

# 动物克隆核再程序化有关机理的研究进展

肖文伍 傅新巧 张苏明

(华中科技大学同济医学院附属同济医院神经科 武汉 430030)

**摘要:**近年来,动物克隆技术发展迅速,不断有新的克隆动物面世。面对克隆效率、克隆动物存活率低的客观事实,人们对克隆有关机制做了很多探讨。在移植核的再程序化过程中,某些胞浆因子如核质原等在解除已分化细胞核染色质的抑制中发挥了关键的作用,同时移植核发生印记基因及非印记基因的去甲基化和重新甲基化的现象,这种染色质抑制作用的解除及基因的甲基化现象与移植核的去分化有着密切的联系,但其具体机制还不清楚。核移植技术中,供核与受体胞质的协调和核再程序化的关系得到大量研究,目前普遍认为为了使核再程序化进行得更完全, M II 期卵母细胞质是适宜的受体,而处于 G0 期或 G1 期的体细胞核是合适的核供体。

**关键词:**克隆;再程序化;成熟促进因子(MPF);核移植;细胞周期

**中图分类号:**Q785 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2003)03-100-05

## Application of Nuclear Reprogramming Techniques in Animal Cloning

XIAO Wen-Wu FU Xin-Qiao ZHANG Su-Ming

(Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

**Abstract:** Despite the recent rapid development in animal cloning technology and increased production of cloned animals, the cloning and survival rate of cloned animals has remained very low. In face of this fact, researchers have invested considerable effort in investigating alternative cloning mechanisms. In the procedure of involving the reprogramming of a transplanted nucleus, some cytoplasmic factors, such as nucleoplasmin, play key roles in the erasure of the repressive chromatin accompanied by DNA demethylation and re-methylation of imprinting and non-imprinting genes. Researchers have known that these phenomena correlate with the reprogramming of transferred nucleus, but the mechanism is not yet clear. At the same time, the compatibility of the transferred nucleus and receptive cytoplasm is very important to normal reprogramming. At present, the cytoplasm of an M II phase oocytes is used as a suitable recipient and the somatic nucleus in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase is used as a suitable donor nucleus.

**Key words:** Cloning; Nuclear reprogramming; Maturation promoting factor; Nuclear transfer; Cell cycle

动物克隆在近年来得到长足的发展,新的克隆动物相继问世。然而动物克隆效率的低下,存活率低是不争的事实。而且不论是用 ES 细胞还是体细胞的克隆都可出现一些表型方面的异常:包括呼吸和循环系统的问题(这是导致新生动物死亡的最普遍的原因);即使是健康存活的个体,也可能有免疫缺陷或肾、脑的功能缺损(这可能是导致后期死亡的原因);大多数的克隆动物出生时均有超重现象(其中胎盘过度生长和

功能不良可能是其原因)。这些现象发生可能的原因涉及到核的再程序化的错误、移植前胚胎培养的损伤及一些核移植过程中本身还不确定的因素。在核的再程序化中发生的很重要的分子事件即是一些印记及非

第一作者介绍 肖文伍,男,30岁,神经病学博士;从事转基因动物、核移植、老年性痴呆研究。

收稿日期:2002-09-26,修回日期:2003-03-14

印记基因再程序化,这些再程序化能否正常进行关系到胚胎发育过程中这些基因能否正常及时序性表达。已知印记基因的畸形表达可导致克隆动物的表型异常<sup>[1]</sup>,如胎儿及胎盘的过度生长,而且单个印记基因的异常可能不足以引起这一异常,而是因为几个印记基因的异常累积引起的。rRNA 基因的激活和核仁的形成是哺乳动物胚胎基因组激活的有用标志,Hyttel<sup>[2]</sup>等发现牛、猪克隆胚胎核仁蛋白形成后,分布在核仁中的位置有大量的偏差,提示了早期克隆胚胎基因的不正常。Werenzycki<sup>[3]</sup>用半定量 RT-PCR 研究克隆胚胎与体内发育的非克隆胚胎的早期特异 mRNA 的表达时,发现克隆胚在涉及滋养层功能、DNA 甲基化等几个基因明显的畸形表达。

本文综述了近年来核再程序化有关机理的研究进展。

## 1 DNA 的甲基化及抑制性染色质的形成

### 1.1 细胞分化过程中抑制性染色质的形成与 DNA 甲基化

在胚胎发育的过程中,染色质的结构成分和 DNA 的甲基化对于特定细胞的分化有着显著的作用。细胞分化涉及到特定形式的抑制性染色质的形成,而接头组蛋白、多梳体蛋白及甲基-CpG 合并蛋白在这个过程中发挥重要作用。这些蛋白将染色质分隔为不同的功能区并使其在细胞分裂过程中维持分化状态的稳定性。非洲爪蟾胚胎中体细胞型的组蛋白 H1 介导了某些卵母细胞特异性基因的抑制<sup>[4]</sup>,从而导致外胚层细胞失去分化为中胚层组织的能力<sup>[5]</sup>。而多梳体蛋白是另一种抑制性的染色质组分<sup>[6]</sup>,在发育过程中它较组蛋白出现晚。两栖类及哺乳类胚胎发育中染色质接头组蛋白的类型出现规律性的变化<sup>[7]</sup>,表明不同的组蛋白在发育的不同时段发挥着抑制不同基因的作用,从而调控着细胞分化发育事件。

在脊椎动物中,细胞分化过程中的甲基化作用主要发生在对称性的二核苷酸 CpG。CpG 二核苷酸的甲基化<sup>[8]</sup>明显地影响了装配染色质的蛋白质组分。甲基化的 DNA 被特异性的抑制性蛋白识别<sup>[9]</sup>,这些蛋白与转录共抑制因子通过对核小体中组蛋白 N 末端的去乙酰化作用抑制转录活性<sup>[10]</sup>。DNA 甲基化对印记基因的稳定抑制<sup>[11]</sup>及雌性哺乳动物 X-染色体的失活均有重要作用<sup>[12]</sup>。DNA 甲基转移酶 Dnmt1 的发现提示某种机制在基因组的甲基化模式中发挥作用<sup>[13]</sup>,然而 DNA 甲基化的具体机制仍不清楚。

### 1.2 核的再程序化过程中染色质结构成分的变化和

### DNA 的去甲基化

分化了的细胞核移入受体胞质后,卵母细胞、受精卵或胞核中的 molecular chaperones 和酶的活动能消除染色质的结构抑制。体细胞核移入卵母细胞胞浆后出现大量的蛋白质移动现象,这个现象伴随着核膨胀及体细胞核中异染色质数量的下降。因而,在核的再程序化中涉及到大量的染色质组分的交换,交换的结果是染色质的抑制性结构得以解除。通常非洲爪蟾受精卵的胞浆比卵母细胞的胞浆在体细胞核的重新编程方面效率更高,但是,如果卵母细胞的生发泡破裂,其内容物进入胞浆,则重新编程的能力明显提高<sup>[14]</sup>。因而卵母细胞生发泡中储存的核组分在体细胞再程序化过程中发挥重要的作用。这些物质包括 molecular chaperones,如核质原 (nucleoplamin)<sup>[15]</sup> 和 N1/N2 (polypeptide N1/N2)<sup>[16]</sup>。这些 molecular chaperones 能介导核心组蛋白的转移及核小体的装配。非洲爪蟾卵细胞浆中,核质原对体细胞核的重新程序化发挥重要作用。一个重要的变化即是体细胞接头组蛋白变体 (histone variant) H1/H0 被胞浆中特异性的组蛋白变体 B<sub>4</sub> 和染色质结构蛋白 HMG<sub>1</sub><sup>[17]</sup> 所取代,B<sub>4</sub> 和 HMG<sub>1</sub> 较 H1/H0 与染色质组成的复合物的稳定性差<sup>[18]</sup>,核质原更易与富含精氨酸的蛋白如 H1/H1(0) 发挥作用,因而核质原与体细胞接头蛋白的蛋白质-蛋白质相互作用可以解释体细胞接头蛋白 H1/H1(0) 的选择性移动。H1/H1(0) 移动后将给基因的再程序化清除一个很大的障碍<sup>[19]</sup>。同时核小体的腺苷三磷酸酶 ISWI (SWI2/SNF2 家族成员之一) 通过刺激 TATA-合并蛋白的释放在体细胞核蛋白与胞浆蛋白互换的过程中发挥了关键性的作用<sup>[20]</sup>。

大多数移植前的克隆胚胎核的再程序化是不完全的,特别是去甲基化不充分。在克隆牛的桑葚胚和囊胚,几个重复和单一序列的甲基化水平较正常的胚胎高得多而接近于供核甲基化水平<sup>[21]</sup>。如要有有效的克隆,很重要的一方面是甲基化被反转而又能重新被建立<sup>[22]</sup>,然而,去甲基化及甲基化的重新建立的具体机制还有待深入研究。

## 2 细胞周期与核的再程序化的关系

核质的互动与协调是所有细胞正常活动的基础,核移植克隆胚二倍体核型的维持及基因组再程序化的正常完成,也取决于供体核与受体卵母细胞质之间的同步协调和相互作用。这是一个复杂的问题,涉及供体细胞核的周期和卵母细胞激活与融合的时间等多个因素,在动物品种之间还存在差异。Dolly 的出生打破了原有的传统结论:已分化的哺乳动物体细胞核不具

备全能性。尽管移入核与细胞质间的作用详细机制还不清楚,但有一点是肯定的,即 M II 期卵母细胞质的确对移入的核发生了去分化,并重新激活了核的发育程序。许多核移植试验观察到,核移入 M II 期卵母细胞质后要发生一系列的形态变化(即核修饰),包括移入核的核膜崩解(nuclear envelop breakdown, NEBD),染色体超前浓缩(premature chromosome condensation, PCC),核仁分散、核膜重新出现和类原核的形成(pronuclear formation, PN)以及原核膨大等<sup>[21]</sup>。这一过程与精子入卵后发生的变化极为相似,而且在时间上也基本同步。如果在卵母细胞激活一段时间后再移入供体核,则不会发生 NEBD 等核修饰变化。引起核修饰的首要因子便是卵母细胞促成熟因子(maturation promoting factor, MPF)<sup>[24]</sup>。

**2.1 MPF 在细胞周期中的变化及其调节细胞周期的机理** 在高等生物分裂期细胞和成熟卵子内均具有 MPF,其活性随细胞周期的不同而异,如在体细胞,MPF 出现于 G<sub>2</sub> 期,分裂中期达到高峰,后期开始下降, G<sub>1</sub> 期消失。脊椎动物的卵母细胞在成熟过程中,MPF 在 M I 期保持高水平,在后期 I、末期 I 时下降,在 M II 期又重新上升。卵母细胞在受精或人工激活后 MPF 失活,减数分裂抑制得到释放,从而进入第一次胚胎细胞周期<sup>[25]</sup>。MPF 是许多细胞周期的调节物,它是由 Cyclin 和蛋白激酶(protein kinase) P34<sup>cdc2</sup> 两个亚单位组成的。Cyclin 是 cdc13 + 基因的产物,在细胞周期中不稳定, G<sub>1</sub> 期无 Cyclin,至 G<sub>2</sub> 期开始合成, M 中期达到高峰, M 期结束前迅速降解。P34<sup>cdc2</sup> 是由 cdc2 + 基因产生的蛋白质激酶,它存在于整个细胞周期内,但在周期内产生两种变化,其一是表现磷酸化或非磷酸化;其二是单独存在或与其它蛋白质形成复合体。现已证明,启动细胞进入 M 期的关键是 P34<sup>cdc2</sup> 发生去磷酸化,导致该激酶活性增高。G<sub>2</sub> 期前, P34<sup>cdc2</sup> 发生磷酸化,与 Cyclin 分开,激酶处于失活状态,所催化的靶蛋白均处于去磷酸化状态; G<sub>2</sub> 期末, P34<sup>cdc2</sup> 与 Cyclin 形成有功能的复合体 MPF, P34<sup>cdc2</sup> 开始去磷酸化,激酶活性出现,所有靶蛋白则开始发生磷酸化,细胞进入 M 期,到中期达到高峰,其后逐渐降低。到末期前 P34<sup>cdc2</sup> 激酶活性开始消失,复合体解体,激酶重新磷酸化,同时靶蛋白在磷酸酶作用下去磷酸化, Cyclin 迅速降解,细胞通过 M 期进入 G<sub>1</sub> 期。Cyclin 的降解是导致 MPF 失活的重要因素。一旦 P34<sup>cdc2</sup> 激酶被激活,细胞内将出现 M 期的各种特征,如染色体浓缩、细胞骨架重排、核膜破裂等<sup>[23]</sup>。相似地,卵母细胞在进入 M II 期时, P34<sup>cdc2</sup> 保持去磷酸化状态的活性形式,它能触发一系列反应,导致 NEBD、PCC 和纺

锤体形成,使卵母细胞进入第二次减数分裂和使其停止在该状态。M II 期卵母细胞质中 MPF 活性很高,同时这一时期有一种细胞静止因子(cytostatic factor, CSF)活性也高,以维持 MPF 的活性。

**2.2 MPF 在核再程序化中的作用** 有些学者认为激活的 M II 期卵母细胞质对移入核的形态修饰是移入核基因重新开始表达(去分化)恢复至受精状态的一个前提条件<sup>[26]</sup>。在胚胎细胞核移植中,许多学者对核供体与核受体所处细胞周期对克隆胚发育的影响进行了大量研究。Collas<sup>[25]</sup> 等用秋水仙碱和 DNA 合成抑制剂来处理核供体,对不同时期的供体核在核移胚中形态学变化进行了系统研究。如以 G<sub>1</sub> 期和 S 早期核作为供体,其 PCC 过程中,中期染色体和纺锤丝在大多数情况下保持完整;以 S 晚期核作为供体,则出现不正常染色体。这表明, G<sub>1</sub> 期和 S 早期的染色体浓缩对克隆胚结构影响不大,而 S 晚期核的染色体浓缩影响克隆胚的结构,从而影响克隆胚的发育。出现上述结果的原因是因为成熟卵母细胞质(M II)中具有高水平的 MPF,所有供体核移入此时卵母细胞后,都发生 NEBD 和 PCC,接着进行 DNA 复制。G<sub>1</sub> 期供体核的 DNA 尚未复制,当它移植到卵母细胞质中时, DNA 只复制一次后再分裂,可产生两个正常染色体倍数的子细胞;以 G<sub>2</sub> 期核作供体时,其 DNA 已经合成,在克隆胚中其 DNA 再复制一次后才能分裂,这样就产生了两个多倍体的子细胞;当以 S 期核作为供体时,有些分裂球 DNA 已复制,因而导致部分克隆胚不正常<sup>[27]</sup>。G<sub>1</sub> 期细胞为二倍体,和 M 期卵母细胞质融合后, PCC 的发生不仅不会引起细胞染色体的异常加倍,还可能促进基因的再程序化<sup>[28]</sup>。哺乳动物核移植中,核受体胞质处在分裂期,而供体核多处在间期,这种核、质的不同步可能是影响克隆胚发育的主要因素。因而设想,用人工激活的方法使卵母细胞从分裂停滞中释放出来,使胞质进入“间期”环境,可能有利于核移植胚胎的发育。

和受精卵的发育一样,核移植后卵母细胞中的母型信息只能支持短时期的发育,克隆胚的后续发育依赖于再程序化后的核的驱动,母型因子存在的时间越短,给再程序化的时间越少,因而尽快完全实现再程序化是非常重要的。PCC 和与之伴随发生的 NEBD,可能会使卵母细胞质因子更易于或更快地与染色质接近而指导再程序化。M 期卵母细胞质还能抑制移入细胞核自身的转录活性,从而使其按胞质的信息开始活动,即再程序化<sup>[29]</sup>。激活后的卵母细胞(MPF 降解)不会使移入其中的细胞发生 PCC,细胞(包括 G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> 期)仍继续原来的周期进程,保持正常核型。但如果“PCC 对

基因的再程序化有促进作用”的认识<sup>[28]</sup>是正确的话,显然激活后的卵母细胞并不是最佳胞质受体。

**2.3 供核与受体胞质细胞周期的协调** 从以上对MPF作用的认识可得出结论:以MⅡ期卵母细胞作为受体,G<sub>1</sub>期体细胞核适宜作供体,但G<sub>0</sub>期细胞应该更好。G<sub>0</sub>期细胞首先在用体外培养的胚盘细胞作核供体克隆绵羊中使用<sup>[30]</sup>,G<sub>0</sub>期细胞和G<sub>1</sub>期细胞一样为二倍体,拥有G<sub>1</sub>期细胞在克隆胚发育中的优点。此外,G<sub>0</sub>期细胞由于胞质成分减少,活动性降低,而可能比G<sub>1</sub>期细胞更易于使细胞质因子对其染色质发挥调控作用,同时也减少了胞质对克隆胚发育的干扰因素。让细胞处于G<sub>0</sub>期对体细胞克隆动物是否必须,目前存在争论,因为有人用未经休眠处理的胎儿成纤维细胞获得克隆转基因牛<sup>[31]</sup>,但作者仅确定所用细胞的56%为二倍体(G<sub>1</sub>或G<sub>0</sub>期),而并未排除所用细胞处在G<sub>0</sub>期的可能。有鉴于此,T淋巴细胞在供核细胞周期研究中可能会作为一个有用的模型<sup>[32]</sup>,因为CD25基因在G<sub>1</sub>和G<sub>0</sub>期的表达不同,很易将处于不同细胞周期的细胞区分开。

S期、G<sub>2</sub>期的细胞只有和已激活的卵母细胞融合才能正常发育<sup>[31]</sup>。因为激活的卵母细胞中MPF的水平低,不会出现PCC及NEBD,从而可避免染色体的损伤及非整倍体的出现。Campbell<sup>[24]</sup>等提出以下两条协调供体核和去核卵母细胞的途径:其一,选取处于G<sub>0</sub>或G<sub>1</sub>期的细胞核供体;其二,选取MPF水平低时的卵母细胞受体。但前者的可能性大一些,这是因为去核时多选处于MⅡ期卵母细胞,这时卵母细胞极体易于观察,染色体位于极体附近,便于去核。但是最近Zhou<sup>[33]</sup>等用ES细胞作供核细胞的研究中,发现处于G<sub>2</sub>/M期的ES细胞更有利于核移植。Ono<sup>[34]</sup>等用M期鼠的成纤维细胞作供体就得到了克隆的后代。通常MⅡ期卵母细胞被用作受体,然而Miyoshi<sup>[35]</sup>发现猪的MⅠ期卵母细胞也能支持核移植胚发育到囊胚。甚至去核的末Ⅱ期的卵母细胞也产生了克隆山羊<sup>[36]</sup>和克隆鼠<sup>[37]</sup>。说明目前的对供核与受体卵母细胞最适周期的认识可能还不全面。

综上所述,有关核再程序化的机理有了一定程度的深入,但是,移植核的抑制性染色质的解除及DNA的去甲基化和后续的重新甲基化的具体机制仍不清楚。MPF的作用得到了进一步的阐明,但是在核的再程序化中它的存在是否必须,胞浆因子作用于移植核的具体机制还有待弄清。供核和卵母细胞周期的协调还有待进一步阐明。

## 参 考 文 献

- [1] Jaenisch R. DNA methylation and imprinting: why bother? *Trends Genet*, 1997, **13**(8):323 ~ 329.
- [2] Hyttel P, Dinnyes A, Laurincik J, et al. Gene expression during pre- and peri-implantation embryonic development in swine. *Reprod Suppl*, 2002, **60**:203 ~ 210.
- [3] Wrenzycki C, Wells D, Herrmann D, et al. Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. *Biol Reprod*, 2001, **65**:309 ~ 317.
- [4] Bouvet P, Dimitrov S, Wolffe A P. Specific regulation of chromosomal 5S rRNA gene transcription *in vivo* histone H1. *Genes Dev*, 1994, **8**:1147 ~ 1159.
- [5] Vermaak D, Steinbach O C, Dimitrov S, et al. The globular domain of histone H1 is sufficient to direct specific gene repression in early *Xenopus* embryos. *Curr Biol*, 1998, **8**:533 ~ 536.
- [6] Van Lohuizen M. The trithorax-group and polycomb-group chromatin modifiers implication for disease. *Curr Opin Genet*, 1999, **9**:355 ~ 361.
- [7] Clarke H J, Mclay D W, Mohamed O A. Linker histone transitions during mammalian oogenesis and embryogenesis. *Developmental Genetics*, 1998, **22**:17 ~ 30.
- [8] Antequera F, Macleod D, Bird A. Specific protection of methylated CpGs in mammalian nuclei. *Cell*, 1989, **58**:509 ~ 517.
- [9] Chandler S P, Guschin D, Landsberger N, et al. The methyl-CpG binding transcriptional repressor MeCP2 stably associates with nucleosomal DNA. *Biochemistry*, 1999, **38**:7008 ~ 7018.
- [10] Wade P A, Geggion A, Jones P L, et al. The Mi-2 histone deacetylase couples DNA methylation to chromatin remodeling and histone deacetylation. *Nature Genet*, 1999, **22**:62 ~ 66.
- [11] Wolffe A P, Matzke M A. Epigenetics: regulation through repression. *Science*, 1999, **286**:481 ~ 486.
- [12] Li E, Bestor T H, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 1992, **69**:915 ~ 926.
- [13] Bestor T H. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*, 2000, **9**(16):2395 ~ 2402.
- [14] Gurdon J B, Lasley R A, De Robertis E M, et al. Reprogramming of transplanted nuclei in amphibia. *Int Rev Cytol Suppl*, 1979, **9**:161 ~ 178.
- [15] Lakskey R A, Honda B M, Mills A D, et al. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature*, 1978, **275**:416 ~ 420.
- [16] Kleinschmidt J A, Dingwall C, Maier G, et al. Molecular characterization of a karyophilic histone-binding protein: cDNA

- cloning, amino acid sequence and expression of nuclear protein N1/N2 of *Xenopus laevis*. *EMBO J*, 1986, **5**: 3 547 ~ 3 552.
- [17] Dimitrov S, Wolffe A P. Remodeling somatic nuclei in *Xenopus laevis* egg extracts: molecular mechanisms for the selective release of histone H1 and H1(0) from chromatin and the acquisition of transcriptional competence. *EMBO J*, 1996, **15**: 5 897 ~ 5 906.
- [18] Nightingale K, Dimitrov S, Reeves R, et al. Evidence for a shared structural role for HMG1 and linker histones B4 and H1 in organizing chromatin. *EMBO J*, 1996, **15**: 548 ~ 561.
- [19] Steinbach O C, Wolffe A P, Rupp R. Somatic linker histones causes loss of mesodermal competence in *Xenopus*. *Nature*, 1997, **389**: 395 ~ 399.
- [20] Kikyo N, Wade P A, Guschin D, et al. Active remodeling of somatic nuclei in egg cytoplasm by the nucleosomal ATPase ISWI. *Science*, 2000, **289**(5 488): 2 360 ~ 2 362.
- [21] Kang Y K, Koo D B, Park J S, et al. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat Genet*, 2001, **28**(2): 173 ~ 177.
- [22] Tada M, Tada T, Lefebvre L, et al. Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nuclei in hybrid cells. *EMBO J*, 1997, **16**: 6 510 ~ 6 520.
- [23] Smith S D, Soloy E, Avery B, et al. Nucleus remodeling in reconstructed cattle embryos. *Theriogenology*, 1994, **41**: 298 ~ 304.
- [24] Fulka J R, Ouhibi N, Moor R M. Nuclear transplantation in mammals: the role of maturation promoting factor (MPF). *Reprod in Domestic Animals*, 1994, **29**(5): 352 ~ 353.
- [25] Collas P, Balise J J, Robl J M. Effect of donor cell cycle stage on chromatin and spindle morphology innuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod*, 1992, **46**: 501 ~ 511.
- [26] Campbell K H S, Ritchie W A, Wilmut I. Disappearance of maturation promoting factor and the *in vitro* matured bovine oocyte. *Theriogenology*, 1993, **39**: 199 ~ 205.
- [27] Campbell K H S, Loi P, Otaegui P J, et al. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Reviews of Reproduction*, 1996, **1**(1): 40 ~ 46.
- [28] Cheong H T, Takahashi Y, Kanagawa H. Relationship between nuclear remodelling and subsequent development of mouse embryonic nuclei transferred to enucleated oocytes. *Mol Reprod Dev*, 1994, **37**: 138 ~ 145.
- [29] Kanka J, Hozak P, Heyman Y, et al. Transcriptional activity and nucleolar ultrastructure of embryonic rabbit nuclei after transplantation to enucleated oocytes. *Mol Reprod Dev*, 1996, **43**: 135 ~ 144.
- [30] Wilmut I, Campbell K H S. Quiescence in nuclear transfer. *Science*, 1998, **281**: 1 661.
- [31] Cibelli J B, Stice S L, Golubce P J, et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 1998, **280**: 1 256 ~ 1 258.
- [32] Pallante B A, Telfer E E, Ansell J, et al. Mouse t-lymphocytes as a model to compare the nuclear transfer efficiency of G<sub>0</sub> and G<sub>1</sub> cells. *Theriogenology*, 2001, **55**: 282.
- [33] Zhou Q, Jouneau A, Brochard V, et al. Developmental potential of mouse embryos reconstructed from metaphase embryonic stem cell nuclei. *Biol Reprod*, 2001, **65**: 412 ~ 419.
- [34] Ono Y, Shimozawa N, Ito M, et al. Cloned mice from fetal fibroblast cells arrested at metaphase by a serial nuclear transfer. *Biol Reprod*, 2001, **64**: 44 ~ 50.
- [35] Miyoshi K, Rázucido S J, Gibbons J R, et al. Development of porcine embryos reconstituted with somatic cells and enucleated metaphase I and II oocytes matured in a protein-free medium. *BMC Dev Biol*, 2001, **1**: 12.
- [36] Baguisi A, Behboodi E, Melican D T, et al. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol*, 1999, **17**: 456 ~ 461.
- [37] Baguisi A, Overstrom E W. Induced enucleation in nuclear transfer procedures to produce cloned animals. *Theriogenology*, 2000, **53**: 209.