCRLaa 更有利于胚胎发育。李凤荣（2002）的研究也得到相似结果，但 SOF 液囊胚率稍低，另外，研究中 SOF 液添加氨基酸明显改善了其效果，这与 Gardner（2008）的研究相似，说明胚胎体外培养液中添加不同成分物质可以提高 IVF 效果。

（2）能量物质

培养液中能量物质是胚胎代谢不可缺少的成分，其中葡萄糖、丙酮酸、乳酸比较常用，但是葡萄糖有明显抑制胚胎早期发育的作用，对后期胚胎发育又不可缺少（Chatot

等, 1990), 所以在使用时需把握好量的变化。后两种能量物质作用效果也不相一致。近年来, 果糖作为能量物质在牛无血清胚胎体外培养液中的添加, 对囊胚率的提高有很大帮助 (Kwun 等, 2003; Barcelo 等, 2007), 其不仅对胚胎质量有好处 (Chaubal 等, 2009), 且更适合于雌性胚胎的无血清培养 (Kimura 等, 2005)。

(3) 体外培养环境

早期胚胎体外培养环境, 如培养液成分、温度、湿度、气相、PH、渗透压等等, 对受精卵的发育也有不容忽视的作用。

牛胚胎培养的气相条件一般是主要有 38.5°C, CO₂% 的空气和饱和湿度。IVF 后, 受精卵要经历原核形成、第一次卵裂、胚胎基因组的激活、致密化等过程, 才能发育成可供移植囊胚 (Lonergan 等, 2003)。期间, 牛体外培养胚胎发育也受很多因素作用, 早期胚胎发育阻滞、培养体系和环境都会使 IVF 胚胎的发育受到影响。

1.2 牛卵母细胞体外受精技术研究新进展

1.2.1 卵母细胞-颗粒细胞的相互作用及相互影响

家畜在自然生殖状态下, 卵泡和卵母细胞发育过程中, 卵母细胞与包裹的卵丘细胞紧密连接。卵丘细胞 (排卵后为颗粒细胞) 在卵泡发育过程中一直伴随着卵母细胞发育与分化、受精和早期胚胎发育, 对维持卵母细胞减数分裂阻滞、支持卵母细胞质成熟、参与诱导卵母细胞减数分裂恢复等发挥着重要作用 (Tanghe 等, 2002)。而体外受精时颗粒细胞黏附在卵母细胞周围, 其对卵母细胞成熟、受精和受精卵体外发育也具有重要作用。

1.2.2 颗粒细胞与卵母细胞的物理连接

牛卵巢上原始卵泡中卵母细胞周围包裹着约24个扁平的原始 (前) 颗粒细胞, 随着原始卵泡生长和发育, 颗粒细胞通过有丝分裂急剧增加, 如人的卵泡发育到格拉夫卵泡时 (排卵卵泡) 颗粒细胞增加到 50×10^6 个, 并形成多层立方状或高柱状 (杨增明等, 2005)。在次级卵泡发育过程中颗粒细胞与卵母细胞之间通过Cx37形成间隙连接 (杨增明等, 2005), 通过这种间隙连接, 颗粒细胞和卵母细胞之间进行着物质如单糖、氨基酸和离子以及信号传递因子如Ca²⁺、cAMP 和三磷酸肌醇 (IP₃) 传递和交换, 从而对卵母细胞发育、减数分裂的启动等起到调节作用。

卵泡排卵前颗粒细胞围绕在卵母细胞周围形成放射冠 (张忠诚等, 2006年), 排卵后以及受精时, 颗粒细胞仍然包围在卵母细胞周围, 而体外受精时从卵巢上卵泡中采集

的卵母细胞周围包围多层颗粒细胞形成颗粒细胞—卵母细胞复合体 (Cumulus Oocyte Complexes, COCs), 因而颗粒细胞和卵母细胞之间仍保持紧密的物理联系, 而这种物理联系对体内受精和体外受精可能都具有重要作用。

1. 2. 3 颗粒细胞对牛卵母细胞体外受精的影响

1. 2. 3. 1 颗粒细胞对卵母细胞体外成熟的影响

体外成熟时卵母细胞与周围的颗粒细胞存在着密切、重要的联系。研究表明, 颗粒细胞与卵母细胞之间通过透明带和缝隙实现连接(de Loos 等, 1991; Allworth 等, 1993), 这种连接为两者间的细胞内信息交流(Rabahi 等, 1991)、物质传递提供了物理通道(Gilula 等, 1978)。

卵母细胞和颗粒细胞合成分泌的蛋白, 以及两者间直接的缝隙联系, 对卵母细胞成熟、颗粒细胞扩散、胚胎发育都是必要的 (Wu 等, 1996)。体外成熟过程中去除围绕在卵母细胞周围的颗粒细胞, 则卵母细胞的成熟率、受精率以及体外胚胎发育率都显著性降低(Shioya 等, 1988; Mochizuki 等, 1991; Zhang 等, 1995)。研究表明, 颗粒细胞在一些因素如 forskolin、cAMP 的刺激下能分泌减数分裂诱导物质, 促进卵母细胞发育与成熟, 包括生发泡 (GVBD) 和第一极体形成 (Xia 等, 1994)。

1. 2. 3. 2 颗粒细胞对卵母细胞体外受精的影响

颗粒细胞对牛体外成熟的卵母细胞体外受精有明显的影响, 研究表明, 体外成熟后去除颗粒细胞的卵母细胞体外受精后卵裂率、囊胚率显著性低于对照组 (Fatehi 等, 2002; Maalouf 等, 2009), 其多精入卵率也显著升高 (Maalouf 等, 2009)。颗粒细胞对卵母细胞体外受精作用包括①吸引, 阻绊和选择精子 (Cox 等, 1993; Chian 等, 1996); ②有助于精子的获能, 顶体反应和穿入 (Chian 等, 1995); ③防止卵母细胞的提前硬化 (Downs 等, 1986; Katska 等, 1989)。

颗粒细胞对卵母细胞体外受精的作用可能包括颗粒细胞的分泌物质和颗粒细胞自身质量 (凋亡) 对卵母细胞的影响。。

1. 2. 3. 3 颗粒细胞影响牛卵母细胞成熟和受精的机理

颗粒细胞可能通过合成分泌一些化学物质和因子调节卵母细胞体外成熟和受精。颗粒细胞包裹在卵母细胞周围不仅与其起到物理连接作用, 而且颗粒细胞具有内分泌 (或旁分泌) 功能, 其分泌的类固醇激素和透明质酸酶等物质通过自一旁分泌调节卵母细胞体外成熟和体外受精。

研究表明, 颗粒细胞用体外受精液培养 18-22h 后离心取上清液, 用 0.22 μ m 孔径的

滤器过滤后获得颗粒细胞液 (cumulus cell conditioned medium, CCCM), CCCM 采用活性炭处理后获得 Charcoal-treated CCCM。COCs 成熟后去掉颗粒细胞 (成熟裸卵) 在体外受精液中受精效果较差, 但在 CCCM 中受精效果得到一定程度的恢复, 而在 Charcoal-treated CCCM 中受精效果又降低 (Fatehi 等, 2002; Tanghe 等, 2003), 说明培养的颗粒细胞分泌物可能对成熟裸卵的体外受精有一定的促进作用。

而最近研究发现, 单个成熟裸卵在 CCCM 中受精时, 卵裂率和囊胚率不但没有升高, 反而显著降低 (Goovaerts 等, 2009)。这说明, 颗粒细胞液对群体裸卵、单个裸卵在体外受精效率的影响程度上, 有明显的差异, 其原理目前还不十分清楚。

颗粒细胞内分泌的 (或旁分泌) 影响卵母细胞体外受精的物质及其作用主要包括:

①类固醇激素

体内时卵泡中卵母细胞周围的颗粒细胞具有内分泌功能 (Erickson 等, 1983), 分泌雌激素、雄性激素和孕激素等。研究表明, 卵母细胞体外成熟时颗粒细胞也能分泌孕酮、睾酮和雌二醇等 (Mingoti 等, 2002; Schoenfelder 等, 2003), 孕酮与精子质膜受体结合能刺激精子的超活化, 提高人和狗精子的顶体反应 (Uhler 等, 1992; Siddiquey 等, 1982; Sirivaidyapong 等, 1999), 孕酮也能提高 IVF 时结合到透明带的马精子数量 (Cheng 等 1998)。

研究表明, 成熟裸卵在用活性炭去除类固醇激素的颗粒细胞液 CCCM 中受精时无论是卵裂率还是囊胚率都较低, 而添加 150ng/ml 孕酮后成熟裸卵的受精效果又得到恢复, 证明颗粒细胞分泌的孕酮对牛体外受精具有积极促进作用 (Fatehi 等, 2002)。但另外一个研究在体外受精液中分别添加 15ng/ml、150ng/ml 孕酮并不能显著提高牛体外受精的效果, 甚至高浓度孕酮降低了体外受精的效果 (Tanghe 等, 2003)。

②透明质酸

透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 是牛颗粒细胞分泌的重要物质 (Downs 等, 1986), 其对体外受精前牛精子获能具有重要作用 (Shamsuddin 等, 1994), 培养液中添加一定浓度的透明质酸能够提高体外受精牛胚胎的体外发育能力 (Stojkovic 等, 2002), 但是 Tanghe 等 (2003) 研究得出了相反的结果, 他认为化学合成的透明质酸并不能够模仿颗粒细胞在体外受精中的作用。

③还原型谷胱甘肽

还原型谷胱甘肽 (reduced glutathione, GSH) 是哺乳动物细胞中重要的非蛋白巯基化合物, 对细胞抗氧化和抗辐射有着重要作用 (Meister, 1983), 其对牛卵母细胞体外受

精液具有重要作用。猪和牛体外受精研究表明，GSH 对精子解聚和雄原核的形成起着重要作用（Sutovsky 和 Schatten, 1997），成熟液中添加 GSH 合成抑制剂—丁硫氨酸亚甲砷胺（BSO）抑制 GSH 的合成，卵母细胞使精核去致密的能力就被抑制。

颗粒细胞对卵母细胞中 GSH 的合成起着重要作用，因而无颗粒细胞的卵母细胞中 GSH 含量非常低（de Matos 等, 1997; Luciano 等, 2005），然而颗粒细胞对 GSH 合成及 GSH 对牛体外受精的影响机制还有待进一步研究。

1. 2. 3. 4 卵母细胞对颗粒细胞的调节作用

传统观点认为，卵丘细胞对卵母细胞生长、成熟、排卵及受精过程中起着重要作用，并影响着卵母细胞的质量（Tanghe 等, 2002; Van Soom 等, 2002），而卵母细胞对卵丘细胞（颗粒细胞）生长和功能的调节作用，以及卵母细胞对自身的调节知之甚少。

最新研究结果表明，卵母细胞能够分泌一些细胞因子（OSF），不仅在调节卵母细胞自身生长、成熟和质量起着重要的作用，而且 OSF 对调节卵泡细胞功能、丘细胞（颗粒细胞）生长发育和功能等起着重要作用（Su 等, 2004; Gilchrist 等 2008; Salhab 等, 2011）。

卵母细胞能够分泌许多因子，其中生长转化因子 9（GDF-9）和骨形态形成蛋白 15（BMP-15）是其中两个重要的卵母细胞分泌因子（OSF），它们能够激活卵丘细胞中的信号通路，调节卵丘细胞分化及维持其特殊表型过程中的关键基因表达及细胞进程（Su 等, 2004; 图 1-1）。

Hussein 等（2006）研究牛体外受精试验结果表明，将 COCs 与裸卵放在一起进行体外成熟或者在体外成熟液中加入重组生长转化因子 9（GDF9）、骨形态形成蛋白 15（BMP15），体外成熟后进行体外受精，发现与 OSF 共培养的 COCs 体外受精后囊胚率显著上升。小鼠体外受精技术研究中，COCs 在体外成熟过程中经过重组 GDF9 处理后，体外受精获得的胚胎发育较快，获得的囊胚内细胞团细胞数量较多，胚胎移植后代成活率也显著升高（Yeo 等, 2007），表明在卵母细胞成熟较短的时期添加 OSF，能够对卵母细胞发育进程产生重要的影响，并且这种影响能够持续到胚胎发育晚期，甚至胎儿发育期。卵母细胞可能通过 OSF 调节周围微环境的能力，促进了卵母细胞胞质的成熟（Yeo 等, 2007）。

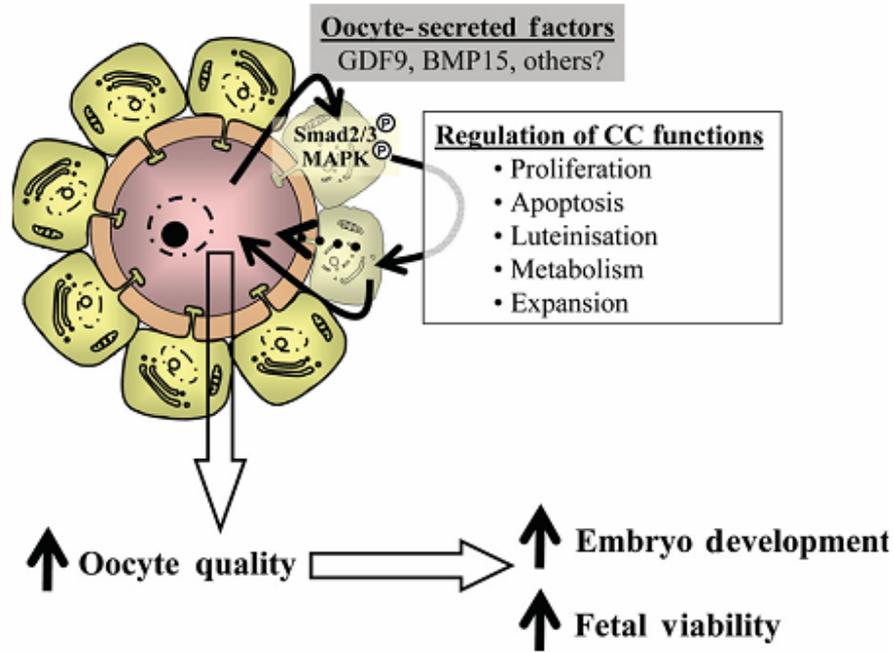


图 1-1 卵母细胞分泌因子（OSF）调节卵丘细胞和卵母细胞示意图
（引自 Gilchrist 等，2008; Human Reproduction Update, 159-177）

1.3 奶牛体外性控胚胎生产

牛常规精液体外受精技术的发展和广泛应用促进了牛体外性控胚胎生产技术的研究。目前依据 X、Y 染色体 DNA 含量差异，利用流式细胞分离仪分离 X、Y 精子使生产牛性控精液的效率不断提高（Moruzzi, 1979），极大地推进了牛体外性控胚胎的生产（Cran 等 1993, 1995）。流式细胞仪分离精液的准确率达到了 85%~95%，分离速度 $1.5 \times 10^7 \sim 2.0 \times 10^7$ 个/小时（Garner 和 Seidel, 2008）。

虽然性控精液体外受精过程与常规精液体外受精是一样的，但是由于分离性控精液活力受到一定的影响，而且受精时的精子数较少等因素，与常规精液 IVF 比较，牛性控冻精体外受精效率相对较低，囊胚率一般低于 30%（Lu 等, 1999, 2004; Xu 等, 2006, 2009），严重制约了性控冷冻精液 IVF 效率提高。为了解决上述问题，许多研究者研究了体外受精时精子浓度（Ward 等, 2002; Ward 等, 2003）、添加肝素浓度（Lu 等, 1999）、受精时间（Barcelo'-Fimbres 等, 2010）等因素的影响，以期提高奶牛体外性控胚胎生产和应用水平。

1.3.1 精子浓度

在牛 IVF 技术研究中，无论是利用常规精液还是分离的性控精液，精子浓度对体外受精效率有着重要影响。在性控精液 IVF 中，高浓度性控精子的囊胚率是低浓度精子组

的3倍(31-33% vs.11-13%)(Xu等, 2006)。

因此为了降低性控胚胎体外生产成本,许多学者在卵母细胞数量确定和性控精子浓度确定的情况下,对体外受精滴体积的大小进行了优化,取得了较好的效果(Lu等, 2004; Xu等, 2006)。

1.3.2 精子质量

体外受精实验中,种公牛精液的质量对于体外受精效率的影响比较大。大量研究表明,不同种公牛的常规精子或性控精子在体外受精能力方面存在较大的差异(Kurtu等, 1996; Lu等, 2001; Zhang等, 2003; 吴冬生等, 2009; Xu等, 2009),不同种公牛精子在活力、获能、顶体反应参数上差别较大是导致上述结果的重要原因(Shi等, 1990; 张明等, 2006)。

在进行体外受精实验时,需要对所采用的种公牛精液进行筛选,以选取体外受精效率较好的种公牛个体,有助于提高体外受精效率。另外,采用特异的药品处理精子,有助于提高受精精子的质量。Nagao等(2010)研究表明,甲基 β -环糊精能够降低活精子的数量,但却能够提高活精子获能及顶体反应的能力。在进行体外受精之前,采用0.5, 1.0 and 1.5 mM MBCD处理精子2-4小时,显著性提高了卵母细胞受精率,但对受精卵发育到囊胚的比率没有影响(Nagao等, 2010)。

1.3.3 肝素浓度

在牛IVF中,一般一定浓度的肝素处理精液使其体外获能(Capacitation),浓度一般为10 μ g/ml。研究表明,不同种公牛的精子获能时需要肝素的浓度可能是不同的,如果在体外受精过程中根据不同的公牛而采用不同的肝素浓度处理精液,可能是提高牛体外受精效率的有效技术(Lu和Seidel, 2004; Cui等, 2007)。

1.3.4 胚胎体外培养体系

不同培养体系对不同性别体外受精胚胎的发育能力可能有着不同的影响。研究结果表明,牛体外受精的雄性胚胎发育速度快于雌性胚胎,因而不同性别的胚胎可能在同一时间就需要不同的营养物质(Beyhan等, 1999)。有研究表明,KSOM体外培养系统比较有利于雄性胚胎发育(Nedambale等, 2004),而CR1aa体外胚胎系统则有利于雌性胚胎发育(Xu等, 2006)。

1.3.5 能量物质

培养液中葡萄糖的含量对牛IVF胚胎性别比例可能有着重要影响。许多研究结果表

明, 培养液中高浓度葡萄糖能够在 IVF 由桑椹胚至囊胚的发育过程中, 特异的阻断雌性胚胎的发育, 从而提高扩张囊胚中雄性胚胎的比例 (Larson 等 2001; Gutierrez-Adan 等, 1999; Peippo 等 2001)。在 IVF 雌性胚胎发育的早期阶段, 两条 X 染色体都是激活的, 位于 X 染色体上基因(G6PD、HPRT)的表达要比雄性胚胎高, 这可能是造成高浓度葡萄糖培养液中雌雄胚胎性别比例失衡的原因 (Kimura 等, 2005)。

在培养液中添加果糖, 能大大提高牛体外性控胚胎 A 级囊胚的比例 (Chaubal 等, 2009)。而在体外胚胎培养液中添加特定氨基酸, 也有利于提高体外受精胚胎的囊胚率 (Gardner, 2008)。

1.4 其他研究进展

1.4.1 受精卵体外发育阻滞

由于现阶段的体外培养体系无法达到体内水平, 哺乳动物受精卵体外培养时常常会出现“发育阻滞”现象。早期胚胎“发育阻滞”阶段在不同动物上有所差异, 牛的体外胚胎发育阻滞常常出现在 8-16 细胞阶段。

与体细胞共培养, 则可使牛受精卵体外生产胚胎比较顺利地通过“发育阻滞”。卵丘细胞共培养是目前应用比较广泛的一种体细胞共培养体系 (Orsi 等, 2007), 其主要优点有制备便利、不易污染等 (Goovaerts 等, 2009)。目前, 关于卵丘细胞共培养促进体外胚胎发育的机理仍不十分清楚, 已知的作用主要有: 分泌一些能够清除体外胚胎培养过程中释放到培养液中的有毒成分 (de Wit and Kruip, 2001; Tan 等, 2000), 比如: 生长因子 (Wastond 等, 1994)、细胞因子以及特异的蛋白质 (Henderson 等, 1987); 能够清除培养液中的氧自由基, 而后者常常引起胚胎发育阻断 (Joo 等, 2001; Wei 等, 2001)。

1.4.2 体外受精过程中活性氧积累的影响

体外受精过程中, 不断累积的活性氧会对精子、卵母细胞和受精后胚胎造成毒性, 不利于体外受精胚胎的发育 (Gonçalves 等, 2010)。最近的一些研究表明, 在洗净液、受精卵体外培养液中添加抗氧化剂, 会有助于减缓活性氧的毒性作用, 进而提高体外受精效率。

褪黑素是由哺乳动物的松果体产生的一种胺类激素, Tan 等 (2007) 研究表明, 褪黑素及其代谢物能够有效清除细胞中自由基。Sainz 等 (2003) 研究也表明, 褪黑素能够阻止细胞凋亡。在体外成熟液中添加褪黑素能够提供核成熟的比率 (Manjunatha 等,

2009; Kang 等, 2009; Shi 等, 2009)。褪黑素也能够直接保护卵母细胞, 使其免受氧化应激的影响 (Tamura 等., 2008)。在胚胎培养液中添加褪黑素也能够提高囊胚发育率 (Papis 等, 2007; Rodriguez-Osorio 等, 2007; Manjunatha 等, 2009)), 褪黑素浓度一般为 10^{-9} M。

另外, 维生素 E 也具有抗氧化功能。在洗精液中添加 50 mM 维生素 E, 能够提高用于体外受精精子的活力, 进而提高体外受精效率 (Marques 等, 2010)。

1.4.3 卵母细胞来源供体牛繁殖疾病的影响

牛场中存在的许多病毒性繁殖疾病对体外受精效率有着严重影响。例如, 牛病毒性腹泻病毒(BVDV)是一种主要影响牛生殖系统的病原体, 常常会引起流产, 妊娠率降低以及永久性感染。有实验表明, BVDV、细胞病变 BVDV (CP-BVDV), 能够显著性降低精子对透明带的粘附作用, 进而降低体外受精的受精率 (Daniel 2004; Talebkhan 等, 2011)。

1.4.4 提高体外受精胚胎发育能力

现阶段, 体外受精胚胎在质量上与体内生产胚胎存在较大差距。在体外受精或受精卵体外培养过程中, 添加一些对胚胎发育有益的物质是提高受精胚胎质量的一个重要途径。曲古霉素 A (TSA), 是一种组蛋白脱乙酰酶抑制剂。在体外受精过程中, 添加 TSA 能够在不影响卵裂率、囊胚率的情况下显著提高体外受精囊胚内细胞团细胞数量, 这说明体外受精过程中基因组的重要表观遗传修饰对早期囊胚的细胞增殖和分化具有滞后效应 (Ikeda 等, 2009)。

1.5 牛卵母细胞体外受精存在的问题及对策

随着牛卵母细胞体外受精研究不断深入和技术的不断完善, 目前牛体外生产和移植发展迅猛, 国内已有多家单位从事奶牛体外胚胎移植推广, 取得了较好的经济效益和社会效益。但是牛胚胎移植普遍存在受胎率低 (30%以下) 和流产率高的问题, 使得体外胚胎移植繁殖动物后代成本较高, 难以大规模推广。

牛体外受精胚胎大规模应用必须解决下列具体问题: (1) 体外胚胎遗传背景清楚; (2) 降低体外胚胎, 特别是体外性控胚胎的生产成本; (3) 提高移植妊娠率。

1.5.1 体外受精胚胎系谱混乱

现阶段, 屠宰厂屠宰的牛中, 很多都没有明确的系谱, 且屠宰厂均是集中屠宰、流水线作业, 因而采集卵巢时区分每对卵巢的来源很困难。体外受精过程中, 卵母细胞的

系谱无法确定，导致体外受精获得的囊胚系谱混乱，进而由体外受精胚胎移植后获得的犊牛无法明确系谱。而目前，奶牛的系谱对于提高我国奶牛的生产水平至关重要，这使得体外受精技术的实际应用受到极大的限制，尤其是在种牛培育中的应用受到极大限制。

可以通过以下三条途径解决牛 IVF 卵母细胞缺乏系谱的问题：

第一是通过 OPU 技术；

第二是选择奶牛场淘汰的优秀高产母牛，在屠宰时明确标记卵巢来源，每头奶牛的卵巢单独保存并进行标记。在卵母细胞采集、体外受精、受精率体外培养过程中，确保卵母细胞、受精卵系谱一一对应，生产系谱明确的体外胚胎。

第三是通过幼畜超排技术获得犊牛卵母细胞。

1.5.2 性控胚胎生产成本高

虽然目前随着牛精液分离技术的不断提高，精子分离速度有了很大提高，但目前商业化生产牛性控冷冻精液价格（300~500 元/支）远远高于常规精液，而且分离的性控精液有效精子数（200 万个左右/支）远远少于常规精液，同时由于流式细胞仪分离精子过程中染色、激光照射、体外停留时间较长等原因，分离后精子的活力显著性降低（Cran 等，1993；Wheeler 等，2006；Underwood 等，2010）。因此与常规体外受精精子密度相比（ 1×10^6 个/mL），性控精液进行体外受精时需要较高的精子密度（ 1×10^6 个/mL~ 2×10^6 个/mL）（Wilson 等，2006；刘俊平等，2005；Liang 等，2008；Barceló-Fimbres 等，2010）。

因此，目前体外牛性控胚胎生产成本较高，在一定程度上限制了该项技术在畜牧业生产中的应用。

1.5.3 体外培养对 IVF 犊牛的影响

虽然目前牛体外培养体系得到优化，体外受精技术效率也不断提高，并在生产中得到广泛应用，但是 IVF 培养体系无论如何与牛体内发育环境还存在差异，尤其是输卵管和子宫角的一些微环境（如一些细胞活性因子、激素分泌变化模式等）体外受精无法模仿。同时由于牛 IVF 胚胎在体外培养时间较长，体外培养的一些因素对胚胎造成不利的影 响，从而引起体外受精胚胎发育能力降低、移植妊娠率低、妊娠时间延长、妊娠期流产率高等现象。同时，有研究表明，牛体外受精犊牛可能出现围产期突然死亡以及犊牛呼吸困难、公牛比例增加、出生时体尺增加等现象（Camargo 等，2010；Bertolini 等，2002；Farin 等，2006；Kruip 等，2000；Van Wagendonk-de Leeuw 等，2000）。

体外受精犊牛出生时体重明显增加现象被称之为“巨胎综合症”（Large Off-spring Syndrome, LOS）（Young 等, 1998）。研究表明, 造成 LOS 的一个重要原因是体外生产胚胎的某些培养条件(Lazzari 等, 2002), 影响了胎儿及出生后犊牛发育过程中一些重要基因的表达(Farin 等, 2006)。Lazzari 等(2002) 研究指出, 体外胚胎基因表达异常与犊牛重量超重有着重要联系。体外培养会引起表观遗传改变, 进而引起胚胎(Camargo 等, 2005; Shi 等, 2002)、胎儿和胎盘 (Farin 等, 2006) 中基因表达谱异常, 影响胎儿发育。

绵羊胎儿中 IGF2r 基因表达的改变与胎儿增重有着紧密联系 (Young 等, 1998)。血清和体细胞共培养也会引起胚胎基因表达异常(Lazzari 等, 2002; Rizos 等, 2002), 使出生重增加(VanWagtendonk-de Leeuw 等, 2000)。

因此, 不断优化和改进牛体外胚胎生产的各种条件, 研究和揭示体外胚胎基因表达异常的机理, 从而提高体外胚胎移植妊娠率和产犊成活率, 减少 IVF 犊牛异常的比例, 是奶牛体外胚胎生产技术在畜牧业生产中推广应用的基础。

随着体外受精技术机制的深入研究, 牛卵母细胞体外受精技术日趋完善, 并在生产得到广泛应用, 而体外性控胚胎生产效率的提高将为我国奶牛繁育提供新的技术途径。

第二章 动物体细胞克隆研究进展

摘要: 动物体细胞克隆, 又称体细胞核移植, 是一项高新生物技术, 不仅为发育生物学、生殖生物学等研究提供了新的方法, 而且为转基因技术研究和提高农业动物繁殖效率提供了新的技术途径。本章综述了近 20 年来动物体细胞克隆研究进展, 尤其是我国牛、羊和猪等动物克隆技术研究和应用取得的成就, 分析了体细胞克隆及克隆动物存在的问题以及体细胞克隆技术在农业生物动物中的应用前景。

前言

自从 1997 年 Dolly 克隆绵羊出生以来 (Wilmut 等, 1997), 动物克隆技术和克隆动物已经成为人们日常最经常提起的科学名词之一。

克隆是英文 clone 的音译, 在这里是指通过无性繁殖形式由单个细胞产生的, 和亲代非常相像动物后代的过程, 所获得的动物就称克隆动物。动物克隆技术又称细胞核移植 (本文克隆技术和核移植技术表示同一概念), 其基本技术过程是将含有遗传物质的供体细胞核 (高度分化的体细胞或者早期胚胎细胞) 移植到去核卵母细胞中, 然后进行融合 (电融合或者化学融合) 并在体外培养发育到一定阶段 (囊胚), 移植到受体动物的子宫内妊娠, 获得与提供细胞核的动物遗传物质相同的后代。动物克隆技术按照细胞核的来源不同, 可以分为胚胎细胞克隆 (embryonic cell nuclear transfer) 和体细胞克隆 (somatic cell nuclear transfer, SCNT)。

虽然很早就有科学家开展低等动物如两栖类克隆研究 (Paul Verma 和 Alan Trounson, 2006), 但是直到 1981 年 Illmensee 和 Hoppe 才宣布获得早期胚胎克隆小鼠 (Illmensee 和 Hoppe, 1981), 然而随后很多研究者未能重复该试验 (作者自己也未能重复), 引起人们对该试验真实性的猜疑, 甚至有的生物学家认为通过核移植技术不能复制动物个体 (McGrath 和 Solter, 1984), 但是 Willadsen 等 (1986) 获得胚胎细胞克隆绵羊后, 克隆技术的研究又重新蓬勃发展。而体细胞克隆绵羊 Dolly 的出生才真正把克隆技术推上一个新的发展高度。

虽然克隆技术取得了辉煌的成就, 但是目前动物体细胞克隆技术的总体效率还比较低 (一般在 2%~10%), 人们对克隆胚胎发育过程中细胞核重编程以及核质互作机制还知之甚少, 很多克隆动物存在生长发育异常现象。而同时由于克隆技术在发育生物学研究、疾病治疗、动物繁育、转基因动物研究等具有极大的应用前景, 以及担心克隆技

术被滥用于人的生殖克隆，引发了全世界范围的科学家、社会活动家、宗教人士、政治家以及普通民众的广泛关注和激烈争论。2001年12月，法国和德国等国家请求联合国拟定一项关于禁止人的克隆国际公约。2005年3月8日，联合国宣布了关于人克隆的政治宣言——《联合国关于人的克隆宣言》，明确反对克隆技术用于人的生殖。美国、中国、英国、瑞典、日本等国家反对人生殖性克隆，但是支持治疗性克隆。

本章综述了近20年来动物体细胞克隆技术研究进展，尤其是我国牛、羊和猪等动物克隆技术研究和应用取得的成就，分析了体细胞克隆及克隆动物存在的问题以及体细胞克隆技术在农业生物动物中的应用前景。

2.1 体细胞克隆技术研究的主要成就

1997年英国罗斯林研究所 Wilmot 等利用妊娠期绵羊乳腺细胞——高度分化的体细胞作为细胞核供体，获得了世界第一例体细胞克隆绵羊 Dolly，引发了全世界对克隆动物研究和应用的兴趣，动物体细胞克隆技术（SCNT）的研究成为全世界各国的研究热点，并相继获得了体细胞克隆牛（Cibelli，1998；Kato，1998）、小鼠（Wakayama 等 1998）、大鼠（Zhou Q 等，2003）、山羊（Baguisi 1999）、猪（Irina Polejaeva，2000）、猫（Shin 等 2002；Gómez,等 2004）、兔（Chesne 等，2002）、马（Galli 等,2003）、骡子（Woods 等，2003）、狗（Lee，等 2005）、狼（Kim 等，2005）、鹿（Eurekalet.等，2005）、盘羊（Loi P 等，2001；陈大元等，2007）、雪貂（Li 等 2006）、骆驼（Wani 等，2010）和印度野牛和爪哇野牛（Lanza 等，2000；BBC 新闻，2005）等动物后代。

2.1.1 国际体细胞克隆动物出生情况

自从 1997 年 Dolly 克隆绵羊出生以来，先后获得了体细胞克隆大鼠 和小鼠等啮齿类动物，克隆牛和山羊等农业生产大动物、狗和猫等犬科和猫科宠物，

以及印度野牛等濒危动物。表 2-1 详细列出了通过胚胎细胞核体细胞克隆技术获得成活动物的时间、供体细胞种类等。

表 2-1 国际动物克隆技术标志性研究进展情况一览表

Species 物种	Date 时间	Donor age 供体	Cell type 细胞类型	Reference 参考文献
Sheep, 绵羊	1996	Embryo	Epithelial like	73
	1996	Fetal	Fibroblast	302
	1997	Adult	Mammary,epithelial	302
Cattle, 牛	1998	Fetal	Fibroblast	86
	1998	Adult	Oviduct,epithelial	161
Mouse, 小鼠	1998	Adult	Cumulus	282
	1999	Embryo	ES	289
Goat, 山羊	1999	Fetal	Fibroblast	54
Pig, 猪	2000	Adult	Cumulus	153
Caur, 印度野牛	2000	Adult	Fibroblast	178
Mouflon 欧洲盘羊	2001	Adult	Granulosa	189
Cat, 猫	2002	Adult	Cumulus	253
Rabbit, 兔子	2002	Adult	Cumulus	82
Banteng 爪哇野牛	2003	Adult	Fibroblast	57
Rat, 大鼠	2003	Fetal	Fibroblast	323
Mule, 骡子	2003	Fetal	Fibroblast	304
Horse, 马	2003	Adult	Fibroblast	119
Deer, 鹿	2005	Adult	Fibroblast	107
African Wildcat 非洲野猫	2003	Adult	Fibroblast	131
Ferret, 雪貂	2006	Fetal	Fibroblast	186
Dog, 狗	2005	Adult	Fibroblast	184
Wolf, 狼	2005	Adult	Fibroblast	166
Camel, 骆驼	2010	Adult,Fetal	Fibroblast,Cmulus	291

2.1.2 我国体克隆技术与克隆动物出生情况

在动物体细胞克隆领域,我国也经历了与世界相似的发展历程,即从胚胎细胞克隆到体细胞克隆的研究过程。

在“七五”和“八五”“863”计划等国家科技计划的大力支持下,我国科学家敏锐地认识

动物体细胞克隆技术的实际意义及应用价值，紧跟国际相关技术的前沿研究，结合我国的实际国情，通过不懈的努力，取得了一系列重大进展，在这一研究领域已经跻身于世界前列，先后获得克隆山羊、绵羊、水牛、牛、猪、兔和北山羊等动物。表 2-2 是根据学术刊物公开发表的研究论文总结的我国克隆技术研究主要进展情况（截至 2010 年 12 月份）。

以下章节较详细地介绍了我国体细胞克隆牛以及转基因克隆牛、克隆羊和克隆猪研究取得的进展。

2.1.3 牛体细胞克隆技术

2001 年中国农业大学陈永福等承担的“863”计划“动物乳腺生物反应器”项目，将在新西兰生产的 64 枚克隆胚胎移植到的受体母牛，妊娠 4 头，其中三头在妊娠过程中流产，一头维持妊娠到预产期，并且于 10 月 15 日，通过剖腹在深圳绿鹏公司转基因基地动物繁育基地获得克隆活犊牛，这是我国首例体细胞克隆牛，非常可惜的是，由于哺喂初乳不当而死亡（安晓荣等，2002，图）。

2001 年，董亚娟等将在日本利用胎儿上皮成纤维细胞为供体核，利用成熟的卵母细胞作受体构建的体细胞重构胚，在国内移植 5 头受体，妊娠 2 头，在青岛农业大学（原山东省莱阳农学院）顺利降生两头体细胞克隆牛（董雅娟等，2002，图 2-2）。这是我国首次获得活的体细胞克隆牛，通过对所获得的克隆小牛 DNA 分析，克隆牛遗传物质与受体无亲缘关系，而与提供细胞核的牛一致。其主要的技术特点：一是采用点击去核法，对卵母细胞的损伤小；二是采用负压气相系统培养方法，有效提高了重构胚囊胚发育率；三是采用-35℃冷冻保存的细胞作为核供体细胞。

元研究员主持的国家自然科学基金重点项目“家畜体细胞无性繁殖研究”，在山东省曹县山东中大动物胚胎工程中心开始克隆牛胚胎制作和移植试验。他们利用成年荷斯坦奶牛和盖洛威（德国黄牛）肉牛耳上皮成纤维细胞作为供体核细胞，利用鲁西黄牛卵母细胞做为核移植受体制作重构胚，980 枚重构胚有 261 枚重构胚发育到囊胚，230 枚胚胎移植到 130 头受体母牛，妊娠 26 头，12 头受体维持妊娠到分娩期，并于 2002 年 1 月中旬到 2 月中旬获得 14 头克隆牛后代（陈大元等，2003，图 2-3），这是我国获得首批完全在国内完成克隆胚胎制作和胚胎移植的克隆牛后代，实现了我国成年体细胞克隆牛成活群体零的突破。

表 2-2 我国动物克隆技术研究进展情况一览表（获得克隆活动物时间顺序）

Species 物种	Date 时间	克隆动物数量	Donor age 供体	Cell type 细胞类型	Reference 参考文献
山羊 goat	2002	1	成年	耳皮肤成纤维细胞	14
		2	成年	颗粒细胞和成纤维细胞	178
	2006	1	胚胎	早期胚胎细胞	19
		5	转 rhATIII 胎儿成纤维细胞	颗粒细胞和成纤维细胞	44
		2008			
牛 cattle	2002	2	胎儿	皮肤成纤维细胞	12
	2002	2	成年	卵丘细胞	2
	2007	3	成年	耳皮肤成纤维细胞	39
水牛 buffalo	2005	2	成年	耳皮肤成纤维细胞	石德顺等
	2005	3	胎儿	胎儿成纤维细胞	29
猪 pig	2008	14		耳皮肤成纤维细胞	28
	2007	1	胎儿	胎儿成纤维细胞	10
	2008	1	成年	睾丸细胞和胎儿成纤维细胞	24
				胎儿	



图 2-1 体细胞克隆牛（安晓荣等，2002 年。（图片来源：中国科学 C 辑，2002，32（1）71-76，



图 2-2 山东莱阳农学院的克隆牛（康康、双双）。图片来源：中国农业科学，2002，35（8）：37 版图 II 图 3

大

这次我国“土生土长”的克隆牛的技术具有中国的特点，“家畜体细胞无性繁殖研

究”项目首席科学家陈大元教授认为：一是所使用的体细胞全部为成年牛的体细胞；二是重构胚（克隆胚）完全是我国科研人员在现场完成的；三是采用了新的去核方法，提高了去核效率和减少了对卵母细胞的损伤。

2002年4月27日 中国农业大学等单位克隆出我国第一头冀南黄牛(图 2-4)。随后，我国许多单位先后开展了体细胞克隆技术的研究。

2003年新疆金牛公司获得克隆存活奶牛 12 头。



图 2-3 体细胞克隆 奶牛和盖洛维肉牛(中科院陈大元等, 图片来源, 科学通报, 2003, 48 (8): 768-773 图 1)



图 2-4 我国第一头体细胞克隆冀南黄牛 (Bocve: 波娃)(中国农业大学等, 图片来源 Chinese Science Bulletin, 2003, Vol.50 No.22 2592-2597 Fig2 (a))

2.1.4 体细胞克隆羊

我国体细胞克隆羊研究也取得重大进展, 西北农业大学张涌等采用成年山羊的体细胞作为核供体进行克隆技术的研究, 并于 2000 年 6 月 22 日获得体细胞克隆的山羊“阳阳”(图 2-5), 此克隆羊一切发育正常, 未出现早衰和发育异常现象, 与胚胎克隆公羊“帅帅”自然交配后于 2001 年 8 月顺利产下一公一母两只羔羊, 证明体细胞克隆山羊和普通山羊一样具有正常的繁殖能力。2001 年 10 月 1 日和 10 月 9 日, 扬州大学成勇等获得体细胞克隆山羊, 通过 DNA 指纹图谱分析, 所获得的克隆山羊后代的指纹图谱与提供细胞核的羊完全一致。

2007 年, 天津畜牧兽医研究所刘海军等获得克隆波尔山羊后代 (图 2-6)。



图 2-5 西北农林科技大学的克隆青山羊



图 2-6 天津畜牧兽医研究所的克隆波尔山羊

2.1.5 猪克隆技术

体细胞克隆猪在培育抗病猪、优良地方品种猪保种、人动物疾病模型建立和人类器官移植方面应用前景广阔。然而，猪是较难核移植的动物之一，进展也相对较为缓慢。自从1997年体细胞克隆羊 Dolly 成功之后，直到2000年，美国科学家 Polejaeva 等才首次获得了体细胞克隆猪的成功。克隆猪成功被攻克之后，人们又利用体细胞克隆技术开始探索生产转基因、基因组修饰（如基因打靶）猪。2005年，已经有美国、英国、日本、韩国、澳大利亚以及我国台湾省近十多个研究组取得了猪体细胞克隆的成功。

2006年，中国农业大学李宁院士课题组首次获得了中国第一例克隆猪—中国实验用小型猪（香猪）体细胞克隆猪。

2007年，东北农业大学刘忠华教授课题组获得了东北民猪体细胞克隆猪。同年，上海农科院畜牧研究所与上海交大医学院附属新华医院发育生物学研究中心、广西大学与广西畜牧研究所合作，分别获得了巴马香猪体细胞克隆猪。

2008年，中国农业大学李宁院士课题组与华南农业大学吴珍芳课题组、温氏食品集团合作，获得了5头长白品种的体细胞克隆猪。



图 2-7，中国农业大学获得的克隆猪



图 2-8，体细胞克隆东北民猪（刘忠华等，2007年）
图片来源：中国科学 C 辑：37（6）：637 图 1）

2.1.6 转基因体细胞克隆技术

体细胞克隆技术是提高转基因效率的重要和有效的技术途径，我国在利用体细胞克隆技术开展转基因动物研究和应用方面取得了重要进展。

1999年10月，中科院发育生物研究所和扬州大学合作研究，经过艰辛努力，成功地采用克隆技术制备转基因羊。即取用普通山羊若干体细胞，在体外培养时就将外源基因整合到体细胞的染色体中，然后挑选出已含有外源基因即转基因的体细胞，进行克隆，进而得到转基因体细胞克隆羊。此法克服了显微注射法的缺点，成功率达到100%。

我国在转基因克隆猪研究方面，也取得了很快的发展。

2005 年中国农业大学李宁院士课题组生产出转绿色荧光基因体细胞克隆猪胚胎。

2006 年东北农业大学刘忠华教授主持转基因克隆猪课题获得成功,使我国成为世界上继美国、韩国、日本之后第四个获得绿色荧光蛋白转基因猪的国家。

2008 年,中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、军事医学科学院生物工程研究所和河北玉田种猪场玉田县牧富种猪繁育有限公司合作,培养出一头转“ ω -3”脂肪酸去饱和酶基因的克隆猪,经分子生物学鉴定,证实此猪为转基因克隆猪,这使中国成为继美国之后第二个能培育富含“ ω -3”多不饱和脂肪酸克隆猪的国家。

2008 年,以吉林大学农学部畜牧兽医学院赖良学教授为首席专家和军事医学科学院军事兽医研究所的专家共同组成的课题组,获得了世界首例“带有抗猪瘟病毒基因的克隆猪”。

2008 年,中国农业大学李宁院士课题组“体细胞克隆猪和转基因体细胞克隆猪技术平台的建立与应用”项目经教育部组织国内有关专家鉴定,中国克隆猪和转基因猪技术整体效率达国际先进水平。李宁院士的课题组与北京一家生物技术公司合作,经过 4 年努力建立的体细胞克隆猪、转基因克隆猪和基因敲除克隆猪生产技术平台,先后获得哥廷根医用小型猪、中国实验用小型猪、长白猪和大白猪品种的体细胞克隆猪共 28 头,16 头转人溶菌酶基因克隆猪和 1 头转人溶菌酶基因再克隆猪,4 头肌肉生长抑制素(MSTN)基因单位点敲除的克隆长白猪,其中体细胞克隆哥廷根医用小型猪、转人溶菌酶基因克隆猪、MSTN 基因单位点敲除均是国际上首次获得。

2003 年 10 月 13 日,中国农业大学李宁院士研究团队利用体细胞克隆技术获得了我国第一头转人岩藻糖转移酶基因克隆牛,随后,又获得了一批转人溶菌酶、人乳铁蛋白和人乳清蛋白的转基因体细胞克隆牛。

2.1.7 异种动物克隆技术

所谓异种动物克隆就是利用一种动物细胞(胚胎细胞或体细胞)作为核移植供体,而利用动物分类学上不同种、属,甚至科和目的其他动物的卵母细胞作为核移植受体制备和繁殖需要的动物。异种动物克隆是保护和繁殖珍贵稀少或者濒危动物的有效技术方法,然而,由于供体细胞和受体卵母细胞在进化上亲缘关系较远,异种动物克隆技术的难度较大,目前只获得了成活的欧洲盘羊、印度野牛和新疆北山羊(盘羊)。



第一头转基因体细胞克隆牛



胞克隆牛群



图 2-11 富含“ ω -3”转基因克隆猪（中国农业科学院北京畜牧兽医研究所。图片来源：

<http://www.iascaas.net.cn/sciences/2008-08-19>

图 上海交通大学获得转基因兔

（左为转基因克隆兔，右为受体母兔）

我国较早就开展了异种动物克隆研究，1993 年梅祺等研究鼠—兔异种克隆，以 8—细胞小鼠胚胎分裂球作核供体移入兔卵母细胞，异种克隆的卵裂率达到 43%，桑囊率为 5.4%。

1999 年，陈大元主持的国家自然科学基金重点项目“家畜体细胞无性繁殖研究”开展了大熊猫克隆研究，并取得重大进展，大熊猫的体细胞核移植到去核的家兔卵母细胞，获得发育到囊胚阶段的重构胚，桑囊率为 9—11.7%。2001 年李劲颂等研究了连续核移植对异种克隆猫胚胎发育的影响。

2003 年陈大元等将猴体细胞移入兔卵母细胞中，获得猴—兔异种克隆囊胚。

2004 年中国农大李宁院士等开展了牦牛、羚羊异种克隆的研究，将牦牛不同体细胞移入普通牛去核卵母细胞，异种克隆胚胎囊胚率为 5%~35%，移植普通牛受体后 60 天妊娠 3 头，并且有 1 头受体母牛维持妊娠到 7 个月。

2004 年，中国科学院、新疆畜科院和新疆金牛生物股份有限公司合作，利用山羊卵母细胞作核移植受体，国内首次成功获得活的克隆北山羊（盘羊）。

图 2-12 体细胞克隆北山羊及其受体母羊。图片来源 Molecular Reproduction and Development , 2007, 74:32 图 4



2006 年，安徽农业大学章志国等研究了山羊—兔异种克隆连续核移植，原代、继 I 代和继 II 代异种克隆胚胎的囊胚率分别为 10%、13.8% 和 0%。

2008 年，韦精卫等开展了黄牛和水牛异种转基因克隆技术的研究，结果发现黄牛卵母细胞—水牛供体细胞构建的核移植重构胚囊胚率显著高于黄牛供体细胞—水牛卵母细胞构建的核移植重构胚。

2008 年，徐旭俊等较系统地研究了山羊 MII 期卵母细胞细胞质与异种哺乳动物如山羊、波尔山羊、牛、塔尔羊、熊猫以及人的成纤维融合的体细胞核移植胚胎着床前的发育能力。

2008 年，杨鹭等研究了人—牛异种克隆胚构建及其线粒体来源，发现人胎儿皮肤成纤维细胞移入牛卵母细胞后体外可以发育到囊胚，但是囊胚率低于同种牛—牛克隆胚胎。

2.2 体细胞克隆技术程序与方法

动物体细胞核移植 (SCNT) 是一项十分复杂、操作技术要求很高的技术方法，包括供体细胞的准备 (培养)、受体卵母细胞的准备 (体外成熟培养)、去核、移核、融合、激活、重构胚体外培养等。如果要获得克隆后代，还需要进行受体准备和胚胎移植等。SCNT 中每个技术环节都十分重要，其中任何一个环节出现问题都将直接影响克隆动物生产的效率，甚至直接决定克隆动物生产的成败。

在首例体细胞克隆羊多莉出生后的十几年来，许多科学家对克隆技术进行了改进，动物体细胞核移植技术效率得到很大的提高，先后利用多种细胞获得了多种克隆动物，并用于制备转基因动物 (Wilmut 等 2002 ; 2009)，但是在动物体细胞核移植技术研究中，核移植程序主要还是 Wilmut 等 (1997) 克隆 Dolly 绵羊采用的方法和 Wakayama 等 (1998) 克隆小鼠采用的方法，习惯上将 Wakayama 等核移植方法称为“檀香山”核移法

(见图 2-13)。

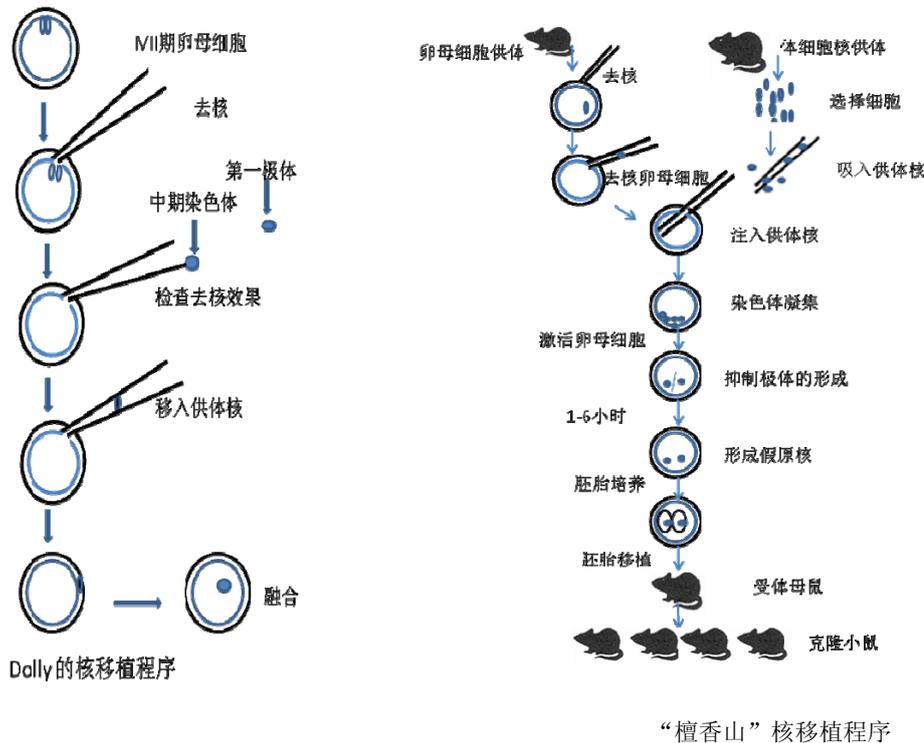


图 2-13 体细胞核移植程序 (图片引自刘建中, 2002)

其实这两种方法主要技术环节是相同的, 主要区别是 Dolly 核移植程序中直接注射体细胞核, 然后需要进行融合, 从而使移入的细胞膜破裂, 细胞核融入受体细胞质, 激活后在受体细胞质的作用下开始重编程。“檀香山”核移植程序中注射供体细胞时首先将供体细胞的细胞膜破坏, 然后注射到受体细胞质内, 不需要融合过程, 而是停留一定时间后直接激活。

以下是动物克隆技术研究的主要环节。

2.2.1 供体细胞准备

SCNT 实际上就是供体细胞在受体卵母细胞质的作用下其基因组实现重编程而重新开始发育, 即体细胞核重新具有全能性 (Totipotency) 而重复个体发育和系统发育从而形成新的动物个体。因此, 供体细胞的准备是体细胞克隆技术和克隆动物研究十分重要的前期工作。

2.2.1.1 供体细胞的来源

核移植的供体细胞可以直接来源动物的组织细胞 (例如排卵卵母细胞周围的颗粒细胞、神经细胞和足细胞), 也可以来源于体外培养的体细胞。目前 SCNT 研究和克隆动

物制备中主要是利用体外培养一定代数的体细胞作为供体核细胞。

2.2.1.2 供体细胞来源动物

SCNT 的供体细胞可以来源于成年动物组织、胎儿组织、干细胞和诱导干细胞 (iPS) 等, 而不同年龄的动物细胞的重构胚发育存在差异, 一般情况下来源于胎儿的供体细胞重构胚囊胚发育率和移植妊娠率较高。

2.2.1.3 供体细胞类型

虽然动物组织存在 200 多种不同的细胞, 但是截至目前只有十几种体细胞获得了克隆后代, 因此 SCNT 中供体细胞类型的选择和处理对获得克隆结果就显得很重要。

核移植供体细胞可以选择: 颗粒细胞、乳腺上皮细胞、输卵管上皮细胞、皮肤成纤维细胞 (胎儿上皮和成年皮肤)、肌肉细胞、神经细胞、原始生殖细胞, 足细胞、干细胞和诱导干细胞等。

虽然许多体细胞处理后都可以作为供体细胞核, 但是核移植后的重构胚发育存在很大的差异, 与生殖有关的体细胞 (例如颗粒细胞、输卵管上皮细胞) 和胎儿组织的体细胞作供体细胞核移植能够获得较高的效率。

目前, 核移植中主要利用成年 (或胎儿) 皮肤成纤维细胞、颗粒细胞和乳腺上皮细胞作为 SCNT 供体细胞, 因为这类细胞取材较方便。

2.2.1.4 供体细胞处于的细胞周期

核移植供体细胞的细胞周期对核移植重构胚的发育具有重要影响 (Campbell 等, 1996)。虽然有些试验利用 M 和 G₂ 期细胞作为供体细胞进行克隆研究, 但是目前比较统一的认识是采用 G₀/G₁ 期细胞作为核供体可以获得较高的核移植效率 (Cibelli 等, 1998)。

通过接触抑制和血清饥饿的方法能够获得较高比例的 G₀/G₁ 期体细胞 (Zakhartchenko 等, 1999)。

2.2.2 卵母细胞准备与去核

2.2.2.1 卵母细胞的类型

早期克隆技术研究中利用受精后一定时间的卵母细胞作为核移植的受体, 而目前主要是利用体内或者体外成熟的 MII 卵母细胞作为核移植受体细胞。

2.2.2.2 卵母细胞去核

(1) 机械去核

机械去核是指利用显微操作方法或切割方法去除受体卵母细胞的核物质。

A. 显微注射针法去核

在显微操作仪下通过玻璃针将细胞核去除。目前大多采用盲吸去核法，就是选择成熟 M II 卵母细胞第一极体刚好排除时，通过显微玻璃针将第一极体下的一部分胞质吸除或挤压去除。此法的去核率与卵母细胞的成熟时间和操作者的熟练程度密切相关。可以通过 Hoechst33342 等核酸染料作为引导去核，能显著提高去核率，并且能减少盲吸去核法对卵母细胞质的损耗，但染料可能会对重构胚发育产生不良影响。一种称为纺锤体图像观察系统能观察到牛、羊等动物的卵母细胞纺锤体，引导去核，可以准确的去核，减少了对卵母细胞质的损伤。

B. 手工切割去核

在显微镜下用胚胎切割工具对去除透明带的卵母细胞切割第一极体及其下方部分胞质去核，该方法通常用于手工克隆。此法无需显微操作系统，在普通的体视镜下即可完成。但由于大量胞质被切割去除，难以使重构胚正常发育，所以通常在将两个去核的胞质融合到一起与供体细胞形成重构胚。

无论是显微注射针还是切割去核时可能都存在以下的问题：

- ① 要求熟练的操作技术；
- ② 体外操作时间较长；
- ③ 损伤卵母细胞质及其中的细胞器；
- ④ 重构胚发育率较低；

(2) 化学去核

化学去核法就是利用一定的化学物质处理卵母细胞，调节卵母细胞的细胞核和细胞质的发育，使细胞核失去功能或者将细胞核排出卵母细胞胞质外，从而达到去除卵母细胞核的目的。化学去核法常用的化学物质有放线菌酮（Fulka 和 Moor, 1993）、秋水仙素、乙醇（Ibanez 等, 2003）和依托泊苷等（Elsheikh 等 1998）。

化学去核法操作简单，去核率较高（去核率 > 85%，Fulk 等 1993），能大批量的处理卵母细胞而节省去核时间，从而提高移核效率，但是，研究表明，当用化学物质处理小鼠 M I 和 M II 卵母细胞时，虽然能获得较高的去核率，然而核移植重构胚卵裂率和囊胚率均较低（Elsheikh 等，1997, 1998），目前，还没有获得化学去核卵母细胞作为受体的克隆动物（Elena Ibanez, 2003）。

(3) 移核

将供体细胞核注射到去核受体卵母细胞的过程，称为移核。具体方法包括：

A. 显微注射针法移核

透明带下注射：将供体细胞用显微注射针注射到去核的卵母细胞卵周隙，然后将卵母细胞与体细胞融合。

胞质内全细胞注射：一种是将供体细胞破膜处理后用显微注射针注射到卵母细胞细胞质内；另一种直接将完整的供体细胞注射到卵母细胞质内。该方法避开了融合过程，简化了克隆程序。

B. 手工法移核

该方法是 Vajta 等（2001）发明的手工克隆（HMC）移植供体细胞（核）的方法，通过无透明带的去核卵母细胞与供体细胞在植物凝集素（PHA）等的作用下粘合，然后在一定的直流电作用下融合。该过程简便、快速，无需显微操作仪，并能有效的提高融合效率。

（4）融合

透明带下注射供体细胞和手工克隆需要将供体细胞与卵母细胞融合使供体细胞核进入卵母细胞胞质，目前大多采用电融合的方法。也可以通过化学融合，如聚乙二醇（Tesarik 等，2000），以简化克隆的融合程序。

（5）激活

阻滞在减数分裂 M II 期的卵母细胞需要一系列的理化因素引起胞质 Ca^{2+} 浓度升高引起一系列级联反应从而激活继续发育，发挥重编程的作用。目前大多采用 A23187、6-DMAP、乙醇、放线菌酮等化学试剂激活。

（6）体外培养

一般情况下，SCNT 的重构胚需要在体外培养一定的时间使之发育到一定的阶段，因此体外培养条件对核移植胚胎体外发育起十分关键的影响作用。不同动物的 SCNT 重构胚可能需要不同的培养液，目前开发了各种培养液(Lorthongpanich 等，2008)，例如猪胚胎专用 NCSU-23 培养液(Peters 等 2001; Lee 等 2003)、小鼠胚胎专用 CZB 培养液(Wakayama 等 1999)和 KSOM 培养液(Wakayama 等，2005)和 mSOFaa 培养液(Laowtammathron 等, 2005)、牛 CR1 培养液等。

不同动物的 SCNT 体外培养的温度要求也不同，例如小鼠重构胚要求 $37.5^{\circ}C$ ，牛重构胚的适宜培养温度是 $38.5^{\circ}C$ ，但是气相条件一般都是 5%二氧化碳的空气，湿度要求饱和湿度。

(7) 胚胎移植

如果要获得克隆动物就需要进行胚胎移植，因此受体动物的选择和处理就十分重要。

A. 受体种类

在克隆胚胎移植时，必须考虑受体动物的生殖生理状况，应选择生殖能力旺盛的受体动物作为克隆胚胎移植受体。研究表明，不同受体母牛（黄牛、Holstein 青年牛和经产母牛）的移植妊娠率可能没有差异，但是黄牛的流产率显著高于 Holstein 奶牛，而且获得活后代的数量也显著低于 Holstein 奶牛（陈大元等，2003）。

B. 移植胚胎数量

为了提高克隆胚胎的移植妊娠率，常常将多枚克隆胚胎移植到一头受体体内，但是移植较多的克隆胚胎可能存在一定的风险，因为受体移植克隆胚胎后如果几个胎儿同时妊娠，其中 1 个胎儿在妊娠中期或者后期死亡，就有可能引起受体母畜机体的强烈反应，从而引起妊娠终止或者流产。在牛克隆研究中，如果受体母牛移植多枚克隆胚胎时，常常获得克隆动物的机会更低，因此，目前在克隆牛研究中，1 头受体母牛一般移植 1—2 枚克隆胚胎。

2.2.3 影响体细胞克隆技术效率的因素

SCNT 是一项实际操作性强和影响因素十分复杂的技术体系，其中任何一个技术环节都可能最终影响克隆的效率，在这些影响因素中，供体细胞类型和阶段，受体卵母细胞质量和阶段等是影响 SCNT 效率的主要因素。

2.2.3.1 供体细胞周期和种类的影响

在体细胞核移植程序中，将供体细胞（体细胞）通过显微注射（或者手工克隆）移到受体卵母细胞（去核的生殖细胞）中，然后融合和激活后，供体细胞核发生重编程，使供体细胞核重新从起点“零点”开始发育，并最终形成克隆个体。供体细胞核是克隆动物遗传物质的来源，移入的细胞核发生时空正确的核重编程是克隆胚胎生产和克隆动物能否成功的关键。而受体卵母细胞质对移入的细胞核重编程起到不可或缺的作用，并支持重构胚的早期发育（Campbell 等，1996）。

因此，供体细胞和受体母牛细胞的选择和处理就是体细胞在核移植过程十分重要和关键的事件，特别是供体细胞和受体细胞之间发育同步性（协同性）对核移植至关重要。

2.2.3.2 供体细胞周期的影响

作为核移植供体细胞核来源，体细胞处于不同周期时就可能对核移植效率产生不同的影响。Wilmut 等所以能够获得体细胞克隆绵羊，与其在试验中利用 G₀/G₁ 的乳腺上皮细胞作为核移植供体细胞具有莫大的关系。许多研究表明，在体细胞核移植中，G₀ 期细胞作供体核的重构胚具有较高的囊胚发育率，重构胚移植后妊娠率和胎儿出生率也较高（CHO 等 2002）。

Kasinathan 等（2001）分别用接触抑制法获得的 G₀ 期和 G₁ 期牛成纤维细胞作核供体克隆牛的研究结果表明，虽然两组核移植重构胚体外发育相似，G₁ 期供体细胞的重构胚移植后获得 5 头克隆牛后代，但是 G₀ 期供体细胞的重构胚移植没有后未能获得后代，说明 G₁ 期供体细胞更支持克隆胚胎后期的胎儿发育。

而在另外一个试验中，Cibelli 等（1998）利用处于活跃增殖期的牛成纤维细胞生产的转基因克隆奶牛胚胎，28 枚胚胎移植 11 头受体后获得 3 头转基因克隆牛，但是该试验结果并不能确切说明所获得的克隆牛到底是来源于 G₁、G₀、S、G₂ 或者 M 期细胞。

SCNT 研究中供体细胞是否必须处于 G₀/G₁ 期，或者其他相期细胞也可以作为体细胞克隆的核供体，亦或不同的供体细胞阶段应该与不同的卵母细胞阶段相匹配，目前科学家之间还存在一定的争议。Wakayama 等（1999）研究小鼠克隆试验结果表明，非 G₀/G₁ 期的 M 细胞做供体也能够获得克隆小鼠后代，而利用颗粒细胞或者胎儿成纤维细胞做核供体也先后获得克隆牛（Tani,等, 2001）和克隆小鼠（Ono 等 2001）。然而以上试验结果并不能完全证明克隆后代就是来源于 M 期的供体细胞，因为在上述试验的供体细胞中，虽然 M 期细胞占主要比例，但是其中也含有一定比例的 G₀/G₁ 期。

但是，无论如何，在动物体细胞核移植中，获得高质量的 G₀/G₁ 期细胞对提高动物克隆动物效率具有十分重要的意义。

体外培养的体细胞经过一定的处理可以使细胞处于 G₀/G₁ 期，例如目前常用的血清饥饿和接触抑制法。乳腺上皮细胞在体外培养时首先在高浓度的血清（例如 10%）培养液中培养，然后在低血清（例如 0.5%，血清饥饿）培养一定的时间，使细胞暂时停止细胞增值周期而使多数细胞处于 G₀ 期（Wilmut, 1997），而体外培养接触抑制（细胞高度聚集化）比血清饥饿更容易获得 G₀ 期，而通过摇晃振动（shake-off）培养的细胞可以获得 G₁ 细胞（Kasinathan 等, 2001）。而通过添加蛋白激酶抑制剂——6-(苄基氨基)-2(R)-1-(羟甲基)丙基]氨基]-9-异丙基嘌呤（**Roscovitin**）也可以使培养的卵丘细胞体细胞处于 G₀/G₁ 期，而且克隆效率较高（Gibbons 等, 2002）。

Li 等（2003）研究雪貂克隆试验结果表明，不同培养天数的雪貂胎儿成纤维细胞在

0.2%血清的 DMEM 培养 14~16h 后, 不同细胞周期相 G0 /G1 , G2/M 和 S 期的细胞所占的比例不同, 培养 5d 的细胞血清饥饿后 G0 /G1 , G2/M 和 S 期细胞的比例分别为 86.3±2.3% , 3.2±0.5% 和 23±3.6% , 而培养 20d 的细胞饥饿时 G0 /G1 期细胞的比例达到 90.7±3.9% , 培养 25 天的细胞饥饿时 G0 /G1 期细胞的比例达到 93.35.4±2.9% , 因此培养 20 天和 25 天的细胞饥饿后能够获得较高的囊胚率。Bordignon 等 (2003) 研究转荧光蛋白基因体细胞克隆公牛的试验结果表明, 体外培养一定代数的胎儿成纤维细胞中 G0 /G1 期、S 期和 G2/M 的比例分别为 76%、12.5% 和 11.5%。

在动物机体组织中不同细胞类型也可能处于 G0 /G 细胞周期, 例如脑神经细胞, 辜丸支持细胞 (Sertoli cell) 和成熟排卵的卵母细胞周围的颗粒细胞 (Wakayama 等 , 1998)

2.2.3.3 供体细胞类型

虽然成年哺乳动物具有近 200 种组织细胞, 但是截至目前只有十几种细胞获得了成活的克隆动物, 包括胚胎干细胞 (Jeanisch 等, 2002)、胎儿和成年成纤维细胞 (Arat 等 2002)、乳腺上皮细胞 (Willmut 等, 1997; Kishi , 2000;)、颗粒细胞 (Kato Y 等, 1998 , 2000)、输卵管上皮细胞 (Kato Y 等, 1998, 2000)、肝脏细胞、(Kato Y 等, 2000))、卵丘细胞 (Arat 等 2001)、肌肉细胞 (Gao 等 2003)、神经元细胞 (Zawad 等, 1998) 和白细胞 (Galli, 1999) 等。

在众多的供体细胞种类中, 来源于胎儿和与生殖关联的供体细胞 (如胎儿皮肤成纤维细胞、颗粒细胞、输卵管上皮细胞等) 能够获得较高的囊胚率和移植妊娠率, 但是这种差异的原因目前还不十分明了, 可能是因为生殖细胞和胎儿体细胞与成年其他类型的供体细胞相比, 遗传分化次数较少, 受到的遗传损伤也较少 (Vajita 和 Gjerris, 2006; Forsberg 2002)。

研究表明, 不同组织细胞作为核移植的供体细胞核时, 重构胚的融合率、分裂率和囊胚率等可能没有差异, 但是来源与胎儿组织的细胞作供体核获得的重构胚移植后能够维持到妊娠后期比例较高 (Miyoshi 等, 2003)。Kimiko 等 (2003) 利用不同品系小鼠以及颗粒细胞和足细胞作为供体研究克隆小鼠的试验结果表明, 在不经血清饥饿培养供体细胞时, 超排后排卵卵母卵细胞周围的颗粒细胞作供体时能获得较高的分裂率, 因为成熟卵母细胞的颗粒细胞比足细胞具有较高的 G0/G1 期细胞比例。

2.2.3.4 提供供体细胞的动物品种 (品系) 和性别

SCNT 研究中, 来源于不同品种 (品系) 的供体细胞可能影响克隆的效率。Kimiko

等（2003）的研究表明，BDF1 杂交小鼠（129×B6）的粒细胞，或者 BDF1 杂交小鼠（B6×129）的足细胞作供体细胞时能获得较高的克隆小鼠出生率。

供体细胞的性别可能也影响动物体细胞核移植效率。研究表明，奶牛（Holstein）雌性（XX）细胞核供体与肉牛（Galowy）雄性（XY）细胞供体核虽然卵裂率和囊胚率之间没有差异，但是来源奶牛雌性（XX）细胞核供体的克隆胚胎移植后获得较高的犊牛成活率（陈大元等，2003），而不同奶牛个体（基因型）的供体细胞作供体核克隆奶牛时囊胚率和胚胎移植妊娠率也存在差异（Constant 等，2006）。

2.2.3.5 提供供体细胞动物的年龄

Wani 等（2010）研究克隆骆驼时发现，来源于成年骆驼皮肤成纤维细胞、粒细胞和胎儿成纤维细胞的克隆胚胎融合率之间没有差异，但是粒细胞供体核的重构胚分裂率较高，而且胚胎移植后具有较高的妊娠率。

2.2.3.6 体外培养体系的影响

在体细胞核移植研究中，体细胞、卵母细胞、重构胚都需要在体外一定条件下进行培养，因此培养条件克隆会影响核移植效率。Powell 等（2004）的研究表明，不同培养液和血清浓度培养的供体细胞影响克隆效率，DMEM 适合作牛胎儿肺来源的成纤维细胞供体培养液，而 MEM 则适合于作牛胎儿臀部皮肤纤维细胞供体培养液，低血清浓度（0.5%）和高氧气体环境可以获得较好的囊胚发育率。

2.2.4 受体卵母细胞对体细胞核移植效率的影响

受体卵母细胞作为核移植的受体细胞，其质量和成熟阶段对核移植效率具有至关重要的影响。无论是体内成熟排卵的卵母细胞，还是体外培养成熟的卵母细胞，亦或受精后的受精卵都曾作为核移植研究的受体细胞。研究表明，卵母细胞只有到达一定的成熟阶段，才能保证移入的细胞核正确的重编程并支持重构胚的早期发育。

影响核 SCNT 效率的卵母细胞因素主要包括：

2.2.4.1 卵母细胞的成熟阶段

一般情况下哺乳动物出生前后的初级卵母细胞处于第一次减数分裂很长时间，这一时期的染色质高度疏松，称为核网期，细胞核称为生发泡（GV）。性成熟后在激素等作用下初级卵母细胞也可能恢复减数分裂，发生生发泡破裂（GVBD），排出第一极体，并发育到第二次减数分裂中期（MII）成为成熟卵母细胞。如果没有外界条件刺激（如受精等），卵母细胞维持在 MII 期数小时后退化。

目前在常规核移植操作中，一般是利用第二次减数分裂中期的 M II 卵母细胞作为核移植受体。成熟 M II 期的卵母细胞适宜作核移植受体，主要是因为 M II 期的卵母细胞能够启动和支持移入的细胞核重编程。Gao 等（2002）利用 GV 期、第一次减数分裂中期（M I）和 M II 卵母细胞作为受体研究克隆小鼠的实验结果表明，虽然 M I 前期卵母细胞作受体的克隆胚胎能够发育到桑囊阶段，但远低于 M II 卵母细胞在作受体的桑囊率，而且只有 M II 卵母细胞作受体的克隆胚胎移植后能够妊娠到分娩。

M II 的卵母细胞适宜作核移植受体的一个重要原因是 M II 的卵母细胞胞质中含有大量成熟的成熟/有丝分裂/减数分裂促进因子（maturation/mitosis/meiosis promoting factor, MFP），能够引起供体细胞核物质发生一系列形态学变化，例如核膜破裂、染色体凝集（PCCF）。研究表明，当移入供体核处于 S 期时，受体卵母细胞中胞质中高水平 MFP 使移入的细胞核染色体异常比率显著升高，而当供体核处于 G₁ 和 G₂ 期时，虽然也会出现 PCC 现象，但是对染色体的损伤很小。

M II 的卵母细胞适宜作核移植受体的另外一个重要原因是因为 M II 的卵母细胞的染色体主要集中在第一极体附近，而极体在显微镜下易于观察，从而方便“盲吸法”机械去除受体卵母细胞核遗传物质。

Bordignon 等（2003）发现，转荧光蛋白基因的公牛体细胞克隆胎儿的成纤维细胞中移植分别移植到不同阶段成熟成熟中期（Metaphase）和末期（Telophase）的卵母细胞中，两者之间 7d 时的囊胚发育率没有差异，但是成熟中期的重构胚移植妊娠率和产犊成活率明显提高。

卵母细胞体内或体外成熟

在 SCNT 研究中，可以通过体内和体外两种方式获得成熟的卵母细胞受体（Wells 等，1997）。小鼠体内成熟的卵母细胞（M II）作核移植受体的克隆胚胎发育率明显高于体外成熟的卵母细胞（Heindryckx 等，2002），但是超排获得的体内卵母细胞受体对胚胎发育和胎儿生长也可能产生不利的影 响（Van der Auwera 和 D'Hooghe, 2001），而且可能会影响胚胎发育早期 DNA 甲基化（Shi 和 Haaf 2002）。

2.2.4.2 提供卵母细胞动物的年龄

来源不同年龄动物的卵母细胞体外成熟可能影响核移植的效率。Aston 等研究表明，成年母牛卵巢采集的卵母细胞作核移植受体时，无论是重构胚的发育率、囊胚率还是移植妊娠率和获得犊牛数都显著高于青年母牛卵母细胞，这可能与初情期前青年母牛卵母细胞体外发育能力较差有关（Majerus, 等，2000），但是该试验并没有具体说明青年

母牛和成年母牛的确切年龄。

2.2.4.3 受精卵

受精后一定时间的受精卵也可以作为核移植受体。Schurmann 等（2006）的研究表明，体外受精后 4 小时的卵母细胞去除雌雄原核后作为核移植受体细胞，虽然囊胚发育率与常规核移植比较没有差异，但是移植后 35 天的妊娠率和克隆牛出生率和断奶成活率明显高于常规核移植。有研究表明，受精卵母细胞并不能很好地支持牛和小鼠重构胚的发育（McGrath 和 Solter, 1984; Kwon O 和 Kono T 1996 ; Prather RS 等 1989; Prather 和 First, 1990）。

受精后发育到 2-细胞的胚胎细胞质也可以作细胞质受体生产克隆小鼠（Tsunoda 等 1987; Wakayama 等, 1999），

2.2.4.4 异种卵母细胞

Mastromonace 等（2007）研究了普通牛（供体核）×普通牛（受体卵母细胞）、印度野牛（供体核）×普通牛（受体卵母细胞）和杂交牛（供体核）×普通牛（受体卵母细胞）的克隆效率，结果发现普通牛卵母细胞能够很好地支持普通牛供体细胞和杂交牛供体细胞发育，显著高于印度野牛供体核组囊胚率，但印度野牛精液和普通牛卵母细胞体外受精胚胎体外发育与对照组没有差异。

2.2.5 动物体细胞克隆技术和克隆动物存在的问题

Dolly 克隆绵羊出生后 SCNT 技术经过近 15 年的研究与改进，SCNT 的效率和机理研究取得了很大进展，获得了大批克隆动物，但是目前动物体细胞克隆技术和克隆动物尚存许多问题需要进一步解决。

目前体细胞克隆技术和克隆动物存在的主要问题包括：

2.2.5.1 总体效率低

1997 年 Willmut 等利用绵羊乳腺上皮细胞克隆 Dolly 绵羊时，如果从操作卵母细胞融合后开始算起，克隆 Dolly 绵羊的总体效率只有 0.36%(1/277 融和卵)。克隆技术经过改进效率有所提高，但是克隆动物的生产效率目前也只有 2%—10%(Chavatte-Palmer 等 2002; 杨素芬等, 2004)。虽然利用胚胎内细胞团（ICM）细胞、滋养层（TE）细胞作为克隆动物的效率稍高，但也低于 3%（Keefer , 1994, Tsunoda and Kato, 1998）。

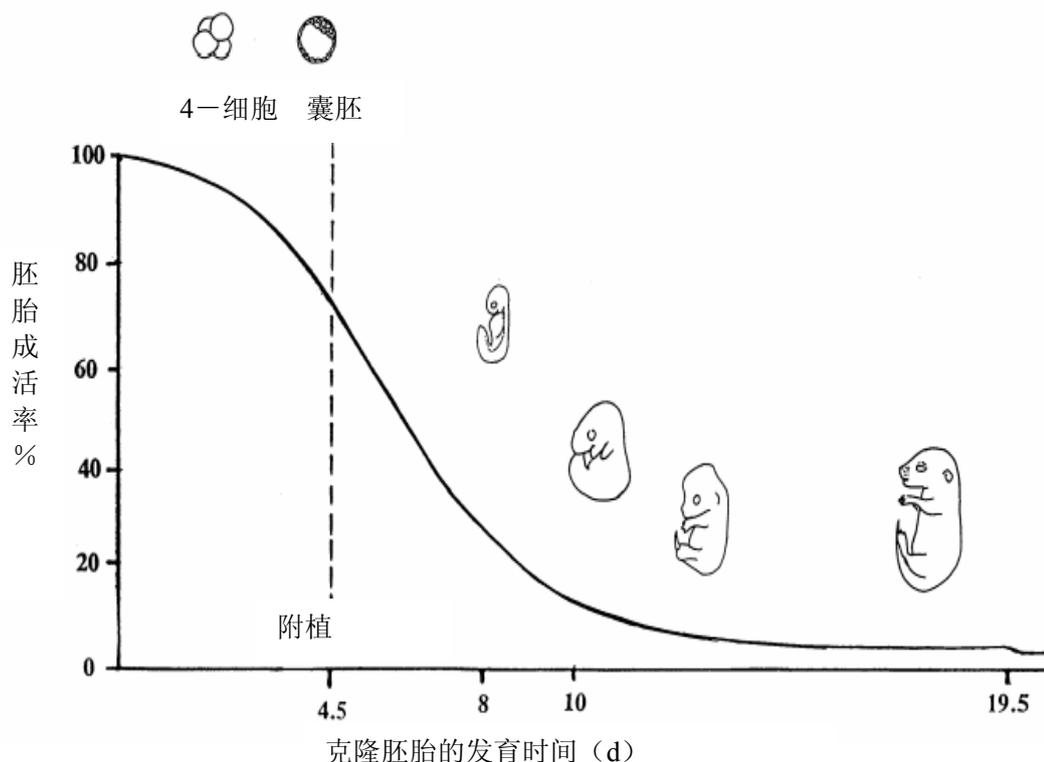
随着干细胞研究进展，胚胎干细胞（ES）或者胚胎原始生殖细胞（EG）也被用作 SCNT 的供体细胞核，但是克隆效率也不高（Wells 等, 1997; Rideout 等, 2000; Brink 等, 2000）。最近 Zhao 和 Zheng（2010）利用胎猪神经干细胞和羊水分离的干细胞作为

供体细胞核获得了较高的桑囊率（分别为 27.24%和 27.92%），但是移植妊娠率也不高（分别为 2%和 2%），而 Kou 等（2010）利用小鼠 iPS 细胞（LiPS37）作为供体核时获得了较高的移植妊娠率。

2.2.5.2 移植妊娠率低、流产率高

动物克隆胚胎移植受体后，虽然在前期胚胎存活率可能较高（Yanagimachi 等 2002；Heyman 等，2002），但是大多数克隆胚胎在随后的附植前或者附植后死亡（Yanagimachi 2002，和图 2-14），也就是说克隆胚胎移植后的各个阶段都可能发生胚胎（和胎儿）死亡。

Heyman 等（2002 年）利用孕酮测定和超声波检测的方法监测受体移植克隆胚胎后胎儿（胚胎）损失情况，结果表明，移植 21 天时移植体细胞克隆胚胎、胚胎细胞克隆胚胎的妊娠率与对照组体外受精胚胎之间没有差异，但是移植 90 天后，体细胞克隆胚胎和胚胎细胞克隆胚胎的妊娠率分别为 12.9%和 34.3%，显著低于对照组的 47%，而体细胞克隆胚胎移植受体出生率只有 6.8%（对照组为 49%）。



2.2.5.3 克隆动物异常率高

自 Dolly 绵羊出生后已经先后获得多种体细胞克隆动物（Willmut, 2002；本章表 2-1 和表 2-2），然而 2001 年发现 Dolly 感染关节炎，并出现老年动物早衰现象（Dolly

供体细胞来源于 1 头 6 岁的母羊), 2003 年 2 月 14 日因为肺部感染而被处以安乐死, 引起了科学家和公众对克隆胚胎移植以及 (或) 动物的缺陷的广泛关注。

克隆胚胎移植后, 克隆动物 (胎儿) 在妊娠期、出生或者出生后存在的异常现象包括:

2.2.5.4 胎盘异常

动物克隆胚胎移植妊娠后胎盘发育异常可能是克隆胎儿流产和胎儿发育障碍的重要原因, 即使克隆胚胎的供体细胞核来源于胚胎细胞 (4-cell 到 ICM 各阶段)。Ono 和 Kono (2006) 的研究表明, 小鼠克隆胚胎在妊娠 19.5 天时, 无论是单次克隆还是连续克隆, 4-细胞和 8-细胞作为供体核时胎盘重量属于正常范围, 但是 ICM 细胞和 ES 作为供体核时胎盘重量明显比对照组高。克隆小鼠的试验研究表明, 几乎所有克隆小鼠的胎盘重量都超过正常胎盘 (Wakayama 和 Yanagimachi, 1999; Ogura 等 2000; Ono Y 等, 2001), 同样现象克隆牛也普遍存在 (Cibelli 等, 1998; De Lille 等 2001; Constant 等, 2006))。

克隆动物胎盘发育异常现象包括 (1) 胎盘滋养层过度增殖; (2) 成胶质层沉淀糖原细胞; (3) 滋养层中巨大细胞增多; (4) 胎儿子叶数和面积减少; (5) 胎盘血管数量减少等。

影响克隆动物胎盘发育异常主要原因可能是细胞核在重编程过程中某些与胎盘发育有关的基因表达异常, 包括与滋养层增殖有关的基因、细胞分化有关的基因和胎盘功能 (如 IFN-和 PAG-9) 有关基因的表达异常 (Arnold 等, 2006)。Palmieri 等 (2008) 详细的研究了克隆牛、克隆羊和克隆小鼠胎盘发育异常病理现象和发病机理, 以及一些可能的基因及其调控途径。

2.2.5.5 妊娠期延长, 胎儿过度生长, 出现“巨胎症”

Cibelli 等(1998)首次报道了克隆牛出生重比正常牛体重大, 称为“巨胎症” (large offspring syndrome, LOS), 克隆小鼠也同样存在 LOS 现象 (Eggan 等 2001)。

克隆动物出现 LOS 现象的根本原因可能不是克隆技术本身而可能是因为克隆胚胎在体外培养和操作而引起的 (Young 等 1998)。但是 LOS 可能是造成克隆动物出生困难和出生后死亡的重要原因。

Chavatte-Palmer 等 (2006 年) 利用超声波技术研究了克隆牛 35 天到 62 天胎儿及胎盘的发育, 结果表明, 在妊娠 35 天, 50 天和 62 天克隆牛的臀顶骨长 (crown-rump length, CRL) 小于人工授精和 IVP 胚胎对照组, 90 天死亡的克隆胎儿 CRL 也小于其

他克隆胎儿。但是 妊娠后期发育成 LOS 的胎儿头骨直径(sack and the biparietal diameter, BPD) 明显较大。

2.2.5.6 器官发育异常

克隆动物胎儿肺脏、心脏、肾脏和大脑等关键组织器官在妊娠可能发育异常，例如 Gibbons J 研究（2002）克隆牛发现出生的克隆牛 10%发生脑积水现象。

2.2.5.7 呼吸和消化及血液循环系统功能障碍

许多克隆动物出生时（后）出现呼吸和消化等系统的功能障碍，例如克隆动物出生后呼吸系统常出现异常现象，包括肺脏不扩张而无法启动正常呼吸。

2.2.5.8 免疫系统机能缺陷

许多克隆动物出生时（后）出现免疫系统机能缺陷，例如淋巴系统和胸腺功能不健全，易感染细菌和病毒。

2.2.5.9 肥胖症

克隆动物出生后容易出现肥胖症。Tamashiro 等（2002）研究克隆小鼠发现出现肥胖症，但是这种肥胖症没有遗传性。

虽然目前克隆动物发生异常现象的确切原因并不十分确切和清晰，但是以下可能是引起克隆动物异常现象的一些原因（Vajta 和 Gjerris,2006），其中，移入的供体核重编程不完全（甚至错误）可能是克隆技术效率低核克隆动物异常的重要原因之一。

- 1、供体细胞和受体（卵母细胞）不合适；
- 2、供体细胞周期与受体卵母细胞质不同步；
- 3、供体细胞核重编程不完全；
- 4、不合适的体外操作程序，包括供体细胞体外培养、卵母细胞体外成熟、去核和移核，重构胚融合和激活，以及胚胎体外培养过程中受到的物理的（如温度、紫外线、电流）和化学的（有毒有害化学物质、渗透压）等引起的损伤。

2.2.6 克隆技术在农业生产中的应用

自从 1997 克隆绵羊 Dolly 出生以来，人们对克隆技术对人类生活、生产、社会经济、甚至人类自身影响的看法与争论从来就没有停止过。随着克隆技术的不断深入研究，CSNT 不仅对动物胚胎发育学及发育生物学、遗传学等相关学科研究产生深远的影响，而且将对动物生产、生物反应器研究和生物药物的生产，家畜品种改良尤其是良种家畜繁育都产生巨大的推动作用（杨向中，2004；韩建永等，2003； Bousquet 和 Blondin，2004）。

动物体细胞克隆技术在农业动物中大规模应用取决于三个前提条件：

1、体细胞克隆总体效率；

2、体细胞克隆动物的成本：获得成活的克隆动物生产成本是克隆技术能否在农业动物中应用的关键。据估计，一个试验室（或者企业）刚开始生产克隆动物时，由于技术不够成熟，生产一头克隆动物牛的成本可能需要 2 万美元左右，而随后可能降到 1 万美元获得一头克隆动物（牛）（Bousquet 和 Blondin, 2004）。实际上，有些国家已经开始克隆牛的商业开发，每头克隆牛的价格定在 1 万~2 万美元（Alison L. Van Eenennaam, 2006），而在我国目前奶牛生产中虽然体细胞克隆技术繁育高产奶牛后代的成本比常规的人工授精技术高，但是低于常规的体内和体外胚胎移植（韩建永等，2004）。

3、体细胞克隆动物的安全性

自从体细胞克隆动物出生以来，克隆动物是否安全就是人们重点关注的焦点。许多研究表明，虽然体细胞克隆动物出生时具有这样那样的异常现象，但是绝大多数出生成活克隆动物的自身生长、繁殖性能与普通动物没有差异（Yanagimachi 2002; Martin 等 2004; Wells 等 2004），体细胞克隆动物的肉、奶也不存在食用的安全问题（Takahashi 和 Yoshihio, 2004），而且克隆牛肉和牛奶的营养价值与正常牛没有任何区别（Tomé 等 2004），对周围环境也不会造成其他危害。因此，美国 FDA 兽医医药中心经过对克隆动物长期的安全性研究认为克隆动物产品对人类健康没有危害性（FDA, 2006）。

体细胞克隆技术在农业动物生产中的应用包括：

1、快速繁育具有优良性状的家畜品种。

由于体细胞克隆技术可以在体外大量生产具有优良生产性状例如高产奶量、优秀肉用性能等的克隆胚胎，因此随着克隆技术效率的不断提高，利用体细胞克隆技术繁育优秀家畜，具有巨大的技术优势。

首先，体细胞克隆技术理论上完全复制了优秀家畜个体（基因型），不会发生优良性状丢失或者退化现象；

其次，体细胞克隆技术可预先选定家畜性别，获得农业生产中需要性别的动物个体，例如在奶业生产中需要高产优质母牛产奶，可以通过体细胞克隆技术大量繁殖高产优质的高产奶牛母牛，而在肉牛生产中公牛生长速度和产肉性能较高，可以通过体细胞克隆技术大量繁殖优秀肉用公犊牛（Paterson 等 2003）。

第三，体细胞克隆技术能够在体外大批量生产家畜胚胎。据估算，一个操作技术熟

练的技术人员（配备一个助手）每天能操作制备 200 个重构胚，每周 2 次试验，按照囊胚率 25% 计算，则每人每周可以生产囊胚 100 个囊胚，每年则能够生产 5000 枚以上的可用体细胞克隆胚胎。

第四，体细胞克隆技术繁育优秀家畜成本低，繁育家畜速度快。

2、提高转基因的效率

为了快速培育我国转基因动植物品种，“十一五”期间我国启动了动植物转基因重大专项，这必将极大地提高我国转基因研究和应用水平。

目前在转基因动物研究中，导入外源基因的方法主要包括原核注射法和转基因体细胞克隆法。

与原核注射法导入外源基因相比，体细胞克隆技术能大大提高获取转基因动物的效率。因为通过转染和筛选体外培养的体细胞，获得转有目的基因细胞系，而利用转基因细胞作为供体细胞生产克隆胚胎，理论上 100% 都是转基因胚胎。为了提高转基因动物生产效率，可以在胚胎移植前进一步检测转基因胚胎中外源基因的情况，从而保证移植的克隆胚胎都是转基因胚胎，减少受体移植头数，节省获得转基因后代的时间。

有些转基因细胞在体外培养就具有分泌功能，例如乳腺上皮细胞，因此在制备乳腺生物反应器转基因克隆动物时，可以首先在体外验证转基因体细胞是否能够表达，提高了转基因动物制备的目的明确性。

3、保存濒危动物品种

人类的活动加速了物种灭绝的速度，而高生产性能的专门化品种的培育和在全世界范围的大量推广减少了家畜的遗传多样性，许多农业生产动物处于濒危状态，尤其是一些生产性能较低的地方品种。印度野牛（Lanza 等 2000）、爪哇野牛（<http://news.bbc.co.uk/1/hi/sci/tech/2932225.stm>. 2005）、欧洲盘羊（Loi 2001 等）和亚洲盘羊（陈大元等，2007）克隆成功，使人们看到了体细胞克隆技术在濒危动物保存和扩繁中的广泛应用前景（Berardino, 2001）。而克隆大熊猫取得的阶段性研究进展使人们看到了体细胞克隆技术在保护野生动物中的应用潜力（陈大元等，1999；陈大元，2000）

结语

随着动物体细胞克隆技术的不断完善和克隆技术机理的深入研究，动物体细胞克隆技术展现了巨大的应用前景，必将对动物生物反应器研究，家畜品种改良尤其是良种奶牛的繁育产生巨大的推动作用，在生产中产生巨大的经济效益

第二部分 试验研究部分

第一章 奶牛体外性控胚胎生产影响因素的研究

摘要：本实验研究卵母细胞体外成熟后卵丘细胞脱除程度、种公牛个体以及性控精液受精滴体积和性控精子密度等对牛性控精液体外受精效率的影响。研究表明：（1）卵丘细胞部分脱除组的卵裂率（ $67\pm 4.74\%$ ）显著性高于不脱除组（ $41\pm 2.23\%$ ）、完全脱除组（ $37.50\pm 2.88\%$ ）（ $P<0.05$ ）；（2）种公牛 B 的性控精液进行体外受精，卵裂率（ $61.25\pm 5.78\%$ ）、囊胚率（ $26.53\pm 3.31\%$ ）要显著高于 A（ $42.5\pm 3.45\%$ ， $17.65\pm 3.65\%$ ）、C（ $30\pm 2.62\%$ ， $16.67\pm 2.36\%$ ）（ $P<0.05$ ）；（3） $50\mu\text{L}\sim 100\mu\text{L}$ 受精滴卵裂率（ $60\pm 3.54\%\sim 64.17\pm 3.04\%$ ）、囊胚率（ $20.41\pm 4.33\%\sim 23.38\pm 4.47\%$ ）无显著性差异（ $P>0.05$ ），但要显著性高于 $40\mu\text{L}$ 、 $30\mu\text{L}$ 的卵裂率（ $48.33\pm 2.89\%$ ， $33\pm 2.74\%$ ）、囊胚率（ $13.79\pm 2.02\%$ ， $12.12\pm 3.73\%$ ）（ $P<0.05$ ）；（4）精子密度 0.5×10^6 个/ $\text{mL}\sim 1\times 10^6$ 个/ mL 的卵裂率（ $62\pm 4.12\%\sim 68.75\pm 4.64\%$ ）、囊胚率（ $22.58\pm 2.17\%\sim 27.27\pm 3.49\%$ ）相比无显著性差异（ $P>0.05$ ），但要显著性高于 0.3×10^6 个/ mL 组卵裂率（ $38.75\pm 3.58\%$ ）、囊胚率（ $16.13\pm 3.46\%$ ）（ $P<0.05$ ）。本章试验结果表明，卵丘细胞部分脱除、采用适宜的种公牛精液，能提高性控精液体外受精效率，受精滴体积、精子浓度适当降低不影响性控精液体外受精效率。

关键词 牛；性控精液；体外受精；卵母细胞

奶牛产奶性状为性别限制性状，只有母牛才表现产奶性能，因而性别控制技术在奶业生产中具有重要实际意义(Johnson, 1995)。自从 Johnson 等(1989)建立利用流式细胞分离仪分离牛精液技术以来，牛 X、Y-精子分离技术日趋成熟，利用分离的奶牛精液进行体内受精或体外受精是获得奶牛性别控制后代的有效方法 (Hamano et al., 1999; Lu et al., 1999)。

然而由于流式细胞仪分离精液时染色、分离过程和体外停留时间较长等因素不可避免地影响分离后精液活力(Cran et al., 1993; Wheeler et al., 2006; Underwood et al., 2010)，以及每剂冷冻精液中有效精子数少等，分离后奶牛精液体外受精的卵裂率、囊胚率降低(Cran et al., 1994; Wheeler et al., 2006; Bermejo-Álvarez et al., 2008)。同时，商业化性控冻精精子含量在 200 万个左右/支，性控精液价格比较昂贵（300 元~500 元/支）。采用性控精液进行体外受精时，在卵母细胞数固定的情况下尽量降低性控受精滴体积或者降低性

控精子浓度, 而又不显著影响性控精液体外受精效率, 对于降低体外性控胚胎生产成本、推进其产业化应用具有重要作用。然而目前这方面的研究较少。

本章实验比较了卵母细胞周围卵丘细胞脱除、不同种公牛个体以及受精滴体积、精子浓度对性控精液体外受精效率的影响, 以期为奶牛体外性控生产提供技术方法。

1.1 材料和方法

1.1.1 试剂与仪器设备

1.1.1.1 主要仪器设备

本试验使用的仪器设备主要包括:

二氧化碳培养箱 (美国, Thermo)

体视显微镜 (日本, Nikon)

离心机 (中国, 湘仪 L550)

电子天平 (瑞士, METTLER)

超纯水仪 (美国, MILLIPORE)

渗透压仪(美国, FISKE ASSOCIATES)

PH 计(瑞士, METTLER)

电热鼓风恒温干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司)

高压蒸汽消毒器 (日本, Sanyo MLS-3750)

超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)

真空蠕动泵 (美国, MILLIPORE)

1.1.1.2 主要试剂

本研究所用试剂除 TCM199 购自 Gibco 公司外,其余均购自 Sigma 公司。

1.1.1.3 培养皿等主要耗材

本试验使用的培养皿购自丹麦 Nunc 公司。

1.1.2 主要液体的配制

1.1.2.1 卵母细胞体外成熟液配制

TCM199 + 0.01 IU/mL 促卵泡素 (FSH) + 0.01 IU/mL 促黄体素 (LH) + 1 μ g/mL 雌激素 (E₂) + 10%胎牛血清 (FBS)。

1.1.2.2 胚胎培养液 (CR1aa) 配制

6.7 mg/mL NaCl+0.23 mg/mL KCl+2.2 mg/mL NaHCO₃+44μg/mL C₃H₃NaO₃+2 μL/mL 0.5%酚红+0.55 mg/mL 半乳糖酸钙,调 pH 为 7.4,使用当天加入:20μL/mL EAA(50×)+10 μL/mL Non-EAA(100×)+0.15 mg/mL 谷氨酰胺+3 mg/mL BSA。用 0.22μm 滤膜过滤灭菌,并用 1.5 mL 无菌离心管分装,每管 500μL,4℃保存。使用前在培养皿内做成 100μL 培养液滴,覆盖灭菌液体石蜡,二氧化碳培养箱中平衡 2 h 以上。

1.1.2.3 洗精液、受精液配制

基础液 (BO): 6.55 mg/mL NaCl + 0.3 mg/mL KCl +0.33 mg/mL CaCl₂·2H₂O +106 μg/mL MgCl₂·2H₂O +99μg/mL NaH₂PO₄ + 3.10 mg/mL NaHCO₃ +2.50 mg/mL Glucose + 138 μg/mL C₃H₃NaO₃ +3 mg/mL BSA.

洗精液: BO 液 + 3.38mg/mL 咖啡因

受精液: BO 液 + 20 mg /mL BSA + 20 μg/mL 肝素钠 +100 IU/mL 青霉素+100 μg/mL 链霉素。

洗精液、受精液用 0.22μm 滤膜过滤灭菌,4℃保存。使用前 38.5℃水浴预热 2 h 。

1.1.3 卵母细胞体外成熟

从屠宰场牛卵巢上直径 2~8mm 卵泡采集卵丘-卵母细胞复合体 (COCs),将含有 3 层以上卵丘细胞的 COCs 用成熟液洗涤 3 遍后,放入平衡 2h 的四孔板培养液中,每孔 500μL 成熟培养(含 50 枚 COCs),二氧化碳培养箱(38.5℃,5%CO₂)饱和湿度培养 22~24h。

1.1.4 性控精液处理

取 3 剂 (0.25mL 细管) 奶牛性控精液 (内蒙古赛科星生物技术有限公司) 37℃水浴解冻后用 7 mL 洗精液 350 g 离心 5 min 后弃上清液,沉淀用 7 mL 洗精液混匀后 350 g 离心 5 min 后弃上清液,精子沉淀用受精液调整浓度至 1×10⁶ 个/mL。

根据试验设计,用性控精子悬浮液制备不同体积的性控精液受精滴,在 38.5℃、5%CO₂ 培养箱中孵育 1.5h 备用。

1.1.5 体外受精

根据实验设计,将卵母细胞放入受精滴中(每个受精滴中 20 枚卵母细胞),在 38.5℃、5%CO₂ 培养箱中受精 18~20 h。

1.1.6 体外培养

卵母细胞受精结束后移入 100 μ L CR1aa 液中反复洗涤, 尽量去除粘附在卵母细胞周围的精子及卵丘细胞。将洗涤后的卵母细胞移入 100 μ L CR1aa+10%FBS 培养小滴中培养, 间隔 48h 更换一半培养液。体外培养 2d 统计卵裂率, 体外培养 8d 统计囊胚率。

1.1.7 实验设计

1.1.7.1 卵丘细胞脱除

COCs 成熟 22~24h 之后, 直接进行体外受精(卵丘细胞不脱除); 或者用含 0.1% 透明质酸酶的 TCM199 消化 1min 左右, 去除部分卵丘细胞, 但卵母细胞周围仍存在 1~2 层卵丘细胞, 而后进行体外受精(卵丘细胞部分脱除); 或者用含 0.1% 透明质酸酶的 TCM199 消化 2~3min 完全去除卵丘细胞, 挑选具有第一极体且胞质均匀的卵母细胞进行体外受精(卵丘细胞完全脱除)。性控精液 350 g 离心后制备 100 μ L 受精滴, 每滴中放入 20 枚卵母细胞进行体外受精, 而后移入 100 μ L CR1aa+10%FBS 进行培养, 进而比较卵丘细胞脱除程度对性控精液体外受精效率的影响。

1.1.7.2 种公牛个体

分别采用三头种公牛个体 A(公牛号: 11104881)、B(公牛号: 11104849)、C(公牛号: 11106001) 的性控精液制备受精滴, 采用 1.5.1 所得出的卵丘细胞脱除最佳组进行体外受精, 而后移入 100 μ L CR1aa+10%FBS 进行培养, 比较不同种公牛个体对性控精液体外受精效率的影响。

1.1.7.3 受精滴体积

按 1.6.1、1.6.2 所筛选出的卵丘细胞脱除最佳组、适宜种公牛性控精液, 分别制备 100 μ L、80 μ L、60 μ L、50 μ L、40 μ L、30 μ L 受精滴进行体外受精, 而后分别移入 100 μ L CR1aa+10%FBS 进行培养, 比较受精滴体积对性控精液体外受精效率的影响。

1.1.7.4 性控精子浓度

按 1.6.1、1.6.2 所筛选出的卵丘细胞脱除最佳组、适宜种公牛性控精液进行实验, 性控精液离心后精子沉淀用受精液调整浓度分别至 1×10^6 个/mL、 0.8×10^6 个/mL、 0.5×10^6 个/mL、 0.3×10^6 个/mL, 进而进行体外受精, 比较不同精子浓度对性控精液体外受精效率的影响。

1.1.8 数据分析

采用 SAS 软件对实验数据进行分析，百分数比较时经反正旋转化后采用方差分析，结果以平均数±标注差表示， $P<0.05$ 为差异显著性标准。各处理组至少重复 3 次以上。

本试验卵裂率是指卵裂卵母细胞数占入培卵母细胞数的百分比，囊胚率是指 7 天和 8 天囊胚数占卵裂卵母细胞的百分数。

1.2 结果与分析

1.2.1 卵丘细胞脱除程度对性控精液体外受精效率的影响

如表 1-1 所示，当卵母细胞周围卵丘细胞部分脱除时，卵裂率（ $67\pm 4.74\%$ ）均显著性高于不脱除组（ $41\pm 2.23\%$ ）、完全脱除组（ $37.50\pm 2.88\%$ ）（ $P<0.05$ ），而囊胚率（ $23.88\pm 2.73\%$ ）与不脱除组（ $19.51\pm 3.44\%$ ）、完全脱除组（ $20\pm 3.18\%$ ）均无显著性差异（ $P>0.05$ ）。

表 1-1 卵丘细胞脱除程度对性控精液体外受精效率的影响

Table1 Cumulus cell removal on efficiency of IVF with sex-sorted sperm

卵丘细胞脱除程度	卵母细胞数/个	卵裂率/% (个数)	囊胚率/% (个数)
Degree of cumulus cell removal	No. of oocytes	Cleaved	Embryos
不脱除 Intact	100	41 ± 2.23^b (41)	19.51 ± 3.44 (8)
部分脱除 Partially	100	67 ± 4.74^a (67)	23.88 ± 2.73 (16)
完全脱除 Totally	80	37.50 ± 2.88^b (30)	20 ± 3.18 (6)

^{a,b}. 同列数据字母不同表示差异显著（ $P<0.05$ ）。下同

^{a,b}. Values with different subscripts (a,b) within the same column differ significantly ($P<0.05$), the same as below.

1.2.2 种公牛个体对性控精液体外受精效率的影响

按 1.1 的实验结果，采用卵丘细胞部分脱除的卵母细胞进行实验。如表 1-2 所示，

采用种公牛 B 的性控精液进行体外受精时，其卵裂率（ $61.25\pm 5.78\%$ ）、囊胚率（ $26.53\pm 3.31\%$ ）均显著性高于种公牛 A（ $42.5\pm 3.45\%$ ， $17.65\pm 3.65\%$ ）、C（ $30\pm 2.62\%$ ， $16.67\pm 2.36\%$ ）（ $P<0.05$ ）。

表 1-2 种公牛个体对性控精液体外受精效率的影响

Table2 Different bulls on efficiency of IVF with sex-sorted sperm

公牛个体	卵母细胞数	卵裂率/% (个数)	囊胚率/% (个数)
Bulls	No. of oocytes	Cleaved	Embryos
A	80	42.5±3.45 ^b (34)	17.65±3.65 ^b (6)
B	80	61.25±5.78 ^a (49)	26.53±3.31 ^a (13)
C	80	30±2.62 ^b (24)	16.67±2.36 ^b (4)

1.2.3 受精滴体积对性控精液体外受精效率的影响

按 1.1、1.2 的实验结果，选择种公牛 B 的性控精液，采用卵丘细胞部分脱除的卵母细胞进行体外受精时。

如表 1-3 所示，100 μ L、80 μ L、60 μ L、50 μ L 受精滴卵裂率(64.17±3.04%、63.33±2.88%、61.25±2.51%、60±3.54%)、囊胚率 (23.38±4.47%、21.05±3.70%、20.41±4.33%、21.67±3.92%) 相比无显著性差异 ($P>0.05$)，但要显著性高于 40 μ L、30 μ L 受精滴卵裂率 (48.33±2.89%、33±2.74%)、囊胚率 (13.79±2.02%、12.12±3.73%) ($P<0.05$)。

1.2.4 精液浓度对性控精液体外受精效率的影响

按 1.1、1.2 的实验结果，选择种公牛 B 的性控精液，采用卵丘细胞部分脱除的卵母细胞进行体外受精时。

如表 1-4 所示，性控精子浓度从 1×10^6 个/mL 降低至 0.8×10^6 个/mL、 0.5×10^6 个/mL 时，受精滴卵裂率 (68.75±4.64%、64.17±5.92%、62±4.12%)、囊胚率 (27.27±3.49%、24.68±2.34%、22.58±2.17%) 并没有显著性降低 ($P>0.05$)。性控精子浓度继续降低至 0.3×10^6 个/mL 时，受精滴卵裂率 (38.75±3.58%)、囊胚率 (16.13 ±3.46%) 均显著性降低 ($P<0.05$)。

表 1-3 受精滴体积对性控精液体外受精效率的影响

Table3 Different volume of drops on efficiency of IVF with sex-sorted sperm

受精滴体积 (μL)	卵母细胞数	卵裂率/% (个数)	囊胚率/% (个数)
Volume of drop	No. of oocytes	Cleaved	Embryos
100	120	64.17 \pm 3.04 ^a (77)	23.38 \pm 4.47 ^a (18)
80	60	63.33 \pm 2.88 ^a (38)	21.05 \pm 3.70 ^a (8)
60	80	61.25 \pm 2.51 ^a (49)	20.41 \pm 4.33 ^a (10)
50	100	60 \pm 3.54 ^a (60)	21.67 \pm 3.92 ^a (13)
40	60	48.33 \pm 2.89 ^b (29)	13.79 \pm 2.02 ^b (4)
30	100	33 \pm 2.74 ^c (33)	12.12 \pm 3.73 ^b (4)

表 1-4 精液浓度对性控精液体外受精效率的影响

Table4 Sperm concentration on efficiency of IVF with sex-sorted sperm

精液浓度 (个/ml)	卵母细胞数	卵裂率/% (个数)	囊胚率/% (个数)
Sperm concentration	No. of oocytes	Cleaved	Embryos
1 \times 10 ⁶	80	68.75 \pm 4.64 ^a (55)	27.27 \pm 3.49 ^a (15)
0.8 \times 10 ⁶	120	64.17 \pm 5.92 ^a (77)	24.68 \pm 2.34 ^a (19)
0.5 \times 10 ⁶	100	62 \pm 4.12 ^b (62)	22.58 \pm 2.17 ^a (14)
0.3 \times 10 ⁶	80	38.75 \pm 3.58 ^b (31)	16.13 \pm 3.46 ^b (5)

1.3 讨论

1.3.1 卵丘细胞脱除程度对性控精液体外受精效率的影响

研究表明, 卵丘细胞在牛卵母细胞体外受精过程中有着许多重要作用, 其中包括吸引、阻绊和选择精子(Cox et al., 1993; Chian et al., 1996), 活力弱的精子在其阻绊下一般很难接近卵母细胞。在实验 1 中, COCs 体外成熟培养之后采用性控精液直接进行体外

受精，其卵裂率（ $41\pm 2.23\%$ ）显著低于卵丘细胞部分脱除组（ $67\pm 4.74\%$ ）（ $P<0.05$ ），而2-细胞胚胎到囊胚的发育能力并无显著性差别（ $19.51\pm 3.44\%$ vs $23.88\pm 2.73\%$ ），这表明卵丘细胞显著影响了性控精液对卵母细胞的受精能力。Suh 等（2003）、吴冬生等（2009）研究都表明性控精液在体外受精过程中精子活力下降要显著快于常规精液，因而卵母细胞周围的卵丘细胞可能会阻挡活力不断下降的性控精子对卵母细胞的受精，卵丘细胞部分脱除则可有效解决上述问题，这也是解释本实验结果的一个原因。本试验结果中卵丘细胞完全脱除组的卵裂率（ $37.50\pm 2.88\%$ ）也显著低于卵丘细胞部分脱除组（ $67\pm 4.74\%$ ）（ $P<0.05$ ），这可能是因为在用 0.1%透明质酸酶完全脱除卵丘细胞的过程中，对卵母细胞的透明带造成了损伤，进而影响了卵母细胞的受精能力(Germond et al., 1996)。



图 1-1 体外受精后第七天的囊胚

1.3.2 种公牛个体对性控精液体外受精效率的影响

表 1-2 结果表明，种公牛 A、C 性控精液体外受精后的卵裂率（ $42.5\pm 3.45\%$ ， $30\pm 2.62\%$ ）、囊胚率（ $17.65\pm 3.65\%$ ， $16.67\pm 2.36\%$ ）要显著低于公牛 B（ $61.25\pm 5.78\%$ ， $26.53\pm 3.31\%$ ）（ $P<0.05$ ），表明不同种公牛间性控精液的受精能力是存在差异的，这与 Kurtu 等（1996）、Lu 等（2001）、Zhang 等（2003）、吴冬生等（2009）、Xu 等（2009）的研究相一致，而且在牛常规精液体外受精中也有类似现象(Kurtu et al., 1996)。这可能是因为在不同种公牛在精子活力、获能和顶体反应参数上存差异(Shi et al., 1990; 张明等, 2006; 吴冬生等, 2009)。根据前人实验和本实验的结果，为提高和保证分离精子的体外受精效率，应该先进行体外受精的预备实验，检查不同种牛的体外受精效率后，才可以

用于性控胚胎体外生产的研究。

1.3.3 受精滴体积对性控精液体外受精效率的影响

如表 1-3 所示, 当卵母细胞数为 20、受精滴精子密度为 1×10^6 个/mL 时, 将性控受精滴体积从 100 μ L 逐步降至 50 μ L, 即精子: 卵子从 5000:1 逐步降低至 2500:1, 卵裂率 (64.17 \pm 3.04%、63.33 \pm 2.88%、61.25 \pm 2.51%、60 \pm 3.54%)、囊胚率 (23.38 \pm 4.47%、21.05 \pm 3.70%、20.41 \pm 4.33%、21.67 \pm 3.92%) 均没有受到显著性影响, 这与 Xu 等 (2006) 的研究是相一致的。而当受精滴体积继续降低至 40 μ L 逐步降至 30 μ L, 即精子: 卵子继续降低至 2000:1、1500:1 时, 卵裂率 (48.33 \pm 2.89%、33 \pm 2.74%)、囊胚率 (13.79 \pm 2.02%、12.12 \pm 3.73%) 均显著降低, 这可能是因为性控精子数量过低, 进而影响了卵母细胞的受精。这些研究都表明, 当卵母细胞数、精子浓度不变的情况下, 将性控受精滴体积适当减少 (最低为 50 μ L), 并不会对卵母细胞性控精液体外受精后的卵裂率和囊胚率产生显著影响。

1.3.4 精液浓度对性控精液体外受精效率的影响

采用牛常规冻液体进行体外受精时, 精子密度一般为 1×10^6 个/mL (Tanghe et al., 2003; Iwata et al., 2008; Zi et al., 2008), 采用性控精液进行体外受精时, 精子密度至少为 1×10^6 个/mL ~ 2×10^6 个/mL (Wilson et al., 2006; Liu et al., 2005; Liang et al., 2008)。本试验结果表明, 当卵母细胞数为 20、受精滴体积为 100 μ L 时, 将性控精子密度从 1×10^6 个/mL 降低至 0.8×10^6 个/mL、 0.5×10^6 个/mL 时, 受精滴卵裂率 (68.75 \pm 4.64%、64.17 \pm 5.92%、62 \pm 4.12%)、囊胚率 (27.27 \pm 3.49%、24.68 \pm 2.34%、22.58 \pm 2.17%) 没有显著性降低 ($P > 0.05$)。本实验中精子浓度为 0.5×10^6 个/mL 组的囊胚率 (22.58 \pm 2.17%), 要略高于 Wilson 等 (2006) 实验中同等条件下精子浓度为 1×10^6 个/mL 组囊胚率 (20.85%)。而当精子浓度过低时 (0.3×10^6 个/mL) 时, 其卵裂率 (38.75 \pm 3.58%)、囊胚率 (16.13 \pm 3.46%) 均显著性降低。本试验结果表明, 在卵母细胞数 (20 枚)、受精滴体积 (100 μ L) 不变的情况下, 精子浓度适当降低 (最低为 0.5×10^6 个/mL), 并不会显著降低性控精子体外受精效率。

综上所述, 本实验结果表明, 卵母细胞周围卵丘细胞部分脱除、选择适宜的种公牛个体有助于提高性控精液体外受精效率, 且在受精卵母细胞数固定情况下适当降低受精滴体积 (最低至 50 μ L) 或精子密度 (最低至 0.5×10^6 个/mL) 并不会显著影响性控精液体外受精效率。上述结果对于提高性控精液利用效率、降低体外性控胚胎生产成本, 进

而推进性控精液体外受精技术的产业化应用，具有重要的实际意义。

1.4 结论

1. 采用牛性控精液进行体外受精时，卵母细胞周围卵丘细胞部分脱除有助于提高受精效率。
2. 受精滴体积、精子浓度适当降低，能够在保证性控精液体外受精效率的前提下，降低体外性控胚胎生产成本

。

第二章 奶牛体细胞克隆技术的研究

摘要：本试验研究了克隆重构胚不同化学激活方法、克隆重构胚体外培养条件和公牛及母牛供体细胞等对奶牛手工克隆和显微注射克隆效率的影响。试验结果表明，（1）建立了优秀种公牛体细胞系 20 头个，高产奶牛体细胞系 4 个；（2）A23187+6-DMAP 和 A23187+放线菌酮组合处理激活体细胞克隆重构胚卵裂率（82.62% VS 78.15%）和囊胚率（34.15% VS 30.21%）差异不显著，但是 A23187+6-DMAP 囊胚质量较好；（3）克隆重构胚在 mCR1aa 培养液卵裂率（83.65%）和囊胚率（34.36%），均显著高于 SOF 和 CR1aa 两种培养液；（4）血清饥饿处理供体细胞的克隆重构胚融合率（90.52%±2.62）、卵裂率 81.27%±3.68 和囊胚率（31.46%±2.42）和接触抑制的克隆重构胚（89.25%±1.92）、（82.44%±4.42）、（30.44%±2.77）差异不显著；（5）种牛可用胚胎移植妊娠率 37.0%（10/27），其中青年荷斯坦母牛移植妊娠率（46.2%）显著高于经产西门塔尔母牛（28.6%）。西门塔尔杂交克隆胚胎受体母牛分别在妊娠的 70~90d 内流产，1 头荷斯坦母牛妊娠受体 101 天后屠宰，1 头荷斯坦母牛妊娠 155 天流产 2 个胎儿，1 头荷斯坦妊娠 149 天流产 2 个胎儿。

前言

目前我国正处于奶业蓬勃发展的关键时期，2009 年我国奶牛存栏达到 1218 万头，牛奶产量达到 3650 万吨（中国奶业协会，2010）。然而奶牛良种覆盖率低、单产水平低，缺乏选育优秀种公牛的高产母牛群，尤其是优秀种公牛选育和后裔测定技术和组织实施滞后等问题，极大地限制了我国奶业快速、健康发展。目前我国奶牛种公牛主要依赖从国外进口活牛（澳大利亚）或者胚胎（美国或加拿大等），限制了我国优秀种公牛培育速度和种公牛遗传质量。传统的育种方法结合 MOET 技术虽然是选育荷斯坦种公牛的有效技术手段（刘成果等，2005），但在短时间内还是不能满足奶业快速发展的需要。体细胞克隆是近年发展起来的新一代动物繁殖技术，以优良高产母牛或者优秀后测种公牛体细胞作为供体，通过无性繁殖的手段，能快速扩繁高产奶牛的后代，使优秀高产奶牛的遗传资源得到最有效率的利用。目前利用体细胞克隆技术获得了瑞士褐牛克隆公牛（Galli 等，1991；2002）、日本和牛克隆公牛和再克隆公牛后代（Kubota，2000，2004；Shiga 等 2005）。Heyman 等（2004）研究结果表明，体细胞克隆种公牛的射精量、精液品质（正常精子率、精子畸形率等）和受精能力等与其供体细胞来源公牛之间没有差异，

说明克隆公牛具有正常的繁殖性能。

我国也积极开展了克隆公牛的试验研究。2004年中国农业大学等单位利用当年加拿大总理送给我国原总理朱镕基的世界顶级荷斯坦种公牛-“龙”体细胞系生产克隆胚胎，移植15头次，妊娠5头，妊娠率达到33.3%，获得3头活的克隆公牛后代，目前存活2头，并开始生产冷冻精液在全国推广。2006年河北省获得了世界著名种公牛“鲁道夫”之子的克隆，2009年内蒙古大学也获得5只世界优秀种公牛的克隆。

虽然我国动物体细胞克隆已取得较大进展，但克隆效率仍然较低，这与核移植技术本身完善程度密切相关。本章试验从核移植过程中的关键环节重构胚的化学激活、克隆胚胎的体外培养条件和供体细胞入手，优化体细胞克隆的技术体系，提高克隆动物的整体效率，并移植优秀荷斯坦公牛克隆胚胎，为加快我国优秀种公牛培育和加快奶牛群体遗传改良进展提供新的技术方法。

2.1 试验材料与amp;方法

2.1.1 试剂与仪器设备

2.1.1.1 主要仪器设备

本试验使用的仪器设备主要包括：

二氧化碳培养箱（美国，Thermo）

倒置显微操作仪(日本，Nikon，Olympus)

拉针仪（日本，NARISHIGE）

磨针仪(日本，NARISHIGE)

煅针仪(日本，NARISHIGE)

体视显微镜（日本，Nikon）

电子天平（瑞士，METTLER）

融合仪（美国，BTX）

超纯水仪（美国，MILLIPORE）

渗透压仪(美国，FISKE ASSOCIATES)

PH计(瑞士，METTLER)

电热鼓风恒温干燥箱（上海精宏实验设备有限公司）

高压蒸汽消毒器（日本，Sanyo MLS-3750）

超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)

真空蠕动泵（美国，MILLIPORE）

2.1.1.2 主要试剂

本试验使用的药品与试剂，如果没有特别说明，均购自 Sigma 公司。DMEM,胎牛血清和 0.25%胰蛋白酶（0.02% EDTA）溶液购自 Gibico 公司。

2.1.1.3 培养皿和培养瓶等主要耗材

本试验使用的培养皿（4—孔培养皿、单孔和 16 孔培养皿）购自丹麦 Nunc 公司，细胞培养瓶、细胞冷冻保存管和 35mm 培养皿购自美国 BD 公司。

2.1.2 主要液体的配制

本试验使用的各种液体成份及其配制过程如下：

PBS 缓冲溶液：NaCl 8.00g, KCl 0.20g, Na₂HPO₄ 2.16g, KH₂PO₄ 0.20g, 超纯水定容至 1L, pH 为 7.2, 0.22μm 滤膜过滤，4℃ 储存。

细胞冻存液：DMEM: FBS: DMSO 比例为 7: 2: 1 配制冻存液。

双抗：100mg 链霉素，60.12mg 青霉素溶于 10mLPBS 溶液中。采用 0.22um 滤膜进行过滤灭菌，-20℃ 保存。

捡卵液：0.1g 的 PVA(Sigma,P1836)溶于 1L TCM199，过滤灭菌，4℃ 保存。

洗卵液：TCM199 加入 10%的 FBS，4℃ 保存。

透明质酸酶：称取 10mg 透明质酸酶，溶解于 10mL PBS 中，用 0.22μm 滤膜过滤灭菌，用 1.5 mL 无菌离心管每管分装 160mL，-20℃ 保存。

FSH 储液：10mL 的 PBS 溶解 50IU 的 FSH (Sigma,F8001)，用 1.5mL 无菌离心管每管分装 40μL，-20℃ 保存。

LH 储液：10mL 的无 Ca²⁺、Mg²⁺ PBS 溶解 55IU LH (Sigma,L5259)，，用 1.5mL 无菌离心管每管分装 36.36μL，-20℃ 保存。

E₂ 储液：10mL 的无 Ca²⁺、Mg²⁺PBS 溶解 1 mg E₂(Sigma,E2257)，1.5mL 无菌离心管每管分装 200μL，-20℃ 保存。

卵母细胞体外成熟培养液：

同第一章

胚胎体外培养液(mCR1aa):

成分	浓度 mM	加入量 (/100mL)
NaCl	109.5	640 mg
KCl	3.1	23 mg
NaHCO ₃	26.2	220 mg
丙酮酸钠	0.4	4.4 mg
0.5%酚红	—	200 μ L
KH ₂ PO ₄	1.19	16.19 mg
葡萄糖	1.5	27 mg
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.8	16.26 mg

配制卵母细胞体外成熟培养液和胚胎体外培养液时，将所有上述成分加入约 90mL 超纯水中（18.2 兆欧，Milli-Q），充分溶解后，加入 0.055g 半乳糖酸钙（5mM），调 pH 为 7.2~7.4，定容至 100mL，渗透压范围为 265~285 mosm/L，过滤灭菌，4℃保存。

在使用当天加入以下成分，过滤灭菌，用 1.5 mL 无菌离心管分装，4℃保存。

成分	加入量/10mL
BSA	60mg
EAA(50 \times)	200 μ L
Non-EAA(100 \times)	100 μ L
谷氨酰胺	1.5 mg

植物血凝素 (Phytohemagglutinin,PHA): 用 25mL 的 TCM199 溶解 3mg PHA (sigma,L1668)，配制成 200 μ g/mL 的 PHA 储液，过滤灭菌，-20℃保存。

链酶蛋白酶:用 1mL 的 T10 溶解 2mg 链酶蛋白酶 (sigma,P8811)，过滤灭菌，-20℃保存。

操作液:

T2: 含 2% FBS 的 TCM199 液

T10: 含 10% FBS 的 TCM199 液

T20: 含 20% FBS 的 TCM199 液

T2+BSA: 含 5%BSA 的 T2 液

A23187 储液: 称取 5mgA23187 溶解于 5mL DMSO 中，配制成 1mg/mL 的储液。过滤

灭菌， -20°C 保存。

46-DMAP 储液：称取 16.3mg 6-DMAP 溶解于 1mL 无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} PBS 中，配制成 100 mM 的储液， -20°C 保存。

Ionomycin 储液：将 1mg Ionomycin 溶解于 5.354 mL DMSO 中，配制成 $250\mu\text{M}$ 的储液， -20°C 保存。

融合液：配制好的溶液用 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜过滤灭菌， -20°C 保存。

成分	终浓度	加入量/25mL
甘露醇	0.27mM	1.23g
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1mM	250 μL
$\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1mM	250 μL
Hepes	0.5 mM	250 μL
PVA	0.01%	2.5mg

2.1.3 显微操作针的制备

2.1.3.1 固定针的制备

① 拉针

拉针参数：Heater 加热温度，数值越高玻璃管拉开得越快

Magnet sub 决定拉针细部的长度，温度数值越高拉针长度越长

Magnet main 决定拉针细度，温度数值越高拉针就越细

打开拉针仪，调整参数 Heater: 80°C ; Magnet sub: 20°C ; Magnet main: 100°C 。

将规格为 $1\text{mm}\times 0.8\text{mm}\times 100\text{mm}$ 毛细玻璃管固定于拉针仪上，按下“start”键，拉出符合要求的针。

② 煅针

打开煅针仪。首次使用时先在铂金丝的中间制作一个液滴状玻璃球。然后调节煅针仪，使针水平，根据视野内刻度，轻轻调节玻璃针使内径为 $50\mu\text{m}$ 处与玻璃球接触，加热铂金丝，稍一停顿立刻停止加热，利用铂金丝局部受热突然冷却而收缩将玻璃针煅开。

③ 收口

在水平方向上，用加热的玻璃球使断开的针口，收缩至内径 $10\sim 20\mu\text{m}$ 之间。

④ 打弯

垂直固定收口的针，根据视野中刻度在距针尖 $3\sim 5\text{mm}$ 处用加热的玻璃球靠近使针

弯曲，弯曲角度控制在 30°。

2.1.3.2 显微去核针的制备

去核针的拉针方法同上，但去核针无需煅针过程。在垂直方向使玻璃针尖端位于玻璃珠的正上方轻微接触玻璃球，加热铂金丝，针融化时向上提针拉出尖部。

2.1.3.3 显微注射针的制备

① 拉针：适宜的参数 Heater: 85 ; Magnet sub: 25; Magnet main: 80。

② 煅针：在内径为 10-20 μm 处断开，方法同上。

③ 磨针与洗针：打开磨针仪，调节转速为 40rpm，用湿润纱布保持磨石湿润。将煅好的针以 45°夹角固定于磨针仪上，调节升降粗细螺旋使针的尖端与磨石的平面刚好接触磨针。将磨好的玻璃针用 HF 酸清洗 2 次后，再用超纯水清洗 3 次。

④ 拔尖：将经以上步骤处理好的玻璃针固定在煅针仪上，调节加热温度到 25℃左右。在垂直方向上，100×视野下使玻璃针尖端位于玻璃珠的正上方稍接触，加热铂金丝至尖端有轻微融化迹象时，快速提升玻璃针。

⑤ 打弯：同固定针。

2.1.4 试验方法

2.1.4.1 公牛和母牛皮肤成纤维细胞培养与建系

采样:

公牛保定后用手术刀片将一侧耳朵下缘刮干净，用 5%碘酊消毒 2~3min，然后用 75%乙醇消毒并脱除碘酊。生理盐水冲洗 2 遍后用手术剪刀（或刀片）取下耳下缘皮肤 1~2cm² 大小，用 PBS 清洗取下的皮肤组织 2-3 遍，放入含 2%双抗的 PBS 内,运回实验室。

采集成年公牛公牛耳皮肤组织时特别注意，一是应保定好公牛，防止公牛伤人或者伤害公牛；二是注意消毒，防止样品污染。

高产母牛耳皮肤组织采样方法同公牛采样。

处理:

室温下 (20~25℃) 将取回的公牛 (或者母牛) 皮肤组织在 75%乙醇浸泡清洗 2-3s, 用 PBS 漂洗 2~3 次后,放在直径为 90mm 的塑料培养皿内备用。

原代培养:

本试验皮肤细胞培养原代分别采用组织块贴壁法和酶消化法，两种方法的操作过程

简述如下。

组织块贴壁法:

(1) 用眼科剪和镊子去除皮肤样品中的结缔组织后,用剪刀将组织块剪切成碎块(0.5 mm²~1mm²大小)。

(2) 铺瓶:将组织碎沫移至培养瓶底壁并分散均匀,倒置培养瓶,旋紧瓶盖倒置于 37.5℃ CO₂ 培养箱中 6~8h。

(3) 培养:加入培养液(含 20%FBS 的 DMEM 培养基),轻轻翻转培养瓶,让培养液浸润组织块,置 37.5℃ 5% CO₂ 培养箱培养。

(4) 传代:当有一定量成纤维细胞爬出,用 0.25%胰蛋白酶(0.02%EDTA)溶液消化,传至新的培养瓶,加培养液培养,隔 d 换液。

酶消化法:

(1) 用眼科剪和镊子去除皮肤样品中的结缔组织后,用剪刀将组织块剪切成碎块(0.5 mm²~1mm²大小)。

(2) 将组织碎沫装入 15mL 离心管,加入 10mL0.25%胰蛋白酶(0.02%EDTA),水浴 38℃ 振荡消化 10min,静止 3min,吸取 3 mL 上清至新的离心管,加等体积培养液(含 10%FBS 的 DMEM 培养基)终止消化,重复 5 次左右,收集终止的消化液,离心机离心(800~1000 r/m×5mins),去上清,加入培养液(含 20%FBS 的 DMEM 培养基)重悬沉淀,接种至培养瓶,加培养液,37.5℃ 5% CO₂ 培养箱培养。

继代培养:

(1) 传代:细胞生长至铺满瓶底 90%,0.25%胰蛋白酶(0.02%EDTA)溶液消化,按 1:2 或 1:3 的比例分瓶培养。

(2) 冻存:细胞生长至铺满瓶底 90%左右,用 0.25%胰蛋白酶(0.02%EDTA)溶液消化,离心机离心(800~1000 r/m×5mins),弃上清液,加入冻存液(血清:DMSO),轻轻吹打令细胞重悬,混匀后调整细胞密度为(3~6)×10⁶个/mL,分装至标记的冻存管,放入冻存盒,置-80℃冰箱中过夜后置液氮长期保存。

(3) 复苏:将冻存管从液氮中取出,迅速投入 40℃水浴中,不停地晃动小冰团融化至黄豆粒大时,取出冻存管放入超净工作台内,加入培养液轻轻吹打混匀,离心机离心(800~1000 r/m×5mins),弃上清液,加入培养液(含 10%FBS 的 DMEM 培养基)重悬至培养瓶,置 37℃,5% CO₂ 培养箱培养。

2.1.4.2 重构胚的制作

供体细胞的准备:

取继代培养5~10代的母牛或者成年公牛体细胞,待细胞长至铺满瓶底70~80%时,更换培养液为DMEM+0.5% FBS血清饥饿处理培养3-5d,或者细胞铺满瓶底95%后,按常规方法消化,并用含0.5%FBS的DPBS洗细胞2~3次,备用。

卵母细胞的收集和体外成熟培养:

(1) 卵巢采集:从北京附近牛屠宰场(河北大厂县)采取牛卵巢,放入28℃~30℃生理盐水中,及时运回实验室(3~4h)。

(2) 卵母细胞采集:牛卵巢运到实验室后,室温下立即将卵巢用含双抗的预热35℃生理盐水清洗三遍后移入灭菌的1000mL玻璃烧杯中,放在预先准备的加热垫上(33℃~35℃),用真空泵抽吸卵巢上肉眼可见的卵泡(直径为2-8mm的卵泡),将卵泡吸取液(含卵母细胞)放入50mL灭菌离心管中自然沉淀10min~20min,吸取沉淀物在体视显微镜收集卵丘-卵母细胞复合体(cumulus-oocyte complexes, COCs),挑选带有3层以上的完整致密COCs培养。

(3) 卵母细胞成熟:先用含0.01%PVA的M199溶液洗两遍后移入TCM199+10%FBS+0.01 IU/mL FSH+0.01 IU/mL LH+1μg/mL E2成熟培养液中洗一遍,移至四孔板50~60枚/孔。置于38.5℃、5%CO₂、饱和湿度的二氧化碳培养箱培养16-18h。

2.1.4.3 受体卵母细胞的准备

将颗粒层扩展良好的COCs用0.1%的透明质酸酶去除颗粒细胞,然后挑选形态完整,胞质均匀并有第一极体出现的卵母细胞备用。

2.1.4.4 受体卵母细胞去核

将带有第一极体的卵母细胞(MII期卵母细胞)移入显微操作液中。在倒置显微镜下和显微操作仪下用去核针挑破极体处正上方的透明带,用去核针挤压卵母细胞使第一极体及其下方的胞质流出透明带。将去核后的卵母细胞逐个放入T10小滴中,按照一一对应关系对挤出的胞质部分经H33342染色,紫外下检测是否含有核和极体。挑选去除核的卵母细胞放于T20小滴中备用。

2.1.4.5 重构胚胎的制备

本试验采用两种方法制备重构胚,具体操作步骤如下:

A. 无透明带融合法制备重构胚胎:

(1) 去透明带:将去核的卵母细胞用0.5%链酶蛋白酶消化去除透明带。

(2) 粘附体细胞:将去透明带卵在200μg/mL植物凝集素(PHA)液滴中处理3~4s后,

再将其放入含有体细胞的液滴中一对一的粘附体细胞，选择折光性强、较小体积、圆形且外表光滑的用作供体细胞。

(3) 融合：小心吸取粘附体细胞的卵母细胞至融合槽，施以 3V 交流电 (AC)，使体细胞-卵胞质复合体的排列方向自动与电极垂直，然后同样在交流电场的作用下使另一个卵胞质粘附在复合体上，使其排列顺序为卵-体细胞-卵，切记保证其排列方向与电极垂直。最后施以 50V/mm，9 μ s，1 个脉冲的直流电 (DC) 对其进行电融合。0.5h 后挑选融合的复合体。

B. 显微注射法制备重构胚胎：

(1) 注核：将去核卵和适量供体细胞移入操作滴中，用注核针吸取直径为 15 μ m 左右、折光性强、圆形光滑的供体细胞，通过透明带上去核时留下的缝隙注入去核卵母细胞的卵周隙中，按压透明带尽量使注入的供体细胞紧贴卵细胞膜。

(2) 融合：将构建的重构胚放入胚胎培养液中恢复 1~2h 后分批放入融合液中平衡 2 min，在融合槽内用拨卵针转动卵母细胞，使供体细胞卵母细胞接触面与电场方向垂直，施以场强为 2.2 kV \cdot cm⁻¹，脉冲时间为 20 μ s，脉冲次数为 1 次的直流脉冲进行融合，融合后 0.5h 后挑选融合胚进行下一步激活处理。

2.1.4.6 重构胚激活

将融合的重构胚移入含有 Ionomycin 的 mCR1aa 滴内作用 5min 后，清洗三次，再移入含有 6-DMAP 的 mCR1aa 滴中培养 6h。

2.1.4.7 重构胚培养

(1) 无透明带重构胚培养：采用微穴培养无透明带重构胚。用钝头钢针在放有 mCR1aa 液滴的培养皿底部做大约直径 300 μ m，深 300 μ m 的小窝，每个 60 μ L 滴内做 30~40 个小窝，每个小窝内放一个重构胚。38.5 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 培养箱培养约 48h 换液，检查重构胚发育情况，7d~8d 统计囊胚率。

(2) 显微注射重构胚培养：将重构胚放入 mCR1aa 液滴中，38.5 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 培养箱培养约 48h 换液，检查重构胚发育情况，7d~8d 统计囊胚率。

2.1.4.8 胚胎移植

(1) 受体母牛的准备：分别在河北畜牧良种工作站试验牛场、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所试验牛场和安徽百旺畜牧科技开发公司奶牛场选择荷斯坦青年母牛（16—18 个月龄）、产后 3 个月以上子宫正常的西门塔尔杂交母牛作为受体。

(2) 受体母牛同期处理：直肠检查受体母牛后，选择卵巢上具有黄体的母牛，肌肉注

射氯前列烯醇 6mL (齐鲁制药厂动物保健药厂), 注射后 48h—72h 期间观察并记录受体发情情况。

- (1) 克隆胚胎移植: 挑选体外培养第 7d (激活当天记做 0d) 发育到囊胚 (或扩张囊胚) 的克隆胚胎装入 0.25mL 塑料细管 (法国卡苏公司), 每支细管装入 2 枚胚胎。直肠检查发情后 6~7 天 (发情当天记做 0 天) 牛卵巢上黄体情况, 选择卵巢上具有 A 级黄体的受体移植克隆胚胎, 每头受体移植 2 枚克隆胚胎。
- (2) 妊娠检查: 受体母牛移植 60 天后, 直肠检查确定妊娠情况。

2.1.5 统计分析

2.1.5.1 统计与分析方法

试验获得的数据用统计分析软件 SAS V8 的 ANOVA 进行分析, Dunacan's 检查判定处理间的差异显著性。

2.1.5.2 本试验统计克隆重构胚体外发育指标表示如下:

融合率: $\text{融合率} = \text{融合后重构胚数} / \text{融合前半卵的对数}$;

卵裂率: $\text{卵裂率} = \text{重构胚卵裂数} / \text{融合后重构胚数}$;

桑葚胚率: $\text{桑葚胚率} = \text{桑葚胚数} / \text{卵裂胚胎数}$;

囊胚率: $\text{囊胚率} = \text{囊胚数} / \text{卵裂胚胎数}$

2.2 试验结果与分析

2.2.1 优秀荷斯坦种公牛体细胞系的建立

本试验分别从河北省畜牧良种工作站采集优秀荷斯坦种公牛 10 头 (包括 2 头后裔测定种用公牛, 牛号分别为: HS515 和 HS535, 以及 8 头胚胎移植后备种公牛), 从山东奥克斯种公牛站采集 10 头美国胚胎移植后备优秀种公牛, 共建立优秀种公牛体细胞吸 20 头份, 为优秀荷斯坦种公牛体细胞克隆提供遗传材料。

试验结果表明, 公牛耳缘组织可以作为组织块贴壁法建立成纤维细胞系的遗传物质来源。组织块贴壁法铺瓶 5-7d 后可见原代细胞的生长, 长满后部分进行传代和冷冻保存, 另一部分继续传代, 利用酶消化法纯化获得成纤维细胞, 经血清饥饿后用作体细胞克隆的核供体。

本试验供体动物 HS515 和 HS535 的体貌及其耳朵成纤维细胞系分别见图 2-1 和图 2-2, 其系谱资料见表 2-1 和表 2-2。



图 2-1 HS515 种公牛的体貌和耳缘成纤维细胞

Fig2-1. Donor bovine HS515 and its ear fibroblast cell lines



图 2-2 核供体 HS535 的体貌及其耳朵成纤维细胞系

Fig2-2. Donor bovine HS535 and its ear fibroblast cell lines

表 2-1 HS515 种公牛的系谱

Tab2-1. Pedigree of HS515

父: MAIZEFIELD BELLWOOD USA2103297 连续 10 年总性能指数排行榜前十名				父 : ARLINDA MELWOOD USA1879149
				母: BREN-WAY BELL BETSY USA12052401
母: BERKLINE MASECOT BRENNUSA14797308				父 : SINGING-BROOK N-B MASCOT-ET USA2020049(福神)
年龄 (岁)	产奶 d 数 (d)	产奶量 (公斤)	乳脂率 (%)	母 : TRENTON-BERKLINE BEULAH-ET USA14043710
2	305	9987	3.7	
4	305	15809	4.0	

表 2-2 HS535 种公牛的系谱

Tab2-2. Pedigree of HS535

父: TD-QUEENS-MANOR MARSMAN-ET*TL USA2127151				父 : WALKWAY CHIEF MARK USA1771437 (马克)
				母 : CHERRY BROOK LTD BALBOA USA11414372
母: CLOVER-MIST NATASHA-ET USA114766270				父 : MADAWASKA AEROSTAR USA383622 (空中之星)
年龄 (岁)	产奶 d 数 (d)	产奶量 (公斤)	乳脂率 (%)	母 : CLOVER-MATT-WEST BRIDOET-ET USA11831011
2	305	9120	3.8	
4	305	13121	4.0	

2.2.2 高产荷斯坦母牛体细胞系的建立

从北京市奶牛中心选择 2 头优质高产荷斯坦母牛，牛号分别为 0301 和 8079，剪取耳缘组织，采用组织快贴壁培养法分别建立其耳缘成纤维细胞系（图 2-3 和 2-4），并进行常规传代培养和冻存。拟用作核移植供体的细胞，根据试验设计进行血清饥饿处理，实现细胞周期的同期化。

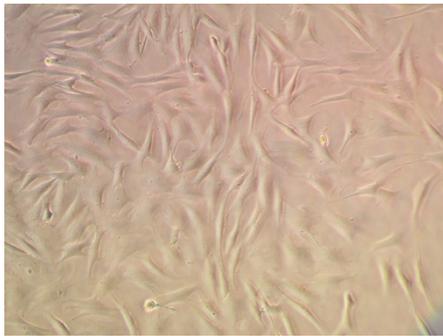


图 2-3 荷斯坦奶牛 0301 耳缘成纤维细胞系
Fig2-3. Ear skin fibroblast cell line Hesitan 0301

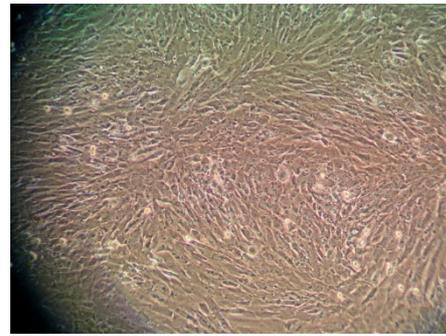


图 2-4 荷斯坦奶牛 8079 耳缘成纤维细胞系
Fig2-3. Ear skin fibroblast cell lines of Hesitan 8079

2.2.3 不同激活方法对克隆胚胎发育率的影响

采用 A23187（处理 5min）分别与 6-DMAP 或放线菌酮组合处理获得的体细胞克隆重构胚，体外培养后统计发育率（表 2-3）。结果，两种组合激活方法的卵裂率（82.62% VS 78.15%）和囊胚率（34.15% VS 30.21%）差异不显著，然而 A23187+CHX+CB 激活方法获得的胚胎异常分裂率高，卵裂球呈碎片，卵裂球大小不均一，胚胎质量较差。

表 2-3 不同激活方法对胚胎发育率的影响
Tab2-3 Effect of different activation methods on bovine SCNT embryos developmental competence

激活方法	重构胚数	卵裂率	囊胚率
A23187+6-DMAP	118	82.62%±1.73 ^a	34.15%±2.45 ^a
A23187+CHX+CB	165	78.15%±4.7 ^a	30.21%±1.20 ^a

表注：a、b 表示组间有显著差异（ $p<0.05$ ）

2.2.4 不同体外培养液对克隆胚胎发育率的影响

激活处理后的体细胞克隆重构胚分别放入三种体外培养液中于 38.5℃、5%CO₂、饱和湿度的二氧化碳培养箱，比较不同体外培养液对重构胚胎发育的影响（表 2-4）。结果显示，mCR1aa 培养液的卵裂率高达 83.65%，囊胚率达 34.36%，均显著高于其余两种

培养液，但三者间的融合率差异不显著。

表 2-4 不同体外培养液对核移植效率的影响

Tab2-4 Effect of different cultural media on bovine SCNT embryos developmental competence

体外培养液	重构胚数	融合率	卵裂率	囊胚率
CR1aa	120	89.02%±2.34 ^a	77.49%±2.26 ^b	25.37%±1.27 ^b
SOF	135	90.33%±2.29 ^a	74.87%±2.83 ^b	28.98%±0.88 ^b
mCR1aa	156	89.85%±3.07 ^a	83.65%±2.49 ^a	34.36%±1.39 ^a

表注：a、b 表示组间有显著差异 (p<0.05)

2.2.5 细胞周期的不同调节方式对克隆胚胎发育率的影响

对建立的种公牛耳缘成纤维细胞系，分别采用血清饥饿和接触抑制处理，获得的供体细胞进行核移植操作，研究不同的同期方法对核移植重构胚胎的发育情况的影响（表 2-5），结果表明，二者的融合率、卵裂率和囊胚率都没有显著差异。

表 2-5 供体细胞不同处理方式对重构胚发育的影响

Tab2-5 Effects of cell cycle synchronization treatment on in vitro development ability of bovine SCNT embryos

同期化处理方式	重构胚数	融合率	卵裂率	囊胚率
血清饥饿	143	90.52%±2.62 ^a	81.27%±3.68 ^a	31.46%±2.42 ^a
接触抑制	171	89.25%±1.92 ^a	82.44%±4.42 ^a	30.44%±2.77 ^a

表注：a、b 表示组间有显著差异 (p<0.05)。

2.2.6 不同核移植方法对奶牛核移植胚胎体外发育的影响

在本试验中共采用两种核移植方法来进行奶牛体细胞克隆胚胎的构建，结果见表 2-6，手工克隆方法获得的重构胚的融合率（89.88%）显著高于显微注射方法（72.18%），而两组的卵裂率和囊胚率则差异不显著。

表 2-6 不同核移植方法对奶牛体细胞克隆胚胎发育的影响

Tab2-6 Effects of different nuclear transfer methods on in vitro development ability of bovine SCNT embryos

核移植方法	重构胚数	融合率	卵裂率	囊胚率
手工克隆	341	89.88%±1.35 ^a	81.86%±4.05 ^a	30.95%±2.60 ^a
显微注射	286	72.18%±3.21 ^b	80.49%±2.37 ^a	28.53%±3.41 ^a

注：a、b 表示组间有显著差异 (p<0.05)

2.2.7 克隆胚胎移植

本试验分别在安徽百旺奶牛场、河北省畜牧良种工作站试验牛场和中国农业科学院北京畜牧兽医研究所试验牛场移植受体27头次，移植克隆公牛胚胎58枚（每头移植2枚~3枚），详细结果见表2-7。

表 2-7 体细胞克隆公牛胚胎移植结果，单位：头次，%，枚
Tab2-7 Results derived from bull SCNT embryo transfer

地点	受体种类	移植受体牛数	妊娠头数	妊娠率
安徽百旺	青年荷斯坦	6	3	50.0
河北畜牧良种工作站	经产西门塔尔杂交牛	14	4	28.6
中国农科院畜牧兽医所	青年荷斯坦	7	3	42.9
合计		27	10	37.0

表 2-8 体细胞克隆公牛胚胎移植妊娠母牛流产情况一览表
Tab2-8 Abortion of pregnant recipient of bull SCNT embryo

地点	移植妊娠头数	流产时妊娠天数	流产受体头数	流产胎儿数
安徽百旺	3	70天	1	1
		80天	1	1
		155天	1	2
河北畜牧良种工作站	4	70天	1	1
		73天	1	2
		85天	1	未见胎儿，只有胎衣
		90	1	1
中农业科学院北京畜牧兽医研究所	3	68	1	1
		101天	1	1(因为受体母牛腿摔断，屠宰)
		149天	1	2
合计	10		10	12

受体移植60天时妊娠检查怀孕10头，总妊娠率37.0%（10/27），其中青年荷斯坦母牛移植妊娠率达到46.2%，显著高于经产西门塔尔母牛。

克隆胚胎移植受体母牛在妊娠后流产情况见表2-8，其中西门塔尔杂交受体母牛分别在妊娠的70~90d内流产，3头看到流产胎儿，1头仅看到胎衣未见胎儿（但不能确定就没有胎儿），1头妊娠受体101天后屠宰，1头妊娠155天、胎水过多受体剖腹产得到2个胎儿，1头妊娠149个月、胎水过多受体死亡取出胎儿2个（见表2-8）。

移植妊娠101d胎儿生长发育及子宫情况见表2-9和图2-5。剖腹后称重时，子宫总重（包括子宫体分叉后2cm距离，但不包括子宫体和子宫颈及阴道）1.71kg，其中胎儿重410g，胎水1270mL,子叶数64个。

表2-9 剖腹产胎儿及胎盘发育情况一览表，单位：头次，%，枚

Tab2-9 Fetus and its placenta derived by Caesarean section of cloned bull

项目	重量	体长	体高
胎儿（101天）	410g	10cm	8cm
子宫	1700g	——	——
胎水	1270mL	——	——

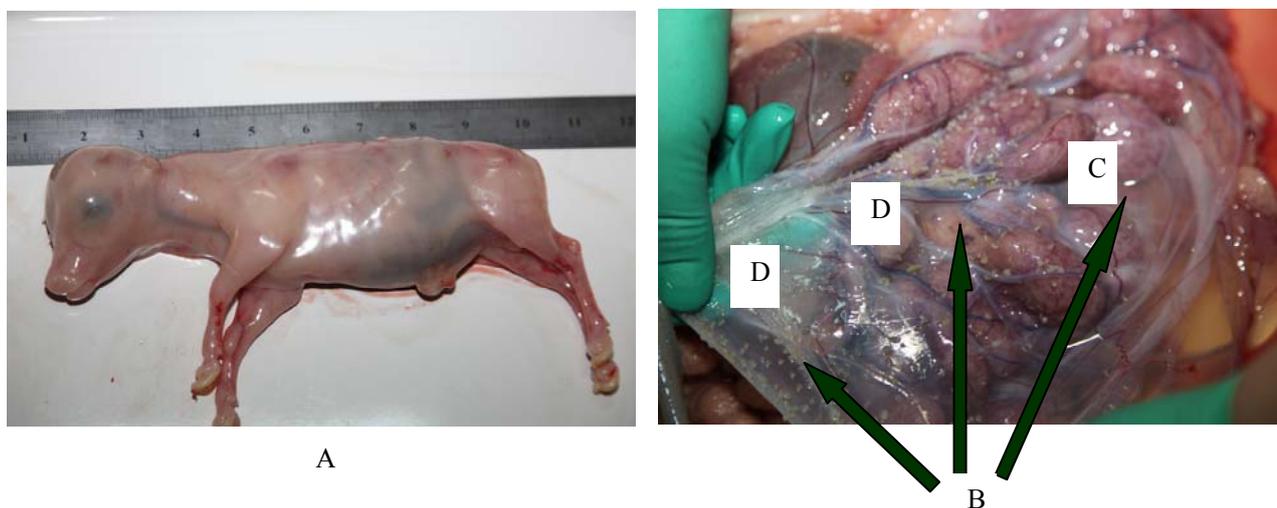


图2-5 妊娠101天胎儿及其胎盘情况

A: 胎儿; B胎盘, 其中C示子叶, D示胶状颗粒分泌物

Fig2-5 Fetus and its placenta derived from cloned bull of pregnancy for 101d

A:fetus; B: placenta; C: cotyledon D: particulate secretions

2 头妊娠到 150 天左右的受体母牛，因为胎水太多，挤压母牛内脏，引起母牛进食废绝。其中 1 头妊娠 155 天受体母牛剖腹产时发现两个胎儿都还成活（有心跳，），但胎儿取出后死亡，胎水重量达到 151kg。1 头妊娠到 149 天的受体母牛进食废绝送屠宰场时死亡，屠宰后发现 2 个胎儿，其中一个胎儿已经死亡（图 2—6C 胎儿发酵），另外一头胎儿则可能刚死亡(图 2—6B)。

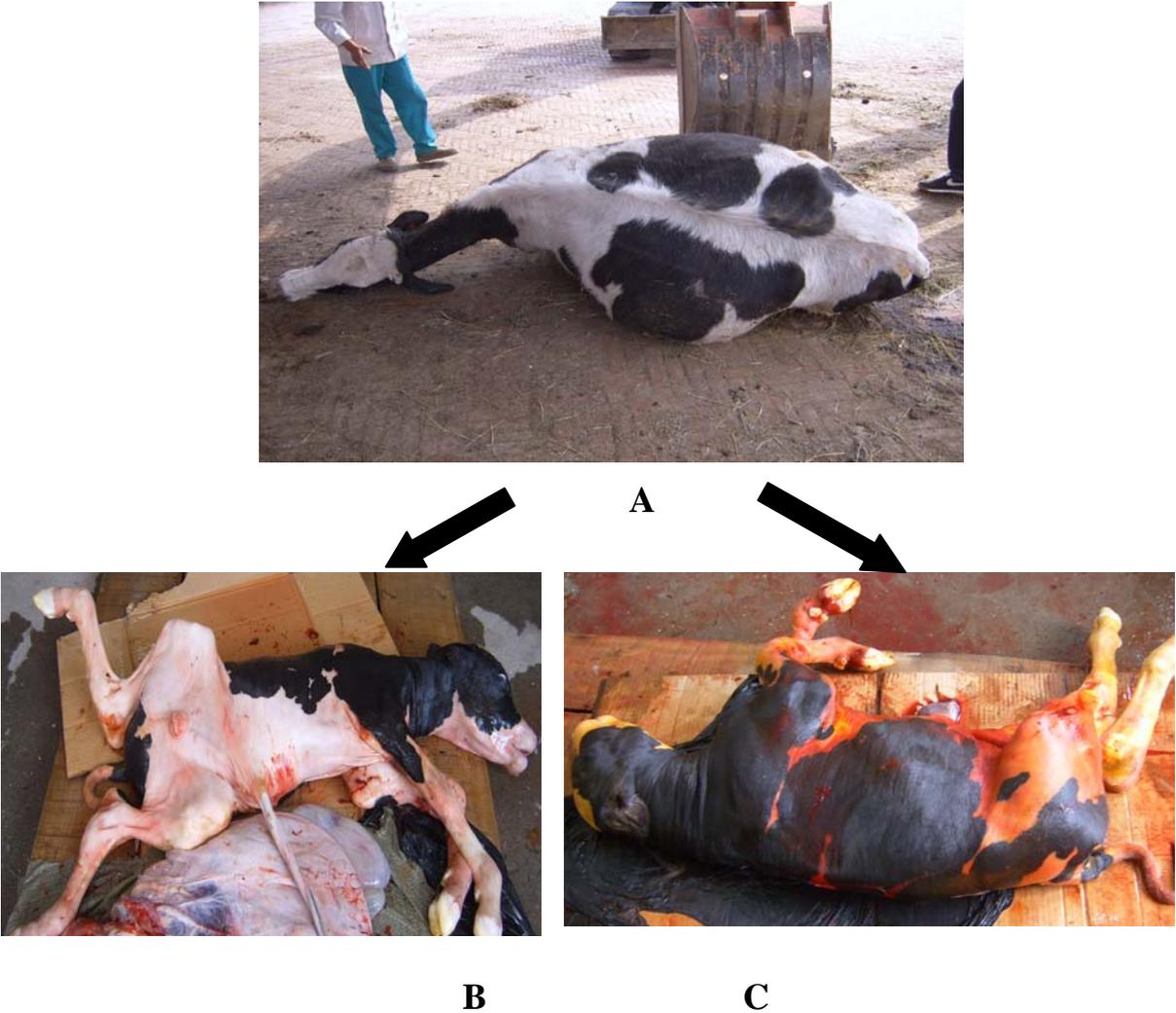


图2—6 牛体细胞克隆胚胎移植受体母牛及其胎儿

A:受体母牛，腹部极度鼓胀，准备送去屠宰厂；B屠宰后取出的胎儿，刚死亡；C屠宰后取出的胎儿，已经发酵水肿。

Fig2-6 Recipient for embryo transfer and fetus of cloned bull

A: Recipient abdomen swelling B: fetus died just recently C: fetus with zmyosis

2.3 讨论

动物体细胞核移植 (SCNT) 是一项十分复杂、操作技术要求很高的技术方法, 包括供体细胞的准备 (培养)、受体卵母细胞的准备 (体外成熟培养)、去核、移核、融合、激活、重构胚体外培养和胚胎移植等。SCNT 中每个技术环节都十分重要, 其中任何一个环节出现问题都将直接影响克隆动物生产的效率, 甚至直接决定克隆动物生产的成败。目前在体细胞核移植技术研究中, 核移植程序主要还是 Wilmut 等 (1997) 克隆 Dolly 绵羊采用的方法和 Wakayama 等 (1998) 克隆小鼠采用的方法。这两种方法都需要将重构胚激活使其发育。

动物体细胞克隆时激活是哺乳动物核移植的关键环节, 其目的是使重构胚发生类似于受精胚胎在精子作用下所发生的卵母细胞活化现象。其机制是在外界刺激作用下 (例如化学物质) 引起胞质内 Ca^{2+} 浓度升高, MPF 活性降低, 从而诱导 MII 期卵母细胞启动供体核的重编程, 完成早期发育启动的激活并支持随后的发育。

目前在动物体细胞克隆研究中常用的化学激活试剂有两类, 一类是 Ca^{2+} 载体, 如 A23187、Ionomycin 等, 引起胞内 Ca^{2+} 水平迅速升高, 达到激活作用 (Wang 等, 1998); 第二类是蛋白激酶抑制剂, 如 6-DMAP, CHX 等, 其能促使 MPF 及其它相关激酶的去磷酸化, 并抑制发生重新磷酸化 (陈大元等, 2000; Oneill 等, 1991)。一般地, 将两类激活试剂组合使用, 能维持 MPF 的低活性, 提高激活效率。Thongphakdee 等 (2008) 采用 A23187 + 6-DMAP 与 A23187 + CHX 激活构建的体细胞克隆牛重构胚, 都得到了较高的体外发育率。本实验也采用了这两种激活方法, 结果两种组合激活方法的卵裂率 (82.62% VS 78.15%) 和囊胚率 (34.15% VS 30.21%) 差异不显著, 然而后者获得的胚胎异常分裂率高, 卵裂球呈碎片, 卵裂球大小不均一, 胚胎质量较差。

体外培养条件同样也对核移植胚胎的体外发育起到至关重要的作用。现在已经发现了针对各物种的专属性培养液, 猪胚胎的体外培养常用 NCSU-23 (Lee 等, 2003; Peters 等, 2001); 小鼠则常用 CZB (Wakayama 等, 1999) 和 KSOM 培养液 (Wakayama 等, 2005); 牛克隆胚胎培养常用 CR1aa 和 mCR1aa。本试验研究了种公牛核移植胚胎在 CR1aa、SOF1aa 和 mCR1aa 中的体外发育情况 mCR1aa 培养液的卵裂率高达 83.65%, 囊胚率达 34.36%, 均显著高于其余两种培养液, 但三者间的融合率差异不显著, 说明 mCR1aa 培养液成分搭配更合理, 更能满足牛克隆胚的体外发育。

在哺乳动物克隆中, 供体核的完全重编程和重构胚的正确倍性是核移植成功的保

证。已分化的体细胞所处的细胞周期与受体卵母细胞成熟周期的协调，有利于供体核的完成重编程。目前，核移植所用的受体为 M II 期卵母细胞，此时其 MPF 活性很高，需要选择的是供体细胞的细胞周期。1997 年 Wilmut 采用 G0 期乳腺上皮细胞获得世界首例克隆动物，Cibelli 等(1998 年)使用 G0/G1 期细胞作核供体也获得较高的克隆效率，该结果也在猪(Onishi 等,2000)和小鼠 (Wakayama 等,1998)上得到验证。将细胞同期到 G0/G1 期的常用方法主要两种，血清饥饿法(Cho 等,2002, Wilmut 等,2007)和接触抑制法(Boquest 等,1999, Holker 等,2005)。

在本试验利用培养的公牛皮肤成纤维细胞进行核移植研究中，血清饥饿和接触抑制两种细胞同期方法处理的细胞作为核供体构建的重构胚，其融合率、卵裂率，桑葚胚率和囊胚率都没有显著差异，因此本试验中，两种方法都能达到将体细胞同期到 G0/G1 期的结果。然而 Gibbons 等 (2002) 的研究结果以及其他一些研究表明表明，血清饥饿的供体细胞由于其 DNA 断裂和细胞凋亡可能导致重构胚的不完全重编程，以及克隆胚胎死亡和流产(Gibbons 等 2002; Edwards 等,2001, Hill 等,2000, Kato 等,1998)。接触抑制可以使体外培养大小为 15~20 μm 的细胞中 95%以上的细胞处于 G0/G1 期，能有效满足核移植对供体细胞的要求(Wakayama 等,1998)。因此，接触抑制法可能是将 G0/G1 期供体细胞的有效方法。

动物体细胞克隆胚胎移植后胚胎死亡和流产率高是动物克隆效率低下的重要原因 (Yanagimachi 等 2002 ; Heyman 等, 2002)。研究表明，牛克隆胚胎在移植受体后的 29d~32d 胚胎 (胎儿) 存活率与体外受精胚胎相似，但是 30d~60d 之间克隆胚胎的死亡可能达到 50%~100% (Edwards 等, 2003, Gibbons 等 2002; Hill 等 2000)。本试验移植克隆胚胎的优秀公牛供体细胞来源于血清饥饿法培养的皮肤成纤维细胞，虽然获得了较高的移植妊娠率 (37.0%，10/27，其中青年荷斯坦母牛为 46.2%)，但是受体母牛在妊娠检查后 (70d~90d) 流产 7 头，占妊娠母牛的 70%，妊娠后期 (90d~160d) 流产 3 头。

不同品种的受体母牛移植克隆胚胎后虽然移植妊娠率可能没有差异，但是流产率却可能不同，例如鲁西黄牛受体母牛移植克隆胚胎的流产率明显高于荷斯坦奶牛 (陈大元等, 2003)。本试验中西门塔尔杂交受体母牛移植妊娠率 28.6% (4/14), 低于荷斯坦奶牛受体，而且所有妊娠怀孕母牛在 70~90 天之间流产。

牛克隆胚胎移植后胎盘发育异常可能是引起早期胎儿流产的重要原因 (Cibelli 等, 1998; De Lille 等 2001; Constant 等,2006)。本试验中 1 头妊娠 101 天的受体母牛屠

宰后获得 1 个胎儿，肉眼观察胎儿各种组织发育正常，但是胎儿胎盘里层的胎膜上附有大量的胶原性物质。这种胶状物具体成份、来源及形成原因等还有待于进一步研究。

受体母牛妊娠后期由于胎儿或者胎盘发育异常引起胎水（羊水和尿水）过多可能是引起克隆牛妊娠后期流产的重要原因（Schlafer 等，2000；Gibbons 2002；Zakhartchenko 等 1999）。本试验中，2 头妊娠到 150 天左右的受体母牛，因为胎水太多，挤压母牛内脏，引起母牛进食废绝。其中 1 头妊娠 155 天受体母牛剖腹产时发现两个胎儿都还成活（心跳，），但胎儿取出后死亡，胎水重量达到 150kg。1 头妊娠到 149 天的受体母牛进食废绝送屠宰场时死亡，屠宰后发现 2 个胎儿，其中一个胎儿已经死亡（胎儿发酵），另外一头胎儿则可能刚死亡。

由于本试验中受体母牛移植 2 枚胚胎，因此移植 2 枚克隆胚胎虽然可能具有较高的移植妊娠率，但是由于受体怀双胞胎，在妊娠后期母牛负担太重可能是引起妊娠后期胎儿流产的重要原因。另外，怀双胞胎时，只要有一个胎儿发育异常而死亡，就会引起受体母牛妊娠终止。

结论

1. 手工克隆和显微注射两种克隆方法构建的克隆胚胎体外发育差异不显著。重构克隆胚胎采用 A23187+6-DMAP 激活后在 mCR1aa 中培养，能够获得较高的囊胚发育率。
2. 种公牛克隆胚胎移植受体母牛 27 头，60 天妊检怀孕 10 头，妊娠率 37.0%，但是母牛在 70~90 天内流产 8 头（流产率 80%），1 头受体在 149 天，1 头受体在 155 天因胎水过多流产（屠宰）。

第三章 不同冷冻方法对牛体外胚胎 ATP 含量与 ROS 水平的影响

摘要：本章试验旨在探讨冷冻保存对牛体外生产胚胎能量代谢、有氧代谢造成的影响。采用常规法或玻璃化法（OPS 法）冷冻保存牛 IVF 囊胚和 SCNT 囊胚，利用 ATP Bioluminescence Assay Kit HS II 和 GENMED ROS Assay Kit 检测了冷冻—解冻后囊胚 ATP 含量和 ROS 水平。结果表明：（1）IVF 和 SCNT 囊胚 OPS 法冷冻—解冻后存活率（ $92.24\pm 4.54\%$ ， $78.71\pm 5.91\%$ ）均显著高于常规冷冻法（ $81.56\pm 2.33\%$ 、 $47.89\pm 5.83\%$ ）（ $P<0.05$ ）；（2）IVF 囊胚和 SCNT 囊胚 OPS 法冷冻—解冻后 ATP 含量（ 0.62 ± 0.04 pmol， 0.30 ± 0.01 pmol）均显著高于常规冷冻法（ 0.43 ± 0.06 pmol， 0.21 ± 0.02 pmol）（ $P<0.05$ ）；但是均显著低于相应的 IVF 或 SCNT 对照组新鲜囊胚（ 0.74 ± 0.05 pmol， 0.39 ± 0.01 pmol）；（3）玻璃化冷冻 IVF 囊胚（ 72.14 ± 4.31 cps）、SCNT 囊胚（ 40.11 ± 5.73 cps）ROS 水平高于新鲜 IVF 囊胚（ 47.33 ± 3.56 cps）、SCNT 囊胚（ 26.44 ± 1.49 cps）（ $P<0.05$ ），常规冷冻组则与此相反（ 34.41 ± 3.32 cps vs. 47.33 ± 3.56 cps； 15.46 ± 2.45 cps vs. 26.44 ± 1.49 cps）（ $P<0.05$ ）。【结论】玻璃化冷冻较适用于牛 IVF、SCNT 囊胚冷冻保存；玻璃化冷冻和常规冷冻均显著影响牛 IVF 囊胚、SCNT 囊胚中 ATP 含量和 ROS 水平。

关键词：牛体外胚胎，常规冷冻，OPS 法冷冻，ATP 含量，ROS 水平

自从 Brackett 等获得体外受精犊牛以来，牛体外胚胎生产（in vitro-production，IVP）技术经过三十多年的研究日趋成熟，并在畜牧业生产中得到广泛应用。牛卵母细胞（来源屠宰母牛或者活体采卵）经过体外成熟（IVM）、体外受精（IVF）和体外培养（IVC），囊胚率达到 40% 左右，胚胎移植妊娠达到 25~30%（Rizos et al., 2002; Lonergan et al., 2003）。胚胎冷冻保存是哺乳动物胚胎生物工程的重要技术环节，可以为体外受精胚胎、体系胞克隆胚胎等的生产与移植解除时间和空间的限制。然而，牛体外胚胎经常规法（traditonal freezing method）或玻璃化法（vitrication）冷冻—解冻后活力和移植妊娠率远低于体内生产胚胎（Pereira et al., 2007），这可能与冷冻过程对胚胎造成化学的、物理和生理损伤有关（Ahn et al., 2002）。

胚胎细胞中 ATP 含量是反映细胞活性的有效指标（Stojkovic 等，2001；Guan 等，2008；Tsai 等 2009），因为 ATP 是胚胎细胞主要能量物质，其含量反映了能量生成与代谢状态。研究表明，ATP 含量低的胚胎，发育迟缓，内细胞团缺失，不能够发育到扩张

囊胚或者孵化 (Hardy et al., 1989; Stojkovic 等, 2001)。牛胚胎体外培养时胚胎细胞进行有氧代谢, 而有氧代谢会产生活性氧族 (reactive oxygen species, ROS), ROS 是生物细胞氧化-还原代谢过程形成的一类含氧基团, 包括超氧阴离子基团、过氧化氢、羟自由基等 (Guerin 等, 2001)。生物细胞中 ROS 的含量及其与抗氧化剂之间的平衡对细胞正常生长和代谢至关重要 (Finkel and Holbrook, 2000)。研究表明, 高浓度的 ROS 影响激酶及其转录活性, 从而影响细胞活性 (Adler 等, 1999), 使胚胎发育延缓 (Johnson 等, 1994), 也可引起囊胚阶段牛胚胎细胞凋亡 (Parchment 等, 1991; Evans 等, 2004), 并能对 DNA、RNA 造成损伤 (Hao 等, 2004)。而 ROS 低于正常生理值水平时, 则会阻断氧化剂在机体增殖、防御等过程中的作用 (Vincent 等, 2009)。

胚胎细胞中 ATP 含量和 ROS 水平可以判断牛体外胚胎冷冻-解冻后活力率的指标, 然而关于冷冻保存对牛体外生产胚胎 ATP 含量和 ROS 水平的影响, 还未见报道。本章试验利用 ATP Bioluminescence Assay Kit HS II 和 GENMED ROS Assay Kit 测定常规方法和玻璃化冷冻方法冷冻-解冻后牛 IVF 囊胚和 SCNT 囊胚中 ATP 含量和 ROS 水平。从能量代谢、有氧代谢水平揭示牛冷冻体外生产囊胚发育能力下降的原因。

3.1 试验材料与试验方法

3.1.1 试剂与仪器设备

酶标仪 (InfiniteM200, Tecan, Austria)

其余仪器设备同第一、二章。

3.1.2 主要试剂与耗材

3.1.2.1 玻璃化冷冻液与解冻液

预处理液: 10% 乙二醇 (EG) + 10% 二甲基亚砷 (DMSO) DPBS 溶液。

FS 液: 30% (w/v) 聚蔗糖 Ficoll 70 + 0.5 mol/L 蔗糖 DPBS 溶液。

玻璃化冷冻液 ED FS 30: EG、DMSO 和 FS 液按照体积比 (v/v) 1.5:1.5:7 混匀。

解冻液: 0.5 mol/L 蔗糖 DPBS 溶液

3.1.2.2 常规冷冻液与解冻液

常规冷冻液: 10% EG + 0.1M 蔗糖的 DPBS 溶液。

解冻液: 20% 胎牛血清的 DPBS 溶液。

3.1.2.3 OPS 管的制备

0.25 ml 塑料细管(IVM., France)在酒精灯上加热软化后拉成外径为 $0.23\pm 0.01\text{mm}$, 管壁厚 0.02mm , 细端长为 $2.5\pm 0.5\text{cm}$ 的 OPS 管。

其余主要试剂与耗材同第一、二章

3.1.3 体外受精胚胎的生产

采用常规精液进行体外受精, 参照第一章。

3.1.4 体细胞克隆胚胎的生产

参照第二章。

3.1.5 体外胚胎冷冻与解冻

3.1.5.1 常规冷冻与解冻

室温下囊胚放入 $10\% \text{EG} + 0.1\%$ 蔗糖的常规冷冻液平衡 5min , $1\sim 2$ 枚胚胎装入 0.25ml 塑料细管放入 -6°C 平衡的程序冷冻仪 (CL5500) 冷冻槽中平衡 5min 后诱发结晶, 再平衡 5min 后以 $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ 降温速率降到 -36°C , 平衡 10min 后投入液氮罐中保存。

室温下从液氮罐中取出冷冻胚胎细管, 空气中停留 10s 后在 32°C 水浴解冻 10s 。将细管内的胚胎推入培养皿中, 体视显微镜下回收胚胎并移入胚胎保存液中平衡 5min 。

解冻后的胚胎或者移入 $\text{CR1aa} + 10\% \text{FBS}$ 培养小滴中二氧化碳培养箱 (38.5°C 、 $5\% \text{CO}_2$) 中培养, 形态正常, 且培养 12h 左右能够重新扩展的囊胚视为存活 (Han 等, 2000), 选择存活的囊胚测定 ATP 含量和 ROS 水平。

3.1.5.2 玻璃化冷冻与解冻

室温下将囊胚移入 $10\% \text{ED} + 10\% \text{DMSO}$ 平衡液中 30s , 然后移入玻璃化溶液 EDFS30 , 平衡 25s 后吸入 OPS 管, 直接投进液氮中保存。

室温下从液氮灌中取出 OPS 管, 迅速浸入解冻液液滴中, 体视显微镜下将胚胎移入 0.5mol/L 蔗糖溶液小滴中平衡 5min , CR1aa 中洗涤 3 次。

解冻后的胚胎或者移入 $\text{CR1aa} + 10\% \text{FBS}$ 培养小滴中二氧化碳培养箱 (38.5°C 、 $5\% \text{CO}_2$) 中培养, 选择存活的囊胚测定 ATP 含量和 ROS 水平。

3.1.6 ATP 含量测定

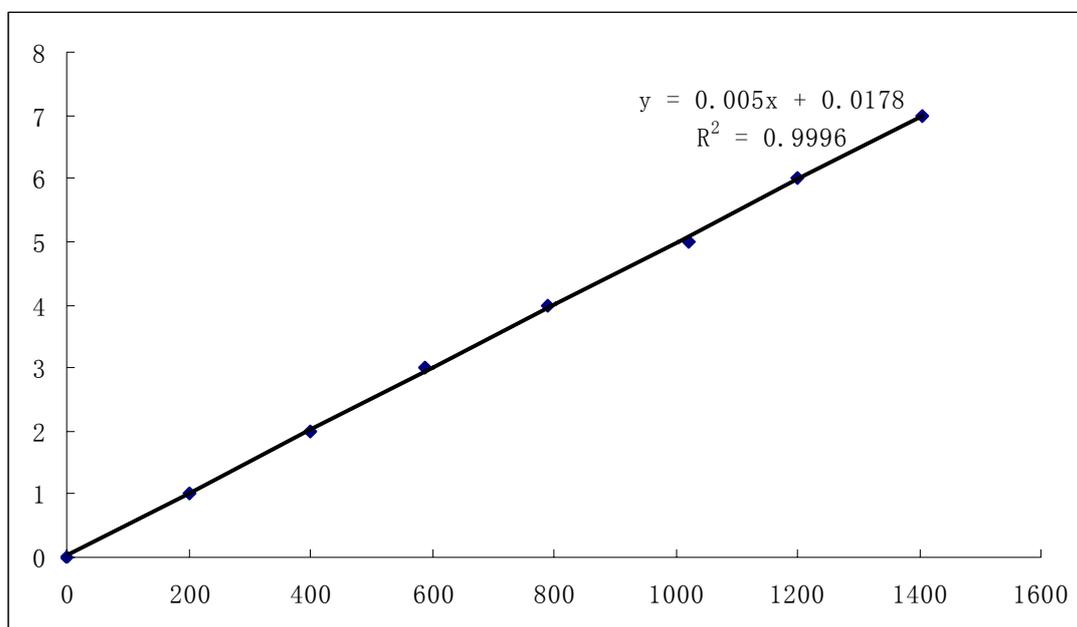
参照 Van Blerkom 等 (1995) 的方法, 用萤光素酶生物发光测定法测定冷冻解冻后牛体外胚胎细胞 ATP 含量。

采用生物发光检测试剂盒检测 ATP 含量 (ATP Bioluminescence Assay Kit HS II, Roche)。冷冻解冻后胚胎 (每管 10 枚胚胎) 用酸性台式液 (pH=2.5) 除去透明带, 放入含有 100 μ l 灭菌超纯水 (18.2 兆欧姆) 离心管中, -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。测量时将样品从冰箱中取出, 冰上用移液器反复吹打以使细胞质内 ATP 溶解。

测量时, 先往酶标板中加入 100 μ l ATP 反应液, 静置 3min 后, 加入 20 μ l 样品, 混匀后于酶标仪 (Infinite2000) 中进行测定。标准曲线梯度为 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 pmol。每次测量重新测定标准曲线值, 同时设空白对照。根据测定的数值, 建立标准曲线 (如图 3-1 所示)。

通过标准曲线给出的方程, 将样品的测量值代入方程求出样品 ATP 含量, 计算公式如下:

$Y=0.005x+0.0178$ 。其中 Y 为 ATP 含量, x 为样品测定的荧光值。



Y 为 ATP 含量 (pmol), x 为仪器测得数据, R 为所得标准曲线的相关系数。

图 3-1 ATP 测量过程中的标准曲线

Fig.3-1 Standard curve of ATP detection

3.1.7 胚胎 ROS 水平检测

参照 Rahimi 等 (2003) 的方法, 氯甲基二氯二氢荧光素二乙酯 ($H_2DCF-DA$) 测定冷冻—解冻牛体外胚胎细胞内氧化状态。 $H_2DCF-DA$ 是一种非极性化合物, 在整合入细胞后被细胞酯酶转化成非荧光极化衍生物 (H_2DCF)。在细胞内存在 ROS 的情况下, 不能通透细胞膜的 H_2DCF 迅速氧化成高度荧光的二氯荧光素(DCF)(Frenkel and Gleichauf, 1991)。因此, 测定 DCF 的含量就能间接测定细胞中 ROS 相对水平。

所使用的高质荧光测定试剂盒 (Genmed Scientific Inc, USA) 包含四种成分 Reagent A (清理液)、B (染色液)、C (稀释液)、D (保存液)。10 μ l Reagent B 采用 100 μ l Reagent C 稀释后制备成染色工作液。

冷冻解冻后胚胎在 Reagent A 中洗涤 3 次, 放入 50 μ l 染色液在 39 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 20min, 用 Reagent D 洗涤 3 次后移入 100 μ l Reagent D 放入黑色平底酶标板中, 酶标仪 (Infinite2000) 激发光为 490nm, 散发波长 530nm 进行检测。

3.1.8 统计分析

所有处理重复至少三次, 采用 SAS 软件统计数据。表 3-1 采用卡方分析, 表 3-2、3-3 及图 3-1 数据采用单因素方差分析。结果以平均数 \pm 标注差表示, $P<0.05$ 为差异显著性标准。

3.2 结果

3.2.1 冷冻方法对体外胚胎冷冻—解冻后活力的影响

牛 IVF 胚胎和 SCNT 胚胎经常规法冷冻与 OPS 法冷冻—解冻后体外培养结果见表 3-1。结果表明, 常规冷冻方法冷冻和玻璃化冷冻后, IVF 囊胚 ($81.56\pm 2.33\%$ 、 $92.24\pm 4.54\%$) 的存活率显著高于 SCNT 囊胚 ($47.89\pm 5.83\%$ 、 $78.71\pm 5.91\%$) ($P<0.05$)。而 IVF 和 SCNT 囊胚 OPS 法冷冻解冻后存活率 ($92.24\pm 4.54\%$ 、 $78.71\pm 5.91\%$) 显著高于常规冷冻法 ($81.56\pm 2.33\%$ 、 $47.89\pm 5.83\%$) ($P<0.05$)。

3.2.2 冷冻方法对体外胚胎冷冻—解冻后 ATP 含量的影响

牛体外受精囊胚 (IVF) 和体细胞克隆囊胚 (SCNT) 分别用常规方法和玻璃化方法冷冻后, ATP 含量测定结果见表 3-2 和图 3-2。试验结果表明, IVF 囊胚常规方法冷冻后 ATP 含量 (0.43 ± 0.06 pmol) 和玻璃化冷冻后 ATP 含量 (0.62 ± 0.04 pmol) 都显著性低于对

照组(0.74±0.05 pmol) (P<0.05)。SCNT 囊胚常规冷冻后 ATP 含量 (0.21±0.02 pmol) 和玻璃化冷冻后 ATP 含量 (0.30±0.01 pmol) 也均显著性对照组 (0.39±0.01 pmol) (P<0.05)。

无论是常规方法或玻璃化方法冷冻, 冷冻—解冻后 SCNT 囊胚 ATP 含量 (0.21±0.02 pmol, 0.30±0.01 pmol) 均显著性低于相应方法冷冻的 IVF 囊胚(0.43±0.06 pmol, 0.62±0.04 pmol) (P<0.05)。而 OPS 法冷冻的牛 IVF 和 SCNT 囊胚 ATP 含量 (0.62±0.04 pmol、0.30±0.01 pmol) 显著高于常规冷冻法 (0.43±0.06 pmol、0.21±0.02 pmol) (P<0.05)。

表 3-1 牛 IVF、ICSI、SCNT 囊胚常规冷冻、玻璃化冷冻效果 单位: 枚, %

Table 3-1 The cryopreservation of bovine IVF and SCNT blastocysts by controlled freezing and OPS vitrification

冷冻方法	胚胎类型	冷冻—解冻胚胎数	存活率 (%)
常规冷冻	IVF	103	84 (81.56±2.33) ^{a, B}
	SCNT	142	68 (47.89±5.83) ^{b, B}
OPS 玻璃化冷冻	IVF	116	107 (92.24±4.54) ^{a, A}
	SCNT	108	85 (78.71±5.91) ^{b, A}

^{a, b}: 字母不同表示同种冷冻方法内数据存在显著性差异 (P<0.05)

^{A, B}: 字母不同表示同种胚胎间数据存在显著性差异 (P<0.05)

表 3-2 不同冷冻方法冷冻—解冻后牛 IVF 和 SCNT 胚胎的 ATP 含量

Table 3-2 The ATP content of cryopreserved bovine IVF, SCNT blastocysts

冷冻方法	胚胎类型	胚胎数量	ATP 含量(pmol)
常规冷冻	IVF	40	0.43±0.06 ^{a, A}
	SCNT	30	0.21±0.02 ^{c, B}
玻璃化冷冻	IVF	40	0.62±0.04 ^{a, A}
	SCNT	30	0.30±0.01 ^{c, B}
对照组	新鲜 IVF	30	0.74±0.05
对照组	新鲜 SCNT	30	0.39±0.01 ^A

表注: 同列中不同字母表性差异显著 (P<0.05)。

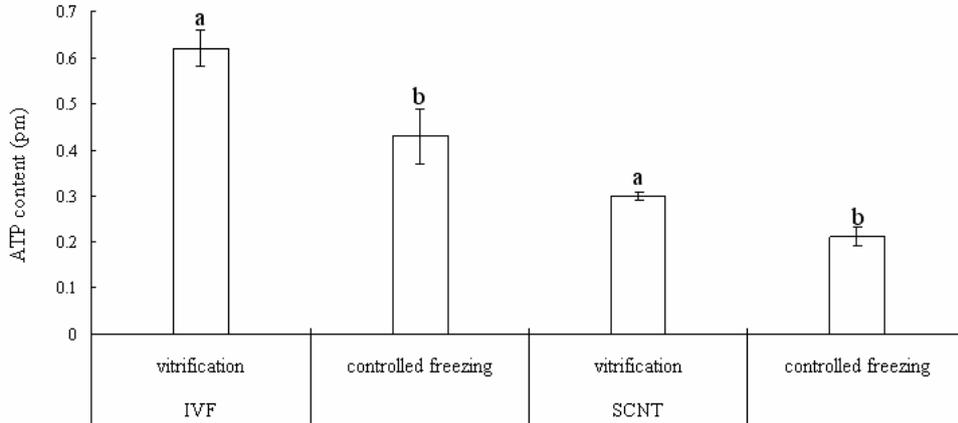


图 3-2 常规冷冻、玻璃化冷冻囊胚中 ATP 含量比较

^{a,b} 玻璃化冷冻、常规冷冻同种胚胎间数据差异显著 ($P < 0.05$) .

Fig.3-2 Comparison of ATP content of blastocysts between controlled freezing group and OPS vitrification group.

^{a,b} Values within each kind of blastocysts differ significantly between controlled freezing and OPS vitrification ($P < 0.05$). The bars represent the mean \pm standard deviation of repeated experiments.

3. 2. 3 冷冻方法对体外胚胎冷冻—解冻后 ROS 水平的影响

牛 IVF 和 SCNT 囊胚不同冷冻方法冷冻—解冻后 ROS 水平测定结果见表 3-3。常规法和 OPS 法冷冻—解冻的 SCNT 囊胚 ROS 水平 (15.46 ± 2.45 cps, 40.11 ± 5.73 cps) 显著性低于相应方法冷冻—解冻的 IVF 囊胚 ROS 水平 (34.41 ± 3.32 cps, 72.14 ± 4.31 cps) ($P < 0.05$)。OPS 法冷冻—解冻的 IVF 囊胚 (72.14 ± 4.31 cps) 和 SCNT 囊胚 (40.11 ± 5.73 cps) ROS 水平显著高于相应的对照组新鲜囊胚 (47.33 ± 3.56 cps, 26.44 ± 1.49 cps) ($P < 0.05$)，而常规法冷冻—解冻的 IVF 囊胚 (34.41 ± 3.32 cps) 和 SCNT 囊胚 (15.46 ± 2.45 cps) ROS 水平显著低于相应的对照组新鲜囊胚 (47.33 ± 3.56 cps)、 26.44 ± 1.49 cps) ($P < 0.05$)。

3. 3 讨论

尽管近年来体外胚胎生产技术日趋成熟，但是无论采用何种冷冻方法，牛体外生产的胚胎冷冻—解冻后的发育能力和胚胎移植妊娠率都显著下降 (Pereira 等, 2007)。这可能与冷冻—解冻过程对牛体外胚胎细胞的损伤密切相关，而细胞中 ATP 含量作为能量物质，对胚胎细胞的发育具有重要作用。

表 3-3 不同冷冻方法冷冻—解冻后牛 IVF 和 SCNT 胚胎的 ROS 水平：单位 cps/ 枚

Table 3—3 The ROS level of cryopreserved bovine IVF, SCNT blastocysts

冷冻方法	胚胎类型	胚胎数量	ROS 水平
常规冷冻	IVF	n=31	34.41±3.32 ^{a,A}
	SCNT	n=32	15.46±2.45 ^{c,B}
OPS 玻璃化冷冻	IVF	n=28	72.14±4.31 ^{a,A}
	SCNT	n=34	40.11±5.73 ^{c,B}
对照组 1	新鲜 IVF	n=35	47.33±3.56
对照组 2	新鲜 SCNT	n=31	26.44±1.49 ^A

^{a,b,c}: 同列中字母不同表示同种冷冻方法内数据存在显著性差异 (P<0.05); ^A: 与新鲜 IVF 囊胚存在显著性差异 (P<0.05); ^B: 与新鲜 SCNT 囊胚存在显著性差异 (P<0.05)

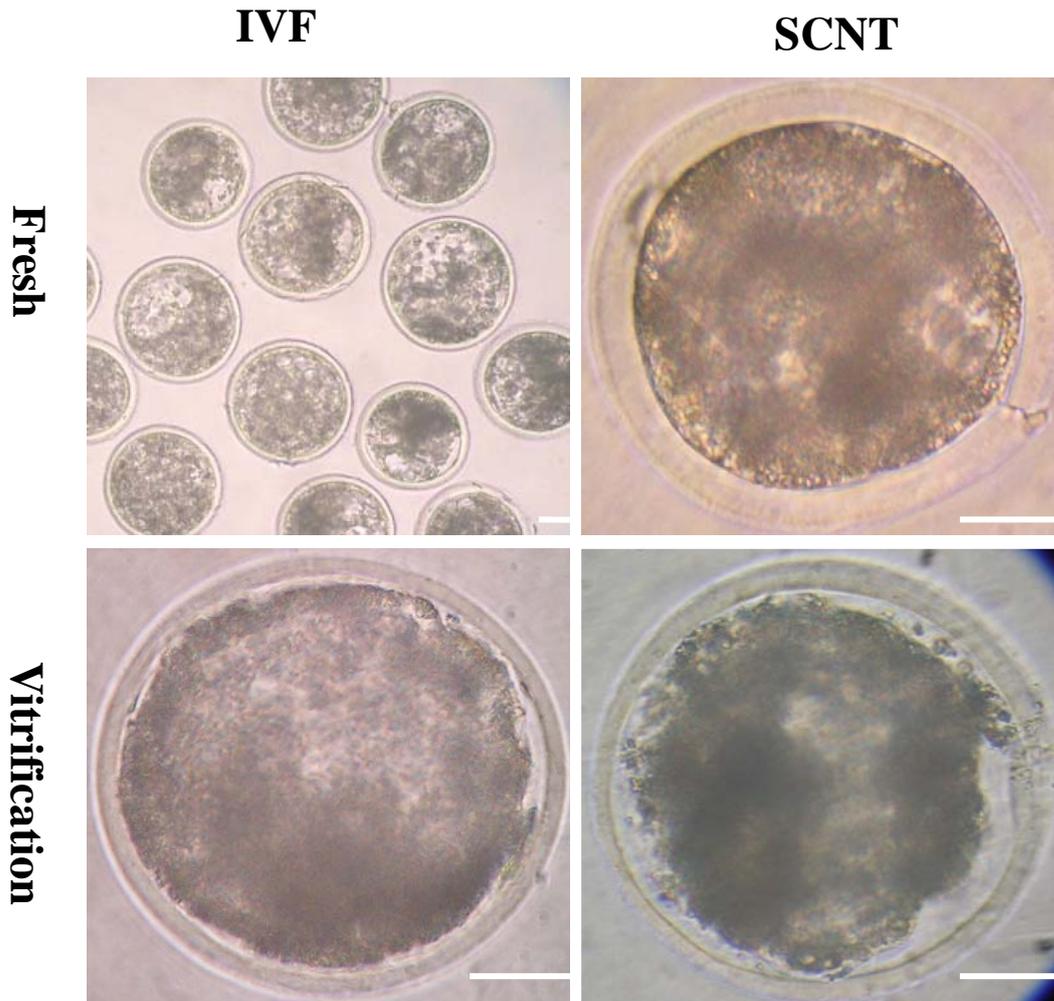


图 3—3 不同冷冻方法冷冻的体外受精和克隆胚胎 标尺=20μm

3.3.1 IVF、SCNT 囊胚冷冻效率比较

本实验中, SCNT 囊胚的存活率要低于 IVF 囊胚 (表 3-1), 这可能与它们在透明带完整性的差异有关。透明带在维持胚胎完整性, 特别是在冷冻解冻过程中发生的脱水、皱缩、再充水过程中具有重要的调节作用 (Magli 等, 2006)。Zheng 等 (2005) 研究表明, 取样后的胚胎冷冻解冻后, 靠近透明带孔洞的卵裂球更趋向于衰退, 并指出这可能是因为在解冻时其充水速度过快。SCNT 胚胎透明带上的孔洞通常与取样胚胎的相似, 而 IVF 胚胎具有完整的透明带, 因而 IVF 胚胎比 SCNT 胚胎有更好的透明带完整性, 这可能是解释试验 1 结果的一个重要原因。另外, 有研究人员认为, 与体外受精胚胎相比, SCNT 胚胎较低的囊胚细胞数, 也是它们对冷冻-解冻更为敏感的原因之一 (Nguyen 等, 2000)。

表 3-1 也说明, 牛 IVF 囊胚、SCNT 囊胚采用 OPS 法冷冻后的存活率均显著性高于常规冷冻法, 说明玻璃化冷冻法较适应用体外胚胎的冷冻保存。OPS 玻璃化冷冻法有许多重要特点, 比如降温速度快 ($20000^{\circ}\text{C}/\text{min}$)、胚胎与高含量抗冻保护剂接触的时间短 ($<30\text{ s}$), 可能是造成上述结果的重要原因。

3.3.2 冷冻保存对 IVF、SCNT 囊胚中 ATP 含量的影响

如表 3-2 所示, 本实验中新鲜 IVF 囊胚 ATP 含量为 $0.74\pm 0.05\text{ pmol}$, 与 Rieger 等 (1997) 所报道的 0.75 pmol 相似。采用常规冷冻法冷冻保存斑马鱼卵母细胞 (Guan 等, 2008) 和卵泡 (Tsai 等, 2009)、采用玻璃化冷冻人 (Manipalviratn 等, 2008) 和兔 (Salveti 等, 2010) 卵母细胞时均发现, 冷冻后 ATP 含量均显著性降低。本研究的结果也显示, IVF、SCNT 囊胚常规冷冻、玻璃化冷冻之后, ATP 含量均显著性低。这都说明, 冷冻保存显著降低了卵母细胞、胚胎中的 ATP 含量。有研究表明, 常规冷冻 (Ahn et al., 2002)、玻璃化冷冻 (Zhao et al., 2009) 均能引起胚胎中线粒体膜电位的变化, 而线粒体膜电位是反映线粒体功能的主要指标 (Xu et al., 2003), 这可能是解释常规冷冻或玻璃化冷冻后 IVF 囊胚、SCNT 囊胚 ATP 含量降低的一个原因。

在常规冷冻组和玻璃化冷冻组中, 相对于 IVF、ICSI 囊胚而言, SCNT 囊胚 ATP 含量均最低, 这可能是因为 SCNT 囊胚中细胞数较少的缘故。该现象在一定程度上可以解释 SCNT 囊胚移植妊娠率不高的原因。

对于每一种体外生产胚胎而言 (IVF, SCNT), 玻璃化冷冻组 ATP 含量比常规冷冻组高 (图 3-1), 这与 Salvetti 等 (2010) 在兔卵母细胞上的研究室相一致的。这说明, 玻璃化冷冻对牛体外生产囊胚的能量合成与代谢影响较小, 从一个方面证明了玻璃化冷

冻较适宜于牛体外生产囊胚的保存。

3.3.3 冷冻保存对 IVF、SCNT 囊胚中 ROS 水平的影响

如表3所示，在常规冷冻组和玻璃化冷冻组中，SCNT囊胚ROS含量均显著低于IVF囊胚，这可能与这二种囊胚细胞数不同、生产方法不同有关。

本实验结果表明，玻璃化冷冻会引起IVF、SCNT囊胚中ROS含量的提高，这与Somfai等（2007）、Gupta等（2010）在猪卵母细胞上的研究相一致。赵学明等（2009）、闫长亮等（2010）研究表明，玻璃化冷冻会引起小鼠2-PN原核胚、卵母细胞中线粒体膜功能异常，而线粒体功能异常则会打破活性氧产生与消除的平衡，进而造成冷冻细胞中活性氧水平的升高。这可能是解释上述结果的一个原因。

Ahn等（2002）以1,2-丙二醇为冷冻液、采用常规冷冻方法冷冻小鼠2-cell胚胎时发现，冷冻2-cell胚胎解冻后H₂O₂含量升高。与此不同的是，本实验结果表明，常规冷冻IVF、SCNT囊胚解冻后，IVF、SCNT囊胚中ROS含量较新鲜IVF、SCNT囊胚低。造成该差别的原因可能是所采用的常规冷冻液、解冻液、冷冻程序、胚胎所处阶段不同，具体深层次原因还需要进一步研究。

表3-3说明，无论采用玻璃化冷冻，还是采用常规法冷冻，都会引起IVF囊胚、SCNT囊胚中ROS含量的显著变化，从而对胚胎的发育潜力造成影响。

结论

1. 玻璃化冷冻和常规冷冻均显著影响牛 IVF 囊胚、SCNT 囊胚中 ATP 含量和 ROS 水平。
2. 玻璃化冷冻较适用于牛 SCNT 囊胚的冷冻保存。

第四章 马-牛异种克隆胚胎线粒体遗传分析

摘要: 本试验研究了手工克隆和显微注射方法对马-牛异种克隆效率的影响, 利用实时荧光定量 RT-PCR 方法检测马-牛异种克隆胚胎不同发育阶段线粒体编码基因细胞色素 B 的转录水平。结果表明: (1) 手工克隆方法克隆马-牛异种重构胚融合率 (95.12%)、卵裂率 (97.07%) 显著高于显微注射法的融合率 (70.25%) 和卵裂率 (85.21%), 但两者之间的囊胚率差异不显著 ($2.64\% \pm 1.68$ vs $2.36\% \pm 1.59$); (2) 供体马 CYBT 基因的表达水平在 1-细胞期的重构胚中表达量最高, 而在囊胚期, 却没有检测到该基因的转录本。牛 CYBT 基因, 在 1-细胞期到 8-细胞期, 其表达量逐渐下降, 而在 16-细胞期的异种克隆胚中, 该基因的表达量急剧升高到最高值, 较 1-细胞期增加了 11 倍, 随后表达水平锐减到囊胚期降低为起始水平的 2 倍。

前言

线粒体是动物细胞质中重要细胞器, 是真核细胞的“能量工厂”, 为动物细胞提供生命活动所需的能量 (卢因等, 2009), 如纺锤体的形成、染色体的分离、以及胚胎呼吸链的维持等。同时, 线粒体还能为胚胎卵裂球的分裂、囊胚腔的形成和囊胚的孵化所需要的能量。

线粒体是动物细胞中除细胞核以外唯一携带自己遗传物质的细胞器, 其遗传物质 DNA (mtDNA), 不仅编码 13mRNAs、22tRNAs 和两种 rRNA, 同时在细胞核编码的转录因子的作用下调控 mtDNA 的复制和转录 (Smith 和 Murphy, 2004)。因此, 哺乳动物细胞质线粒体遗传和细胞核遗传之间相互协调不仅对细胞发育, 而且对线粒体的结构和功能都具有至关重要的作用。

动物在精子和卵子受精繁殖模式下, mtDNA 来源于卵母细胞质, 因为在受精时精子几乎不携带 mtDNA (卢因, 2005; Smith 和 Murphy, 2004)。而目前利用体细胞克隆繁殖动物时, 主要移核方法是将整个供体细胞 (包括细胞质和细胞核) 注入受体卵母细胞质中, 与受体卵母细胞融合。因此体细胞核移植在导入供体核的同时, 必然同时将供体细胞质及其中的线粒体导入受体卵母细胞, 这样克隆重构胚胎中就同时存在供体和受体两种来源的线粒体。研究表明, 在胚胎细胞克隆小鼠胚胎的各个发育阶段、胎儿和克隆后代个体中都存在供体细胞 mtDNA (Meirelles 和 Smith, 1997, 1998), 胎儿和成年

体细胞克隆牛胚胎及后代中也同样存在供体细胞 mtDNA (Meirelles 等, 2001; Steiborn 等, 2000; Takeda 等, 2003)。

因此, 研究供体细胞来源和受体细胞来源的 mtDNA 在克隆重构胚中存在比例、存在形式, 以及两种 mtDNA 正常功能的发挥对研究影响克隆胚胎发育影响因素、提高克隆动物的效率具有重要意义。而异种体细胞克隆是研究克隆胚胎和克隆动物供体细胞和受体卵母细胞线粒体正常功能的有效途径。本试验利用实时荧光定量 RT-PCR 方法检测马-牛异种克隆胚胎不同发育阶段线粒体编码基因细胞色素 B 的转录水平, 以研究线粒体遗传机制, 以期为提高克隆的效率以及克隆技术在拯救濒危动物中的应用提供研究基础材料和技术支撑。

4.1 试验材料与试验方法

4.1.1 试剂与仪器设备

4.1.1.1 主要仪器设备

荧光定量 PCR 仪 (美国, BIO-RAD iQ5)

DY-501B 型电泳仪(上海琪特分析仪器有限公司)

凝胶成像系统(上海天能科技有限公司, GIS-2008)

其余仪器设备同第二章。

4.1.2 主要试剂: 同第二章

4.1.3 试验方法

4.1.3.1 马胎儿成纤维细胞培养建系

A. 原代培养

组织块贴壁法:

(1) 采样: 剖腹取出的 40 天日龄胎儿, 用含 2% 双抗的 PBS 清洗 2~3 遍, 运回实验室。

(2) 处理: 胎儿置于培养皿内, 酒精浸泡清洗 2-3 次, PBS 漂洗 2~3 次, 用眼科剪将组织块剪切成碎沫。

(3) 铺瓶: 将组织碎沫移至培养瓶底壁并分散均匀, 倒置培养瓶, 旋紧瓶盖倒置于 37.5℃ CO₂ 培养箱中 6~8h。

(4) 培养: 加入培养液 (含 20% FBS 的 DMEM 培养基), 轻轻翻转培养瓶, 让培养液

浸润组织块,置 37.5℃ 5% CO₂ 培养箱培养。

(5) 传代: 当有一定量成纤维细胞爬出,用 0.25%胰蛋白酶(0.02%EDTA)溶液消化,传至新的培养瓶,加培养液培养,隔天换液。

酶消化法:

(1) 采样: 剖腹取出的 40 天日龄胎儿,用含 2%双抗的 PBS 清洗 2-3 遍,运回实验室。

(2) 处理: 胎儿置于培养皿内,酒精浸泡清洗 2-3 次,PBS 漂洗 2~3 次,用眼科剪将组织块剪切成碎沫。切碎处理: 胎儿置于培养皿内,75%乙醇浸泡清洗 2-3s,PBS 漂洗 2~3 次,用眼科剪去除胎儿头、四肢和内脏,将胎儿皮肤(主要是背部皮肤)组织块剪切成碎块(0.5 mm~1mm 大小)。

(3) 将组织碎沫装入 15mL 离心管,加入 10mL0.25%胰蛋白酶(0.02%EDTA),水浴 38℃ 振荡消化 10 分钟,静止 3 分钟,吸取 3 mL 上清至新的离心管,加等体积培养液(含 10%FBS 的 DMEM 培养基)终止消化,重复 5 次左右,收集终止的消化液,离心机离心(800~1000 r/m×5mins),去上清,加入培养液(含 20%FBS 的 DMEM 培养基)重悬沉淀,接种至培养瓶,加培养液,37.5℃ 5% CO₂ 培养箱培养。

B. 继代培养

(1) 传代: 细胞生长至铺满瓶底 90%,0.25%胰蛋白酶(0.02%EDTA)溶液消化,按 1:2 或 1:3 的比例分瓶培养。

(2) 冻存: 细胞生长至铺满瓶底 90%左右,用 0.25%胰蛋白酶(0.02%EDTA)溶液消化,离心机离心(800~1000 r/m×5mins),弃上清液,加入冻存液(血清: DMSO),轻轻吹打令细胞重悬,混匀后调整细胞密度为 $(3\sim6) \times 10^6$ 个/mL,分装至标记的冻存管,放入冻存盒,置-80℃冰箱中过夜后置液氮长期保存。

(3) 复苏: 将冻存管从液氮中取出,迅速投入 40℃水浴中,不停地晃动小冰团融化至黄豆粒大小时,取出冻存管放入超净工作台内,加入培养液轻轻吹打混匀,离心机离心(800~1000 r/m×5mins),弃上清液,加入培养液(含 10%FBS 的 DMEM 培养基)重悬至培养瓶,置 37℃,5% CO₂ 培养箱培养。

4.1.3.2 显微操作针的制备: 同第二章

4.1.3.3 供体细胞的准备: 同第二章

4.1.3.4 卵母细胞的收集和体外成熟培养: 同第二章

4.1.3.5 卵母细胞的去核: 同第二章

4.1.3.6 重构胚胎的构建、激活与体外培养：同第二章

4.1.3.7 特异性引物、探针的设计

参考 GenBank 中马、牛 GAPDH 和细胞色素 B 基因序列，设计特异性扩增引物。

引物名称	引物序列	片断大小
cattle-CYTB (bp493)	5'-TGAGGCGGATTCTCAGTAGACA-3'	474 bp
cattle-CYTB (bp967C)	5'-ATTGGCTGAGTGGTCGGAATA-3'	
horse-CYTB(bp1011)	5'-AATCGGTGGACAGCCAGTG-3'	105 bp
<i>horse-CYTB(bp1116C)</i>	5'-GATGGTGCTTGCGAGTGGT-3'	
cattle-GAPDH(bp394)	5'-GGCGTGAACCACGAGAAGTA-3'	342 bp
cattle-GAPDH(bp736C)	5'-GGCAGGTCAGATCCACAACA-3'	
horse-GAPDH(bp288)	5'-TTGTGGAGTCCACTGGTGTCTT-3'	261 bp
horse-GAPDH(bp549C)	5'-GTGATGGCATGCACTGTGGT-3'	

4.1.3.8 异种克隆胚胎的收集及 RNA 的提取

分别收集 1-细胞期、2-细胞期、4-细胞期、8-细胞期、16-细胞期、囊胚等各时期克隆胚胎，采用 PureLink Viral RNA Kits 进行 RNA 的提取，作定量 PCR 模板。

4.1.3.9 反转录

(1) 取一灭菌的无 RNA 酶的 eppendorf 管,每个样本加入如下组分得到 mix 1。

组分	体积
Up to 5 μ g total RNA	5 μ l
Primer(50uM oligio(dt)	1 μ l
10mM dNTP Mix	1 μ l
DEPC-treated water	3 μ l
Total	10 μ l

(2) 把 mix1 65℃温浴 5 分钟，然后立即放冰 2 分钟。

(3) 在 mix1 里加入如下成分。得到 mix2 共 20 μ l 体系。

组分	体积
10xRT butter	2 μ l
25 mM 镁离子	4 μ l
0.1M dTT	2 μ l
RNaseout 40U/ μ l	1 μ l
SuperScrip III RT (200U/ μ l)	1 μ l
Mix1	10 μ l
Total	20 μ l

(4) 50℃处理 50 分钟。

(5) 85℃处理 5 分钟。立即放置到冰上。

(6) 在每管 mix2 中加入 1 μ l 的 RNase H ， 37℃处理 20 分钟。

(7) 所得到的 cDNA 可以保存到-20℃保存半年。

4. 1. 3. 10 PCR 扩增

PCR 体系中各组分的体积:

组分	体积
超纯水	17.5ul
10*pcr buffer	2.5ul
镁离子(25mM)	2ul
dNTPs(25mM)	0.2 ul
上游引物 (10uM)	0.5ul
sybr(50x)	0.5ul
下游引物 (10uM)	0.5ul
Taq 酶 (5u/ul)	0.3ul
模板	1.0ul
总体系	25ul

PCR 反应条件:

95℃, 2min 然后 95℃, 10S; 60℃, 30S; 70℃, 45S 循环 40 次, 最后 68℃延伸 10 min。

4.1.3.11 PCR 产物的回收

- (1) 手术刀片割取含有所要回收 DNA 的琼脂块，放入 1.5ml 的离心管中。
- (2) 每 100mg 的琼脂糖凝胶，加入 400ul Binding Buffer, 然后放入 50~60℃ 水浴中 10min, 使胶完全融化。
- (3) 将彻底融化的胶溶液转移到套放于 2ml 收集管的 UNIQ-10 柱子中，室温下放置 2 min。8000rpm 离心 1 min。
- (4) 取下 UNIQ-10 柱子，将收集管中的废液倒掉，再把 UNIQ-10 柱子放回收集管中，加入 500uL Wash Solution，10000rpm 离心 30S。
- (5) 重复步骤上述一次。
- (6) 取下 UNIQ-10 柱子，倒掉收集管中废液，再把 UNIQ-10 柱子放回收集管中，10000rpm 离心 15S。
- (7) 将 UNIQ-10 柱放入一根新的洁净 1.5ml 离心管中，在柱子的膜中央加 30ul Elution Buffer, 室温下或 37℃ 放置 2 min。
- (8) 10000rpm 离心 1min，离心管中的上清液体即为回收的 DNA 片段。

4.1.3.12 载体构建

将回收的 PCR 产物用 invitrogen 公司载体连接试剂盒进行连接，在 0.2ml 的 PCR 管中，16℃ 连接，过夜。连接体系如下：

成份	用量
PCR 回收产物	4μL
pCR®2.1-TOPO®	1μL
Vector	1μL
Ligation Mix	1μL
总体系	6μL

4.1.3.13 转化

- (1) 取出 1 管冻存的 DH5α(200ul/tube)感受态细胞，冰中溶解。
- (2) 取 5ul 连接产物加入菌液中，轻轻混匀，冰浴处理 30 min。
- (3) 42℃ 热激 30S，然后冰浴 2 min。
- (4) 加入 500ul 无抗性 LB 培养基在摇床中 37℃ 200rpm 培养 45 min。

(5) 在超净台中取 200ul 预转化的菌液涂布至含 100ug/ml 氨苄的平板上。将平板放置在恒温培养箱中 37℃ 倒置培养过夜，至克隆长出。

(6) 从每块平板上挑取 3 个克隆接种于 3ml 100ug/ml 氨苄的 LB 培养基中，37℃ 摇床过夜培养。

4.1.3.14 提取质粒

用 Axygen 质粒小量提取试剂盒抽提,提取过程如下:

- (1) 取 2 mL 在 LB 培养基中培养过夜的菌液，12000g 离心 1 分钟，弃尽上清。
- (2) 用 250 μ L 已加入 RNase A 的 Buffer S1 悬浮细菌沉淀，悬浮需均匀，不应留有小的。
- (3) 加入 250 μ L Buffer S2，温和并充分地上下翻转混合 4~6 次均匀使菌体充分裂解。
- (4) 加入 400 μ L Buffer S3，温和并充分地上下翻转混合 6~8 次，12000g 离心 10 分钟。
- (5) 吸取离心上清并转移到 DNA 制备管（置于 2 mL 离心管中），12000g 离心 1 分钟。
- (6) 制备管放回离心管，加 500 μ L Buffer W1，12000g 离心 1 分钟，弃滤液。
- (7) 把制备管放回离心管，加 700 μ L Buffer W2，12000g 离心 1 分钟，弃滤液；同样方法用 700 μ L Buffer W2 洗涤一次。弃滤液。
- (8) 制备管放回 2 mL 离心管中，12000g 离心 1 分钟。
- (9) 将制备管移入新的 1.5 mL 离心管中，在 DNA 制备膜正中央加 40 μ L 水或 Eluent，室温静置 1 分钟。12000g 离心 1 分钟。
- (10) 测序鉴定
- (11) 把原液稀释 1/25 来测定 OD 值

4.2 试验结果

4.2.1 马胎儿成纤维细胞系的建立

剪取新疆伊犁马的胎儿皮肤组织块，采用组织块贴壁法，建立马胎儿成纤维细胞系。组织铺于细胞培养瓶底面后 4 天，其边缘有少量的成纤维细胞长出，呈梭状（图 4-1）；随后细胞呈放射状向周围扩展，形成细胞晕；典型的胎儿成纤维细胞呈簇状生长，有较强的分裂能力，生长速度快，细胞形态多为梭形，细胞核位于细胞的中间部分，核仁清

晰，立体感较强，折光性好（图 4-2）。6-7 天后，细胞长满汇片，部分细胞冷冻保存，部分细胞进行传代培养，并采用血清饥饿方法同期处理细胞，用于马-牛异种克隆胚胎的制备研究。

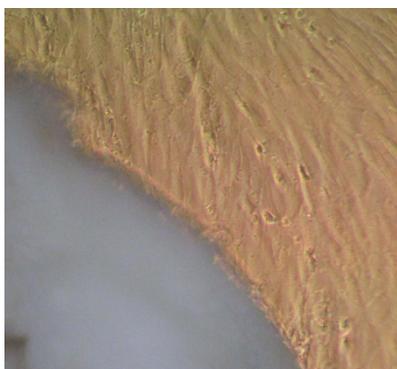


图 4-1 原代马胎儿成纤维细胞
Fig4-1 Primary ear fibroblast cell lines of equine fetus

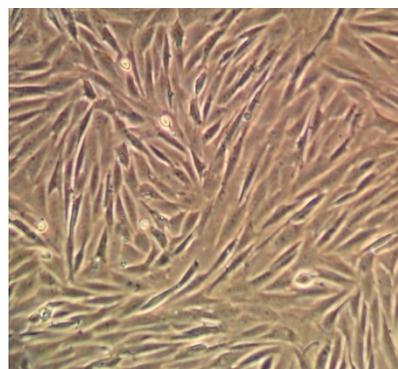


图 4-2 马胎儿成纤维细胞系
Fig4-2 Ear fibroblast cell lines of equine fetus

4.2.2 马-牛异种克隆胚胎的制备

已建立的马胎儿成纤维细胞经过血清饥饿处理后做核供体，体外成熟培养的牛卵母细胞做受体，进行马-牛异种克隆胚胎的构建。采用手工克隆方法获得异种克隆胚胎 8 枚，显微注射方法获得异种克隆胚 6 枚，共制备马-牛克隆胚胎 14 枚。

分别采用手工克隆与显微注射两种核移植方法构建重构胚胎，结果表明，手工克隆方法的融合率、卵裂率显著高于显微注射法（95.12% VS 70.25%；97.07% VS 85.21%），而囊胚率并没有显著差异。

表 4-1 不同核移植方法对核移植效率的影响

Tab4-1 Effects of different SCNT methods on efficiency of iSCNT

核移植方法	重构胚数	融合率	卵裂率	囊胚率
手工克隆				
Hand-made clone	341	95.12%±2.15 ^a	97.07%±1.32 ^a	2.64%±1.68 ^a
显微注射				
Microinjection	286	70.25%±5.08 ^b	85.21%±4.27 ^b	2.36%±1.59 ^a

注：a、b 表示组间有显著差异（ $p < 0.05$ ） a,b Within columns, values with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

另外，还比较了手工克隆方法制备的马-牛异种克隆胚与牛同种克隆胚的体外发育

情况，统计数据说明，融合率没有显著差异（95.12% VS 93.46%），而卵裂率和囊胚率均呈现显著差异（97.07% VS 95.25%； 2.64% VS 35.14%）。

表 4-2 马-牛异种克隆效率与牛的同种克隆胚胎发育率比较
 Tab4-2 The development of equine—bovine & bovine--bovine cloned embryos

克隆胚胎	重构 胚数	融合	卵裂率	囊胚率
马-牛 Equine-bovine	341	95.12%±2.15 ^a	97.07%±1.32 ^a	2.64%±1.68 ^a
牛-牛 Bovine-bovine	325	93.46%±1.72 ^a	95.25%±2.59 ^b	35.14%±3.36 ^b

注：a、b 表示组间有显著差异 (p<0.05) a,b Within columns, values with different letters are significantly different (P<0.05).

4. 2. 3 标准曲线的建立

对构建的标准品按梯度稀释至 10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³，以起始模板数的对数作横轴，Ct 值为纵轴作回归曲线，分别构建马、牛细胞色素 B 基因 (CYBT) 和马、牛 GAPDH 基因的标准曲线（见图 3-6）。

如图 4-3 所示，牛 GAPDH 基因表达量在 10³~10⁷ 范围内，与 Ct 值之间呈良好的线性关系，标准曲线的斜率为-3.395，截距为 37，直线回归方程的相关系数 R² 值为 0.999；从扩增动力学曲线图中可见扩出的 S 型荧光曲线。

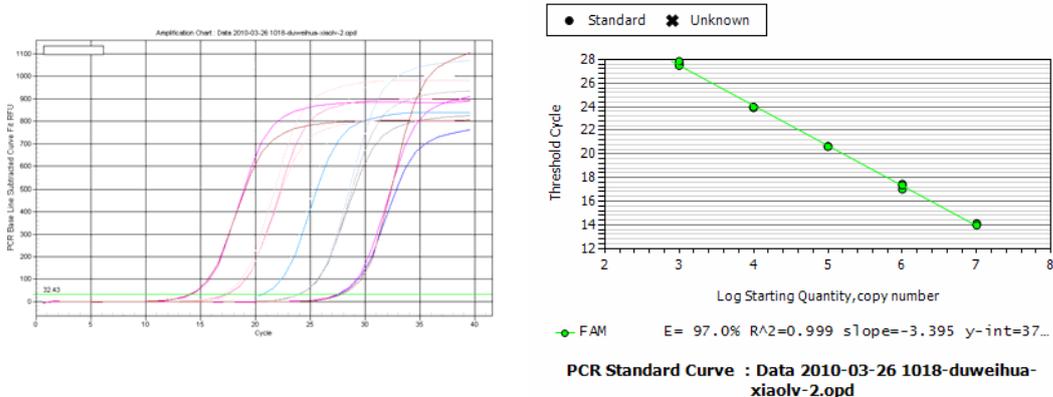


图 4-3 牛 GAPDH 基因的标准曲线
 左图为扩增曲线，右图为标准曲线

Fig4-3 Regression lines of standards with log copy numbers of bovine GAPDH gene

如图 4 所示，牛细胞色素 B 基因表达量在 $10^3 \sim 10^7$ 范围内，与 Ct 值之间线性关系良好，标准曲线的斜率为-3.478，截距为 38，直线回归方程的相关系数 R^2 值为 0.999；扩增曲线图为 S 型。

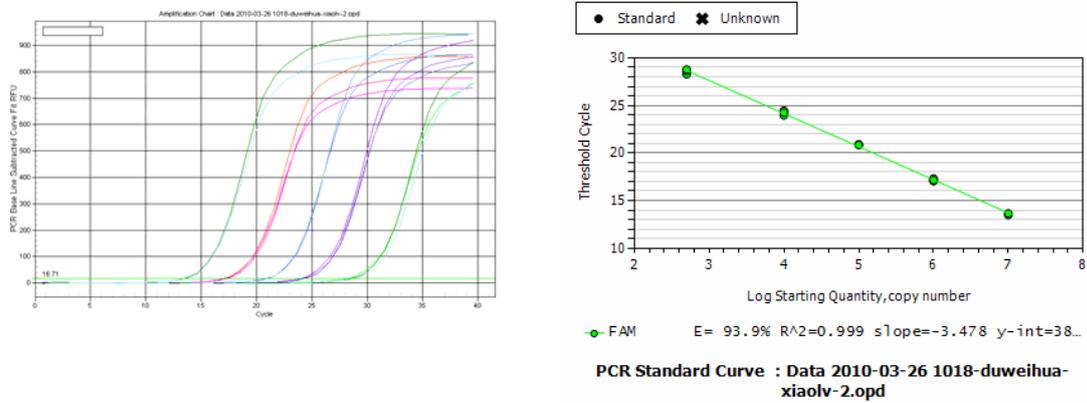


图 4-4 牛细胞色素 B 基因的标准曲线

上图为扩增曲线，下图为标准曲线

Fig4-4 Regression lines of standards with log copy numbers of bovine CYBT gene

如图 4-5 所示，马 GAPDH 基因表达量在 $10^3 \sim 10^7$ 范围内，与 Ct 值之间呈良好的线性关系，标准曲线的斜率为-3.515，截距为 39，直线回归方程的相关系数 R^2 值为 0.999；能扩增出 S 型荧光曲线。

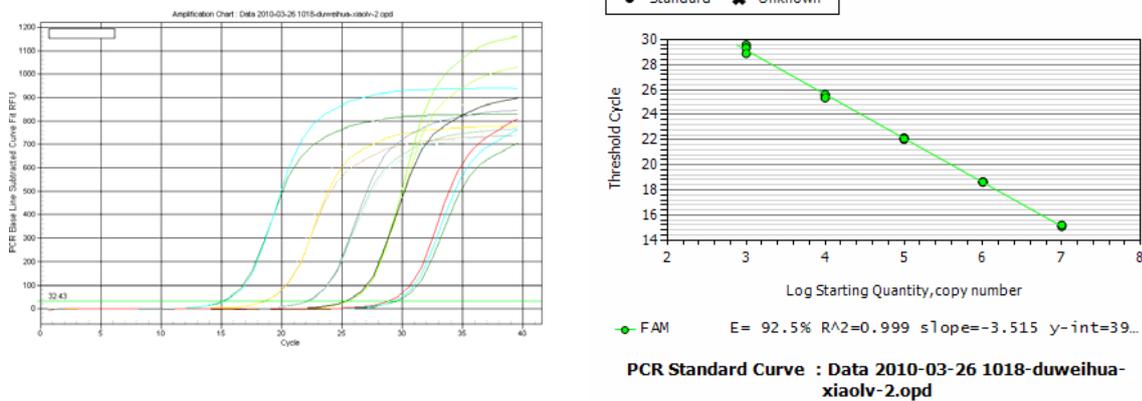


图 4-5 马 GAPDH 基因的标准曲线

上图为扩增曲线，下图为标准曲线

Fig4-5 Regression lines of standards with log copy numbers of equine GAPDH gene

如图 4-6 所示，马细胞色素 B 基因表达量在 $10^3 \sim 10^7$ 范围内，与 Ct 值之间呈良好的线性关系，标准曲线的斜率为-3.164，截距为 42，直线回归方程的相关系数 R^2 值为 0.997；扩增曲线图中可见扩出的 S 型荧光曲线。

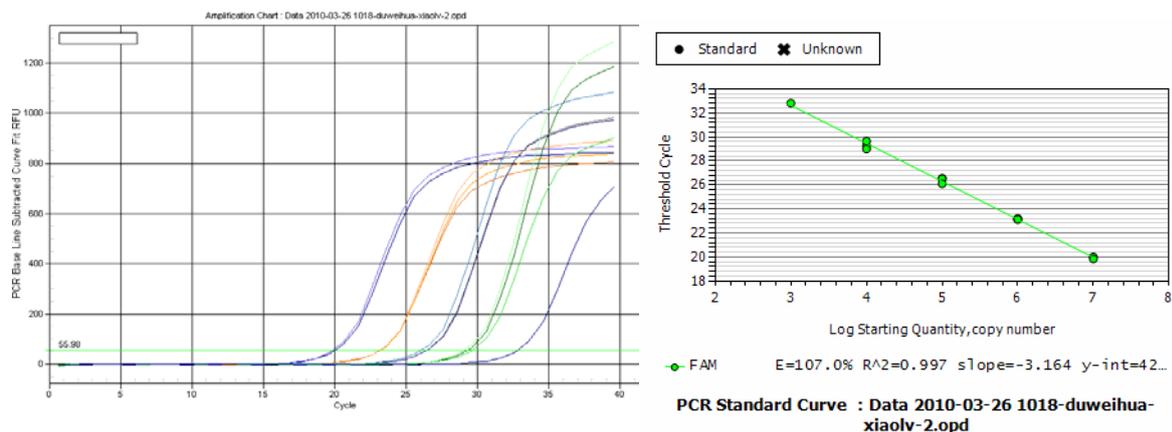


图 4-6 马细胞色素 B 基因的标准曲线

上图为扩增曲线，下图为标准曲线

Fig4-6 Regression lines of standards with log copy numbers of equine CYBT gene

4.2.4 马-牛异种克隆胚胎中线粒体遗传分析

分别收集位于 1-细胞、2-细胞、4-细胞、8-细胞、16 细胞和囊胚期的马-牛异种克隆，并提取其总 RNA，以 GAPDH 基因为参照，利用 SYBGREEN 方法实时检测马、牛细胞色素 B 基因的表达水平。由溶解曲线（图 4-7）可知，各基因定量 PCR 检测所用的引物特异性强，溶解曲线峰单一，重复性好，测试结果稳定，可靠。

根据荧光检测获得的 Ct 值（表 4-3，表 4-4），绘制马、牛细胞色素 B 基因在各发育阶段胚胎中的表达变化趋势图（图 4-8）。可见，供体马的 CYBT 基因的表达水平在 1-细胞期的重构胚中表达量最高，而在囊胚期，却没有检测到该基因的转录本；在整个发育过程中，其表达水平出现 2 次波峰，分别在 4-细胞期和 16-细胞期，但均低于 1-细胞重构胚，因此从总体上说，马 CYBT 基因的表达呈现下降趋势。

而牛 CYBT 基因，在 1-细胞期到 8-细胞期，其表达量逐渐下降，而在 16-细胞期的异种克隆胚中，该基因的表达量急剧升高到最高值，较 1-细胞期增加了 11 倍，随后表达水平锐减到囊胚期降低为起始水平的 2 倍。

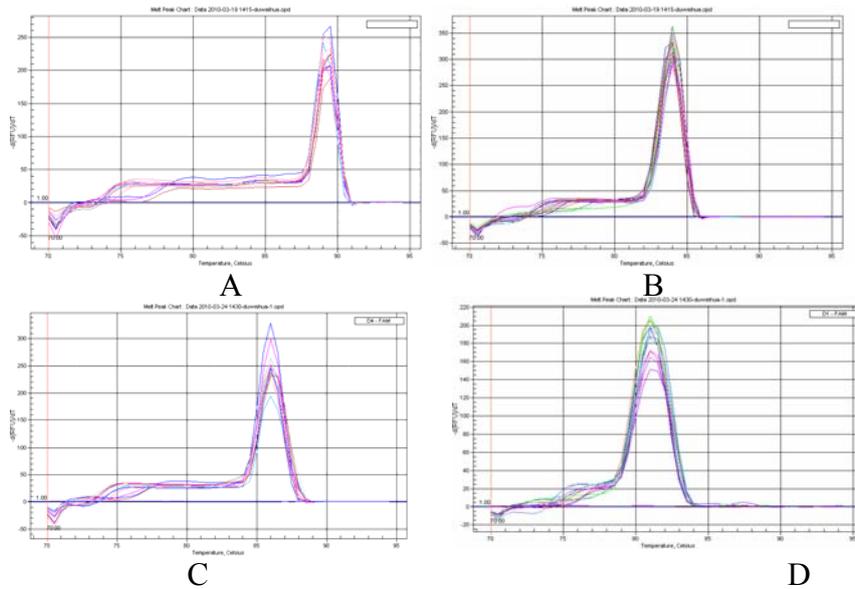


图4-7 马-牛异种克隆胚胎中4个基因的溶解曲线图

Fig4-7 Melting diagram of four genes in equine-bovine cloned embryos
A 为牛 GAPDH 基因的溶解曲线, B 为牛细胞色素 B 基因, C 为马 GAPDH 基因, D 为马细胞色素 B 基因

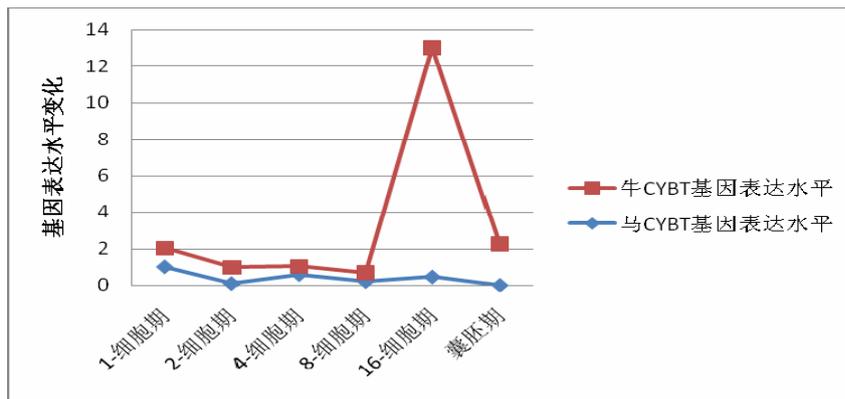


图4-8 马-牛异种克隆胚胎中马、牛细胞色素B基因的表达变化趋势

Fig4-8 Trends of bovine and equine CYBT gene in equine-bovine cloned embryos

表4-3 马-牛异种克隆胚胎中牛细胞色素B基因的相对定量结果

Tab 4-3 Quantitative results of bovine CYBT gene in equine-bovine cloned embryos

发育阶段	CYBT	GAPDH	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
1-细胞期	20.64	26.773333333	-6.133333333	0	1
2-细胞期	20.425	26.76	-6.335	-0.2017	0.8695
4-细胞期	20.29	27.776666667	-7.351666667	-1.2183	0.4298
8-细胞期	20.703333333	27.963333333	-7.26	-1.1267	0.458
16-细胞期	21.443333333	31.226666667	-9.783333334	3.65	12.5533
囊胚期	22.813333333	27.783333333	-4.97	1.1633	2.2397

表4-4 马-牛异种克隆胚胎马细胞色素B基因的相对定量结果
 Tab 4-3 Quantitative results of equine CYBT gene in equine-bovine cloned embryos

发育阶段	CYBT	GAPDH	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	2- $\Delta\Delta$ CT
1-细胞期	30.37	30.896666667	-0.526666667	0	1
2-细胞期	29.35	33.276666667	-3.926666667	-3.4	0.0947
4-细胞期	30.55	31.865	-1.315	-0.7883	0.579
8-细胞期	29.44	32.276666667	-2.836666667	-2.31	0.2017
16-细胞期	31.396666667	33.075	-1.678333333	-1.1516	0.4501
囊胚期	-	37.13	-	0	

4.3 讨论

动物异种克隆是拯救濒危物种、优质高产家畜的保种和胚胎干细胞研究中具有重要的技术手段，然而胚胎发育率低仍是异种克隆的主要障碍。线粒体是细胞内的半自主性细胞器，具有自己的基因组和转录机制。然而，在转录过程中需要由核编码的蛋白质参与，由线粒体基因组和核基因组共同控制，因此对于异种克隆胚胎，供体核与线粒体的相容性和互作性是影响其体外发育率的重要因素（Brenner 等，2004；St John 等，2004）。研究异种克隆胚胎中线粒体的组成和线粒体相关基因的表达变化规律，分析线粒体的遗传机制对于提高异种克隆胚胎的体外发育效率和异种克隆动物的整体效率具有至关重要的作用。

Barritt 等(2002 年)证明，线粒体拷贝数在卵母细胞中大约含有 10^5 数量级；在体细胞中，根据细胞种类的不同大约在 $10^2 \sim 10^3$ 之间（Inoue 等，2004）。本研究室前期研究也表明，1-细胞期的马-牛异种克隆胚胎中，马的 mtDNA 拷贝数为 4.43×10^2 ，牛的 mtDNA 拷贝数为 2.21×10^5 ，后者是前者的 498 倍（沈彦军，2009）。在此基础上，本研究对线粒体相关基因细胞色素 B 在马-牛异种克隆胚胎中的表达水平进行了检测。结果发现，供体马的 CYBT 基因的表达水平在 1-细胞期的重构胚中表达量最高，而在囊胚期，却没有检测到该基因的转录本；在整个发育过程中，其表达水平分别在 4-细胞期和 16-细胞期出现 2 个波峰，但均低于 1-细胞重构胚中的表达量，因此从总体上说，马 CYBT 基因的表达呈现下降趋势。推测，虽然牛卵母细胞能支持马体细胞核发育到囊胚，即完成异种克隆胚的早期发育，但马线粒体编码的基因转录却是下调的，直到不表达或痕量表达而检测不到，所以异种克隆囊胚中占主导地位的线粒体来自于牛卵母细胞。这与 Evans

(1999年)和 Meirelles (2001年)认为供体细胞的线粒体会随着发育进程的延续而选择性消失的结论是一致的。

对牛 CYBT 基因,在 1-细胞期到 8-细胞期,其表达量逐渐下降;相反的,马 CYBT 基因则在 4-细胞期的表达有所上调,推测核基因组主要支持马线粒体的遗传。Sha 等(2009年)在人-山羊异种克隆胚胎中检测线粒体表达发现,山羊线粒体 DNA 拷贝数也是随着胚胎的发育而逐渐降低,而人的线粒体 DNA 拷贝数却维持在原始水平;这与本研究中 16-细胞期之前的胚胎中获得的结果相符。但不同的是,牛 CYBT 基因在 16-细胞期胚胎中的表达量急剧升高到最高值,较 1-细胞期增加了 11 倍,随后表达水平锐减,到囊胚期降低为起始水平的 2 倍。

胚胎体外发育的关键是胚胎基因组(embryo genome activation, EGA)的激活(Latham 等,2005),此时会发生来源于卵母细胞的母方基因组到胚胎基因组的母胎转换(maternal embryonic transition, MET),之后将由胚胎基因组来调控胚胎的发育过程。对异种克隆胚胎,其成功发育取决于其 EGA 需要的、来源于供体和受体的蛋白因子间相互协调合作。EGA 发生时间具有种属特异性,小鼠为 2-细胞期、人为 4~8-细胞期、马、牛为 8~16-细胞期(Brunet-Simon 等,2001)。胚胎细胞分化前,线粒体的复制和转录具有不同步性(Cummins 等,2004)。对小鼠胚胎,线粒体在桑葚胚和囊胚期开始转录,复制则发生在囊胚期(Thundathil 等,2005)。本试验中,马和牛的线粒体在 8-细胞期均有减少,推测异种克隆胚胎在 8~16-细胞期发生 EGA。而 16-细胞期胚胎中牛 CYBT 的表达量急剧升高,说明在胚胎基因组激活后,异种克隆胚胎中牛线粒体基因的转录占据主导地位,而供体细胞的线粒体基因的转录则选择逐渐下调和消失,本试验中马 CYBT 基因在 16-细胞期胚胎中表达水平的降低也证明了这一点。

在不同物种间,mtDNA 序列存在多态性,因此异种克隆胚胎中不同来源的线粒体与胚胎细胞核之间的相容性问题较为突出。线粒体 mtDNA 编码 13 种多肽、2 种 rRNA 和 22 种 tRNA,其复制和转录所需的上千种蛋白则由核基因编码,并运输到线粒体中。线粒体的正常遗传和转录,需要其与细胞核之间的相互协调,否则将导致克隆胚胎的发育异常和克隆失败。Thundathil 等(2005年)证明,在大鼠的 mtDNA 和 ρ^0 小鼠的细胞中,线粒体呼吸链的复合体都丧失功能;影响线粒体在桑葚胚和囊胚期开始转录,从而失去为核重编程提供足够的能量的作用(Boiani 等,2004),最终导致异种克隆的失败。

因此,选择亲缘关系较近的物种进行异种克隆,其发育率和成功率相对于较远的物种要高。以牛为例,2008年 Thongphakdee 等制备的同纲的猫-牛异种克隆胚胎发育停滞

在 8-细胞期，猴子-牛的异种克隆胚胎的发育没有越过 16-细胞期(Lorthongpanich 等,2008)，人-牛异种克隆胚胎能发育到桑胚期，但囊胚率非常低(Chang 等,2003)。而以同科的羊作核供体，克隆胚的囊胚发育率高达 24.6%(Hua 等,2008)，同以同属的水牛作核供体，异种胚胎的囊胚率达 39%，与牛的同种克隆没有显著差异(Kitiyanant 等,2001)。

以上结果表明，物种间亲缘关系的远近决定了线粒体与细胞核之间的相容性，同时也影响着胚胎的发育能力。本研究中，以马作细胞核来源，而以与其亲缘关系较远的牛为线粒体的来源，导致了马-牛异种重构胚发育效率的低下，然而两者互作的机制及其中涉及的蛋白因子等具体机制还需要进一步研究，进而为马-牛异种克隆效率的提高提供技术支持。

结论

1. 手工和显微注射构建的马-牛异种克隆胚胎融合率与牛-牛同种克隆胚胎没有差异，但是囊胚率显著低于牛-牛同种克隆重构胚。
2. 马-牛异种克隆胚胎中供体细胞马线粒体编码基因细胞色素基因 mRNA 在胚胎发育阶段呈现下降趋势，在囊胚阶段痕量表达或不表达。受体卵母细胞牛线粒体编码细胞色素基因 mRNA 在在胚胎发育过程均有表达，在 16-细胞前逐渐下降，桑葚胚是 1-细胞期的 12 倍，囊胚阶段则降为起始水平的 2 倍。

第五章 全文结论

5.1 采用牛性控精液进行体外受精时，卵母细胞周围卵丘细胞部分脱除有助于提高受精效率。

5.2 受精滴体积、精子浓度适当降低，能够在保证性控精液体外受精效率的前提下，降低体外性控胚胎生产成本

5.3 手工克隆和显微注射两种克隆方法构建的克隆胚胎体外发育差异不显著。重构克隆胚胎采用 A23187+6-DMAP 激活后在 mCR1aa 中培养，能够获得较高的囊胚发育率。

5.4 种公牛克隆胚胎移植受体母牛 27 头，60 天妊检怀孕 10 头，妊娠率 37.0%，但是母牛在 70~90 天内流产 8 头（流产率 ），2 头在 140~160 天之间受体胎水过多流产屠宰。

5.5 玻璃化冷冻和常规冷冻均显著影响牛 IVF 囊胚、SCNT 囊胚中 ATP 含量和 ROS 水平。

5.6 玻璃化冷冻较适用于牛 SCNT 囊胚的冷冻保存

5.7 手工和显微注射构建的马—牛异种克隆胚胎融合率与牛—牛同种克隆胚胎没有差异，但是囊胚率显著低于牛—牛同种克隆重构胚。

5.8 马—牛异种克隆胚胎中供体细胞马线粒体编码基因细胞色素基因 mRNA 在胚胎发育阶段呈现下降趋势，在囊胚阶段痕量表达或不表达。受体卵母细胞牛线粒体编码细胞色素基因 mRNA 在在胚胎发育过程均有表达，在 16—细胞前逐渐下降，桑葚胚是 1—细胞期的 12 倍，囊胚阶段则降为起始水平的 2 倍。

致 谢

三年博士研究生生活即将过去，值此论文付梓之时，首先感谢导师王宗礼研究员三年来对我的辛勤培养和殷切教诲。导师严谨务实的治学态度、辛勤敏锐的科学洞察力、勇于进取的精神和活跃而严肃的科研思维和坦诚热情、宽以待人的品德及孜孜不倦的工作作风将永远是我学习的榜样！

本论文是在导师精心指导下完成的。从论文的选题，实验方案的设计到论文的修改和定稿的整个过程都凝聚着导师极大的心血。

在此谨向导师致以衷心的感谢和崇高的敬意！

在校学习和研究期间，在学习和生活上得到了动物科技学院各位领导和老师以及学校研究生管理处的各位领导的关怀和指导，特别是李发弟教授，莫其江付副处长的耐心帮助和鼓励，以及马友记副教授，郭姜鹏博士的帮助，使得我能够顺利完成学业。

本实验是在中国农业科学院北京畜牧兽医研究所完成的。在试验过程中得到了胚胎工程与繁殖技术研究室杜卫华副研究员、赵学明助理研究员和郝海生助理研究员，以及王栋副研究员和宋金辉等的无私帮助。以及该实验室博士研究生王帅和硕士研究生任晶晶、马腾、李海燕、王浩宇帮助。

在学习和研究期间，还得到了中国农业科学院北京畜牧兽医研究所各位领导和老师的大力支持和帮助。

再次由衷地感谢上述各位老师和同学，谢谢你们！

特别感谢我的家人在我学习和试验期间给予的无微不至关怀和无私奉献，才使我能够全身心地投入到学习和工作中去，顺利完成学业！

参考文献

1. 安晓荣, 陈永福. 体细胞克隆法生产绵羊转基因囊胚[J]. 科学通报. 2001, 46(10): 820-823+883.
2. 安晓荣, 苟克勉, 朱世恩. 卵丘细胞核移植技术生产克隆牛犊[J]. 中国科学(C辑). 2002, 32(1): 69-76.
3. 白佳桦, 关宏, 苟克勉, 等. 幼畜繁殖(JIVET)技术在性成熟前奶牛上的应用[J]. 农业生物技术学报. 2010, 18(1): 187-191.
4. 曹素英, 韩建永, 李建国. 哺乳动物体细胞克隆后生重新编程有关机理研究进展[J]. 中国畜牧兽医. 2004, 32: 33-36.
5. 陈大元, 韩之明, 刘忠华, 等. 体细胞克隆牛: 供体细胞和受体的影响[J]. 科学通报. 2003, 48(08): 768-773.
6. 陈大元, 孙青原, 刘翼珑, 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[J]. 中国科学(C辑). 1999, 29(3): 325-330.
7. 陈大元. 克隆大熊猫取得阶段性成果[J]. 中国科学院院刊. 2000, 2: 120-121.
8. 陈大元. 受精生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
9. 陈大元. 受精生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2000:389-396.
10. 戴建军, 吴华莉, 张廷宇, 等. 猪体细胞克隆胚的胚胎移植研究[J]. 上海农业学报. 2007, 23(04): 1-4.
11. 丁向彬, 王新庄, 田万强, 等. 精子不同处理方法对牛卵泡卵母细胞体外受精的影响[J]. 黄牛杂志. 2005, 31(3): 32-34.
12. 董雅娟, 柏学进, MD Varisanga, 等. 应用负压气相培养系统生产体细胞克隆牛的研究[J]. 2002, 35(8):988-994.
13. 谷亚轻, 郝青, 李拥军. 牛卵母细胞体外成熟[J]. 黑龙江动物繁殖. 2008, 16(2): 6-9.
14. 郭继彤, 安志兴, 李裕强, 等. 成年耳细胞克隆山羊(*Capra hircus*) [J]. 中国科学(C辑:生命科学). 2002, (01): 77-83.
15. 郭建来, 魏红芳. 影响牛卵母细胞体外成熟的因素[J]. 郑州牧医工程专科学校学报. 2005, (3): 176-180.
16. 韩建永, 李宁, 邱宏伟, 等. 体细胞克隆技术与我国奶牛业发展[J]. 中国农业科技导报. 2004, 6(3):9-16.

17. 胡林勇. 牛体外受精体系的优化研究[D]. 西北农林科技大学. 2008.
18. 刘成果, 等. 中国奶业发展战略研究[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
19. 刘海军, 刘灵, 冯建忠, 等. 波尔山羊胚胎克隆的研究[J]. 华北农学报. 2007, 22(04): 71-75.
20. 刘建中, 李宁, 等. 动物体细胞核移植技术的研究现状[J]. 生物技术通. 1999, 18—21.
21. 刘俊平, 张志平, 安志兴, 等. 奶牛性控胚胎体外生产的影响因素及控制措施研究[J]. 中国农学通报. 2005, 21(10): 1-5.
22. 刘云海, 等. 采用活体采卵-体外受精方法生产牛胚胎技术的研究与应用[D]. 武汉: 第十届全国动物繁殖学术研讨会论文, 2001, 11.
23. 刘忠华, 田江天, 郑重等. 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. 中国科学(C辑: 生命科学). 2007. 37(06): 634-640.
24. 卢晟盛, 吕培茹, 刘红波, 等. 广西巴马小型猪克隆胚的构建及胚胎移植[J]. 动物学杂志. 2008, 43(06): 147-153.
25. 卢因 B 等编著, 余龙、江松敏等译, 基因VIII (Gene VIII), 2005, 84—88, 科学出版社(北京),
26. 马学海. 牛体外成熟卵母细胞与性控精子体外受精的研究[D]. 新疆: 石河子大学, 2007.
27. 马云, 李芬, 张琪, 等. 影响牛卵母细胞体外成熟的因素[J]. 黄牛杂志. 2000, 26(1): 48-51.
28. 倪明, 林松涛, 韩光, 等. 获能液及精子密度对牛性控精子体外受精成功率的影响[J]. 中国奶牛. 2008, 12:30-32.
29. 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)[J]. 科学通报. 2006; 51(04): 415-419.
30. 钱云, 师蔚群, 丁家桐. 哺乳动物体外受精的研究进展[J]. 动物科学与动物医学. 2002, 17(1): 26-28.
31. 沈彦军. 马-牛异种克隆胚胎及其线粒体异质性研究[D]. 2009年.
32. 孙韬, 李裕强. 卵母细胞的体外成熟培养研究进展[J]. 草食家畜. 2003, 2(119): 30-34.
33. 吴冬生, 刘敬浩, 孙伟, 等. 不同种公牛 X/Y 精子分离效果及对体外受精能力的影响[J]. 中国奶牛. 2009, 4: 11-15.
34. 杨利国. 动物繁殖学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 331.
35. 杨素芳, 石德顺, 冯贵雪. 供体细胞培养处理方法对水牛核移植效果的影响[J]. 中国兽医学报. 2004, 24(6): 612-616.

36. 杨素芳, 石德顺, 韦精卫, 等. 哺乳动物细胞核移植目前存在的问题[J]. 动物科学与动物医学. 2004, 6:14-16.
37. 杨向中. 21 世纪中国的际遇和挑战: 治疗性克隆、人类胚胎干细胞和相关胚胎生物技术的研究与开发[J]. 世界科学. 2004, (2) 3-6.
38. 杨增明, 孙青原, 夏国良. 生殖生物学[J]. 北京: 科学出版社, 2005: 78, 81.
39. 张家新, 孟昭霞, 张向利, 等. 影响克隆牛生产效率之因素研究[J]. 中国农学通报. 2007, 23(12): 5-9.
40. 张明, 陆阳清, 卢克焕, 等. 牛分离精子对其 IVF 胚胎染色体影响的研究[J]. 中国生物工程杂志. 2006, 27(1):98-101).
41. 张忠诚. 家畜繁殖学[M]. 第四版(第三次印刷). 北京: 中国农业出版社, 2006: 84.
42. 章美玲, 章孝荣. 牛卵母细胞体外成熟的影响因素[J]. 畜牧与饲料科学. 2010, 31(5):15-17.
43. 中国奶业协会. 北京: 2010 年中国奶业统计摘要(内部资料), 2010.
44. 邹贤刚, 袁三平, 鲜建等, 转基因克隆山羊大量生产重组人的抗凝血酶Ⅲ蛋白质(rhATⅢ), 生物工程学报: 2008, 24: 117-123.
45. 朱珠, 叶绍辉. 牛卵母细胞体外成熟和体外受精技术[J]. 动物科学与动物医学. 2004, 21(2): 21-22.
46. Adler V, Yin Z, Tew KD, et al. Ronai Z. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling[J]. Oncogene. 1999; 18(45):6104-6111.
47. Ahn HJ, Sohn IP, Kwon HC, et al. Characteristics of the cell membrane fluidity, actin fibers, and mitochondrial dysfunctions of frozen-thawed two-cell mouse embryos[J]. Mol Reprod Dev. 2002; (61):466-476.
48. Alison L. Van Eenennaam. Careful risk assessment needed to evaluate transgenic fish [J]. California Agriculture. 2006; 60(3):132-139.
49. Allworth AE, Albertini DF. Meiotic maturation in cultured bovine oocytes is accompanied by remodeling of the cumulus cell cytoskeleton [J]. Dev Biol. 1993; 158:101-121.
50. Ampika Thongphakdee, Shuji Kobayashi, Kei Imai, et al. Interspecies Nuclear Transfer Embryos Reconstructed from Cat Somatic Cells and Bovine Ooplasm [J]. Journal of Reproduction and Development. 2008; 54(2):142-147.

51. Arat S, Gibbons J, Ruzicidlo SJ, et al. In vitro development of bovine nuclear transfer embryos from transgenic clonal lines of adult and fetal fibroblast cells of the same genotype [J]. *Biol Reprod.* 2002; 66:1768–1774.
52. Arat S, Ruzicidlo SJ, Gibbons J, et al. Production of Transgenic bovine embryos by transfer of transfected granulosa cells into enucleated oocytes [J]. *Mol Reprod Dev.* 2001; 60:20-26.
53. [Armstrong DT](#), [Holm P](#), [Irvine B](#), et al. Pregnancies and live birth from in vitro fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration [J]. 1992; 38(4):667-78.
54. Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, et al. Production of goats by somatic cell nuclear transfer [J]. *Nat Biotechnol.* 1999; 17:456–461.
55. Barcelo´-Fimbres M, Campos-Chillo´n LF, Seidel GE. In Vitro Fertilization using Non-sexed and Sexed Bovine Sperm: Sperm Concentration, Sorter Pressure, and Bull Effects. *Reproduction in Domestic Animals.* 2010:1-8.
56. Barritt JA, Kokot M, Cohen J, et al. Quantification of human ooplasmic mitochondria [J]. *Reprod Biomed Online.* 2002; 4(3):243-247.
57. BBC. Endangered animal clone produced. <http://news.bbc.co.uk/1/hi/sci/tech/2932225.stm>. 2005.
58. Berardino MA Di, Animal cloning—the route to new genomics in agriculture and medicine. *Differentiation* [J]. 2001; 68: 67–83.
59. Bermejo-Álvarez P, Rizos D, Rath D, et al. Can bovine in vitro-matured oocytes selectively process X- or Y-sorted sperm differentially? [J]. *Biology of Reproduction.* 2008; 79(4):594-597.
60. Bertolini M, Mason JB, Beam SW, et al. Morphology and morphometry of in vivo- and in vitro-produced bovine concepti from early pregnancy to term and association with high birth weights [J]. *Theriogenology.* 2002; 58:973–994.
61. Beyhan Z, Johnson LA, First NL. Sexual dimorphism in IVM-IVF bovine embryos produced from X and Y chromosome-bearing spermatozoa sorted by high speed flow cytometry [J]. *Theriogenology.* 1999; 52:35-48.
62. Bjorn Heindryckx, Andrei Rybouchkin, Josiane Van der Elst, et al. Serial Pronuclear Transfer Increases the Developmental Potential of In Vitro-Matured Oocytes in Mouse Cloning [J]. *Biol Reprod.* 2002; 67:1790–1795.
63. Boiani M, Gambles V, Scholer H. R. ATP levels in cloned mouse embryos [J]. *Cytogenet Genome*

- Res.2004;105:270-278.
64. Boquest AC, Day BN, Prather RS. Flow cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells [J]. *Biol Reprod.* 1999; 60(4):1013-9.
 65. Bordignon V, Keyston R, Lazaris A, et al. Transgene Expression of Green Fluorescent Protein and Line Transmission in Cloned Calves Derived from In Vitro-Transfected Somatic Cells[J]. *Biol Reprod.* 2003;68(6): 2013-2013.
 66. Bousquet, D & Blondin P. Potential uses of cloning in breeding schemes: dairy cattle [J]. *Cloning Stem Cells.*2004; 6:190–197.
 67. Brackett BG, Zuelke KA. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos [J].*Theriogenology.*1993; 39:43-64.
 68. Brenner CA, Kubisch HM, Pierce KE. Role of the mitochondrial genome in assisted reproductive technologies and embryonic stem cell-based therapeutic [J]. *cloning Reprod Fertil Dev.* 2004;16(7):743-51.
 69. Brunet-Simon A., Henrion G., Renard JP, et al. Onset of zygotic transcription and maternal transcript legacy in the rabbit embryo[J].*Mol Reprod Dev.*2001;58(2):127-136.
 70. Camargo LS, Freitas C, de Sa WF, et al. Gestation length, birth weight and offspring gender ratio of in vitro-produced Gyr (*Bos indicus*) cattle embryos [J]. *Anim Reprod Sci.* 2010; 120(1-4):10-15.
 71. Campbell KH, Alberio R, Choi I, et al. Cloning: eight years after Dolly [J].*Reprod Domest Anim.*2005; 40:56–268.
 72. Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line [J]. *Nature.*1996; 380:64–66.
 73. Campbell KHS, Loi P, Otaegui P, et al. Cell cycle coordination in embryo cloning by nuclear transfer[J].*Rev Reprod.*1996;1:40-46.
 74. Chang K H, Lim J M, Kang SK, et al. Blastocyst formation, karyotype, and mitochondrial DNA of interspecies embryos derived from nuclear transfer of human cord fibroblasts into enucleated bovine oocytes [J].*Fertil Steril.*2003;80(6):1380-1387.
 75. Chatot CL, Lewis JL, Torres I, et al. Development of 1-cell embryos from different strains of mice in CZB medium [J]. *Biol Reprod.*1990; 42:432-440.
 76. Chaubal S, Xu J, Yang X, et al. Effect of addition of fructose to the culture medium on development of bovine in vitro produced sexed embryos [J]. *Reprod Fertil Dev.*2009; 21(Abstr).

77. Chavatte-Palmer P, Heyman Y, Richard C, et al. Clinical, hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells [J]. *Biol Reprod.*2002; 66(6):1596-603.
78. Chavatte-Palmera P, deSousac N, Laigreb P, et al. Ultrasound fetal measurements and pregnancy associated glycoprotein secretion in early pregnancy in cattle recipients carrying somatic clones[J]. *Theriogenology.*2006;66(4):829-840.
79. Chen DY, Jiang MX, Zhao ZJ, et al. Cloning of Asian yellow goat (*C. hircus*) by somatic cell nuclear transfer: telophase enucleation combined with whole cell intracytoplasmic injection [J]. *Mol Reprod Dev.*2007; 74(1):28-34.
80. Cheng FP, Gadella BM, Voorhout WF, et al. Progesterone-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa is mediated by a plasma membrane progesterone receptor[J]. *Biology of Reproduction.*1998;59:733~742.
81. Chesne P, Adenot PG, Viglietta C, et al. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells [J]. *Nat Biotechnol.*2002; 20:366~369.
82. Chian R C, Park C K, Sirard M A. Cumulus cells act as a sperm trap during in vitro fertilization of bovine oocytes [J]. *Theriogenology.*1996; 45(1):258 (abstract).
83. Chian RC, Okuda K, Niwa K. Influence of cumulus cells on in vitro fertilization of bovine oocytes derived from in vitro maturation [J]. *Anim Reprod Sci.* 1995; 38:37-48.
84. Cho JK, Lee BC, Park JI, et al. Development of bovine oocytes reconstructed with different donor somatic cells with or without serum starvation [J]. *Theriogenology.*2002; 57:1819~1828.
85. Cibelli JB, Stice SL, Golueke P, et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts [J]. *Science.*1998; 280:1256~1261.
86. Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts [J]. *Science.*1998; 280:1256~1258.
87. Constant F, Guillomot M, Heyman Y, et al. Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydarllantois [J]. *Biol Reprod.*2006; 75:122~130.
88. Cox J F, Hormazabal J, Santa Maria A. Effect of the cumulus on in vitro fertilization of bovine matured oocytes[J]. *Theriogenology.*1993;40(6): 1259 - 1267.

89. Cran DG, Cochrane DJ, Johnson LA, et al. Separation of X- and Y-chromosome bearing sperm by flowcytometry for use in IVF[J].*Theriogenology*. 1994; 41(1): 183 (abstract).
90. Cran DG, Johnson LA, Miller NG, et al. Production of bovine calves following separation of X- and Y-chromosome bearing sperm and in vitro fertilization [J]. *Veterinary Record*.1993; 132(2):40-41.
91. Cran DG, Johnson LA, Polge C. Sex preselection in cattle: a field trial [J].*Vet Rec*.1995; 136:495-496.
92. Cui XS, Kim NH.Maternally derived transcripts: identification and characterization during oocyte maturation and early cleavage [J]. *Reprod Fertil Dev*.2007; 19:25-34.
93. Cummins JM. The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence [J].*Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*.2004;115:S23-29.
94. Daniel LG. Reproductive consequences of infection with Bovine Viral Diarrhea Virus [J]. *Vet Clin Food Anim*. 2004; 20:5-19.
95. Daniel R Aenold, Vilceu Bordignon, Rejean Lefebvre, et al. Somatic cell nuclear transfer alters per-implantation trophoblast differentiation in bovine embryos[J]. *Reproduction*.2006; 132:2769-290.
96. De Loos F, Kastrop P, Van Maurile P, et al. Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes [J]. *Mol Reprod Dev*. 1991; 28:255-259.
97. de Matos DG, Furnus CC, Moses DF. Glutathione synthesis during in vitro fertilization of bovine oocytes: role of cumulus cells [J]. *Biol Reprod*. 1997; 57: 1420-1425.
98. de Wit AAC, and Kruip TA. Bovine cumulus-oocyte-complex-quality is reflected in sensitivity for α -amanitine, oocyte-diameter and developmental capacity[J]. *Animal Reproduction Science*.2001;65:5165
99. Downs SM, Schroeder AC, Eppig JJ. Serum maintains the fertilizability of mouse oocytes matured in vitro by preventing the hardening of the zona pellucid [J]. *Gamete Res*. 1986; 15:115-122.
100. Edwards JL, Schrick FN, McCracken MD, et al. Cloning adult farm animals: a review of the possibilities and problems associated with somatic cell nuclear transfer[J]. *Am J Reprod Immunol*.2003;50:113–123.
101. Edwards JL,King WA,Kawarsky SJ,et al.Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP70 and glutathione[J] *Theriogenology*.2001; 55(1):209-23.
102. Eggan K, Akutsu H, Loring J, et al. Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice

- derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation[J].*Proc Natl Acad Sci U S A*.2001; 98:6209–6214.
103. Elsheikh AS, Takahashi Y, Katagiri S, et al. Functional enucleation of mouse metaphase II oocytes with etoposide [J].*Jpn J Vet Res*. 1998;45:217-220.
104. Enright BP, Lonergan P, Dinnyes A, et al. Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo: implications for early embryo development and quality[J].*Theriogenology*.2000;54:659-673.
105. Erickson GF, Magoffin DA. Ovarian function: follicle. The endocrine control of follicle androgen biosynthesis [J].*J Steroid Biochem*. 1983; 19(1A):113-117.
106. Eurekalert. Texas A&M scientists clone world's first deer. Texas A&M http://www2.eurekalert.org/pub_releases/2003-12/tau-tas122203.php 2005.
107. Evans G, Hollinshead FK, Maxwell WM. Preservation and artificial insemination of sexed semen in sheep [J]. *Reprod Fertil Dev*. 2004; 16:455-64.
108. Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance [J]. *Mutat Res*. 2004; 567:1–61.
109. Evans MJ, Gurer C, Loike JD, et al. Mitochondrial DNA genotypes in nuclear transfer-derived cloned sheep [J]. *Nature Genetics*.1999; 23:90–93.
110. Farin PW, Piedrahita JA, Farin CE, et al. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos [J]. *Theriogenology*.2006; 65:178–191.
111. Fatehi A N, Zeinstra E C, et al. Effect of cumulus cell removal of in vitro matured bovine oocytes prior to in vitro fertilization on subsequent cleavage rate [J].*Theriogenology*.2002; 57(4):1347-1355.
112. FDA Animal Cloning: A Draft Risk Assessment, http://www.fda.gov/cvm/CVM_Updates/clones.htm.2006.
113. Finkel T, and Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and biology of ageing [J]. *Nature*.2000; 408:239-247.
114. Forsberg EJ, Strelchenko NS, Augenstein ML, et al. Production of cloned cattle from in vitro systems[J]. *Biology of Reproduction*. 2002;67:327–333.
115. Frenkel K, Gleichauf C. Hydrogen peroxide formation by cells treated with a tumor promoter [J]. *Free Radic Res Commun*. 1991;12-13 Pt 2:783-94.

116. Fulka J Jr, Moor RM. Noninvasive chemical enucleation of mouse oocytes [J]. *Mol Reprod Dev.*1993; 34:427-430.
117. Gabrial F, Mastromonace, Laura A.Favetta, et al. The Influence of Nuclear Content on Developmental Competence of Gaur×Cattle Hybrid in Vitro Fertilized and Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos[J].*Bio Reprod.*2007; 76:514-523.
118. Galli C, Duchi R, Moor RM, et al. Mammalian leukocytes contain all the genetic information necessary for the development of a new individual [J]. *Cloning.* 1999; 1:161-170.
119. Galli C, Lagutina I, Crotti G, et al. A cloned horse born to its dam twin [J]. *Nature.*2003; 424:635.
120. Galli C, Lagutina I, Vassiliev I, et al. Comparison of microinjection (piezo-electric) and cell fusion for nuclear transfer success with different cell types in cattle[J]. *Cloning Stem Cells.*2002; 4:189–196.
121. Gandhi AP, Lane M, Gardner DK, et al. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture [J].*Human Reproduction.* 2000; 15(2):395-401.
122. Gandolfi F, Milanesi E, Pocar P. Comparative analysis of calf and cow oocyte during in vitro maturation[J]. *Mol Reprod.* 1998; 49(2):168-175.
123. Gao S, Chung YG, Williams JW, et al. Somatic cell-like features of cloned mouse embryos prepared with cultured myoblast nuclei [J]. *Biol Reprod.*2003; 69:48-56.
124. Gardner DK. Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristics[J]. *Reprod Fertil Dev.*2008;20: 9- 18.
125. Garner DL, Seidel Jr GE. History of commercializing sexed semen for cattle [J]. *Theriogenology.*2008;69:886–95.
126. Germond M, Nocera D, Senn A, et al. Improved fertilization and implantation rates after non-touch zona pellucida microdrilling of mouse oocytes with a 1.48 μm diode laser beam[J]. *Human Reproduction.*1996; 11(5):1043-1048.
127. Gibbons J, Arat S, Ruzidlo J, et al. Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells[J].*Biology of Reproduction.*2002; 66:895–900.
128. Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality[J].*Hum Reprod Update.* 2008; 14(2): 159-177.
129. Gilula NB, Epstein ML, Beers WH. Cell to cell communication and ovulation: A study of the cumulus-oocytes complex [J]. *J Cell Biol.*1978; 78:58-75.

130. Gómez MC, Pope CE, Giraldo A, et al. Birth of African Wildcat cloned kittens born from domestic cats [J]. *Cloning Stem Cells*. 2004; 6(3):247-58.
131. 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 [J]. *Molecular Reproduction & Development*. 2004; 69:278-288.
132. Goovaerts IG, Leroy JL, Van Soom A, et al. Effect of cumulus cell coculture and oxygen tension on the in vitro developmental competence of bovine zygotes cultured singly [J]. *Theriogenology*. 2009; 71:729-738.
133. Guan M, Rawson DM, Zhang T. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes using controlled slow cooling protocols [J]. *Cryobiology*. 2008; 56:204-208.
134. Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings [J]. *Hum Reprod Update*. 2001; 7:175-189.
135. Gupta MK, Uhm SJ, Lee HT. Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and in vitro development of oocytes vitrified before or after in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2010 ; 93(8): 602-607..
136. Gutierrez-Adan A, Granados J, Garde JJ, et al. Relationship between sex ratio and time of insemination according to both time of ovulation and maturational state of oocyte Zygote. 1999; 7(1):37-43.
137. Hamano K, Li X, Qian X. Gender preselection in cattle with intracytoplasmic injected,
138. Han YM, Kim SJ, Park JS, et al. Blastocyst viability and generation of transgenic cattle following freezing of in vitro produced, DNA-injected embryos [J]. *Anim Reprod Sci*. 2000; 63(1-2):53-63.
139. Hao Y, Lai L, Mao J, et al. Apoptosis in parthenogenetic preimplantation porcine embryos [J]. *Biol Reprod*. 2004; 70:1644-1649.
140. Hardy K, Hooper M, Handyside A, et al. Non-invasive measurement of glucose and pyruvate uptake by individual human oocytes and preimplantation embryos [J]. *Hum. Reprod*. 1989; 4, 188-191.
141. Henderson KM, McNatty KP, Smith P, Gibb M. Influence of follicular health on the steroidogenic and morphological characteristics of bovine granulosa cells in vitro [J]. *Journal of Reproduction & Fertility*. 1987; 79:185-193.

142. Heyman Y, Chavatte-Palmer P, LeBourhis D, et al. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos[J]. *Biol Reprod.*2002; 66:6–13.
143. Heyman Y, Richard C, Rodriguez-Martinez H, et al. Zootechnical performance of cloned cattle and offspring: preliminary results. *Cloning Stem Cells [J].*2004; 6(2):111-20.
144. Hill JR, Winger QA, Long CR, et al. Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells [J]. *Biol Reprod.*2000; 62:1135–1140.
145. Hölker M, Petersen B, Hassel P, et al. Duration of in vitro maturation of recipient oocytes affects blastocyst development of cloned porcine embryos[J]. *Cloning Stem Cells.*2005; 7(1):35-44.
146. Hua S, Zhang Y, Song K, et al. Development of bovine-ovine interspecies cloned embryos and mitochondria segregation in blastomeres during preimplantation [J]. *Anim Reprod Sci.*2008; 105(3-4):245-257.
147. Hussein TS, Thompson JG, Gilchrist RB. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence[J]. *Dev Biol.*2006;296:514–521.
148. Ibanez E, Albertini DF, Overstrom EW. Demecolcine-induced oocyte enucleating for somatic cell cloning :coordination between cell—cycle egress, kinetics of cortical cytoskeletal interaction, and second polar body extrusion[J]. *Biol Reprod.*2003; 68:1249-1258.
149. Ikeda S, Tatemizo A, Iwamoto D, et al. Enhancement of histone acetylation by trichostatin A during in vitro fertilization of bovine oocytes affects cell number of the inner cell mass of the resulting blastocysts [J]. *Zygote.* 2009;17(3): 209-
150. Illmensee K, Hoppe PC. Nuclear transplantation on *Mus Musculus*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos [J]. *Cell.*1981; 23:9-18.
151. Inoue K, Ogonuki N, Yamamoto Y, et al. Tissue-specific distribution of donor mitochondrial DNA in cloned mice produced by somatic cell nuclear transfer[J]. *Genesis.* 2004; 39(2):79-83.
152. Irina A. Polejaeva¹, Shu-Hung Chen¹, Todd D. Vaught¹, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells [J]. *Nature.*2000; 407:86-90.
153. Iwata H, Shiono H, Kon Y, et al. Effects of modification of in vitro fertilization techniques on the sex ratio of the resultant bovine embryos[J]. *Animal Reproduction Science.*2008;105 (3-4): 234-244.
154. Jeanisch R, Eggan K, Humpherys D, et al. Nuclear cloning, stem cells, and genomic reprogramming[J]. *Cloning Stem Cells.*2002; 4:380-396.

155. Johnson LA, Flook JP, Hawk HW. Sex preselection in rabbits: live births from X and Y spermatozoa separated by DNA and cell sorting [J]. *Biology of Reproduction*. 1989; 41(2):199-203.
156. Johnson MH, Nasr-Esfahani MH. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro? [J]. *Bioessays*. 1994; 16(1):31-38.
157. Joo BS, Kim MK, Na YJ, et al. The mechanism of action of coculture on embryo development in the mouse model: direct embryo-to-cell contact and the removal of deleterious components [J]. *Fertility & Sterility*. 2001; 75(1):193-199.
158. Kang JT, Koo OJ, et al. Effects of melatonin on in vitro maturation of porcine oocyte and expression of melatonin receptor RNA in cumulus and granulosa cells [J]. *Journal of Pineal Research*. 2009; 46:22–28.
159. Kasinathan P, Knott JG, Wang ZD, et al. Production of calves from G1 fibroblasts [J]. *Nature Biotechnology*. 2001; 19:1176-1178.
160. Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, et al. Eight calves cloned from somatic cells of single adult [J]. *Science*. 1998; 282:2095–2098.
161. Kato Y, Tani T, Tsunoda Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows [J]. *J Reprod Fertil*. 2000; 120:231-237.
162. Katska L, Kauffold P, Smorag Z, et al. Influence of hardening of the zona pellucida on in vitro fertilization of bovine oocytes [J]. *Theriogenology*. 1989; 32:767-777.
163. Kazuchika Miyoshi, S Jacek Rzućidle, Scott L et al. Improvements in Cloning Efficiencies May Be Possible Increasing Uniformity in Recipient Oocytes and Donor cells [J]. *Biology of Reproduction*. 2003; 68:1079-1086.
164. Keefer CL, Stice EL, Matthews, DL. Bovine inner cell mass cells as donor nuclei in the production of nuclear transfer embryos and calves [J]. *Biology of Reproduction*. 1994; 50:935-939.
165. Kim MK, Jang G, Oh HJ, et al. Endangered wolves cloned from adult somatic cells [J]. *Cloning Stem Cells*. 2007; 9(1):130-7.
166. Kimiko, Inoue, ?????
167. Kimura K, Spate LD, Green MP, et al. Effects of D -glucose concentration, D -fructose, and inhibitors of enzymes of the pentose phosphate pathway on the development and sex ratio of bovine blastocysts [J]. *Mol Reprod Dev* 2005; 72:201–7.

168. Kishi M, Itagaki Y, Takakura R, et al. Nuclear transfer in cattle using colostrum-derived mammary gland epithelial cells and ear-derived fibroblast cells[J]. *Theriogenology*.2000;54:675-684.
169. Kitiyanant Y, Saikhun J, Chaisalee B, et al. Somatic cell cloning in Buffalo (*Bubalus bubalis*): effects of interspecies cytoplasmic recipients and activation procedures [J]. *Cloning Stem Cells*.2001;3(3):97-104.
170. Koh-ichi Hamano, Xihe Li, Xiao-qiao Qian, et al. Gender Preselection in Cattle with Intracytoplasmically Injected, flow cytometrically sorted sperm heads [J]. *Biology of Reproduction*. 1999; 60(5): 1194-1197.
171. Kruip TAM, Bevers MM, Kemp. Environment of oocyte and embryo determines health of IVP offspring[J]. *Theriogenology*.2000;53:611-618.
172. Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, et al. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*.2000; 97:990–995.
173. Kurtu JM, Ambro JD, Rajamahendran R. Cleavage rate of bovine oocytes in- vitro is affected by bulls but not sperm concentrations [J]. *Theriogenology*.1996; 45(1):257(abstract).
174. Kwon O, Kono T. Production of live young by serial nuclear transfer with mitotic stage of donor nuclei in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93:13010–13013.
175. Kwun J, Chang K, Lim J, Lee E, et al. Effects of exogenous hexoses on bovine in vitro fertilized and cloned embryo development: improved blastocyst formation after glucose replacement with fructose in a serum-free culture medium[J]. *Mol Reprod Dev*. 2003;65:167–74.
176. Lai L, Kang J X, Li R, et al. Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids [J]. *Nat Biotechnol*.2006; 24:435–436.
177. Lan Guo-Cheng, Chang Zhong-Le, Luo Ming-Jiu, et al. Production of cloned goats by nuclear transfer of cumulus cells and long-term cultured fetal fibroblast cells into abattoir-derived oocytes. *Molecular Reprod. And Dev*. 2006.73:834-840
178. Lanza RP, Cibelli JB, Moraes CT, et al. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer[J]. *Cloning*.2000;2:79–90.
179. Laowtammathron C, Lorthongpanich C, Ketudat-Cairns M, et al. Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: effects of hatching stage, linoleic acid-albumin in IVC medium and Ficoll supplementation to vitrification solution[J]. *Theriogenology*.2005; 64,:1185-1196.

180. Larson MA, Kimura K, Kubisch HM, et al. Sexual dimorphism among bovine embryos in their ability to make the transition to expanded blastocyst and in the expression of the signaling molecule IFN-tau[J]. *Proc Natl Sci U S A*. 2001; 98(17):9677–9682.
181. Latham KE. Early and delayed aspects of nuclear reprogramming during cloning [J]. *Biology Cell*.2005; 97:119–132.
182. Lazzari G, Crotti G, Turini P, et al. Equine embryos at the compacted morula and blastocyst stage can be obtained by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of in vitro matured oocytes with frozen-thawed spermatozoa from semen of different fertilities. *Theriogenology*.2002, 58 709–712
183. Lee BC, Kim MK, Jang G, et al. Dogs cloned from adult somatic cells [J]. *Nature*. 2005; 436:641–1292.
184. Lee JW, Wu SC, Tian XC, et al. Production of cloned pigs by whole-cell intracytoplasmic microinjection [J].*Biology of Reproduction*.2003; 69: 995–1001.
185. Li Z, Sun X, Chen J, et al. Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer [J].*Dev Biol*.2006; 293(2):439-48.
186. Liang XW, Lu YQ,Chen MT, et al. In vitro embryo production in buffalo (*Bubalus bubalis*) using sexed sperm and oocytes from ovum pick up [J]. *Theriogenology*.2008; 69:822-826.
187. Liu JP, Zhang ZP, An ZX, Zhang Y. Influence factors and control measures for the in vitro production of sexed embryos of dairy cattle, *Chinese agricultural science bulletin*[J].2005;21(10),1-5.(刘俊平,张志平,安志兴,等. 奶牛性控胚胎体外生产的影响因素及控制措施研究[J].*中国农学通报*.2005,21(10): 1-5.)
188. Loi P, Ptak G, Barboni B, et al. Genetic rescue of an endangered mammal by cross species nuclear transfer using post-mortem somatic cells[J].*Nat Biotechnol*. 2001; 19:962–964.
189. Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, et al. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns [J]. *Reprod Domest Anim*.2003;38:259-267.
190. Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, et al. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo [J]. *Biol Reprod*. 2003; 69:1424- 1431.
191. Lorthongpanich C, Laowtammathron C, Chan AW, et al. Development of interspecies cloned monkey embryos reconstructed with bovine enucleated oocytes[J]. *J Reprod Dev*.2008; 54:306-313.
192. Lorthongpanich C, Laowtammathron C, Chan AW, et al. Development of interspecies cloned monkey embryos reconstructed with bovine enucleated oocytes [J]. *J Reprod Dev*.2008; 54(5):306-313.

193. Lu K H, Suh T K, Seidel G E. vitro fertilization of bovine oocytes with flow-cytometrically and unsorted sperm from different bulls[J]. *Theriogenology*. 2001; 55(1):431(abstract).
194. Lu KH, Grand DG, Seidel JR GE. In vitro fertilization with flow-cytometrically- sorted bovine sperm [J].*Theriogenology*.1999; 52(8):1393-1405.
195. Lu KH, Seidel GE Jr.Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes with flow cytometrically-sorted sperm[J].*Theriogenology*.2004;62:819-830.
196. Luciano AM, Lodde V, Beretta MS, et al. Developmental capability of denuded bovine oocyte in a co-culture system with intact cumulus-oocyte complexes: role of cumulus cells, cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate, and glutathione [J]. *Mol Reprod Dev*. 2005; 71(3):389-397.
197. Maalouf WE, Lee JH, Campbell KHS. Effects of caffeine, cumulus cell removal and aging on polyspermy and embryo development on in vitro matured and fertilized ovine oocytes[J]. *Theriogenology*.2009; 71:1083-1092.
198. Magli MC, Gianaroli L, Grieco N, et al. Cryopreservation of biopsied embryos at the blastocyst stage [J]. *Hum Reprod*. 2006; 21:2656–2660.
199. Majerus V, Lequarre AS, Ferguson EM, et al. Characterization of embryos derived from calf oocytes: kinetics of cleavage, cell allocation to inner cell mass and trophectoderm and lipid metabolism [J]. *Mol Reprod Dev*.2000; 57(4):346-352.
200. Manipalviratn S, Tong Z, Stegmann B, et al. A Time course of human oocyte ATP recovery after vitrification and thawing [J]. *Fertil Steril*.2008; 90:S272.
201. Manjunatha BM, Devaraj M, Gupta PSP, Ravindra JP, et al. Effect of taurine and melatonin in the culture medium on buffalo in vitro embryo development[J]. *Reproduction in Domestic Animals*.2009; 44:12–16.
202. Marques A, Santos P, Antunes G, Chaveiro A, et al. Effect of alpha-tocopherol on bovine in vitro fertilization. *Reprod Domest Anim*. 2010; 45(1):81-85.
203. Martin M, Adams C, Wiseman B. Pre-weaning performance health of pigs to cloned (fetal cell derived) swine versus non-cloned swine [J].*Theriogenology*. 2004; 62:113–132.
204. McGrath J, Solter D. Completion of mouse embryogenesis require both the maternal es paternal genomes [J].*Cell*.1984; 37:179-183.
205. Meirelles FV, 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 [J]. *Genetics*.2001;158:351-356.
206. Meister A, and Anderson M, Glutathione. *Annual Review of Biochemistry* [J]. 1983; 52:711~760.
207. Mingoti G, Garcia JM, Rosa-e-Silva AAM. Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus-oocyte -complexes matured in vitro with BSA and different concentrations of steroids [J]. *Animal Reproduction Science* [J]. 2002; 69:175- 186.
208. Mochizuki H, Fukui Y, Ono H. Effect of the number of granulosa cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization and development of bovine oocytes [J]. *Theriogenology*.1991; 36:973-986.
209. Moruzzi JF. Selecting a mammalian species for the separation of X- and Y-chromosome- bearing spermatozoa [J].*J Reprod Fertil*. 1979; 57: 319-23.
210. Nagao Y, Ohta Y, Murakami H, et al. The effects of methyl- β -cyclodextrin on in vitro fertilization and the subsequent development of bovine oocytes [J].*Zygote*.2010; 18(4):323-30.
211. Nedambale TL, Dinnyes A, Yang X, et al. Bovine blastocyst development in vitro: timing, sex, and viability following vitrification [J]. *Biol Reprod*.2004; 71: 1671-1676.
212. Nguyen BX, Sotomaru Y, Tani T, et al. Efficient cryopreservation of bovine blastocysts derived from nuclear transfer with somatic cells using partial dehydration and vitrification [J]. *Theriogenology*.2000; 53:1439–1448.
213. Ogura A, Inoue K, Ogonuki N, et al. Production of male cloned mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature Sertoli cells [J]. *Biol Reprod*.2000; 62: 1579–1584.
214. O'Neill, Rolfe LR, Kaufman MH. Developmental potential and chromosome constitution of strontium-induced mouse parthenogenones [J].*Mol Reprod Dev*.1991; 30(3):214-219.
215. Onishi A, Iwamoto M, Akita T, et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei [J]. *Science*. 2000; 289:1188–1190.
216. Ono Y, Shimozawa N, Ito M, et al. Cloned mice from fetal fibroblast cells arrested at metaphase by a serial nuclear transfer [J].*Biol Reprod*. 2001; 64:44-50.
217. Orsi NM and Reischl JB.Mammalian embryo co-culture: trials and tribulations of a misunderstood method [J]. *Theriogenology*.2007; 67:441-458.
218. Palmieri C, Loi P, Ptak G, et al. A Review of the Pathology of Abnormal Placentae of Somatic Cell

- Nuclear Transfer Clone Pregnancies in Cattle, sheep, and Mice [J]. *Vet Pathol.*2008; 45:865-880.
219. Papis K, Poleszczuk O, Wenta-Muchajska E, et al. Melatonin effect on bovine embryo development in vitro in relation to oxygen concentration [J]. *Journal of Pineal Research.*2007; 43:321–326.
220. Parchment RE. Programmed cell death (apoptosis) in murine blastocysts: extracellular free-radicals, polyamines, and other cytotoxic agents [J]. *In Vivo.*1991; 5(5):493-500.
221. Parrish JJ, Susko-Parrish J L, Leibfried-Rutledge ML, et al. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen [J]. *Theriogenology.*1986; 25:591-600.
222. Paterson L, Desousa P, Ritchie W, et al. Application of reproductive biotechnology in animals: implications and potentials. .Application of reproductive cloning [J]. *Anima Reprod Sci.*2003; 79:137-143.
223. Paul J. Verma, Alan O. Trounson. Nuclear transfer protocols: cell reprogramming and transgenesis [M].2006.
224. Peippo J, Kurkilahti M, Bredbacka P, et al. Developmental kinetics of in vitro produced bovine embryos: the effect of sex, glucose and exposure to time-lapse environment [J]. *Zygote.*2001; 9:105-113.
225. Pereira RM, Baptista MC, Vasques MI, et al. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t, 12c CLA) [J]. *Anim Reprod Sci.* 2007; 98(3-4):293-301.
226. Peters JK, Milliken G, Davis DL. Development of porcine embryos in vitro: effects of culture medium and donor age [J]. *J Anim Sci.*2001; 9:1578-1583.
227. Powell AM, Talbot NC, Wells KD, et al. Cell donor influences success of producing cattle by somatic cell nuclear transfer [J]. *Biol Reprod.* 2004; 71:210–216.
228. Prather RS, First NL. Cloning embryo by nuclear transfer [J]. *J Reprod Fertil Suppl.* 1990; 41:125-134.
229. Prather RS, Sims MM, First NL. Nuclear transplantation in early pig embryos [J]. *Bio Reprod.*1989; 41:414-418.
230. Prather RS, Tao T, Machaty Z. Development of the techniques for nuclear transfer in pigs [J]. *Theriogenology.*1999; 51:487–498.
231. Rabahi F, Monniaux D, Pisselet C, et al. Qualitative and quantitative changes in protein synthesis of

- bovine follicular cells during the preovulatory period[J]. *Mol Reprod Dev.* 1991; 30:265-275.
232. Rahimi G, Isachenko E, Sauer H, et al. Effect of different vitrification protocols for human ovarian tissue on reactive oxygen species and apoptosis [J]. *Reprod Fertil Dev.* 2003; 15:343–349.
233. Rideout WM, Wakayama T, Wutz A, et al. Generation of mice from wild-type and targeted ES cells by nuclear cloning [J]. *Nature Genetics.*2000; 24: 109–110.
234. Rieger D, Semple E, Leibo S. P. Preliminary observations on the ATP content of bovine oocytes and embryos[J].*Theriogenology.*1997;47(1):311.
235. Rizos D, Ward F, Duffy P, et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality[J]. *Molecular Reproduction & Development.* 2002;61:234-248.
236. Rodriguez-Osorio N, Kim IJ, Wang H, et al. Melatonin increases cleavage rate of porcine preimplantation embryos in vitro[J]. *Journal of Pineal Research.*2007; 43:283-288.
237. Sainz RR, Mayo JC, Rodriguez C, et al. Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences.*2003; 60:1407–1426.
238. Salhab M, Tosca L, Cabau C, et al. Kinetics of gene expression and signaling in bovine cumulus cells throughout IVM in different mediums in relation to oocyte developmental competence, cumulus apoptosis and progesterone secretion[J].*Theriogenology.*2011; 75 (1):90-104.
239. Salvetti P, Buff S, Afanassieff M, et al. Structural, metabolic and developmental evaluation of ovulated rabbit oocytes before and after cryopreservation by vitrification and slow freezing [J].*Theriogenology.*2010 [Epub ahead of print].
240. Schlafer DH, Fisher PJ, Davies CJ. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease [J]. *Anima Reprod Sci.* 2000; (60-61):145-160.
241. Schoenfelder M, Schams D, Einspanier R. Steroidogenesis during in vitro maturation of bovine cumulus oocyte complexes and possible effects of tri-butyltin on granulosa cells [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003; 84(2-3): 291- 300.
242. Schurmann A, Wells DN, Oback B. Early zygotes are suitable recipients for bovine somatic nuclear transfer and result in cloned offspring [J]. *Reproduction.* 2006; 132:839–848.
243. Sha HY, Chen JQ, Chen J, et al. Fates of donor and recipient mitochondrial DNA during generation of

- interspecies SCNT-derived human ES-like Cells [J]. *Cloning Stem Cells*.2009; (11)4:497-507.
244. Shamsuddin M, Rodriguez-Martinez H. Fine structure of bovine blastocysts developed either in serum-free medium or in conventional co-culture with oviduct epithelial cells [J]. *Zentralblatt Veterinärmed A*. 1994; 41:307-316.
245. Shaorong Gao, Bianca Gasparini, Michell McGarry, et al. Germinal Vesicle Material Is Essential for Nucleus Remodeling [J]. *Biol Reprod*.2002; 67:928–934.
246. Shi DS, Lu FH, Wei YM, et al. Buffalos (*Bubalus bubalis*) Cloned by Nuclear Transfer of Somatic Cells [J]. *Biology of Reproduction*. 2007; 77(2):285-291.
247. Shi DS, Lu KH, Gordon I. Effect of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development in vitro [J].*Theriogenology*.1990; 33(1):324 (abstract).
248. Shi JM, Tian XZ, et al. Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves in vitro maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes [J].*Journal of Pineal Research*. 2009; 47:318–323.
249. Shi W, Haaf T. Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure [J]. *Mol Reprod Dev*. 2002; 63:329-334.
250. Shiga K, Umeki H, Shimura H, et al. Growth and fertility of bulls cloned from the somatic cells of an aged and infertile bull [J].*Theriogenology*.2005;64(2): 334-43.
251. Shin MR, Park SW, Shim H, et al. Nuclear and microtubule reorganization in nuclear-transferred bovine embryos [J].*Mol Reprod Dev*.2002;62:74–82.
252. Shin T, Kraemer D, Pryor J, et al. A cat cloned by nuclear transplantation [J]. *Nature*.2002; 415:859.
253. Shioya Y, Kuwayama M, Fukushima M, et al. In vitro fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro [J]. *Theriogenology*.1988; 30:489-494.
254. Siddiquy AK, Cohen J. In-vitro fertilization in the mouse and the relevance of different sperm/egg concentrations and volumes [J]. *J Reprod Fertil*. 1982; 66(1): 237-42.
255. Sirivaidyapong S, Bevers MM, Colenbrander B. Acrosome reaction in dog sperm is induced by a membrane-localized progesterone receptor [J]. *J Androl*. 1999; 20(4):537-44.
256. Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, et al. Developmental competence of in vitro–fertilized porcine oocytes after in vitro maturation and solid surface vitrification: effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage [J]. *Cryobiology*. 2007; 55:115–126.

257. St John JC, Ramalho-Santos J, Gray HL, et al. The expression of mitochondrial DNA transcription factors during early cardiomyocyte in vitro differentiation from human embryonic stem cells [J]. *Cloning Stem Cells*. 2005; 7(3):141-53.
258. Stojkovic M, Kolle S, Peinl S, et al. Effects of high concentrations of hyaluronan in culture medium on development and survival rates of fresh and frozen-thawed bovine embryos produced in vitro [J]. *Reproduction*. 2002; 124: 141-153.
259. Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, et al. Wolf E Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture [J]. *Biol Reprod*. 2001; 64:904–909.
260. Su YQ, Wu X, O'Brien MJ, et al. Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte-cumulus cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte-granulosa cell regulatory loop [J]. *Dev Biol*. 2004; 276:
261. Suh TK, Schenk JL. Pressure during flow sorting of bull sperm affects post-thaw motility characteristics [J]. *Theriogenology*. 2003; 59(1):516 (abstract).
262. Sutovsky P, Schatten G. Depletion of glutathione during bovine oocyte maturation reversibly blocks the decondensation of the male pronucleus and pronucleus apposition during fertilization [J]. *Biol Reprod*. 1997; 56:1503-1512.
263. Takahashi S, Yoshihio I. Evaluation of meat products from cloned cattle: biological and biochemical properties [J]. *Cloning Stem Cells*. 2004; 6(2): 165-171.
264. Talebkhan, Garoussi M, Mehrzadb J. Effect of bovine viral diarrhoea virus biotypes on adherence of sperm to oocytes during in-vitro fertilization in cattle [J]. *Theriogenology*. 2011; 75:1067–1075.
265. Tamashiro KL , et al. Cloned mice have an obese phenotypo not transmitted to their offspring [J]. *Nature Med*. 2002; 8:262-267
266. Tamura H, Takasaki A, Miw I, et al. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate [J]. *J Pineal Res*. 2008; 44(3):280-7.
267. Tan XW, Ma SF, Yu JN, et al. Effects of species and cellular activity of oviductal epithelial cells on their dialogue with co-cultured mouse embryos [J]. *Cell Tissue Research*. 2007; 327:55-66.

268. Tanghe S, Van Soom A, Mehrzad J, et al. Cumulus contributions during bovine fertilization in vitro [J]. *Theriogenology*.2003; 60(1):135-149.
269. Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, et al. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization [J]. *Mol Reprod Dev*.2002;61:414–24.
270. Thundathil J, Filion F, Smith LC. Molecular control of mitochondrial function in preimplantation mouse embryos [J]. *Molecular Reproduction and Development*.2005;71: 405-413.
271. Tome D, Dubarry M, Fromentin G. Nutritional value of milk and meat products derived from cloning [J]. *Cloning Stem Cells*.2004;6:172-177.
272. Tsai S, Rawson DM, Zhang T. Development of cryopreservation protocols for early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles using controlled slow cooling [J]. *Theriogenology*.2009; 71(8):1226-1233.
273. Tsunoda Y, Kato Y. Not only inner cell mass nuclei but also trophectoderm nuclei of mouse blastocysts have a developmental totipotency [J]. *J Reprod Fertil*. 1998; 113:181-184.
274. Tsunoda Y, Yasui T, Shioda Y, et al. Full-term development of mouse lastomere nuclei transplanted into enucleated two-cell embryos [J]. *J Exp Zool*. 1987; 242 :147—151.
275. Uhler ML, Leung A, Chan SY, et al. Direct effects of progesterone and antiprogestosterone on human sperm hyperactivated motility and acrosome reaction [J]. *Fertil Steril*.1992; 58(6):1191-8.
276. Underwood SL, Bathgate R, Ebsworth M, et al. Pregnancy loss in heifers after artificial insemination with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed dairy bull sperm [J]. *Anim Reprod Sci*. 2010; 118(1):7-12.
277. Vajta G, Gjerris M. Science and technology of farm animal cloning: State of the art [J]. *Anim Reprod Sci*.2006; 92:211–230.
278. Vajta G, Lewis IM, Hyttel P, et al. Somatic cell cloning without micromanipulators [J]. *Cloning*.2001; 3:89–95.
279. Van Blerkom J, Davis PW, Lee J. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer [J]. *Hum Reprod*. 1995; 10:415–424.
280. Van der Auwera , D' Hooghe T. Superovulation of female mice delays embryos and fetal development [J]. *Hum. reprod*. 2001; 16:1237-1243.
281. Van Eenennaam A. What is the future of animal biotechnology? [J]. *California*

- Agriculture.2006;60(3):132-139.
282. Van Soom A, Tanghe S, De Pauw I, et al. Function of the cumulus oophorus before and during Mammalian fertilization[J]. *Reprod Domest Anim.* 2002; 37:144–51.
283. Van Wagendonk-de Leeuw AM, Mullaart E, de Roos AP, et al. Effects of different reproduction techniques: AI MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring [J]. *Theriogenology.* 2000; 15, 575–597.
284. Vincent A, Crozatier M. Neither Too Much Nor Too Little: Reactive Oxygen Species Levels Regulate *Drosophila* Hematopoiesis[J]. *J Mol Cell Biol.* 2009. [Epub ahead of print]
285. Wakayama S, Ohta H, Kishigam, S, et al. Establishment of male and female nuclear transfer embryonic stem cell lines from different mouse strains and tissues [J]. *Biol Reprod.* 2005; 72:932-936.
286. Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei[J]. *Nature.* 1998; 394:369–374.
287. Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei[J]. *Nature.* 1998; 394(23):369-274.
288. Wakayama T, Rodriguez I, Perry AC, et al. Mice cloned from embryonic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96:14984-14989.
289. Wang W H , Macháty Z, Abeydeera L R, et al. Parthenogenetic activation of pig oocytes with calcium ionophore and the block to sperm penetration after activation[J]. *Biology of Reproduction* 1991; 58(6):1357-1366.
290. Wani Nisar A, Wernery U, Hassan F.A.H, et al. Skidmore Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer [J]. *Biol Reprod.* 2010; 82(2):373-379.
291. Ward F, Enright B, Rizos D, et al. Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire [J]. *Theriogenology.* 2002; 57:2105-17.
292. Ward F, Rizos D, Boland MP, et al. Effect of reducing sperm concentration during IVF on the ability to distinguish between bulls of high and low field fertility: work in progress [J]. *Theriogenology.* 2003; 59:1575–84.

293. Wei Z, Park KW, Day BN, et al. Effect of epidermal growth factor on preimplantation development and its receptor expression in porcine embryos[J].Molecular Reproduction & Development.2001; 60(4):457- 462.
294. Wells DN, Forsyth JT, McMillan V, et al. The health of somatic cell cloned cattle and their offspring [J]. Cloning Stem Cells.2004; 6(2): 101-10.
295. Wells ND, Misica PM, Day AM, et al. Production of cloned lambs from an established embryonic cell line: a comparison between in vivo- and in vitro-matured cytoplasts[J]. Biol Reprod. 1997; 57:385–393.
296. Wells ND, Pavla MM, Tervit HR. Production of clone calves following nuclear transfer with culture adult mural granulosa cells. Biol Reprod 1999; 60:996–1005.
297. Wheeler M, Rutledge JJ, Fischer-Brown A, et al. Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle [J].Theriogenology.2006; 65(1):219-27.
298. Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos [J]. Nature.1986;320: 63–65.
299. Willmut I, N Beaujean, PA de Sousa, et al. Somatic cell nuclear transfer Nature.2002; 419(10):583-586.
300. Wilmut I, Careth Sulliva, Jane Taylor. A decade of progress since the birty of Dolly [J]. Reproduction, Fertility and Development.2009; 21:95-100.
301. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells [J]. Cloning Stem Cells.2007; 9(1):3-7.
302. Wilson RD, Fricke PM, Leibfried-Rutledge ML, et al. In vitro production of bovine embryos using sex-sorted sperm [J].Theriogenology.2006; 65(6):1007- 1015.
303. Woods GL, White KL, Vanderwall DK, et al. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer [J].Science. 2003; 301:1063.
304. Wu B, Ignatz GG, Currie WB, et al. Temporal distinctions in the synthesis and accumulation of proteins by oocytes and cumulus cells during maturation in vitro of bovine oocytes [J]. Mol Reprod Dev. 1996; 45(4):560-565.
305. Wu DS, Liu JH, Sun W, et al. Effect of X/Y sperm sorting and the influence on in vitro fertilization among different bulls[J].China Dairy Cattle.2009; 4:11-15. (吴冬生,刘敬浩,孙伟,等.不同种公牛 X/Y 精子分离效果及对体外受精能力的影响[J].中国奶牛.2009,4:11-15.)

306. Xia G, Byskov AG, Andersen CY. Cumulus cells secrete ameiosis-inducing substance by stimulation with forskolin and dibutyric cyclic adenosine monophosphate [J]. *Mol Reprod Dev.*1994; 39: 17-24.
307. Xu J, Chaubal SA, Du F. Optimizing IVF with sexed sperm in cattle [J]. *Theriogenology.* 2009; (71):39-47.
308. Xu J, Guo Z, Su L, et al. Developmental potential of vitrified Holstein cattle embryos fertilized in vitro with sex-sorted sperm [J]. *J Dairy Sci.* 2006; 89: 2510 -2518.
309. Xu JS, Chan Samuel TH, Ho PC, et al. Coculture of human oviductal cells maintains mitochondrial function and decreases caspase activity of cleavage stage mouse embryos [J]. *Fertil Steril.*2003; 80:178–183.
310. Yan CL, Fu XW, Zhou GB, et al. Mitochondrial behaviors in the vitrified mouse oocyte and its parthenogenetic embryo: effect of Taxol pretreatment and relationship to competence [J]. *Fertil Steril* 2010;93:959–66.
311. Yanagimachi R. Cloning: experience from the mouse and other animals [J]. *Mol Cell Endocrinol.*2002; 187:241–248.
312. Yeo CX, Gilchrist RB, Thompson JG, et al. Exogenous growth differentiation factor 9 in oocyte maturation media enhances subsequent embryo development and fetal viability in mice[J].*Hum Reprod.*2008;23(1):67-73. Epub 2007 Oct 12.
313. Young LE, Sinclair KD, Wilmut I. Large offspring syndrome in cattle and sheep [J]. *Rev. Reprod.*1998; 3:155–163.
314. Zakhartchenko V, Alberio R, Stojkovic M, et al. Adult cloning in cattle: potential of nuclei from a permanent cell line and from primary cultures[J]. *Mol Reprod Dev.* 1999; 54:264–272.
315. Zakhartchenko V, Durcova-Hille G, Stojkovic M, et al. Effects of serum starvation and re-cloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts[J]. *J Reprod Fertil.*1999; 115:325-331.
316. Zawad WM, Cibell JB, Choi PK, et al. somatic cell cloned transgenic bovine neurons for transplantation in parkinsonian rats[J]. *Nat Med.* 1998; 4:569-574.
317. Zhang L, Jiang S, Wozniak PJ, et al. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro[J]. *Mol Reprod Dev.*1995; 40:338-344.

318. Zhang M, Lu K H, Seidel G E. Development of bovine embryos after in vitro fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls [J]. *Theriogenology*. 2003; 60(9):1657-1663.
319. Zhao XE, Zheng YM. Development of cloned embryos from porcine neural stem cells and amniotic fluid-derived stem cells [J]. *Animal*. 2010; 4(6):921-929.
320. Zhao XM, Fu XW, Hou YP, et al. Effect of vitrification on mitochondrial distribution and membrane potential in mouse two pronuclear (2-PN) embryos [J]. *Molecular Reproduction & Development*. 2009; 76:1056-1063.
321. Zheng WT, Zhuang GL, Zhou CQ, et al. Comparison of the survival of human biopsied embryos after cryopreservation with four different methods using non-transferable embryos [J]. *Hum Reprod*. 2005; 20:1615–1618.
322. Zhou Q, Renard JP, Le Friec G, et al. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation [J]. *Science*. 2003; 302:1179.
323. Zi XD, Lu H, Yin RH, et al. Development of embryos after in vitro fertilization of bovine oocytes with sperm from either yaks (*Bos grunniens*) or cattle (*Bos taurus*) [J]. *Animal Reproduction Science*. 2008; 108(1-2):208-215.
324. Ziyi Li, Maryam Rezaei Sabet, Qi Zhou, et al. Developmental Capacity of Fertile Embryos by Nuclear Transfer Using G0/G1-Phase Fetal Fibroblasts [J]. *Biology of Reproduction*. 2003; 68:2297-2303.

作者简历

基本资料

姓名：朱化彬 性别：男 出生年月：1965年8月
政治面貌：中共党员 毕业学校：甘肃农业大学 学历：博士
专业方向：动物遗传育种与繁殖

学习经历

1984.9—1988.7 安徽农业大学攻读农学学士学位 畜牧与兽医
1988.9—1991 中国农业科学院研究生院攻读农学硕士学位，家畜繁殖
2009.9—至今 甘肃农业大学攻读农学博士学位，家畜遗传育种与繁殖

博士阶段发表论文：

1. 朱化彬, 庞云渭, 杜卫华, 郝海生, 李海燕, 沈彦军, 赵学明, 王栋, 王宗礼。不同因素对奶牛分离精子 ISCI 效率的影响; 畜牧兽医学报, 2010, 41 (12): 1543—1549。
2. 朱化彬, 沈彦军, 杜卫华, 鞠光伟; 庞云渭; 王宗礼等。马一牛无透明带异种克隆的研究; 中国农业科学 (接收)
3. 王帅, 赵学明, 朱化彬, 杜卫华, 王栋, 郝海生, 王宗礼。部分中国荷斯坦种公牛脊柱畸形综合征携带状况的检测和分析. 畜牧兽医学报 (接收)。
4. 王帅, 赵学明, 朱化彬, 杜卫华, 郝海生, 王栋, 刘岩, 秦彤, 王宗礼。pEGFP-loxP-Lox2272 载体的构建、转染及牛胎儿转基因阳性细胞筛选程序的优化. 农业生物技术学报 (接收)。

导师简介

王宗礼，男，汉族，中共党员，博士，研究员。1984年毕业于甘肃农业大学畜牧系，1987至2002年，在中国农业科学院先后担任团委专职副书记，科技开发办公室副处长，国际合作与产业发展局副局长、处长；2002至2006年，任草原研究所所长兼党委书记，2006年以来任国家农业部畜牧业司副司长，同时兼任中国可持续发展研究会理事（农业分会副主席）、中国资源与区划学会副理事长、中国草学会常务理事、内蒙古党委《实践》杂志社理事会常务理事、《中国草地学报》主编等学术职务。1993年获中国农业科学院先进党员称号，2005年被聘为农业部有突出贡献青年专家。

先后主持的项目有：国家自然科技技术平台“牧场植物种质资源标准化整理、整合及共享试点”，中央级科研院所社会公益研究专项“典型生态经济草业发展评价”，农业部重大农产品推广项目“优质牧草新品种新技术示范推广”及“高产荷斯坦奶牛繁育及饲养技术引进”和“中国草原防灾减灾战略研究”等，获省部级科技成果奖6项。

多次参与起草国家和有关部门的规划，在国家核心感悟或国际学术会议上发表科技论文47篇，主编或参编专著7部。其中《加快我国草业发展保障体系的构建》荣获我国草业可持续发展战略论坛“克劳沃杯”优秀论文奖（2004年）；《用科学发展观统领我国草原生态保护与治理》荣获中国科协2005年学术年会优秀论文一等奖。