

# 化学辅助去核法对绵羊卵母细胞去核率和重构胚发育率的影响

潘晓燕<sup>1</sup>, 王正朝<sup>2</sup>, 李质馨<sup>1</sup>, 金玉姬<sup>1</sup>, 窦肇华<sup>1</sup>, 郭志勤<sup>3</sup>, 王锋<sup>4</sup>

1 吉林医药学院 组织学与胚胎学教研室, 吉林 132013

2 弗吉尼亚联邦大学医学院, 里士满 23298

3 新疆畜牧科学院 农业部家畜繁育生物技术重点开放实验室, 乌鲁木齐 830000

4 南京农业大学 动物胚胎工程技术中心, 南京 210095

**摘要:** 为提高绵羊体细胞核移植的效率, 本研究采用一种新的去核方法—化学辅助去核法, 对绵羊体外成熟的卵母细胞进行去核, 研究了化学诱导剂秋水仙素的处理浓度、作用时间、卵母细胞的成熟时间对去核效果及重构胚发育的影响。结果表明: 1) 卵母细胞在 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的秋水仙素溶液中分别孵育 0.5 h 和 1 h, 胞质突起率和去核率没有显著的差异, 突起率可高达 85.4%, 去核率达到 100%; 2) 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  或 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  秋水仙素溶液将卵母细胞处理 0.5 h, 对去核效果没有显著影响; 3) 对于体外成熟 18~23 h 的卵母细胞, 随着成熟时间的延长, 盲吸法的去核率降低, 但没有影响秋水仙素诱导胞质突起的比率和去核率; 4) 两种去核方法对重构胚的发育没有产生显著影响, 但成熟 21~23 h 卵母细胞重构胚囊胚的发育率显著高于成熟 18~20 h 卵母细胞重构胚囊胚的发育率。综上所述, 本试验优化了绵羊卵母细胞化学辅助的去核程序, 利用化学辅助去核法对高卵龄的绵羊卵母细胞进行去核, 提高了去核率和重构胚的体外发育率。

**关键词:** 秋水仙素, 卵母细胞, 化学辅助去核, 重构胚

## Effect of the chemically assisted enucleation on the enucleation of sheep oocytes and the development of their reconstructed embryos

Xiaoyan Pan<sup>1</sup>, Zhengchao Wang<sup>2</sup>, Zhixin Li<sup>1</sup>, Yuji Jin<sup>1</sup>, Zhaohua Dou<sup>1</sup>, Zhiqin Guo<sup>3</sup>, and Feng Wang<sup>4</sup>

1 Department of Histology and Embryology, Jilin Medical College, Jilin 132013, China

2 Medical College of Virginia, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA 23298, USA

3 Key Laboratory of Animal & Veterinary Biotechnology of MOA, Urumqi 830000, China

4 Center of Animal Embryo Engineering and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

**Abstract:** In order to enhance the efficiency of sheep somatic cell nuclear transfer, we used a chemically assisted enucleation with colchicine to study the effects of the concentration of colchicine, the incubation time of oocytes in colchicine and the maturation time of oocytes on the enucleation rates and the development of reconstructed embryos. The results showed that 1) there were no significant differences in the rates of cytoplasm protrusion and enucleation between oocytes that were incubated in colchicine

**Received:** September 7, 2008; **Accepted:** February 4, 2009

**Supported by:** Jilin Medical College Research Program (No. 2008-01), Key Scientific and Technological Project of Xinjiang Uygur Autonomous Region (No. 200631109).

**Corresponding author:** Xiaoyan Pan. Tel: +86-432-4560019; E-mail: pxy19790105@163.com

吉林医药学院科研专项基金(No. 2008-01), 新疆维吾尔自治区重点科技攻关项目(No. 200631109)资助。

(0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 0.5 h and oocytes that were incubated in colchicine (0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 1 h, and the rate of cytoplasm protrusion can be 85.4% while the rate of cytoplasm enucleation is 100%. 2) There was no significant difference in oocyte enucleation between oocytes treated with medium containing 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  colchicine for 0.5 h and oocytes treated with medium containing 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  colchicine for 0.5 h. 3) A maturation time of 18–23 h did not affect the rates of cytoplasm protrusion and enucleation by chemically assisted enucleation, whereas the rate of enucleation of oocytes by blind enucleation was found to decrease with a prolonged incubation time. 4) The development rates of reconstructed embryos could not be influenced by these two enucleation methods, increased from oocytes matured for 21–23 h. These results demonstrate that sheep oocytes can be enucleated fast and effectively by optimized colchicine chemically assisted enucleation, which can enhance the enucleation rate of sheep oocytes and the early development of reconstructed embryos *in vitro*.

**Keywords:** colchicine, oocyte, chemically assisted enucleation, reconstructed embryos

自从1997年Dolly的诞生揭开了哺乳动物体细胞核移植的序幕<sup>[1]</sup>,使得该技术在家畜品种改良、濒危物种保护和器官移植等各项领域都有着广泛的应用前景。但目前核移植动物的成活率很低,限制了该技术的实际应用<sup>[2]</sup>。影响核移植效率的一个十分重要的环节就是受体卵母细胞的去核。对于大多数动物,如绵羊、山羊、牛和猪等<sup>[3]</sup>,其卵母细胞的染色体需做DNA染色才能观察到,主要通过盲吸法去除第一极体及其下方的大量胞质来完成去核<sup>[2]</sup>。但该方法由于去除的卵胞质较多且需经紫外灯照射检查去核情况,因而降低了核移植胚的发育能力;通过激活卵母细胞,去除末期卵母细胞染色体的方法也是有效的<sup>[4]</sup>,但激活后,随着卵母细胞内MPF活性的降低,其重编程体细胞核的能力也随之降低<sup>[5]</sup>。

随着研究的深入,不同物种卵母细胞的去核方法不断改进。化学诱导法在小鼠、山羊、牛、猪等动物的卵母细胞上也进行了应用研究,其是在卵母细胞减数分裂的过程中添加化学诱导剂,破坏纺锤体微管的功能,使得极体排出时不能与核染色体发生分离,因此与核染色体一起被排到卵周隙,以达到去核的目的,其整个去核过程不需要显微操作仪。该方法简单、易于操作,但研究发现利用不同的化学诱导剂诱导去核后,胞质支持重构胚发育的能力不同,且不同物种的卵母细胞诱导的效果也有很大差异,因此限制了该方法的广泛应用<sup>[6,7]</sup>。在此基础上,Yin等<sup>[8]</sup>和Tani等<sup>[9]</sup>以猪和牛的卵母细胞为试验材料对化学诱导去核法进行了改进,用化学诱导剂Deme处理成熟排出第一极体的卵母细胞,使卵胞质中含染色体的部分形成一个胞质突起,这样就能明确核所在的位置,然后通过显微操作,将核

与极体一并除去,达到去核的目的,此法被称为化学辅助去核。该方法对卵母细胞损伤少,且由于化学诱导剂作用时间短,减少了对胞质的毒副作用,可得到较高的重构胚发育率,有望在其他动物上推广应用。

本试验是首次利用秋水仙素对绵羊卵母细胞进行化学辅助去核,旨在建立一套操作简便、对卵母细胞损伤少、高效稳定的去核方法,以期进一步提高绵羊核移植效率,简化核移植程序。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

胚胎的培养器皿购自Costar公司;胎牛血清(FBS)为Hyclone公司产品;促黄体素(LH)为中国科学院动物研究所生殖内分泌室产品;其他药品除特殊注明外均购自Sigma公司。

抽卵液: 2%(V/V)FBS+HEPES缓冲的TCM199(H199);

卵母细胞体外成熟培养液(IVM液): 10%(V/V)FBS+5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 促卵泡素(FSH)+0.3 IU/mL LH+1  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\beta$ -雌二醇的TCM199(M199);

显微操作液: 7.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 细胞松弛素B(CB)+10% FBS的H199;

融合液: 0.3 mol/L甘露醇+0.1 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ +0.1 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ +0.5 mmol/L HEPES+0.05% BSA;

激活液包括5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 离子霉素(Ionomycin)的H199和2 mmol/L 6-二甲氨基嘌呤(6-DMAP)的合成输卵管液(SOF液);

胚胎培养液: 1%非必须氨基酸+2%必须氨基酸+4 mg/mL BSA的SOF液。

### 1.2 卵母细胞的体外成熟

从屠宰厂摘取刚屠宰的绵羊卵巢,置于30°C左

右的生理盐水中, 2 h 内运到实验室。用手术刀片割开卵巢表面 1~5 mm 的卵泡, 挑选卵丘细胞包裹 3 层以上、结构致密的卵丘-卵母细胞复合体(COCs), 放入 100  $\mu$ L 的 IVM 液滴中, 在 38.6°C、5% CO<sub>2</sub>、100% 湿度的培养箱中成熟培养 18~23 h。将成熟的 COCs 放入 0.1% 透明质酸酶中, 脱去包裹卵母细胞的卵丘细胞, 选择卵周隙明显、细胞质均匀并排出第一极体的卵母细胞备用。

### 1.3 成熟卵母细胞的盲吸去核

将成熟不同时间的带有第一极体的卵母细胞置于含 5  $\mu$ g/mL Hoechst33342 的 M199 中孵育 10 min, 将孵育后的卵母细胞移入显微操作液滴中, 在配有显微操作臂的 200 倍倒置显微镜下, 用一内径为 20  $\mu$ m 的吊尖斜口去核针将第一极体及其下方胞质内的染色体一并吸除。然后在荧光显微镜下观察去核后的卵母细胞有无荧光, 统计卵母细胞的去核率。

### 1.4 成熟卵母细胞的化学辅助去核

将成熟不同时间的绵羊卵母细胞放在添加不同浓度秋水仙素的 M199 中处理不同的时间, 在显微镜下可见到卵母细胞膜上出现类似“芽孢”样的突起<sup>[10]</sup>, 将有胞质突起的卵母细胞移入显微操作液滴中, 在配有显微操作臂的 200 倍倒置显微镜下, 用一内径为 20  $\mu$ m 的吊尖斜口去核针将此突起及第一极体一并吸除。然后将去核的卵母细胞在 5  $\mu$ g/mL Hoechst33342 的 M199 中孵育 10 min, 在紫外光下快速照射, 检查去核率。

### 1.5 核移植重构胚的构建

将去核后的卵母细胞放在显微操作液滴中, 用一内径为 20  $\mu$ m 的吊尖斜口去核针吸取消化好的直径为 15~20  $\mu$ m、表面光滑的成年绵羊耳皮肤成纤维细胞, 从透明带原切口处移入去核卵母细胞的卵周隙中, 尽量使供体细胞紧贴卵细胞膜。然后将构建好的重构胚在融合液中平衡 2 min, 移入融合槽中, 使供体细胞与卵母细胞接触面与电场方向垂直, 施以场强为 1.2 kV/cm, 脉冲时间为 20  $\mu$ s, 脉冲次数为 2 次的直流脉冲进行融合(融合仪为宁波新芝生物公司生产), 融合后 0.5 h 检查融合率, 挑选融合胚进行激活处理。

### 1.6 重构胚的激活与培养

将重构胚在 5  $\mu$ mol/L Ionomycin 液中作用 4 min, 之后移到 2 mmol/L 6-DMAP 液培养 3 h, 最后放入

胚胎培养液滴中, 在 38.6°C、5% CO<sub>2</sub>、100% 湿度的培养箱中培养, 2 d 后统计卵裂率, 7 d 后检查囊胚发育率。

## 1.7 统计分析

所有试验均重复 4 次, 以统计分析软件 SPSS12.0 的 ANOVA 或 T 检验进行差异显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 秋水仙素处理时间对化学辅助法去核率的影响

成熟 21~23 h 的绵羊卵母细胞, 在 0.4  $\mu$ g/mL 的秋水仙素溶液中分别孵育 0.5 h 和 1 h, 前者的胞质突起率稍高于后者, 但差异不显著(85.4% vs 82.6%), 且只要将突起的胞质和第一极体一并去除, 去核率就能达到 100%。但考虑到秋水仙素对卵母细胞的毒副作用, 孵育 0.5 h 比较合适(表 1)。

表 1 秋水仙素处理时间对化学辅助法去核率的影响  
Table 1 Effects of colchicine treatment duration on the enucleation rate of oocytes by chemically assisted enucleation

Duration (h)	Number of oocytes	Rate of cytoplasm protrusion (%)	Rate of enucleation (%)
Experiment group I (0.5 h)	82	85.4±3.1	100
Experiment group II (1 h)	109	82.6±2.3	100
Control group	76	0	

### 2.2 秋水仙素处理浓度对化学辅助法去核率的影响

本试验参照国内外相关文献, 比较了 0.2  $\mu$ g/mL 和 0.4  $\mu$ g/mL 的秋水仙素对成熟 21~23 h 绵羊卵母细胞处理 0.5 h 后的胞质突起情况。结果表明二者的胞质突起率没有显著差异, 去核率均为 100%, 如表 2 所示。由此可见, 在不影响胞质突起率和去核率的前提下, 可以将秋水仙素的浓度降低到 0.2  $\mu$ g/mL 进行使用。

### 2.3 卵母细胞成熟时间对盲吸法和化学辅助法去核效果的影响

不同成熟时间的卵母细胞(图 1)采用不同去核方法去核的结果表明: 对于成熟 18~20 h 的卵母细胞, 采用盲吸法或化学辅助去核法, 不会影响去核率(表 3); 而对于成熟 21~23 h 的卵母细胞, 比较适

表 2 秋水仙素浓度对化学辅助法去核率的影响

**Table 2 Effects of colchicine concentrations on the enucleation rate of oocytes by chemically assisted enucleation**

Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Number of oocytes	Rate of cytoplasm protrusion (%)	Rate of enucleation (%)
Experiment group I (0.2 $\mu\text{g/mL}$ )	92	83.7 $\pm$ 4.3	100
Experiment group II (0.4 $\mu\text{g/mL}$ )	82	85.4 $\pm$ 3.1	100
Control group	89	0	

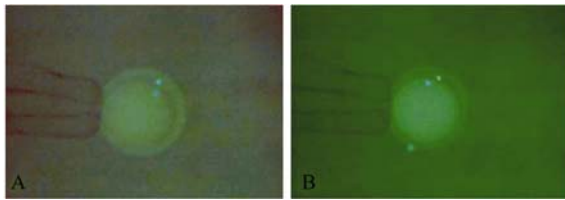


图 1 不同成熟时间核与极体的位置关系

Fig. 1 Position of oocyte nucleus and pole body at different maturation times. (A) The position of oocyte nucleus and polar body at *in vitro* maturation 19 h. (B) The position of oocyte nucleus and polar body at *in vitro* maturation 22 h.

合于采用化学辅助去核法, 可获得更高的去核率(表 3); 去核过程如图 2 所示。

表 3 盲吸法与化学辅助法的去核率比较

**Table 3 Comparison of oocyte enucleation rates between blind enucleation and chemically assisted enucleation**

Maturation time (h)	Enucleation method	Number of oocytes	Rate of cytoplasm protrusion (%)	Rate of enucleation (%)
18~20	Blind enucleation	143	0	94.4 $\pm$ 2.7 a
	Chemically assisted enucleation	96	80 $\pm$ 5.2	100 a
21~23	Blind enucleation	154	0	88.3 $\pm$ 1.9 b
	Chemically assisted enucleation	92	83.7 $\pm$ 4.3	100 a

Note: within columns, values with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

表 4 绵羊体细胞核移植重构胚的体外发育

**Table 4 Development *in vitro* of sheep reconstructed embryos from somatic cells**

Maturation time (h)	Enucleation method	No. of reconstructed embryos	Cleavage rate (%)	Blastocyst rate (%)
18~20	Blind enucleation	257	87.4 $\pm$ 4.3	15.1 $\pm$ 1.3 a
	Chemically assisted enucleation	169	88.9 $\pm$ 3.2	16.1 $\pm$ 1.7 a
21~23	Blind enucleation	204	89.3 $\pm$ 1.3	21.3 $\pm$ 1.9 b
	Chemically assisted enucleation	197	89.7 $\pm$ 3.6	23.4 $\pm$ 2.3 b

Note: within columns, values with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

## 2.4 绵羊体细胞核移植重构胚的体外发育

对体外成熟不同时间的绵羊卵母细胞分别采用盲吸法或化学辅助法去核, 去核方法对重构胚的卵裂率和囊胚率没有显著影响(表 4); 但体外成熟 21~23 h 的卵母细胞组, 其重构胚的囊胚发育率显著高于体外成熟 18~20 h 的卵母细胞组, 卵裂率没有显著的差异。化学辅助去核法得到的核移植囊胚见图 3。

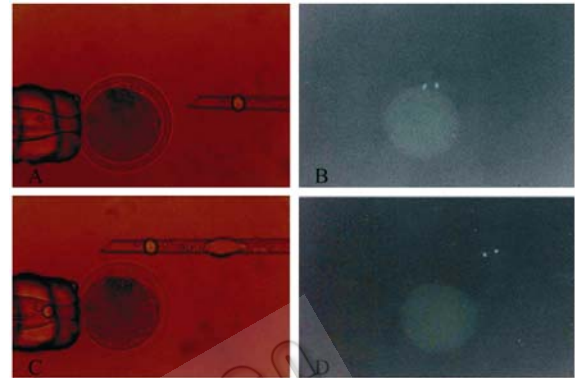


图 2 卵母细胞进行秋水仙素化学辅助去核过程

Fig. 2 Process of colchicine chemically assisted enucleation. (A) M II oocyte treated by colchicines. (B) Colchicine-treated M II oocyte dyed by Hoechst 33342 under UV. (C) The enucleation process of colchicine-treated M II oocyte. (D) The enucleation process of colchicine-treated M II oocyte dyed by Hoechst 33342 under UV.

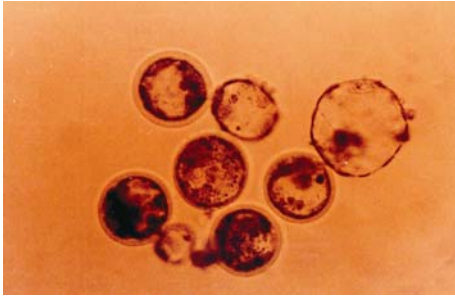


图3 绵羊体细胞核移植囊胚

Fig. 3 Reconstructed blastocysts produced by sheep somatic nuclear transfer.

### 3 讨论

2003年Gasparrini等利用Deme对小鼠卵母细胞进行诱导去核,虽然效率不高,但获得了克隆小鼠<sup>[11,12]</sup>,说明化学诱导去核的卵胞质同样具有支持供体基因组重编程和胚胎发育的能力。后来在山羊、牛、猪等哺乳动物上也相继开展了卵母细胞Deme诱导去核的研究<sup>[13-16]</sup>。但在国内,李向臣等<sup>[17]</sup>对牛卵母细胞进行化学诱导去核,未见到诱导现象的产生,可能是由于Deme的浓度和作用时间不同所致。由此可见,化学诱导去核法虽然在本世纪初得到了广泛的研究,并获得了克隆动物,但并没有得到广泛的推广,表明化学诱导去核法本身可能存在一定的缺陷,因此本研究在此基础上选择一种新的去核方法——化学辅助法进行相关研究,旨在进一步改进绵羊体细胞核移植的操作程序,提高核移植效率。

秋水仙素作为一种破坏微管稳定的药物,是一种常用的化学诱导剂,利用其处理卵母细胞进行化学辅助去核,将会对卵母细胞内由微管介导的生物过程产生一定的影响,这种影响在一定程度上取决于各种生物过程的可逆性,高浓度、长时间的秋水仙素处理会使卵母细胞核染色质高度浓缩成小团<sup>[12]</sup>,产生不可逆性的影响,阻滞原核形成、卵裂等胚胎发育过程。因此,在不影响去核率的前提下,尽量减少秋水仙素的使用浓度、缩短作用时间对胚胎后期发育很关键。本实验首次利用秋水仙素对绵羊卵母细胞进行化学辅助去核,将秋水仙素的使用浓度降低至0.2 μg/mL、作用时间缩短到30 min对胞质的突起率和去核率没有显著影响,达到了很好的去核效果,同时减少了秋水仙素的毒副作用及其对重构胚后期发育的影响<sup>[18]</sup>。

Russell等认为化学诱导剂的起始作用时间也很关键,会直接影响去核率<sup>[15]</sup>,Gasparrini等在小鼠的诱导去核上也得出同样的结论<sup>[11]</sup>。本实验对成熟不同时间的绵羊卵母细胞进行了秋水仙素诱导处理,结果发现卵母细胞的卵龄对胞质的突起率和去核率没有显著影响,这与李向臣的研究结果是一致的<sup>[17]</sup>,原因可能是去核程序的差异造成的。本研究表明低卵龄卵母细胞(成熟18~20 h)采用盲吸法和化学辅助法去核,均可获得较高的去核率;但高卵龄卵母细胞(成熟21~23 h)应采用化学辅助法去核,因为其去核率显著高于盲吸法。

卵母细胞的去核是核移植研究中重要的一步,卵母细胞的完全去核是保证核移植胚胎正常发育的先决条件。选择快速准确的去核方法能更好、更有效地利用现有的卵母细胞资源。因此,很多科研人员对卵母细胞的去核方法进行了广泛的研究<sup>[19-22]</sup>,目前更多采用的是盲吸去核法,但是这一方法对卵母细胞的体外成熟时间有所要求,正如本实验的结果所示,随卵母细胞体外成熟时间的延长其去核率会逐渐下降<sup>[10]</sup>,这样就限制了卵母细胞的利用。在本研究中还发现,2种去核方法没有影响重构胚的体外发育率,但以高卵龄的去核卵母细胞作为受体胞质,重构胚囊胚的发育率显著高于低卵龄的卵母细胞,这与胞质的成熟度有关<sup>[23]</sup>。因此在核移植试验中,为使卵胞质得到充分成熟,一般采用成熟21~23 h的卵母细胞作为受体胞质,这样化学辅助去核法较盲吸法更适合于核移植的研究。

由此可见,利用秋水仙素化学辅助去核法对绵羊卵母细胞进行去核,简化了操作程序,提高了高卵龄卵母细胞的去核效率;考虑到胞质的成熟程度,以高卵龄的卵母细胞为受体胞质能显著提高重构胚的体外发育率。因此,化学辅助去核法在绵羊卵母细胞的核移植试验中起着重要的作用,有望得到进一步地推广与应用。

致谢: 衷心感谢新疆畜牧科学院农业部家畜繁育生物技术重点开放实验室刘明军主任、杨梅老师、汪立琴老师和陈童老师在试验中给予的指导;衷心感谢石河子大学博士研究生彭夏雨在试验取材方面提供的帮助;最后还要衷心地感谢弗吉尼亚联邦大学医学院的英国留学生Christopher Brimson认真阅读并修改了英文摘要。

## REFERENCES

- [1] Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, **385**: 810–813.
- [2] Tsunoda Y, Kato Y. The recent progress on nuclear transfer in mammals. *Zool Sci*, 2000, **17**: 1177–1184.
- [3] Li GP, White KL, Bunch TD. Review of nucleation methods and procedures used in animal cloning: State of the art. *Cloning Stem Cells*, 2004, **6**(1): 5–13.
- [4] Bordignon V, Smith LC. Telophase enucleation: An improved method to prepare recipient cytoplasts for use in bovine nuclear transfer. *Mol Reprod Dev*, 1998, **49**: 29–36.
- [5] Tani T, Kato Y, Tsunoda Y. Direct exposure of chromosomes to nonactivated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming. *Biol Reprod*, 2001, **64**: 324–330.
- [6] Elsheikh AS, Takahashi Y, Hishinuma M, *et al.* Developmental ability of mouse late 2-cell stage blastomeres fused to chemically enucleated oocytes *in vitro*. *J Vet Med Sci*, 1997, **59**: 107–113.
- [7] Elsheikh AS, Takahashi Y, Katagiri S, *et al.* Functional enucleation of mouse metaphase II oocytes with etoposide. *Jpn J Vet Res*, 1998, **45**: 217–220.
- [8] Yin XJ, 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**: 442–446.
- [9] Tani T, Shimada H, Kato Y, *et al.* Demecolcine-assisted enucleation for bovine cloning. *Cloning Stem Cells*, 2006, **8**(1): 61–66.
- [10] Takano H, Koyama K, Kozai C, *et al.* Effect of aging of recipient oocytes on the development of bovine nuclear transfer embryos *in vitro*. *Theriogenology*, 1993, **39**: 909–917.
- [11] Gasparini B, Gao S, Ainslie A, *et al.* Cloned mice derived from embryonic stem cell karyoplasts and activated cytoplasts prepared by induced enucleation. *Biol Reprod*, 2003, **68**: 1259–1266.
- [12] Wang Q, Gu L, Zhang Y. Chemical induction—new strategy of oocyte enucleation. *Chin J Biotech*, 2003, **19**(6): 763–766.  
王强, 顾玲, 张涌. 化学诱导法——卵母细胞去核新策略. *生物工程学报*, 2003, **19**(6): 763–766.
- [13] Ficscher D, Ibanez E, Albertini DF, *et al.* Activated bovine cytoplasts prepared by demecolcine-induced enucleation support development of nuclear transfer embryos *in vitro*. *Biol Reprod Dev*, 2005, **72**: 161–170.
- [14] Ibanez E, Albertini DF, Overstrom EW. Demecolcine induced oocyte enucleation for somatic cell cloning: coordination between cell cycle egress, kinetics of cortical cytoskeletal interconnections, and second polar body extrusion. *Biol Reprod*, 2003, **68**: 1249–1258.
- [15] Russell DF, Ibanez E, Albertini DF, *et al.* Activated bovine cytoplasts prepared by demecolcine-induced enucleation support development of nuclear transfer embryos *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, 2005, **72** (2): 161–170.
- [16] Kawakami M, Tani T, Yabuuchi A, *et al.* Effect of demecolcine and nocodazole on the efficiency of chemically assisted removal of chromosomes and the developmental potential of nuclear transferred porcine oocytes. *Cloning Stem Cells*, 2003, **5**(4): 379–387.
- [17] Li XC, Wu YH, Ma Y, *et al.* Demecolcine assisted enucleation of bovine oocyte. *Acta Vet Zootech Sin*, 2007, **38**(6): 537–541.  
李向臣, 吴月红, 马毅, 等. 脱羧秋水仙碱(DM)辅助去牛卵母细胞核的研究. *畜牧兽医学报*, 2007, **38**(6): 537–541.
- [18] Yin XJ, Kato Y, Tsunoda Y. Effect of enucleation procedures and maturation conditions on the development of nuclear-transferred rabbit oocytes receiving male fibroblast cells. *Reproduction*, 2002, **124**: 41–47.
- [19] Pan XY, Yang M, Zhang HY, *et al.* Effects of argali (*Ovis ammon*) donor cells on interspecies nuclear transfer. *Scientia Agri Sin*, 2008, **41**(9): 2798–2805.  
潘晓燕, 杨梅, 张寒莹, 等. 盘羊供体细胞对异种核移植效率的影响. *中国农业科学*, 2008, **41**(9): 2798–2805.
- [20] Wu KL, Shi YX, Bai ZL, *et al.* Reconstruction of embryo using an improving nuclear transfer method. *Chin J Biotech*, 2007, **23**(1): 161–165.  
吴克良, 时永香, 白增亮, 等. 用改进的细胞核移植方法构建重构胚. *生物工程学报*, 2007, **23**(1): 161–165.
- [21] Zhang L, Hua S, Zhang Y, *et al.* Optimization of culture measure for bovine-bovine and goat-bovine cloned embryos *in vitro*. *Chin J Biotech*, 2007, **23**(4): 662–666.  
张林, 华松, 张涌, 等. 牛-牛及山羊-牛克隆胚胎体外培养条件的优化. *生物工程学报*, 2007, **23**(4): 662–666.
- [22] Critser ES, First NL. Use of a fluorescent stain for visualization of nuclear material in living oocytes and early embryos. *Stain Technol*, 1986, **61**: 1–5.
- [23] Holker M, Petersen B, Hassel P, *et al.* Duration of *in vitro* maturation of recipient oocytes affects blastocyst development of cloned porcine embryos. *Cloning Stem Cells*, 2005, **7**(1): 35–44.