

한우 체외수정란을 이용한 핵 이식배의 체외발달에 관한 연구

박충생 · 공일근 · 노규진* · 이효종* · 최상용*

경상대학교 축산학과

***In Vitro* Development of Nuclear Transplantation Bovine Embryos Using *In Vitro* Fertilized Embryos of Korean Native Heifers**

Park, C. S., I. K. Kong, G. J. Rho*, H. J. Lee* and S. Y. Choe*

Department of Animal Science, Gyeongsang National University

SUMMARY

To improve nuclear transplantation(NT) efficiency and to produce a large scale genetically identical cloned calves, examined the *in vitro* development capacity after co-culture of bovine oviductal epithelial cells (BOEC) and granulosa cells in TCM-199 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) with early bovine embryos derived from *in vitro* matured-fertilized (IVM-IVF) oocyte. In addition, the age dependence of IVM oocyte on electro-stimulation and the effective electric voltage on *in vitro* development of bovine NT embryos were examined. The results obtained were summarized as follows;

1. The cleavage rates of IVM-IVF bovine embryos in co-culture with bovine oviductal epithelial cells and granulosa cells were not significantly different($P < 0.05$), but the developmental rate into morula and blastocyst stage were different showing 38.3 and 20.2%, respectively.
2. The activation (82.5%) and development *in vitro*(8.6%) into later embryo stages of the aging oocytes of 32 hours post-maturation (hpm) were significantly higher than those of 24 hpm at direct current (DC) voltage of 1.5 kV/cm, 60 μ sec pulse duration and 1 pulse time.
3. The fusion rates of NT eggs of 32 hpm following to different DC voltages from range 0.75 to 1.5 kV/cm were not differ, but the developmental rate into morula and blastocyst stages at DC voltages of 0.75 and 1.0 kV/cm were higher(11.4 and 12.6%, respectively) than those of 1.5 kV/cm (0 %).

From these results, it can be suggested the optimal culture system for *in vitro* culture of IVM-IVF bovine embryos is a co-culture system with BOEC in TCM-199 supplemented 10% FCS. The effective time and the DC voltage for activation, electrofusion and *in vitro* development of NT embryos derived from IVM-IVF bovine embryo are 32 hpm and 0.75~1.0 kV/cm. But to improve NT efficiency, the advanced research (cell cycle synchronization, micro-manipulation, culture system, etc.) is needed.

(Key words : Korean native heifer, *in vitro* culture, activation, nuclear transplantation)

* 이 연구는 1993년도 교육부에서 지원한 유전공학 학술 연구 조성비로 연구되었음.

* 경상대학교 수의학과 (Department of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University)

I. 서 론

하나의 수정란으로 부터 분리된 개개의 핵을 공핵란으로 이용해서 제핵된 난자에 이식하여 생산된 핵이식 배는 모두 유전적으로 동일한 형질의 산자를 만들게 되며, 이렇게 복제된 배는 가치가 있는 유전자를 동시에 함유할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

1952년 Briggs와 King이 양서류에서 핵이식된 배를 이용하여 산자를 생산하였으며, 포유류에서는 1983년 McGrath와 Solter가 생쥐에서 핵이식을 성공시킨 이래, rat (Kono 등, 1988), 토끼 (Stice와 Robl, 1988; Collas와 Robl, 1990; Lee 등, 1994), 돼지 (Prather 등, 1987) 그리고 양(Willadson, 1986; Smith와 Wilmut, 1989) 등에서도 핵이식에 의한 산자를 생산하는데 성공함으로써 핵이식 기술의 응용으로 복제동물의 생산 가능성이 입증되었다. 그러나 핵이식 실험의 대부분은 체내에서 배란된 난자를 사용하였으며, 그에 따른 공시 난자 수급의 어려움과 경제적인 측면에서 많은 제한적인 요인이 되고 있다. 이러한 어려움을 극복하기 위해서 도축장에서 수집한 난소에서 채란하여 체외성숙시킨 난자를 이용하고자 노력하고 있으나, 체외성숙된 난자는 체내성숙된 난자보다 질적인 면에서 좋지 않아 핵이식의 성공율이 저조하다고 보고하였다(Bondioli 등, 1990; Clement-Sengewald 등, 1992; Barnes 등, 1993).

체외성숙 난자의 핵이식시 배반포기배의 발달율과 평균 할구수는 많은 저해 요인에 의해서 발달이 저조하여, 체외수정 및 체외배양한 배반포기배 평균 할구수의 1/3~1/4 정도의 수준에 이른다. 이러한 원인은 수핵난자의 미세조작에 의한 세포질의 손상(Yang과 Foote, 1990), 공핵란의 세포발달주기의 불확실(Collas 등, 1992), 전기자극의 조건 및 난자의 성숙도(Yang, 1991) 그리고 좋지 못한 배양 체계 등에 의해서 특정 수정란 발달단계에서 발달중지현상(cell block)과 평균 할구수의 현저한 저하 등이 나타난다.

난자의 세포질은 핵의 생존성에 중요한 작용을 하며, 특히 모체유전자에서 수정란유전자로 유전적 조절을 전이하는 조절인자를 가지고 있다. 제핵을 하기 위해서 미세조작으로 세포질의 일부분을 제거함으로써 할구 당 세포질의 양적 감소는 평균 할구수와 배반포

기배까지의 발달을 저하 및 배반포기배의 형성시간이 지연되며(Evsikov 등, 1990), 또한 퇴행배를 유발하여 결과적으로 비정상적인 산자를 생산하게 된다(Yang, 1991).

성숙된 난자는 이식된 핵을 재프로그래밍하여 새로운 배로 발달시킬 수 있으며(Robi와 Stice, 1989; Prather, 1989), 핵이식된 난자는 활성화 후 핵 swelling, 핵막 붕괴 및 미성숙 염색체의 농축 등을 포함한 재모델을 하기 위해서 수핵란과 공핵할구의 세포발달주기의 동기화가 핵이식배의 발달에 큰 영향을 미친다고 보고하였다(Prather 등, 1987; Stice와 Robl, 1988). 특히 난자의 활성화, 공핵할구와 수핵란의 융합 및 배발달율의 상승을 위한 적정 전기자극과 난자의 성숙도 또한 중요한 요인으로 작용하고 있다.

이와 같이 핵이식의 생산성 효율을 상승시키기 위해서 다각적인 측면에서 문제 제기와 연구가 진행되고 있지만, 아직까지 만족할 만한 성적은 기대하지 못하고 있는 실정이다. 따라서 본 실험에서는 핵이식배의 배양에 적용하기 위한 체외수정란의 배양체계를 구축하고 난자 활성화를 위한 난자의 age 및 핵이식 배의 융합과 발달율에 따른 전기 자극조건을 조사하여 체외수정란을 이용한 핵이식기술의 적정 체계를 확립하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 체외성숙 난자 및 체외수정란의 준비

본 실험에 사용된 난소는 도살 직후 적출하여 penicillin G(100 units/ml)와 streptomycin(100 μ g/ml)이 함유된 생리식염수(25~28 $^{\circ}$ C)에 넣어 2 시간 이내에 실험실로 운반하여 직경이 2~6 mm내의 난포에서 미성숙난포란을 채란하였다. Wiemer 등(1991)의 방법에 준하여 미성숙 난포란들을 난구세포층과 세포질의 충실도에 따라 Grade I, II 및 III으로 구분하고 본 실험에서는 Grade I 만 선별하여 fetal calf serum(FCS; Gibco)이 10% 수준으로 첨가된 TCM-199(Earle's salt, 25mM Hepes, Sigma)에 sodium pyruvate(56 μ g/ml), streptomycin(100 μ g/ml), penicillin G(100 units/ml), amphotericin B(25 μ g/ml), LH(10 μ g/ml), estradiol-17 β (1 μ g/ml)와 FSH(35 μ g/ml)를 첨가하여

제조된 배양액을 4-well dish(Nunc)에 1ml씩 분주하여 CO₂ 배양기(39°C, 5% CO₂ in air)에서 최소한 18시간 이상 평형시킨 다음 체외성숙을 실시하였다. 즉, 각 well당 10~15개의 미성숙난포란을 옮겨 넣은 후 22~24시간 배양하여 체외성숙을 유도하였고, 체외수정은 Goto 등(1988)의 방법에 준하여 실시하였으며, 수정용 정자는 정소상체 미부정자를 이용하였다.

2. 수정란 및 핵이식배의 체외배양

체외수정 후 회수된 수정란을 TCM-199(10% FCS)배양액에 단층을 형성하고 있는 난관상피세포나 granulosa cell과 각각 공배양하여 체외배양을 유도하였다. 배양액은 48 시간마다 신선배양액으로 교환하여 수정 후 7~9일 까지 각각의 배양체계에 대한 배발달율을 비교 조사하였으며, 핵이식배는 난관상피세포와 공배양하였다.

3. 미세조작에 의한 탈핵 및 핵의 주입

22~24 시간 체외성숙된 난자의 난구세포를 hyaluronidase(300 IU/ml)로 제거한 후 제 1극체가 확인되고 세포질이 균일한 것만을 수핵난자로, 체외수정 후 8~16-세포기의 배를 pronase(300 IU/ml)로 투명대를 연화시켰다. 그리고 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺-free Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS)에서 2~3분 처리후 pipetting에 의해 활구를 분리하여 공핵란으로 공시하였으며, 수핵난자와 공핵활구를 cytochalasin B(Sigma)가 7.5 µg/ml 함유된 D-PBS액에 미세조작 10분전에 전처리하고 Willadsen(1986)의 방법에 준하여 제핵 및 핵의 주입을 실시하였다. 제핵은 제 1극체와 그 주변의 세포질을 약 1/4 정도 흡입하여 제거하고, 공핵활구를 위관강에 주입하였으며, 핵이식된 난자는 TCM-199(10% FCS)배양액에서 다음 단계인 전기융합할 때까지 배양하였다.

4. 난자의 활성효율과 전기융합

난자의 단위발생에 따른 전기적 활성화 및 핵이식된 난자의 융합을 위한 배양액은 100 µM CaCl₂ 및 MgCl₂, 0.05 mg/ml BSA가 함유된 0.3 M mannitol 용액을 이용하였다. 체외성숙된 난자는 체외성숙 후 24, 28 및 32시간에 1.5 kV/cm의 전기자극을 가하여

단위발생을 유도하였다. 핵이식된 난자를 체외성숙 후 32시간에 미소적의 mannitol용액으로 옮겨 +극에 할 구세포를, -극에 난세포질이 일직선 상에 놓이도록 배열하고, 두 전극을 Embryonic Cell Fusion Equipment (EYELA)에 장치하여 60 sec, 1 회에서 0.75, 1.0 및 1.5 kV/cm 를 가해 각각의 전압에 따른 핵의 융합과 배발달율을 비교 조사하였다.

5. 통계학적 분석

실험 결과의 통계학적 분석은 X²-test를 실시하여 유의차를 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 공배양조건에 따른 체외수정란의 배발달율

난관상피세포와의 공배양은 소에서 8~16세포기의 cell block 현상을 극복하며 배발달율의 향상에 도움을 준다. 이에 관한 기전은 아직 정확히 밝혀져 있지 않으나 배양액내에 배의 영양인자 제공과 배발달 억제 물질제거 등과 같은 작용기전이 제시되고 있다(Eyestone과 First, 1989; Eyestone 등, 1990). 또한 다양한 체세포도 공배양에 이용되고 있으며 이러한 체세포들과의 공배양도 배발달을 개선시킨다고 보고하였다(Rexroad, 1989; Aoyagi 등, 1990). 본 연구에서 다른 공배양조건이 배발달에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 각 배양군의 분할율에 있어서 공히 약 80%로 차이가 없었으나, 상실배와 배반포기배까지의 발달율은 난관상피세포와의 공배양이 38.3%로써 granulosa cell과는 유의적인 차이를 보였다(P<0.05). 이는 Eyestone과 First(1989)의 보고와 일치되며, 특히 난관상피세포에서 분비되는 단백질은 배란된 난자의 투명대에 결합하여 위관강내로 전이되어 정상적인 배발달과 배발달의 촉진인자로 작용한다는 보고가 있다(Gandolfi와 Moor, 1987). 그러므로 체외수정란과 난관상피세포의 공배양법이 배발달율 향상에 효과적이며, 핵이식배의 체외배양에 있어서도 난관상피세포와의 공배양이 적합할 것으로 사료된다.

2. 수핵난자의 성숙도 따른 활성화 효율

체외성숙란의 활성화효율을 조사하기 위하여 60µ sec의 통전시간과 통전횟수를 1회로 고정하고 전압을

Table 1. Effect of co-culture cell types on *in vitro* development of IVM-IVF bovine embryos

Cells for co-culture	No. of oocytes inseminated	No. (%) of embryos cleaved	No. (%) of embryos developed to		
			Morula	Blastocyst	Mor. & Blast.
Oviduct	107	90(84.1) ^a	26	15	41(38.3) ^b
Granulosa	84	67(79.8) ^a	14	3	17(20.2) ^a

* Values with different superscripts were significantly different (P<0.05).

Table 2. Effect of age of oocytes on activation and *in vitro* development of IVM bovine oocytes

Age of oocytes (hrs. post-maturation)	No. of oocytes used	No. (%) of oocytes activated	No. (%) of eggs developed to /activated		
			2-cell	8-cell	Mor. & blast.
24	47	26(55.3) ^a	26	6(23.1)	1(3.9) ^a
28	97	74(76.3) ^b	74	30(40.5)	12(16.2) ^b
32	137	113(82.5) ^b	113	51(45.1)	21(18.6) ^b

Electric voltage : 1.5 kV/cm, pulse duration : 60 μ sec, pulse times : 1

* Values with different superscripts were significantly different (P<0.05).

1.0, 1.5 및 2.0 kV/cm로 각각 통전자극한 결과 1.5 kV/cm에서 활성화율(63.5%)과 후기배로의 발달율(9.7%)이 가장 높았다(미발표성적). 그러므로 난자의 성숙시간에 따른 활성화율 및 후기배로의 발달율을 조사하기 위한 통전은 60 μ sec의 통전시간과 1회의 통전횟수 및 전압 1.5 kV/cm로 실시한 바, Table 2와 같다. 체외성숙 후 24시간 보다 다소 'aging'이 된 32시간의 난자에서 82.5%의 활성화율과 18.6%의 상실배 및 배반포기배의 발달을 보였다. 이는 28시간의 성적과 유사했지만, 24시간의 성적과는 유의적인 차이를 보였다(P<0.05). 이렇게 'aging'된 난자가 활성화효율이 높은 것은 Ware 등(1989), Collas와 Robl(1990) 그리고 Yang 등(1991)의 보고와 일치하는 결과였다. 그러므로 체외성숙란의 활성화를 위한 전기자극의 시간은 체외성숙 후 32시간대가 적합한 것으로 사료되어 이후의 실험에서는 핵이식배의 융합시간을 체외성숙 후 32시간에 실시하였다.

3. 핵이식배의 체외발달율

제 2감수분열 중기의 염색체를 제거하기 위해서 체외성숙된 소 난자의 제핵물은 성숙 22~24 시간에서 가장 좋은 반면 성숙시간이 경과될수록 제핵물은 떨어지며, 전기적 활성화는 이와 반대의 경향을 보였다. 즉 성숙 22~24시간에 활성화는 거의 일어나지 않고 시간이 경과함에 따라 활성화의 효율이 증가하는 것으로

알려져 있다(Nagai, 1987; Ware 등, 1989; Yang 등, 1993). 22~24시간 성숙시킨 난자의 핵은 제 1극체 주변의 세포질에 존재하지만 성숙시간이 경과되면 중앙으로 이동하기 때문에 제핵의 어려움이 따른다. 특히 소(Prather 등, 1987), 돼지(Prather 등, 1989), 양(Smith와 Wilmut, 1989)의 세포질은 어둡기 때문에 핵이 보이지 않으므로 'blind aspiration'에 의해 제거해야 하므로 핵이 중앙으로 이동을 하면 제핵에 어려움이 많다. 그러므로 성숙 후 22~24시간에 제핵하고, 전기활성화의 효율을 높이기 위해서 탈핵된 난자를 8~18시간 더 'aging' 시킴이 좋은 분할율을 나타내며(Ware 등, 1989; Yang, 1991), 전기융합율은 대체적으로 70~80%를 나타낸다고 보고하였다.

본 실험에서 체외성숙 후 22~24시간에 제핵하고 8~16세포기의 할구를 핵이식하여 8~10시간 TCM-199 배양액에 평형시킨 후 60 μ sec의 통전시간과 통전 횟수를 1회로 고정하여 전압을 0.75, 1.0 및 1.5 kV/cm로 전기융합을 실시하여 융합율과 핵이식배의 발달율을 조사하였다. 융합율에 있어서는 각기 다른 전압에 대해 차이는 없었으나 후기배로의 발달율에 있어서 0.75 및 1.0 kV/cm에서는 11.2와 12.6%의 성적을 보였으나 1.5 kV/cm에서는 후기배로의 발달을 볼 수 없었다(Table 3). 이러한 원인이 높은 통전 때문이라고 보고한 Kono 등(1989)의 결과와 일치했으나, 높은 통전자극 뿐만 아니라 미세조작에 의한 난세

Table 3. Effect of electric voltage on *in vitro* development of bovine nuclear transplanted embryos

Electric voltage (kV/cm)	No. of oocytes used	No. (%) of embryos fused	No. (%) of embryos developed to /fused		
			2-cell	8-cell	Mor. & Blast.
0.75	53	44(83.0) ^a	33	13	5(11.4) ^a
1.0	137	119(86.9) ^a	87	33	15(12.6) ^a
1.5	42	26(72.2) ^a	10	2	0(0.0) ^b

Pulse duration : 60 μ sec, pulse times : 1

Enucleation time : 22~24 hours post-maturation, fusion time : 32 hours post-maturation

** Values with different superscripts were significantly different ($P < 0.05$).

포질과 원형질막의 취약함도 그 원인이 있다고 사료된다.

이상의 결과로써, 핵이식배의 통전 전압은 0.75~1.0 kV/cm가 적합하다고 사료되며, 그러나 핵이식배의 체외발달을 성적은 극히 저조하였다. 이러한 원인은 100%의 탈핵이 되지 않은 점도 배제할 수 없지만, 핵이식된 난자가 활성화 후 핵 swelling, 핵막붕괴 및 미성숙 염색체의 농축 등을 포함한 재모델을 하기 위해서 공핵할구와 수핵난자의 세포발달주기의 동기화가 요구되며(Collas 등, 1992; Kato와 Tsunoda, 1992), 핵이식배에 대한 배양체계 개선도 향후의 문제점으로 제시 된다.

IV. 적 요

핵이식 기술의 응용으로 체외성숙 난자를 수핵난자로 하고 체외수정된 배를 공핵할구로 이용하여 복제배 및 복제동물을 효율적으로 생산하기 위한 체외배양조건, 체외성숙 후 'aging'에 따른 난자의 활성화 및 핵이식 난자의 융합과 배발달에 따른 적정 통전전압을 정하기 위하여 본 실험에 실시하였다.

체외성숙 수정 후 회수된 초기배를 TCM-199(10% FCS)배양액에 단층을 형성하고 있는 난관상피세포나 granulosa cell과 각각 공배양하여 수정 후 7~9일 까지 각각의 공배양에 대한 분할율과 배발달율을 비교 조사하였다. 각 배양군의 분할율에 있어서 공히 약 80%로 차이가 없었으나, 상실배와 배반포기배까지의 발달율은 난관상피세포와의 공배양이 38.3%로써 granulosa cell의 공배양(20.2%)과는 유의적인 차이를 보였다. ($P < 0.05$)

체외성숙란의 성숙시간에 따른 활성화 및 후기배

로의 발달율을 조사하기 위해서 60 μ sec의 통전시간, 1회의 통전횟수 및 전압 1.5 kV/cm으로 실시한 바, 체외성숙 후 24시간 보다 다소 'aging'이 된 32시간의 난자에서 82.5%의 활성화율과 18.6%의 상실배 및 배반포기배의 발달을 보였다. 이는 28시간의 성적과 유사했지만, 24시간의 성적과는 유의적($P < 0.05$)인 차이를 보였다. 그러므로 체외성숙란의 활성화를 위한 전기자극의 시간은 체외성숙 후 32시간대가 적합한 것으로 사료되어 핵이식배의 융합시간을 체외성숙 후 32시간에 실시하였다.

체외성숙 후 22~24시간에 제핵하고 8~16-세포기의 할구를 핵이식하여 8~10시간 TCM-199 배양액에 평형시킨 후 pulse duration(60 sec), pulse times(1회)을 고정하여 전압을 0.75, 1.0 및 1.5 kV/cm로 전기융합을 실시하여 융합율, 핵이식배의 발달율 및 퇴행란의 비율을 조사하였다. 융합율에 있어서는 각기 다른 전압에 대해 차이는 없었으나 1.5 kV/cm의 조건에서 72.2%로 저하되었고, 후기배로의 발달율에 있어서도 0.75 및 1.0 kV/cm에서는 11.2와 12.6%의 성적을 보였으나 1.5 kV/cm에서는 후기배로의 발달을 볼 수 없었다.

이상의 결과로 보아, 초기배를 체외배양할 경우에는 난관상피세포와의 공배양하는 것이 바람직하다. 전기자극에 대한 난자의 적정 활성화 시간은 체외성숙 후 32시간대가, 핵이식배의 융합과 배발달을 상승을 위한 통전 전압은 0.75~1.0 kV/cm가 적합하다. 그러나 핵이식배의 배발달을 성적은 극히 저조하였다. 이러한 원인의 대책으로 완전한 탈핵과 공핵할구와 수핵난자의 세포발달주기의 동기화가 요구되며 배양체계 개선도 향후의 문제점으로 제시된다.

V. 인용문헌

1. Aoyagi, Y., Y. Fukui, Y. Iwazumi, M. Urakawa, and J. Ono. 1990. Effects of culture systems on development of *in vitro* fertilized bovine ova into blastocysts. *Theriogenology* 34:793-759.
2. Barnes, F., M. Endebrock, C. Looney, R. Powell, M. Westhusin and K. Bondioli. 1993. Embryo cloning in cattle: The use of *in vitro* matured oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 97:317-320.
3. Bondioli, K. R., M. E. Westhusin, and C. R. Looney. 1990. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenology* 33(1):165-174.
4. Briggs, R. and T. J. King. 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 38:455-463.
5. Collas, P., J. and M. Robl. 1990. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. *Biol. Reprod.* 43:877-884.
6. Collas, P., J. J. Balise, G. A. Hofmann and J. M. Robl. 1992. Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 46:492-500.
7. Clement-Sengewald, A., G. A. Palma, U. Berg and G. Brem. 1992. Comparison between *in vitro* produced and *in vivo* flushed embryos for cloning experiments in cattle. *Theriogenology* 37:196(Abstr.)
8. Eyestone, W. H., J. M. Jones and N. L. First. 1990. The use of oviduct-conditioned medium for culture of bovine oocytes to the blastocyst stage. *Theriogenology* 33(1):226(Abstr.).
9. Eyestone, W. H. and N. L. First. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.* 85:715-720.
10. Evsikov, S. V., L. M. Morozova and A. P. Solomko. 1990. The role of the nucleocytoplasmic ratio in development regulation of the early mouse embryo. *Development* 109:232-238.
11. Gondolfi, F. and R. M. Moor. 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fert.* 81:23-28.
12. Goto, K., Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba, Y. Nakanishi and K. Ogawa. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.* 83:753-758.
13. Kato, Y. and Y. Tsunoda. 1992. Synchronous division of mouse two-cell embryos with nocodazol *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 95:39-43.
14. Kono, T., S. Iwasaki and T. Nakahara. 1989. Parthenogenetic activation by electric stimulus of bovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 32:569-577.
15. McGrath, J. and D. Solter. 1983. Nuclear transplantation in mouse embryos by microsurgery and cell fusion. *Science* 220:1300-1302.
16. Nagai, T. 1987. Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes *in vitro* with ethanol. *Gamete Res.* 16:243-249.
17. Prather, R. S. 1989. Nuclear transfer in mammals and amphibians : nuclear equivalence, species specificity? In: Schatten H and Schatten G(eds), *The Molecular Biology of Fertilization*. San Diego: Academic Press Inc. 323-340.
18. Prather, R. S., M. M. Sims and N. L. First. 1989. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol. Reprod.* 41:414-418.
19. Prather, R. S., F. L. Barnes, M. M. Sims, J.

- M. Robl, W. H. Eyestone and F. L. First. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryo. Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.* 37:859-866.
20. Rexroad, C. E. Jr. 1989. Co-culture of domestic animal embryos. *Theriogenology*, 31(1):105-114.
21. Robl, J. M. and S. L. Stice. 1989. Prospects for the commercial cloning of animals by nuclear transplantation. *Theriogenology* 31:75-84.
22. Smith, L. C. and I. Wilmut. 1989. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vivo of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol. Reprod.* 40:1027-1035.
23. Stice, S. L. and J. M. Robl. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 39:657-664.
24. Ware, C. B., F. L. Barnes, M. Meike-Laurila and N. L. First. 1989. Age dependence of bovine oocyte activation. *Gamete Res.* 22:265-275.
25. Willadsen, S. M. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 320:63-65.
26. Wiemer, K. E., A. J. Watson, V. Polanski, A. I. McKenna, G. H. Fick and G. A. Schultz. 1991. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol. Reprod. Development* 30:330-338.
27. Yang, X. and R. H. Foote. 1990. Survival of bisected rabbit morulae transferred to synchronous and asynchronous recipients. *Mol. Reprod. & Dev.* 26:6-11.
28. Yang, X., S. Jiang, P. Farrell, R. H. Foote and A. McGrath. 1993. Nuclear transfer in cattle: Effect of nuclear donor cells, cytoplasmic age, co-culture and embryos transfer. *Mol. Reprod. & Dev.* 35:29-36.
29. Yang, X. 1991. Embryo cloning by nuclear transfer in cattle and rabbit. *Embryo Transfer Newsletter* 9:10-22.
30. 이효종, 전병균, 윤희준, 이경미, 송상현, 공일근, 노규진, 최민철, 최상용, 박충생. 1994. 핵이식에 의한 복제 토끼 생산. (인쇄 중).