

研究报告

人-牛异种克隆胚构建及其线粒体来源

杨鹭, 张东, 王勇胜, 孙达权, 张涌

西北农林科技大学动物医学学院生物工程研究所, 杨凌 712100

摘要: 通过人-牛异种核移植技术获得异种克隆囊胚, 便于在不消耗人类卵母细胞的情况下从异种克隆胚中分离出人类干细胞。通过透明带下注射法将人胎儿成纤维细胞和牛胎儿成纤维细胞分别注入去核牛卵母细胞中构建异种和同种胚胎, 并比较两者之间的融合率、卵裂率、8-细胞发育率以及囊胚率。并对处于2-细胞、4-细胞、8-细胞、桑椹胚、囊胚阶段的异种克隆胚的线粒体DNA来源进行检测。结果表明, 异种克隆胚体外各个阶段的发育率均低于同种克隆胚, 尤其是8-细胞到囊胚阶段的发育率, 以及囊胚率都显著低于同种克隆胚($P < 0.05$)。异种克隆胚在2-细胞到桑椹胚阶段检测到人、牛线粒体DNA共存, 囊胚阶段只检测到牛线粒体DNA。结果表明: 牛卵母细胞可以重编程人胎儿成纤维细胞, 完成异种克隆胚植入前的胚胎发育, 异种克隆胚由于核质相互作用的不协调, 影响其发育能力, 使其囊胚率显著低于同种克隆胚。牛线粒体DNA存在于植入前异种胚胎发育的各个阶段。异种克隆胚胎用于人类胚胎干细胞分离具有可行性。

关键词: 异种克隆, 治疗性克隆, 体细胞核移植, 线粒体

Construction of Human-bovine Interspecies Embryos and Investigation of Interspecies Embryonic Mitochondrial Source

Lu Yang, Dong Zhang, Yongsheng Wang, Daquan Sun, and Yong Zhang

Bioengineering Institute, College of Veterinary Medicine, Northwest Agricultural & Forestry University, Yangling 712100, China

Abstract: Obtaining human blastocysts is a prerequisite for cell replacement therapy using embryonic stem cells. We established an interspecies somatic cell nuclear transfer (iSCNT) technique for producing blastocysts without sacrificing human oocytes. Human foetal fibroblasts were used as donor cells injected into the enucleated bovine oocytes in nuclear transfer, whereas bovine foetal fibroblasts were used to produce intraspecies embryos. We also examined the fate of human and bovine mitochondrial DNA (mtDNA) during preimplantation development after nuclear transfer by PCR. PCR analysis for the detection of human and bovine mtDNA was done at the 2, 8-morula, and blastocyst stages of the embryos. Result: 2.8% interspecies embryos developed to blastocysts after cultured in an SOF medium, while blastocyst rate of intraspecies embryos were 10.1%. Both human and bovine mtDNAs existed until the morula stage, whereas only the bovine mtDNA was found at the blastocyst stage. These results indicated that interspecies cloning without using human oocytes could generate human blastocysts. Because of the incoordination between bovine mtDNA and human nuclear gene, developmental rate of interspecies embryos was significantly lower than intraspecies. Whether the embryonic stem cell could be used for cell replacement therapy need further research.

Keywords: interspecies clone, therapeutic cloning, somatic cell nuclear transfer, mitochondria

Received: October 23, 2007; **Accepted:** April 1, 2008

Supported by: the National High Technology Research and Development Programme (No. 2004AA213072).

Corresponding author: Yong Zhang. Tel: +86-29-87080082; E-mail: zhangyl@public.xa.sn.cn

国家“863”计划项目(No. 2004AA213072)资助。

随着克隆羊多利的问世^[1], 以及人类干细胞的建立^[2], 使人们看到了利用干细胞进行疾病治疗的希望, 因此, 近年来干细胞的研究成为了生物研究的热点。其中, 又以胚胎干细胞的研究最为关注。利用胚胎干细胞进行细胞替代性治疗的首选条件就是获得人类囊胚。但此种方法会导致人类胚胎需求数量的上升。由于人类卵母细胞来源非常有限, 且受到法律、伦理等多种因素的限制, 很难获得足够数量的人卵母细胞用于实验研究, 异种核移植技术为解决这一难题提供了可能^[3]。国际上关于人-动物异种核移植的报道非常少, 国内迄今还没有关于人-牛异种克隆胚胎植入前全程发育并对异种胚胎主要发育阶段进行线粒体 DNA 来源检测的报道。本研究旨在对牛成熟卵母细胞能否支持人体细胞核的重编程, 并使重构胚获得一定程度的发育进行探索, 同时对克隆胚胎的线粒体来源进行 PCR 检测, 为将来利用动物卵母细胞来获取治疗性克隆所需的人源性胚胎干细胞奠定基础。

1 材料方法

1.1 供体细胞准备

1.1.1 人胚胎组织获得

胎龄 12 周人工终止妊娠的废弃胚胎(男性), 要求胚体完整, 无严重污染, 废弃胚胎由西安药物研究所附属医院提供, 使用前征得患者同意, 签署知情同意书。

1.1.2 人胎儿皮肤成纤维细胞分离及原代培养

取妊娠 12 周的人胎儿背部完整无任何创伤的皮肤组织, 用含青链霉素的 PBS 浸洗皮肤组织块 5~6 次, 剪碎至 1 mm³ 大小, 均匀接种与 60 mm 的培养皿上, 倒置 5 min, 然后加入含 FBS(Gibco) 10% 的 DMEM 培养液。待细胞生长至约 80% 铺满培养皿底, 进行传代培养和冷冻保存。

1.1.3 供体细胞准备

取在对数生长期的人胎儿、牛胎儿成纤维细胞, 在含 FBS(Gibco) 0.5% 的 DMEM 培养液中血清饥饿培养 3~5 d。核移植前用胰酶(Sigma)(0.5%)消化成单细胞悬液备用。

1.2 去核卵母细胞准备

1.2.1 牛卵母细胞成熟

牛卵巢采自西安屠宰场, 用 10 mL 的注射器抽取卵巢卵泡中的卵丘卵母细胞复合体(Cumulus

oocyte complexes), 选择带有三层以上颗粒细胞的 COCs 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次, 放入成熟培养液 OM (TCM199(Gibco)+10% FBS(Gibco)+10 mmol/L Hepes (Sigma)+0.5 mmol/L Pyruvic acidsodium salt (Sigma) + 0.075IU/mL HMG(宁波第二激素厂)+1 µg/mLβ-E2 (Sigma))中, 于 38.5°C, 5% CO₂, 100%湿度条件下^[4]培养 20~22 h 后用含 0.3%透明质酸酶(Sigma)脱去 COCs 上的颗粒细胞, 挑取明显具有第一极体的成熟卵母细胞进行后续实验。

1.2.2 卵母细胞去核

将 M2 期卵母细胞置于含 5mg/L CB 和 10% FBS 的 PBS 微滴中, 使第一极体位于 1~2 点位置, 用外径为 20~25 µm 的去核针吸出第一极体及其下方 1/4~1/3 胞质。去核后的卵母细胞用 Hoechst 33342 进行染色, 荧光显微镜下挑选出去核完全的卵母细胞备用。

1.3 重构胚构建和培养

1.3.1 重构胚构建

将供体细胞悬浮于放入去核卵母细胞的 PBS 微滴中, 静置 5 min, 用注射针将供体细胞注入去核卵母细胞的透明带下。在电融合液中清洗平衡重构胚 2 min, 然后转入新鲜的电融合液。用两根铂金制成的微电极轻度夹住重构胚, 使两个电极与胚胎的接触点、供体细胞处于一条直线上, 微电极连接电融合仪(Thermo, BTX-2001 型)正负极, 逐个融合卵母细胞和供体细胞。融合参数: 35 V、10 ms, 融合次数: 1 次。

1.3.2 重构胚培养

融合后的胚胎移入 M199 培养基中清洗 3 次, 再移入新鲜的 M199 培养液中恢复 3~5 h 后进行化学激活, 立即用含 5 µmol/L ionomycin 的 SOFaa 培养液处理 4 min, 转入含 2 mmol/L 的 6-DMAP 的培养液中作用 4 h, 然后在新鲜 SOFaa 培养液中清洗 3 遍后转移到有石蜡油覆盖、提前铺有颗粒细胞饲养层的 SOFaa 培养液微滴中, 在 38.5°C、5% CO₂、饱和湿度下进行培养, 每 48 h 半量换液 1 次。

1.4 线粒体 DNA 的 PCR 分析

1.4.1 PCR 模板制备

收集 2-细胞、4-细胞、8-细胞、桑椹胚 4 个时期的胚胎各 10 枚于含 20 µL 的超纯水的微离心管中, 囊胚 6 枚置于 12 µL 的超纯水的微离心管中, 微离心管于 -70°C 保存。反复冻融胚胎后, 向其中添加

200 mg/mL 蛋白酶 K, 于 56°C 下温育 30 min, 之后于沸水中放置 10 min, 1000 r/min 离心 1 min 后, 上清用作 PCR 模板^[5]。

1.4.2 PCR 引物设计

根据人 mtDNA(HUMMTCG)、牛 mtDNA(NC_006853)序列 cytochrome c oxidase subunit I 部分序列差异, 分别设计两对种属特异性引物, 牛特异性引物, pB1(5'-3'): GGAATAGTTTGGGCTATAATG 及 pB2(5'-3'): GAACAATATCGAGGGAAGAG; 人特异性引物, pH1(5'-3'): ATTCATCTTTCTTTTCACCGT 及 pH2(5'-3'): TGTAAGTACGATGTCTAGTGAT GAG。以各期异种克隆胚胎为模板扩增两个种属的 mtDNA。电泳检测。本试验引物均由 Invitrogen 公司合成。

1.5 异种克隆囊胚核基因来源 PCR 分析

1.5.1 PCR 分析设计原理

根据人-牛种属间核基因干扰素序列差异, 设计人类特异性 PCR 引物, 专一扩增人类干扰素基因序列。再依据本次试验使用男性人类胎儿成纤维细胞作为供核体的特点, 将定位于 Y 染色体上的 SOX10 基因作为目的基因, 这种基因在牛卵母细胞中是不存在的。根据 SOX10 基因设计 PCR 扩增引物。两组 PCR 分析都同时进行阳性、阴性对照试验。

1.5.2 PCR 模板制备

分别收集异种克隆囊胚、牛体细胞克隆囊胚、牛卵母细胞 6 枚置于 12 μ L 的超纯水的微离心管中, 收集 10^5 个人、牛胎儿成纤维细胞于 20 μ L 的超纯水微离心管中, 微离心管于 -70°C 保存。反复冻融胚胎后, 向其中添加 200 mg/mL 蛋白酶 K, 于 56°C 下温育 30 min, 之后于沸水中放置 10 min, 1000 r/min 离心 1 min 后上清液用作 PCR 模板^[5]。

1.5.3 PCR 检测人类干扰素 α 基因

根据人类干扰素 α 基因(BC074929)以及牛干抗

素基因(BOVIFNAA)的序列差异设计人类种属特异性 PCR 反应引物 p INF1(5'-3'): TCGCCCTTTGCTT TACTGATGGT 及 pINF2(5'-3'): CCTTCCTCCTTAA TCTTTCTTGC。分别以异种克隆胚胎、人胎儿成纤维细胞、牛体细胞克隆胚胎、牛胎儿成纤维细胞裂解液为模板扩增人类干扰素 α 基因, 电泳检测。

1.5.4 PCR 检测人类 SOX10 基因

根据 SRY(Sex determining region Y)-box10 (DQ896471) 合成引物 pSOX1(5'-3'): ATGGCGGA GGAGCAGGACCTATCGG 及 pSOX2(5'-3'): GGGG CGGGAGATGGAGGGGAAGGC, 分别以异种克隆胚胎、人胎儿成纤维细胞、牛卵母细胞裂解液为模板扩增 SRY 基因, 电泳检测。

1.6 数据统计

本研究所有试验重复 3 次, 所得数据均用 SPSS 软件作 ANOVA 分析, 当 $P < 0.05$ 时在统计学上认为差异显著。

2 实验结果

2.1 人-牛异种克隆胚胎与牛体细胞克隆胚胎的体外发育比较

从表 1 中可以看出, 人胎儿成纤维细胞与去核牛卵母细胞的融合率($63.5\% \pm 1.0\%$)低于牛耳成纤维细胞与去核牛卵母细胞的融合率($68.3\% \pm 3.1\%$), 两者的差异不显著($P > 0.05$)。异种克隆胚的卵裂率($50.6\% \pm 4.7\%$)、8-细胞的发育率($21.0\% \pm 5.6\%$)、桑椹胚的发育率($5.7\% \pm 2.4\%$)、囊胚的发育率($2.8\% \pm 1.3\%$)均低于同期的同种克隆胚胎(卵裂率 $58.5\% \pm 2.7\%$, 8-细胞发育率 $31.4\% \pm 2.9\%$, 桑椹胚发育率 $14.8\% \pm 1.8\%$, 囊胚率 $10.1\% \pm 2.2\%$)。其中桑椹胚、囊胚的发育率差异显著 ($P < 0.05$)。发育各阶段人-牛异种克隆胚胎形态正常(图 1)。

表 1 人-牛异种克隆胚与牛体细胞克隆胚的体外发育比较

Tabel 1 Comparison of the developmental rate of intraspecies and interspecies cloned embryos derived from bovine oocytes in vitro

Type of cloned embryos	No. of enucleated oocytes	Successfully fused rate (%)	Cleavage rate (%)	8-cell rate (%) ^a	Morula rate (%) ^b	Blastocyst rate (%) ^c
Human-bovine	328	63.5 \pm 1.0	50.6 \pm 4.7	21.0 \pm 5.6	5.7 \pm 2.4 ^e	2.8 \pm 1.3 ^e
Bovine-bovine	276	68.3 \pm 3.1	58.5 \pm 2.7	31.4 \pm 2.9	14.8 \pm 1.8 ^d	10.1 \pm 2.2 ^d

Note: * The experiments were replicated three times; a: No. of 2-cell stage/ No. of successfully fused; b: No. of 8-cell stage/ No. of successfully fused; c: No. of blastocyst/No. of successfully fused; d,e: within the same column, different superscripts are significantly different($P < 0.05$)

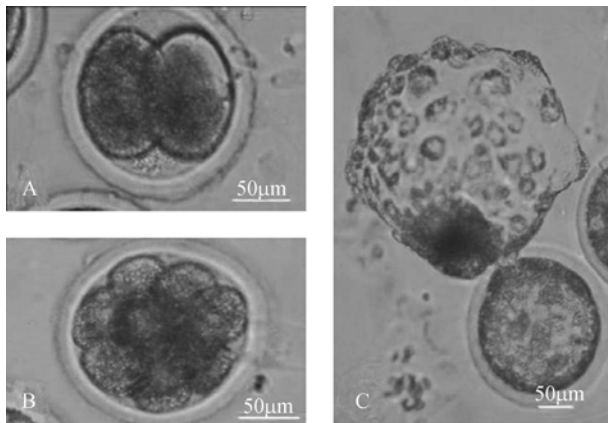


图1 人-牛异种克隆胚胎形态图

Fig. 1 Morphology (A: 2-cell stage; B: 8-cell stage; C: blastocysts) of interspecies embryos derived from a human foetal fibroblast transfer into enucleated bovine oocyte

2.3 线粒体 DNA 分析结果

通过 PCR 方法分析了人-牛异种克隆胚胎 2-细胞、4-细胞、8-细胞、桑椹胚、囊胚阶段的线粒体 DNA。人线粒体 DNA 存在于桑椹胚之前的各个胚胎发育阶段,牛线粒体 DNA 存在于整个植入前的胚胎发育阶段。在阴性对照中使用超纯水为 PCR 反应模板,并未出现 PCR 产物(图 2)。

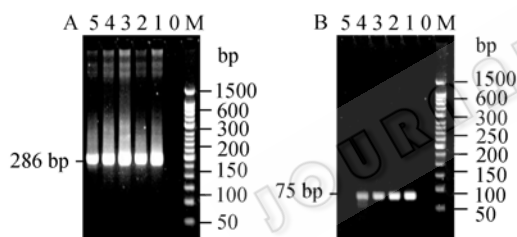


图2 异种克隆胚胎牛(A)和人(B)mtDNA 分析

Fig. 2 PCR analysis on bovine (A) and human (B) mtDNA of interspecies embryos

Types of mitochondrial DNA (mtDNA) in interspecies embryos reconstructed by human foetal fibroblast transfer into bovine enucleated oocytes. Interspecies embryos developed to the 2-cell, 4-cell, 8-cell, morula, and blastocyst stages were provided and mtDNA in embryos of different stages were traced by polymerization chain reaction (PCR) amplification of cytochrome c oxidase subunit I region of human and bovine mtDNA. Left picture shows the detection bovine mtDNA at 286 bp, whereas the right shows human mtDNA (75 bp) of interspecies. The PCR analysis shows that human mtDNA disappears at the blastocyst stage, but bovine mtDNA continues to express it until blastocysts. M: marker; 0: negative control; 1:2-cell stage; 2:4-cell stage; 3:8-cell stage; 4: morula stage; 5: blastocyst stage

2.4 克隆囊胚核基因来源分析

2.4.1 人类干扰素基因 PCR 检测

通过 PCR 方法扩增待测物中人干扰素 α 基因,牛体细胞克隆囊胚、牛成纤维细胞试验组并未出现

PCR 扩增产物,人-牛异种克隆囊胚、人胎儿成纤维细胞试验组扩增出目的产物(图 3)。

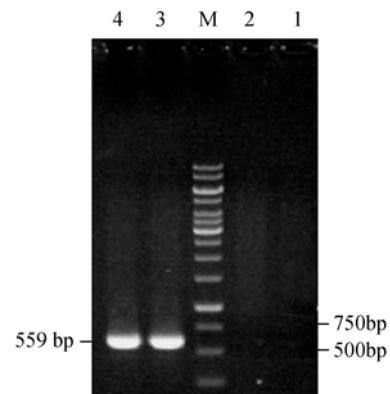


图3 异种克隆胚胎核基因来源分析

Fig. 3 PCR analysis on karyogene of interspecies embryos

Interspecies embryos, bovine SCNT embryos, human foetal fibroblasts, bovine fibroblasts were provided and karyogene of them were traced by polymerization chain reaction (PCR) amplification of homo sapiens interferon DNA of human karyogene. Picture shows the detection homo karyogene at 559 bp. The PCR analysis shows that homo sapiens interferon detect at the blastocyst stage of interspecies embryos and human foetal fibroblasts but not detect in bovine SCNT embryos and bovine fibroblasts. M: marker; 1:bovine fibroblasts; 2: bovine embryos of somatic cell nuclear transfer; 3: human foetal fibroblasts; 4: interspecies embryos

2.4.2 人类 SOX10 基因 PCR 检测

PCR 方法扩增待测物中人 SOX10 基因,牛卵母细胞试验组并未出现 PCR 扩增产物,人-牛异种克隆囊胚、人胎儿成纤维细胞试验组扩增出目的产物(图 4)。

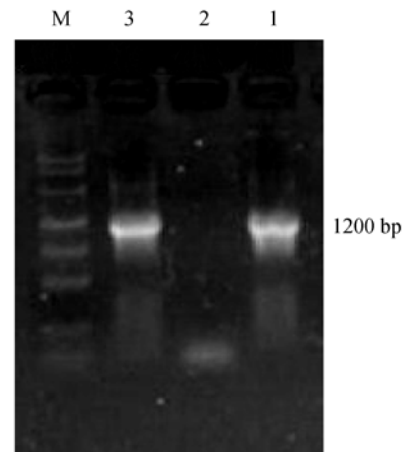


图4 男性 SOX10 基因分析

Fig. 4 PCR analysis on homo male sapiens SOX10 DNA of interspecies embryos

Interspecies embryos, human foetal fibroblasts, bovine oocytes were provided and karyogene of them were traced by polymerization chain reaction (PCR) amplification of homo male sapiens SOX10 DNA of human karyogene. Picture shows the detection homo SOX10 DNA at 1194 bp. The PCR analysis shows that homo sapiens SOX10 detect in the interspecies embryos and human foetal fibroblasts, but not detect in bovine oocytes. M: marker; 1: human foetal fibroblasts; 2: bovine oocytes; 3: interspecies embryos

3 讨论

3.1 异种克隆胚胎发育能力低于同种体细胞克隆胚胎

多种异种间体细胞核移植囊胚的成功构建^[6-11]及异种克隆动物的出生^[12-14]表明了卵母细胞对体细胞核的去分化及再程序化作用不具有种属特异性。在本研究中,牛去核卵母细胞可以重编程人胎儿成纤维细胞,使重构胚完成植入前的胚胎发育,并且异种克隆囊胚核基因来源于人类。但相同条件下构建并培养的异种克隆胚的发育能力低于同种克隆胚。由于缺乏同类试验的参照,估计是由于异种克隆胚胎需要不同于牛体细胞克隆胚胎发育的培养条件造成的。本研究表明,人-牛异种间体细胞克隆胚的体外囊胚率($2.8\% \pm 1.3\%$)显著低于牛-牛同种间体细胞克隆胚($10.1\% \pm 2.2\%$),且这种差异主要表现在异种克隆胚到桑椹胚阶段的发育能力($5.7\% \pm 2.4\%$)显著低于同种克隆胚($14.8\% \pm 1.8\%$)。其可能的原因在于,克隆胚胎在早期发育过程中合子型基因并没有被激活,胚胎发育依靠的是卵母细胞胞质在成熟过程中合成并且积累的大量蛋白质、mRNA 及细胞器,在此期间克隆胚胎的发育不受核供体的影响;但当核移植胚发育到一定时期时,卵母细胞中的母源性物质被消耗殆尽,此时合子型基因激活(zygotic gene activation, ZGA),胚胎的进一步发育依靠的是供体核基因编码的 mRNA 及 mRNA 指导下合成的蛋白质,在此期间异种克隆胚中由于核质相互作用的不协调,从而影响牛去核卵母细胞对人胎儿成纤维细胞的重编程,使异种克隆胚进一步的发育能力低于同种克隆胚胎。

3.2 线粒体 DNA 胚胎阶段共存的影响

在核移植操作过程中,核供体细胞来源的线粒体不可避免的会被带入到受体卵母细胞质中,从而导致分别来源于供受体的两套线粒体共存于克隆胚中。在同种间克隆后代中,大部分的、甚至全部的 mtDNA 来源于受体卵母细胞^[15-20]。然而,对于异种间克隆动物或早期胎儿中线粒体的来源问题仍存在有争议。大多数的报道表明异种克隆动物中的线粒体主要、甚至完全的来源于受体卵母细胞^[21-24];目前还不能确定人-动物异种克隆胚胎是否能分离得到适用于细胞替代治疗的人源性胚胎干细胞,但

研究表明两种来源线粒体的共存会导致很多严重的病理症状^[25]。本研究中,人、牛线粒体在异种克隆桑椹胚阶段以前共存,但在囊胚阶段,只检测到了牛的线粒体 DNA,人线粒体 DNA 在囊胚阶段是完全被降解还是由于含量过少而未被检测到需要采用更高灵敏度的定量 PCR 进行研究。陈大元等^[6]的研究表明,在大熊猫-兔异种克隆胚胎中,核受体和核供体的线粒体 DNA 在植入前的胚胎发育阶段共存,但在植入后,核供体的 mtDNA 大量增殖,而核受体 mtDNA 逐渐被降解,核供体来源的线粒体占有主导地位,研究表明由于核供体与核受体在遗传上亲缘关系较远,核基因编码的因子只能支持核供体来源的线粒体的发育^[6]。本研究中,人-牛异种克隆胚胎核供体 mtDNA 数量,随着核供体基因的激活、表达量的增大,会逐渐增多,同时核受体线粒体会被选择性的降解,人-牛异种克隆胚的线粒体趋于同质化,最终可以为细胞替代治疗提供合适的人源性胚胎干细胞。

REFERENCES

- [1] Wilmut I, Schnieke A, McWhir J, *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, **385**: 810-813.
- [2] James A Thomson, Joseph Itskovitz-Eldor, Sander S Shapiro, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, **282**: 1145-1147
- [3] Dominko T, Mitalipova M, Haley B, *et al.* Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biol Reprod*, 1999, **60**: 1496-502.
- [4] Li XF, Li Y, An ZX, *et al.* Effects of pre-activation of donor cells and enucleated oocytes on the *in vitro* development of bovine somatic nuclear transferred embryos. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Science*, 2003, **34**(1): 33-36.
李雪峰, 李煜, 安志兴, 等. 供体细胞和去核卵母细胞的不同预激活对体细胞核移植胚胎体外发育的影响. 畜牧兽医学报, 2003, **34**(1): 33-36.
- [5] Wan QH, Qian KX, Fang SG. A simple DNA extraction and rapid specific identification technique for single cells and early embryos of two breeds of *Bos taurus*. *Anim Reprod Sci*, 2003, **77**(1-2): 1-9
- [6] Chen DY, Wen DC, Zhang YP, *et al.* Interspecies implantation and mitochondria fate of panda-rabbit cloned embryos. *Biol Reprod*, 2002, **67**: 637-642.
- [7] Yang CX, Kou ZH, Wang K, *et al.* Quantitative analysis of mitochondrial DNAs in macaque embryos reprogrammed

- by rabbit oocytes. *Biol Reprod*, 2004, **127**: 201–205.
- [8] Jiang Y, Chen T, Nan CL, *et al.* *In vitro* culture and mtDNA fate of ibex-rabbit nuclear transfer embryos. *Zygote*, 2005, **13**: 233–240.
- [9] Li Y, Dai Y, Du W, *et al.* Cloned endangered species takin (*Budorcas taxicolor*) by interspecies nuclear transfer and comparison of the blastocyst development with yak (*Bos grunniens*) and bovine. *Mol Reprod Dev*, 2006, **73**: 189–195.
- [10] Yang CX, Han ZM, Wen DC, *et al.* *In vitro* development and mitochondrial fate of macaque-rabbit cloned embryos. *Mol Reprod Dev*, 2003, **65**: 396–401.
- [11] Zhao ZJ, Ouyang YC, Nan CL, *et al.* Rabbit oocyte cytoplasm supports development of nuclear transfer embryos derived from the somatic cells of the camel and Tibetan antelope. *J Reprod Dev*, 2006, **52**(3): 449–459.
- [12] Lanza RP, Cibelli JB, Diaz F, *et al.* Cloning of endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning*, 2000, **2**: 79–90.
- [13] Meirelles FV, Bordignon V, Watanabe Y. Complete replacement of the mitochondrial genotype in a *Bos indicus* calf reconstructed by nuclear transfer to a *Bos taurus* oocyte. *Genetics*, 2001, **158**(1): 351–356.
- [14] Steinborn R, Schinogl P, Wells DN, *et al.* Coexistence of *Bos taurus* and *B. indicus* mitochondrial DNAs in nuclear transfer-derived somatic cattle clones. *Genetics*, 2002, **162**: 823–829.
- [15] Evans MJ, Gurer C, Loike JD, *et al.* Mitochondrial DNA genotypes in nuclear transfer-derived cloned sheep. *Nat Genet*, 1999, **23**: 90–93.
- [16] Takeda K, Takahashi S, Onishi A, *et al.* Dominant distribution of mitochondria DNA from recipient oocytes in bovine embryos and offspring after nuclear transfer. *J Reprod Fertil*, 1999, **116**(2): 253–259.
- [17] Do JT, Hong KH, Lee BY, *et al.* *In vitro* development of reconstructed bovine embryos and fate of donor mitochondria following nuclear injection of cumulus cells. *Zygote*, 2001, **9**: 211–218.
- [18] Do JT, Lee JW, Lee BY, *et al.* Fate of donor mitochondrial DNA in cloned bovine embryos produced by microinjection of cumulus cells. *Biol Reprod*, 2002, **67**: 555–560.
- [19] Hiendleder S, Schmutz SM, Erhardt G, *et al.* Transmitochondrial differences and varying levels of heteroplasmy in nuclear transfer cloned cattle. *Mol Reprod Dev*, 1999, **54**: 24–31.
- [20] Steinborn R, Schinogl P, Zakhartchenko V, *et al.* Mitochondrial DNA heteroplasmy in cloned cattle produced by fetal and adult cell cloning. *Nat Genet*, 2000, **25**: 255–257.
- [21] Lanza RP, Cibelli JB, Diaz F, *et al.* Cloning of endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning*, 2000, **2**: 79–90.
- [22] Loi CP, Ptak G, Barboni B, *et al.* Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**: 962–964.
- [23] Meirelles FV, Bordignon V, Watanabe Y. Complete replacement of the mitochondrial genotype in a *Bos indicus* calf reconstructed by nuclear transfer to a *Bos taurus* oocyte. *Genetics*, 2001, **158**(1): 351–356.
- [24] Steinborn R, Schinogl P, Wells DN, *et al.* Coexistence of *Bos taurus* and *B. indicus* mitochondrial DNAs in nuclear transfer-derived somatic cattle clones. *Genetics*, 2002, **162**: 823–829.
- [25] Barritt J, Brenner C, Malter H, *et al.* Mitochondria in human offspring derived from ooplasmic transplantation: Brief communication. *Hum Reprod*, 2001, **16**: 513–516.

关于《生物工程学报》2008 年度开始专刊申请的通知

当前, 随着生物技术的飞速发展, 生物工程涵盖的领域越来越广, 交叉学科的研究也越来越受到关注。除了已有的基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程之外, 基因组学、代谢工程、纳米科学、生物炼制等也逐步成为生物工程研究的热门领域。为了更加系统、集中地反映各个领域的研究成果, 以及该领域学科的热点难点问题, 充分发挥《生物工程学报》的学科引领和导向作用, 促进学科发展, 《生物工程学报》编委会决定自 2008 年起, 每年出版一定数量的专刊。专刊将系统地反映生物工程相关领域或新学科生长点的最新进展, 及时介绍国内外生物工程相关前沿领域的突破性成果, 以及面向国家和社会发展需要并具有重大应用前景的研究成果。真诚欢迎本领域各学科的学术带头人, 申请并组织专刊。申请得到编委会批准后, 申请人将被邀请担任本专刊的特约编辑, 负责组织稿件、确定审稿专家, 并撰写专刊序言。

根据专刊工作计划, 编辑部已开始接受 2009 年度专刊申请, 现将有关事项通知如下:

1. 专刊申请的有关规定详见本期第 1239 页, 或浏览我刊主页 “编辑部公告” 栏, 请申请者仔细阅读(网址: <http://journals.im.ac.cn/cjbcn>);
2. 提交形式: 请到我刊主页的 “下载专区” 下载专刊申请表; 填好之后, 以 E-mail 附件的形式发送到编辑部信箱: cjb@im.ac.cn, 请在邮件主题中注明 “专刊申请” 字样;
3. 申请者如有疑问, 请咨询编辑部:

E-mail: cjb@im.ac.cn; Tel: 010-64807509