

牛体细胞核移植技术研究进展

王振飞 李煜* 梁琳

(内蒙古大学哺乳动物生殖生物学与生物技术教育部重点实验室, 呼和浩特 010021)

摘要 对近年来牛体细胞核移植技术研究的进展作一综述。其中包括: 供体细胞种类、传代次数和所处细胞周期的选择; 对供体细胞的特殊处理; 卵母细胞的采集; 传统去核方法的优化、去透明带核移植技术的建立与发展; 胚胎重构、激活和体外培养条件的比较与改进等内容。

关键词 牛; 体细胞; 核移植

世界首例体细胞克隆绵羊“多莉”的降生, 开辟了体细胞核移植技术的新纪元, 改写了部分生物学理论并在全世界范围内掀起了体细胞核移植技术研究的热潮。牛是一种重要的家畜, 其体细胞核移植技术更是被各国科学家进行了广泛而深入的研究, 取得了不少成果。时至今日全世界已有数百头体细胞克隆牛降生, 国内也有不少成功报道。

1 供体细胞的准备

1.1 供体细胞的来源

进行核移植首先要选择合适的供体细胞种类。迄今已有胎儿、成体成纤维细胞、颗粒细胞、卵丘细胞、输卵管上皮细胞、乳腺上皮细胞等多种体细胞被用作核供体成功生产出克隆牛。但哪一种细胞支持更高的克隆效率呢? Kubota等^[1]在相同条件下使用乳腺上皮细胞、皮肤成纤维细胞、卵丘细胞三种供体进行比较试验, 发现卵丘细胞组获得最高的囊胚发育率(23%, 34%, 57%), 并且其所得的6头牛犊中有4头存活到了成年, 皮肤成纤维细胞所得的4头牛犊中无一存活到成年, 而乳腺上皮细胞则产犊率为零。所以, 他们认为: 在这三种细胞中卵丘细胞是最佳的供体类型。Forsberg等^[2]证实卵丘细胞为供体时, 其产犊率(15.2%)高于胎儿生殖嵴细胞(9%)和胎儿、成体成纤维细胞(5%, 5%)为供体。Kato等^[3,4]比较了颗粒细胞、输卵管上皮细胞和肝、皮肤等组织来源的细胞后, 认为颗粒细胞和输卵管上皮细胞是较适宜的供体类型。龚国春等^[5,6]的实验也证实, 对于非转基因细胞, 胎儿输卵管上皮细胞所得重构胚的囊胚发育率(41.5%)显著高于胎儿成纤维细胞(37.9%)、卵丘细胞(35.1%)、成体成纤维细胞(29.4%); 对于转GFP基因的细胞, 胎儿输卵管上皮细胞和卵丘细胞的重构胚囊胚发育率

(49.1%, 44.6%)显著高于胎儿成纤维细胞(37.2%)和胎儿卵巢上皮细胞(22.5%), 而胎儿输卵管上皮细胞和卵丘细胞之间的差异不显著。综合以上材料, 输卵管上皮细胞和卵丘细胞是较理想的供体类型。

大部分实验中所使用的供体细胞都来自于经反复传代的细胞系, 从目前的报道来看从传2代到传16代, 甚至36代的细胞都有人使用, 哪一个较为适宜呢? Jang等^[7]证实供体细胞培养时间过长, 会增加重构胚中凋亡卵裂球的数目。Roh等^[8]也发现对于转GFP基因的胎儿成纤维细胞, 使用传8~16代的细胞其囊胚发育率(18.9%)显著高于用传17~32代的细胞(10.5%)。看来传16代以上的细胞是不适合于作供体的。在16代以下, Kubota等^[1]证明用传10代的细胞其囊胚发育率(37%)显著高于用传5代(21%)和15代(33%)的细胞。但Arat等^[9]则发现用传15代的细胞其囊胚发育率显著高于用传10、11、13代的细胞。看来传10代与15代是比较合适的选择, 但还需要更多的实验进一步全面比较, 以圆满解决这一问题。

1.2 供体所处细胞周期

在“多莉”的生产过程中, Wilmut等^[10]使用血清饥饿使供体细胞处于G₀期, 并认为这是成功的关键之一。所以此后大部分学者在牛的体细胞核移植中也使用经血清饥饿处于G₀期的细胞作供体。但后来Gibelli等^[11]用活跃分裂的胎儿成纤维细胞(56%为G₁期)为供体, 成功的克隆出4头牛犊, 证明了非G₀期细胞也可作为核供体。由于这4头牛犊很可能是来源于G₁期细胞, 一些学者就尝试使用G₁期

收稿日期: 2005-11-03 接受日期: 2006-02-16

国家自然科学基金(No.30460054)、内蒙古自治区自然科学基金(No.200408020405)资助项目

*通讯作者。Tel: 0471-4995867-8017, E-mail: liyu_cn@hotmail.com

的细胞作供体, 并比较其与 G_0 期供体的效果: Kasinathan 等^[12]发现, 在体外阶段两种供体细胞的克隆效率差异不显著, 但在胚胎移植后, G_1 期供体组产下 5 头牛犊, 而 G_0 期供体组无一例能进入妊娠的后 3 个月, 所以他们认为 G_1 期细胞作供体对胚胎后 3 个月的发育更为有利; 但 Wells 等^[13]的实验有不同结果, 他们发现, 对于非转基因细胞, G_0 期供体比 G_1 期供体支持更高的产犊率, 而对于转基因的细胞, G_1 期供体表现出显著增高的产犊率和到断奶期的存活率。目前虽然得到不少 G_1 期来源的牛犊, 但供体处于哪一个细胞周期更有利还有待深入探讨。

1.3 血清饥饿的问题

使用 G_0 期供体时最常用的办法就是血清饥饿, 对于生长期的细胞, 一般饥饿时间在 7 天左右, 对于完全汇合的细胞选择 3~5 天为宜^[14], 血清饥饿 11 天以上将显著降低重组胚的囊胚发育率^[15]。有报道显示血清饥饿会对细胞产生一些不利影响如减少细胞存活率、增加 DNA 片断化等^[16], 所以有些学者尝试用其他方法得到 G_0 期细胞: Kasinathan 等^[12]证实, 让细胞生长到高度汇合可比血清饥饿更有效的使细胞处于 G_0 期且重构胚的体外发育无显著差异。Hayes 等^[17]也发现, 对卵丘细胞和成体成纤维细胞, 用高度汇合法得到 G_0 期细胞的比率较血清饥饿法略微高一点, 两种方法的囊胚率几乎一样, 并且随血清饥饿时间的延长, 处于 G_0 期的细胞比例会下降一些。Gibbons 等^[16]发现, 用 CDK-2 的专一性抑制剂 roscovitine 可比血清饥饿更有效的使细胞处于 G_0/G_1 期(82.7% vs. 76.7%), 而且所得囊胚内细胞团细胞数目增多(142.8±6.0 vs. 86.8±14.5), 在胚胎移植后显著减少了怀孕晚期的流产, 显著提高了产犊率(11.3% vs. 3.3%)。

1.4 对供体细胞的特殊处理

Sullivan 等^[18]先用链球菌溶血素增加供体细胞的通透性, 而后将供体细胞置于 M 期细胞的提取液中, 这样供体细胞会发生核膜崩解、染色体凝集, 此后再进行核移植操作可以克服普通核移植导致的一些缺陷, 如原核期就有 Lamin A/C 表达, 原核中 TBP 浓度增高等。胚胎移植后, 还可以提高分娩 1 个月后健康存活牛犊的比例。造成这样的原因可能是: 在供体核预先的凝集过程中, 一些可溶性因子与染色体分离, 这样在移入受体胞质后, 母型调控因子能较容易的与染色质接近, 利于核的重新编程。

Park 等^[19]发现, 用血红蛋白或 β - 巯基乙醇处

理供体细胞可有效的抑制重构胚的凋亡, 改善植入前胚胎的发育。尤以 β - 巯基乙醇的效果为好, 它的处理组紧密化桑椹胚发育率、囊胚内细胞团数目及内细胞团数 / 滋养层细胞数都有显著提高。这可能是由抗氧化剂能保护细胞, 避免染色质发生异常变化的缘故。

表观遗传修饰在基因表达调控、细胞分化中起重要作用, 用作核供体的各种体细胞, 其表观遗传修饰在重构胚的早期发育中能否正常重建呢? 目前至少可证明: 克隆牛桑椹胚、囊胚中, 无论单一序列^[20]还是重复序列^[21], 其甲基化水平明显高于正常胚胎, 与供体细胞的水平相似。这说明在正常早期胚胎发育中的基因组去甲基化在克隆胚中不能完全进行。所以一些学者试图降低供体细胞的甲基化水平以利于重构胚的正常发育。但 Jones 等^[22]用去甲基化剂 5-aza-2'-deoxycytidine 处理供体细胞后反而降低了克隆胚的囊胚发育率, 这可能是由于 5-aza-2'-deoxycytidine 本身具有毒性, 其他学者也没有成功的报道, 看来这一思路虽然不错, 但合适的试剂与合理的剂量及处理时间还需要摸索。

Lacham-Kaplan 等^[23]用离子霉素预激活供体细胞提高了重构胚的卵裂率与囊胚率。这可能是由于: 预激活因素可以引起供体细胞的活化, 供体细胞在移入卵母细胞内之前就开始恢复细胞活动并为 DNA 的合成做好充分的准备, 这样的细胞注入后与受体细胞在周期上可以取得较好的协调性, 对发育有利^[14]。

2 受体卵母细胞的采集

目前大部分实验都采用从屠宰牛卵巢中抽吸卵丘-卵母细胞复合体而后体外成熟的方法获得受体卵母细胞, 该法既经济又简便, 但美中不足的是这样获得的卵母细胞其胞质环境(特别是其中的线粒体基因组)不清, 且混杂不一, 导致得到的克隆牛只在核基因组上一致而在胞质遗传上并不一致, 还不能称为真正的克隆牛。而数量遗传分析表明: 线粒体基因组对牛的产奶、生殖等一些重要生理活动产生很大影响^[24], 有实验证明^[25]: 受体线粒体基因组控制区中 11 个核苷酸位点的不同就可以使可移植胚发育率产生显著差异, 这就要求进行克隆牛时仅选取性状优良个体的体细胞作供体还不够, 还要保证受体卵母细胞中的线粒体基因组与供体核基因组相协调。Bruggerhoff 等^[25]对这个问题进行了初步探讨, 他们使用超声波引导的活体卵泡穿刺法, 从属于已知母本来源家系的牛吸得卵丘卵母细胞复合体, 经

体外成熟、去核后用作受体,核移植后获得的可移植囊胚比率为15%,妊娠率为24%,该法为生产具有确定胞质遗传环境的克隆牛提供了一条途径。但由于该法操作费力而且所得的卵母细胞数目有限,用于基础研究尚可,用于工厂化生产还不很理想,这还有待于进一步研究。

Hou等^[26]将玻璃化冷冻后解冻的卵母细胞去核,作为核移植受体,成功的生产出了一头体细胞克隆牛,尽管解冻后的卵母细胞所支持的囊胚率和产犊率还远低于对照组,但它证明了玻璃化冷冻解冻后的卵母细胞可用于核受体,从而使卵母细胞的来源初步摆脱了时间空间的限制。

3 卵母细胞的去核

已报道的去核方法不少,但功能去核法、化学诱导法、蔗糖显示法等多数方法都未能得到广泛使用,目前较流行的是盲吸法和荧光染色法。另外,自1998年以后,去透明带核移植法得到不断丰富发展并由于其简便高效的优点日益引起人们的重视。

3.1 盲吸法

盲吸法以第一极体为参照进行去核,但随体外成熟时间的推移,第一极体与核的位置会发生偏移,因此去核率不太高(60%~70%),卵母细胞胞质损失较多,所以该法关键是提高去核准确率和减少胞质损失,研究者从以下三方面进行了探索。

3.1.1 选择合理的去核时间 目前各实验室选择的去核时间在体外成熟(*in vitro* maturation, IVM) 16~24 h不等,哪一个较好呢?毕春明等^[27]研究了IVM不同时间下第一极体与核的位置关系及卵母细胞的体外成熟率、去核率。他们发现:随IVM时间延长(21 h),卵母细胞成熟率会增高但第一极体与核相对位置的偏移也随之增大,易造成去核失败;而IVM时间缩短(17 h),核与第一极体基本上处于零度角位置关系,仅个别发生偏移,可保证很高的去核率,但卵母细胞成熟率又降低,浪费了卵母细胞。所以,综合考虑去核率与成熟率他们认为应在IVM 19 h进行去核。

3.1.2 半卵盲吸法 传统的去核方法是吸除第一极体及其下方1/3~1/4胞质,而谭世俭等^[28]则吸除第一极体及其下方1/3~1/2的胞质,这样即使核与第一极体的位置发生较大偏移,也可保证将其吸去,所以去核率高达96.3%,再将去核后的半卵去透明带,而后使两个裸露的半卵与一个供体电融合,

这样又补充了卵胞质的数量,最后得到了较高的囊胚发育率(45.1%)。该法其实是将去透明带与盲吸法结合起来,是提高去核率的一个较好方法。

3.1.3 去核手法 目前绝大多数学者使用的去核手法都基本沿用McGrath等^[29]发明的吸引除核法,后来Shiga等^[30]建立了挤压除核法,即在第一极体附近将透明带切开1/3,再用切割针在与切口成垂直方向的位置挤压,从而挤出第一极体及其下方的一小部分胞质。董雅娟等^[31]又发明了点击去核法,该法先于第一极体处切开透明带1/3,而后调整卵母细胞使切口与切割针垂直,固定好卵母细胞后用切割针点击透明带上一点,从而挤出第一极体及其下方一小部分胞质。这样,因为微针和卵的作用面积减小,所以对卵母细胞损伤小、胞质损失少。董雅娟等^[31]比较了三种方法的效果,发现点击法和挤压法的去核率(90.0%, 88.0%)极显著高于吸除法(68.3%),而点击法的囊胚率(34.1%)显著高于挤压法(20.9%)和吸除法(18.0%)。可见:这也是提高盲吸法效果的一个较好手段。

3.2 荧光染色法

比起盲吸法,荧光染色法操作准确、去核成功率、受体胞质损失少,但紫外光对受体细胞的损害是一个问题。李雪峰等^[32]发现照射20 s极显著降低重构胚卵裂率,照射10 s重构胚的发育不受任何影响。看来该法的关键是缩短紫外暴露时间。另外,如能将紫外光的强度衰减,也可降低对受体的损伤^[28]。

3.3 去透明带核移植

去透明带核移植最早由Peura等^[33]在牛的胚胎细胞核移植中使用,其基本过程是:IVM的卵母细胞去掉卵丘细胞后用链霉菌蛋白酶消化掉透明带,用Hochest33342染色,之后于体视显微镜下用微针按压裸卵使其分为两个半卵,在紫外灯下将含有核的半卵捡除,然后将两个不含核的半卵与一个供体细胞靠近并施以直流电脉冲使其融合——因而常被称为去透明带双半卵去核法,最后将重构胚单个培养。这一方法的最大优点是事先去除了透明带,在去核时操作简便快捷,也无需控制特殊的去核针,这样就缩短了操作时间有利于进行工厂化的克隆胚生产。另外,它无需昂贵的显微操作器材,降低了对操作人员的技能要求,有利于更多的实验室进行核移植研究。

此后,Vajta等^[34]和Booth等^[35]同时将该法引入体细胞克隆牛中。Vajta等^[34]坚持了Peura^[33]的手工

克隆操作法,并不断地对其进行了改进完善。首先是融合时使用了 PHA 使供体与两个半卵牢固的粘在一起^[34],克服了带下注射时供体与受体有时会分离使融合失败的缺陷,并且很容易就可使供体受体相互靠近,提高了操作速度^[34];然后又从去核操作液、融合时供体受体的取向、融合时间、培养条件等方面进行了优化,从而使这一不借助显微操作器的核移植方法达到较高的水平。其囊胚发育率(平均 25~30/150 卵母细胞)、胚胎质量(内细胞团-滋养层分化染色、电镜观察)都不差于传统方法的效果,而由于操作简便,平均每得一个囊胚所需时间仅为 6 min^[36];此后, Vajta 等^[37]又发明了化学辅助的导向去核法,从而不需荧光染色也可手工去核,这样没有荧光显微镜也可进行核移植研究;最近,他用“潜水艇培养法”代替了 CO₂ 培养箱,手工克隆法生产出了非洲第一胎克隆牛^[38],使得 CO₂ 培养箱也从核移植所需仪器中省去了。这样,经过 Vajta 等的努力,使得人们可在很简单的条件下高效的生产克隆牛。

Booth 等^[35]、谭世俭等^[28]、Oback 等^[39]则将显微操作技术与去透明带核移植的思路结合起来。Booth 等^[35]的方法与 Peura^[33]基本相同,只是在切割半卵时,切割针用显微操作仪控制而非手工操作。谭世俭的方法前面已述及。Oback 等^[39]没有采取半卵去核的方法,他们将卵母细胞去透明带、荧光染色,而后在紫外灯下直接用一钝的平头吸管将受体的核吸除,这样,无需切割透明带与拉制特殊去核针的繁琐,去核的效率可提高为传统方法的 2 倍。另外,谭世俭等^[28]和 Oback 等^[39]在胚胎重构时都使用了自动排线批量融合,更加提高了操作速度。

来自于小鼠和猪的研究表明:连续核移植可以提高囊胚发育率和克隆效率。但牛的连续核移植一直没能成功,最近, Hall 等^[40]利用手工核移植法结束了这一遗憾。他们先利用 Vajta 等^[36]的方法进行第一轮克隆,在重构胚激活后的 15~17 h 将重构胚(一细胞期)挑出,作为核供体;将体外受精所得合子于受精后 18 h(原核期)去掉透明带,随机切割为两半,染色后挑出无核的那一半作为核受体,最后将核受体与核供体电融合。重构胚经激活、培养、移植后产下一头牛犊。但他们的结果表明牛的连续核移植不具有在小鼠和猪中体现的那些优点。该工作也表明了原核期的合子亦可作为核移植受体。

4 胚胎重构

在透明带完整的核移植中,胚胎重构有带下注

射加电融合法和胞质直接注射法两种。前者目前应用最广,但其缺点有二:一是供体与受体有时无法紧密接触使融合失败,二是融合前要一个一个的对供体受体对手工排线,繁琐费事。后者虽无以上缺点但技术难度大,对操作人员要求高。李雪峰等^[41]的研究表明后者优于前者,而 Liu 等^[42]认为前者优于后者,目前对两种方法的优劣比较还难有定论。

去透明带核移植中大都采用植物凝集素加电融合进行胚胎重构。谭世俭等^[28]和 Oback 等^[39]在融合时都采用了自动排线的方法实现了批量融合,即将多个(5~10 多个)用植物凝集素粘好的供体受体对同时放在两电极间,施以一交变电场,这些供体受体对就可一同完成排线,此时再施以直流电,这一批供体受体对就可同时完成融合,比起手工排线单个融合可极大的提高操作速度。例如:Oback 等^[39]每次同时融合 5~10 个供体受体对速度就可提高 2.5 倍。而在带下注射时自动排线很难实现^[39],这一方面由于此时供体与受体结合得不很紧密,另一方面交变电场自动排线的效果与受体体积/供体体积成反比。所以去透明带半卵去核法是最适宜使用自动排线的了。

5 重构胚的激活

激活的机制目前还不完全清楚。一般认为化学激活强于电激活。目前大都采用两步联合激活法:第一步要引起卵母细胞质内钙离子波动,常用乙醇、钙离子载体、离子霉素、锶离子等。前三者引起的钙离子波动都与正常受精时的钙离子波动很不一样,而锶离子虽可以引起与正常受精时相似的钙离子波动,但在牛上还未有成功的报道。第二步要引起卵母细胞内促成成熟因子活性下降,恢复有丝分裂,常使用 6-DMAP 或 CHX+CCB。来自于孤雌激活的研究表明离子霉素+6-DMAP 可取得最佳的激活效果^[43],但来自于克隆胚激活的研究目前还不能取得一致。

6 重构胚的体外培养

体外培养常用的培养液有 CR1aa^[5]、SOFaaci^[36]等。

Varisangal 等^[44]对培养的气象条件进行了探索,他们使用一种负压气象条件(5% CO₂、8%~10% O₂、300 mmHg)培养重构胚,比常压气象条件可显著提高囊胚发育率。其原因可能是:牛发情时,子宫和输卵管处于紧张状态,子宫管腔中产生了一定程度负压,该环境对初期胚的减数分裂具有支持作用,Varisangal 等所采用的条件正模拟了这种环境。

7 牛与其他动物体细胞核移植工作的简单比较

迄今为止,已获成功的克隆动物还有山羊、绵羊、猪、马、骡子、小鼠、大鼠、猴、猫等许多种。其中山羊、绵羊、猪、小鼠研究的较多,但是所得的克隆后代数都远少于牛,对条件的探索优化也不及牛的深入细致。从已有研究来看,各种动物的核移植过程大致相似,对条件优化的努力方向基本一致。尤其在核移植新方法的探索方面,各种动物间的新方法经常互相借鉴且都取得不错的效果,在供体细胞的选择、处理甚至重构胚的激活方案等方面有越来越多的结果趋于一致,例如:山羊以前常用的激活试剂为细胞松弛素 B,但采用和牛一样的离子霉素+6-DMAP 后效果也很好。所以,牛核移植经验的总结对其他物种的核移植工作有着重要的参考意义。但由于各种动物在卵子大小,透明带和卵质膜的厚度、韧性,早期代谢等方面还存在一些差异,所以在核移植条件的某些方面特别是诸如电融合参数、一些试剂的处理剂量和时间等涉及定量的问题,各物种有其自己的特性,需要具体摸索掌握。

8 小结

目前,经各国学者的努力,核移植各技术环节已取得了较大的进展,囊胚发育率较开始时有了很大的提高,但是诸如克隆胚胎的胎盘异常、胎儿流产率高、大后代综合征、新生儿畸形、死亡率高等问题还不能得到解决,甚至对其原因还不很清楚,可以预见,人们还需要做很多系统深入的研究,以完善该技术并早日实现它的产业化。

参考文献 (References)

- [1] Kubota C *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 990
- [2] Forsberg EJ *et al. Biol Reprod*, 2002, **67**: 327
- [3] Kato Y *et al. Science*, 1998, **282**: 2095
- [4] Kato Y *et al. J Reprod Fertil*, 2000, **120**: 231
- [5] 龚国春等. *中国科学 C 辑 生命科学*, 2004, **34**: 257
- [6] 龚国春等. *中国科学 C 辑 生命科学*, 2003, **33**: 532
- [7] Jang G *et al. Theriogenology*, 2004, **62**: 512
- [8] Roh S *et al. Reprod Fertil Dev*, 2000, **12**: 1
- [9] Arat S *et al. Mol Reprod Dev*, 2001, **60**: 20
- [10] Wilmut I *et al. Nature*, 1997, **385**: 810
- [11] Gibelli JB *et al. Science*, 1998, **280**: 1256
- [12] Kasinathan P *et al. Nat Biotechnol*, 2001, **19**: 1176
- [13] Wells DN *et al. Theriogenology*, 2003, **59**: 45
- [14] 李雪峰等. *动物学研究*, 2003, **24**: 35
- [15] Beyhan Z *et al. Theriogenology*, 2002, **57**: 396
- [16] Gibbons J *et al. Biol Reprod*, 2002, **66**: 895
- [17] Hayes O *et al. Anim Reprod Sci*, 2005, **87**: 181
- [18] Sullivan EJ *et al. Biol Reprod*, 2004, **70**: 146
- [19] Park ES *et al. Mol Reprod Dev*, 2004, **68**: 65
- [20] Kang YK *et al. Nat Genet*, 2001, **28**: 173
- [21] Han YM *et al. Theriogenology*, 2003, **59**: 33
- [22] Jones KL *et al. Mol Reprod Dev*, 2001, **60**: 208
- [23] Lacham-Kaplan O *et al. Theriogenology*, 1999, **51**: 206
- [24] Schutz MM *et al. Livest Prod Sci*, 1994, **37**: 283
- [25] Bruggerhoff K *et al. Biol Reprod*, 2002, **66**: 367
- [26] Hou YP *et al. Theriogenology*, 2005, **64**: 1381
- [27] 毕春明等. *自然科学进展*, 2003, **13**: 997
- [28] 谭世俭等. *广西农业生物科学*, 2003, **22**: 202
- [29] McGrath J *et al. Science*, 1983, **220**: 1300
- [30] Shiga K *et al. Theriogenology*, 1999, **52**: 527
- [31] 董雅娟等. *中国兽医学报*, 2002, **22**: 347
- [32] 李雪峰等. *中国兽医科技*, 2003, **33**: 20
- [33] Peura TT *et al. Mol Reprod Dev*, 1998, **50**: 185
- [34] Vajta G *et al. Cloning*, 2001, **3**: 89
- [35] Booth PJ *et al. Cloning Stem Cells*, 2001, **3**: 139
- [36] Vajta G *et al. Biol Reprod*, 2003, **68**: 571
- [37] Vajta G *et al. Reprod Fertil Dev*, 2004, **16**: 159
- [38] Vajta G *et al. Theriogenology*, 2004, **62**: 1465
- [39] Obach B *et al. Cloning Stem Cells*, 2003, **5**: 3
- [40] Hall VJ *et al. Theriogenology*, 2006, **65**: 424
- [41] 李雪峰等. *中国兽医学报*, 2003, **23**: 400
- [42] Liu JL *et al. Theriogenology*, 2000, **54**: 989
- [43] 李雪峰等. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2002, **30**: 43
- [44] Varisanga MD *et al. Theriogenology*, 2002, **58**: 77

Progress in Somatic Cell Nuclear Transfer of Cattle

Zhen-Fei Wang, Yu Li*, Lin Liang

(Key Laboratory of Mammal Reproductive Biology and Biotechnology, Ministry of Education, Inner Mongolia University, Huhhot 010021, China)

Abstract This review introduces recent progress in bovine somatic cell nuclear transfer including the effects of donor cell types, cell passages, cell cycle stages, treatments of donor cells, recipient oocytes, enucleation manipulations, embryo reconstruction methods, and embryo culture methods on development of cloning embryos.

Key words cattle; somatic cell; nuclear transfer

Received: November 3, 2005 Accepted: February 16, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30460054) and the Natural Science Foundation of Inner Mongolia Municipality (No.200408020405)

*Corresponding author. Tel: 86-741-4995867-8017, E-mail: liyu_cn@hotmail.com