

文章编号: 1004-0374(2009)05-0652-06

克隆猪技术及其在转基因猪研究中的应用

樊娜娜, 杨东山, 赖良学*

(中国科学院广州生物医药与健康研究院 中国科学院再生生物学重点实验室, 广州 510663)

摘要: 哺乳动物核移植技术是一种可以获得基因组遗传信息完全相同的后代的生物技术。猪体细胞核移植技术包括以下几个环节: 卵母细胞的体外成熟、供体细胞的分离和处理、体细胞的核转移、重构胚胎的人工激活、胚胎体外培养和胚胎移植。由于该技术在最近几年的迅速发展, 很多实验室已通过该技术成功获得了克隆猪后代。核移植克隆猪技术的出现为生产转基因猪提供了一种有效的方法, 并且是目前生产基因打靶猪的惟一方法。至今利用克隆猪技术已经成功获得了一系列的转基因猪和基因敲除猪。以核移植技术产生基因修饰猪目前正处于从基础研究走向应用的过渡阶段。尽管猪体细胞核移植克隆的效率(出生克隆猪数占所用卵数的比例)还不高, 但是由于通过该技术能够对猪基因组进行特定的修饰, 确保生产的克隆动物100%为转基因动物, 从而大大提高了转基因猪的制作效率, 可以预料猪核移植技术将会对医药业和农业产生重大的影响。

关键词: 猪; 核移植; 转基因; 基因打靶

中图分类号: Q813 **文献标识码:** A

The applications of nuclear transfer technology in production of transgenic pigs

FAN Na-na, YANG Dong-shan, LAI Liang-xue*

(Guangzhou Institute of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510663, China)

Abstract: Nuclear transfer (NT) is a procedure by which genetically identical offspring can be generated. The technology of pig somatic NT, including *in vitro* maturation of oocytes, isolation and treatment of donor cells, artificial activation of reconstructed oocytes, embryo culture and embryo transfer, has been intensively studied in recent years. The progress has resulted in birth of cloned pigs in many labs. Pig cloning provides an efficient method for producing transgenic pigs, further more, it is the only approach which has been used to produce gene-targeted pigs so far. The production of pigs with genetic modification by NT is now in the transition from investigation to practical use. Although the efficiency of somatic cell NT in pig, when measured as development to term as a proportion of oocytes used, is low, the ability of making specific modifications to the swine genome and every cloned offspring containing foreign genes can promote the efficiency to make transgenic pigs largely, which will make a technology having a large impact not only on medicine but also on agriculture.

Key words: pig; nuclear transfer; transgene; gene targeting

长期以来原核显微注射技术一直被认为是生产转基因动物最可靠的方法, 特别是在小鼠中, 这一技术得到了广泛的应用。但是, 由于显微注射技术基因整合的时机和位点是随机的, 基因整合效率低, 需要获得大量的动物个体后再进行基因整合和表达的筛选。这样的低效率和高成本制约了它在转

基因大动物中的应用, 更为重要的是利用原核显微注射技术不能够对动物的内源基因进行定点的修饰, 大动物的基因打靶成为长期以来难以实现的梦

收稿日期: 2009-09-14

*通讯作者 E-mail: lai_liangxue@gibh.ac.cn

想。

1994年,以培养的细胞为供体的核移植技术首先在牛上取得成功^[1],这为通过核移植技术获得基因修饰猪提供了可能性。McCreath等^[2]以基因打靶成纤维细胞作为供体细胞核移植后成功获得了首例基因打靶克隆羊,为大动物的基因打靶技术开了先河。猪的体细胞核移植技术曾经落后于小鼠、牛和羊,然而,自从2000年首例体细胞克隆猪诞生以来^[3],猪体细胞核移植技术得到了迅猛的发展,取得了很大的进步。在不到十年的时间里,通过核移植技术获得转基因猪已经成为目前制作转基因猪的主流技术,并在全世界多个实验室中广泛应用^[4-6],并且利用该技术已经成功获得了几种定点基因修饰(基因打靶)克隆猪^[7-10]。转基因克隆猪技术现在正处于由基础研究走向实际应用的过渡阶段。本文简要介绍克隆猪技术的研究历史、主要技术环节及其在转基因猪研究中的应用前景。

1 克隆猪技术研究历史

1989年,Prather等^[11]首次报道以猪四细胞期胚胎卵裂球作为供体核,以体内来源的MII期猪卵母细胞为受体胞质进行核移植实验,共移植88枚核移植胚胎到代孕母体进行后续发育,最后成功获得一头克隆猪。类似以胚胎细胞为核供体进行克隆猪的研究直到十多年以后才有第二例报道^[12]。1997年,Wilmot等^[13]报道采用相似的核移植技术,将已分化的体细胞与去核的成熟卵母细胞融合,最终获得了世界首例体细胞克隆动物——绵羊“多莉”。然而,采用同样的方法进行体细胞克隆猪的研究却遇到了困难。有研究者推测由于猪的胚胎基因组激活的时间早于牛羊等动物,可能对于猪的体细胞核移植来说,进行一步核移植激活不足以支持后续的胚胎发育。2000年,Polejaeva等^[3]报道首先将颗粒细胞来源的供体细胞与去核卵母细胞融合,18 h后,将供体核从第一个重构胚移入到另一个去核受精卵胞质中,进行两步核移植,最终获得5头健康的体细胞克隆猪。这使得克隆猪研究者认为猪克隆程序比其他物种更为复杂困难。然而,几乎在同一时间,Onishi等^[14]报道,利用piezo通过显微注射直接将猪胎儿成纤维细胞注射入去核卵母细胞的方法得到克隆猪。Onishi等克隆猪成功的重要性在于证明了两步核移植法对于体细胞核移植克隆猪并非必要的。

最早成功的这两例克隆猪研究都是采用体内成

熟卵而不是体外成熟卵作为核移植受体。以体细胞核移植技术获得克隆猪需要大量的成熟卵,而体内成熟卵代价昂贵,因此许多人开始尝试从屠宰场取回的卵巢中收集未成熟卵,然后进行体外成熟培养获得体外成熟卵母细胞用于核移植。2000年,Betthausen等^[15]系统地优化了猪体细胞核移植的各个步骤,包括卵母细胞的来源和体外成熟培养、供体细胞的培养、核移植后卵的激活、胚胎的体外培养和胚胎移植代孕,建立了一套稳定的猪体细胞核移植程序,为通过核移植技术生产基因修饰猪的技术路线奠定了基础。

2001年,Park等^[4]报道以转有绿色荧光蛋白基因的猪成纤维细胞为供体细胞进行体细胞核移植获得转基因猪,第一次打通了通过体细胞核移植技术生产转基因猪的技术路线。2002年,Lai等^[7]采用这一技术路线,利用同源重组技术敲除小型猪成纤维细胞 α -1,3半乳糖苷转移酶(GGTA1)基因,获得基因打靶细胞;然后,将打靶细胞通过核移植技术移入体外成熟的去核卵母细胞,得到4头GGTA1基因敲除克隆猪,第一次实现了猪的基因定点修饰。同时,去除猪 α -1,3-半乳糖抗原决定簇有望解决异种器官移植过程中产生的超急性排斥反应和延期性排斥反应,因此该实验具有重要的实际应用价值,极大地促进了异种器官移植的研究。此后,通过体细胞核移植技术制作基因修饰动物的技术路线逐渐被越来越多的实验室所掌握,成为目前制作基因修饰猪的主要技术手段。将核移植技术与各种体细胞基因转染技术相结合,获得了多种基因修饰猪。

2 克隆猪技术主要技术环节及其影响因素

目前,哺乳动物体细胞核移植技术的效率还很低(出生数/所用卵数约为1%—2%)。以克隆技术获得特定基因型动物的能力受很多因素影响,包括物种、受体卵来源、供体细胞类型、供体细胞核移植前的处理、卵的人工激活方法、胚胎培养、重构胚胎移入核中体细胞印记的去除、体细胞核的不完全重编程、核移植的方法等。此外,猪的体细胞核移植技术还存在一些特殊的困难,例如猪的胚胎移植,至少需要4个以上质量好的胚胎才能引发和维持稳定的妊娠。提高克隆动物出生率必须提高核移植技术各个环节的效率。以下就影响克隆猪效率的因素进行分别讨论。

2.1 克隆猪供体细胞类型的选择

关于供体细胞类型的选择在小鼠和牛的核移植中有较多的报道。在

小鼠中, 2001年, Wakayama等^[16]检测了来自不同遗传背景、不同性别的至少8种胎儿细胞和成体细胞。只有成纤维细胞、未定向的胎儿性腺细胞和卵丘细胞作为供体细胞才能够得到克隆小鼠, 并且这三种细胞具有相似的克隆效率。Kato等^[17]检测了来自不同遗传背景、不同性别的胎牛、新生牛和成体牛的至少15种类型的体细胞, 所有类型的细胞得到的重构胚胎都能在体外正常发育到囊胚, 但只有卵丘细胞、输卵管细胞、皮肤细胞和肝细胞能够产生克隆牛。迄今, 在各种物种中已有包括乳腺上皮细胞、卵丘细胞、成纤维细胞、睾丸支持细胞、淋巴细胞、NK细胞、嗅觉细胞、神经干细胞、胚胎干细胞和成肌细胞等十多种不同类型的细胞被证明具备完全的克隆能力。在猪中, 成纤维细胞和卵丘细胞已被证明具备克隆能力, 此外, 从成体猪皮下脂肪组织分离的脂肪前体细胞也被证明是可以克隆的^[18]。在猪的体细胞核移植中, 特别是转基因猪制作中, 皮肤成纤维细胞是最为常用的核移植供体, 因为它易于获得, 在体外能够进行相对较长时间的传代培养, 因而有利于对其进行基因转染和筛选。

2.2 供体细胞的处理 利用核移植技术以培养的细胞生产克隆动物已在许多物种中取得成功。对这些细胞进行分析表明, 以不同的细胞群体为供体获得的重构胚胎发育能力不同, 并且以现有技术方法还无法判定哪些细胞群体更适合用作核移植供体细胞。影响细胞作为核移植供体细胞的因素包括代谢引起的氧化损伤、基因组不稳定性及染色体病变。这些因素可能受细胞的分离和培养方法以及传代次数的影响。即使是同一个胎儿分离得到的不同的亚克隆细胞在相同的培养条件及传代次数的条件下, 核移植后得到的重构胚胎仍具有不同的体外发育潜能^[19]。另一个影响核移植克隆效率的因素是供体细胞所处的细胞周期, 不过细胞周期对克隆效率的影响仍然存在争议。Wilmut等^[13]认为核移植供体细胞必须处于G₀期(静止期), 而Cibelli等^[20]在克隆牛的研究中以处于细胞周期中的细胞, 包括细胞周期的各个阶段的细胞作为核移植供体细胞均获得成功。以G₂/M期的细胞为供体也已经得到克隆小鼠^[21]、克隆猪^[6]和克隆羊^[22], 因此G₂/M期细胞可能是核移植供体的另一种选择。

2.3 可进行基因修饰的供体细胞 利用核移植技术生产基因修饰猪的供体细胞需满足以下两个条件: (1) 该细胞能够用作生产克隆猪; (2) 具备一定的增殖能

力以筛选得到正确的基因修饰细胞。研究起步阶段因胎儿成纤维细胞具有广泛的增殖能力, 多选择它来进行基因修饰。但是所有的体细胞都存在衰老的问题, 在没有完成转基因或基因打靶阳性细胞筛选之前就已经衰老。这个问题的解决可通过分离获得易转染和筛选的细胞, 这些细胞需具有高增殖潜能并且能够长时间维持正常的染色体组型, 比如小鼠ES和EG细胞系。原始生殖细胞来源的细胞系已经从猪胎儿中分离获得, 经转染的细胞系注射入猪囊胚后得到嵌合体^[23, 24], 但并不能够生殖系嵌合。猪ES细胞的分离至今未获成功, 但是, 近年来诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS细胞)技术的出现为基因修饰供体细胞提供了新的选择。已有几个实验室同时报道获得了猪的iPS细胞, 然而还没有iPS嵌合体的报道。而且, 目前无论是以小鼠还是猪的iPS细胞进行核移植的实验都没有获得后代, 限制了这一技术的应用。因此, 未来基因修饰动物研究的发展方向是建立具有发育潜能和能在体外无限增殖的细胞系。

2.4 核移植重构胚胎 用于核移植的卵母细胞首先要去核。常用于辅助去核的化合物是bisbenzimidazole, bisbenzimidazole处理后的卵母细胞染色体是可见的。然而此化合物处理猪卵后对后续的胚胎发育具有毒副作用。因为凝集染色体通常位于第一极体下面胞质中, 所以体外成熟的第二次减数分裂中期卵母细胞可以不染染色质, 通过吸走第一极体及附近胞质的方法去核, 这种去核方法叫做盲吸去核法。采用这种方法去核率可达85%—90%^[25]。将供体核移入去核卵母细胞胞质的方法有两种, 一种是通过显微注射直接将供体细胞注射入去核卵母细胞; 另一种是先将供体细胞注射入卵周隙, 再用电刺激使供体细胞与卵融合。通过直接显微注射法, 细胞质膜和多数胞质成分没有被转入卵中, 而融合法, 供体细胞所有成分(细胞核、细胞质、质膜)都合并入去核卵母细胞。

供体核移入去核卵母细胞后, 重构胚胎需要被激活后才能进行后续发育。卵母细胞可通过多种物理和化学方法人工诱导激活。Miyoshi等^[26]发现融合之后3h再进行激活能够提高囊胚发育率。刚开始研究阶段核移植重构胚胎囊胚发育率只有3%。G₀期成纤维细胞移入去核卵母细胞后经电激活, 只有7%的重构胚胎能够形成囊胚。Betthausen等^[15]报道以6-dimethylaminourine和离子载体激活NT胚胎

囊胚发育率为4%—8%。Kühholzer等^[19]报道电激活的核移植重构胚胎囊胚发育率达20%。有研究表明,联合使用thimerosal/DTT处理能够有效地激活猪卵母细胞,并且有42.0%的NT重构胚胎在体外培养条件下能发育到紧密化桑葚胚和囊胚期^[27]。近年来,研究者以去乙酰化酶抑制剂TSA、Scriptaid来处理重构胚胎,使猪克隆胚胎体外发育囊胚率提高一倍左右^[28,29]。

2.5 胚胎移植 在妊娠第12天左右,代孕猪需要4个或更多的胚胎信号才能够维持妊娠^[30]。为了减少体外培养条件对核移植胚胎的副作用,需要尽可能早的将胚胎移植入代孕母猪。通常核移植胚胎质量较差,因此一头代孕猪需要移植大量的胚胎。

如果核移植胚胎数量不足,可以采用以下两种策略补救:一是采用辅助胚胎共移植,来诱导和维持妊娠。辅助胚胎可以是孤雌胚胎,孤雌胚胎具有着床的能力但在怀孕30 d时由于基因组印记而退化^[6,31],另一种辅助胚胎是正常的受精胚胎^[7]。另一种策略是通过在第12 d使用雌二醇——一种母体识别怀孕的正常信号,来维持妊娠^[6,11]。但是现在还很难确定哪种策略更加有利,以及这些策略对后续发育是否有阻碍作用。

3 克隆猪技术在基因修饰上的应用

对猪进行基因修饰具有广泛的农业和医学应用。在农业领域,对基因组进行修饰可以(1)改变猪肉成分,使其成为更加健康的产品;(2)提高猪肉生产效率;(3)提高猪抗疾病能力;(4)降低第一个月胚胎发生死亡胎率;(5)创造出环境友好型猪。在医学领域,创造特异基因修饰猪为在动物中生产生物学或营养学用途产品和建立人类遗传性疾病动物模型用于科学研究和药物研发提供可能。体细胞核移植将通过以下三种方式在基因修饰方面发挥重要作用。

3.1 提高转基因猪的生产效率 通过原核注射将外源基因转入受精卵生产转基因动物的方法操作简单,已应用于许多家畜物种。但其转基因效率低,并不是所有注射的卵都能发育成转基因猪,并且并不是所有转基因猪都能按照既定的模式表达目的基因。与原核注射相比,体细胞核移植则可以更加高效的生产转基因动物。外源基因转入体外培养的细胞系后筛选出阳性细胞进行扩增培养。通过在目的基因后插入一个报告基因,可以检测目的基因在单个细胞水平的表达。选择外源基因表达水平高的细

胞作为核移植的供体细胞,以确保得到的克隆猪能够高水平地表达目的基因。2001年, Park等^[4]用复制缺陷逆转录病毒将绿色荧光蛋白(eGFP)增强型基因转入成纤维细胞,以这种细胞为供体细胞核移植后得到表达绿色荧光蛋白的转基因猪。2006年, Lai等^[32]又利用体细胞核移植技术获得能够高表达omega-3脂肪酸的FAT-1转基因猪。

3.2 提高转基因猪的繁殖效率 采用体细胞克隆技术,以转基因猪的皮肤成纤维细胞为供体进行核移植来生产更多的转基因克隆猪,与通过育种的方式相比大大缩短了获得大量转基因猪所需要的时间。Park等从eGFP转基因猪^[33]耳部分离得到的成纤维细胞作为供体细胞进行核移植,得到5头克隆猪,获得的克隆猪各组织eGFP的表达与供体猪相似^[34]。Bondioli等^[35]以H-转移酶转基因猪皮肤成纤维细胞为供体细胞核移植后得到H-转移酶转基因克隆猪。用于核移植前,这些细胞可以在体外培养很长时间,不会发生转变,可冻存和复苏,并且具有单细胞克隆形成能力。

3.3 生产基因打靶猪 基因打靶是一种强有力的基因修饰技术,它的效率取决于打靶同源臂DNA与目的基因DNA发生同源重组并替换的能力。在小鼠中对胚胎干细胞进行定点修饰,得到生殖系嵌合体后,通过育种就可以获得基因定点修饰小鼠。十多年来,研究者一直致力于包括猪在内的大型家畜胚胎干细胞的研究,虽然有成功的报道,但是所得到的胚胎干细胞系都不能够生殖系嵌合,最近几个实验室获得的猪的iPS细胞系也不能得到嵌合体,因此以这条途径获得定点基因修饰猪目前还难以实现。至今,以基因打靶的非全能细胞进行核移植得到克隆猪,是获得基因打靶猪的唯一途径。以核移植获得基因定点修饰克隆猪的第一个成功的例子是猪器官移植灵长类时引起超急性排斥反应(HAR)基因的敲除,利用这一途径获得成功的第一个例子就是前面提到的猪器官移植到灵长类时引起超急性排斥反应的主要基因GGTA1的敲除。

如上所述,猪体细胞核移植已完全可以获得活的克隆猪。建立基因打靶细胞系成为生产基因修饰猪的关键。

一般情况下,成纤维细胞不能在体外无限增殖。家畜成纤维细胞在体外培养条件下一般增殖30代后开始衰老。猪胎儿成纤维细胞体外培养扩增到24—28代时就失去克隆形成能力。与胚胎干细胞

相比,成纤维细胞不能无限增殖,发生同源重组的效率极低,这是其作为打靶细胞存在的主要技术障碍,而这个问题在一定程度上可通过基因捕获技术解决,基因捕获技术可以提高基因打靶效率^[7]。另外一种克服这种障碍的方法是细胞分离后尽可能早的进行转染^[7],如转染 2—6 代细胞。目前,这一问题主要是通过基因捕获技术提高同源重组效率,并尽可能在细胞分离后及早进行基因转染和筛选的策略加以克服的,但其总的效率仍然比较低,特别是在对一些成纤维细胞中不表达的基因进行打靶时难度较大。2008 年,Prather 实验室^[36,37]报道采用腺相关病毒载体对培养的猪胎儿成纤维细胞 *CFTR* 基因进行基因打靶,然后通过核移植技术获得了囊性纤维化病的转基因猪模型,为囊性纤维化病的病理和治疗的研究提供了很好的动物模型,同时,以腺相关病毒载体法提高基因打靶效率,然后通过核移植技术获得基因打靶猪的技术路线大大提高了基因打靶猪的制作成功率。

通过转基因克隆技术获得的基因打靶克隆猪通常是杂合子,可以通过以下两种方式获得纯合子基因打靶猪:一是通过育种;二是以一个位点敲除克隆猪胎儿或成体猪细胞进行第二轮的基因打靶及核移植。通过育种的方式需要同时得到一个位点已敲除的具有繁殖能力的公猪和母猪,这种方法虽然可行但是需要至少 12 个月的时间。而利用第二轮基因敲除和核移植克隆策略可以节省 6 个月的时间,并且得到的克隆猪都是双位点敲除(DKO)。2002 年,Lai 等^[7]应用体细胞核移植技术得到 α -1,3-半乳糖苷转移酶单基因敲除猪。之后通过从单基因敲除猪筛选到的不表达 GGTA1 细胞进行核移植得到 GGTA1 双基因敲除猪。同时,另外一个研究组采用第二轮敲除克隆策略也得到 5 头半乳糖苷转移酶缺陷克隆猪^[38]。

总之,核移植克隆猪技术目前已取得了明显的进展,尽管还存在效率低的问题,但由于使用该技术可以对猪基因组进行定点修饰,使得这一技术在农业和医药领域具有广泛的应用前景和发展潜力。随着技术的不断完善和发展,我们相信,未来这一技术必将极大地促进和推动转基因猪在农业和医药领域的应用。

[参 考 文 献]

[1] Sims M, First NL. Production of calves by transfer of nuclei

- from cultured inner cell mass cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 6143-7
- [2] McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KHS, et al. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*, 2000, 405: 1066-9
- [3] Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 2000, 407: 86-90
- [4] Park KW, Cheong HT, Lai LX, et al. Production of nuclear transfer-derived swine that express the enhanced green fluorescent protein. *Anim Biotechnol*, 2001, 12: 173-81
- [5] Lai LX, Tao T, Machaty Z, et al. Feasibility of producing porcine nuclear transfer embryos by using G2/M-stage fetal fibroblasts as donors. *Biol Reprod*, 2001, 65: 1558-64
- [6] Lai LX, Park KW, Cheong HT, et al. Transgenic pig expressing the enhanced green fluorescent protein produced by nuclear transfer using colchicine treated fibroblasts as donor cells. *Mol Reprod Dev*, 2002, 62: 300-6
- [7] Lai LX, Kolber-Simonds D, Park KW, et al. Production of α -1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, 2002, 295: 1089-92
- [8] Dai YF, Vaught TD, Boone J, et al. Targeted disruption of the α 1,3- galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol*, 2002, 20: 251-5
- [9] Ramsoondar JJ, Machaty Z, Costa C, et al. Production of α 1,3-galactosyltransferase-knockout cloned pig expressing human α 1,2-fucosyltransferase. *Biol Reprod*, 2003, 69: 437-45
- [10] Sharma A, Naziruddin B, Cui C, et al. Pig cells that lack the gene for α 1-3galactosyltransferase express low levels of the gal antigen. *Transplantation*, 2003, 75: 430-6
- [11] Prather RS, Sims MM, First NL. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol Reprod*, 1989, 41: 414-8
- [12] Li GP, Tan JH, Sun QY, et al. Cloned piglets born after nuclear transplantation of embryonic blastomeres into porcine oocytes matured *in vitro*. *Cloning*, 2000, 2: 45-52
- [13] Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385: 810-3
- [14] Onishi A, Iwamoto M, Akita T, et al. Pig cloning by micro-injection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 2000, 289: 1188-90
- [15] Betthausen J, Forsberg E, Augenstein M, et al. Production of cloned pigs from *in vitro* systems. *Nat Biotechnol*, 2000, 18: 1055-9
- [16] Wakayama T, Yanagimachi R. Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type. *Mol Reprod Dev*, 2001, 58: 376-83
- [17] Kato Y, Tani T, Tsunoda Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J Rep Fertl*, 2000, 120: 231-7
- [18] Nagashima H, Fujimura T, Takahagi Y, et al. Development of efficient strategies for the production of genetically modified pigs. *Theriogenology*, 2003, 59: 95-106
- [19] Kuhhölzer B, Hawley RJ, Lai L, et al. Clonal lines of transgenic fibroblast cells derived from the same fetus result in different development when used for nuclear transfer in pigs. *Biol*

- Reprod, 2001, 64: 1695-8
- [20] Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 1998, 280: 1256-8
- [21] Cheong HT, Takahashi Y, Kanagawa H. Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. *Biol Reprod*, 1993, 48: 958-63
- [22] Liu L, Dai YF, Moor RM. Nuclear transfer in sheep embryos—the effect of cell-cycle coordination between nucleus and cytoplasm and the use of *in vitro* matured oocytes. *Mol Reprod Dev*, 1997, 47: 255-64
- [23] Piedrahita JA. Generation of transgenic porcine chimeras using primordial germ cell-derived colonies. *Biol Reprod*, 1998, 58: 1321-1329
- [24] Mueller S. Chimeric pigs following blastocyst injection of transgenic porcine primordial germ cells. *Mol Reprod Dev*, 1999, 54: 244-54
- [25] Tao T, Machaty Z, Boquest AC et al. Development of pig embryos reconstructed by microinjection of cultured fetal fibroblast cells into *in vitro* matured oocytes. *Anim Reprod Sci*, 1999, 56: 133-41
- [26] Miyoshi K, Taguchi Y, Sendai Y, et al. Establishment of a porcine cell line from *in vitro*-produced blastocysts and transfer of the cells into enucleated oocytes. *Biol Reprod*, 2000, 62: 1640-6
- [27] Machaty Z, Wang WH, Day BN, et al. Complete activation of porcine oocytes induced by the sulfhydryl reagent, thimerosal. *Biol Reprod*, 1997, 57: 1123-27
- [28] Zhang Y, Li J, Villemoes K, et al. An epigenetic modifier results in improved *in vitro* blastocyst production after somatic cell nuclear transfer. *Cloning Stem Cells*, 2007, 9: 357-63
- [29] Zhao J, Ross JW, Hao Y, et al. Significant improvement in cloning efficiency of an inbred miniature pig by histone deacetylase inhibitor treatment after somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod*, 2009, 81: 525-30
- [30] Polge C, Rowson LE, Chang MC. The effect of reducing the number of embryos during early stages of gestation on the maintenance of pregnancy in the pig. *Reprod Fertil*, 1966, 12: 395-7
- [31] De Sousa PA, Dobrinsky JR, Zhu J, et al. Somatic cell nuclear transfer in the pig: control of pronuclear formation and integration with improved methods for activation and maintenance of pregnancy. *Biol Reprod*, 2002, 66: 642-50
- [32] Lai L, Kang JX, Li R, et al. Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. *Nat Biotechnol*, 2006, 24: 435-6
- [33] Cabot RA, Kuhholzer B, Chan AWS, et al. Transgenic pigs produced using *in vitro* matured oocytes infected with a retroviral vector. *Anim Biotechnol*, 2001, 12: 205-14
- [34] Park KW, Lai LX, Cheong HT, et al. Mosaic gene expression in nuclear transfer derived embryos and the production of cloned transgenic pigs from ear-derived fibroblasts. *Biol Reprod*, 2002, 66: 1001-5
- [35] Bondioli K, Ramsoondar J, Williams B, et al. Cloned pigs generated from cultured skin fibroblasts derived from a H-transferase transgenic boar. *Mol Reprod Dev*, 2001, 60: 189-95
- [36] Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, et al. Production of α 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science*, 2003, 299: 411-4
- [37] Rogers CS, Hao Y, Rokhlina T, et al. Production of CFTR-null and CFTR- Δ F508 heterozygous pigs by adeno-associated virus-mediated gene targeting and somatic cell nuclear transfer. *J Clin Invest*, 2008, 118: 1571-7
- [38] Rogers CS, Stoltz DA, Meyerholz DK, et al. Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science*, 2008, 321: 1837-41