

# 人–兔异种核移植构建克隆胚的实验研究

季静娟, 郭通航, 童先宏, 骆丽华, 周桂香, 傅应云, 刘雨生\*

(安徽医科大学 附属省立医院生殖中心, 安徽 合肥 230001)

**摘要:**“治疗性克隆”是人类最关注的课题之一,而人体细胞核移植是治疗性克隆的基础和前提。异种核移植的方法虽已被引入人体细胞克隆胚的构建,但供体细胞的类型、培养代数及准备方法与其效率之间的关系尚有待探讨。本实验以不同培养代数和不同准备方法的人卵丘细胞、皮肤成纤维细胞和软骨细胞为供体构建了克隆胚,对其发育情况的比较表明,以卵丘细胞为供体时重构胚的体外发育率高于其余二者,差异显著( $P < 0.05$ );不同培养代数的成纤维细胞克隆胚和不同冷藏天数供体细胞克隆胚体外发育率无明显差异。此外,本实验还尝试用荧光原位杂交法检测所构建的异种克隆胚核遗传物质的来源,结果显示来自人体细胞。本研究表明,人–兔异种核移植构建克隆胚切实可行;体细胞的类型与核移植效率相关;供体细胞的体外培养传代对克隆胚的发育并无影响;而冷藏是一种简便有效的供体细胞准备方法;此外,用 FISH 方法对重构胚进行核遗传物质的鉴定切实可行。

**关键词:** 治疗性克隆;核移植;体细胞核移植;异种克隆胚胎

中图分类号: Q813 文献标识码: A 文章编号: 0254–5853 (2005) 04–0416–06

## Experimental Research on the Construction of Cloned Embryos Through Human-rabbit Inter-species Nuclear Transfer

Ji Jing-juan, Guo Tong-hang, Tong Xian-hong, Luo Li-hua,  
Zhou Gui-xiang, Fu Ying-yun, Liu Yu-sheng\*

(Center for Reproductive Medicine, Anhui Medical University Affiliated Provincial Hospital, Hefei 230001, China)

**Abstract:** Therapeutic cloning is one of our major research objectives, and therapeutic cloning is based on human somatic cell nuclear transfer. Though inter-species nuclear transfer has been introduced to construct human somatic cell cloned embryos, the effects of type, passage and preparation method of donor cells on embryo development remain to be determined. In our experiment, cloned embryos were reconstructed with different passage and preparation methods of osso-cartilaginous cell, skin fibroblast and cumulus cells. The cumulus cell embryos show significantly higher development rates than the other two ( $P < 0.05$ ). The development rate of embryos reconstructed with skin fibroblasts of different passage number and somatic cells of different chilling durations show no significant difference. Also, FISH were conducted to detect nuclear derivation of the embryos. The result showed that the nuclei of the inter-species cloned embryo cells came from human. We conclude (1) that cloned embryos can be constructed through human-rabbit inter-species nuclear transfer; (2) different kinds of somatic cell result in different efficiency of nuclear transfer, while *in vitro* passage of the donor does not influence embryo development; (3) refrigeration is a convenient and efficient donor cell preparation method. Finally, it is feasible to detect DNA genotype through FISH.

**Key words:** Therapeutic cloning; Nuclear transfer; Somatic cell nuclear transfer; Inter-species cloned embryo

胚胎干细胞是未分化、具有分化为各种类型细胞潜能的细胞。它的这二大特性使其可能成为修复组织和器官损伤最佳“种子”细胞。但免疫排斥反应问题是胚胎干细胞应用于临床所必须克服的问

题。体细胞核移植技术和胚胎干细胞技术的结合 (Smith, 1998; Solter & Gearhart, 1999) 诞生了“治疗性克隆” (Lanza et al, 1999), 它可从根本上解决上述问题。

\* 收稿日期: 2005–01–13; 接受日期: 2005–04–25

\* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: liuyusheng6@hotmail.com

人体细胞克隆胚的构建是“治疗性克隆”的基础和前提。构建人体细胞克隆胚时存在二大难题。首先是人卵母细胞的短缺问题。异种核移植因而成为科学家们解决这一问题的理想方法 (Wells et al, 1998; Chen et al, 1999)。Lanza et al (1999) 和 Chen et al (2003) 分别报道用该方法构建了人体细胞克隆胚。其次是核移植效率低下的问题。在 Chen et al (2003) 的研究中, 仅就供体细胞提供者的年龄与核移植之间的关系进行探讨, 未对影响核移植效率的其他方面进行研究。因而, 本实验旨在进一步论证异种核移植构建人体细胞克隆胚可行性的基础上, 对供体细胞的类型、培养代数及准备方法与核移植效率之间的关系进行探讨, 期望能找到最适合于构建人体细胞克隆胚的供体细胞。另外, 本研究还尝试用荧光原位杂交的方法对重构胚进行核遗传物质的鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 核供体细胞和受体卵母细胞的准备

成纤维细胞由成年女性颈部手术时丢弃的标本体外培养、传代, 传代时将部分细胞以  $2 \times 10^5/\text{mL}$  的浓度分装于 1.5 mL 的无菌离心管中 4 °C 冷藏保存 (保存时间在 15 d 以内), 至显微操作时直接从 4 °C 取出; IVF 手术时自卵子周围剥取的卵丘细胞备用; 软骨细胞由安徽省立医院的张梅博士惠赠。性成熟期日本大耳兔 PMSG-HCG 促排卵, 注射 hCG 15 ~ 18 h 后处死兔子, TCM199 培养液冲洗输卵管, 回收卵团。

### 1.2 显微操作

将脱去卵丘细胞的兔卵母细胞移入含  $7.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  CB 的  $\text{M}_2$  培养液液滴中, 同时加入供体细胞, 用内径  $15 \mu\text{m}$  的玻璃针吸出第一极体及其下方的  $1/4 \sim 1/3$  胞质 (包括细胞核), 然后从原针吸口处将供体细胞注入透明带下并轻压透明带。

### 1.3 电融合与激活

将重构卵移入盛有融合液的融合槽两电极之间, 用实心玻璃管拨动之, 使供、受体细胞胞质接触面与两电极平行以利融合。融合参数设定为 140 V/mm, 脉宽  $80 \mu\text{s}$ , 2 个电脉冲, 间隔 1 s。融合后的重构卵放入 MS (含 20% FBS 的  $\text{M}_2$ ) 培养液中 38.5 °C、5%  $\text{CO}_2$  环境中培养。20 min 后观察融合情况, 未融合者按上述方法再融合一次, 已融合者进行激活, 激活参数为 140 V/mm, 脉宽  $20 \mu\text{s}$ , 2

个电脉冲, 间隔 1 s。

### 1.4 体外培养

重构胚在 MS (含 20% FBS 的  $\text{M}_2$ ) 培养液中洗涤, 然后放入上述培养液滴中, 38.5 °C、5%  $\text{CO}_2$  环境中培养, 每日观察一次。

### 1.5 细胞固定

选择 4-8 细胞期的成纤维细胞重构胚, 记录供体细胞提供者的性别。链酶蛋白酶溶解透明带后, 吹散卵裂球细胞, 移入已滴有吐温-盐酸 (0.1% Tween 20-0.01 mol/L HCl) 的玻片上, 镜下观察直至细胞溶解, 并做好标记。玻片干后于酒精中脱水各 5 min, 室温下老化过夜。

### 1.6 荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH)

以成年男性外周血淋巴细胞染色体标本为对照。将玻片置于  $(73 \pm 1)^\circ\text{C}$  70% 甲酰胺中变性 5 min 后, 加入已变性的染色体计数探针 (chromosome enumeration probe, CEP, 美国 Vysis 公司生产, 为人染色体特异性) 混合物于玻片的靶区域, 盖上盖玻片后橡皮胶泥封片, 42 °C 杂交过夜。次日分别于  $(73 \pm 1)^\circ\text{C}$  0.4 × SSC/0.3NP-40、室温 2 × SSC/0.1NP-40 中各 1 min 后暗处风干玻片, 每靶区域加入 10  $\mu\text{L}$  DAPI 复染。

### 1.7 结果判定

荧光显微镜下观察, 当细胞同时出现红、绿色信号各一个时, 判定重构胚的性染色体核型为 XY, 仅当同时出现两个绿色信号时判定性染色体的核型为 XX。

### 1.8 统计学方法

采用卡方检验及确切概率法, 当  $P < 0.05$  时表示差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 异种克隆胚

本实验以 3 种体细胞为供体共构建重构卵 361 枚, 各组操作卵数、融合情况、胚胎各阶段发育情况如表 1 所示。

由表 1 可知, 3 组细胞的融合率差异不显著。卵丘细胞组早期发育率显著高于其他 2 组, 软骨细胞组和皮肤成纤维细胞组早期发育率差异不显著。卵丘细胞组囊胚形成率显著高于成纤维细胞组, 本实验中软骨细胞组未获得囊胚。重构胚的发育见图 1。

表 1 人软骨细胞、卵丘细胞、成纤维细胞克隆胚发育情况

Tab. 1 The development of cloned embryos reconstructed with human osseocartilaginous cells, cumulus cells and fibroblasts

组别 Group	操作卵数 No. of oocytes manipulate	融合率 Fusion rate <sup>1</sup> (%)	卵裂率 Cleavage rate <sup>2</sup> (%)	8 细胞胚胎率 Eight-cell embryo rate <sup>3</sup> (%)	桑葚胚率 Morula stage <sup>3</sup> (%)	囊胚率 Blastocyst rate <sup>3</sup> (%)
软骨细胞 Osseocartilaginous cell	67	61.2 (41/67) <sup>a</sup>	39.0 (16/41) <sup>a</sup>	14.5 (8/41) <sup>a</sup>	7.3 (3/41) <sup>a</sup>	
卵丘细胞 Cumulus cell	116	56.9 (66/116) <sup>b</sup>	65.2 (43/66) <sup>b</sup>	53.0 (35/66) <sup>b</sup>	31.8 (21/66) <sup>b</sup>	18.2 (12/66) <sup>b</sup>
成纤维细胞 Fibroblast	178	55.6 (99/178) <sup>a</sup>	42.4 (42/99) <sup>a</sup>	25.3 (25/99) <sup>a</sup>	12.1 (12/99) <sup>a</sup>	6.1 (6/99) <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup> 表示同列数值间差异显著 (卡方检验:  $P < 0.05$ )

<sup>a</sup> and <sup>b</sup> mean that the values in the same column differ significantly ( $\chi^2$  test:  $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup> 融合卵数/显微操作的卵数 (No. of oocyte fused/No. of oocyte manipulated); <sup>2</sup> 分裂至两细胞的胚胎数/培养的重组胚数 (No. of two-cell embryos/No. of reconstructed embryos); <sup>3</sup> 发育至不同细胞时期的胚胎数/培养的重组胚数 (No. of embryos developed to different stage/No. of reconstructed embryos cultured)

表 2 三种培养代数的成纤维细胞克隆胚发育情况比较

Tab. 2 The development of cloned embryos obtained from three passages of fibroblast

培养代数 Passage cultured	操作卵数 No. of oocyte manipulate	融合率 Fusion rate (%)	2-4 细胞胚胎率 2-4 cell embryo rate (%)	囊胚率 Blastocyst (%)
第二代 The 2nd passage	24	58.3 (14/24) <sup>a</sup>	35.7 (5/14) <sup>a</sup>	7.1 (1/14) <sup>a</sup>
第三代 The 3rd passage	29	51.7 (15/27) <sup>a</sup>	66.7 (10/15) <sup>b</sup>	
第四代 The 4th passage	66	35.1 (13/37) <sup>a</sup>	35.1 (13/37) <sup>a</sup>	10.8 (4/37) <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup> 表示同列数值间差异显著 (卡方检验:  $P < 0.05$ )

<sup>a</sup> and <sup>b</sup> mean that the values in the same column differ significantly ( $\chi^2$  test:  $P < 0.05$ ).

## 2.2 培养传代对重构胚体外发育的影响

本实验中成纤维细胞的培养代数为一—六代, 对以第二至四代为供体 (准备方法随机) 所构建的重构胚发育情况进行了比较 (表 2)。

由表 2 可知, 3 组重构卵融合率差异不显著。第三代细胞组重构胚的 2-4 细胞胚胎的发育率明显高于其余 2 组, 差异极显著 ( $P < 0.01$ ); 而且除第二代细胞组重构胚外, 其余 2 代细胞组重构胚均有发育至囊胚者, 只是囊胚形成率较低且差异不显著。

## 2.3 不同冷藏天数对重构胚体外发育的影响

本实验以冷藏方法准备供体细胞共构建重构卵

154 枚, 对以新鲜细胞和冷藏 2、5、9 d 的成纤维细胞为供体时重构胚的发育情况进行了比较 (表 3)。

由表 3 可知, 与新鲜细胞组相比, 冷藏细胞各组的融合率、早期胚胎发育率差异均不显著, 本次实验未获得新鲜细胞组和冷藏 9 d 细胞组囊胚。

## 2.4 FISH 结果

本实验对 24 枚卵裂球行 FISH 检测, 有 22 枚卵裂球出现清晰、明亮的 2 个信号, 可判定重构胚的遗传物质来自人体细胞, 与核供体细胞的性染色体类型一致 (图 2)。

表 3 不同冷藏天数的成纤维细胞构建克隆胚发育情况的比较

Tab. 3 The development of cloned embryos reconstructed from fibroblast chilling for different days

冷藏天数 Chilling duration (d)	操作卵数 No. of oocyte manipulate	融合率 Fusion rate (%)	2-4 细胞胚胎率 2-4 cell embryo rate (%)	囊胚率 Blastocyst rate (%)
0	24	41.7 (10/24) <sup>a</sup>	50 (5/10) <sup>a</sup>	
2	32	56.3 (18/32) <sup>a</sup>	38.9 (7/32) <sup>a</sup>	11.1 (2/32) <sup>a</sup>
5	17	58.8 (10/17) <sup>a</sup>	60 (6/10) <sup>a</sup>	10 (1/10) <sup>a</sup>
9	22	63.6 (14/22) <sup>a</sup>	35.7 (5/14) <sup>a</sup>	

<sup>a, b</sup> 表示同列数值间差异显著 (卡方检验:  $P < 0.05$ )

<sup>a</sup> and <sup>b</sup> mean that the values in the same column differ significantly ( $\chi^2$  test:  $P < 0.05$ ).

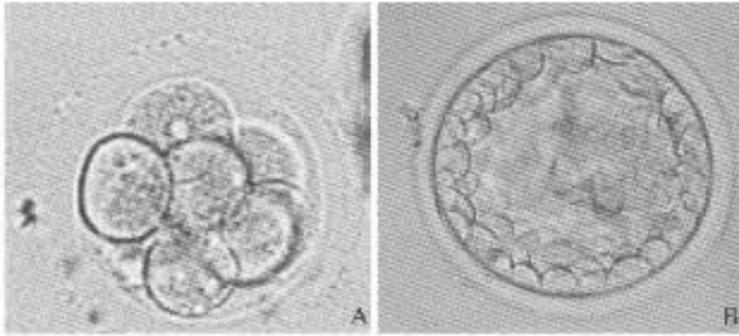


图 1 重构胚的发育

Fig. 1 Development of reconstructed embryo

A. 早期发育阶段的重构胚 (Early stage embryo); B. 囊胚阶段的重构胚 (Blastocyst)

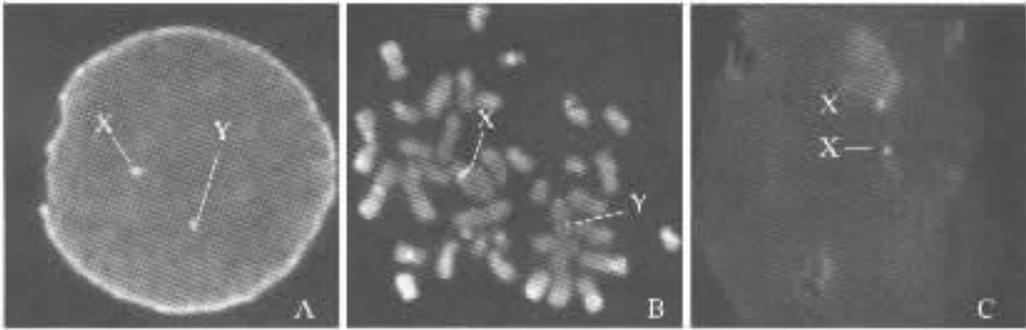


图 2 对重构胚的 FISH 检测

Fig. 2 FISH detection of cloned embryos

A. 男性外周血淋巴细胞间期 (Male peripheral interphase lymphocyte cell); B. 男性外周血淋巴细胞中期 (Male peripheral middlephase lymphocyte); C. 重构胚胎卵裂球细胞 FISH 检测 (Cleavage cell in reconstructed embryos)

### 3 讨论

“治疗性克隆”的设想已提出多年，其诱人的应用前景激起了众多科研工作者的研究热情。人们首先关注的是人体细胞可否被重编程并发育到囊胚阶段，已有研究肯定了这一点 (Lu et al, 2003; Hwang et al, 2004)。那么，其他哺乳动物的卵母细胞可否支持其恢复全能性并重编程呢？Lanza et al (1999) 及 Chen et al (2003) 分别报道用异种核移植的方法构建人体细胞克隆胚，后者同时获取了胚胎干细胞。经核型分析、同源染色体分析、原位杂交、PCR 和免疫组化染色等多种鉴定，克隆胚细胞及其衍生细胞-核移植胚胎干细胞均起源于被兔卵母细胞重编程的人体细胞 (Chen et al, 2003)。本研究对其可行性进行了进一步的论证，结果说明兔卵母细胞可支持人体细胞重编程，与 Chen et al (2003) 的报道相符。

尽管核移植近年来取得了长足的发展，但该技术效率低下是不争的事实。提高核移植的效率除可以从分子水平对其影响因素进行探讨外，还有赖于各组成环节效率的提高。其中，供体细胞的选择、准备方式以及重构胚鉴定方法是重要的方面。

#### 3.1 供体细胞的类型与核移植之间的关系

对核移植机理的研究表明，供/受体细胞的细胞周期是否相容是决定重构胚能否正常发育的关键。由于本实验所用的受体细胞为 M II 期卵母细胞，其胞质中成熟促进因子 (maturation promoting factor, MPF) 的活性很高。供核暴露在该环境中后会发生核膜破裂 (nuclear envelop breaks down, NEBD) 以及早熟染色质凝集 (prematurely chromosomes condense, PCC)，接着进行 DNA 的复制。G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期供体核处于 DNA 合成前期，移入受体胞质后，DNA 复制一次后分裂，可产生 2 个正常染色体倍数的子细胞；与 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞不同的是 G<sub>2</sub>/M 期细胞

会有四倍体 DNA, 导入受体胞质后, 只有顺利排出极体的重构胚才能正常发育; 而 S 期细胞处于 DNA 合成期, 为供体时, 则会由于 NEBD 和 PCC, 导致碎片化产生。所以, 以  $G_0/G_1$  期细胞为供体核移植效率最高 (Campbell et al, 1993; Wolf et al, 1998; Cambell et al, 1996)。由于卵丘细胞增殖速度快, 处于  $G_0/G_1$  期的细胞数目就较多, 因此以卵丘细胞为供体时核移植效率较高 (Kato et al, 2000)。然而由于卵丘细胞来源困难, 而且男性病人体内无卵丘细胞, 使其应用受到一定的限制。虽然以皮肤成纤维细胞为供体效率比卵丘细胞低, 但取材较容易, 不失为一个首选的供体细胞类型。

### 3.2 供体细胞的培养代数与核移植之间的关系

供体细胞的培养代数与核移植效率之间的关系也是人们研究的热点之一 (Arat & Rzcudlo, 2001; Kubota et al, 2000)。普遍的观点认为 (Kato et al, 1998; Lanza et al, 2000), 传代对核移植效率有不利的影响 (Liu, 2000)。但是否培养代数与核移植的效率呈负相关; 还是超过一定的培养代数后, 培养代数才会对核移植的效率产生影响, 尚无定论。本实验结果初步说明, 在一定的范围内, 培养代数对核移植无明显影响, 但此“范围”限于多少代之内, 尚有待进一步探讨。

### 3.3 供体细胞的准备方法与核移植效率之间的关系

核移植过程中, 供体细胞的准备是一项受许多因素制约却又十分重要的环节。目前, 供体细胞的准备方法主要为: 1) 新鲜分离 (Wakayama et al, 1998); 2) 培养传代, 包括对细胞进行血清饥饿 (Wilmot et al, 1997) 和不进行血清饥饿 2 种方法 (Cibelli et al, 1998)。这些方法不仅烦琐, 而且细胞在传代的过程中, 染色体变异的可能性增大 (Liu, 2000)。因此, 探索一种简便有效的供体细胞准备方法对提高核移植效率有很重要的价值。Liu (2000) 在克隆牛实验中采用将供体细胞冷藏备用的方案, 结果显示, 冷藏不仅可以减小染色体变异的可能性, 还可以简化实验程序, 是一种简便有效的供体细胞准备方法。本实验也引入了该方法, 结果证实, 同样适用人体细胞克隆胚的构建。

### 3.4 用 FISH 对重构胚进行鉴定的可行性和优点

目前对异种重构胚进行鉴定的方法主要有染色体核型分析、PCR 等 (Hwang et al, 2004)。这些方法或受标本量的限制, 较难操作; 或因实验步骤繁多, 混杂因素多, 结果并不理想。用人 X、Y 染色体特异性探针进行荧光原位杂交的技术较为成熟 (Munne et al, 1994; Laverge et al, 1997; Delhanty et al, 1997); 所用探针具有种属特异性; 结果相对准确、可靠。本实验中首次运用 FISH 方法对所构建的异种克隆胚进行检测, 结果表明用该方法对核移植重构胚进行鉴定切实可行, 应是较为理想的判断重构胚核遗传物质来源的方法之一。线粒体是细胞中重要而独特的细胞器, 哺乳动物的线粒体有着自己的遗传物质——线粒体 DNA。核移植过程中不可避免地会将部分或全部供体细胞的胞质带入受体卵内, 重构胚胞质中含有供/受体两种来源的线粒体。目前人们最关心的是从人-兔异种核移植获取的胚胎干细胞能否用于临床治疗, 因而对人体细胞重构胚发育过程中及到所形成的干细胞分化后线粒体构成变化的研究至关重要 (Yang et al, 2004), 有待深入探讨。

## 4 结论

1. 去核的兔卵母细胞可支持人体细胞核进行重编程, 以人体细胞为核供体, 去核的兔卵母细胞为受体构建克隆胚切实可行。
2. 以卵丘细胞为供体核移植效率高, 但其来源受到一定的限制, 而皮肤成纤维细胞取材方便, 不失为一种较理想的供体细胞类型。
3. 一定范围内, 供体细胞的传代对核移植的效率并无显著影响。
4. 在人体细胞异种克隆胚的构建中, 冷藏是一种简便、有效的核供体细胞准备方法。
5. 单细胞荧光原位杂交是鉴定重构胚中核遗传物质来源的简单、准确的方法。

伦理管理: 本研究遵照国家科技部和卫生部联合颁布的《人胚胎干细胞研究伦理指导原则》12 条执行。

## 参考文献：

- Arat S, Rzuicidlo SJ. 2001. Production of transgenic bovine embryos by transfer of transfected granulose cells into enucleated oocytes [ J ]. *Mol. Reprod. Dev.*, **60**: 20 - 26.
- Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a culture cell line [ J ]. *Nature*, **380**: 64 - 66.
- Campbell KH, Ritchie WA, Wilmut I. 1993. Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: Implications for deoxyribonucleic acid replication and development [ J ]. *Biol. Reprod.*, **49**: 933 - 942.
- Chen DY, Sun QY, Liu JL, Li GP, Lian L, Wang MK, Han ZM, Song XF, Li JS, Sun X, Chen YC, Zhang YP, Ding B. 1999. The giant panda (*Ailuropoda mealanolenca*) somatic nuclei can dedifferentiate in rabbit ooplasm and support early development of the reconstructed egg [ J ]. *Science in China ( Series C )*, **29**: 324 - 329. [ 陈大元, 孙青原, 刘冀珑, 李光鹏, 廉莉, 王敏康, 韩之明, 宋祥芬, 李劲松, 孙强, 陈玉村, 张亚平, 丁波. 1999. 大熊猫供体细胞在兔卵胞质中可去分化而支持早期重构胚的发育. 中国科学 ( C 辑 ), **29**: 324 - 329. ]
- Chen Y, He ZX, Liu A, Wang K, Mao WW, Chu JX, Lu Y, Fang ZF, Shi YT, Yang QZ, Chen DY, Wang MK, Li JS, Huang SL, Kong XY, Shi YZ, Wang ZQ, Xia JH, Long ZG, Xue ZG, Ding WX, Sheng HZ. 2003. Embryonic stem cells generated by nuclear transfer of human somatic nuclei into rabbit oocytes [ J ]. *Cell Research*, **13**: 251 - 264.
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA, Robl JM. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts [ J ]. *Science*, **280**: 1256 - 1258.
- Delhanty JD, Harper JC, Ao A, Handyside AH, Winston RM. 1997. Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients [ J ]. *Hum. Genet.*, **99**: 755 - 760.
- Hwang WS, Ryu YJ, Park JH, Park ES, Lee EG, Koo JM, Jeon HY, Lee BC, Kang SK, Kim SJ, Ahn C, Hwang JH, Park KY, Cibelli JB, Moon SY. 2004. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst [ J ]. *Science*, **303**: 1669 - 1674.
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult [ J ]. *Science*, **282**: 2095 - 2098.
- Kato Y, Tani T, Tsunoda Y. 2000. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows [ J ]. *Reprod. Fertil.*, **120**: 231 - 237.
- Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, Mizoshita K, Tabara N, Barber M, Yang X. 2000. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture [ J ]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**: 990 - 995.
- Lanza RP, Cibelli JB, West MD. 1999. Human therapeutic cloning [ J ]. *Nature Med.*, **5**: 975 - 977.
- Lanza RP, Cibelli JB, Blackwell C, Cristofalo VJ, Francis MK, Baerlocher GM, Mak J, Schertzer M, Chavez EA, Sawyer N, Lansdorp PM, West MD. 2000. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells [ J ]. *Science*, **288**: 665 - 669.
- Laverge H, De Sutter P, Verschraegen-Spaë MR, De Paeppe A, Dhont M. 1997. Triple color fluorescent in-situ hybridization for chromosomes X, Y, and 1 on spare human embryos [ J ]. *Hum. Reprod.*, **12**: 809 - 814.
- Liu JL. 2000. Intra- and Inter-species Somatic Nuclear Transfer Using Bovine Oocyte as Recipient [ D ]. Ph. D. thesis, Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences. [ 刘冀珑. 2000. 以牛卵母细胞为受体开展同种和异种核移植. 中国科学院动物研究所博士学位论文. ]
- Lu CF, Lin G, Xie CQ, Gong F, Zhou H, Tang YQ, Lu GX. 2003. *Chinese Science Bulletin*, **48**: 1844 - 1847. [ 陆长富, 林戈, 谢常青, 龚斐, 周虹, 谭跃球, 卢光. 2003. 人类体细胞克隆胚的构建. 科学通报, **48**: 1844 - 1847. ]
- Munne S, Weier HUG, Grifo J, Cohen J. 1994. Chromosomal mosaicism in human embryos [ J ]. *Biol. Reprod.*, **51**: 373 - 379.
- Smith AG. 1998. Cell therapy: In search of pluripotency [ J ]. *Curr. Bid.*, **8**: 803 - 804.
- Solter D, Gearhart J. 1999. Putting stem cells to work [ J ]. *Science*, **283**: 1468 - 1470.
- Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei [ J ]. *Nature*, **394**: 369 - 374.
- Wells DN, Miscia PM, Tervit HR, Viranco WH. 1998. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderly Island cattle breed [ J ]. *Reprod. Fertil. Dev.*, **10**: 369 - 378.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells [ J ]. *Nature*, **385**: 810 - 813.
- Wolf E, Zakhartchenko V, Brem G. 1998. Nuclear transfer in mammals: Recent developments and future perspectives [ J ]. *Biotech.*, **65**: 99 - 110.
- Yang CX, Kou ZH, Wang K, Jiang Y, Mao WW, Sun QY, Sheng HZ, Chen DY. 2004. Quantitative analysis of mitochondrial DNAs in macaque embryos reprogrammed by rabbit oocytes [ J ]. *Reproduction*, **127**: 201 - 205.