

핵이식에 의한 소 난자 및 초기배의 핵-세포질의 상호작용에 관한 연구*

김정익 · 양부근 · 정희태
강원대학교 축산대학

Nucleo-cytoplasmic Interactions of Bovine Oocytes and Embryos Following Nuclear Transplantation

Kim, C.I., B.K. Yang and H.T. Cheong

College of Animal Agriculture, Kangwon National University

SUMMARY

This study was to investigate the effects of electrofusion, activation and developmental stage of donor embryos on *in vitro* development of nuclear transplant bovine embryos. A single blastomere nucleus from 8-cell to morula stage embryos produced by *in vitro* fertilization(IVF) was transferred into a recipient oocyte enucleated at 23~25 h after *in vitro* maturation(IVM) or into a recipient oocyte enucleated and cultured for 14~15 h. In one experiment the nuclear transplant embryos were subjected to additional activation treatments. Fusion rate of nuclear transplant eggs was high at direct current(D.C) voltages of 1.0 and 1.5 kV/cm (91.5 and 93.3%, respectively), but decreased at 2.0 kV/cm (81.8%). Additional activation treatments by electric pulses or 7% ethanol did not affect the cleavage and development of nuclear transplant embryos. Development of nuclear transplant embryos slightly increased by delayed nuclear transfer and fusion (42~43 h after IVM). With this system, blastocysts were obtained from transfer of 8-cell to morula stage donor nuclei (9.6%~2.4%). The result of this study suggests that nucleo-cytoplasmic interactions, especially activation of ooplasm are very important for the development of nuclear transplant embryos, and donor cell stage does not affect the development of nuclear transplant embryos.

I. 서 론

McGrath와 Solter(1983)가 생쥐의 핵이식기술의 개발에 성공한 이래, 핵이식기술을 이용한 유전적으로 동일한 동물의 대량생산(cloning) 및 핵-세포질간의 상호작용의 규명을 위한 많은 연구들이 생쥐(McGrath와 Solter, 1984, 1986; Howlett 등, 1987; Cheong과 Kanagawa, 1993; Cheong 등, 1993, 1994) 및 토끼(Stice와 Robl, 1988; Collas와 Robl,

1990; Collas 등, 1992a,b) 뿐 아니라 면양(Willadsen, 1986; Smith와 Wilmut, 1989), 돼지(Prather 등, 1989) 및 소(Prather 등, 1987; Bondioli 등, 1990) 등의 가축에서도 이루어져 왔다. 핵이식 기술은 발육 도중에 있는 배 유래의 핵을 제핵 난세포질에 이식하므로써 개체를 생산해 내는 기술이나, 배의 발육 과정에 있어 각각의 세포들은 각기 다른 조직으로 분화되므로, 발생도중에 있는 세포핵을 제핵 미수정란 세포질에 이식할 경우 핵과 세포질간의 복잡한 상호작용이 수반된다. 핵이식배의 발생은 donor배의 배성

*본 연구는 1991년도 동물자원연구센터 중장기연구과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

유전자 활성화시기와 관련이 있고(Surani 등, 1987), 아울러 recipient 세포질의 발육단계에 따라서도 영향을 받는 것으로 보고되고 있다(Rob1 등, 1987; Prather와 First, 1990a, b). 그러나 최근, 토끼(Collas와 Rob1, 1990), 땀양(Smith와 Wilmot, 1989) 및 소(Willadsen, 1989; Bondioli 등, 1990; Sims와 First, 1993)에 있어서 성숙미수정란의 재핵세포질내로 배성유전자가 활성화된 이후의 배유래의 핵을 이식하여도 배반포 및 산자로 발생할 수 있다고 보고되었다. 또한, 이들 핵이식배의 발생능은 donor핵의 세포주기 stage(Collas 등, 1992a; Cheong 등, 1993)뿐 아니라 핵과 세포질간의 융합시간 및 세포질의 활성화시기(Collas와 Rob1, 1990)에 의해서도 다를 수 있다고 보고되었다.

한편, 이들 가축에 있어서의 핵이식 연구는 체내에서 회수된 난자 및 배가 사용되었는데, 많은 수의 난자 및 배를 확보하기 위해서는 체외성숙, 체외수정기술과 핵이식을 연계시키는 것이 바람직하다. 체외성숙, 체외수정란의 발육능은 체내유래 난자 및 배에 비하여 저조하나, 이들 체외성숙, 체외수정란을 이용한 핵이식 연구가 활발히 진행되고 있다(Ushijima와 Eto, 1992; Keefer 등, 1993; Kono 등, 1993).

본 연구는 소 난자 및 초기배의 핵과 세포질간의 상호작용에 관한 연구로서, 소에 있어서의 체외성숙·체외수정 유래의 난자 및 배를 이용하여 핵이식을 실시하고, 전기융합 및 활성화 처리, 그리고 donor배의 발육단계가 핵이식배의 체외발육에 미치는 영향을 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난자 및 배의 준비

난포란의 체외성숙 및 체외수정은 Kim 등(1990)의 방법에 준하여 실시하였다. 도축장에서 회수한 소의 난소로부터 채취한 난포란을 10% fetal calf serum(FCS; Gibco, NY, USA)이 첨가된 TCM 199 (Gibco)액중에서 39°C, 5% CO₂ 빛 95% 공기조건하에 22~24시간 성숙배양 후, heparin(Sigma, St. Louis, Mo, USA) 10 μ g/ml과 caffeine(Sigma) 5mM이 첨가된 BO액(Brackett

와 Oliphant, 1975)내에서 8~12시간 수정하였다. 수정후 난자는 세척하여 난구세포가 붙어있는 채로 10% FCS가 첨가된 TCM 199액중에서 36~40시간 배양후 4세포기 이상으로 발육한 수정란은 계속하여 동일한 배양소적내의 난구세포 단층세포층과 공동배양하여 8세포기-상실배기로 발육한 수정란을 donor배로 공시하였다. Recipient란은 동일한 방법으로 채외성숙시킨 난포란을 1 ml의 TCM 199액이 들어있는 원심관에 옮겨, vortex mixer로 3분간 처리하여 난구세포를 제거한 후, 세포질의 색조가 균일하고 제1극체가 확인된 란만을 실험에 공시하였다.

2. 현미조작

Donor배는 0.25% Pronase처리로 투명대를 제거하고, 20% FCS를 첨가한 Dulbecco's phosphate-buffered saline(PBS) 내에서 수회 세정한 후 pipetting 조작에 의해 할구를 분리하였다. 상실배의 경우는 투명대 제거후 0.125% trypsin과 0.1% EDTA가 첨가된 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺-free PBS액으로 2~3분간 처리후 pipetting조작에 의해 할구를 분리하였다.

미수정란의 제핵 및 핵이식은 5 μ g/ml cytochalasin B(Sigma)와 0.3 μ g/ml nocodazol(Aldrich Chem. Co. Milw. WI, USA)이 함유된 PBS액내에서 Prather(1987)의 방법에 준하여 실시하였다. 미수정란의 제핵은 성숙배양후 23~25시간에 제1극체와 주변의 세포질을 약 1/3정도 흡입 제거한 후(Fig. 1). 난세포질을 1 μ g/ml의 농도의 Hochest 33342(Sigma)로 20분간 처리하여(Westhusin 등, 1992) 형광현미경하에서 염색체의 유무를 확인하고, 제핵이 확인된 난자만을 recipient 세포질로 사용하였다. Donor 배의 단일할구는 injection pipette으로 흡인 후(Fig. 2), 제핵을 실시했던 구멍을 통하여 제핵란세포질의 위란강내로 주입하였다(Fig. 3). 일부실험에 있어서는 미수정란의 제핵을 실시한 후 14~15시간 배양후(성숙배양후 40~42시간)단일할구를 이식하였다.

3. 전기융합 및 활성화처리

할구 주입란은 10% FCS를 함유한 TCM 199 액중에서 1시간 배양한 후 전기융합을 실시하였다. 전기융합은 Zimmerman 세포융합장치(Model Z1000,

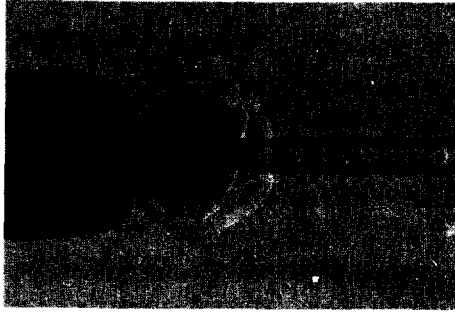


Fig. 1. Enucleation of mature oocyte. The first polar body (1PB: arrow) and some parts of cytoplasm around the 1PB were removed by aspiration with injection pipette.



Fig. 2. A blastomere from an 8~16 cell stage embryo was aspirated into the injection pipette.

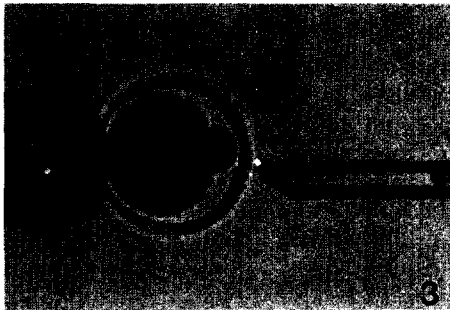


Fig. 3. A blastomere from an 8~16 cell stage embryo was inserted into the perivitelline space of an enucleated oocyte.

GCA/Precision Scientific Group, Chicago, IL, USA) 및 0.5mm 폭의 wire chamber가 사용하여

Cheong 등(1991, 1992)의 방법에 준하여 실시하였다. 할구 주입액은 0.1mM MgSO₄, 0.05 mM CaCl₂, 0.05mg/ml BSA를 첨가한 0.3 M mannitol 용액을 넣은 wire chamber의 양 전극 사이로 옮긴 후, 0.6MHz, 12V/mm의 교류전류(A.C)를 통전하여 할구와 세포질의 접촉면이 양 전극에 수평이 되도록 유도하고, 이어서 1.0~2.0kV/cm의 직류 전류(D.C)를 70 μsec간 3회 통전하였다. 통전 후 즉시 TCM 199 + 10% FCS액내에서 수회 세척후 같은 배양액 내의 옮겨 융합 여부를 관찰하였다. 일부 융합란은 필요에 따라 7% ethanol로 7분간 처리하거나, 전기융합 시와 동일한 조건으로 세포질의 활성화 처리를 실시하였다.

4. 핵이식배의 체외배양

핵이식배는 별도로 준비된 난구세포 단층세포층, 또는 donor배를 배양했던 동일한 배양소적내의 단층세포층과 39°C, 5% CO₂ 및 95% 공기조건하에서 3~7일간 공동배양하였다. 배양액은 매일 2~3일마다 신선한 배양액으로 1/2씩 교환하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 전기융합조건에의 검토

융합시 직류전압의 강도가 융합 및 핵이식배의 발육에 미치는 영향을 검토하기 위하여 8~16 세포기 유래의 단일할구를 제핵 미수정란에 이식한 후 1.0, 1.5 및 2.0 kV/cm의 직류전압 조건하에서 전기융합을 실시 후 48~72시간 배양하여 핵이식배의 분할율을 검사하였다. 융합율은 1.0 및 1.5kV/cm의 조건에서 91.5~93.3%의 높은 성적을 얻었으나 2.0kV/cm의 경우는 81.8%로 저하되었고, 융합후 퇴행란자의 비율도 19.4%로 증가하였다(Table 1). 한편, 핵이식배의 분할율은 1.0, 1.5 및 2.0 kV/cm의 조건하에서 각각 53.5%, 57.1% 및 47.2%로 낮은 성적을 나타냈다.

Kono등(1989)은 체외성숙 소 난자에 1.0kV/cm의 전압을 통전하였을 경우 퇴행란이 증가하였다고 보고하였으나, 본 실험의 결과는 1.5kV/cm의 조건하에서도 퇴행란이 거의 발생하지 않고, 높은 융합율을 나타내, 그들의 결과와 일치하지 않았다. 핵이식에

있어서의 전기자극에 의한 할구융합 성적은 소의 경우 매우 다양하나, 1.0~1.5kV/cm의 전압을 5~100 μ sec 간 1~3회 통전하는 것이 일반적이다(Prather 등, 1987; Westhusin 등, 1992). 이상의 결과에 따라 이후의 모든 실험에서는 1.25kV/cm의 D.C 조건하에서 전기융합을 실시하였다.

2. 활성화 처리의 영향

분할구의 융합후 추가적인 난세포질의 활성화처리가 핵이식배의 발육에 미치는 영향을 검토하기 위하여, 8~16 세포기배 유래의 분할구를 난세포질에 이식한 후 무처리구, 7% ethanol 처리구, 전기자극 처리구로 나누어 체외 발육능을 검사하였다. Table 2에 나타나 바와 같이 3구간에 분할율의 차이는 나타나지 않았으나, 추가적인 활성화 처리를 실시한 구에서는 8세포기 이후로의 발육율이 증가하는 경향을 보였다.

이상의 결과는 추가적인 활성화 처리가 핵이식배의 분할율 증가에 영향을 주지 못함을 의미하며, 결과적으로는 난세포질의 활성화에도 영향을 미치지 못함을 의미할 수 있다. Mitani 등(1993)은 8세포기 분할구 주입란의 전기융합후 7% ethanol로 추가적인 활성화 처리를 하였을 경우에 분할율 및 체외발육율에 거의

영향을 주기 못하였다고 보고하여, 본 결과와 일치하였다. 한편, First 등(1992)은 단위발생 처리에 의한 소 난자의 활성화율은 난자의 aging에 크게 좌우되어, 성숙배양후 24시간째의 난자는 전기자극후 30% 미만의 활성화를 나타낸 반면, 32시간째의 난자는 80% 이상의 높은 활성화를 보였다고 보고하였다. 최근에는 초기난자의 활성화를 위한 새로운 방법으로 전기자극과 cycloheximide처리를 병행하는 방법이 보고되어 있다(First 등, 1992). 따라서 핵이식배의 분할율을 증가시키기 위해서는 전기융합의 시간을 지연하거나, cycloheximide 처리의 병용과 같은 방법이 활용되어야 할 것으로 판단된다.

3. 융합시간의 영향

핵이식란의 융합 및 발육에 미치는 융합시간의 영향을 검토하기 위하여, 성숙배양을 시작한지 23~25시간에 미수정란으로부터 염색체를 제거한 후, 일부는 즉시 핵이식 및 할구융합을 실시(성숙배양후 27~28시간)하고 일부는 14~15시간 배양후 핵이식 및 할구융합을 실시(성숙배양후 42~43시간)하였다. 융합율은 각각 90.5%(38/42)와 93.0%(40/43)로 두 구간에 차이가 인정되지 않았다. 한편, 핵이식배의 분할율

Table 1. Effect of voltage of DC pulses on fusion and *in vitro* development of nuclear transplant eggs.

D.C voltage (kV/cm)	No. (%) of eggs fused manipulated	No. (%) of eggs developed to				Degenerated (%)
		Total	2-cell	3~4-cell	5~8-cell	
1.0	43/47(91.5)	23(53.5)	10	8	5	0(0.0)
1.5	42/45(93.3)	24(57.1)	8	10	6	2(4.8)
2.0	36/44(81.8)	17(47.2)	6	8	3	7(19.4)

Table 2. Effect of various activation treatment on *in vitro* development of nuclear transplant embryos

Activation treatment	No. of eggs cultured	No. (%) of eggs developed to					
		Total	2~4-cell	5~8-cell	9~32-cell	Morula	Blastocyst
None	34	16(47.1)	10	5	1	0	0
7% ethanol	37	19(51.4)	8	6	4	1	0
Electric pulses	38	21(55.3)	7	8	4	1	0

Table 3. Effect of fusion time on *in vitro* development of nuclear transplant embryos

Fusion time	No. (%) of eggs fused / manipulated	No. (%) of eggs developed to					
		Total	2~4-cell	5~8-cell	9~32-cell	Morula	Blastocyst
27~28h	38 / 42(90.5)	20(52.6)	11	6	4	0	0(0.0)
42~43h	40 / 43(93.0)	28(70.0)	8	9	7	1	3(7.5)

* Oh=time in which oocytes were put into maturation.

Table 4. Effect of donor cell stage on *in vitro* development of nuclear transplant embryos

Donor cell stage	No. (%) of eggs fused / manipulated	No. (%) of eggs developed to					
		Total	2~4-cell	5~8-cell	9~32-cell	Morula	Blastocyst
8~16-cell	45 / 49(91.8)	29(64.4)	8	9	7	2	3(6.6)
16~32-cell	52 / 56(92.9)	37(71.2)	9	11	9	3	5(9.6)
>32-cell	42 / 50(84.0)	26(61.9)	8	7	7	3	1(2.4)

및 체외발육율은 42~43시간 구에서 다소 증가하는 경향을 보여, 27~28시간 구에서는 상실배기 이후로의 발육이 관찰되지 않았으나, 42~43시간 구에서는 4개가 상실배기 이후로 발육하고, 그중 3개(7.5%)가 배반포로 발육하였다(Table 3).

Collas와 Robl(1990)은 aging된 난자가 어린 난자에 비해 전기자극에 의한 활성화율이 높았다고 보고하였으며, Rao 등(1993)은 분할구 주입후 융합시간이 36시간 이후로 지연됨으로써 핵이식배의 분할율과 체외발육율이 증가되었다고 보고하였다. 본 실험의 결과는 또한, 핵이식후 12시간 지연 융합의 결과 융합율, 분할율 및 체외발육이 증가되었다고 한 Sims 등(1991)의 결과와도 일치하는 경향을 보였다. 한편, 핵이식배의 발육능증가는 융합시간을 지연시킴으로써 핵이식배의 발육에 충분한 난세포질의 성숙을 유도한 결과만으로 보기는 어려우며, aging된 난세포질은 어린 난세포질의 경우에 보이는 성숙촉진인자(MPF: maturation promoting factor)에 의한 염색체응축(PCC; premature chromosome condensation) 현상이 억제되어 donor 핵의 세포주기 stage에 의한 영향이 감소된 때문인 것으로 판단된다(Cheong 등, 1993; Collas와 Robl, 1991).

4. Donor 핵의 발육단계의 영향

Donor 핵의 발육단계에 따른 핵이식배의 체외발육

능을 검토하기 위하여 donor 핵의 발육단계를 3구로 나누어 각각 제핵후 14~15시간 배양된 난세포질에 이식하였다. 융합율은 32세포기 이상 구에서 약간 낮게(84.0%) 나타났으나, 이는 세포의 크기가 타구에 비해 작은 것에 기인하는 것으로 판단된다. 한편, 8~16세포기, 16~32세포기 및 32세포기 이상구에서 각각 64.4%, 71.2% 및 61.9%가 2세포기로 분할하여, 각각 6.6%, 9.6% 및 2.4%가 배반포(Fig. 4)까지 발육하였다(Table 4).

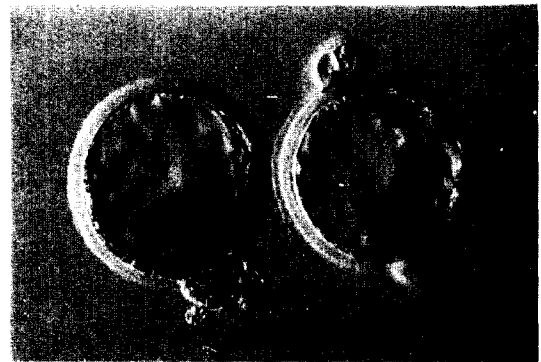


Fig. 4. Blastocyst stage embryos produced by transfer of a 16~32 cell blastomere to an enucleated oocyte and *in vitro* culture for 7 days.

Prather 등 (1987)은 2~32세포기 배 유래의 핵이 식으로부터 상실배 및 배반포를 얻었다고 보고하였으며, Bondioli 등 (1990)도 16~64 세포기배 유래의 핵이 식으로부터 배반포기배 및 산자를 얻는데 성공한 바 있다. 그러나 이들의 결과는 체내 회수란을 이용한 성적이며, 최근 Ushijima와 Eto(1992) 및 Kono 등 (1993)은 체외수정란 유래의 16~32세포기 핵을 이식하여 배반포를 얻었다는 결과를 보고하여, 체외수정 유래의 배를 이용한 핵이식이 기대되고 있다.

이상의 결과는 핵이식배의 발육이 핵과 세포질간의 상호작용, 특히 난세포질의 활성화와 긴밀한 관계가 있으며, donor핵의 발육단계는 핵이식배의 발육에 큰 영향을 미치지 않는다는 것을 시사한다. 그러나 난세포질의 활성화와 관련된 구체적인 핵-세포질 상호작용의 기전을 밝히기 위해서는 활성화를 뿐 아니라 활성화 형태, 세포주기와의 관계 등 세포학적 특성에 관한 연구가 필요하다고 판단된다.

IV. 적 요

본 연구는 소 난자 및 초기배의 핵과 세포질간의 상호작용에 관한 연구로서, 소에 있어서의 체외성숙·체외수정 유래의 난자 및 배를 이용하여 핵이식을 실시하고, 전기융합 및 활성화처리, 그리고 donor배의 발육단계가 핵이식배의 체외발육에 미치는 영향을 검토하였다.

핵이식란의 융합율은 1.0 및 1.5 kV/cm의 조건하에서 각각 91.5% 및 93.3%로 높았으나, 2.0kV/cm의 조건하에서는 81.8%였으며, 융합 후 퇴행란의 비율도 높았다. 전기융합후의 7% ethanol 및 전기자극에 의한 추가적인 활성화 처리는 핵이식배의 분할 및 발육에 영향을 주지 못하였다. 한편, 핵이식 및 전기융합시간에 따른 발육율은 성숙배양의 42~43시간에 실시한 구가 27~28시간 구에 비하여 분할율 및 발육율이 향상되는 경향을 나타냈다. 제핵후 14~15시간 배양된 미수정란 세포질에 체외수정유래의 8~64세포기배의 핵을 이식한 결과, 배반포로의 발육율을 8~16세포기구, 16~32세포기구 및 32세포기이상구에서 각각 6.6%(3/45), 9.6%(5/52) 및 2.4%(1/42)로 나타났다.

이상의 결과는 핵이식배의 발육이 핵과 세포질간의

상호작용, 특히 난세포질의 활성화와 긴밀한 관계가 있으며, donor핵의 발육단계는 핵이식배의 발육에 큰 영향을 미치지 않는다는 것을 시사한다.

V. 인용문헌

1. Bondioli, K.R., M.E. Westhusin and C.R. Looney. 1990. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenology*, 33 : 65-174.
2. Brackett, B.G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 12 : 260-274.
3. Cheong, H.T. and H. Kanagawa. 1993. Assessment of cytoplasmic effects on the development of mouse embryonic nuclei transferred to enucleated zygotes. *Theriogenology*, 39 : 451-461.
4. Cheong, H.T., T. Taniguchi, M. Hishinuma, Y. Takahashi and H. Kanagawa. 1991. Effects of various electric fields on the fusion and *in vitro* development of mouse two-cell embryos. *Theriogenology*, 36 : 875-885.
5. Cheong, H.T., Y. Takahashi and H. Kanagawa. 1992. Developmental capacity of reconstituted mouse embryos: influences of nucleus and cytoplasm sources. *J. Vet. Med. Sci.*, 54 : 1099-1103.
6. Cheong, H.T., Y. Takahashi and H. Kanagawa. 1993. Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. *Biol. Reprod.*, 48 : 958-963.
7. Cheong, H.T., Y. Takahashi and H. Kanagawa. 1994. Relationship between nuclear remodeling and subsequent development of mouse embryonic nuclei transferred to enucleated oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, in press.
8. Collas, P. and J.M. Robl. 1990. Factors affecting the efficiency of nuclear transplana-

- tation in the rabbit embryo. *Biol. Reprod.*, 43 : 877-884.
9. Collas, P. and J.M. Robl. 1991. Relationship between nuclear remodeling and development in nuclear transplant rabbit embryo. *Biol. Reprod.*, 45 : 455-465.
 10. Collas, P., J.J. Balise and J.M. Robl. 1992a. Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear trnasplant rabbit embryo. *Biol. Reprod.*, 46 : 492-500.
 11. Collas, P., C. Pinto-Correia, F.A. Ponce De Leon and J.M. Robl. 1992b. Effect of donor cell cycle stage on chromatin and spindle morphology in nuclea transplant rabbit embryo. *Biol. Reprod.*, 46 : 501-511.
 12. First, N.L., M.L. Leibfried-Rutledge, D.L. Northey and P.R. Nuttleman. 1992. Use of *in vitro* matured oocytes 24hr of age in bovine nuclear transfer. *Theriogenology*, 37 : 211(abstr.).
 13. Howlett, S.K., S.C.Barton and M.A.H. Surani. 1987. Nuclear cytoplasmic interactions following nuclear transplantation in mouse embryos. *Development*, 101 : 915-923.
 14. Keefer, C.L., S.L. Stice and J. Dobrinsky. 1993. Effect of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during bovine *in vitro* maturation on development following *in vitro* fertilization and nuclear transfer. *Mol. Reprod. Dev.*, 36 : 469-474.
 15. Kim, C.I., J.E. Ellington and R.H. Foote. 1990. Maturation, fertilization and development of bovine oocytes *in vitro* using TCM 199 and a simple defined medium with co-culture. *Theriogenology*, 33 : 433-440.
 16. Kono, T., S. Iwasaki and T. Nakahara T. 1989. Parthenogenetic activation by electric stimulus of bovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*, 32 : 248(abstr.)
 17. Kono, T., Y. Sotomoru, F. Aono, T. Takahashi, K. Ogihara, F. Sekizawa, T. Arai and T. Nakahara. 1993. Effect of ooplast activation on the development of nuclear transferred bovine embryos. *Theriogenology*, 39 : 248(abstr.).
 18. McGrath, J. and D. Solter. 1983. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science*, 220 : 1300-302.
 19. McGrath, J. and D. Solter. 1984. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development *in vitro*. *Science*, 226 : 1317-1319.
 20. McGrath, J. and D. Solter. 1986. Nucleocytoplasmic interaction in the mouse embryos. *J. Embryol. exp. Morph.*, 97 (Suppl.) : 277-289.
 21. Mitani, T., K. Utsumi and A. Iritani. 1993. Developmental ability of enucleated bovine oocytes matured *in vitro* after fusion with single blastomere of eight-cell embryos matured and fertilized *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 34 : 314-322.
 22. Prather, R.S., F.L. Barnes, M.M. Sims, J. M. Robl, W.H. Eyestone and N.L. First. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryos : assessment fo donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.*, 37 : 859-866.
 23. Prather, R.S. and N.L. First. 1990a. Cloning embryos by nuclear transfer. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, 41 : 125-134.
 24. Prather, R.S. and N.L. First. 1990b. Nuclear transfer in mammalian embryos. *Int. Rev. Cytol.*, 120 : 169-190.
 25. Prather, R.S., M.M. Sims and N.L. First. 1989. Nuclear transplantation in early pig embryo. *Biol. Reprod.*, 41 : 414-418.
 26. Rao, V.H., P. Chesne, J.P. Renade and Y. Heymen. 1993. Influence of age of *in vitro* matured oocytes and electrical stimulation on the development of cattle nuclear trans-

- fer embryos. *Theriogenology*, 39:292 (abstr.)
27. Robl, J.M., R.S. Prather, F.L. Barnes, W.H. Eyestone, D.L. Northey, B. Gilligan and N. L. First. 1987. Nuclear transplantation in bovine embryos. *J. Anim. Sci.*, 67:642-647.
 28. Smith, L.C. and I. Wilmut. 1989. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development *in vitro* of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol. Reprod.*, 40:1027-1035.
 29. Sims, M.M. and N.L. First. 1993. Production of fetuses from totipotent cultured bovine inner cell mass cells. *Theriogenology*, 39:313(Abstr.).
 30. Sims, M.M., C.F. Rosenkrans, Jr. and N.L. First. 1991. Development *in vitro* of bovine embryos derived from nuclear transfer. *Theriogenology*, 35:272(abstr.).
 31. Stice, S.L. and J.M. Robl. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 39:657-664.
 32. Surani, M.A.H., S.C. Barton and M.L. Norris. 1987. Experimental reconstitution of mouse eggs and embryos: an analysis of mammalian development. *Biol. Reprod.*, 36:1-16.
 33. Ushijima, H. and T. Eto. 1992. Production of a calf from a nuclear transfer embryo using *in vitro* mature oocytes. *J. Reprod. Dev.*, 38:61-65.
 34. Westhusin, M.E., M.J. Levanduski, R. Scarborough, C.R. Looney and K.R. Bondioli. 1992. Viable embryos and normal calves after nuclear transfer into Hoechst stained enucleated demi-oocytes of cows. *J. Reprod. Fert.*, 95:475-480.
 35. Willadsen, S.M. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature.*, 320:63-65.
 36. Willadsen, S.M. 1989. Cloning of sheep and cow embryos. *Genome*, 31:956-965.