

# 低氧培养早期胚胎克隆小型猪(*Sus Scrofa*)

潘登科\* 张运海\* 孙秀柱 张健 李旭阳 李燕 顾志良 戴蕴平  
吴常信 李宁†

( 中国农业大学生物学院农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094; 中国农业大学动物科技学院, 北京 100094; 中国农业大学动物医院, 北京 100094; 河北明慧养猪集团, 三河 065200. \* 同等贡献. † 联系人, E-mail: [ninglbau@public3.bta.net.cn](mailto:ninglbau@public3.bta.net.cn))

**摘要** 猪的体细胞克隆在人类的异种器官移植方面有着巨大的应用前景. 以中国实验用小型猪胎儿成纤维细胞为核供体, 从屠宰场采集初情期前母猪的卵巢, 卵母细胞体外成熟后去核构建克隆胚胎, 重构卵电融合并激活, 在 7% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> 及 88% N<sub>2</sub> 的气相条件下 NCSU-23 或 PZM-3 培养基培养. 给 3 头代孕母猪移植 230 枚克隆胚胎, 其中一头妊娠足月并产下 3 头仔猪, 生产克隆猪的效率达到 1.3%; 其中一头健康状况良好, 存活至今, 毛色及 DNA 微卫星遗传分析证实为克隆个体. 以上结果表明, 利用初情期前母猪的卵母细胞, 克隆胚胎培养在低氧条件下, 是生产克隆猪的一条有效途径.

**关键词** 卵母细胞体外成熟 核移植 胚胎培养 低氧 猪

我国已经得到了克隆牛<sup>[1,2]</sup>、山羊<sup>[3,4]</sup>、绵羊<sup>[5]</sup>等的后代, 但在克隆猪方面还处于起步阶段<sup>[6]</sup>. 猪的体细胞克隆是各种家畜中难度相对较大的, 直到 2000 年才获得世界首例体细胞克隆猪<sup>[7]</sup>. 截止到目前克隆猪的总效率不到 1%<sup>[8]</sup>, 影响克隆猪效率的因素很多. 首先, 许多环节都会影响克隆胚胎的早期发育, 尤其是猪卵母细胞来源和体外成熟、胚胎体外培养等; 其次, 猪的体外胚胎质量很低, 至少有 4 个优质胚胎同时附植, 才能诱发足够的妊娠信号; 最后, 猪怀孕早期胚胎的死亡率非常高, 达 40% 左右. 所以, 在开展猪克隆胚胎移植时, 人们倾向一次移植大量的胚胎, 或者同时移植孤雌激活胚胎、体外受精作为辅助手段<sup>[9]</sup>.

本研究利用猪胎儿成纤维细胞为核供体、初情期前母猪体外成熟的卵子为受体获得了体细胞克隆猪个体. 早期获得克隆猪的研究大部分是利用体内成熟的卵子或经产母猪体外成熟的卵子, 而利用初情期前母猪体外成熟的卵子获得克隆猪的报道很少; 早期胚胎的培养一般是在 5% CO<sub>2</sub> (约 20% O<sub>2</sub> 的空气) 的培养箱内培养, 而 5%~10% 氧分压更接近体内环境, 因此本研究尝试在低氧(7% 氧)分压培养早期胚胎能否提高胚胎的发育能力. 低氧培养胚胎获得克隆猪的研究报道非常有限.

猪的体细胞克隆在猪肉品质改良和人类异种器官移植上有着巨大的应用前景. 本研究利用体细胞核移植生产克隆猪, 为将来在我国开展大规模克隆猪及基因组修饰克隆猪生产奠定基础.

## 1 材料与方法

除特别注明外, 所有化学试剂均购自 Sigma-Aldrich 公司(USA).

( ) 猪胎儿成纤维细胞系的建立. 对处于妊娠期第 33 天(配种时期为 0 d)的中国实验用小型猪(黑色皮毛)采用组织块接种法建立细胞系, 细胞传代以及冷冻保存的具体方法参考龚国春等人<sup>[10]</sup>的方法.

供体细胞准备方法: 待传代 2~6 次的细胞生长至 80% 汇合时, 开始血清饥饿处理, 即把细胞培养液中血清浓度从 20% 降至 0.5% 继续培养 2 d. 对经上述处理的细胞常规方法消化, 离心, 最后加 200 μL 显微操作液重悬细胞沉淀, 备用.

( ) 卵母细胞体外成熟. 从屠宰场采集初情期前母猪卵巢, 放入含青链霉素的 30 生理盐水中, 2 h 内运回实验室. 用配有 18 号针头的 10 mL 注射器抽吸卵巢上 3~6 mm 的卵泡. 体视镜下挑选卵丘包裹 3 层以上、致密、胞质均匀的卵丘细胞-卵母细胞复合体(cumulus-oocyte-complexes, COCs), 卵母细胞体外成熟液(IVM 液)为北卡罗林纳州大学培养液 NCSU-23 添加 10% 猪卵泡液(PFF)、0.57 mmol/L L-半胱氨酸、10 ng/mL 表皮生长因子(EGF)、10 IU/mL 人绒毛膜促性腺激素(hCG)和 10 IU/mL 孕马血清促性腺激素(eCG). 用 IVM 液洗涤 3 遍再转入至少已经在 CO<sub>2</sub> 培养箱中平衡 3~4 h、矿物油覆盖的 IVM 液滴内(每 100 μL 液滴放 25 枚). 将 COCs 先在 IVM 液中培养 20 ± 2 h, 之后转移到无 hCG, eCG 的 IVM 液中

继续培养  $20 \pm 2$  h. 在 IVM 中 42 h 后, 将 COCs 转移到含 1 mg/mL 透明质酸酶中脱去卵丘细胞, 挑选排出第一极体、卵黄膜完整、卵周隙清晰、胞质均匀、色泽灰褐的卵母细胞为受体.

( ) 体细胞核移植显微操作. 显微操作液为添加 7.5  $\mu$ g/mL 细胞松弛素 B (CB) 的 HEPES 缓冲的无钙 NCSU-23. 将供体细胞以及成熟卵母细胞同时转入操作滴中, 然后在显微操作仪上用固定吸管(外径 100~120  $\mu$ m)吸持卵母细胞, 用内径 15~25  $\mu$ m 的去核/注射针盲吸法去核, 吸取第一极体及相邻的 10%~20% 可能含有卵母细胞核的胞质. 挑选直径 15~20  $\mu$ m 圆形光滑的体细胞, 从去核切口放入卵周隙. 每批操作 30 个卵母细胞, 结束后将供体细胞-卵胞质构成的细胞对(重构卵)转移到 NCSU-23 + 4 mg/mL BSA(牛血清白蛋白)中, 在 39  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% 湿度培养箱中恢复 0.5 h.

( ) 重构卵融合与激活. 将恢复好的重构卵分批转移到融合液中平衡 2 min, 融合/激活液由 0.25 mol/L 甘露醇, 0.1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mmol/L HEPES 及 0.01% PVA 组成, 每批 5 个放入已经铺满融合液的融合槽内(电极宽度为 500  $\mu$ m), 用实心玻璃针使供体细胞-受体卵细胞膜接触面与电极平行, 再用 ECM2001 融合仪(BTX, USA)施加一个 50  $\mu$ s, 2.0 KV/cm 的直流电脉冲诱导融合并同时激活, 之后将重构卵用 NCSU-23 + 4 mg/mL BSA 洗涤, 转入矿物油覆盖的胚胎培养液中, 在 39  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% 湿度下培养 0.5~1 h 后取出判定融合.

( ) 体细胞核移植胚胎体外培养. 将融合的重构胚转入胚胎培养液滴内 NCSU-23 + 4 mg/mL BSA, PZM-3 + 3 mg/mL BSA 培养基中培养, 培养条件为 39  $^{\circ}$ C, 100% 湿度, 7% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 88% N<sub>2</sub> 或 5% CO<sub>2</sub> 的空气. 每 30  $\mu$ L 的液滴培养 8~10 枚重构胚, 胚胎培养 12~30 h 后取出一部分 1-2 细胞阶段克隆胚, 装入 2.5 mL 麦管内携带到猪场进行胚胎移植; 一部分胚胎则继续培养, 并在培养的第 168 h 时统计囊胚(图 1)形成结果及囊胚细胞数, 囊胚细胞数 Hoechst33342 染色计数. 统计结果以统计分析软件 SAS 8.2 的 *t* 检验进行分析,  $P < 0.05$  差异显著.

( ) 胚胎移植与妊娠维持和检测. 在构建克隆胚的当天, 挑选自然发情的经产母猪(长白猪 $\times$ 大白猪), 开始发情的标准为站立反射. 次日胚胎移植前, 硫酸妥钠常规麻醉, 在手术架上侧卧保定, 侧腹部做

一个长约 8 cm 的手术切口, 暴露卵巢、输卵管及子宫, 用胚胎移植管(Agtech Inc, USA)沿输卵管伞进入约 5 cm, 将胚胎(100 枚以上)移植到输卵管壶腹部-峡部结合处. 胚胎移植后第 10 天代孕母猪肌肉注射 1000 IU PMSG(天津华孚高生物技术公司), 第 13 天注射 800 IU hCG(宁波第二激素厂). 胚胎移植后 30 d B 型超声波(Pie Medical, Holand/Netherland)检测妊娠与否, 然后于第 50, 70 和 90 天超声波跟踪检测胎儿发育情况.

( ) 微卫星 DNA 分析. 应用微卫星 DNA 分析法检测体细胞克隆猪的基因型是否与供体细胞一致, DNA 样品来源于供体细胞系、2 头克隆猪和 1 头代孕母猪的耳部组织及 1 头随机抽样的分娩母猪耳部组织和 2 头随机抽样的仔猪尾尖组织. 选取 7 对分布于不同染色体的荧光标记的微卫星引物(S0070, S0714, S072, SW1111, S742, S830 和 S857), 按优化的反应条件对上述基因组 DNA 进行 PCR 扩增, PCR 扩增产物在 ABI 377 全自动测序仪上进行电泳, 以软件 Genescan3.1 对电泳结果进行基因型分析.

## 2 结果

### 2.1 氧分压和培养基对猪核移植胚胎发育的影响

高低氧分压(20% O<sub>2</sub>, 7% O<sub>2</sub>)和 NCSU-23, PZM-3 培养基培养结果表明(表 1), 在低氧条件下提高了胚胎的囊胚率和细胞数, 两种培养基差异不显著. 其中, 培养基 NCSU-23 在 7% O<sub>2</sub> 气相下, 囊胚率和囊胚细胞数提高显著( $P < 0.05$ , (17.7  $\pm$  2.5)% vs (8.2  $\pm$  1.2)%; (46.3  $\pm$  9.6) vs (31.0  $\pm$  2.1)), 而 PZM-3 在低氧下只能显著提高囊胚的细胞数( $P < 0.05$ , (49.4  $\pm$  9.8) vs (36.6  $\pm$  2.1)), 对囊胚率无显著影响( $P > 0.05$ , (10.9  $\pm$  4.5)% vs (11.2  $\pm$  3.6)%).

### 2.2 胚胎移植后体内发育及出生后个体发育

克隆胚胎移植给 3 头经产母猪, B792 受体母猪移植了 150 枚克隆胚胎, B790 受体母猪本交后移植了少量胚胎(20 枚), P1652 受体母猪移植了中等数量(60 枚)的克隆胚胎. 移植后 30 d 用 B 超检测证实前 2 头妊娠. 其中全部移植克隆胚胎的 B792 怀孕足月, 在第 116 天注射前列腺稀醇诱导分娩, 于第 117 天自然产下 3 头黑色仔猪(表 2). 其中一头存活(图 2), 克隆猪出生重为 1130g, 出生后一直很健康.

### 2.3 克隆猪的微卫星分析

微卫星鉴定结果表明, 7 对微卫星 DNA 分析(表 3)

表 1 不同氧分压和胚胎培养基对猪核移植胚胎发育的影响

胚胎培养氧分压 <sup>a)</sup>	胚胎培养基	培养的胚胎数	囊胚数(% ± 标准差) <sup>b)</sup>	细胞数(平均值 ± 标准差) <sup>b)</sup>
7%	NCSU-23	450	75 (17.7 ± 2.5)a	46.3 ± 9.6ab
	PZM-3	114	12 (10.9 ± 4.5)ab	49.4 ± 9.8a
20%	NCSU-23	308	25 (8.2 ± 1.2)b	31.0 ± 2.1c
	PZM-3	144	16 (11.2 ± 3.6)ab	36.6 ± 2.1bc

a) 20%为 5%CO<sub>2</sub> 的空气; 7%为 5%CO<sub>2</sub>, 7% O<sub>2</sub>, 88%N<sub>2</sub>. b) 同一栏内上标不同差异显著 (P < 0.05).

表 2 克隆胚胎移植后的体内发育

受体母猪(发情天数)	克隆胚个数	超声波妊娠检测	生产克隆后代
B792(1d)	150 个	妊娠	3 头黑猪(1 头存活, 1 头畸胎, 1 头死产)
B790(1d)	20 个/本交	妊娠	5 头白猪, 但无克隆个体
P1652(1d)	60 个	空怀	无

表 3 供体细胞、代孕母猪和克隆猪的 7 个微卫星位点基因型

	S0070	S0714	S072	SW1111	S742	S830	S857
供体细胞系	274/290	124/128	114/116	168/174	199/199	185/187	143/151
代孕母猪	266/266	126/126	108/116	166/174	205/205	181/181	147/150
克隆猪 1	274/290	124/128	114/116	168/174	199/199	185/187	143/151
克隆猪 2	274/290	124/128	114/116	168/174	199/199	185/187	143/151

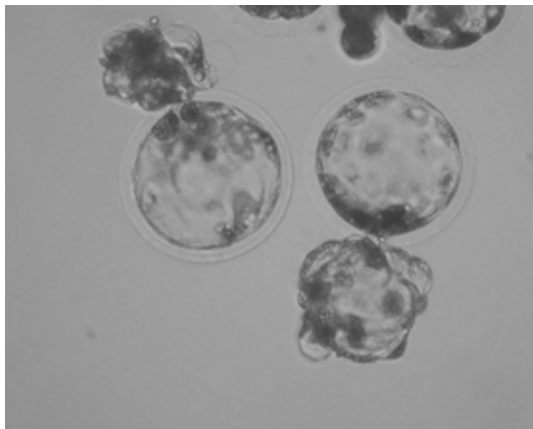


图 1 猪胎儿成纤维细胞克隆囊胚



图 2 出生后 7 d 的体细胞克隆猪

证实 2 头克隆猪和供体细胞系的基因型完全一致, 而与代孕母猪、随机抽样的分娩母猪、随机抽样的仔猪无任何相关, 说明克隆猪的遗传物质完全来自供体细胞.

### 3 讨论

体细胞克隆猪已有多例出生<sup>[7,11~32]</sup>, 但利用体外成熟的初情期前母猪卵母细胞为核移植受体, 克隆胚在低氧(7% O<sub>2</sub>)条件NCSU-23 培养后移植生产克隆猪尚未见报道. 本研究以中国实验用小型猪胎儿成纤维细胞为核供体, 利用初情期前母猪体外成熟的卵母细胞为受体, 重构卵电融合同时激活后在 7% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 88% N<sub>2</sub> 的气相条件下NCSU-23 或PZM-3 培养基培养. 7% O<sub>2</sub> 下NCSU-23, PZM-3 两种培养基对胚胎发育的结果表明低氧条件下都提高了胚胎的囊胚率和细胞数, 两种培养基差异不显著. 其中, 培养基NCSU-23 在 7% O<sub>2</sub> 气相下, 囊胚率和囊胚细胞数提高显著, 因此克隆胚胎培养在 7% O<sub>2</sub> 气相下NCSU-23 培养基 20 h 左右后进行胚胎移植.

与其他动物相比, 猪胚胎体外发育能力较低. 这反映了体外培养条件偏离体内环境, 其中一个重要因素是气相条件的氧分压. 通常人们都是使用 5% CO<sub>2</sub>, 95% 的空气(约 20%O<sub>2</sub>)的培养箱内进行体外培养, 而输卵管和子宫的氧分压低于空气<sup>[33]</sup>. 在高氧(20%O<sub>2</sub>)下培养胚胎, 可能会产生更多的氧自由基而有害于胚胎的发育<sup>[34]</sup>. 研究表明将氧分压从 20%降

低到 5%~10%提高了胚胎的发育潜能<sup>[35-38]</sup>。胚胎培养基是影响胚胎发育率低的另一个因素。目前, 培养猪胚胎的培养基有多种, 其中NCSU-23 是最常用的胚胎培养基<sup>[39]</sup>, 也是目前公认较好的胚胎培养基。然而, 与体内培养的胚胎相比, NCSU-23 还有不足, 胚胎发育延迟, 细胞数较少。最近, Yoshioka等人<sup>[35]</sup>研究出一种新的猪胚胎培养基PZM-3, 此培养液基于猪的输卵管液, 并补充氨基酸。有研究表明, NCSU-23 和PZM-3 在 5%和 20%氧分压下体外培养猪核移植胚胎, 在低氧下都有利于猪胚胎的体外发育, 这和本研究结果是一致的<sup>[36]</sup>。

卵母细胞的来源直接影响着核移植的效率。卵母细胞来源有经产母猪或初情期前母猪。通常体内成熟的卵要比体外成熟的卵好; 经产母猪体外成熟的卵比初情期前母猪体外成熟的卵要好, 体现在克隆胚胎的发育、胎儿的出生上<sup>[12,26]</sup>。初情期前母猪卵巢的来源丰富, 屠宰场屠宰的母猪一般在 5~6 月龄, 正处在母猪的初情期前。我们采集的卵巢均来自初情期前的母猪, 发现其成熟质量受季节、批次的影响很大。在卵巢表面, 有一半以上的卵泡直径小于 2 mm, 卵泡的直径大部分处于 2~4 mm, 大卵泡也不多, 抽取出来的卵子大多是卵丘细胞稀少, 胞质不均匀, 有黑斑及裸卵等现象。因此采卵时优先采集中等大小(2~4 mm)的卵泡, 挑选卵丘包裹 3 层以上、致密、胞质均匀的COCs培养。利用初情期前母猪的卵母细胞, 我们获得了较高的囊胚率并得到了克隆猪。以上结果表明, 利用初情期前母猪的卵母细胞, 克隆胚胎培养在低氧条件下, 是生产克隆猪的一条有效途径。

本研究共移植 3 头受体母猪(经产), 移植后 30 d 用B超检测确定有前 2 头妊娠, 妊娠率为 66.7% (2/3), 而平均水平为 30%~50%。代孕母猪B790 怀孕到期并生下 3 头仔猪, 本研究克隆猪的出生率 1.3% (3/230), 超过了公认的难度效率 1%。出生的 3 头猪, 1 头存活, 出生后一直很健康, 出生重 1130 g, 而自然繁殖香猪胎儿平均出生重 700 g 左右(出生重正常范围在 400~950 g), 这与克隆猪出生重偏小<sup>[7,40]</sup>的报道相反, 有待进一步研究; 其余 2 头中有 1 头为死产, 而且伴有脊柱裂, 上颌裂等发育异常, 右肾缺乏等畸形现象; 另 1 头发育缺陷严重, 胸腹腔脏器全部暴露在外, 而且脊柱, 四肢骨骼都呈现不同程度畸形。克隆动物出现发育缺陷以及围产期死亡是长期困扰核移植克隆技术向实用化发展的一个障碍。而克隆猪出现的发

育畸形问题近两年报道日益增多。综上所述, 我们的结果进一步说明了猪的体细胞克隆难度很大。因此, 有必要开展更深入系统的研究, 以期得到更为优化的生产克隆猪的技术平台, 并研究体细胞重新程序化的机理, 才能真正解决克隆猪效率低和畸形的问题。

致谢 感谢中国实验用小型猪繁育场厂长王锐成、北京市第五肉联厂厂长刘国哲在实验方面提供的帮助; 感谢北京东方联鸣公司王少华工程师在受体母猪妊娠检测上提供的帮助; 感谢河北明慧养猪公司张富生场长对克隆仔猪的产后护理; 感谢公安部二所胡兰、李万水工程师和浙江大学赵莉莉对克隆猪进行的遗传鉴定。本研究为国家重点基础研究发展规划(批准号: G20000161)、国家高技术研究发展计划(批准号: 2003AA205102)和北京市自然科学基金(批准号: 5030001)的资助项目。

## 参 考 文 献

- 1 陈大元, 李劲松, 韩之明, 等. 体细胞克隆牛: 供体细胞和受体的影响. 科学通报, 2003, 48(8): 768~773[摘要]
- 2 龚国春, 戴蕴平, 朱化彬, 等. 供体细胞类型对体细胞克隆牛生产效率的影响. 中国科学, C辑, 2004, 34(3): 257~262[摘要]
- 3 王玉阁, 邹贤刚, 成国祥, 等. 由胎儿成纤维细胞而来的克隆山羊(*Capra hircus*). 科学通报, 1999, 44(21): 2319~2323
- 4 郭继彤, 李煜, 安志兴, 等. 成年耳细胞克隆山羊(*Capra hircus*). 中国科学, C辑, 2002, 32(1): 77~83[摘要]
- 5 Gou KM, An XR, Guan H, et al. Transgenic twin lambs cloned by granulosa cells. Cloning Stem Cells, 2003, 5(1): 71~78
- 6 张运海, 潘登科, 孙秀柱, 等. 利用体细胞核移植技术生产表达绿色荧光蛋白的猪转基因克隆胚胎. 中国科学, C辑, 2005, 35(5): 439~445[摘要]
- 7 Polejaeva I A, Chen S H, Vaught T D, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. Nature, 2000, 407: 86~90[DOI]
- 8 Martinez Diaz M A, Suzuki M, Kagawa M, et al. Effects of cycloheximide treatment on *in-vitro* development of porcine parthenotes and somatic cell nuclear transfer embryos. Jpn J Vet Res, 2003, 50(4): 147~155
- 9 Lai L, Prather R S. A method for producing cloned pigs by using somatic cells as donors. Methods Mol Biol, 2004, 254: 149~164
- 10 龚国春, 戴蕴平, 樊宝良, 等. 以不同类型的转基因细胞为核供体生产牛的转基因克隆胚胎. 中国科学, C辑, 2003, 33(6): 54~60
- 11 Onishi A, Iwamoto M, Akita T, et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. Science, 2000, 289(5482): 1188~1190[DOI]
- 12 Betthausen J, Forsberg E, Augenstein M, et al. Production of cloned pigs from *in vitro* systems. Nat Biotechnol, 2000, 18(10): 1055~1059[DOI]
- 13 Bondioli K, Ramsoondar J, Williams B, et al. Cloned pigs generated from cultured skin fibroblasts derived from a H-transferase

- transgenic boar. *Mol Reprod Dev*, 2001, 60(2): 189~195[DOI]
- 14 Yin X J, Tani T, Yonemura I, et al. Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes. *Biol Reprod*, 2002, 67(2): 442~446[DOI]
- 15 Park K W, Lai L, Cheong H T, et al. Mosaic gene expression in nuclear transfer-derived embryos and the production of cloned transgenic pigs from ear-derived fibroblasts. *Biol Reprod*, 2002, 66(4): 1001~1005[DOI]
- 16 Park K W, Cheong H T, Lai L, et al. Production of nuclear transfer-derived swine that express the enhanced green fluorescent protein. *Anim Biotechnol*, 2001, 12(2): 173~181[DOI]
- 17 Lai L, Kolber-Simonds D, Park K W, et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, 2002, 295(5557): 1089~1092[DOI]
- 18 Dai Y, Vaught T D, Boone J, et al. Targeted disruption of the alpha-1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(3): 251~255[DOI]
- 19 Phelps C J, Koike C, Vaught T D, et al. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science*, 2003, 299(5605): 411~414[DOI]
- 20 De Sousa P A, Dobrinsky J R, Zhu J, et al. Somatic cell nuclear transfer in the pig: Control of pronuclear formation and integration with improved methods for activation and maintenance of pregnancy. *Biol Reprod*, 2002, 66(3): 642~650[DOI]
- 21 Boquest A C, Grupen C G, Harrison S J, et al. Production of cloned pigs from cultured fetal fibroblast cells. *Biol Reprod*, 2002, 66(5): 1283~1287[DOI]
- 22 Ramsoondar J J, Machaty Z, Costa C, et al. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-knockout cloned pigs expressing human alpha 1,2-fucosyltransferase. *Biol Reprod*, 2003, 69(2): 437~445[DOI]
- 23 Lai L, Park K W, Cheong H T, et al. Transgenic pig expressing the enhanced green fluorescent protein produced by nuclear transfer using colchicine-treated fibroblasts as donor cells. *Mol Reprod Dev*, 2002, 62(3): 300~306[DOI]
- 24 Lee J W, Wu S C, Tian X C, et al. Production of cloned pigs by whole-cell intracytoplasmic microinjection. *Biol Reprod*, 2003, 69(3): 995~1001[DOI]
- 25 Walker S C, Shin T, Zaunbrecher G M, et al. A highly efficient method for porcine cloning by nuclear transfer using *in vitro*-matured oocytes. *Cloning Stem Cells*, 2002, 4(2): 105~112[DOI]
- 26 Hyun S, Lee G, Kim D, et al. Production of nuclear transfer-derived piglets using porcine fetal fibroblasts transfected with the enhanced green fluorescent protein. *Biol Reprod*, 2003, 69(3): 1060~1068[DOI]
- 27 Fujimura T, Kurome M, Murakami H, et al. Cloning of the transgenic pigs expressing human decay accelerating factor and n-acetylglucosaminyltransferase. *Cloning Stem Cells*, 2004, 6(3): 294~301
- 28 Hoshino Y, Uchida M, Shimatsu Y, et al. Developmental competence of somatic cell nuclear transfer embryos reconstructed from oocytes matured *in vitro* with follicle shells in Miniature Pig. *Cloning Stem Cells*, 2005, 7(1): 17~26[DOI]
- 29 Kolber-Simonds D, Lai L, Watt S R, et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase null pigs by means of nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(19): 7335~7340[DOI]
- 30 Takahagi Y, Fujimura T, Miyagawa S, et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase gene knockout pigs expressing both human decay-accelerating factor and N-acetylglucosaminyltransferase. *Mol Reprod Dev*, 2005, 71(3): 331~338[DOI]
- 31 Watanabe S, Iwamoto M, Suzuki S, et al. A novel method for the production of transgenic cloned pigs: Electroporation-mediated gene transfer non-cultured cells and subsequent selection with puromycin. *Biol Reprod*, 2005, 72(2): 309~315[DOI]
- 32 Holker M, Petersen B, Hassel P, Kues WA, Lemme E, Lucas-Hahn A, Niemann H. Duration of *in vitro* maturation of recipient oocytes affects blastocyst development of cloned porcine embryos. *Cloning Stem Cells*, 2002;7(1): 35~44[DOI]
- 33 Fischer B, Bavister B D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil*, 1993, 99(2): 673~679
- 34 Johnson M H, Nasr-Esfahani M H. Radical solutions and cultural problems: Could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*? *Bioessays*, 1994, 16(1): 31~38[DOI]
- 35 Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, et al. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol Reprod*, 2002, 66(1): 112~119[DOI]
- 36 Im G S, Lai L, Liu Z, et al. *In vitro* development of preimplantation porcine nuclear transfer embryos cultured in different media and gas atmospheres. *Theriogenology*, 2004, 61(6): 1125~1135[DOI]
- 37 Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, et al. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology*, 2004, 62(7): 1186~1197[DOI]
- 38 Berthelot F, Terqui M. Effects of oxygen, CO<sub>2</sub>/pH and medium on the *in vitro* development of individually cultured porcine one- and two-cell embryos. *Reprod Nutr Dev*, 1996, 36(3): 241~251
- 39 Petters R M, Wells K D. Culture of pig embryos. *J Reprod Fertil Suppl*, 1993, 48: 61~73
- 40 Lai L, Prather R S. Production of cloned pigs by using somatic cells as donors. *Clon Stem Cells*, 2003;5(4): 233~241[DOI]

(2005-09-26 收稿, 2005-12-19 接受)