

线粒体损伤对山羊-绵羊异种核移植胚 早期发育的影响

曹俊伟^{1,2}, 马利兵³, 华松¹, 张涌¹

(1 西北农林科技大学 生物工程研究所, 陕西 杨凌 712100; 2 内蒙古农业大学 生命科学院, 内蒙古 呼和浩特 010018;
3 内蒙古科技大学 生物与化学工程学院, 内蒙古 包头 014010)

[摘要] 【目的】研究线粒体损伤对核移植胚早期发育的影响。【方法】用经光敏化染料罗丹明-123 损伤的山羊胎儿成纤维细胞和绵羊卵母细胞, 构建山羊-绵羊异种体细胞核移植胚, 于 38.5℃、相对湿度 100%、体积分数 5% CO₂ 条件下培养, 统计其 2-细胞期、8-细胞期和囊胚期的发育率。【结果】山羊核供体线粒体损伤并不影响囊胚期前核移植胚的发育率($P>0.05$); 绵羊卵母细胞线粒体损伤, 使核移植胚 2-细胞期的发育率下降($P<0.05$), 但不影响 8-细胞期和囊胚期的发育率($P>0.05$); 核供体和卵母细胞线粒体都损伤的核移植胚发育率的变化规律与卵胞质受体线粒体损伤的核移植胚一致。【结论】在异种核移植胚的早期发育中, 核供体线粒体损伤不影响核移植胚的发育, 但卵母细胞受体线粒体损伤明显影响核移植胚的发育率。

[关键词] 线粒体; 异种体细胞核移植; 山羊; 绵羊

[中图分类号] Q813.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)04-0042-05

Effect of mitochondrial dysfunction on the early development of goat-sheep interspecies nuclear transfer embryos

CAO Jun-wei^{1,2}, MA Li-bing³, HUA Song¹, ZHANG Yong¹

(1 Institute of Biological Engineering, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot, Inner Mongolia 010018, China; 3 School of Biological & Chemical Engineering, Inner Mongolia University of Science & Technology, Baotou, Inner Mongolia 014010, China)

Abstract: 【Objective】The effect of mitochondrial dysfunction in nuclear donor and/or ooplasmic recipient on early development of goat-sheep interspecies somatic nuclear transfer embryos was studied. 【Method】Nuclear donor and/or ooplasmic recipient mitochondria damaged by photoirradiating rhodamine-123, were used to reconstruct and culture goat-sheep interspecies somatic nuclear transfer embryos, then percent of 2-cell stage, 8-cell stage and blastocyst stage embryos was calculated separately. 【Result】Damaged goat nuclear donor cells mitochondria does not affect development ability of reconstructed embryos before blastocyst stage($P>0.05$); Damaged sheep ooplasmic recipient mitochondria could result in dedining for reconstructed embryos in 2-cell stage($P<0.05$), but does not affect 2-cell stage to 8-cell and blastocyst stage development($P>0.05$); After both nuclear donor and ooplasmic recipient mitochondria are damaged, the development pattern of reconstructed embryos is the same with as that of only ooplasmic recipient mitochondrial damaged. 【Conclusion】In the early stage of somatic nuclear transfer reconstructed embryo to moru-

* [收稿日期] 2009-12-25

[基金项目] 国家“863”高新技术研究与发展计划项目(2004AA213072)

[作者简介] 曹俊伟(1970—), 男, 内蒙古呼和浩特人, 讲师, 在读博士, 主要从事动物胚胎工程研究。

E-mail: caojunwei1970@163.com

[通信作者] 张涌(1956—), 男, 内蒙古和林格尔人, 教授, 博士生导师, 主要从事发育生物学、胚胎工程、分子生物学及形态学研究。

lae/blastocyst, ooplasmic recipient mitochondrial is dominant over nuclear donor mitochondrial in affecting reconstructed embryos development ability.

Key words: mitochondria; interspecies somatic nuclear transfer; goat; sheep

在哺乳动物的正常受精胚中,精子线粒体上的某种核编码蛋白被蛋白水解肽-泛素所标记,随后在卵母细胞的溶酶体及蛋白酶体中被降解而消失^[1]。这一机制使受精后选择性的降解父本线粒体成为可能,从而使线粒体及线粒体 DNA 呈严格的母性遗传。在核移植重构胚发育过程中,核供体线粒体也可以复制^[2],因此在重构胚及子代可能有 2 种不同来源的线粒体。

成熟卵母细胞中母性遗传的多个不能复制的线粒体,在子代线粒体中占一定的比例^[3-4]。由于缺少模板或修复机制失活,卵母细胞突变的 mtDNA 可传给子代并引起胚胎发育停止^[5]。小鼠卵母细胞线粒体异常可严重影响卵母细胞成熟,导致早期胚胎发育停止^[6-8]。对人类而言,随着卵母细胞的发育,可能使线粒体活性下降,导致胚胎发育能力及受孕率降低^[9]。基于供体细胞类型、核移植方法及其核供体与胞质受体融合方式的不同,注入胞质受体的核供体线粒体命运也不同^[10]。目前,关于线粒体在同质和异质体细胞核移植胚发育中分布的研究较多^[11-20],而关于核供体与卵胞质受体中线粒体损伤,对山羊-绵羊异种核移植胚早期发育影响的研究尚未见报道。为此,本试验研究了核供体及胞质受体线粒体光敏化作用损伤对山羊-绵羊异种体细胞核移植重构胚早期发育的影响,以期为相关研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 化学试剂与培养基

胰蛋白酶(Amresio)、罗丹明-123、硫酸庆大霉素、肝素钠盐、透明质酸酶、矿物油、细胞松弛素 B、Hoechst 33342 荧光染料、离子霉素、2,6-二甲基氨基嘌呤、牛血清白蛋白(BSA)、二甲基亚砜(DMSO),均购自 Sigma 公司。胎牛血清(FBS),购自 HyClone 公司;人促性腺激素(HMG),购自 Serono 公司;DMEM 培养液、表皮生长因子(EGF)、组织培养基-199(TCM-199)、必需氨基酸(EAA)、非必需氨基酸(NEAA),购自 Gibco 公司。卵母细胞成熟培养基(TCM-199 中添加 10 mmol/L 羟乙基哌嗪乙磺酸)、0.38 mmol/L 丙酮酸钠、1 g/mL 17-β 雌二醇、0.075 IU/mL 尿促性腺激素、10 ng/mL 表

皮生长因子、SOF 发育液^[21]、线粒体染色媒介(磷酸盐缓冲液培养基添加体积分数 5% 胎牛血清和 50 g/mL 罗丹明-123)、操作液(磷酸盐缓冲液中添加 5 g/mL 的 Hoechst 33342 和含细胞松弛素 B 5%(体积分数)的胎牛血清),实验室自行配制。

1.2 绵羊卵母细胞的体外成熟

从陕西杨凌屠宰场回收绵羊卵巢,置于 38℃ 生理盐水中,于 4~6 h 内带回实验室用生理盐水洗 3 次,在加有采卵液的培养皿中切割取卵后,在显微镜下,挑选卵丘层紧密包裹的卵丘-卵母细胞复合体, (Cumulus oocyte complexes, COCs)置于成熟培养液小滴中培养,培养条件为 38.5℃、100% 相对湿度和体积分数 5% CO₂。将培养 20~22 h 成熟的 COCs 置于含体积分数 0.2% 透明质酸酶的 PBS⁻ 中,去掉成熟卵母细胞表面的卵丘细胞,用成熟培养液洗 3 次,在显微镜下挑出有第一极体的卵母细胞,移到成熟培养液中待用。

1.3 卵母细胞的去核及线粒体的光敏化损伤

选择成熟的卵母细胞置于操作液中,于 38.5℃ 放置 20 min,在显微操作仪(NT-88NE, Narishige, Nikon)下用固定针固定卵母细胞,用直径约为 20 μm 的去核管吸出极体和邻近少量胞质。将去核卵母细胞置于 35 mm 培养皿中,用线粒体特异荧光染料罗丹明-123 染色 10 min,再用含体积分数 5% 胎牛血清的磷酸缓冲液冲洗卵母细胞 2 次。细胞核移植前,将去核卵母细胞分别用 100 W 汞钨混合灯泡产生的可见光照射,通过分色镜((480±10) nm)滤过并照射(光敏化)0, 20, 40, 60 s,激发罗丹明-123 损伤线粒体。以未经罗丹明-123 染色及光敏化的去核卵母细胞为对照组。

1.4 山羊胎儿成纤维细胞的制备及线粒体的光敏化损伤

无菌手术采取 30~33 d 的山羊胎儿,置于 D-Hanks 培养液中洗涤数次,去除头及内脏,将剩余组织充分剪碎,平铺于直径 60 mm 的无菌塑料培养皿中,置于体积分数 5% CO₂、37℃ 培养箱中培养 2~3 h 后添加培养液,培养液为 1 L DMEM+NaHCO₃ 2.75 g+丙酮酸钠 0.100 g+青霉素 60 mg+链霉素 100 mg+体积分数 10% FBS。当外植体细胞生长至 80% 汇合时,用含 2.5 g/L 胰蛋白酶+0.2 g/L

EDTA 的 D-Hanks 培养液消化,并传代。将第 3 代细胞用含体积分数 0.5% FBS 的 DMEM 培养液饥饿培养 2~3 d,使细胞处于 G₀ 期。核供体(G₀ 期山羊胎儿成纤维细胞)移植前,分别用 100 W 汞钨混合灯泡产生的可见光照射,通过分色镜((480±10) nm)滤过并照射(光敏化)0,20,40,60 s,激发罗丹明-123 损伤线粒体。以未经罗丹明-123 染色及光敏化的山羊胎儿成纤维细胞为对照组。

1.5 山羊-绵羊异种体细胞核移植胚的构建与培养

在显微镜下,用注核针反复抽吸供体细胞,使细胞膜破裂成核胞体,在含体积分数 5% 的 FBS 和 30 g/L PVP 磷酸缓冲液中,将核胞体注入到去核卵胞质内,构建山羊-绵羊异种体细胞核移植胚,将重构胚放入 SOF 培养液中,于 38.5 ℃、相对湿度 100% 和体积分数 5% CO₂ 条件下培养 2 h,然后在含 5 mol/L 离子霉素的培养液中激活 5 min 后转入 6-D 液中培养 4 h,最后在覆盖矿油的培养液中培养。统计核移植胚 2-细胞期、8-细胞期和囊胚期的发育率。

表 1 线粒体损伤对山羊-绵羊异种体细胞核移植胚早期发育率的影响

Table 1 Effect of mitochondrial dysfunction on early development ability of goat-sheep interspecies somatic nuclear transfer embryos

处理时间/s Time of photosensi- tization	绵羊卵母细胞 Sheep oocyte	山羊供体细胞 Goat donor cell	重构胚数 Number of nuclear transfer embryos	核移植胚发育率/% Rate of nuclear transfer embryos		
				2-细胞期 2-cell stage	8-细胞期 8-cell stage	囊胚期 Blastocyst stage
0	对照组 Control	对照组 Control	96	52.1(50/96) a	62.0(31/50) a	16.1(5/31) a
	+	+	78	48.7(38/78) a	55.3(21/38) a	14.3(3/21) a
	+	—	86	34.9(30/86) b	56.7(17/30) a	11.7(2/17) a
20	—	+	76	51.3(39/76) a	61.5(24/39) a	16.7(4/24) a
	+	+	88	36.4(32/88) b	50.0(16/32) a	12.5(2/16) a
	+	—	95	25.3(24/95) b	58.3(14/24) a	14.3(2/14) a
40	—	+	83	48.2(40/83) a	60.0(24/40) a	16.7(4/24) a
	+	+	98	26.5(26/98) b	57.7(15/26) a	13.3(2/15) a
	+	—	104	23.1(24/104) b	54.2(13/24) a	15.4(2/13) a
60	—	+	73	47.9(35/73) a	48.6(17/35) a	17.6(3/17) a
	+	+	148	10.8(16/148) b	50.0(8/16) a	12.5(1/8) a

注:同列数据后标不同小写字母者表示差异显著($P<0.05$);“+”表示经罗丹明-123 染色,“—”表示未经罗丹明-123 染色。
Note: The different small letters in the same column indicate significance at 0.05 level; “+” indicates oocytes or donor cells dyed with ROD-123; “—” indicates oocytes or donor cells not dyed with ROD-123.

2.2 卵母细胞线粒体损伤对核移植胚早期发育率的影响

由表 1 可知,经罗丹明-123 染色并光敏化 20, 40,60 s 的绵羊卵母细胞与未经处理核供体构建的核移植胚 2-细胞期的发育率分别为 34.9%,25.3% 和 23.1%,与对照组(52.1%)差异显著($P<0.05$); 8-细胞期的发育率分别为 56.7%,58.3%和54.2%,囊胚期的发育率分别为 11.7%,14.3%和15.4%,均与对照组(62.0%,16.1%)差异不显著($P>$

1.6 数据分析

试验数据采用卡方检验进行分析。

2 结果与分析

2.1 核供体线粒体损伤对核移植胚早期发育的影响

由表 1 可知,经罗丹明-123 染色并光敏化 20, 40,60 s 的核供体与未经处理受体胞质构建的核移植胚 2-细胞期的发育率分别为 51.3%,48.2%, 47.9%;8-细胞期的发育率分别为 61.5%,60.0%, 48.6%;囊胚期的发育率分别为 16.7%,16.7%, 17.6%,均与对照组(2-细胞期、8-细胞期、囊胚期的发育率分别为 52.1%,62.0%,16.1%)差异不显著($P>0.05$)。随着光敏化时间的延长,2-细胞期和 8-细胞期核移植胚发育率呈下降趋势,但差异不显著($P>0.05$)。说明核供体线粒体受损不影响山羊-绵羊异种体细胞核移植胚的早期发育。

0.05)。随着光敏化作用时间的延长,各处理组间核移植胚的发育率差异不显著($P>0.05$),2-细胞期和 8-细胞期的发育率呈下降趋势,而囊胚期的发育率呈上升趋势。说明卵母细胞线粒体损伤对山羊-绵羊异种体细胞核移植胚 2-细胞期的发育率有影响,对 8-细胞期及囊胚期的发育率没有影响。

2.3 核供体与卵母细胞线粒体损伤对核移植胚早期发育的影响

由表 1 可知,核供体与卵母细胞线粒体均被罗

丹明-123 染色并光敏化,山羊-绵羊异种体细胞核移植胚 2-细胞期(图 1a)、8-细胞期(图 1b)和囊胚期(图 1c)发育率的变化趋势与卵母细胞线粒体损伤

的核移植胚一致。说明山羊-绵羊异种间核移植胚发育率与卵母细胞线粒体损伤与否有关,而与核供体线粒体是否受损无关。

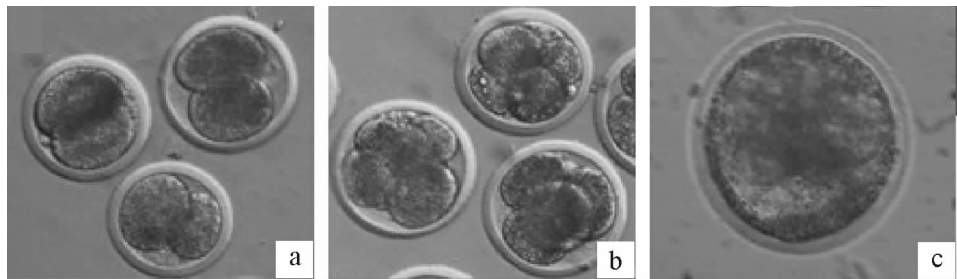


图 1 发育各阶段的核供体与卵母细胞线粒体均损伤的山羊-绵羊异种核移植胚

a. 2-细胞期(100×);b. 8-细胞期(100×);c. 囊胚期(200×)

Fig. 1 Various stages of mitochondrial dysfunction in nuclear donor and ooplasmic recipient on development of nuclear transfer embryos

a. 2-cell stage (100×);b. 8-cell stage (100×);c. Blastocyst stage (200×)

3 讨 论

线粒体是细胞内 ATP 的主要生产者。ATP 可通过三羧酸循环、 β 2 氧化、氧化磷酸化等过程产生。在多数情况下,ATP 由电子传递链的氧化磷酸化途径产生,由 2 个不同线粒体基因组编码,这不同于其他细胞通路^[22]。哺乳动物线粒体中 DNA 呈双链环状,大小约为 16.5 kb,可编码电子传递链所需酶中的 13 种多肽亚基以及 22 种 tRNA 和 2 种 rRNA,其余数百个亚基均由核基因编码,这决定了线粒体的半自主性,其功能的正常表达还需要其与核相互作用^[23]。卵母细胞并不成熟,与体细胞相比有较小的细胞器和相对简单的内部结构^[24-25]。一些代谢指标表明,尽管卵母细胞不成熟,但其线粒体仍然发挥着一定的作用,对维持卵母细胞发育是必要的^[6]。本研究发现,绵羊卵母细胞线粒体损伤可显著降低山羊-绵羊异种体细胞核移植胚 2-细胞期的发育率,原因可能是核供体细胞分裂完成重新编程需要 ATP,而卵母细胞线粒体的损伤影响了 ATP 的供应。在胚胎发育过程中,受精卵基因激活在母性遗传直至受精卵基因调控的转变过程中发挥着重要作用。在哺乳动物卵母细胞成熟过程中,将合成和积累大量蛋白质、mRNA、细胞器等母性遗传因子以维持胚胎的早期发育。此后,胚胎早期发育将由核基因编码的 mRNA 及其转录蛋白所控制。不同动物受精卵基因激活时间不同,山羊在 2-细胞期或 8-细胞期^[26-27],绵羊在 8~16 细胞期^[28]。8-细胞期后,山羊体细胞核基因激活,转录、翻译细胞因子和蛋白亚基,控制绵羊线粒体复制和氧化磷酸化途径,但山羊

线粒体不能复制,而被破坏或降解,具体机制尚不清楚。

核移植将供体线粒体注入卵母细胞受体中,因此重构胞质中含有供体细胞和受体卵母细胞 2 种来源的线粒体,可能导致核移植后代表现出 4 种线粒体遗传类型。第 1 种可能类型为,供体细胞来源的线粒体经类似于精子降解的泛素-蛋白酶体途径而得到降解,核移植后代的所有类型细胞中都是同质的受体卵母细胞来源的线粒体^[11];第 2 种可能的类型为,受体卵母细胞来源的线粒体遭到降解,后代个体细胞中只保留了供体细胞来源的线粒体^[12];第 3 种可能的类型为,供体细胞与受体卵母细胞来源的线粒体共存于后代的所有组织类型细胞中^[13];第 4 种可能类型为,在后代的某些组织细胞中,线粒体呈异质性,而在其他组织细胞中线粒体呈同质性^[14]。本研究中,因为山羊核供体线粒体损伤并不影响囊胚期前核移植胚的发育,这可能是核供体来源的线粒体以一定的方式被破坏或者是并不复制,也可能是在胚胎发育中线粒体逐渐降解,最终卵母细胞线粒体占主导地位。

本研究中,核供体、卵母细胞线粒体都损伤的核移植胚发育率的变化趋势,与卵母细胞线粒体损伤的核移植胚一致。在异种体细胞核移植胚发育的早期,虽然核供体线粒体影响核移植胚的发育,但卵母细胞线粒体扮演更重要的角色,卵母细胞的品质对异种体细胞核移植效率有重要影响。因此,在核移植过程中提高成熟卵质减少卵损伤,将有益于提高异种体细胞核移植的效率。

[参考文献]

- [1] Sutovsky P, Moreno R, Ramalho-Santos J, et al. Uiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos [J]. Biol Reprod, 2000, 63: 582-590.
- [2] Meirelles F V, Bordignon V, Watanabe Y, et al. Complete replacement of the mitochondrial genotype in a *Bos indicus* calf reconstructed by nuclear transfer to a *Bos taurus* oocyte [J]. Genetics, 2001, 158: 351-356.
- [3] Jansen R P. Germline passage of mitochondria: quantitative considerations and possible embryological sequelae [J]. Hum Reprod, 2000, 15(Suppl 2): 112-128.
- [4] Van Blerkom J, Davis P, Mathwig V, et al. Domains of highpolarized and low-polarized mitochondria may occur in mouse and human oocytes and early embryos [J]. Hum Reprod, 2002, 17: 393-406.
- [5] Barritt J A, Kokot M, Cohen J, et al. Quantification of human ooplasmic mitochondria [J]. Reprod Biomed, 2002, 4: 243-247.
- [6] Thouas G A, Trounson A O, Wolvetang E J, et al. Mitochondrial dysfunction in mouse oocytes results in preimplantation embryo arrest *in vitro* [J]. Biol Reprod, 2004, 71: 1936-1942.
- [7] Takeuchi T, Neri Q V, Katagiri Y, et al. Effect of treating induced mitochondrial damage on embryonic development and epigenesis [J]. Biol Reprod, 2005, 72: 584-592.
- [8] Thouas G A, Trounson A O, Jones G M. Developmental effects of sublethal mitochondrial injury in mouse oocytes [J]. Biol Reprod, 2006, 74(5): 969-977.
- [9] Wilding M, Dale B, Marino M, et al. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos [J]. Hum Reprod, 2001, 16: 909-917.
- [10] Ma L B, Cao J W, Hua S, et al. Nuclear Transfer and Mitochondria [J]. Hereditas(Beijing), 2006, 28(3): 345-350.
- [11] Evans M J, Gurer C, Loike J D, et al. Mitochondrial DNA genotypes in nuclear transfer-derived cloned sheep [J]. Nature Genetic, 1999, 23: 90-93.
- [12] Chen D Y, Wen D C, Zhang Y P, et al. Interspecies implantation and mitochondrial fate of panda-rabbit cloned embryos [J]. Biol Reprod, 2002, 67(2): 637-642.
- [13] Takeda K, Akagi S, Kaneyama K, et al. Proliferation of donor mitochondrial DNA in nuclear transfer calves (*Bos taurus*) derived from cumulus cells [J]. Molecular Reproduction and Development, 2003, 64(4): 429-437.
- [14] Hiendleder S, Zakhartchenko V, Wenigerkind H, et al. Heteroplasmy in bovine fetuses produced by intra- and inter-subspecific somatic cell nuclear transfer; neutral segregation of nuclear donor mitochondrial DNA in various tissues and evidence for recipient cow mitochondria in fetal blood [J]. Biol Reprod, 2003, 68: 159-166.
- [15] Lanza R P, Cibelli J B, Diaz F, et al. Cloning of an endangered species (*Bos taurus*) using intersecies nuclear transfer [J]. Cloning, 2000, 2(2): 79-90.
- [16] Loi P, Ptak G, Barboni B, et al. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells [J]. Nat Biotech, 2001, 19(10): 962-964.
- [17] Steinborn R, Zakhartchenko V, Wolf E, et al. Non-balanced mix of mitochondrial DNA in cloned cattle produced by cytoplasm-blastomere fusion [N]. FEBS Letters, 1998b, 426: 357-361.
- [18] Takeda K, Takahashi S, Onishi A, et al. Dominant distribution of mitochondria DNA from recipient oocytes in bovine embryos and offspring after nuclear transfer [J]. J Reprod Fertil, 1999, 116(2): 253-259.
- [19] Steinborn R, Schinogl P, Wells D N, et al. Coexistence of *Bos taurus* and *B. indicus* mitochondrial DNAs in nuclear transfer-derived somatic cattle clones [J]. Genetics, 2002, 162: 823-829.
- [20] Yang C X, Kou Z H, Wang K, et al. Quantitative analysis of mitochondrial DNAs in macaque embryos reprogrammed by rabbit oocytes [J]. Biol Reprod, 2004, 127: 201-205.
- [21] Gardner D K, Lane M, Spitzer A, et al. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells; amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development [J]. Biol Reprod, 1994, 50: 390-400.
- [22] Justin C, Rhiannon E, Emma J, et al. The consequences of nuclear transfer for mammalian foetal development and offspring survival. A mitochondrial DNA perspective [J]. Reproduction, 2004, 127: 631-641.
- [23] Garesse R, Vallejo C G. Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between genomes [J]. Gene, 2001, 263: 1-16.
- [24] Trimarchi J R, Liu L, Porterfield D M, et al. Oxidative phosphorylation-dependent and -independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos [J]. Biol Reprod, 2000, 62: 1866-1874.
- [25] Thompson J G, McNaughton C, Gasparrini B, et al. Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured *in vitro* [J]. J Reprod Fertil, 2000, 118: 47-55.
- [26] Chartrain I, Niar A, King W A, et al. Development of the nucleolus in early goat embryos [J]. Gamete Res, 1987, 18: 201-213.
- [27] Pivko J, Grafenau P, Kopecny V. Nuclear fine structure and transcription in early goat embryos [J]. Theriogenology, 1995, 44: 661-671.
- [28] Crosby I M, Gandolfi F, Moor R M. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos [J]. Reprod Fertil, 1988, 82: 769-775.