核移植方法和活化方法对小鼠体细胞克隆胚胎发育的影响

王二耀[①②] 于 洋[①②] 李雪梅[①②] 焦丽红[①] 王 柳[①*]

(① 中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080; ② 中国科学院研究生院生物系, 北京 100049.
* 联系人, E-mail: wangliu@ioz.ac.cn)

摘要 用卵丘细胞为核供体进行小鼠体细胞克隆, 成功获得了一批成年体细胞克隆小鼠. 为探讨不同核移植方法和重构胚活化方法对小鼠克隆胚发育的影响, 用 B6D2F1 小鼠的卵丘细胞和卵母细胞作为供、受体进行核移植实验, 采用电融合和细胞质内直接显微注射的方法进行核移植, 并采用电脉冲、乙醇处理、氯化锶处理和电脉冲联合氯化锶 4 种不同方法对重构胚进行活化, 对克隆胚胎的体外及体内发育进行研究. 结果显示, 利用显微注射法获得重构胚胎的工作效率(90.7%)显著高于融合法获得重构胚胎的工作效率(49.7%). 乙醇、电脉冲和氯化锶 3 种激活方法都可以诱导孤雌胚发育到囊胚, 但前二者处理的胚胎的囊胚发育率(52.4%, 54.2%)显著低于后者(76.9%). 10 mmol/L 氯化锶处理 6 h 活化效果最好. 融合法获得的重构胚经氯化锶或者电脉冲联合氯化锶激活后, 囊胚发育率(9.5%, 8.6%)显著高于单纯电脉冲激活(2.6%), 而乙醇活化的重构胚没有发育到囊胚阶段. 用显微注射法经氯化锶激活获得的重构胚的囊胚发育率最高(16.6%). 注射法和融合法获得的重构胚胎经氯化锶激活后进行胚胎移植, 都获得了发育到期的体细胞克隆小鼠, 发育到期率分别为2.5%和 1.4%. 结果表明, 两种核移植方法对 B6D2F1 小鼠重构胚胎的早期发育能力有一定影响, 用这两种方法都可以获得体细胞克隆小鼠; 不同活化方法对重构胚胎的体外发育能力有显著影响, 在上述 4 种激活方式中, 氯化锶处理对克隆胚的激活效果最好.

关键词 小鼠 体细胞克隆 核移植 显微操作 卵母细胞激活 发育

核移植是研究细胞核重编程的有力工具. 尽管目前已获得多种体细胞克隆动物[1~9], 但克隆效率仍然很低. 目前认为导致克隆胚胎、胎儿及克隆动物死亡率高的重要原因之一是克隆技术不够完善, 包括核移植方法、胚胎激活方式、胚胎培养及胚胎移植等技术. Perry报道[7], 从 1998 年第一只体细胞克隆小鼠出生以来, 小鼠作为一种优秀的实验动物得到了大量的应用, 但是小鼠的核移植效率一直很低, 国际上能够稳定从事小鼠核移植研究的研究组还很少, 这大大限制了核移植研究的深入.

体细胞克隆小鼠最初是使用压电陶瓷(Piezo)辅助的直接注射方法获得的[2], Zhou等人[10]使用非Piezo协助的注射方法同样获得了体细胞克隆后代, 此后大多数克隆小鼠的研究均是采用了Piezo辅助的注射技术; 只有少数报道是使用融合方法. Ogura等人[11]使用电融合方法获得尾尖成纤维细胞克隆小鼠. Saito等人[8]用融合方法获得胎儿成纤维细胞克隆小鼠. 同一实验中采用两种常规核移植方法对相同供体细胞体细胞克隆胚胎发育的影响的研究目前还没有报道.

卵母细胞的激活是影响克隆效率的重要因素, 因为卵母细胞人工活化方式不能完全模仿受精时卵细胞的活化[12], 因而有必要研究各种激活方法对小鼠体细胞克隆胚的发育的影响, 筛选最优的活化方法, 提高克隆胚胎发育效率.

为了完善克隆技术, 优化小鼠核移植方法和胚胎激活方式, 本研究使用卵丘细胞作为供体, 比较了两种核移植方法(电融合方法和直接注射方法)和 4 种活化方法(电脉冲、乙醇处理、氯化锶处理及电脉冲组合氯化锶激活)对重构胚发育的影响.

1 材料和方法

(ⅰ) 试剂. 孕马血精(PMSG)和人绒毛膜促性腺激素(hCG)购自天津市华孚高新生物技术公司, 其

2006-09-06 收稿, 2006-11-03 接受
国家自然科学基金国际合作重点项目和国家自然科学基金面上项目(批准号: 30300176, 30400232)

他试剂购自 Sigma 公司.

(ⅱ) 实验动物. DBA 雄鼠和 C57BL/6 雌鼠购自北京维通利华实验动物中心. B6D2F1 (C57BL/6*DBA) 小鼠为本实验室自行繁殖获得.

(ⅲ) 溶液. 卵母细胞去核前后的培养以及重构胚的培养用 M16 培养液. 卵母细胞收集及纺锤体复合体的去除用 M2 液. 电激活液含 0.05 mmol/L $CaCl_2$, 0.1 mmol/L $MgSO_4$, 0.3 mol/L 甘露醇, 0.1 mg/mL PVA, 3 mg/mL BSA. 融合液含 0.1 mmol/L $MgSO_4$, 0.3 mol/L 甘露醇, 0.1 mg/mL PVA, 3 mg/mL BSA.

(ⅳ) 卵母细胞的收集和供体细胞的准备. 8~16 周龄的 B6D2F1 雌鼠每只腹腔注射 10 IU 的 PMSG, 48 h 后腹腔注射 10 IU hCG, 13 h 后颈椎离断小鼠并取卵, 获得卵丘卵母细胞复合体后, 放入含 0.1% (质量体积比)的透明质酸酶的 M2 溶液中处理 3 min, 脱掉卵丘细胞, 卵母细胞在 M16 溶液中洗 3 遍后放入 M16 溶液中, 于 37℃, 5% CO_2 的空气中培养备用. 卵丘细胞在 M2 溶液中洗两遍以去除透明质酸酶, 并保存在 M2 液中备用. 使用时挑选直径为 10~12 μm, 圆形, 细胞膜完整的卵丘细胞作为供体.

(ⅴ) 卵母细胞纺锤体复合体的去除. 卵母细胞纺锤体复合体的去除(称为去核)及重构操作在 NIKON 显微镜下进行. 显微操作器为 NIKON-Narishige (MO-188, TOKYO, JAPAN). 卵母细胞放入含 5 μg/mL 细胞松驰素 B 的 M2 液中, 转动卵母细胞使 M Ⅱ 期染色体中期板(可见一明亮区域)位于 3 点位置. 去核管的内径为 8~10 μm 的平口针, 借助压电陶瓷(Piezo, Prim 1500)脉冲在 3 点位置的透明带上开一洞, 通过这一洞把去核平口针抵在明亮区域的纺锤体复合体上, 给一吸力的时候, 可见复合体堵塞在管口, 然后退针, 纺锤体复合体即被拉出, 同时仅带出很少量细胞质.

(ⅵ) 核移植方法. (1) 电融合方法. 吸取圆形的卵丘细胞, 通过去核时所开的洞置于卵周隙内, 并用针尖按压卵丘细胞, 使其细胞膜与卵母细胞紧密接触. 重构好的细胞置入融合液中平衡 1 min, 然后放入融合室中, 施加 2 次 2.2 kV/cm 持续 10 μs 的电脉冲进行融合, 放入 M16 液中, 于 37℃, 5% CO_2 的空气中培养, 30 min 后在实体显微镜下观察融合情况. (2) 直接注射法. 用内径为 6~8 μm 的注射针吸取卵丘细胞, 反复吹出、吸入卵丘细胞使其质膜破裂, 使细胞核刚好位于注射针管口, 通过去核时透明带上的洞, 注射针伸入卵胞质内, 然后给一小的 Piezo 脉冲, 使卵母细胞质膜破开, 注入卵丘细胞核, 退针时使用负压使卵质膜封闭. 重构好的卵母细胞放入 M16 培养液中培养 1~3 h, 以待活化处理.

(ⅶ) 卵母细胞的活化. 卵母细胞的孤雌活化采用 3 种方式: (1) 2.2 kV/cm 持续 10 μs 的两次直流电脉冲(间隔 1 s); (2) 7%乙醇的 M16 液处理 5 min; (3) 氯化锶处理(含 10 mmol/L $SrCl_2$ 和 5 μg/mL 细胞松驰素 B 的无钙 M16 液) 6 h. 活化处理后, 将电激活组和乙醇激活组细胞放入含 5 μg/mL 细胞松驰素 B 的 M16 液培养 6 h. 含有明显原核的细胞记为已激活. 然后将激活后的卵母细胞放入 M16 液中, 于 37℃, 5% CO_2 的空气中培养, 观察体外发育. 对氯化锶活化条件进行了优化, 使用不同浓度的氯化锶(5, 10 和 15 mmol/L)和不同处理时间(4 和 6 h), 观察孤雌活化效果.

(ⅷ) 重构胚的活化. 直接注射法获得的重构胚用含 10 mmol/L 氯化锶和 5 μg/mL 细胞松驰素的无钙 M16 液处理 6 h 进行激活.

电融合方法获得的重构胚用 4 种方法进行激活: (1) 2.2 kV/cm 持续 10 μs 的两次直流电脉冲; (2) 7%乙醇的 M16 液处理 5 min (上述两组细胞处理后, 培养于含 5 μg/mL 细胞松驰 B 的 M16 液 6 h); (3) 氯化锶处理(含 10 mmol/L $SrCl_2$ 和 5 μg/mL 细胞松驰 B 的无钙 M16 液) 6 h; (4) 2.2 kV/cm 持续 10 μs 的两次直流电脉冲处理, 15 min 后, 放入含 10 mmol/L $SrCl_2$ 和 5 μg/mL 细胞松驰 B 的无钙 M16 液中 6 h. 活化处理后, 具有明显类原核结构的胚胎记为已活化胚胎, 培养于 M16 液中观察体外发育.

(ⅸ) 胚胎移植. 重构胚激活后, 将 1 个细胞克隆胚移入假孕 0.5 d 的昆明白小鼠输卵管膨大部(移植前一天合笼), 所用的结扎昆明白公鼠在实验前已连续 5 次交配使母鼠见栓但不育. 于假孕 19.5 d 进行剖腹产手术.

(ⅹ) 统计分析. 结果用 χ^2 检验分析, $P<0.05$ 记为差异显著.

2 结果

2.1 两种核移植方法获得克隆胚胎的工作效率

两种方法的重构成功率见表 1. 利用 Piezo 辅助的直接注射法获得克隆胚胎的效率是 90.7%, 显著高于利用电融合方法获得的克隆胚胎的效率(49.7%). 经过注射后, 90.7%的供体细胞可以成功地导入卵母细胞胞质内, 而使用电融合方法, 只有近一半的供体细胞可以成功导入卵母细胞胞质内.

表 1 不同核移植方法的操作成功率

核移植方法	去核卵数	核移植数(%)		总成功率(%)[a)]
		供体导入卵周隙数(%)	融合成功数(%)	
注射法	162	147 (90.7)		147/162 (90.7)[a]
电融合法	380	368(96.8)	189(51.4)	189/380 (49.7)[b]

a) 不同字母的数值表示差异显著($P < 0.05$), 数据使用χ^2检验分析, 下同

2.2 小鼠卵母细胞的孤雌发育

用乙醇、氯化锶以及电脉冲对卵母细胞进行孤雌活化. 结果表明, 氯化锶激活的孤雌胚胎体外囊胚发育率(76.9%)显著高于乙醇和电激活的孤雌胚胎的体外囊胚发育率(分别为 52.4%和 54.2%), 而乙醇和电激活间没有显著差异(表 2).

表 2 不同激活方法对孤雌卵体外发育的影响

激活方法	重复数	卵母细胞数	活化卵数(%)	卵裂数(%)	囊胚数(%)
7%乙醇	3	124	118 (95.2)	105 (84.7)	65 (52.4)[b]
氯化锶	5	160	154 (96.3)	141(88.1)	123 (76.9)[a]
电脉冲	3	118	110 (93.2)	101 (85.6)	64 (54.2)[b]

以上结果表明, 氯化锶可有效地激活卵母细胞, 但不同浓度的氯化锶以及处理时间可能影响活化效果, 本研究进一步比较了 0, 5, 10 和 15 mmol/L 的氯化锶在不同处理时间(4 和 6 h)时的激活能力. 结果表明, B6D2F1 小鼠在用 10 mmol/L 氯化锶处理 6 h 激活效率最高, 囊胚发育率为 76.9%, 除了相同浓度处理 4 h 组外, 显著高于其他浓度及处理时间组(表 3).

2.3 不同核移植方法和激活方法获得的重构胚的体外发育

采用相同的氯化锶活化方法, 注射法获得的重构胚体外囊胚发育率(16.6%)显著高于融合法获得的克隆胚的囊胚率(9.5%). 采用融合方法, 氯化锶激活后囊胚发育率(9.5%)显著高于电脉冲激活的重构胚(2.6%), 但与电脉冲+氯化锶组合激活组的囊胚发育率无显著差异. 用乙醇激活的重构胚未发育至囊胚(表 4).

2.4 不同核移植方法和激活方法获得的重构胚的体内发育

将 1 个细胞重构胚移入假孕 0.5 d 昆明白小鼠体内(结扎公鼠也为昆明白), 于 19.5 d 进行剖腹产, 使用氯化锶激活、注射法重构的胚胎发育到期率为 2.5%, 用氯化锶激活、融合法重构的胚胎发育到期率为 1.4%, 而使用其他激活方式的重构胚没有发育到期(表 5). 两种重构方法各获得 2 只成活一周以上的体细胞克隆小鼠.

表 3 不同浓度氯化锶、处理不同时间的孤雌卵体外发育情况

浓度/mmol · L^{-1}	处理时间/h	卵母细胞数(重复数)	活化卵数(%)	卵裂数(%)	囊胚数(%)
0	6	131(6)	0[c]	0[c]	0[c]
5	6	122(3)	98 (80.3)[b]	90 (73.8)[b]	48 (39.3)[b]
10	6	160(5)	154 (96.3)[a]	141(88.1)[a]	123(76.9)[a]
10	4	158(6)	152 (96.2)[a]	136 (86.1)[a]	115 (72.8)[a]
15	6	120(3)	94 (78.3)[b]	94 (78.3)[b]	52 (43.3)[b]

表 4 不同核移植方法和激活方法获得的重构胚的体外发育

核移植方法	活化方法			重构胚数	活化胚数(%)	发育至细胞(%)	发育至囊胚(%)
	电脉冲	乙醇	氯化锶				
注射	–	–	+	162	133(82.1)[a]	97(59.9)[a]	27(16.6)[a]
融合	+	–	–	116	91(78.4)[a]	61(52.6)[b]	3(2.6)[d]
融合	–	+	–	96	69(71.9)[c]	33(34.4)[c]	0(0)[c]
融合	+	–	+	128	98(76.6)[b]	67(52.3)[b]	11(8.6)[b]
融合	–	–	+	95	72(75.8)[b]	51(53.7)[b]	9(9.5)[b]

表 5 不同核移植方法和激活方法获得的重构胚的体内发育

核移植方法	活化方法			移植胚数	到期(to term)发育	
	电脉冲	乙醇	氯化锶		到期胎儿(%)	一周后存活后代(%)
注射	–	–	+	162	4(2.5)	2(1.2)
融合	+	–	–	79	0	0
融合	–	+	–	92	0	0
融合	+	–	+	88	0	0
融合	–	–	+	209	3(1.4)	2(0.96)

3 讨论

3.1 核移植方法与动物克隆

本研究证明，用注射法和电融合法均可获得体细胞克隆小鼠，且采用两种方法的克隆小鼠发育到期率都在 1%~3%. 尽管在家畜核移植研究中，电融合方法是一种常规的重构方法，但对于小鼠，除了用 4 细胞卵裂球和桑椹胚细胞作供体的核移植外[13]，电融合方法很少用于小鼠体细胞核移植研究. 在Ogura等人[11]的实验中，所使用的是尾尖成纤维细胞，其直径较大，因而获得了较高的融合率；卵丘细胞由于直径小，融合困难，因而很少用融合方法进行重构. 本研究利用融合法获得了 49.7%的重构成功率，显著低于显微注射方法获得的成功率. 尽管如此，由于显微注射方法需要较高的操作技能，电融合方法仍作为一种重要的核移植方法被采用. 在本研究中，电融合获得的重构胚，无论采用何种活化方式，其囊胚发育率都显著低于显微注射法获得的重构胚，原因可能在于融合时的电刺激同时对小鼠的卵母细胞具有一定的活化作用，而此时的卵母细胞对供体核尚未开始进行重编程，因而影响了重构胚的体外发育，Wakayama等人[2]认为延迟活化是他们成功克隆小鼠的原因之一. 其他的研究者也对核移植所采用的电融合及注射方法进行了比较. 但对哪种方法更好未达成一个统一的认识. Galli等人[14]报道牛卵母细胞电融合导入卵丘细胞和成纤维细胞后，囊胚形成率显著高于直接注射法，然而重构胚移入受体牛后受胎率无显著差异. 相反，Roh等人[15]用两种方法核移植后，猪囊胚形成率无显著差异. Heyman等人[16]利用注射法对牛的细胞进行核移植获得了高的囊胚发育率. Kawano等人[17]认为两种方法对猪的囊胚形成率、囊胚细胞数、内细胞团与滋养层细胞数都无显著影响. 这些实验表明，细胞融合和直接注射方法的核移植效率可能对动物品种有依赖性. 注射法大大提高了重构速度，但其对体内发育的影响仍需进一步的研究.

3.2 卵母细胞的孤雌激活

正常发育中，哺乳动物卵母细胞由精子激活，卵母细胞活化后表现一系列形态变化以及卵胞质内物质的变化，包括胞内钙浓度的反复升高、第二极体的排放、原核形成、DNA的合成和有丝分裂的开始等. M II 期的卵母细胞也可以用人工方式孤雌激活，如电脉冲[18]、钙离子载体、氯化锶、乙醇、放线菌酮(一种蛋白合成抑制剂)，或者这些方式的组合使用[19,20].

精子入卵引起卵胞质内短暂的周期性的自由钙浓度的升高，小鼠及其他哺乳动物这种变化持续数小时[21]. 受精时这种细胞内游离钙浓度的升高，可诱发钙调蛋白激酶 II (CaM II)的激活，使cyclins退化和CSF灭活，$P34^{cdc2}$磷酸化，MPF灭活，从而使卵子从成熟分裂阻遏状态释放[22]. 也就是说钙振荡使卵内成熟促进因子MPF失活，而MPF的作用是使卵子停滞在M II 期[23]. 人工激活卵母细胞的目的在于模仿精子诱导的卵胞质变化[24]，锶离子可取代胞内结合态钙离子，使钙从胞内钙库释放从而引起自由钙浓度的升高，并可引起多次钙升高形成钙振荡[25]. 电脉冲引起暂时性的膜的穿孔而导致跨膜钙内流，而乙醇是通过刺激质膜上三磷酸肌醇的形成而引起钙释放[26]. 本研究中，使用乙醇、氯化锶、电脉冲对卵母细胞进行活化处理，就孤雌激活后原核形成而言，乙醇、电脉冲及氯化锶处理之间没有显著差异，尽管如此，氯化锶处理获得了最高的孤雌囊胚发育率. 这是因为活化后胞质内钙升高的次数、频率、幅度和持续时间都影响后续的发育，包括囊胚发育率[27]，氯化锶诱导多次胞内钙升高，乙醇和一次电脉冲只诱导一次自由钙的升高[21]，说明重复多次的钙升高对孤雌胚胎发育是有利的. 实验证明，对于孤雌胚胎而言，在活化过程中，氯化锶的作用时间在 4 和 6 h的时候，获得的囊胚发育率并没有显著差异. Ma等人[28]报道，在 10 mmol/L氯化锶的浓度下，作用 2.5 h就可以获得较高的囊胚发育率. 由此可见，对于孤雌活化的胚胎而言，在 10 mmol/L氯化锶的浓度下，氯化锶的作用时间的范围比较大，并且都可以获得较高的囊胚发育率.

除了活化试剂的影响，孤雌活化的效率与取卵时间[29]和小鼠的遗传背景[30]也有相关性.

3.3 不同活化方式激活后重构胚的发育

在正常受精过程中，精子进入卵母细胞，诱发内质网释放 Ca^{2+}，使细胞内游离的 Ca^{2+}浓度增加，从而导致细胞内 MPF 表达水平下降，使停滞在第二次减数分裂中期的卵母细胞恢复减数分裂，进入分裂末期，形成原核，使胚胎进入早期发育. 但是在这个过程中，Ca^{2+}浓度的变化是反复振荡的，会出现数个 Ca^{2+}峰. 胚胎活化和启动胚胎早期发育的 Ca^{2+}浓度并

不相同，启动胚胎早期发育的 Ca^{2+}浓度要比胚胎活化所需 Ca^{2+}浓度大许多. 因此，在采用乙醇和电活化过程中，这种不充分的活化尽管可以使停滞在第二次减数分裂中期的克隆胚胎恢复减数分裂，进入分裂末期，形成类原核，但是并不能很好地启动克隆胚胎早期的发育，因此胚胎早期囊胚发育率显著降低.

本研究使用不同的激活方式处理重构胚时，氯化锶处理获得的囊胚发育率显著高于乙醇和电激活. 本研究还同时使用了电脉冲和氯化锶的组合方式进行激活，希望这种方式能更好地模仿受精时的情形，因为受精时的首次钙升高的幅度要高于后续的升高幅度[31]，但是这种组合方式没有提高克隆胚的囊胚发育率. 这可能仍然是因为它们引起的钙变化次数的不同造成的，氯化锶引起的多次钙峰更加类似于受精时发生的情况；另一方面可能在于其引起钙变化的细节不同造成的. 在正常受精中，首次钙升高的幅度大，持续时间长，而且是叠加的，随后的钙振荡频率低[31]，而且在第一次有丝分裂的原核核膜破裂时，又出现了钙振荡[32]，而这些在用孤雌激活方法时没有实现. 在孤雌活化中，几种激活方式都可以获得较高的囊胚发育率，但在克隆胚中的情形不同，因而克隆胚可能比孤雌胚需要更精细的模仿受精时的钙变化模式. 有研究表明，在兔子的核移植中，间断性的提供电脉冲不仅可以显著增加激活率和融合率，而且更重要的是重构胚的发育率也有了明显的提高[33]. 但也有研究表明，电融合后一段时间的培养对于供体核的重编程(reprogramming)是重要的，并且在不同种属的动物中，所需要重编程的时间是不一样的[29].

锶离子是一种 2 价阳离子，是一种钙离子的替代物. 在活化过程中，锶可以诱导内质网的内源钙离子释放，用氯化锶激活，无论是注射法，还是融合法，在进行了重构胚移植后都获得了发育到期的后代，而使用其他激活方式未获得到期发育. 在另一篇报道中，即使使用精子提取物激活重构胚，发育到期率与氯化锶激活没有显著差异[34]. 这可能是因为精子因子引起的钙振荡的频率要显著地高于正常受精时的钙振荡[35]. 所有这些表明，克隆胚的活化机制有其特殊性，特别是首次钙升高的模式，以及有丝分裂过程中的钙振荡，因而充分了解克隆胚的活化机制，优化活化方式有望进一步提高克隆效率.

作为影响克隆效率的主要因素之一，核移植和活化方法是研究的热点，也在不断改进中. Kishigami等人[36]报道，在活化过程中加入甲基化药物Trichostatin A，可以显著提高体外囊胚率、发育到期率和分离干细胞的效率.

本研究结果表明，使用卵丘细胞作供体，电融合和注射方法都可以获得体细胞克隆小鼠，但克隆效率仍然在 1%~3%，因而操作技术可能不是引起克隆胚发育率低的根本原因. 电脉冲和乙醇处理都可以有效地诱导孤雌胚发育至囊胚，但诱导克隆胚的囊胚发育能力大大下降. 能引起多次钙振荡的氯化锶处理对克隆胚的激活效果最好.

参 考 文 献

1 Wilmut I, Schinieke A E, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature, 1997, 385: 810—813[DOI]

2 Wakayama T, Perry A C F, Zuccotti M, et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. Nature, 1998, 394: 369—374[DOI]

3 Polejaeva I A, Chen S H, Vaught T D, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. Nature, 2000, 407: 86—90[DOI]

4 Chesne P, Adenot P G, Viglietta C, et al. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. Nat Biotechnol, 2002, 20: 366—369[DOI]

5 Zhou Q, Renard J P, Friec G L, et al. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. Science, 2003, 302: 1179[DOI]

6 Lee B C, Lim M K, Jang G, et al. Dogs cloned from adult somatic cells. Nature, 2005, 436(7051): 641[DOI]

7 Perry A C. Nuclear transfer cloning and the United Nations. Nat Biotechnol, 2004, 22(12): 1506—1508[DOI]

8 Saito M, Saga A, Matsuoka H. Production of a cloned mouse by nuclear transfer from a fetal fibroblast cell of a mouse closed colony strain. Exp Anim, 2004, 53(5): 467—469[DOI]

9 Woods G L, White K L, Vanderwall D K et al. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. Science, 2003, 301(5636): 1063[DOI]

10 Zhou Q, Laurent B, Renard J P. A simplified method for the reconstruction of fully competent mouse zygotes from adult somatic donor nuclei. Cloning, 2000, 2: 35—44[DOI]

11 Ogura A, Inoue K, Takano K, et al. Birth of mice after nuclear transfer by electrofusion using tail tip cells. Mol Reprod Dev, 2000, 57(1): 55—59[DOI]

12 Alberio R, Zakhartchenko V, Motlik J, et al. Mammalian oocyte activation: Lessons from the sperm and implications for nuclear transfer. Int J Dev Biol, 2001, 45(7): 797—809

13 Tsunoda Y, Kato Y. Full-term development after transfer of nuclei from 4-cell and compacted morula stage embryos to enucleated oocytes in the mouse. J Exp Zool, 1997, 278: 250—254[DOI]

14 Galli C, Lagutina I, Vassiliev I, et al. Comparison of microinjection (piezo-electric) and cell fusion for nuclear transfer success with differ-

ent cell types in cattle. Clon Stem Cells, 2002, 4(3): 189—196[DOI]

15 Roh S, Lee E S, Lee B C, et al. *In vitro* development of porcine nuclear transfer embryos reconstructed by microinjection of somatic cell nuclei into oocytes using Piezo-driven micromanipulator. Theriogenology, 2001, 55: 288(abstact)

16 Heyman Y, Zhou Q, Lebourhis D, et al. Novel approaches and hurdles to somatic cloning in cattle. Clon Stem Cells, 2002, 4(1): 47—55[DOI]

17 Kawano K, Kato Y, Tsunoda Y. Comparison of *in vitro* development of porcine nuclear-transferred oocytes receiving fetal somatic cells by injection and fusion methods. Clon Stem Cells, 2004, 6(2): 67—72[DOI]

18 Ozil J P. The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation. Development, 1990, 109: 117—127

19 Hagemann L J, Hillery-Weinhold F L, Leibfried Rutledge M L, et al. Activation of murine oocytes with Ca^{2+} ionophore and cycloheximide. J Exp Zool, 1995, 271(1): 57—61[DOI]

20 Wang W H, Machaty Z, Ruddock N, et al. Activation of porcine oocytes with calcium ionophore: Effects of extracellular calcium. Mol Reprod Dev, 1999, 53(1): 99—107[DOI]

21 Vitullo A D, Ozil J P. Repetitive calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear development during mouse oocyte activation. Dev Biol, 1992, 151: 128—136[DOI]

22 Machaty Z, Prather R S. Strategies for activating nuclear transfer embryos. Reprod Fertil Dev, 1998, 10: 599—613[DOI]

23 Dupont G. Link between fertilization-induced Ca^{2+} oscillations and relief from metaphase Ⅱ arrest in mammalian eggs: A model based on calmodulin-dependent kinase Ⅱ activation. Biophys Chem, 1998, 72: 153—167[DOI]

24 Nakada K, Mizuno J. Intracellular calcium responses in bovine oocytes induced by spermatozoa and by reagents. Theriogenology, 1998, 50: 269—282[DOI]

25 Cuthbertson K S R, Whittingham D G, Cobbold P H. Free Ca^{2+} increases in exponential phases during mouse oocyte activation. Nature, 1981, 294: 754—757[DOI]

26 Loi P, Ledda S, Fulka Jr J, et al. Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: Effect of activation protocols. Biol Reprod, 1998, 58: 1177—1187[DOI]

27 Ikumi S, Asada M, Sawai K, et al. Effect of activation methods for bovine oocytes after intracytoplasmic injection. J Reprod Dev, 2003, 49: 37—43[DOI]

28 Ma S F, Liu X Y, Miao D Q, et al. Parthenogenetic activation of mouse oocytes by strontium chloride: A search for the best conditions. Theriogenology, 2005, 64: 1142—1157[DOI]

29 Koo D B, Kang Y K, Choi Y H, et al. *In vitro* development of reconstructed porcine oocytes after somatic cell nuclear transfer. Biol Reprod, 2000, 63(4): 986—992[DOI]

30 Ibanez E, Albertini D F, Overstrom E W. Effect of genetic background and activating stimulus on the timing of meiotic cell cycle progression in parthenogenetically activated mouse oocytes. Reproduction, 2005, 129(1): 27—38[DOI]

31 Jones K T, Nixon V L. Sperm-induced Ca^{2+} oscillations in mouse oocytes and eggs can be mimicked by photolysis of caged inositol 1,4,5-trisphosphate: Evidence to support a continuous low level production of inositol 1,4,5-trisphosphate during mammalian fertilization. Dev Biol, 2000, 225: 1—12[DOI]

32 Bos-Mikich A, Whittingham D G, Jones K T. Meiotic and mitotic Ca^{2+} oscillations affect cell composition in resulting blastocysts. Dev Biol, 1997, 182(1): 172—179[DOI]

33 Collas P, Robl J M. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. Biol Reprod, 1992, 46: 492—500[DOI]

34 Kishikawa H, Wakayama T, Yanagimachi R. Comparison of oocyte-activating agents for mouse cloning. Cloning, 1999, 1: 153—159[DOI]

35 Wu H, Smyth J, Luzzi V, et al. Sperm factor induces intracellular free calcium oscillations by stimulating the phosphoinositide pathway. Biol Reprod, 2001, 64(5): 1338—1349[DOI]

36 Kishigami S, Mizutani E, Ohta H et al. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 340(1): 183—189