

体细胞核移植技术生产转基因猪胚胎的研究

华再东¹, 刘西梅¹, 毕延震¹, 华升², 郑新民¹

(1 湖北省农业科学院, 动物胚胎工程及分子育种湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430064;
2 武汉金鹰牧业有限公司, 湖北 武汉 430209)

摘要:以转染绿色荧光蛋白基因的猪胎儿成纤维阳性细胞作为体细胞核移植的核供体, 体外成熟卵母细胞为核移植受体构建绿色荧光蛋白转基因克隆猪胚胎, 研究供核细胞的处理、注核部位及重构胚融合/激活时间对转 GFP 克隆胚早期发育的影响. 结果显示, 胎儿成纤维细胞血清饥饿与非饥饿培养 10 d 处理组, 采用卵周间隙核移植重构胚的卵裂率(82.35% 和 79.07%) 差异不显著($P>0.05$); 体外培养 42~44 h 卵母细胞进行胞质内和卵周间隙注核的重构胚, 其卵裂率(81.11% 和 76.80%) 差异不显著($P>0.05$); 将卵周间隙注射法构建重构胚在 0~1 h, 2~4 h 和 6~8 h 进行融合/激活操作, 前 2 组重构胚卵裂率(75.61% 和 83.07%) 无显著差异($P>0.05$), 但显著高于第 3 组(60.00%) 的卵裂率($P<0.05$).

关键词:供核细胞; 融合激活时间; 转基因重构胚; 猪
中图分类号:S864.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2013)03-0394-05

A Study of Transgenic Pig Embryos Produced by Somatic Cell Nuclear Transfer

HUA Zaidong¹, LIU Ximei¹, BI Yanzhen¹, HUA Sheng², ZHENG Xinmin¹

(1 Hubei Key Lab of Animal Embryo Engineering and Molecular Breeding, Hubei Academy of Agriculture Science, Wuhan 430064, China; 2 Wuhan Jinying Animal Husbandry Co., Ltd., Wuhan 430209, China)

Abstract: In the present study, green fluorescent protein (GFP) transgenic embryos were reconstructed by nuclear transfer of GFP positive cells into enucleated *in vitro* matured oocytes. The development of reconstructed embryos both *in vitro* was observed, and GFP expression was checked as well. This research was conducted to study the processing of nuclear cells, the method of nuclear transfer and fusion/activation on early development *in vitro* of reconstructed embryos. The results showed that there were no significant differences in the cleavage rates between serum hunger and not hunger training 10 d using injection ways of perirenal space of eggs, and the cleavage rate of reconstructed embryos with intracytoplasmic injection (81.11%) was not significantly higher than that of the perirenal space of eggs (76.80%). After activation treatment, the rate of cleavage were assessed on 2 days, respectively. Although there were no significant differences in the cleavage rates of the first two treatment groups (75.61% and 83.07%), the developmental rate was significantly higher than that of the third group (60.00%).

Key words: fetal fibroblast cells; fusion activation schedule; transgenic embryos; pig

哺乳动物细胞核移植研究经历时间并不长, 以 1997 年英国 Roslin 研究所 Wilmut 实验室“多利羊”的诞生为标志, 揭开了体细胞核移植的序幕^[1]. 1998 年, Wakayama 等^[2]用颗粒细胞作供核细胞克隆出了

收稿日期:2013-05-20 网络出版时间:2013-06-13
网络出版地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20130613.1424.023.html>
作者简介:华再东(1978—),男,助理研究员,博士;通信作者:郑新民(1960—),男,研究员,硕士,E-mail:anbit20@163.com
基金项目:国家转基因生物新品种培育重大专项(2013ZX08006-002,2013ZX08010-3,2013ZX08006-003);湖北省农业科技创新中心课题(2011-620-001-003);湖北省自然科学基金(2010CDA120);湖北省国际科技合作项目(2009BFA012)

小鼠.同年,Cibelli等^[3]得到第1头体细胞转基因牛.但由于猪的特殊生殖特点,导致利用细胞核移植技术生产转基因猪的发展比较滞后,直到2000年,Polejaeva等^[4]才获得首例体细胞克隆猪.2003年,Sanghwan等^[5]克隆出了表达强荧光蛋白的转基因猪.Jagdece等^[6]克隆出了敲除 α -1, α -2半乳糖苷转移酶基因的克隆猪,从而为人类培育异种器官移植猪跨进了一大步.在国内通过该技术路线获得了转基因山羊^[7]和转基因牛^[8].冯秀亮等^[9]得到了人体细胞和猪卵母细胞异种核移植囊胚.2005年8月中国农业大学李宁教授课题组获得我国第1头体细胞克隆猪,我国也成为世界第7个获得猪体细胞克隆后代的国家^[10].尽管体细胞核移植技术已在牛、羊、小鼠、猪等动物上获得成功,但总效率仍较低.而猪的体细胞核移植效率更低,体外成熟卵母细胞组成的重构胚发育至囊胚的比例在7%~10%,体内的为10%~31%,出生活仔数与移植胚的比率仅为1%左右^[11].绿色荧光蛋白(GFP)是一种水母蛋白,由于该蛋白可以在特定波长紫外光的激发下发出绿色荧光,因此可以作为标记蛋白.以绿色荧光蛋白为标记基因进行转基因动物研究可以使基因的检测更为简单,因此该基因成为转基因动物相关研究领域广泛应用的标记基因.为了完善克隆技术,优化猪核移植方法和胚胎激活方式,本研究使用转绿色荧光蛋白基因的胎儿成纤维细胞作为供体,比较了胞质内和卵周间隙注射方法、供体细胞处理方法及重构胚的融合/激活时间对转GFP克隆胚早期发育的影响.

1 材料与方法

1.1 材料

DPBS和TCM-199为Gibco公司产品,孕马血清促性腺激素(PMSG)、人绒毛膜促性腺激素(hCG)为宁波激素制品厂产品;细胞培养相关耗材为NEST Biotech Co.,Ltd.产品,卵母体外成熟培养(IVM)以及胚胎培养4孔板为Rochford Medical Ltd.产品.其他试剂如未特别注明,均为Sigma公司产品.

卵母细胞体外培养液为改良TCM-199(mTCM199),添加3.05 mmol/L葡萄糖,0.91 mmol/L丙酮酸钠,0.57 mmol/L L-半胱氨酸,1.00 mmol/L L-谷氨酰胺,10 ng/mL表皮生长因子(EGF),10 IU/mL hCG和10 IU/mL PMSG,75 μ g/mL青霉素,50 μ g/mL硫酸链霉素,体积分数为10%猪卵泡液(pFF);NCSU-23+4 mg/mL BSA^[12].洗卵液用DPBS;脱卵液用质量分数为0.1%透明质酸酶.显微操作液为添加7.5 μ g/mL细胞松弛素B(CB)和4 mg/mL牛血清白蛋白(BSA)的HEPES缓冲的TCM-199;融合/激活液由0.25 mol/L甘露醇,0.1 mmol/L氯化钙,0.1 mmol/L

氯化镁及0.5 mmol/L HEPES组成;胚胎培养液为NCSU-23+4 mg/mL BSA.

1.2 方法

1.2.1 猪胎儿成纤维细胞系的建立 从子宫内取出胎儿,含抗生素DPBS清洗胎儿,转移到超净工作台内,用剪刀去除胎儿头,四肢,内脏,DPBS冲洗;在直径100 mm细胞培养皿内用剪刀将剩余部分剪碎,组织块大小为1 mm³,加入少许血清,将组织块转移到细胞培养瓶的底壁上;用弯头吸管将组织块均匀地铺开,将铺有组织块的一面向上,加入15 mL细胞培养液,再放入39℃、相对湿度为100%、体积分数为5% CO₂培养箱;培养6~8 h后,将铺有组织块的一面翻转过来,使细胞培养液浸没组织块;培养5 d后观察组织块周围有无细胞爬出,待细胞生长至80%汇合时,进行传代培养或者冷冻保存.具体方法参考文献[13].

1.2.2 猪胎儿成纤维细胞的转染和筛选 利用脂质体介导的方法将质粒pEGFP-C1(Clontech)转染到猪胎儿成纤维细胞,即按照试剂盒Lipofectamine™ 2000(Invitrogen)所附说明书进行转染:将传代2~5次的细胞接种到6孔培养板,待其在无抗生素的细胞培养液中汇合90%时进行转染,每孔加入500 μ L含4 μ g pEGFP-C1和10 μ L Lipofectamine™ 2000并预先在室温孵育20 min的无血清DMEM,混匀转染培养液,放入细胞培养箱,在39℃、体积分数为5% CO₂、相对湿度为100%条件下培养6~8 h,再换用含体积分数为20% FBS、体积分数为1% NEAA的高糖DMEM培养.待细胞汇合90%时,将细胞消化后转至T-25,加入含0.6 mg/mL G418的细胞培养液连续筛选14 d,Leica显微镜下观察荧光细胞.

供体细胞准备方法:将传代5~10次的细胞分为2部分,一部分长至80%汇合时采取血清饥饿处理,即把细胞培养液FBS(Gibco)体积分数从20%降至0.5%继续培养3~5 d;另一部分细胞不饥饿,即用FBS(Gibco)体积分数为20%的细胞培养液培养8~10 d.按常规方法消化、离心,最后加1 mL显微操作液重悬细胞沉淀备用.倒置显微镜选择呈绿色的细胞用作供体.

1.2.3 猪卵母细胞的采集和IVM 猪卵巢从当地屠宰场采集,摘取新鲜卵巢立即置于盛有26~37℃生理盐水(含青霉素20万IU/L、链霉素15万IU/L)的保温瓶内,2 h内送回实验室,用适量生理盐水(26~37℃)冲洗3~5遍,盛于500 mL烧杯中,放在水浴锅(37℃)里.用镊子夹取卵巢,再用生理盐水润湿灭菌纱布包裹,采用10 mL注射器(16号针头)抽吸直径为3~8 mm的卵泡,吸取的卵泡液汇集到置于37℃水浴保温的尖底灭菌试管中,静置15~

20 min ,弃上清液,取试管底部卵泡液于表面皿中,实体显微镜下观察,捡取卵丘卵母细胞复合体(COCs),转移到 DPBS 液滴中,冲洗 3~5 遍,用 CO₂ 培养箱内平衡 2 h 以上的 mTCM199 培养基再洗 3 遍,然后放在 39 ℃,相对湿度为 100%,体积分数为 5% CO₂ 培养箱中培养. 在体外培养的 0~22 h 添加 10 IU/mL PMSG 和 hCG, 22~44 h 不加激素. 间隔 24 h 调换约 1/2~2/3 的培养液,并于倒置显微镜下观察卵丘细胞扩散状态.

1.2.4 猪卵泡液(pFF)制备 抽取卵巢上直径 4~8 mm 的卵泡,将抽取液放入离心管中离心(1 600 r/min)20 min ,取上清液于超净工作台内,以 0.22 μm 滤膜过滤后分装于 0.5 mL 离心管中,−20 ℃ 条件冷冻保存备用.

1.2.5 卵母细胞成熟观察及鉴定 COCs 培养 44 h,在 4×10 倍实体显微镜下观察,将卵丘扩散良好,胞质发育均匀的 COCs 转移到质量分数为 0.1% 透明质酸酶溶液中,用移液器轻轻吹打脱去颗粒细胞,以第一极体排出作为卵母细胞成熟的主要标准.

1.2.6 注核 透明带下注射法. 将一个供体细胞沿去核切口注入卵周隙,供体细胞的细胞膜与去核卵母细胞的质膜紧密接触;细胞质内注射法,将供体细胞直接注入到去核卵母细胞的胞质内. 注射完成后检测卵母细胞质膜完整性,弃去裂解卵,对完整的存活卵进行激活操作.

1.2.7 重构胚胎的融合激活 将恢复好的重构卵分批转移到融合液中平衡 3 min,洗涤 3~5 遍后,每批 5 个放入已经铺满融合液、电极宽度为 1 mm 的融合槽(BTX ECM2001 电融合仪配套电激活槽)中,用自制口吸管使供体细胞-受体卵细胞膜接触面与电极平行,再用 ECM2001 融合仪施加 60 μs、1.2 kV/cm,2 次直流电脉冲诱导融合并同时激活,之后将经过电击的重构卵用 NCSU-23 + 4 mg/mL BSA 洗涤 5 遍,立即转入矿物油覆盖的胚胎培养液中,在 39 ℃、体积分数为 5% CO₂ 及相对湿度为 100% 条件下培养 0.5~1 h 后判定融合.

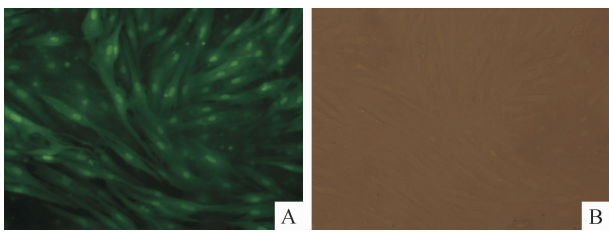
1.3 数据分析

试验结果用卡方(χ^2)检验,进行差异显著性分析.

2 结果与分析

2.1 表达绿色荧光蛋白细胞的筛选

利用脂质体介导的方法将质粒 pEGFP-C1 (Clontech) 转染到猪胎儿成纤维细胞,经 Lipofectamine™ 2000 筛选后的细胞在倒置荧光显微镜下观察,标记已表达绿色荧光蛋白的细胞克隆,于体视镜下将标记的细胞挑出,经传代、培养,即为下一步体细胞克隆的核供体细胞(图 1).



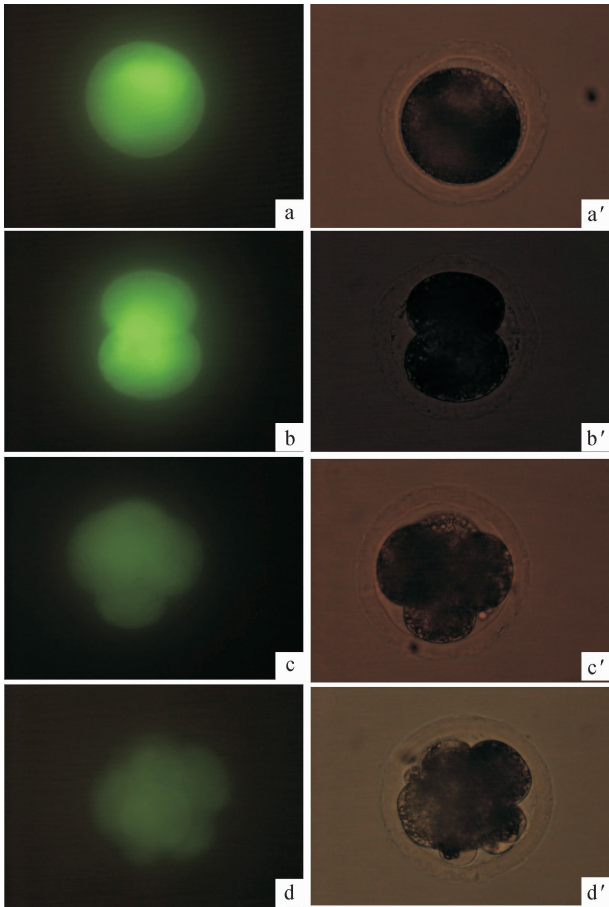
A: 荧光显微镜下阳性细胞;B: 普通光学显微镜下细胞.

图 1 G418 筛选 14 d 后的 GFP 转基因猪胎儿成纤维细胞 (20 ×)

Fig. 1 Transgenic pig fetal fibroblasts cells of transfected by GFP after 14 d

2.2 转基因体细胞核移植胚胎的体外发育及绿色荧光蛋白表达检测

融合的重构胚培养于 NCSU-23 培养液中,于 39 ℃、体积分数为 5% CO₂、相对湿度为 100% 的培养箱中培养 48 h,荧光镜下观察细胞发育的卵裂数情况(含 2 个及 2 个以上卵裂球的胚胎). 胚胎构建当天为第 0 天,培养 48 h 荧光镜下统计卵裂胚胎数(含 2 个及 2 个以上卵裂球的胚胎)情况(图 2).



a~d: 示荧光显微镜下 1 细胞、2 细胞、4 细胞、8 细胞中 GFP 的表达; a'~d': 示普通光子显微镜下的对应照片.

图 2 GFP 转基因体细胞核移植胚胎体外发育及绿色荧光蛋白表达结果 (20 ×)

Fig. 2 GFP expression of transgenic pig somatic cell nuclear transfer embryo

2.3 供核细胞的不同处理方法对核移植胚胎分裂的影响

以胎儿成纤维细胞作供体细胞,分血清饥饿(用体积分数 0.5% 的 FBS 培养 3 ~ 5 d)与不饥饿培养 10 d 处理组,采用卵周间隙注核,重构胚用 NCSU-23 为培养液四孔板法培养,2 组重构胚分裂率差异不显著 ($P>0.05$). 详见表 1.

2.4 注核方法对核移植胚胎的影响

采用胞质内和卵周间隙对 42 ~ 44 h 卵母细胞进行注核操作,结果显示,胞质内注射重构胚的卵裂率

(81.11%)与卵周间注核的卵裂率(76.80%),差异不显著 ($P>0.05$). 详见表 2.

2.5 不同时间融合/激活对核移植重构胚分裂的影响

以胎儿成纤维细胞采用卵周间隙注射法构建重构胚,然后重构胚在不同时间进行融合/激活操作(分别在 0 ~ 1、2 ~ 4 和 6 ~ 8 h 进行),再用四孔板法培养,培养液为 NCSU-23. 前 2 组重构胚卵裂率显著高于第 3 组 ($P<0.05$),但前 2 组之间无显著差异 ($P>0.05$). 详见表 3.

表 1 供核细胞不同处理方法对核移植胚胎分裂的影响¹⁾

Tab.1 Effects of different treatments of donor cumulus cell on the cleavage rates of reconstructed embryo

处理	重构胚数	分裂胚胎数(卵裂率/%)		
		2~4 细胞	6~8 细胞	合计
血清饥饿	68	49(72.06a)	7(10.29a)	56(82.35a)
非饥饿	86	57(66.28a)	11(12.79a)	68(79.07a)

1) 表中同列数据后凡是有一个相同小写字母者,表示差异不显著($P>0.05$, χ^2 检验);括号中的数据为胚胎卵裂率.

表 2 不同注射方式对克隆胚胎的体外早期发育影响¹⁾

Tab.2 Effects of field injection method on *in vitro* developmental competence of pig reconstructed embryos

注射方式	重构胚数	分裂胚胎数(卵裂率/%)		
		2~4 细胞	6~8 细胞	合计
胞质内注射	90	65(72.22b)	8(8.89b)	73(81.11b)
卵周间隙注射	125	80(64.00b)	16(12.80b)	96(76.80b)

1) 表中同列数据后凡是有一个相同小写字母者,表示差异不显著($P>0.05$, χ^2 检验).

表 3 不同时间融合/激活对核移植重构胚分裂的影响¹⁾

Tab.3 Effects of different fusion/activation schedules on *in vitro* developmental competence of pig reconstructed embryos

$t_{融合/激活}/h$	重构胚数	分裂胚胎数(卵裂率/%)		
		2~4 细胞	6~8 细胞	合计
0~1	82	52(63.41a)	10(12.20a)	62(75.61a)
2~4	65	43(66.15a)	11(16.92a)	54(83.07a)
6~8	60	28(46.67b)	8(13.33a)	36(60.00b)

1) 表中同列数据后凡是有一个相同小写字母者,表示差异不显著($P>0.05$, χ^2 检验).

3 讨论

绿色荧光蛋白是进行转基因研究的重要标记基因. 制作转基因动物的前期工作中,可以将目的基因构件与 GFP 基因串联起来一并整合,由于 GFP 基因的表达产物在胚胎发育的早期即可检测到,可以只选择那些表达了 GFP 的胚胎进行移植,这样即可以减少移植胚胎的盲目性. 试验采用了简便易行的脂质体转染法,脂质体是介导 DNA 进入细胞的重要试剂,由于其应用简单,效果稳定,现在已经成为非病毒载体转染细胞的主要转染手段. 本试验通过 G418

对猪胎儿成纤维细胞转染后的筛选,形成表达绿色荧光的细胞克隆,经过挑选培养后用于核移植. 理论上,以阳性体细胞为核供体经过核移植获得的胚胎,应该都是阳性胚胎. 但是本试验发现并不是所有的胚胎都是阳性,这与文献中的结果相符^[14-15]. 原因可能是显微操作注核过程中并未打开荧光激发系统,直接挑取 GFP 阳性细胞用于核移植;也可能由外源基因整合得不稳定造成,因此不可避免会导致非转基因细胞核移植胚胎的存在.

对供体细胞的选择和处理在整个核移植体系中非常重要,本试验比较了供核细胞的不同处理方法

对核移植胚胎分裂的影响. 结果显示以胎儿成纤维细胞作供体细胞, 血清饥饿与非饥饿培养, 核移植重构胚的卵裂率差异不显著. 该结果与 Wilmut 等^[1]的相同. Edward 等^[16]认为, 克隆胚胎和胎儿损失与供体细胞血清饥饿有关, 胎儿后期流产可能由于 DNA 被破坏或 DNA 不当修复. 因此, 造成血清饥饿得到的克隆胎儿有某些先天的生理缺陷. 不采用血清饥饿, 重构胚的卵裂率并没有降低, 这有可能避免克隆胚胎或移植胎儿早期流产. Kuhholzer 等^[17]研究也表明血清饥饿不能提高卵裂率和囊胚率. 从目前研究状况可以看出, G0 期或 G2/M 期的供核细胞都能有效地在胞质受体中进行正常核编程. 然而, Fioretti 等^[18]认为没有一种伴随核移植动物出生的细胞周期专一性标记证明核移植的后代来源于某一特定时期. 因此, 对供体细胞的周期、供核与受体卵母细胞的发育同步及其最适周期的认识等问题, 还需要做更深入的研究和探讨.

胞质内注射一般用压电-陶瓷系统 (Piezo-actuation) 微注射系统, 直接把供体核注入胞质内^[19]. 笔者最初也使用 Piezo 系统, 但通过多次重复试验, 发现 Piezo 系统和斜口针注射的效率没有显著差异, 而 Piezo 系统操作过程中需要在针尖装汞和洗针比较麻烦. 因此, 本研究采用自制的斜口针, 把整个供核细胞注入胞质内, 不需要融合而且效果很好, 其卵裂率达 81.11%. 这可能是由于胞质内注射的重构胚供体细胞与受体卵母细胞质膜接触更好, 易于融合激活, 有利于细胞重编程所致. 也有研究认为, 移入的供核细胞的细胞膜会逐渐在胞质受体中消失^[20], 移入的胞质成分对重组胚的进一步发育很重要, 确保了 DNA 能完全进入去核的卵母细胞, 避免为获得供体核过程中对供体核结构的损坏. 因此, 这样能更有效地支持重组胚的发育. 虽然透明带下注射的效果不如胞质内注射好, 但两者总体效率没有显著差异, 而胞质注入法可将导入外源遗传物质的过程由两步简化成一步, 缩短核移植操作时间, 提高克隆效率, 为控制克隆胚胎的活化时间以及调整其细胞周期提供了可能.

最早的融合方法使用仙台病毒^[21]或 PEG^[22-23]介导融合, 效果很不稳定而且毒性大, 而 Willadsen 等^[24]利用胚胎细胞克隆羊试验中采用的直流电介导融合的方法, 简便而且高效, 目前已被广泛使用. 本研究发现将卵周间隙注射法构建重构胚在不同时间段进行融合/激活操作, 结果表明在 6~8 h 融合/激活卵裂率显著低于 0~1 h 和 2~4 h 组, 虽然这 2 组

重构胚卵裂率无显著差异, 但核移植胚胎后在 2~4 h 内融合/激活的效果更好些. 这可能是体外显微操作过程中, 对卵母细胞造成一定损伤, 而重构胚后放置 2~4 h, 使受到损伤的卵得到恢复, 有利于重构胚的重编程, 提高卵裂率. 但延长激活时间是否能提高核移植效率, 避免克隆胚胎或移植胎儿早期流产, 还需进一步研究.

参考文献:

- [1] WILMUT I, SCHNIEKE A E, McWHIR J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells [J]. *Nature*, 1997, 385(6619): 810-813.
- [2] WAKAYAMA T, PERRY A C, ZUCCOTTI M, et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei [J]. *Nature*, 1998, 394(6691): 369-374.
- [3] CIBELLI J B, STICE S L, GOLUEKE P J, et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts [J]. *Science*, 1998, 280(5367): 1256-1258.
- [4] POLEJAEVA I A, CHEN S H, VAUGHT T D, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells [J]. *Nature*, 2002, 407(6800): 86-90.
- [5] HYUN S, LEE G, KIM D, et al. Production of nuclear transfer derived piglets using porcine fetal fibroblasts transfected with the enhanced green fluorescent protein [J]. *Biol Reprod*, 2003, 69(3): 1060-1068.
- [6] RAMSOONDAR J J, MACHÁ TY Z, COSTA C, et al. Production of $\alpha 1, 3$ -galactosyltransferase-knockout cloned pigs expressing human $\alpha 1, 2$ -fucosyltransferase [J]. *Biol Reprod*, 2003, 69(2): 437-445.
- [7] 成勇, 王玉阁, 罗金平, 等. 由成年转基因山羊体细胞而来的克隆山羊 [J]. *生物工程学报*, 2002, 18(1): 79-83.
- [8] 龚国春, 戴蕴平, 樊宝良, 等. 利用体细胞核移植技术生产转基因牛 [J]. *科学通报*, 2003, 48(24): 2528-2533.
- [9] 冯秀亮, 雷安民, 杨春荣, 等. 异种动物细胞核移植研究现状及相关问题的探讨 [J]. *西北农林科技大学学报*, 2003, 31(4): 78-82.
- [10] 潘登科. 分子育种成果之我国首例体细胞克隆猪 [J]. *动物科学与动物医学*, 2005(9), 22: 26.
- [11] IM G S, LAI Liangxue, LIU Zhonghua, et al. *In vitro* development of preimplantation porcine nuclear transfer embryos cultured in different media and gas atmospheres [J]. *Theriogenology*, 2004, 61(6): 1125-1135.
- [12] REED M L, HIERA M JPETTERS R M. *In vitro* culture of pig embryos [J]. *Theriogenology*, 1992, 37(1): 95-109.

[3] JOTEREAU F, HEUZE F, SALOMON-VIE V, et al. Cell kinetics in the fetal mouse thymus: Precursor cell input, proliferation, and emigration[J]. J Immunol, 1987,138 (4):1026-1030.

[4] SCOLLAY R, SMITH J, STAUFFER V. Dynamics of early T cells: Prothymocyte migration and proliferation in the adult mouse thymus[J]. Immunol Rev, 1986,91:129-157.

[5] VAN EWIJK W. T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments[J]. Annu Rev Immunol, 1991, 9:591-615.

[6] 王云. 鸡胸腺发育形态学研究[D]. 武汉:华中农业大学,2010.

[7] 冯仁田, 潘宏志, 何维, 等. Balb/C 小鼠免疫系统结构与功能的增龄性变化[J]. 中华老年医学杂志, 2000, 12(2): 223-225.

[8] OLSON I A, POSTE M E. The vascular supply of the thymus in the guinea-pig and pig[J]. Immunology, 1973,24 (2):253-257.

[9] CLARK S L, Jr. The thymus in mice of strain 129/J, studied with the electron microscope[J]. Am J Anat, 1963,112(1):1-33.

[10] HENRY M, CHARLEMAGNE J. Development of amphibian thymus: I: Morphological differentiation, multiplication, migration and lysis of thymocytes in the urodele *Pleurodeles waltlii* [J]. J Embryol Exp Morphol, 1980,57: 219-232.

[11] SALVADOR A C, PEREIRA A S, DE SÁ C M, et al. Blood vessel architecture in lymph nodes of the dog viewed by scanning electron microscopy[J]. J Submicrosc Cytol Pathol, 1992,24(1):97-102.

[12] IRINO S, TAKASUGI N, MURAKAMI T. Vascular architecture of thymus and lymph nodes, blood vessels, trans-mural passage of lymphocytes, and cell-interactions[J]. Scan Electron Microsc, 1981(Pt 3):89-98.

[13] KATO S, SCHOEFL G I. Microvasculature of normal and involuted mouse thymus: Light- and electron-microscopic study[J]. Acta Anat, 1989,135(1):1-11.

【责任编辑 柴 焰】

(上接第 398 页)

[13] 龚国春, 戴蕴平, 樊宝良, 等. 以不同类型的转基因细胞为核供体生产牛的转基因克隆胚胎[J]. 中国科学, 2003, 33(6): 532-538.

[14] LAI Liangxue, PARK K W, CHEONG H T, et al. Transgenic pig expressing the enhanced green fluorescent protein produced by nuclear transfer using colchicine-treated fibroblasts as donor cells[J]. Mol Reprod Dev,2002,62(3): 300-306.

[15] LEE G S, KIM H S, HYUN S H, et al. Production of transgenic cloned piglets from genetically transformed fetal fibroblasts selected by green fluorescent protein[J]. Theriogenology, 2005,63(4):973-991.

[16] EDWARD L J, DORADO C M, WILSON T J, et al. Development of cloned embryos reconstituted with serum fed or starved adult granulose cells[J]. Theriogenology,2001, 55:265.

[17] KUH HOLZER B, HAWLEY R J, LAI L X, et al. Clonal lines of transgenic fibroblast cells derived from the same fetus result in different development when used for nuclear transfer in pigs[J]. Biol Reprod, 2001, 64(6):1695-1698.

[18] FIORETTI A M, LANZA R. Preliminary palaeomagnetic results from the devono-carboniferous admiralty intrusives [J]. Terra Antarctica, 2000, 7(5):657-664.

[19] ONISHI A, IWAMOTO M, AKITA T, et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei[J]. Science, 2000, 289(5482):1188-1190.

[20] LEE G S, HYUN S H, KIM H S, et al. Improvement of a porcine somatic cell nuclear transfer techniques by optimizing donor cell and recipient oocyte preparations [J]. Theriogenology, 2003, 59(9):1949-1957.

[21] LIN T P, FLORENCE J. Cell fusion induced by a virus within the zona pellucida of mous eggs[J]. Nature, 1973, 242(5392):47-49.

[22] CZOŁOWSKA R, MODLINSKI J A, TARKOWSKI A K. Behaviour of thymocyte nuclei in non-activated and activated mouse oocytes[J]. Cell Sci, 1984, 69:19-34.

[23] SIMS M, FIRST N L. Production of calves by transfer of nuclei from cultured inner cell mass cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(13):6143-6147.

[24] WILLADSEN S M. Nuclear transplantation in sheep embryos [J]. Nature, 1986, 320(6057):63-65.

【责任编辑 柴 焰】