

---

---

УДК 612.089:591.089:591.39

**МИКРОХИРУРГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ КЛЕТочНОЙ ИНЖЕНЕРИИ  
В ЭМБРИОНАЛЬНОМ КЛОНИРОВАНИИ ЖИВОТНЫХ**

Никитин В. А.

*Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия  
Научный центр биологических исследований, Россия*

В настоящее время интенсивно развивающиеся методы клеточной инженерии позволяют активно вмешиваться в развитие клеток, органов, тканей. Технологии клеточной инженерии включают методы пересадки ядер, разделения эмбрионов для получения монозиготных близнецов, методы микроинъекции. Эти методы стали неотъемлемым инструментом биотехнологии и их развитие становится актуальным в сельском хозяйстве и в медицине. Создание животных-биореакторов для улучшения качества молока (Dobrovolsky et al., 1993; Эрнст и др., 1995; Sobolev et al., 1998), клонирование в сочетании с технологией трансгенеза (Kuhholzer, Prather, 2000), ксенотрансплантация, в последнее время и с помощью стволовых клеток (Illmensee, 2001, 2002; Hochedlinger, Jaenisch, 2003), начинают занимать прочное положение, представляя, помимо научного, большое народно-хозяйственное значение.

За последние годы научные работы, связанные с получением клеточных фрагментов – ядра и цитоплазмы и созданием на их основе новой клетки, выделились в самостоятельную область биологических исследований – реконструкцию клетки или клонирование. Наибольший интерес привлечен к проблемам реконструкции эмбриональных клеток.

Нам довелось стоять у истоков клеточной инженерии и клонирования в нашей стране. В конце 1960-х годов в Институте биофизики АН СССР в Пущине была создана лаборатория сохранения исчезающих видов животных под руководством профессора Б.Н. Вепринцева, который, сознавая все особенности и трудности работы с клеткой под микроскопом, был инициатором развития в нашей стране микроманипуляционных методов и техники для исследования клеток (Вепринцев, Ротт, 1980). Работы по созданию приборов проводились в сотрудничестве со специальным конструкторским бюро в Пущине (Институт биологического приборостроения РАН), с коллективом инженеров, возглавляемым А.М. Хохловым. Мы предлагали идеи различных устройств, приборов и оборудования для исследований, требующих новых подходов и новых методов, создавали их эскизы и макеты, а они разрабатывали инженерные решения и воплощали их в реальность.

В это время в Дубровицах в Институте животноводства под началом академика РАСХН Л.К. Эрнста началось строительство специального здания для работы с ранними эмбрионами животных. Молекулярные генетики школы академика А.А. Баева приняли активное участие в совместной с нами работе по микроинъекции генетического материала в единичную клетку (Земскова, Никитин и др., 1983). От молекулярных генетиков (акад. Е.Д. Свердлов) мы получили заказ на разработку комплекса приборов для работы с эмбриональными клетками, впоследствии полу-

чившего название ПМЯ-1 (прибор для микрохирургии яйцеклетки) (Хохлов и др., 1990).

Однако широкое внедрение методов клеточной инженерии, прежде всего пересадка ядер, сдерживается в настоящее время низкой эффективностью получения клонированного потомства животных (0,1 – 3%). Кроме того, по многим данным, клонированное и трансгенное потомство имеет большое количество аномалий развития (Walton et al., 1987; Андреева, Серова, 1992). Ведущий специалист в этой области, Дэвид Солтер, видит причину этого, наряду с другими факторами, в несовершенстве технологических операций (Solter, 2000).

В настоящем сообщении мы представляем некоторые наши подходы, новые и усовершенствованные методы, микроинструменты, устройства и приборы и рассказываем об их использовании в наших работах по пересадке ядер и разделению ранних предимплантационных эмбрионов на лабораторных мышах, а также для репродуктивного клонирования кроликов и коров. Разработанные нами методы направлены, прежде всего, на снижение повреждений клетки и ее органелл в сложных условиях микрохирургии под контролем микроскопа.

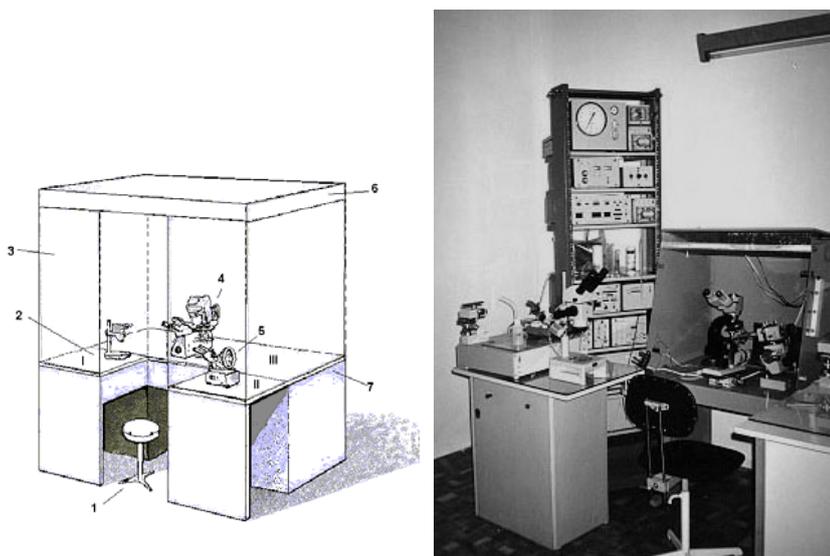
Назовем некоторые, по нашим представлениям основные факторы, «подводные камни» этой технологии. Во-первых, это недостаточно развитая эргономика операционного цикла, что чаще всего является причиной слишком большой длительности всех видов операций (от момента выделения эмбрионов до их имплантации животным-реципиентам проходит до 2-х -4-х и более часов), что может привести к повреждению целостности клеточных структур. Помимо этого, не всегда профессионально используются стеклянные микрокамеры и микроинструменты. Так, например, известно, что кортикальная реакция не происходит у эмбрионов, находящихся в капиллярах, сделанных из пирекса или «йенского» стекла (Методы биологии..., 1987). Однако весьма часто именно эти стекла на практике обычно применяются для изготовления микроинструментов при проведении операций на клетках.

Другой важный вопрос – это условие проведения микрохирургических операций на клетке. Нами был разработан комплексный подход к проведению микрохирургии клетки с созданием эргономичного операционного блока, разделенного на функциональные зоны, нашедший свое частичное воплощение в приборе для микрохирургии яйцеклетки (ПМЯ-1) (рис. 1).

Классическая схема рабочего места микрохирурга – это линейное расположение приборов, что очень усложняет работу, так как приходится при этом переходить от одного прибора к другому. Необходимо было уйти от такой схемы. С этой целью был создан операционный блок, разделенный на функциональные зоны. Благодаря этому проведение микрохирургии как одним микрохирургом, так и с участием помощников, специализированных на отдельных приемах и методах, стало значительно более эффективным. Появилась возможность сократить время операции, повторять циклы, стандартизовать проведение различных этапов микроопераций и в результате свести к минимуму травмирование эмбрионов и их потерю.

Комплекс окружает микрохирурга с трех сторон и имеет три функционально связанных между собой ламинарных бокса, три зоны работы (рис. 1, слева): I – зона приготовления объекта исследования (приготовление препаратов клеток под стереомикроскопом и помещение их в микрокамеры для исследований); II – зона изготовления микроинструментов (микрокузница) – для изготовления микроинст-

рументов в стерильных и беспылевых условиях, прибор для вытяжки капилляров, пуллер и газовая горелка); III зона – микроскоп с микроманипуляторами, антивибрационный стол, система жизнеобеспечения клетки и приборы для измерений различных физико-химических параметров. Боксы необходимы для создания стерильных и беспылевых условий, и к ним подается стерильный воздух. Общий вид полного комплекса ПМЯ-1 представлен на рисунке 1, справа.



*Рис. 1. Комплекс для микрохирургии яйцеклеток (ПМЯ-1), слева – схема функциональных зон ПМЯ-1; справа – общий принципиальный вид ПМЯ-1.*

Приборы и технологии комплекса ПМЯ-1 внедрены и используются в работе ряда Институтов РАН и в работе Харьковского биотехнологического центра и Института животноводства Украинской академии аграрных наук. Не обязательно иметь весь комплекс для микрохирургии, который мы ввели в ПМЯ. Здесь важен принцип.

Остановимся на описании некоторых новых приборов, вошедших в комплекс ПМЯ-1, и методов работы с их помощью на единичных клетках, прежде всего на эмбрионах млекопитающих. Следует заметить, что при работе на млекопитающих всегда есть дефицит эмбрионов и потери их крайне нежелательны. По общепринятому методу микроинструменты для операций вводят с помощью микроманипулятора или нескольких микроманипуляторов с противоположной стороны от удерживающего клетку микроинструмента, укрепленного на другом микроманипуляторе. Это весьма непросто. Так, для проведения пересадки ядер таким способом надо одному экспериментатору манипулировать не менее как 28 ручками микроманипуляторов и микроинъекторов. Кроме того, если клетка недостаточно ригидна (упруга), проколоть ее микроинструментом непросто и это может привести к снижению ее жизнеспособности и иногда к ее потере. Обычно проводят пересадку ядер по следующей схеме: клетку закрепляют с помощью микроприсоски-держателя и отдельно вводят внутрь нее различные микроинструменты. При таком способе удерживания клетки невозможно избежать значительных ее деформаций и повреждений (Никитин, Фесенко, 2006).

Мы предложили принципиально иной способ проведения операции. Клетка в разработанном нами микроманипуляторе для пересадки ядер единичных клеток с дистанционным управлением фиксируется новым микроинструментом – капсулой-держателем без применения отрицательного давления, а микроинструмент или микроинструменты для хирургии вводятся из ее полости (Nikitin et al., 2006). В результате для операции оказалось достаточно одного микроманипулятора, а не двух и более, как обычно, и появилась возможность работать на клетках с различной ригидностью: фиксируется непосредственно нужный участок мембраны, и внутри капсулы-держателя вводится микрохирургический инструмент (рис. 2).

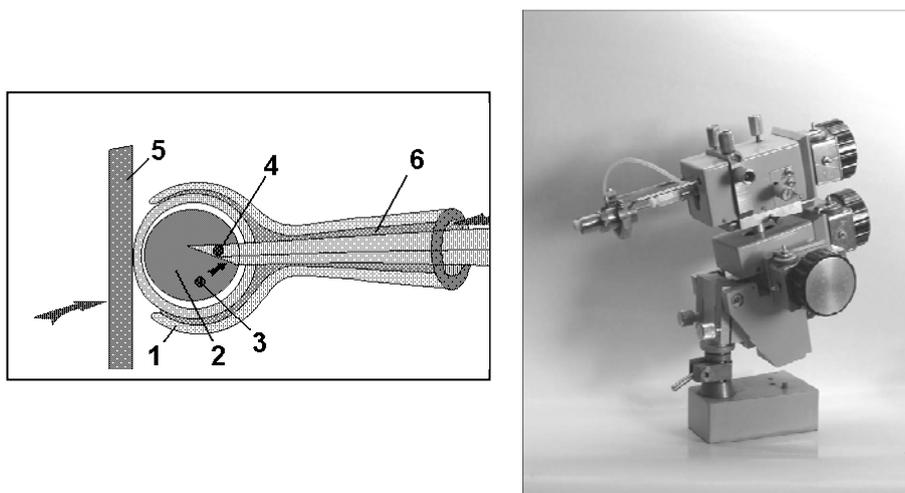


Рис. 2 . Пересадка ядер. Слева – схема пересадки ядер: 1 – капсула-держатель; 2 – бластомер; 3 – ядро для энуклеации; 4 – ядро для пересадки; 5 – стеклянная пластинка для упора; 6 – изотонический раствор. Справа – фото микроманипулятора для пересадки ядер с дистанционным управлением.

Известными методами и известными микроманипуляторами невозможно проводить операции таким способом, так как обычно каждый микроманипулятор управляет только одним микроинструментом. Для использования всех возможностей этого микроманипулятора нужны специальные микроинструменты, которые были нами сконструированы и изготовлены (рис. 3).

С помощью этого микроманипулятора и проводились работы по реконструкции яйцеклеток лабораторных мышей до помещения их суррогатным матерям, причем с помощью предложенных способов фиксации и микрохирургии оказалось возможным проводить и пересадку ядер, и микроинъекции в цитоплазму и в ядро.

Есть достаточное количество данных о повреждающем действии микроманипуляционной техники, применяемой для реконструкции клеток, на развитие эмбрионов. С учетом этого мы разработали еще 28 новых микроинструментов и этот арсенал обеспечивает практически все задачи микрохирургической реконструкции клетки, причем при разработке микроинструментов учитывалась именно необходимость минимизировать повреждение клетки при манипуляциях.

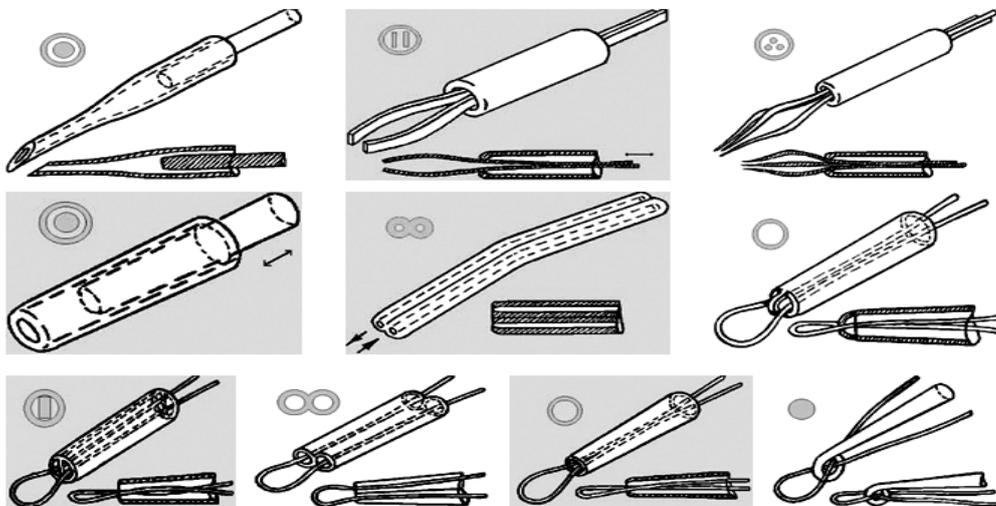


Рис.3. Микроинструменты. Слева направо: (верхний ряд) - микрошпатель, микропинцет, микрорасширитель; (средний ряд) – микродержатель с выдвижным штоком, микроотсос-иригатор, микропетля из капилляра с перемычкой; (нижний ряд) – микропетля из капилляра со вставкой, микропетля из спаренного капилляра, микропетля из одиночного капилляра, микропетля – «удавка».

Отметим еще один важный аспект работы с помощью стеклянных микроинструментов. Микроинструменты можно было бы заранее изготовить и всегда иметь под рукой, сохраняя их в кассетнице в стерильном боксе. Однако, по нашим данным, это практически нереально. У стекла есть одно очень плохое свойство – со временем оно стареет. Выщелачивание поверхностного слоя происходит очень активно на воздухе и должно контролироваться в фазовом контрасте при большом увеличении микроскопа в воздушной среде. На практике считается, что микроинструменты нужно хранить в водных растворах, так как на поверхности образуется гидролизованый кремнезем, предохраняющий от дальнейшего разрушения, но и в этом случае необходим контроль. На рисунке 4 показано, как выглядит поверхность микропипетки, хранившейся на воздухе в кассетнице в течение 40 дней. Наблюдать такую картину нам удалось только в хорошо настроенном фазовом контрасте микроскопа при большом увеличении или в аноптральном контрасте.

Предложили мы и микрокузницу, на которой можно использовать широкий набор нитей накаливания различных форм, которые можно заменять в процессе работы простым поворотом головки-держателя нитей; она имеет свое собственное устройство для вытяжки капилляров. Важнейшим ее преимуществом является также возможность обрабатывать микроинструмент со всех сторон, в том числе с торца, и контролировать его размеры, вращая его вокруг оси под контролем микроскопа благодаря специальному поворотному устройству, включенному в конструкцию МК-2.

Впервые заготовка не фиксируется неподвижно по отношению к нити накаливания, а вращается вокруг своей оси, что позволило значительно расширить виды работ, которые можно проводить на микрокузнице: сверление, обтачивание и ряд других работ, которые можно назвать токарными работами со стеклом.

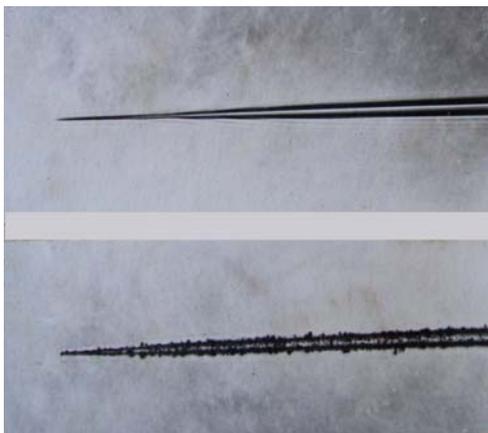


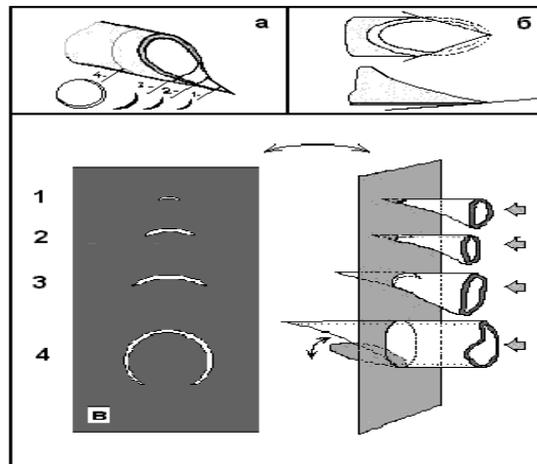
Рис. 4. Микроинструменты до и после хранения на воздухе. Стекло микропипетки молибденовое, снимок сделан на воздухе.

Вместо этого можно устанавливать на микрокузницу созданную нами пневматическую головку микроманипулятора, также имеющую поворотное устройство (Ларин, Никитин, авт. св-во 1229030) и микроинструмент изготавливать непосредственно на головке микроманипулятора, а затем, не вынимая его из держателя, переносить головку на микроманипулятор для проведения операций на клетке. Имеется возможность подачи сжатого воздуха внутрь полости стеклянной заготовки, например, для изготовления микрошариков, сужений или увеличения диаметра заготовки в определенном месте. Преимуществ, которые имеет эта микрокузница, нет ни у одной из известных микрокузниц (Иванов и др., авт. св-во №1183469).

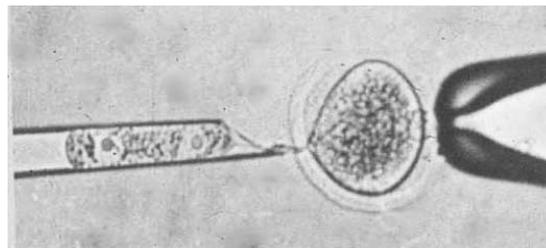
Мы не одни совершенствуем микроинструментарий. В Харькове в Биотехнологическом центре предлагаются оригинальные микроприсоски для удерживания клеток. Микроинструменты в настоящее время можно купить за рубежом. Следует только отметить, что японское, немецкое, английское и американское стекло будет всегда различаться по составу и, соответственно, по своим свойствам, как физическим, так и химическим.

Одной из проблем микрохирургии ранних эмбрионов при пересадке ядер является как можно более полное и быстрое восстановление целостности их после введения микроинструмента. Проникновение общепринятых микропипеток через *zona pellucida* создает достаточно труднорепарируемую перфорацию. Значительно лучше закрываются щелевые отверстия, которые можно получить при работе с клеткой с помощью специально заточенных пипеток (рис. 5). Поэтому в состав ПМЯ-1 было введено разработанное, запатентованное и изготовленное по нашему проекту устройство для заточки и шлифовки микроинструментов (Гришин и др., авт. св-во №1315248). Главные достоинства этого прибора в том, что при работе на нем можно регулировать скорость заточки, производить шлифовку микроинструмента и, самое важное, можно проводить затачивание при большом увеличении под контролем микроскопа. Ни одно известное устройство не позволяет проводить микроскопический контроль всех манипуляций, связанных с затачиванием микроинструментов. Только благодаря возможностям этого прибора нам удалось сделать

специальную микропипетку для пересадки ядер, заточенную с 4-х сторон (рис. 5), и с ее помощью провести клонирование мышей методом микрохирургии в сочетании с электрослиянием (Чайлахян и др., 1987).



А



Б

Рис 5. А. Схема специальной заточки кончика микропипетки и схема образования перфорации в зона pellucida. «Захлопывание» перфорации при выходе микропипетки из эмбриона способствует быстрой репарации поврежденного участка зона pellucida. а – 1, 2, 3, 4 - профили кончика; б - схема заточки; в – 1, 2, 3, 4 - этапы образования перфорации в зона pellucida клетки. Б. (фото) Выход микропипетки диаметром 24 мкм со специально заточенным кончиком из зона pellucida во время пересадки пронуклеусов, виден короткий тяж цитоплазмы (Чайлахян и др., 1987). Перфорация таким кончиком как бы "расклинивает" ткани зона pellucida и оболочка «захлопывается» после удаления микропипетки.

Репродуктивные качества кроликов сделали их удобной моделью для исследований в эмбриологии, биологии развития, генетической инженерии (Yang, Foote, 1987). Однако попытки получить однояйцовых близнецов у кроликов практически не имели успеха из-за несовершенства методов (Brochart, 1954; Ogawa et al., 1983; Hahn, 1984). Способы разделения эмбрионов, которые были разработаны для эмбрионов коров, не подходят для эмбрионов кролика, во многом из-за того, что у эмбрионов кролика плотный, липкий слой муцина, затрудняющий проникновение микроинструмента (Hiroshi, Ogawa, 1981; Rottmann, Lampeter, 1981). Это привело нас к необходимости разработки альтернативного способа разделения эмбрионов, не использующего инвазивный метод микрохирургии – наложение микролигатуры (рис. 6) (Никитин и др., 1987). Такой метод не применялся ранее на

млекопитающих. Он оказался пригоден для получения близнецов кролика при перевязке эмбрионов и на стадии 2-х бластомеров, и на стадии морулы.

В совместной работе с сотрудниками ВИЖ в опытном хозяйстве этого института было впервые получено жизнеспособное потомство крольчат из половинок эмбрионов, в том числе однойцовые близнецы. Опыт проведенной успешной работы свидетельствовал, однако, о необходимости стандартизовать методику наложения микролигатуры на эмбрион, сделать ее независимой в основных своих этапах от искусности экспериментатора. В связи с этим был создан прибор и метод для разделения яйцеклеток наложением микролигатуры (рис. 6, справа) (Бондарев и др., авт. св-во №1327333).

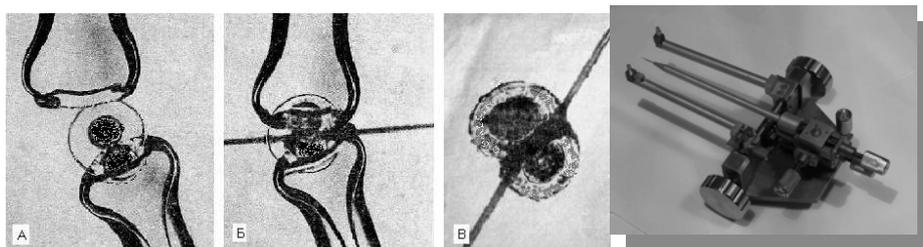
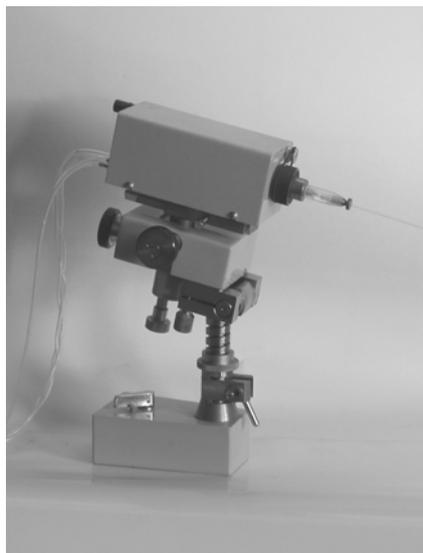


Рис. 6. Фотография перевязки двубластомерного эмбриона кролика наложением лигатуры с использованием капсул-держателей (слева) и микроманипулятор для наложения лигатуры (справа)

По заключению Всесоюзного государственного института патентной экспертизы (ныне Федеральный институт промышленной собственности РФ), этот метод и прибор являются разработками, которые «не имели аналогов в мире на момент подачи изобретения» (пионерское изобретение). Случаев неудачных перевязок с помощью описываемого прибора и метода с применением капсул-держателей, фиксированных в микроманипуляторе, не наблюдалось, в отличие от наложения микролигатуры вручную (где по нашим данным 20-30% неудачных перевязок двубластомерных эмбрионов).

В состав комплекса ПМЯ-1 вошел также новый микроманипулятор с вращающимся микроинструментом, позволяющий локально перфорировать *zona pellucida* яйцеклетки, не деформируя всю клетку (рис. 7) (Ларин, Никитин, Хохлов, авт. св-во №1229030).

Этот микроманипулятор может также использоваться для микроинъекций и пересадки ядер и других органелл. С его помощью можно переносить клетки, в том числе стволовые, и удерживать их во время операции без использования отрицательного давления, тем самым сохраняя целостность клетки. Этого набора функций нет ни в одном известном приборе для микрохирургии. И при этом он очевидно прост в обращении и имеет небольшой вес, благодаря чему его можно использовать и в полевых условиях. Мы привезли его на ферму НИИ животноводства Лесостепи и Полесья Украины (г. Харьков) для работы на эмбрионах коров элитной Лебединской породы. Было рождено 3 жизнеспособных теленка, т.е. получено живое потомство близнецов крупного рогатого скота Лебединской породы коров.



*Рис. 7. Микроманипулятор обеспечивает возможность вращать микроинструмент вокруг его продольной оси.*

Успешное проведение репродуктивного клонирования кроликов и коров лебединской породы продемонстрировало пригодность разработанных методов, оборудования и микроинструментария не только для лабораторных исследований, но также и для работы в условиях фермы, опытного хозяйства и экспедиции.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Dobrovolsky V.N., Lagutin O.V., Vinogradova T.V., Frolova I.S., Kuznetsov V.P., Larionov O.A. Human gamma-interferon expression in the mammary gland of transgenic mice. *FEBS Lett.*, 1993, 319(1-2): 181-184.
2. Эрнст Л., Гольдман И., Зиновьева Н. Доклады РАН, 1995, 345(4): 555-558. (Ernst L.K., Gol'dman I.L., Zinov'eva N.A., Bashkeev E.D., Gogolevskii P.A., Kadulin S.G., Brem G. [Development of sheep, transgenic in genetic design of alphaS1-casein/chymosin]. *Dokl. Akad. Nauk*, 1995, 345(4): 555-558).
3. Sobolev A.S., Rosenkranz A.A., Smirnova O.A., Nikitin V.A., Neugodova G.L., Naroditsky B.S., Shilov I.N., Shatski I.N., Ernst L.K. Receptor-mediated transfection of murine and ovine mammary glands in vivo. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273(14): 7928-7933.
4. Kuhholzer B., Prather R. S. Advances in livestock nuclear transfer. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 2000, 224(4): 240-245.
5. Illmensee K. Cloning in reproductive medicine. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2001, 18(8), 451-467.
6. Illmensee K. Biotechnology in reproductive medicine. *Differentiation*, 2002, 69: 167-173.
7. Hochedlinger K., Jaenisch R. Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. *N. Engl. J. Med.*, 2003, 349(3): 275-286.
8. Вепринцев Б.Н., Ротт Н.Н. Консервация генетических ресурсов (Экспериментальные и теоретические предпосылки получения живых животных из клеток, несущих генетическую информацию), ОНТИ НЦБИ Пушкино, 1980.
9. Земскова М.Ю., Никитин В.А., Бендукидзе К.А. Микроинъекция ДНК в ядра соматических клеток. В кн.: "2-е Всесоюзное совещание по генетике соматических клеток в культуре", М., Изд-во атомной энергии АН СССР, 1983: 95.

10. Хохлов А.М., Попов Ю.А., Бондарев В.А., Шишков М.И., Никитин В.А. Комплекс приборов для проведения микрохирургических работ с клетками, яйцеклетками и ранними зародышами. В сб.: "Приборы и лабораторное оборудование для научных исследований по новым направлениям биологии и биотехнологии", Пущино, ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1990: 54-71.
11. Андреева Л.Е., Серова И.А. Повреждающее действие микроманипуляционной техники, применяемой для трансгенеза, на развитие мышей. Онтогенез, 1992, 23(6): 637-643.
12. Walton J.R., Murra J.D., Marshall Y, J.T., Nancarrow C.D. Zygote viability in gene transfer experiments. Biol. Reprod., 1987, 37: 957-967.
13. Solter D. Mammalian cloning: advances and limitations. Nat. Rev. Genet., 2000, 1(3): 199-207.
14. Методы биологии развития. Раздел: Методы изучения кортикальной реакции. М., 1987: 66-73.
15. Никитин В.А., Фесенко Е.Е. Биофизические аспекты реконструкции единичной клетки методами клеточной инженерии. Биофизика, 2006, 51(8): 673-678.
16. Nikitin V.A., Khokhlov A.M., Larin V.T., Fikhte V.A. Procède d'intervention microchirurgicale sur les cellules et dispositif pour sa mise en oeuvre. Patent 2 553 432, France.
17. Иванов Е.Г., Ларин В.Т., Никитин В.А., Попов Ю.А., Хохлов А.М., Шишков М.И., Комаров В.П. Устройство для изготовления стеклянных микроинструментов. Авт. св. № 1183469.
18. Гришин А.Ф., Иванов Е.Г., Никитин В.А., Попов Ю.А., Хохлов А.М., Цалкович А.Э. Способ заточки стеклянных микропипеток и устройство для его осуществления. Авт. св. № 1315248.
19. Чайлахян Л.М., Вепринцев Б.Н., Свиридова Т.А., Никитин В.А. Электростимулируемое слияние клеток в клеточной инженерии. Биофизика, 1987, XXXII(5): 874-887.
20. Yang X., Foote R.H. Production of identical twin rabbits by micromanipulation of embryos. Biol. Reprod., 1987, 37: 1007-1014.
21. Brochart M. Attempted experimental production of identical twins in rabbits. Nature, 1954, 173: 160-162.
22. Ogawa S., Miyake K., Seike N., Kanagwa H. Microsurgical technique for the bisection of early embryos in the mouse, rabbit and cow. Japan J. Anim. Reprod., 1983, 29: 198-208.
23. Hahn J. The value of laboratory animals in embryo transfer research. Theriogenology, 1984, 21: 45-59.
24. Hiroshi H., Ogawa S. Studies on the developmental potential and the survival after the deep freezing of microsurgically dichotomized morulae embryos in rats and rabbits. Japan J. Anim. Reprod., 1981, 27: 12-17.
25. Rottmann O.J., Lampeter W.W. Development of early mouse and rabbit embryos without *zona pellucida*. J. Reprod. Fertil., 1981, 61(2): 303-306.
26. Никитин В.А., Гольдман И.Л., Клецко Н.Г., Волынчук В.Ф. Методические рекомендации по изготовлению и применению микроинструментов для микроманипуляции с эмбрионами млекопитающих. М., Изд-во ВИЖ ВАСХНИЛ, 1987.
27. Бондарев В.А., Иванов Е.Г., Никитин В.А., Попов Ю.А., Хохлов А.М., Цалкович А.Э., Газарян К.Г. Способ разделения яйцеклетки и устройство для его осуществления. Авт. св. № 1327333.
28. Ларин В.Т., Никитин В.А., Хохлов А.М. Микроманипулятор. Авт. свид. № 1229030.

## **Microsurgery methods of embryo enjoneerring for embryo cloning of animals**

V.A. Nikitin

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics,  
Russian Academy of Sciences*

*The great number of developmental anomalies in cloned and transgenic specimens might have been, at least partly, caused by ceel damage during surgery manipulation. Therefore, in our study the new micromanipulator with distant control was constructed and used for nucleus transfer. The ceel is fixed by special capsule-holder without using negative pressure and micro instruments are introduced into the ceel through the lumen of holder. The series of new micro instruments are also developed which permit the nucleus transfer and micro injection into cytosol and in nucleus be performed with minimal damage of cellular membranes. The two-blastomere rabbit embryo is divided by meabs of micro ligature using twj capsule-holders and micromanipulator. Using this method, the viable litter of rabbit was obtained from half-imbryos, including monoval twins. The constructed methods and instruments can be useed not only in laboratory, but in field conditions too.*

*Key words: embryo cloning, cell surgery, micromanipulators, micro instruments, animal cloning*

*Prob. Prod. Anim. Biol., 2007, 2:37-47*