

Nocodazole로 分裂期에 동조된 생쥐 4세포기核 由來 再構築卵의 발생에 관한 연구

權 五 龍 · 河野友宏
東京農業大學 總合研究所

Development of Mouse Embryos Reconstituted with 4-cell Nuclei at Metaphase with Nocodazole

Oh-Yong Kwon and Tomohiro Kono

NODAI Research Institute, Tokyo University of Agriculture, Setagaya-ku, Tokyo 156, Japan

SUMMARY

The present study investigated the effect of treatment with nocodazole on the efficiency of cell cycle synchronization and development of mouse 4-cell embryos. In addition, developmental ability of reconstituted embryos that received nuclei from 4-cell embryos synchronized with nocodazole at M phase was examined *in vitro* and *in vivo*.

(1) When 4-cell blastomeres exposed to culture medium containing 1 μ g/ml nocodazole for 2, 4, 6 and 8 hrs, 40% (40/101), 75% (119/159), 85% (87/102) and 97% (155/160) of nuclei were synchronized at M phase, respectively.

(2) Treated with nocodazole for 4 hrs, the proportion of 4-cell embryos developed to blastocysts (98%, 60/61) was not significantly different from that of the control embryos (98%, 196/201). However, the developmental ability of 4-cell embryos treated for 8 (87%, $P < 0.05$) and 12 hrs (76%, $P < 0.001$) was significantly reduced.

(3) The reconstituted embryos that received a metaphase nuclei from 4-cell embryos, which were synchronized at metaphase with nocodazole for 1, 2 and 4 hrs were developed to blastocysts (21 to 31%), respectively. After transfer to recipients females, total of 21 live young were obtained, which derived from the reconstituted embryos.

These results should live young be produced from reconstituted embryos which received metaphase nuclei synchronized with nocodazole.

(Key words: mouse, metaphase, nocodazole, nuclear transfer)

서 론

최근, clone(클론)동물의 생산 및 genome의 분석을 위해 핵이식 기술을 이용한 연구가 빈번히 사용되고 있는데, 특히, 클론 동물의 생산을 위해서 여러 종류의 embryonic cells을 除核未受精卵에 이

식하는 방법이 가장 많이 이용되고 있다(Briggs와 King, 1952; Collas와 Robl, 1990; Kono 등, 1991; Kono 등, 1992; Cheong 등, 1993; Keefer 등, 1994). 間期(interphase)의 핵을 成熟한 除核未受精卵에 이식하였을 때, 未受精卵은 donor(도나)핵을 再構築(remodeling)할 수 있는 능력을 갖고 있다. 이것은 이식한 도나 핵의 核膜消失(nuclear en-

velope breakdown; NEBD)과 染色體凝縮(premature chromosome condensation; PCC)으로 설명되어지고 있는데(Czolowska 등, 1984; Szollosi 등, 1988; Stice와 Robl, 1988). 이러한 현상은 cyclin과 p34^{cdc2}의 복합체인 成熟促進因子(maturation promoting factor; MPF)에 의해 지배 된다(Kubiak 등, 1993). 재구성 난자를 활성화 처리하였을 경우, 난자는 極體를 방출하며(Kono 등, 1991; Campbell 등, 1996b), 染色體의 脫凝縮후에 핵을 재구성하게 된다(Czolowska 등, 1984; Szollosi 등, 1988; Stice와 Robl, 1988; Prather와 First, 1990). 결과적으로 세포질과 핵사이에서 핵 단백질(nuclear proteins)을 교환함으로써 재구성 난자의 핵의 재구축이 이루어진다(Prather와 First, 1990).

최근까지 진행되어온 여러 종류의 핵이식법은, 도나 핵의 細胞週期에 관계없이 재구성 난자의 정상적인 2배體 생산의 가능성을 提示하고 있다(Kono와 Kwon, 1995; Campbell 등, 1996b). 핵이식법에 의해 생산된 재구성 난자를 個體까지 발생시키기 위해서는 정상적인 2배체의 생산이 필수적이라고 할 수 있는데, 이 분제는 도나 핵과 recipient(레시피엔트) 세포질과의 融合과 활성화처리의 시기로 조절이 가능하다(Kono와 Kwon, 1995). DNA합성을 끝내고 4n의 DNA를 포함하고 있는 G2 또는 M期の 핵을 도나 핵으로 사용하였을 경우, 도나 핵과 레시피엔트 세포질이 융합된 후에 활성화 처리를 함으로서, 활성화된 재구성 난자는 제 2 극체와 같은 형태의 극체를 방출하게 되고, 새롭게 DNA 합성을 한 후에 세포분열을 하게 된다. 한편, DNA합성 前인 G1 또는 S期の 핵을 도나 핵으로 사용하였을 경우에는 도나 핵과 레시피엔트 세포질이 융합하기 전이나 융합과 동시에 활성화처리를 함으로서, 융합 후 재구성 난자는 극체의 방출없이 정상적인 2배체로서 세포분열을 하여 개체로의 발생이 가능한 것이다.

이와 같이, 除核未受精卵에의 핵이식법에는 크게 두 가지의 방법이 이용되고 있는데, 前報에서 보고한 바와 같이 M期の 핵을 이용할 경우에는(Kwon 등, 1996), G1 또는 S期の 핵을 이용하는 경우와 비교해서, 도나 핵의 세포주기의 동조가 용이한 점, 도나 핵의 발생주기가 동일한 경우에는 2배의 재구

성 난자를 생산할 수 있는 장점을 갖고 있다. 그러므로, 현재까지 보고되고 있지 않은 除核未受精卵에의 핵이식법에 의한 클론 생쥐의 생산도 가능할 것으로 생각된다.

본 연구에서는, 생쥐 4세포기를 사용하여 nocodazole (노코다졸) 처리에 의한 M期에의 세포주기 동조법을 검토하였다. 또한, 노코다졸로 처리한 4세포기胚의 M期핵을 除核未受精卵에 이식하여, 재구성 난자의 胚盤胞에의 발생능력을 조사하였고, 胚盤胞에 발생한 胚는 偽妊娠 雌性생쥐에 이식하여 産仔에의 발생능력도 조사하였다.

재료 및 방법

1. 供試卵

成熟한 B6CBF1(C57BL/6j×CBA)系 雌性생쥐에게 5 iu의 eCG (equine chorionic gonadotrophin; Peamex, Sankyo Ltd., Tokyo, Japan)와 hCG (human chorionic gonadotrophin; Puberogen, Sankyo Ltd., Tokyo, Japan)을 48시간 간격으로 腹腔內에 주사하여 過剩排卵을 誘導하였다. 未受精卵은 hCG 투여 14시간후에 卵管膨大部로부터 卵丘細胞에 둘러싸인 未受精卵을 회수하였고, hyaluronidase (300 units/ml)를 함유한 M2液(Quinn 등, 1982)으로 처리하여 卵丘細胞를 제거한 다음, M2液으로 3회 洗淨한 후에 사용하였다. 전핵기란은 hCG투여후 동계통의 雌性생쥐와 수컷시켜 臍檢이 확인된 雌性생쥐로부터, hCG 투여 22~24시간후에 採卵하여 미수정란과 동일한 방법으로 卵丘細胞를 제거하여 사용하였고, 4세포기 난자는 hCG 투여 59~60시간 후에 卵管을 灌流하여 채취하여 본 실험에 공시하였다. 한편, 4세포기 난자의 獲구가 필요한 경우에는, 난자를 酸性 Tyrode액(Nicolson 등, 1975)에 1~2분간 처리하여 투명대를 제거한 다음, 0.25% trypsin EDTA을 함유한 Ca²⁺ free M2액내에서 刮펏하여 獲구를 분리하였고 M2液으로 3회 洗淨한 후에 사용하였다(Stice와 Robl, 1988; Collas와 Robl, 1990).

2. 노코다졸處理

생쥐 4세포기胚 또는 獲구를 유동과라핀오일(Na-

calai Tesque INC., Japan)로 덮여있는 1 μ g/ml의 노코다졸을 함유한 M16小滴내(Whittingham, 1971)로 옮기고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 5% O₂ 및 90% N₂의 탄산가스 배양기내에서 각각 2, 4, 6, 8 및 12시간 동안 배양하였다. 배양 후 각각의 실험 내용에 따라 이하와 같이 처리하였다.

- (1) 노코다졸 처리에 의한 생쥐 난자의 M期에의 동조 효과를 조사하기 위하여, 생쥐 4세포기 胚 유래의 활구는 노코다졸 처리후에 10 μ g/ml의 Hoechst 33342 (Calbiochem-Behring Corp., San Diego, USA)를 함유한 M2액에 10분간 처리한 후, M2액으로 수회 洗淨하였다. 활구를 유동파라핀오일로 덮여있는 M2小滴으로 옮긴 후에 UV 현미경으로 세포 주기를 관찰하였다.
- (2) 생쥐 4세포기 胚의 발생에 미치는 노코다졸의 영향을 조사하기 위하여, 노코다졸 처리 후, 생쥐 4세포기 胚는 M2과 M16액내에서 수회 洗淨한 다음, 前述과 동일한 조건의 탄산가스 배양기내 M16액에서 48시간 배양한 후 胚盤胞에의 발생을 조사하였다.

3. 除核未受精卵의 作出과 핵이식

1) 除核未受精卵의 作出

除核未受精卵의 作出은 前報와 같이 실시하였다 (Kono 등, 1993). 그리고, 모든 현미조작은 0.1 μ g/ml의 colcemid와 5 μ g/ml의 cytochalasin B (CB)을 함유한 M2 小滴내에서 실시하였다. 미수정란을 고정 피펫으로 고정시키고 M II의 紡綉體가 존재하는 부근의 투명대를 절단용 그래스로 10~20%정도 절단하였다. 투명대를 절단한 미수정란은, 흡인 피펫을 절단 부위로 넣어 M II의 紡綉體가 존재하는 부위의 少量의 세포질과 함께 염색체를 제거하여 핵이식의 레시피언트 세포질로서 사용하였다.

4. 핵이식

1) 1차 핵이식

M期 핵이식은 前報와 같이 실시하였다(Kwon

등, 1996). 1 μ g/ml의 노코다졸을 함유한 M16배양액내에서 각각 1, 2 및 4시간 처리하여 M期로 동조된 4세포기 胚는 투명대를 컷팅한 후, colcemid와 CB을 함유한 M2小滴내에서 15분간 처리하였다. 핵이식은 흡인 피펫을 활구의 중심을 향하여 접근시킨 다음, 4세포기 활구의 약 1/3~1/2의 양을 흡인하므로써 핵을 채취하였고, 2,700 HAU/ml의 HVJ (Sendai virus)와 함께 除核未受精卵에 이식하였다. 핵이식을 마친 난자는 M2액으로 洗淨후, 노코다졸을 함유한 M16액내에서 배양하였고, 배양 개시 15분 후에 융합 여부를 확인했다. 재구성 난자는 융합 4시간후에 세포융합장치(Sankei Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 활성화 처리를 하였다. 즉, 재구성 난자를 0.3mM의 mannitol액으로 洗淨한 후에, mannitol액으로 가득 차 있는 1mm폭의 chamber내로 옮긴 후, 1.5kV/cm의 직류(direct current; DC) pulse를 100 μ sec동안 6회 부여했다. 또한, 최초의 전기자극을 부여 후, 20 및 40분 후에도 50 μ sec의 전기자극을 2회씩 부여했다. 이러한 수차에 걸친 전기자극은 활성화율과 그 후의 발생율을 향상시킨다(Collas 등, 1993). 활성화 처리한 재구축난은, 5 μ g/ml의 CB을 함유한 M16액내에서 배양함으로써 극체의 방출을 저지하여, 2개의 전핵(pronuclei-like nuclei)를 형성시켰다.

2) 2차 핵이식

활성화 처리 6시간 후에 2개의 전핵을 형성한 재구축난로부터, 2개의 전핵을 준비해 놓은 除核前核期卵에 HVJ (Sendai virus)와 함께 한개씩 이식하였다. 이러한 2차 핵이식법은 재구성 난자의 발생능력을 향상시킨다(Kwon 등, 1996).

3) 체외배양 및 胚이식

노코다졸의 처리에 의해 M期로 동조시킨 생쥐 4세포기 胚 유래의 핵을, 1차 및 2차 핵이식법에 의해 얻은 재구축난은 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 5% O₂ 및 90% N₂의 탄산가스 배양기내에서 3일간 배양하여 胚盤胞에의 발생을 조사하였고, 胚盤胞에 발생한 胚는 偽妊娠 3일째의 雌性생쥐에 이식하여 産仔에의 발생능력도 조사하였다.

4. 통계처리

본 실험에 얻어진 결과는, χ^2 檢定法에 의해 有意差의 검정을 실시하였다.

결 과

1. 노코다졸의 처리에 의한 생쥐 4세포기胚의 M期에의 동조 효과

노코다졸의 처리에 의한 M期에의 동조 효과는 Table 1에서 보는 바와 같았다. 생쥐 4세포기胚의 핵구를 노코다졸에 2시간 동안 처리한 경우, inter-phase(間期), prophase(分裂前期), metaphase(分裂期)의 비율은 각각 54%(55/101), 6%(6/101) 및 40%(40/101)를 나타내었다. 한편, 노코다졸에 4, 6 및 8시간의 처리하였을 경우, 分裂期로 동조된 비율은 각각 75%(119/159), 85%(87/102) 및 97%(155/160)을 나타내어, 노코다졸에의 처리시간을 연장함으로써 분열기에의 동조율을 높일 수 있었다.

2. 노코다졸의 처리가 생쥐 4세포기胚의 발생에 미치는 영향

노코다졸의 처리가 생쥐 4세포기胚의 발생에 미치는 영향을 Table 2에 제시하였다. 1 μ g/ml의 노코다졸에 생쥐 4세포기胚를 4시간 처리하여 胚盤胞로의 발생을 조사해 본 결과, 98%(60/61)가 胚盤胞로 발생하였는데, 이것은 대조구의 98%(196/201)와 대등한 발생율이였다. 한편, 노코다졸에의 처리 시간을 8 및 12시간으로 연장한 경우, 胚盤胞로의 발생율은 각각 87%(60/69) 및 76%(47/62)을 나타내어, 4시간 처리한 경우와 비교해서 有意하게 낮은 ($P < 0.05$ 및 $P < 0.001$) 발생율을 나타내었다.

3. 노코다졸 처리로 M期에 동조시킨 생쥐 4세포기胚의 핵이식

노코다졸 처리로 M期에 동조시킨 생쥐 4세포기胚를 이용한 핵이식 성적은 Table 3에서 보는 바와 같다. 노코다졸에 1, 2 및 4시간 처리하여 M期로 동

Table 1. Effect on developmental ability of mouse 4-cell embryos treated with nocodazole

| Treatment | Hours of reatment | No. of eggs used | No. of eggs developed to(%) | | |
|------------------------------|-------------------|------------------|-----------------------------|---------|----------------------|
| | | | 8-cell | Morula | Blastocyst |
| Control | - | 201 | 198(99) | 198(99) | 196(98) |
| Nocodazole (1 μ g/ml) | 4 | 61 | 61 (100) | 60 (88) | 60 (98) |
| | 8 | 69 | 67 (97) | 61 (98) | 60 (87) ^a |
| | 12 | 62 | 56 (90) | 48 (77) | 47 (76) ^b |

* Differ significantly (a: $P < 0.05$ and b: $P < 0.001$)

Table 2. *In vitro* and *in vivo* development of reconstituted mouse embryos

| Treatement with nocodazole (hours) | No. of eggs examined | | No. of reconstituted embryos developed to(%) | | No pregnant /No. of recipients | No. of live young (%) |
|------------------------------------|----------------------|----------|--|------------|--------------------------------|-----------------------|
| | 1st NT* | 2nd NT** | 2-cell | Blastocyst | | |
| 1 | 48 | 71 | 69(97) | 15(21) | 2/2 | 4(27) |
| 2 | 83 | 140 | 136(97) | 43(31) | 7/7 | 11(26) |
| 4 | 66 | 111 | 108(97) | 26(23) | 4/5 | 6(26) |

* Nuclear transferred eggs formed two pronuclei with cytocharasine B.

** After first NT, each nuclei was transferred into enucleated fertilized zygotes obtained from superovurated mated females.

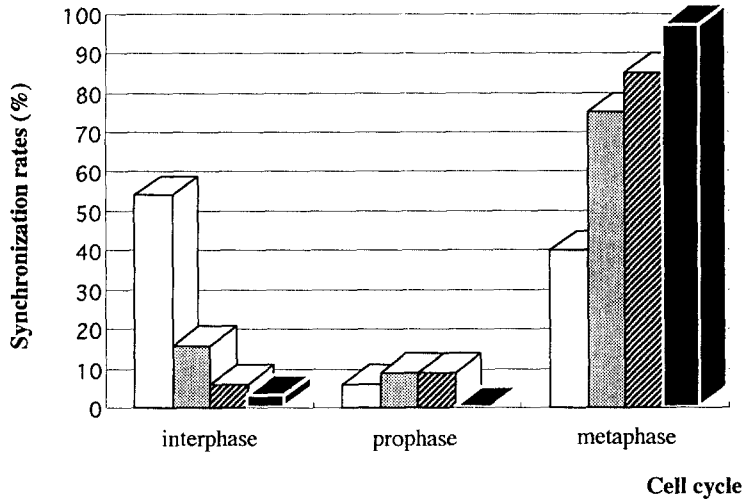


Fig. 1. Synchronization of cell cycle at M phase with nocodazole.

* The blastomeres of mouse 4-cell embryos were exposed to $1\mu\text{g/ml}$ nocodazole for 2(□), 4(▤), 6(▥) and 8(■) hours.

조된 생쥐 4세포기태를 1차 및 2차 핵이식에 의해 재구축란을 체외배양한 결과, 각각 21%(15/71), 31%(43/140) 및 23%(26/111)의 재구축란이 胚盤胞로 발생하였다. 한편, 胚盤胞로 발생한 재구축란을 偽妊娠 3일째의 雌性생쥐에 이식한 결과, 총 14首 중 13首가 임신하였고, 각각 27%(4/15), 26%(11/43) 및 26%(6/26)의 産仔를 생산하였다.

고 찰

본 실험은 생쥐 4세포기태를 사용하여 노코다졸에 의한 M期로의 세포주기 동조 효과와 毒性을 조사하였고, 또한 핵이식 실험에의 이용 가능성을 검토하였다. 이 실험에서 저농도의 노코다졸 ($1\mu\text{g/ml}$) 처리에 의해서 생쥐 난자의 발생에는 영향을 미치지 않고 세포주기 동조 효과를 얻을 수 있었으며, 또한, 도나 핵의 세포주기를 노코다졸 처리에 의해 M期로 동조시켜 핵이식 실험에 충분히 이용 가능성이 示唆되었다.

도나 핵과 레시피언트 세포질과의 관계가 매우 중요하다는 것은 여러 보고서에서 확인할 수 있다 (Smith 등, 1988; Smith 등, 1990). 최근에는, 이러한 핵이식 실험에 의해서 핵이식 난자의 발생에 영

향을 미치는 도나 핵과 레시피언트 세포질과의 세포주기 관계가 밝혀지고 있으며, G1/S期, G2/M期의 모든 세포주기에서 産仔의 생산에 성공하였다 (Bondioli 등, 1990; Collas와 Robl, 1990; Campbell 등, 1994; Stice 등, 1994; Kono 등, 1991; Kwon 등, 1996). 한편, 도나 핵을 G1期の 免胚를 사용한 제핵미수정난에의 핵이식법이 그 이외의 세포주기의 도나 핵을 사용하는 경우와 비교해서, 특히 높은 발생율을 얻을 수 있다고 보고하였다 (Collas와 Robl, 1991). 정 등 (Cheong 등, 1993)도 생쥐 2, 4 및 8세포기 태의 G1期핵을 이식한 경우에도 동일한 결과를 얻을 수 있었다고 보고하였지만, 생쥐 2세포기 태 이후의 도나 핵을 사용하여 동일한 방법으로 핵이식을 실시해 보았으나 재현이 불가능하였다. 생쥐 난자에 있어서 세포주기를 G1期로 동조하는 것은 매우 어려운데, 그 이유는, 첫째로 G1期가 단기간이라는 것과, 둘째로는 도나 핵을 G1期에 동조하기 위해 사용되는 DNA합성 障害劑 aphidicolin에 처리하여도, 분열기를 마친 난자가 30분부터 1시간 이내에 DNA합성이 개시됨이 확인되었기 때문이다 (Kono와 Kwon, 1995).

본 실험에서, 생쥐 난자의 발생에는 영향을 미치지 않고 세포주기를 M期로 동조시킬 수 있는 방법

이 개발되었으며, 핵이식 실험에도 이용 가능성이 示唆되었다. 최근까지, 소나(Bondioli 등, 1990) 양(Campbell 등, 1996a) 등에서는 크론동물이 생산되었지만, 생쥐에서는 그 예가 없다. 그 이유로는, 클론동물이 생산이 가능했던 동물보다도 全能性(totipotency)의 손실이 빠른 시기에 일어나는점, 체외배양계가 완벽하지 못하다는 점 등을 들 수 있다. 소에 있어서도 全能性이 손실된다고 생각되어 온 8세포기胚 이후의 도나 핵으로부터 産子의 생산이 가능했던 것을 비추어 볼 때, 前述과 같은 문제를 하나씩 해결함으로써 클론생쥐도 가능할 것으로 생각된다. 최근, 당 연구실에서는 생쥐 4세포기胚의 M期의 핵을 제핵미수정난에 이식함으로써, 1개의 도나 난자로부터 여덟쌍의 재구성란을 作出하여, 여섯마리의 클론 생쥐를 생산 하였으며, 앞으로 발생유전학적인 연구에 많은 응용이 가능할 것으로 생각된다.

적 요

본 연구에서는, 생쥐 4세포기胚를 사용하여 노코다줄 처리에 의한 M期에의 세포주기 동조범을 검토하였다. 또한, 노코다줄로 처리한 4세포기胚의 M期 핵을 除核未受精卵에 이식하여, 재구성란의 胚盤胞에의 발생능력을 조사하였고, 胚盤胞에 발생한 胚는 偽妊娠 雌性생쥐에 이식하여 産仔에의 발생능력도 조사하였다.

1. 생쥐 4세포기胚 유래의 활구를 노코다줄에 각각 4, 6 및 8시간 처리하였을 경우, 分裂期로 동조된 비율은 각각 75%(119/159), 85%(87/102) 및 97%(155/160)을 나타내었다.
2. 생쥐 4세포기胚를 노코다줄에 4시간 처리하여 胚盤胞로의 발생능력을 조사해 본 결과, 98%(60/61)가 胚盤胞로 발생하였는데, 이것은 대조구의 98%(196/201)와 동등한 발생율이었다. 한편, 노코다줄의 처리시간을 8 및 12시간으로 연장한 결과, 발생능력은 有意하게 저하되었다($P < 0.05$ 및 $P < 0.001$).
3. 생쥐 4세포기胚를 노코다줄에 1, 2 및 4시간 처리하여 1차 및 2차 핵이식에 의해 재구성된 난자의 胚盤胞 발생율은 21~31%였고, 胚盤胞

로 발생한 재구성란을 偽妊娠 3일째의 雌性생쥐에 이식한 결과, 총 21首의 産仔를 생산하였다.

이 결과, 노코다줄을 이용하여 세포주기를 분열기로 동조시킨 핵의 이식에 의해 재구성된 난자로부터 産仔의 생산이 가능성이 示唆되었다.

참고문헌

- Bondioli K, Westhusin M and Looney C. 1990. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenology*, 33:165-174.
- Briggs R and King T. 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs eggs. *Zoology.*, 38:455-463.
- Campbell K, McWhir J, Ritchie W and Wilmot I. 1996a. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature.*, 380:64-66.
- Campbell K, Otaegui P and Wilmot I. 1996b. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Reviews Reprod.*, 1: 40-46.
- Campbell KHS, Loi P, Cappai P and Wilmot I. 1994. Improved development to blastocyst of ovine nuclear transfer embryos reconstructed during the presumptive S-phase of enucleated activated oocytes. *Biol. Reprod.*, 50:1385-1393.
- Cheong HT, Takahashi Y and Kanakawa H. 1993. Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. *Biol Reprod.* 48:958-963.
- Collas P, Fissore R, Robl JM, Sullivan EJ and Barnes FL. 1993. Electrically induced calcium elevation, activation, and parthenogenetic development of bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 34:212-23.
- Collas P and Robl JM. 1990. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in

- the rabbit embryo. *Biol. Reprod.* 43:877-884.
- Collas P and Robl JM. 1991. Relationship between nuclear remodeling and development in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 45:455-465.
- Czolowska R, Molinski J and Tarkowski A. 1984. Behaviour of thymocyte nuclei in non-activated and activated mouse oocytes. *J. Cell Sci.* 69:19-34.
- Keefer C, Stice S and Matthews D. 1994. Bovine inner cell mass cells as donor nuclei in the production of nuclear transfer embryos and calves. *Biol. Reprod.* 50:935-939.
- Kono T and Kwon OY. 1995. Cloning of mammalian embryos by nuclear transfer. 1st East Asian Symposium on Animal Biotechnology. 1:109-116.
- Kono T, Kwon OY and Nakahara T. 1991. Development of enucleated mouse oocytes reconstituted with embryonic nuclei. *J. Reprod. and Fert.* 93:165-172.
- Kono T, Kwon OY, Watanabe T and Nakahara T. 1992. Development of mouse enucleated oocytes receiving a nucleus from different stage of the second cell cycle. *J. Reprod. and Fert.* 94:481-487.
- Kono T, Sotomaru Y, Sato Y and Nakahara T. 1993. Development of androgenetic mouse embryos produced by in vitro fertilization of enucleated oocytes. *Mol. Reprod. and Dev.* 34:43-46.
- Kubiak J, Weber M, Pennart Winston N and Maro B. 1993. The metaphase II arrest in mouse oocytes is controlled through microtubule-dependent destruction of cyclin B in the presence of CSF. *The EMBO Journal.* 12:3773-3778.
- Kwon OY, Kono T and Nakahara T. 1996. Production of live young by serial nuclear transfer with mitotic stage of donor nuclei in mice. In press.
- Nicolson G, Yanagimachi R and Yanagimachi, H. 1975. Ultrastructural localization of lectin-binding sites on the zonae pellucidae and plasma membranes of mammalian eggs. *J. Cell. Biol.* 66:263-274.
- Prather RS and First NL. 1990. Cloning embryos by nuclear and nuclear transfer. *J. Reprod. and Fert.* 41:125-134.
- Quinn P, Barros C and Whittingham DG. 1982. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J. Reprod. and Fert.* 66:161-168.
- Smith L, Wilmut I and Hunter R. 1988. Influence of cell cycle stage at nuclear transplantation on the development in vitro of mouse embryos. *J. Reprod. and Fert.* 84:619-624.
- Smith L, Wilmut I and West J. 1990. Control of first cleavage in single-cell reconstituted mouse embryos. *J. Reprod. and Fert.* 88:655-663.
- Stice S, Keefer C and Matthews L. 1994. Bovine nuclear transfer embryos: oocyte activation prior to blastomere fusion. *Mol. Reprod. and Dev.* 38:61-68.
- Stice S and Robl J. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 39:657-664.
- Szollosi D, Czolowska R, Szollosi M and Tarkowski A. 1988. Remodeling of mouse thymocyte nuclei depends on the time of their transfer into activated, homologous oocytes. *J. Cell Sci.* 91:603-613.
- Whittingham DG. 1971. Culture of mouse ova. *J. Reprod. and Fert.* 14:7-12.