

# 국내·외 소 체세포 복제 연구 동향

이병천, 조종기, 박종임, 황우석

서울대학교 수의과대학

## 서론

우리나라에서 소 수정란 이식은 1979년부터 고 등(1981)에 의해 한우에서 비외과적으로 수정란의 채취와 이식 시험이 이루어졌으며 수정란 이식에 의한 최초의 송아지 생산은 정 등(1983)에 의해 보고되었다. 그 이후 수정란 이식을 통한 산자의 생산은 과배란 유도에 의한 체내 수정란은 물론 체외 수정란(황 등, 1993), 할구 핵이식란(황 등, 1995) 및 형질전환수정란(한 등, 1996) 등에 의해 보고되었다. 그러나 이들 수정란은 산자의 유전 형질 입증과 양적인 생산 가능 면에서 한계가 있다. 이 단점을 보완하기 위해 체세포 핵이식 기법을 소 수정란 이식에 적용하였다. 1997년 Wilmut 등에 의해 면양에서 체세포 복제를 통한 산자의 생산은 Kato 등(1998)에 의해 소에 적용되었고 국내에서는 황 등(1999)에 의해 최초로 Holstein에서 자궁상피세포 유래 복제 송아지가 출산되었고 이 후 한우에서(황 등, 2000) 귀세포를 이용한 산자가 출산되었다. 그러나 체세포 핵이식란의 체외에서 후기배로의 발육률은 우수하였으나 숙란우에 이식 후에 착상 실패, 유·사산 및 거대 태아사 등에 의해 산자 생산을 면에서 크게 떨어지는 실정이다. 이에 소 체세포 핵이식 기법의 실용화를 위하여 핵이식란 생산에 관한 연구에 대해 알아보고 최근 핵이식의 국내외 연구 동향에 대해 검토하고자 한다.

## 체세포 핵이식

소의 체세포 핵이식은 실험실 간 방법의 차이는 있으나 대체적으로 1) 수핵난자(Recipient oocytes)의 확보, 2) 성우로부터 공핵세포(Donor cell) 채취 및 배양, 3) 탈핵(Enucleation), 4) 핵이식(Nuclear Transfer), 5) 융합(Fusion), 6) 체외배양(In vitro culture), 7) 수란우에 이식 (Embryo Transfer) 및 8) 체세포 복제 송아지의 생산의 복잡한 과정을 거치게 된다. 이에 각 단계별 국내외 최근 연구 동향과 산자 출산율을 높일 수 있는 방안에 대해 알아보기로 한다.

## 1. 수핵난자의 준비

수핵난자의 탈핵은 핵이식 과정 중 선행 단계이며 일반적으로 cytoskeleton inhibitor인 cytochalasin B를 처리하여 세포막의 파괴를 제어한 상태에서 미세조작을 통해 실시한다. 수핵난자로는 aged oocyte와 MII(metaphase II) oocyte가 이용되는데 각각의 장단점이 있다. 소에서 aged oocyte는 모든 시기의 공여핵을 받아들일 수 있는 이점이 있으나 이식 후 체세포의 remodeling과 reprogramming에 문제가 있다. 최근 소에서는 aged oocyte보다 MII기의 수핵난이 효율적이라 보고되었으며(Wells 등, 1998), 대부분 MII기의 난을 수핵난으로 이용하고 있다. MII기의 난자를 수핵란으로 이용시 체세포의 remodeling과 reprogramming을 촉진시키며(DiBerardino 등, 1984), MII기의 난자에 수 시간 노출 시 이미 분화된 체세포가 용이하게 전능성을 갖게 되는 이점이 있다고 알려져 있다(Cibelli 등, 1998). 소에서는 MII기의 난자를 수핵란으로 할 경우 탈핵용 피펫으로 흡입시 중기염색체 (metaphase chromosome)가 검경 확인되지 않기 때문에 제 1극체 인접 세포질의 20% 정도를 제거하고 Hoechst 33342 형광염색으로 탈핵된 세포질에서 MII plate를 확인하여 탈핵유무를 판단하게 되며 (blind enucleation) 이로써 세포질 제거의 최소화 및 완전한 탈핵이 보장된다(Tsunoda 등, 1988). 탈핵용 피펫을 이용한 aspiration 방법을 이용하지 않고 저자의 연구실에서는 절개용 피펫으로 절개(cutting)와 탈핵 과정을 동시에 할 수 있는 squeezing 방법으로 탈핵 과정을 간단히 할 수 있었으며 높은 탈핵률을 얻을 수 있었다. 그러나 미세조작에 의한 물리적인 탈핵은 높은 탈핵율이라는 장점을 지니고 있으나 작업에 많은 시간을 요하며 이로 인해 핵이식 효율을 저하시키는 주 요인이 되고 있다. 이의 보완 방안으로 탈핵과정을 간단하고 효율적으로 수행하기 위하여 레이저(Rink 등, 1996)로 염색체를 소락시키거나, 원심분리와 자외선조사를 통한 기능적 핵 제거술이 제시되고 시도되어 왔다(Wagoner 등, 1996).

## 2. 공여핵원용 체세포의 준비 및 이식

체세포의 공여우는 선발 기준에 따라 육질 및 착유량 등에서 유전적 형질이 우수하여야 하며 질병이나 유산 등의 생식기계 병력이 없이 건강하여야 한다. 이론상 성체의 모든 세포는 공여핵원으로 이용될 수 있으며 핵이식을 통한 복제가 가능하다. 지금까지 소 체세포 핵이식에서 이용된 세포는 난구세포(Kato 등, 1998), 난관상피세포(Kato 등, 1998; Goto 등, 1999), 유선세포(Goto 등, 1999), 자궁상피세포(Hwang 등, 1999) 귀섬유아세포(Hwang 등, 2000; Kubota

등, 2000), 난포과립막 세포(Wells 등, 1999) 등 여러 조직의 세포에서 보고되었다. 그러나 아직 공여핵원용 세포의 종류에 따른 핵이식란의 발육률에 대한 보고는 미비한 실정이다. Kato 등(1998)의 보고에서는 난구 및 난관 상피세포 간 유의적인 차이가 없었으며 Wells 등(1999)의 논문에서는 난포과립막 세포가 채취의 용이성과 배반포로의 발육의 높은 효율로 최적의 공여핵원임이 보고되었다. 본 연구실에서는 800kg 이상의 한우에서 각각 난구, 귀섬유아, 난관 상피 및 자궁상피 세포를 채취하여 핵이식에 공여한 결과 난구 및 귀섬유아세포군에서 유의적으로 높은 발육률을 보였다. 체세포의 종류와 함께 공여핵원의 세포 주기도 체세포 복제란 작성시 중요한 요소이다. 소에서 MII기의 난자를 수핵란으로 이용 시 핵형 이상을 방지하기 위해서는 공여핵원은 S기 및 G2기가 아닌 2C(diploid) 상태인 G1기여야 한다(Wells 등, 1999). 공여핵원의 Diploid 상태로 인위적인 조절을 위해 혈청 기아배양을 하여 세포를 휴지기인 G0기로 유도를 하여야 한다. 그러나 아직 G0기로의 유도를 위한 혈청기아배양의 효과에 대해서는 확실하게 정립되어 있지 않다. Willmut 등(1997)은 양 유선세포를 이용한 핵이식에서 혈청기아배양의 중요성을 언급하였으나 Shiga 등(1999)의 실험에서는 공여핵원의 혈청기아배양 여부에 따른 발육률에 유의적인 차이가 없었으며 산자도 보고되었다. 본 연구실의 공여세포 종류에 따른 체세포 복제 수정란의 배 발달에 관한 결과도 유의적인 차이가 없었다(Hwang 등, 2000).

### 3. 세포융합 및 활성화

체세포 핵이식의 미세조작은 수핵난과 체세포의 융합하는 과정으로 종료된다. 그리고 MII기의 난자를 수핵란으로 이용하였으면 단위발생에서처럼 난자의 활성화 과정이 필요하게 된다. 세포융합 방법으로는 화학물질(polyethylene glycol)에의 노출, 불활화된 Sendai virus의 이용 및 전기적 자극 등의 세 가지 방법이 있다. Polyethylene glycol을 이용한 방법은 세포간 융합을 유도에 보편적으로 이용되나 수정란에서는 그 독성 때문에 잘 이용되지 않는다. 마우스 수정란의 경우 분할기 수정란의 융합에 효과적이며 특히 난자의 활성화가 일어나지 않고 세포융합만을 유도하기 때문에 특정 실험에 유용하게 쓰일 수 있다(Graham 등, 1969). 소와 같은 유제류는 난자의 단위발생활성화와 동일한 조건하에서 세포융합이 가능하며 특히 Sendai virus에 의한 융합이 설치류에서처럼 고율의 융합을 나타나지 않기 때문에 전기적 세포 융합법이 선호되고 있다(Willadeson 등, 1996). 소에서 세포융합을 위한 조건은 대개 0.75~

2.0KV/cm의 DC로 15~60 $\mu$ s 동안 1~2회 정도 통전한다. 통전 후 30분 정도에 세포융합 여부를 확인하게 되며 융합되지 않는 수정란은 재차 통전을 실시하여 총 3회 반복으로 세포융합을 실시한다. 통전시 공여핵과 수핵난자는 통전 방향과 일치시켜야 하는데 이를 위해 인위적으로 핵이식란을 배열하거나 융합전 5~10V의 교류전류를 수초간 통전시키는 방법이 이용된다. 체세포 핵이식에서는 할구 핵이식과 달리 공여핵원의 크기가 작기 때문에 일반적으로 인위적인 방법이 효과적이다. Lavoir 등(1997)에 의하면 융합 시 수핵란과 공여핵의 접착력을 증가시키기 위해 미세조작배지에 phytoagglutinin-P를 첨가하거나 Wells 등(1999)에 의하면 공여핵을 이식할 때 수핵란을 탈수시킨 다음 융합 전 원상으로 돌려서 두 세포간 접착력을 증가시키기도 한다.

일반적으로 정자와 융합된 난자는 정자로부터 어떤 인자에 의해 세포내 칼슘이온농도가 증가하고 MPF(maturation/mitosis/meiosis/metaphase promoting factor) 수준의 감소, cortical granule reaction, 감수분열재개 및 제 2극체의 방출 등의 현상을 보인다. 난자의 인위적인 활성화 또는 세포내 칼슘이온의 유입을 통해 수정시 보이는 난자의 활성을 유도하는 것으로 ethanol(7%) 단시간 노출법, 통전법 및 Ca-ionophore와 ionomycin등의 화학물질에 의한 활성화가 있다. 활성화 후 MPF의 재상승을 막기 위해 단백질합성억제제인 cyclohexamide와 인산화억제제인 6-dimethylaminopurine을 이용한다. 이와는 별도로 정자로부터 유래한 활성화 유도인자를 추출하여 난자의 활성화를 유도하는 연구도 수행되고 있다 (Swann 등, 1990). 만일 정자로부터 좀 더 순수한 인자를 분리해 낼 수 있다면 핵이식 수정란의 활성화시 생리학적으로 좀 더 나은 칼슘반응을 유도할 수 있을 것으로 생각된다. 소 체세포 핵이식시에는 전기적 활성화 방법보다는 화학적 방법이 효과적임이 보고되었다(Wells 등, 1999). 그리고 소 체세포 핵이식에서 활성화는 융합과 동시에 실시한 것보다 융합 수 시간 후 실시한 군에서 높은 발육률을 보였다 (Wells 등, 1998; Wells 등, 1999). 지연 활성화의 효과는 저자의 연구실의 결과에서도 입증되었다 (Shin 등, 2000).

할구와는 달리 이미 분화가 된 체세포를 MII기의 난자에 이식하여 높은 MPF 수준의 세포질에 수 시간 노출 시 핵의 remodeling과 reprogramming을 촉진시킨다고 보고되고 있다. 이때 공여핵원이 diploid 상태여야 하는데 공여핵원이 대부분 S, G2기인 할구 핵이식과 달리 체세포 핵이식에서는 큰 문제가 되지 않는다. 이 결과는 다른 동물에서도 적용되었다(Wakayama 등, 1998). 또한 Shin 등(2000)의 결과에서도 융합 후 활성화군에서 높은 발육률을 보였다. 단위발생시에는 제 2극체의 방출을 막아 diploid 상태를 유지하기 위해

cytochalasin B에 노출시키기도 하는데 핵이식과정에서도 융합 후 1시간 정도 cytochalasin B를 처리하는 방법이 이용되기도 한다(Smith 등, 1989; Collas 등, 1990). 그 기전은 아직 완전히 밝혀지지 않았으나 단위발생에서와 마찬가지로 haploidization 및 aneuploidy를 방지하는 역할을 하는 것으로 생각되고 있다. 그러나 소에서는 이방법이 유효하지 못하다는 주장도 있어(Levenduski 등, 1990) 모든 동물종에서 통용될 수는 없거나 노출시간 및 적정농도 조건이 종간에 상이할 가능성도 추정할 수 있다.

#### 4. 체세포 핵이식란의 배양 및 대리모에의 이식

핵이식란의 배양 및 이식은 일반 수정란의 경우에서와 동일하게 적용되며 융합 후 정상적으로 분할한 핵이식란의 경우 배반포로의 발생률은 일반적인 체외수정란과 큰 차이를 보이지 않는다. 융합 된 수정란 기준 50% 이상의 배반포로의 발육률을 보인다. 그러나 핵이식 배반포를 이식한 후의 산자 생산율은 10% 이하로 체외수정란에 비해 매우 저조하며 이는 착상의 실패 등 조기 태아사가 주요 원인 것으로 생각되고 있다. 착상 후 거대태아의 발육이 지적되는데(Behboodi 등, 1995) 이는 핵이식란에서만 문제가 아닌 수정란의 체외조작시 대부분 나타나는 현상으로 배반포의 elongation 과정시 내부세포피의 비해서 영양막세포가 우선 증식하여 태반이 정상보다 확대되고 이후 태아의 성장에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 한편 착상 전 수정란의 체외조작 혹은 체외배양시 성장에 관여하는 하나 또는 그 이상 유전자의 이상발현, 탈핵시 세포질의 제거, 체외배양시 세포질의 fragmentation, 세포질내 mitochondria의 손상, 외래 progesterone의 투여 및 asynchronous embryo transfer 등도 요인으로 제기되고 있다. 최근 체세포 핵이식란의 착상 실패에 대하여 일반 체외수정란과의 분자생물학적 비교 보고에 의하면 마우스에서 착상과 착상 후 초기 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 IL6, FGF4 및 FGFR2 gene의 transcription의 이상을 보였다(Daniels 등, 2000). 세포질의 부분적 제거 및 fragmentation은 핵과 세포질내 소기관의 정상 반응에 장애를 가져오고 착상 전후 외래 progesterone 투여는 영양막세포의 조기 elongation을 유발하는 것으로 알려져 있다(Walker 등, 1996). 배양시 첨가하는 혈청 또한 직·간접적으로 genome 혹은 mitochondria와 같은 세포질내 소기관에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 혈청대신 BSA 및 아미노산의 경우 mitochondria의 변성현상을 유발시키지 않는 것으로 보고되고 있다(Dorland 등, 1994).

핵이식을 통한 동물의 생산이 완전한 복제를 의미하는 것은 아닐 수 있다. 왜냐하면 동일한 공여핵을 이용한 산자는 핵은 공유하고 있으나 수핵난자가 다를 경우 mitochondria에 의한 영향을 받아 일정수준의 유전적 특성을 달리 할 수 있기 때문이다. 특히 유 생산이나 번식성등은 세포질내 mitochondria DNA와의 유관성이 제기되어, 향후 실용화 추구하고 동시에 이 측면에서의 검토도 병행되어야 할 것이다.

## 5. Reprogramming

이식된 공여핵은 수핵난자의 낮은 환경에 놓여지며 개체발생을 위한 정상적 발육은 유전자발현을 변형시킬 수 있는 세포질의 능력에 좌우된다. Reprogramming은 핵이식 후 수정란이 정상적인 수정란처럼 분할 및 발육에 적응하는 과정을 뜻하며 다음의 몇 가지 사실이 이의 증거가 된다. 첫째, 핵이식란이 배반포와 같은 특정단계까지의 소요기간이 일반적인 체외수정란의 배양시간과 큰 차이가 없다. 둘째, 공여핵의 핵막이 마치 전핵에서처럼 심하게 종대되는 현상(nuclear swelling)을 보인다. 융합 후 2시간 이내에 핵막의 종대가 나타나지 않으면 배반포로 발육되지 않는 것으로 알려져 있다. 셋째, transcription이 신속하게 억제된다는 사실이 핵소체와 RNA, peptide의 관찰에 의해 확인되었다. 넷째, nuclear lamins 및 ribosomal protein을 포함한 특정분자의 변화상을 들 수 있다. 수정시 정자는 protamine과 같은 독특한 형태의 핵단백질을 지니고 난자에 들어오게 되는데 핵이식시의 공여핵은 protamine이 존재하지 않는다. 그러나 핵이식란은 융합 후 이런 특정 핵단백질이 나타나며 이와같은 현상은 세포질내의 특정단백질이 DNA와 결합, 즉각적인 유전자발현을 통해 나타나게 된다. 어떤 경우에는 methylation이 이러한 변화를 촉진시키는 것으로 알려져 있다.

## 6. Telomere 길이의 분석

Telomere는 진핵세포의 염색체의 말단 부위에 위치 염색체의 유지에 중요한 역할을 한다. 인간에서는 나이가 들수록 telomere의 길이가 점점 짧아진다. Dolly의 경우 정상적인 3세의 양보다 telomere의 길이가 5,000 base만큼 짧은 것으로 보고되었다(Shields 등 1999). 일반적으로 1세부터 6세까지 1년에 590 base만큼 짧아진다. 그리고 세포를 배양 시 분열할 때마다 약 157 base 만큼 짧아진다. 그러나 핵이식에서는 이런 telomere의 파괴가 복구되지 않는다. Telomere shortening에 대한 추가적인 연구가 필요하며 계대 배양 회수를 줄임으로써 shortening을 완화시킨다고 한다(Shields 등, 1999).

## 소 체세포 복제의 효용성

### 1. 유전능력 개량

동물복제기술은 유용가축의 유전능력을 개량하며 축산농민의 소득을 향상시키고 인류의 식량문제를 해결하는데 현존하는 어느 방안보다도 효과적이다. 특히 우리나라와 같은 고능력 유전자원도 부족하여 척박한 토양과 협소한 국토를 지닌 국가에서는 검증된 고능력 유전형질을 지닌 가축으로부터 공여핵을 채취하여 이를 대량복제하고 농가에 보급함으로써 생산성을 현저히 향상시킬 수 있게 된다. 현재 국내 젖소의 두령 연간 우유생산량은 축산선진국에 비해 낮은 실정이다. 그러나 착유량면에서 고능력우를 체세포 복제하여 이를 대리모에 이식함으로써 우수한 송아지를 생산 보급이 필요하다. 이와 같은 의도가 산업화 수준에 달성된다면 낙농생산성은 현재보다 수배 향상될 것이며 기타 산업동물에 복제기술을 적용시켜 소에서와 같이 유전능력을 향상시킬수 있는 수단으로 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

### 2. 체세포 복제 기술을 이용한 형질전환 소의 생산

형질전환동물의 생산과 같은 생명공학은 21세기를 주도할 산업부분으로 예측되고 있다. 그러나 형질전환동물은 원하는 유전형질의 발현율이 낮고 외부 환경에 대한 저항성, 번식성 등이 취약한 문제점으로 지적되고 있다. 이러한 단점은 복제기술에 의해 대부분 극복될 수 있을 것이다. 양에서 형질전환 동물 생산을 위한 전핵 미세주입법과 형질전환된 체세포 복제와 비교 결과 체세포 복제가 효과적이라 보고되었다(Table 3; Schnieke 등, 1997). 이와같은 체세포 복제기술의 실현은 현재 막대한 비용과 장기간이 소요되는 형질전환동물의 생산을 실용화시킬 수 있는 핵심 기술이 될 것이다. 그 결과 인간에 유익한 생리활성물질을 대량생산할 수 있으며 난치성 질환을 해결하는 하나의 방법으로도 적용할 수 있게 된다. 또한 인간장기 제공용 형질전환동물의 대량생산에도 이용될 수 있다고 본다.

Table 1. Comparison of development rates of reconstructed embryos according to laboratory after bovine somatic cell nuclear transfer

	Hwang <sup>11)</sup>	Wells <sup>28)</sup>	Kato <sup>12)</sup>	Hill <sup>9)</sup>	Goto <sup>7)</sup>	Kubota <sup>13)</sup>
Donor cell	Ear fibroblast	Mural granulosa	Cumulus & Oviduct	Sub cutaneous	Oviduct & Mammary	Ear fibroblast
Serum starvation	Starved	Starved	Starved	Starved	Starved	Non-starved
Fusion rate(%)	63.3	77.4	56.6	59	69.0	36
Cleavage rate(%)	93.4	-	86.4	-	71.7	78
Bl. rate(%)	40.6	69.4	30.4	28	39.4	28

Table 2. Comparison of techniques of bovine somatic cell nuclear transfer according to laboratory

	Hwang <sup>11)</sup>	Wells <sup>28)</sup>	Kato <sup>12)</sup>	Hill <sup>9)</sup>	Goto <sup>7)</sup>	Kubota <sup>13)</sup>
Enucleation	Squeezing	Aspiration	-	Aspiration	Squeezing	-
Fusion condition	2DC, 15 $\mu$ s, 1.75KV/cm	2DC, 15 $\mu$ s, 2.25KV/cm	2DC, 25 $\mu$ s, 1.5KV/cm	2DC, 20 $\mu$ s, 1.6KV/cm	1DC, 50 $\mu$ s, 2.5KV/cm	2DC, 10 $\mu$ s, 2.5KV/cm
Activation method	Ionomycin FBA <sup>1)</sup>	Ionomycin FBA	Electrical SFA <sup>2)</sup>	Ionomycin FBA	Ca-ionophore SFA	Electrical SFA
Postactivation	6-DMAP <sup>3)</sup>	6-DMAP	Cyclohexa-mide	Butyrolactone - I	Cyclohexa-mide	Cyclohexa-mide
Culture medium	mCR1aa	SOF	CR1aa	CR1aa	CR1aa	CR1aa

\*fusion medium : Zimmerman fusion medium

<sup>1)</sup>FBA: fusion before activation

<sup>2)</sup>SFA: simultaneous fusion and activation

<sup>3)</sup>6-DMAP: 6-dimethylaminopurine



Table 3. Comparison of the production of transgenic sheep by nuclear transfer or pronuclear microinjection\*

Parameter	Pronuclear microinjection (1989-1996)	Nuclear transfer of PDFF2 transfectants
Oocyte donors	982	68
Intermediate recipients**	Not applicable	14
Final recipients	1895	22
Total number of sheep used	2877	104
Established pregnancies (% of final recipients)	912(48%)	9(41%)
Lambs born	1286	6
Viable transgenic lambs born***	56	5
Percentage of offspring transgenic	4.35%	100%
Sheep required for production of one transgenic lamb'	51.4	20.8

\*This table was referred from Schnieke's report (Schnieke et al, 1997)

\*\*After nuclear transfer, intermediate recipients are used to allow development of reconstructed embryos to blastocyst stage

\*\*\*Defined as those alive at 1 week of age.

### 참고문헌

1. Behboodi E, Anderson GB, BonDurant RH, Cargill SL, Dreuscher BR, Medrano JF, Murray JD. 1995. Birth of large calves that developed from in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology*. 44:227-232.
2. Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Robl JM. 1998. Cloned transgenic calves produced from non-quiescent fetal fibroblasts. *Science*, 280:1256-1258.
3. Collas P, Robl JM. 1990. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. *Bio Reprod*. 42:877-884.
4. Daniels R, Hall V, Trounson AO. 2000. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. *Bio Reprod*. 63:1034-1040.
5. DiBerardino MA, Hoffner NJ, Etkin LD. 1984. Activation of dormant genes in specialized cells. *Science*, 224:946-952.

6. Dorland M, Gardner DK, Trounson AO. 1994. Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in ovine embryos. *J Reprod Fert.* 1994. 13:25.
7. Goto Y, Kaneyama K, Kobayashi S, Imai K, Kojima T. 1999. Birth of cloned calves derived from cultured oviductal epithelial cells of a dairy cow. *Anim Sci J.* 70(4):243-245.
8. Graham CF. 1969. The fusion of cells with one- and two-cell mouse embryos. *Wistar Inst Symp Monogr.* 9:19.
9. Hill RH, Winger QA, Long CR, Looney CR, Thompson JA, Westhusin ME. 2000. Developmental rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Bio Reprod.* 62:1135-1140.
10. Hwang WS, Shin TY, Park JI, Roh SH, Lee BC. 1999. Production of Holstein and Korean Native Cattle Cloned by Somatic Cell Nuclear Transfer(SNT) in Korea. *Transgenic Animal Research Conference.*
11. Hwang WS, Park JI, Cho JK, Shin SJ, Kim KY, Shin TY, Roh SH, Lee ES, Lee BC. 2000. Cloning of HanWoo (Korean Native Cattle) by somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology,* 53(1):220.
12. Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Tsunoda Y. 1998. Eight clones cloned from somatic cells of a single adult. *Science,* 282:2095-2098.
13. Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, Mizoshita K, Tobara N, Barber M, Yang X. 2000. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *PNAS* 97:990-995.
14. Lavoie MC, Rumph N, Moens A, King WA, Plante Y, Johnson WH, Ding J, Betteridge KJ. Development of bovine nuclear transfer embryos made with oogonia. *Biol Reprod.* 56:194-199.
15. Levenduski MJ, Westhusin ME. 1990. Effect of cytoskeletal inhibitor on fusion and development. *Theriogenology.* 33:273.
16. Rink K, Descloux L, Delcar taz G. 1996. Zona pellucida drilling by a 1.48 $\mu$ m laser: influence on the biomechanics of the hatching process. *Proc SPIE.* 2624:27-32.
17. Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A, Campbell KHS. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science.* 278:2130-2133.

18. Shiels PG, Kind AJ, Campbell KHS, Waddington D, Wilmut I, Colman A, Schnieke AE. 1999. Analysis of telomeres lengths in cloned sheep. *Nature*. 399:316-317.
19. Shiga K, Fujita T, Hirose K, Sasae Y, Nagai T. 1999. Production of calves by transfer of nuclei from cultured somatic cells obtained from Japanese black bulls. *Theriogenology*, 52:527-535.
20. Shin SJ, Lee BC, Park JI, Yong HY, Roh SH, Shin TY, Hwang WS. Effect of various activation conditions on the development of somatic cell nuclear transfer embryos in "HanWoo". *Ani Reprod*. 14(2): 19:2.
21. Smith LC, Wilmut T. 1989. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vivo of sheep embryos after nuclear transplantation. *Bio Reprod*. 40:1027-1035.
22. Swann K. 1990. A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. *Development*. 110:1295-1302.
23. Tsunoda Y, Shioda Y, Onodera M, Nakamura M, Ochida T. 1988. Differential sensitivity of mouse pronuclei and zygote cytoplasm to Hoechst staining and ultraviolet irradiation. *J Reprod Fert*. 82:173-178.
24. Wagoner EJ, Rosenkrans CF, Gliedt Jr DW, Pierson JN, Munyon AL. 1996. Functional enucleation of bovine oocytes: effects of centrifugation and ultraviolet light. *Theriogenology*. 45:111-120.
25. Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394:369-374.
26. Walker SK, Hartwich KM, Seaman RF. 1996. The production of unusually large offspring following embryo manipulation concepts and challenges. *Theriogenology*. 45:111-120.
27. Wells DN, Misica PM, Tervit HR, Vivanco WH. 1998. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. *Reprod Fertil Dev*. 10:369-378
28. Wells DN, Misica PM, Tervit HR. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod*, 60:996-1005.
29. Wiladson SM. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*. 320:63-65.

30. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385:810-813.
31. 고광두, 정길생, 이기만. 1981. 한우의 수정란 생산에 관한 연구Ⅲ. 수정란의 비외과적 채취와 이식. *한우축산학회지*, 23: 331-337.
32. 정길생, 윤종삼, 이훈택, 유승환, 김정익. 1983. 수정란이식에 의한 우의 쌍태우기에 관한 연구Ⅲ. 비외과적으로 이식한 신선 및 동결수정란의 분만성적. *한국축산학회지*, 25:424-429.
33. 한용만, 김선정, 유대열, 박정선, 이철상, 정상균, 박인영, 손보화, 최영희, 남명수, 이훈택, 정병현, 정길생, 고대환, 김영훈, 양철성, 유욱준, 이경광. 1996. 락토페린을 이용한 우유에서 생산하는 형질전환 젖소의 개발에 관한 연구. *한국가축번식학회지*. 20(4):371-378.
34. 황우석, 조충호, 이병천, 신태영, 노상호, 김성기, 전병준, 이강남, 신언익, 임홍순. 1993. 한우정액 유래 체외수정 송아지 생산에 관한 연구, *한국수정란이식학회지*, 8(2): 143-149.
35. 황우석, 조충호, 한재용, 이병천, 신태영, 이원유, 송길영, 민순기, 김영찬, 구자홍, 이윤수, 민종식, 김기영, 김준선, 장중명, 임홍순, 이광원, 이수현, 김용길, 이후식. 1995. 소 핵이식 수정란에 의한 산자 생산에 관한 연구, *한국수정란이식학회지*, 10(1):83-90.