

牛-牛及山羊-牛克隆胚胎体外培养条件的优化 Optimization of Culture Measure for Bovine-bovine and Goat-bovine Cloned Embryos *in vitro*

张 林 华 松 张 涌* 权富生 刘风军 廖列如 蒋永海

ZHANG Lin ,HUA Song ,ZHANG Yong* ,QUAN Fu-Sheng , LIU Feng-Jun , LIAO Lie-Ru and JIANG Yong-Hai

西北农林科技大学 生物工程研究所, 杨凌 712100

Bioengineering Institute , Northwest Agricultural & Forestry University , Yangling 712100 , China

摘 要 通过胞质内注射法将牛和山羊胎儿耳朵成纤维细胞分别注入去核牛卵母细胞中构建同种胚胎和异种胚胎。采用 mCR2aa 和 mSOF 分别培养,然后在 mSOF 中按不同培养时间添加 8mg/mL BSA 或者 10% FBS 培养前 3d 和培养 3d 后添加的补充物质及次序为 (1)BSA + FBS (2)BSA + BSA ;(3)FBS + BSA (4)FBS + FBS。根据培养胚胎的卵裂率、8/16-cell 发育率、囊胚发育率及囊胚细胞数筛选出最好的培养方法。结果 (1)mSOF 中培养同种胚胎和异种胚胎的卵裂率、8/16-cell 发育率以及囊胚发育率均明显高于在 mCR2aa 中的培养结果 ($P < 0.05$)。(2)添加 BSA + FBS 组的 mSOF 培养胚胎的卵裂率、8/16-cell 发育率、囊胚发育率和囊胚细胞数同种依次为 $79.8\% \pm 7.1\%$ 、 $49.7\% \pm 3.5\%$ 、 $21.5\% \pm 1.8\%$ 和 115.2 ± 4.3 , 异种依次为 $40.1\% \pm 6.3\%$ 、 $29.2\% \pm 2.0\%$ 、 $13.4\% \pm 2.1\%$ 和 100.1 ± 3.0 均明显高于其他培养组 ($P < 0.05$)。结论:山羊-牛异种克隆胚胎可以用优化的牛胚胎培养体系进行培养。同种胚胎和异种胚胎的最佳培养方法均为前 3d 用 mSOF + BSA 培养液,3d 后用 mSOF + FBS 培养液。

关键词 牛,山羊,核移植,胚胎

中图分类号 S823.9 Q492.2 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)04-0662-05

Abstract This study is conducted to explore an effective culture method for supporting the embryo development. The cattle fetal ear fibroblasts and the goat fetal ear fibroblasts are transplanted into the enucleated cattle oocytes separately by oocyte intraplasmic nuclear injection method to construct bovine cloned embryos and goat-bovine cloned embryos. The embryos are first cultivated in modified charles rosenkrans 2 amino acid medium (mCR2aa) and modified synthetic oviduct fluid medium (mSOF) separately. Then BSA (8mg/mL) or FBS (10%) can be added to mSOF according to the different culture period. The supplements and orders, added during the first three days and after three days are as follow: BSA and BSA, BSA and FBS, FBS and BSA, FBS and FBS. On the basis of the cleavage rate, 8/16-cell rate, blastocysts rate and total cell number of blastocysts, the best culture way can be screened out. Result: First, cleavage rate, 8/16-cell rate, blastocysts rate and total cell number of blastocysts, cultivated in mSOF solution are all higher than those cultivated in mCR2aa ($P < 0.05$). Second, the cleavage rate and 8/16-cell rate, adding BSA and FBS into mSOF, are in turn $79.8\% \pm 7.1\%$, $49.7\% \pm 3.5\%$, $21.5\% \pm 1.8\%$, and 115.2 ± 4.3 in bovine cloned embryo, and $40.1\% \pm 6.3\%$, $29.2\% \pm 2.0\%$, $13.4\% \pm 2.1\%$ and 100.1 ± 3.0 in goat-bovine cloned embryo, which are significant higher than other culture groups ($P < 0.05$). Conclusion: The goat-bovine cloned embryo

Received: November 21, 2006; Accepted: January 8, 2007.

This work was supported by the grant from the National High Technology Research and Development Programme (No. 2004AA213072).

* Corresponding author. Tel: 86-29-87080085; E-mail: zhangyl@public.xa.sn.cn

国家 863 计划资助项目 (No. 2004AA213072).

can be cultivated by the optimized culture measure of bovine cloned embryo. The best culture ways of bovine cloned embryo and goat-bovine cloned embryo are all to use mSOF supplemented BSA in the first three days and then use mSOF supplemented FBS in the next five days.

Key words bovine, goat, Somatic cell nuclear transfer, embryo

动物体细胞核移植近年来得到了长足发展,随着新克隆动物的相继问世,核移植在生命科学基础研究各个领域、商业生产应用、人类医学研究以及拯救濒危珍稀野生动物等方面具有越来越重要的价值。无论是同种核移植技术,还是异种核移植技术,所生产的胚胎都要经过体外培养,所以牛胚胎的体外培养是牛胚胎工程的关键技术。但是早期胚胎在体外培养过程中对环境的变化以及培养液非常敏感,从而导致发育到桑椹胚以及囊胚的比率非常低。对此,国内外很多学者对牛胚胎体外培养液的选择和培养液中添加血清^[1,2]、生长因子^[3]、葡萄糖^[4]、氨基酸^[3,5]等营养物质以及共培养体系颗粒细胞^[1,6]对胚胎培养影响等诸多方面进行了研究。目前有关体外培养体系中添加血清已经有了大量相关报道,但是有关体外培养体系中添加 BSA 和 FBS 的次序对同种及异种胚胎培养影响的资料相当少,而且目前也尚未见到培养异种胚胎的优化培养体系的相关报道。本实验室对异种胚胎均采用相应同种胚胎培养体系进行培养研究。因此本实验就 mCR2aa^[7]与 mSOF^[8]两种培养液对牛同种克隆胚胎及山羊-牛异种克隆胚胎的培养结果进行了对比,就培养液中添加 BSA 和 FBS 的不同次序对培养胚胎的影响进行探索,筛选出最合适的培养体系,并且对同种胚胎和异种胚胎的结果进行了对比。最后尽可能的简化培养操作,使其具有稳定性以及简易性。

1 材料与方法

1.1 卵母细胞的体外成熟

采用抽吸法,从西安肉牛屠宰场回收的牛卵巢上采集卵丘卵母细胞复合体(COCs),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 中,于 38.5 °C,5% CO₂,100%湿度条件下^[9]培养 20~22h 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下一步实验。OM 液组成:TCM199(Gibco)+10%FBS(Gibco)+10mmol/L Hepes(Sigma)+0.5mmol/L Pyruvic acid sodium salt(Sigma)+0.1IU/mL HMG(宁波第二激素厂)+1μg/mL β-E₂(Sigma)

1.2 供体细胞的准备

牛和山羊耳朵成纤维细胞来自 4 月龄大小的 Holsten 奶牛胎儿以及山羊 5 月龄胎儿,分别传到第 5~7 代,将在上一代经染色体核型分析正常的传代细胞作为供体细胞。具体方法参照文献^[10]。核移植前用含 0.5% FBS 的 DMEM 液血清饥饿培养 6~8d。

1.3 卵母细胞的去核以及核移植

挑选去除卵丘细胞并排出第一极体形态正常、胞质均一的用于去核。以 10~15 枚为 1 组,置 7.5μg/mL 细胞松弛素 B(CB, Sigma)的 TCM199 液中孵育 20min 后,移入 50μL TCM199+10%FBS+7.5μg/mL CB 液滴中,石蜡油(Sigma)覆盖,在显微操作仪(Nikon)下用外径 20~25μm 的玻璃细管去核。Hoechst 33342(Sigma)染色,荧光检测去核效果^[11]。采用细胞质内注射法将供体细胞注入去核卵母细胞的细胞质内构建重组胚^[12]。将去核的卵母细胞按 10~15 枚/批置 50μL TCM199+10%FBS 微滴中,用石蜡油覆盖,然后吸取 10~20μL 供体细胞悬液加入操作液滴,静置 5min,显微操作仪下,用外径 10~15μm 的注核管反复吸取细胞,破膜后把细胞核吸入注核管,插入卵母细胞,轻轻将破膜后的核胞质推入卵母细胞胞质。

1.4 核移植胚胎的激活以及体外培养

将同种胚胎及异种胚胎分别用 5μmol/L 离子霉素(Ionomycin)处理 5min,在含 2mmol/L 6-DMAP+5μg/mL CCB 培养液内培养 3.5h,分别采用 mCR2aa^[7]与 mSOF^[4,13]培养液对重组胚胎进行培养。改良 mSOF 中 CaCl₂·2H₂O 为 2mmol/L, NaCl 为 107mmol/L, KCl 为 3.2mmol/L, KH₂PO₄ 为 1.3mmol/L,用前 mCR2aa 中添加 3mg/mL BSA, mSOF 中添加 8mg/mL BSA。在 38.5 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下,用微滴培养法(石蜡油覆盖)(50μL+12 个胚胎 48h 半量换液)培养核移植胚胎 7~8d。同时记录卵裂率,8/16-cell 以及囊胚发育率。

1.5 囊胚细胞数计数

将在 mSOF 培养液不同添加体系中培养 8d 的同种胚胎以及异种胚胎取出 6 枚以上囊胚用 Hoechst 33342(Sigma)染色,处理 15min,然后逐个转

移到清洁的载玻片上,压片后在荧光显微镜下观察计数。

1.6 实验设计

1.6.1 mCR2aa 以及 mSOF 液的筛选:分别采用 mCR2aa 及 mSOF 培养同种胚胎和异种胚胎,根据卵裂率、8/16-cell 以及囊胚发育率筛选出合适的培养液。

1.6.2 mSOF 液中添加 BSA 以及 FBS 的不同次序对胚胎培养的影响:克隆胚胎在 mSOF 液中进行培养,并在不同培养时间添加不同成分(8mg/mL BSA 或者 10% FBS)。培养前三天以及培养三天后添加的补充物质及次序如下:(1)BSA + BSA (2)BSA + FBS;(3)FBS + BSA (4)FBS + FBS。分别记录卵裂率、8/16-cell 以及囊胚发育率。

1.7 数据统计

所有实验重复 3 次以上,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 mSOF 和 mCR2aa 对胚胎发育的影响

mSOF 液中培养同种胚胎和异种胚胎的卵裂率、8/16-cell 发育率以及囊胚发育率均明显高于 mCR2aa 中培养的卵裂率、8/16-cell 发育率以及囊胚发育率(同种依次为 $74.4\% \pm 6.5\%$ Vs $54.2\% \pm 4.3\%$ 、 $45.1\% \pm 6.2\%$ Vs $31.5\% \pm 2.9\%$ 以及 $18.5\% \pm 2.3\%$ Vs $9.3\% \pm 1.8\%$,异种依次为 $46.6\% \pm 3.7\%$ Vs $36.4\% \pm 5.1\%$ 、 $30.4\% \pm 3.8\%$ Vs $20.3\% \pm 3.2\%$ 以及 $8.8\% \pm 2.1\%$ Vs $3.7\% \pm 1.5\%$ ($P < 0.05$)) 表明 mSOF 培养液更适合于培养牛同种胚胎以及山羊-牛异种克隆胚胎(表 1)。

表 1 mSOF 和 mCR2aa 两种不同培养液对胚胎的影响*

Table 1 Effects of culture media mSOF and mCR2aa on the development of cloned embryo

Media	Embryo species(<i>n</i>)		Cleavage rate/%		8/16-cell rate/%		Blastocyst rate/%	
	Bovine ¹	Goat-Bovine ²	Bovine	Goat-Bovine	Bovine	Goat-Bovine	Bovine	Goat-Bovine
mSOF	195	204	74.4 ± 6.5^a	46.6 ± 3.7^a	45.1 ± 6.2^a	30.4 ± 3.8^a	18.5 ± 2.3^a	8.8 ± 2.1^a
mCR2aa	216	187	54.2 ± 4.3^b	36.4 ± 5.1^b	31.5 ± 2.9^b	20.3 ± 3.2^b	9.3 ± 1.8^b	3.7 ± 1.5^b

Note: * The experiments were replicated four times. ¹Bovine cloned embryo. ²Goat-Bovine inter-species cloned embryo. ^a, ^b Different superscripts within columns were significantly different ($P < 0.05$). The same for the following table.

2.2 mSOF 液中添加 BSA 以及 FBS 次序不同对胚胎发育的影响

2.2.1 胚胎发育率的比较:添加 BSA + FBS 和 BSA + BSA 的 mSOF 培养体系培养的同种胚胎和异种胚胎卵裂率(同种为 $79.8\% \pm 7.1\%$ 及 $74.0\% \pm 3.6\%$, 异种为 $40.1\% \pm 6.3\%$ 及 $36.2\% \pm 2.7\%$)均比添加 FBS + BSA、FBS + FBS 的 mSOF 培养体系中培养的卵裂率明显高(同种为 $49.8\% \pm 5.1\%$ 及 $49.5\% \pm$

2.4% , 异种为 $26.1\% \pm 3.2\%$ 及 $23.4\% \pm 2.8\%$ ($P < 0.05$))。在 mSOF 液中添加 BSA + FBS 培养的同种胚胎及异种胚胎的 8/16-cell 发育率和囊胚发育率(同种为 $49.7\% \pm 3.5\%$ 和 $21.5\% \pm 1.8\%$, 异种为 $29.2\% \pm 2.0\%$ 和 $13.4\% \pm 2.1\%$)均比其他组高($P < 0.05$)。本实验结果表明在 mSOF 培养液中添加 BSA + FBS 对同种以及异种胚胎的培养更适合(从表 2 可见)。

表 2 mSOF 液中添加 BSA 以及 FBS 次序不同对胚胎培养发育率的影响*

Table 2 Effects of the different order of supple BSA or FBS to mSOF on the development of the cloned embryo

Add BSA or FBS		Embryo species(<i>n</i>)		Cleavage rate/%		8/16-cell rate/%		Blastocyst rate/%	
0 ~ 72h	72 ~ 192h	Bovine	Goat-Bovine	Bovine	Goat-Bovine	Bovine	Goat-Bovine	Bovine	Goat-Bovine
BSA	FBS	163	202	79.8 ± 7.1^a	40.1 ± 6.3^a	49.7 ± 3.5^a	29.2 ± 2.0^a	21.5 ± 1.8^a	13.4 ± 2.1^a
BSA	BSA	192	188	74.0 ± 3.6^a	36.2 ± 2.7^a	37.5 ± 2.6^b	18.1 ± 2.2^b	10.9 ± 2.0^b	6.9 ± 2.1^b
FBS	BSA	201	211	49.8 ± 5.1^b	26.1 ± 3.2^b	20.4 ± 2.4^c	19.9 ± 2.8^b	5.0 ± 2.3^c	3.3 ± 1.6^b
FBS	FBS	184	192	49.5 ± 2.4^b	23.4 ± 2.8^b	19.0 ± 2.1^c	18.2 ± 2.6^b	4.3 ± 2.0^c	3.1 ± 1.7^b

Note: * The experiments were replicated three times.

2.2.2 发育囊胚细胞数的比较:添加 BSA + FBS 的 mSOF 培养体系中培养的囊胚的囊胚细胞数均比其他三个培养体系 BSA + BSA、FBS + BSA、FBS + FBS 明显高(同种依次为 115.2 ± 4.3 Vs 103.4 ± 4.4 Vs

101.1 ± 5.2 Vs 102.9 ± 7.7 , 异种为 100.1 ± 3.0 Vs 99.0 ± 2.2 Vs 79.7 ± 5.3 Vs 77.7 ± 4.6 ($P < 0.05$)) 从而证明在 mSOF 培养液中添加 BSA + FBS 最合适同种、异种胚胎的培养(从表 3 可见)。

表 3 囊胚细胞数计数

Table 3 Total cell number of blastocysts counted

Add BSA or FBS		Blastocysts examined(n)		Total cell number	
0 ~ 72h	72 ~ 192h	Bovine	Goat-Bovine	Bovine	Goat-Bovine
BSA	FBS	8	10	115.2 ± 4.3 ^a	100.1 ± 3.0 ^a
BSA	BSA	8	10	103.4 ± 4.4 ^b	99.0 ± 2.2 ^b
FBS	BSA	8	7	101.1 ± 5.2 ^b	79.7 ± 5.3 ^c
FBS	FBS	8	6	102.9 ± 7.7 ^b	77.7 ± 4.6 ^c

3 讨论

3.1 mSOF 以及 mCR2aa 对牛核移植胚胎以及山羊-牛异种核移植胚胎发育的影响

关于同种核移植胚胎体外培养液的研究,目前主要有 TCM-199^[14],mCR2aa^[7],mSOF^[4,8]等培养系统。而有关异种胚胎的培养,目前国内尚未见到类似相关报道。本实验室一直以来尝试用同种克隆胚胎培养体系对相应异种克隆胚胎进行培养研究。本研究使用的 mSOF 以及 mCR2aa 均添加了 1.5mmol/L 葡萄糖,相同量的丙酮酸钠,必需氨基酸 非必需氨基酸,谷氨酸,胰岛素,硒和铁传递蛋白,但是培养液中 $H_2PO_4^-$ 及 Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Cl^- 等无机盐离子有一定的差异。无机盐离子不仅是培养液渗透压的主要贡献者,而且其本身也直接或间接地参加胚胎的代谢过程。Walker 等^[15]报导: K^+ 浓度为 2.15 ~ 10.14 mmol/L 时,对羊胚胎在体外的发育无显著影响。王武陵、卢克焕^[16]结果表明: Na^+ / K^+ 比显著影响牛胚胎在体外的发育。本实验, mSOF 液中 Na^+ / K^+ 为 138.9/4.5[(mmol/L) × (mmol/L)], mCR2aa 中 Na^+ / K^+ 的比例为 130.7/2.8[(mmol/L) × (mmol/L)]。这之间的差异可能是胚胎在 mSOF 液中培养比在 mCR2aa 中培养结果好的原因之一。另外 mSOF 中 Ca^{2+} 浓度为 2mmol/L, mCR2aa 中 Ca^{2+} 浓度为 4.5mmol/L,可以看出 Ca^{2+} 浓度为 2mmol/L 可能更有利于胚胎的培养。王武陵、卢克焕^[16]试验结果也显示在 Ca^{2+} 浓度为 2 mmol/L 时,对牛胚胎体外发育有显著促进作用,这也许与 Ca^{2+} 在桑椹胚致密化时所起的作用有关。本实验显示 mSOF 中的这些培养液成分的浓度以及营养环境对于牛克隆胚胎的重编程化有着更有益的作用, mSOF 比 mCR2aa 更合适培养牛同种胚胎以及山羊-牛异种胚胎,同种胚胎的培养结果与 YH Choi 等^[13]的研究报道一致。

3.2 mSOF 培养液中 FBS 和 BSA 的添加次序对于胚胎发育的影响

血清是胚胎培养中经常添加的蛋白质源物质,是目前胚胎培养中被广泛采用而且培养效果最好的一种添加成分^[17]。牛血清白蛋白(BSA)是培养液

中常用的一种蛋白源物质,能结合培养液中的一些胚胎毒性物质,对胚胎有保护作用,血清存在情况下 BSA 能促进胚胎发育,能增加胚胎中的细胞数量。单独使用 BSA 并不能完全取代血清的作用,因为血清中还有一些其他有用因子不包括在 BSA 中。但也有添加血清对胚胎发育产生不利影响的报道, Abe 等^[18]认为,添加血清,特别是在胚胎发育早期添加血清,可增加胚胎脂质含量,抑制卵裂。本实验表明培养前三天添加 BSA 明显比添加血清的卵裂率高,可以看出血清对于最初的卵裂有一定抑制作用,这与 Abe 等^[18]报道的相一致。对比 BSA + FBS 组和 FBS + FBS 组的 8/16 cell 发育率以及囊胚发育率可以看出前三天添加血清对日后胚胎囊胚的发育也有一定的抑制作用,这也说明虽然血清比 BSA 所含成分更加复杂,但是在早期胚胎发育到卵裂之前,BSA 更合适胚胎的培养。对比 BSA + FBS 组和 BSA + BSA 组可以看出培养三天后添加 FBS 对于胚胎的 8/16cell 发育率以及囊胚的发育率非常有利。不少实验也证明血清的存在对胚胎的最初发育有损害作用,而对后期胚胎发育有利,因此不少人提倡在胚胎培养 24 ~ 48h 后才添加血清^[19,20]。本实验表明用 mSOF 培养胚胎时, FBS 宜于胚胎培养的第三天进行添加,原因可能是血清中的蛋白,固醇激素可以刺激桑椹胚的发育和囊胚的形成,从而提高核移植胚胎囊胚的发育率^[21]。就培养液中添加血清的研究,目前应该尽快明确血清中各种因子对胚胎培养的作用,提取其中的有用因子而弃去有害因子,这将是今后研究的一个重要课题之一。

3.3 牛克隆胚胎培养液对山羊-牛异种克隆胚胎发育的影响

不管是同种克隆还是异种克隆均要解决体细胞核的去分化和重编程问题,多数胚胎在发育早期核基因组的重编程是不完全的也是在不断进行中的,在胚胎培养液中加入适当的适于胚胎生长的营养物质往往更有利于胚胎的发育及重编程。从本实验可以看出胚胎发育期间,前三天添加 BSA,三天后添加 FBS 最有利于胚胎的发育。总体说来牛同种胚胎以及异种胚胎对培养液的要求差异不明显,可以使用同一种培养液,这可能是因为胚胎的早期发育主要是由卵母细胞中的母体效应因子(maternal-effect factor)所控制。但是同一种培养液培养牛异种克隆胚胎的发育率明显低于培养同种克隆胚胎的发育率,这可能与异种克隆胚胎的发育过程中受体卵母细胞接受异种供核体细胞的能力以及使异种细胞核重编程和去分化的能力有一定关系。本研究对山羊

牛异种克隆胚胎采用牛同种克隆胚胎培养体系 mSOF 添加 BSA + FBS 来进行培养, 平均囊胚率达到 $13.4\% \pm 2.1\%$, 表明该优化培养体系有效可靠, 可以进行山羊-牛异种胚胎培养的推广和应用。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Fukui Y, Ono H. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J Reprod Fert*, 1989, **86**(2): 501 - 506.
- [2] Zhang ZP(张志平), Zhang JI(张君涛), An ZX(安志兴), *et al.* The optimization of culture system for bovine IVF embryo. *J of Northwest Sci-Tech Univ of Agri and For (Nat Sci Ed)* 西北农林科技大学学报(自然科学版) 2006 **34**(6): 7 - 15.
- [3] Yang BK, Yang X, Foote RH. Effect of growth factors on morula and blastocysts development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine oocytes. *Theriogenology*, 1993, **40**: 521 - 530.
- [4] Takahashi Y, First NL. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology*, 1992, **37**: 963 - 978.
- [5] Ikeda K, Takahashi Y, Katagiri S. Effect of medium change on the development of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes cultured in medium containing amino acids. *J Vet Med Sci*, 2000, **62**(1): 121 - 123.
- [6] Wu YH(吴月红), An ZX(安志兴), Zhang Y(张涌), *et al.* The application of co-culture system on the *in vitro* development of bovine somatic nuclear transferred embryos. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) 2006 **22**(2): 306 - 310.
- [7] Rosenkrans Jr CF, Zeng GQ, Menamara GT, *et al.* Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. *Biol Report* 1993 **49**: 459 - 462.
- [8] Tevit HR, Whittingham DG, Rowson LE. Successful culture of *in vitro* sheep and cattle ova. *J Reprod Fert*, 1972 **30**: 493 - 497.
- [9] Li XF(李雪峰), Li Y(李煜), An ZX(安志兴), *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* (畜牧兽医学报), 2003, **34**(1): 33 - 36.
- [10] Li YQ(李裕强), Zhang Y(张涌), Guo JI(郭继彤), *et al.* Dissociation and culture of goat skin cells. *Journal of Agricultural Biotechnology*(农业生物技术学报), 2000, **8**(2): 133 - 137.
- [11] Li YQ(李裕强), An ZX(安志兴), Zhang Y(张涌), *et al.* Bovine oocytes enucleation and artificial activation. *J of Northwest Sci-Tech Univ of Agri and For (Nat Sci Ed)* 西北农林科技大学学报(自然版) 2004 **32**(11): 6 - 10.
- [12] Li YQ(李裕强), An ZX(安志兴), Zhang Y(张涌), *et al.* Bovine somatic cell nuclear transplantation by intraplasmic injection. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*(畜牧兽医学报), 2005 **36**(1): 33 - 37.
- [13] Choi YH, Lee BC, Lim JM, *et al.* Optimization of culture medium for cloned bovine embryos and its influence on pregnancy and delivery outcome. *Theriogenology* 2002 **58**(6): 1187 - 1197.
- [14] Shamsuddin M, Larsson B, Gustafsson H, *et al.* *In vitro* development up to hatching of Bovine *in vitro*-matured and fertilized oocytes with or without support from somatic cells. *Theriogenology*, 1993, **39**: 1069 - 1079.
- [15] Walker SK, Seamark RF, Quinn P, *et al.* Culture of pronuclear embryos of sheep in a simple medium. *Proc 11th Int Congr Anim Reprod & AJ*, 1988 **4**: 483 - 485.
- [16] Wang WL(王武陵), Lu KH(卢克焕). Effect of inorganic ions on the *in vitro* development of bovine embryos. *Journal of Guangxi Agricultural University*(广西农业大学学报), 1994 **13**(1): 43 - 48.
- [17] Steeves TE, Gardner DK. Temporal and differential effects of amino acids on bovine embryo development in culture. *Biol Reprod*, 1999, **61**: 731 - 740.
- [18] Abe H, Yamashiita S, Itoh T, *et al.* Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro* matured and fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. *Mol Reprod Dev*, 1999 **53**: 325 - 335.
- [19] Zhang JI(张靖飞), Li YQ(李裕强), Liu YF(刘月凤). Progress in embryo *in vitro* culture. *Animal Science & Veterinary Medicine*(动物科学与动物医学) 2002 **19**(2): 19 - 22.
- [20] Rizo D, Ward F, Boland P, *et al.* Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. *Theriogenology* 2001 **56**: 1 - 6.
- [21] Krisher RL, Lane M, Bavister BD. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semidefined and defined culture media. *Bio Report*, 1999 **60**: 1345 - 1352.