

체외수정 유래 소 핵이식란의 배양에 관한 연구

황우석 · 조충호
서울대학교 수의과대학
(1994년 11월 2일 접수)

Studies on the culture of bovine nuclear transplant embryos derived *in vitro* fertilization

Woo-suk Hwang, Choong-ho Jo

College of Veterinary Medicine, Seoul National University
(Received Nov 2, 1994)

Abstract : The fusion rates of nuclear transplant embryos with various DC voltage were 55.6-79.2%. The significantly higher fusion rates of nuclear transplant embryos were achieved at the electric field strength of DC 1.0-2.0kV/cm(72.0-79.2%) than DC 0.75kV/cm(55.6%, $P<0.05$). No significant differences in the percentage of embryos that cleaved(48.1, 55.4 and 42.6% respectively) and the percentage of cleaved embryos that developed to morulae/blastocyst(1.9, 5.3 and 1.9% respectively) could be found among the three types of *in vitro* culture system (Granulosa cell, BOEC co-culture and SOF, $P>0.01$). The age of the recipient cytoplasm(30 vs 40hr) had no effect on the fusion rates and the rates of cleavage development(36.9 vs 44.1%, $P>0.01$).

Key words : bovine, nuclear transfer, electrofusion, *in vitro* development

서 론

포유동물에 있어 수정란의 핵이식기법은 실험동물을 이용한 번식생리학 및 유전학 분야에서의 클론동물생산 뿐만 아니라 우량품종을 이용하여 동일한 유전자형을 지닌 다수의 개체를 생산하는 측면에서 매우 유용한 분야이다^{1,2,3,4,5,6}. 핵이식 기술에 의한 클론동물 생산의 가능성은 1952년에 Briggs와 King⁷에 의해 양서류에서 처음으로 시사되었으며, 포유류에서는 Illmensee와 Hoppe⁸가 처음으로 마우스 배반포기 수정란의 내세포 외 핵을 탈핵된 전핵기 수정란에 이식하여 배반포로의

발육과 산자생산에 성공하였다고 보고하였다.

1987년 Prather et al⁹에 의해 최초로 소에서의 핵이식 산자가 생산된 이래 이에 대한 많은 연구가 진행되었다^{10,11,12}. 최근의 핵이식 기법은 미세조작에 의한 metaphase II(MII)단계 난자의 탈핵과 전기적 자극을 통한 공핵란의 세포원형질과의 융합이 보편화되고 있으며, 체내성숙란외에 도축장유래의 체외성숙란을 핵이식에 사용하고 있다^{10,13,14}. 그러나 소 핵이식란의 작성에 있어 체외성숙난자의 전기적 활성화는 세포질 성숙도에 의존적이며, 22-24시간 동안 체외성숙된 난자의 활성화 시도는 극히 제한된 성공률만을 나타낸다고 보

고되었을 뿐 아니라^{15,16} 난자의 탈핵을 또한 성숙시간이 길어짐에 따라 감소하는 결과를 보였다¹⁷. 이에 성숙난자의 탈핵률을 높이며 세포질 활성도를 극대화하기 위해 체외성숙 개시후 22-24시간에 탈핵을 실시하고, 난의 활성화를 위해 탈핵된 난자를 체외 배양 30-40시간 후 핵이식을 실시하는 'aged cytoplasm'의 이용이 더 높은 분할률을 나타내었다^{17,18}.

세포융합술은 포유동물의 접합체와 초기수정란의 핵-세포질 작용에 관한 연구 및 이의 응용에 널리 이용되어 왔으며, 불활화한 Sendai virus(HVJ)¹⁹와 polyethylene glycol(PEG)^{20,21}이 세포융합 매개체로 이용되었다. 그러나 HVJ나 PEG를 세포융합 매개체로 이용할 경우 융합시 융합매개체에 노출되는 시간이 비교적 길고, 외부요인 및 각 실험실 조건이 융합성적에 영향을 줄 수 있으며, HVJ불활화 등 복잡한 과정이 요구된다. 이와같은 HVJ와 PEG를 이용한 세포융합술의 단점을 보완하고 융합하려는 세포에 영향을 최소로 하며 간편하고 반복재현성이 있는 방법으로서 전기적 세포융합 방법이 연구되었다²². 이 방법은 물리적 수치를 정확하게 제어하여 완벽하게 재현할 수 있고, 세포가 융합매개체에 매우 짧은 시간(μ sec 범위) 노출된다는 장점이 있다²³.

한편, 작성된 핵이식 수정란의 체외배양에 있어 문제가 되는 8-cell block의 극복과 후기배로의 분할율을 높이기 위해 난관과 유사한 특수한 환경의 설정이 핵이식 수정란의 발육에 필수불가결한 요소로 알려져 있다^{24,25}. 이에 난관과 유사한 환경의 설정을 위해 난관상피세포(bovine oviduct epithelial cell; BOEC)와의 공배양과 단순합성배지(synthetic oviduct fluid; SOF)에서의 체외배양이 다른 배양조건에 비하여 우수한 결과를 보이는 등 다양한 연구결과가 제시되어지고 있다^{26,27}.

이상에서와 같이 미세조작에 의한 소 핵이식 수정란에 관한 많은 연구를 기초로 하여, 저자들은 핵-세포질 융합시 다양한 DC 전압과 소 핵이식 수정란의 작성시 세포질 성숙시간에 따른 세포융합률 및 체외발육률을 비교하여 체외수정유래 소 핵이식란의 후기배 발달의 최적조건을 찾아 핵이식 수정란 분야의 응용범위를 확대코저 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

체외성숙 : 도축장에서 난소를 채취한 후 100 IU/ml의 penicillin과 100 μ g/ml의 streptomycin이 첨가된 38 $^{\circ}$ C의 생리식염수가 들어 있는 보온병에 넣어 2시간

내에 실험실로 운반 하였다. 주사침(18 gauge)이 연결된 10ml의 주사기로 5% fetal calf serum(Gibco laboratories, USA; 이하 FCS로 약함)이 첨가된 tissue culture medium 199(Gibco laboratories, USA; 이하 TCM 199으로 약함)을 2ml정도 흡인한 다음 직경 3-5mm의 소 난포로부터 난자를 채취하였다. 회수된 난포란은 Wiemer et al²⁸의 기준에 준해 난구세포가 치밀하게 부착되고 세포질이 균질한 것만을 선별하여 사용하였다. 배양액은 10% FCS 첨가 TCM 199이 분주되어 있는 4-well dish(Nunc, USA)의 각각의 well에 10ng/ml의 epidermal growth factor(Boehringer Mannheim, Germany; 이하 EGF로 약함)와 성숙난포로부터 채취된 과립막 세포를 세정하여 5.0×10^6 개/ml의 농도로 첨가하여 사용하였다. 이후 각 well당 15개씩의 난자를 넣어 공기 및 습도가 포화상태인 39 $^{\circ}$ C, CO₂ 배양기내에서 20-24시간 배양하였다.

체외수정 : 정액은 straw당 4×10^7 개의 정자가 들어 있는 동결정액을 사용하였으며 기본배양액은 modified Tyrode-medium²⁹(이하 TALP로 약함)을 사용하였다. 난자의 성숙배양 개시 22시간 후 체외수정을 위해 동결정액을 38 $^{\circ}$ C 수조에 30초간 침지하여 진탕용해시킨 후 현미경하에서 운동성을 확인하였다. 준비된 10개의 round bottom plastic tube(Falcon, USA; 11 \times 55mm)에 1ml의 정자수정능력획득용 배지(sperm-TALP)를 넣고 0.2ml씩의 정자를 첨가하여 CO₂ 배양기내에서 1시간 정지하였다(swim-up 과정). 그 후 정자의 상층액 0.8ml를 pasteur pipette으로 흡입하여 하나의 원심관에 모으고 세정을 위해 2회 원심분리(500g, 10min)하여 동결보호제 및 희석액을 제거하고 생존성 있는 활력정자를 선별하였다. 수정능획득은 원심관에 들어있는 정자를 농도가 1×10^6 개/ml 되도록 조정후 heparin(Gibco laboratories, USA; 200 μ g/ml)을 포함한 sperm-TALP를 동량 첨가하여 CO₂ 배양기에 15분간 배양함으로써 유도하였다. 한편 정자를 swim-up시키는 동안 성숙난자는 세정과정을 통하여 패대된 난구세포 1/3정도를 벗겨낸 후 light white oil(mineral oil; Sigma, USA)이 도포된 35mm petridish(Costar, USA)내의 수정용-TALP 40 μ l drop에 5 μ l의 배지와 함께 각각 5개씩 주입하였다. 체외수정은 준비된 난자의 dorpe에 heparin 처리 후 동량의 sperm-TALP를 혼합한 다음 5 μ l의 배지로 정자를 최종농도가 2.5×10^6 개/ml 가 되도록 첨가하여 CO₂ 배양기내에서 18시간 배양하여 실시하였다.

분할란의 체외배양 : 초기황체기 소 난관의 여분 결체질을 제거한 후 5% FCS 첨가 TCM 199으로 관류시켜

난관상피세포를 채취하였다. 난관상피세포는 5% FCS 첨가 TCM 199으로 3회 원심분리(700 g, 5min)하여 세정한 후 10% FCS 첨가 TCM 199 0.5ml씩이 분주된 24-well dish에 3일간 배양하여 난관상피세포의 monolayer를 작성하였다. 형성된 monolayer는 수정란과 함께 배양하기 3시간 이전에 배양액을 교환하여 부유하고 있는 잔존피사세포들을 제거하고 평형시켰다. 초기배(4-, 8-세포기 이상)는 monolayer가 형성된 dish에 각 well당 12-15개씩을 넣어 co-culture를 실시하였다.

수핵난자의 준비 및 미세조작 : 수핵난자로 준비된 metaphase II 단계의 체외성숙난자(성숙 22시간후)는 0.1% hyaluronidase(Sigma, USA)가 첨가된 PBS(+) (Gibco laboratories, USA) 2ml가 분주된 35mm petridish에서 mouth pipetting을 실시하여 난구세포를 완전히 벗겨낸 후 제1극체가 보이는 것만을 선별하여 실험에 사용하였다. 미세조작은 differential interference contrast(DIC)가 장착된 도립현미경(Leitz, Germany; $\times 250$)하에서 실시하였다. 수핵란은 탈핵을 용이하게 하기 위하여 미리 투명대의 10-20% 정도를 절개하고 미세조작시의 손상을 최소화하기 위해 절개 후 7.5 μ g/ml의 cytochalasin B(Sigma, USA)가 함유된 PBS(-) 20 μ l의 미소적내에서 20분간 전배양시켰다. 전배양 후 외경 20-30 μ m의 탈핵용 pipette을 사용하여 수핵란의 절개되어진 투명대를 관통하여 제1극체와 metaphase chromosome을 한꺼번에 karyoplast 형태로 흡입, 제거하였다. 수핵란은 탈핵을 마친 후 세정과정을 거쳐 10% FCS 첨가 TCM 199이 분주된 4-well dish에 옮기고 CO₂ 배양기내에서 8-10, 혹은 18-20시간 동안 배양하여 수핵난자의 활성화를 유도하였다.

공핵수정란의 준비 및 미세조작 : 탈핵된 수핵란의 배양 8-18시간 후, 16-32세포기의 체외수정유래 공핵란을 0.5%의 pronase(Sigma, USA)가 첨가된 PBS(-)내에서 1분동안 처리하였다. 할구간의 decompaction을 위해 Ca²⁺와 Mg²⁺가 첨가되지 않은 PBS(-) 2ml가 분주된 35mm petridish로 옮겨 할구를 완전히 분리한 후 준비된 수핵난자가 들어있는 35mm petridish내의 미소적으로 옮겨 근접시켜 놓았다. 핵이식은 공핵수정란의 할구를 외경 30 μ m의 주입용 pipette 내로 흡입하여 탈핵된 수정란의 절개된 투명대를 관통하여 주란강에 주입함으로 실시하였다.

전기융합 : 핵이식란은 light white oil이 도포된 60 mm petridish의 PBS(+) 20 μ l의 융합 미소적내로 옮겨 agglutination plane과 전류통전 방향이 수직이 되도록 alignment를 형성시켰다. 전기적 세포융합은 각각 DC 0.75, 1.0, 1.5 및 2.0 kV/cm에서 100 μ sec의 조건으로

실시하였으며, 1회 통전하여 세포융합을 유도하였다. 통전 1시간 후에 현미경하에서 검사하여 세포융합 여부를 판정하였다.

핵이식 수정란의 배양 : 핵이식 수정란은 과일막세포, BOEC와의 co-culture 및 SOF에서 배양을 실시하여 후기배로의 발육을 유도하였다. 과일막세포 및 BOEC와의 co-culture는 난자의 체외성숙 및 분할란의 체외배양시와 동일하게 실시하였으며 SOF에서의 배양은 수정란을 세정용 SOF에서 3회 세정한 후 배양용 SOF가 0.5ml씩 분주된 24-well dish에서 실시하였다. 각각의 실험군은 수정란을 공히 well당 10-15개씩 첨가하였으며 수정 후 5, 7일째에 후기배로의 발육률을 조사하였다.

통계학적 분석 : 실험결과와 통계학적 유의성 검정은 χ^2 -test를 이용하여 실시하였다.

결 과

소의 체외수정유래의 16-32 세포기 수정란의 할구를 탈핵된 체외성숙난자에 이식하여 핵이식란의 작성시 전기적 세포융합률과 후기배로의 발육률, 세포질의 성숙시간에 따른 융합률 및 체외발육률 등을 조사하여 얻은 결과는 다음과 같다.

핵이식 수정란의 전기적 세포융합률 : 탈핵된 체외성숙난자(성숙 22시간 후)를 수핵란으로 사용하여 체외수정유래의 16-32 세포기 수정란의 할구를 이식후 100 μ sec 동안 DC 0.75, 1.0, 1.5 및 2.0 kV/cm로 통전하였을 때의 세포융합률은 Table 1과 같다.

Table 1. The fusion rates of nuclear transplant embryos with various DC voltage

DC voltage (kV/cm)	No of embryos examined	No(%) of embryos fused	No(%) of embryos lysed
0.75	90	50(55.6) ^a	8(8.9)
1.0	100	72(72.0) ^b	10(10.0)
1.5	90	66(73.3) ^b	10(11.1)
2.0	96	76(79.2) ^b	14(14.6)

Prior to fusion, oocytes were mechanically aligned. Immediately, a single DC pulse for 100 μ sec followed. a, b: Different superscripts denote significant differences(P<0.05).

핵이식 수정란의 전기적 세포융합률은 100 μ sec 동안 1회 통전되었을 경우, DC 1.0 kV/cm 처리군(72.0%)과 DC 1.5 kV/cm 처리군(73.3%) 및 DC 2.0 kV/cm 처리군(79.2%)에서 DC 0.75 kV/cm 처리군(55.6%)보다 유의성있게 높은 결과를 나타내었다($P < 0.05$). 전기자극에 의한 세포원형질막의 손상률은 DC voltage가 0.75, 1.0, 1.5 및 2.0 kV/cm에서 각각 8.9, 10.0, 11.1 및 14.6%를 나타내어 여러 통전군간의 유의차는 인정되지 않았다.

핵이식 수정란의 체외발육률 : 핵이식 수정란의 전기적 세포융합조건을 100 μ sec 동안 DC 1.5 kV/cm의 조건으로 하고 융합된 난을 과립막세포와 난관상피세포와의 co-culture 및 SOF에서의 체외배양법을 통하여 배양한 결과는 Table 2와 같다.

전기적 세포융합이 이루어진 난을 과립막세포 monolayer와 공배양한 군에서의 분할율은 48.1%, 난관상피세포 monolayer와 공배양한 군에서의 분할율은 55.4% 그리고 SOF에서 체외배양한 군의 분할율은 42.6%로 나타나 융합된 핵이식란의 체외배양방법에 따른

분할율은 통계적인 유의차를 보이지 않았으며 상실배, 배반포로의 분할율은 각각 1.9%, 5.3% 및 1.9%로 나타났다.

수핵란의 age에 따른 전기적 세포융합률과 분할율 : Activation competence를 유도하기 위하여 체외성숙 22시간 후에 투명대절개와 탈핵을 실시하고 TCM 199 배양액에서 과립막세포와 함께 8-10 또는 18-20시간 배양을 실시하였다. 이후 1.5 kV/cm를 100 μ sec 동안 통전하여 전기적융합을 실시하였을 때의 세포융합률과 융합된 핵이식란을 난관상피세포 monolayer가 형성된 TCM199에서 체외배양하였을 경우의 분할율은 Table 3과 같다.

체외성숙 22시간에 탈핵을 실시하고 30시간에 핵이식을 실시한 군의 분할율은 36.9%, 체외성숙 22시간에 탈핵을 실시하고 40시간에 핵이식을 실시한 군의 분할율을 44.1%로 나타나 세포질 성숙시간을 체외성숙후 40시간을 준 군에서 약간 높은 분할율을 나타내는 경향이 있으나 서로간의 통계적인 유의차는 인정되지 않았다.

Table 2. Development of nuclear transplant embryos with three types of *in vitro* culture

Type of* culture system	No of** fused embryos	No of nuclear transplant embryos developed to					
		2	4	8	16	Mo/BL***	Total(%)
Gr	104	4	12	22	10	2	50(48.1)
BOEC	112	2	6	32	16	6	62(55.4)
SOF	104	6	12	20	6	2	46(42.6)

* Gr : granulosa cell monolayer
BOEC : bovine oviduct epithelial cell monolayer
SOF : synthetic oviduct fluid.

** Membrane fusion was induced by exposing the blastomere-oocyte complex to a 1.5 kV/cm of DC pulse for 100 μ sec.

*** Mo : morulae, BL : blastocyst

Table 3. The fusion rates and *in vitro* development of nuclear transplant embryos with recipient cytoplasm of different ages

Oocyte age(h)*		No of embryos fused/examined(%)	No of nuclear transplant embryos developed to					
En	NT		2	4	8	16	Mo/BL**	Total(%)
22	30	66/92(71.7)	2	6	14	10	2	34(36.9)
22	40	88/118(74.6)	2	8	24	14	4	52(44.1)

* En : enucleation, NT : nuclear transplantation

** Mo/BL : morulae/blastocyst

고 찰

포유동물의 핵이식에 관한 연구는 마우스^{8,19}, 토끼³⁰, 31, 면양^{32,33}, 돼지³⁴ 및 소^{9,10,16,17,35} 등에서 보고되었다. 소에서의 핵이식시 사용되는 수핵란의 인공적 활성화 연구와 더불어 정상적인 체외성숙시간을 24시간으로 했을 때 배양시간을 더 길게 하여 수핵란자의 세포질 활성화를 얻게 하는 방법이 보고되었으며^{15,16,17}, 16-32세포기의 수정란을 공핵란으로 이용하여 핵이식을 실시한 후 전기적 세포융합법에 의한 많은 성공예가 보고되었다^{10,34,36,37}. 전기적 세포융합시 사용되는 전압의 범위와 통전시간이 소 핵이식란의 작성시 중요한 요인으로 작용되어 그 정도에 따른 연구도 또한 보고되었다^{10,37}.

전압의 범위를 달리하여 비교 실험한 결과 0.75, 1.0, 1.5 및 2.0 kV/cm로 조정하였을 때 그 세포융합률이 각각 55.6, 72.0, 73.3 및 79.2%로 나타나 1.0-2.5 kV/cm에서 45~80%로 나타난 Van Stekelenbrigg-Hamers et al³⁸의 보고와 유사한 결과를 나타내었다. 그러나 전기적 세포융합후 세포원형질막이 손상된 비율이 20% 정도로 보고된 것에 비해 본 실험에서는 8.9-14.6%로 낮게 나타났다. 그 이유는 사용되는 융합배지(fusion medium)를 Zimmerman cell fusion medium이나 F 300을 사용한 것에 비해 PBS(+)를 사용한 것때문인 것으로 사료된다.

한편 작성된 핵이식란을 체내배양이나 체내배양조건과 가장 유사한 조건으로 조절하여 후기배로의 분화에 결정적인 영향을 미치는 8-16 cell block을 극복하기 위한 보고와 함께 난관상피세포와 과립막세포와의 공배양 및 SOF의 이용이 연구되어 왔다^{18,39,40,41}. 이에 전기적 세포융합이 성공적으로 이루어진 핵이식란들을 과립막세포와 난관상피세포와의 공배양 및 SOF에서 배양한 결과 각각의 분할율이 48.1, 55.4 및 42.6%로 나타나 개체 분할율을 30-40% 정도로 보고한 Yang et al¹⁸의 보고와 유사하였으나, 상실배와 배반포기로의 분할율이 7-11%로 나타난 성적에 비해서 본 연구에서는 3-5%정도로 낮게 나타났다. 이 결과는 미세조작에 소요된 시간 및 사용된 체외배양유래의 공핵란의 세포주기가 동기화되는 수준이 적당하지 못했거나 activation competence가 충분하지 못했던 것으로 사료된다.

수핵란자의 activation competence는 핵이식에 있어서 분할율에 많은 영향을 미치며¹⁷ 체외배양시기가 증가하면 할수록 activation competence가 증가한다고 보고하였다⁴². 이와 유사한 결과를 유도하기 위하여 인위적으로 ethanol이나 전기적 자극을 통한 방법들이 연구되고 있다. 본 실험에서는 체외성숙 22시간에 탈핵을

실시한 후 난자 활성화를 유도하기 위하여 8-10시간 및 18-20시간 더 배양을 실시하여 난관상피세포와 함께 배양한 결과 분할율이 36.9%와 44.1%로 나타나서 51-57% 분할율을 나타낸 Yang et al¹⁷의 결과와도 유사하게 나타났으며 Stice와 Keefer⁴³의 결과와도 유사하게 나타났다. 그러나 탈핵후 체외배양기간에 따른 유의차는 인정되지 않았다.

이상에서의 결과로 미루어 보아 소 핵이식 수정란의 체외배양시 더 많은 수의 분할란을 얻기 위해서는 미세조작과정, activation competence, 전기적 세포융합조건, 핵이식 수핵란의 체외배양에 대한 다양한 연구가 더 이루어져야 하며 이를 바탕으로 차후 핵이식 복제수정란의 수정란이식을 통한 복제동물의 대량생산방안에 대한 심도 깊은 연구가 더 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결 론

핵이식 수정란의 세포질과 핵의 적당한 융합조건, 핵이식 수정란을 체외배양시에 발육률을 증진시킬 수 있는 조건을 조사하고 탈핵시킨 수정란의 체외배양(8-18시간) 후 핵이식을 실시하여 체외발육률을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 핵이식 수정란의 전기적 세포융합시 세포융합율은 100 μ sec동안 1회 통전하였을 경우 DC 1.0 kV/cm 처리군(72.0%)과 DC 1.5 kV/cm 처리군(73.3%) 및 DC 2.0 kV/cm(79.2%)에서 DC 0.75 kV/cm 처리군(55.6%)보다 유의적으로 높게 나타났다($P < 0.05$). 전기자극에 의한 세포원형질막의 손상은 다양한 통전군에 따른 유의적 차이를 보이지 않았다.

2. 핵이식 수정란의 전기적 세포융합을 100 μ sec동안 DC 1.5 kV/cm의 조건으로 하여 융합된 난을 과립막세포와 난관상피세포와의 공배양 및 단순합성배지(SOF)에서의 체외배양시 분할율은 각각 48.1%, 55.4% 그리고 42.6%를 나타내어 체외배양방법간의 차이에 따른 분할율은 유의성이 인정되지 않았다.

3. 핵이식 수정란의 작성시 수핵란의 세포질 성숙도에 따른 융합률 및 체외발육률은 30시간 체외성숙시켰을 경우 71.7%와 36.9%로, 40시간 체외성숙시켰을 경우 74.6%와 44.1%로 나타나 성숙시간 차이에 따른 유의적 차이는 없었다.

참 고 문 헌

1. McLaren A. Methods and success of nuclear transplantation in mammals. *Nature* 1984; 21: 671-672.
2. Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE, et al. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 1985; 315: 680-683.
3. Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CF Jr, et al. Genetic engineering of mammalian embryos. *J Anim Sci* 1986; 63: 269-278.
4. Herr CM, Reed KC. Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. *Theriogenology* 1991; 35: 45-54.
5. Wilmut I, Hooper ML, Simons JP. Genetic manipulation of mammals and its application in reproductive biology. *J Reprod Fert* 1991; 92: 245-279.
6. Yang X, Anderson GB. Micromanipulation of mammalian embryos: Principles, progress and future possibilities. *Theriogenology* 1992; 38: 315-335.
7. Briggs R, King TJ. Transplantation of living nuclei from blastula cell into enucleated frog eggs. *Proc Natn Acad Sci U.S.A.* 1952; 38: 455.
8. Illmense K, Hoppe PC. Nuclear transplantation in *Mus musculus*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell* 1981; 23: 9-18.
9. Prather RS, Barnes FL, Sims MM, et al. Nuclear transplantation in the bovine embryo. Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol Reprod* 1987; 37: 859-866.
10. Bondioli KE, Westhusin ME, Looney CR. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenology* 1990; 33: 165-174.
11. Stice SL, Keefer CL, Maki-Laurila M, et al. Producing multiple generations of bovine nuclear transplanted embryos. *Theriogenology* 1991; 35: 273.
12. Willadsen SM, Janzen RE, Mcalister RJ, et al. The viability of late morula and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. *Theriogenology* 1991; 35: 161.
13. Barnes FL, Looney CR, Westhusin ME. Embryo cloning in cattle: The current state of technology. *Embryo Transfer*(Shering) 1991; 6: 1-5.
14. Clement-Sengewald A, Palma GA, Berg U, et al. Comparison between *in vitro* produced and *in vivo* flushed embryos for cloning experiments in cattle. *Theriogenology* 1992; 37: 196(abstract).
15. Nagai T. Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes *in vitro* with ethanol. *Gamete Res* 1987; 16: 243-249.
16. Ware CB, Barnes FL, Meike-Laurila M, et al. Age dependence of bovine oocyte activation. *Gamete Res* 1989; 22: 265-275.
17. Yang X, Jiang S, Kovacs A, et al. Age dependent activation enucleation and nuclear transfer of bovine oocytes matured *in vitro* and *in vivo*. *Biol Reprod* 1991; 44(suppl 1): 141(abst).
18. Yang X, Jiang S, Foote RH. Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. *Mol Reprod Dev* 1993; 34: 94-100.
19. McGrath J, Solter D. Nuclear transplantation in mouse embryos by microsurgery and cell fusion. *Science* 1983; 220: 1300-1302.
20. Eglitis MA. Formation of tetraploid mouse blastocysts following blastomere fusion with polyethylene glycol. *J Exp Zool.* 1980; 213: 309-313.
21. Spindle A. Polyethylene glycol-induced fusion of two-cell mouse embryo blastomeres. *Exp Cell Res* 1981; 131: 465-470.
22. Zimmermann U, Vienken J. Electric field-induced cell-to-cell fusion. *J Membr Biol* 1982; 67: 165-182.
23. Kubiak JZ, Tarkowski AK. Electrofusion of mouse blastomeres. *Exp Cell Res* 1985; 157: 561-566.
24. Eyestone WH, Vignieri J, First NL. Co-culture of early bovine embryos with oviductal epithelium. *Theriogenology* 1987; 27: 228.
25. Babister BD. Role of oviductal secretions in embryonic growth *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology* 1988; 29: 143-154.
26. Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LEA. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J Reprod Fert* 1972; 30: 493-497.
27. Fukui Y, McGowan LT, James RW, et al. Factors

- affecting the *in-vitro* development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J Reprod Fert* 1991; 92: 125-131.
28. Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, et al. Effect of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol Reprod* 1991; 30: 330-338.
 29. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA, et al. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod*. 1988; 38: 1171-1180.
 30. Stice SL, Robl JM. Nuclear programming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod* 1988; 39: 657-664.
 31. Collas P, Robl JM. Development of rabbit nuclear transplant embryos from morula and blastocyst stage donor nuclei. *Theriogenology* 1991; 35: 190(abstract).
 32. Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 1986; 321: 63-65.
 33. Smith LC, Wilmut I. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development *in vivo* of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol Reprod* 1989; 40: 1027-1035.
 34. Prather RS, Sims M, First NL. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol Reprod* 1989; 41: 414-418.
 35. Kubiak JZ. Mouse oocytes gradually develop the capacity for activation during the metaphase II arrest. *Dev Biol* 1989; 136: 537-545.
 36. Robl JM, Prather R, Barners F, et al. Nuclear transplantation in bovine embryos. *J Anim Sci* 1987; 64: 642-647.
 37. Westhusin ME, Pryor JH, Bondioli KR. Nuclear transfer in the bovine embryo: A comparison of 5-day, 6-day, frozen-thawed, and nuclear transfer donor embryos. *Mol Reprod Dev* 1991; 28: 119-133.
 38. Van Stekelenbrug-Hamers, wouter G. Van Inzer, Tanja AE, et al. Nuclear Transfer and Electrofusion in Bovine *In Vitro*-Matured/*In Vitro*-Fertilized Embryos: Effect of Media and Electrical Fusion Parameters. *Mol Reprod Dev* 1993; 36: 307-312.
 39. Eyestone WH, First NL. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J Reprod Fert* 1989; 85: 715-720.
 40. Ellington JE, Carney EW, Farrell PB, et al. Bovine 1-2-cell embryo development of nuclear transplant embryos. *Biol Reprod* 1990; 43: 97-104.
 41. Fukuda Y, Ichikawa M, Naito K, et al. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized and cultured with cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. *Biol Reprod* 1990; 42: 114-119.
 42. Barnes FL, Collas P, Powell R, et al. Influence of recipient oocyte cell cycle stage on DNA synthesis nuclear envelope breakdown, chromosome constitution, and development in nuclear transfer bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 1993; 36: 33-41.
 43. Stice SL, Keefer CL. Improved developmental rates for bovine nucleus transfer embryos using cold shock activated oocytes. *Biol Reprod* 1992; (suppl)46: 166(abst).