

## 토끼에서 난자의 성숙도가 전기융합 및 핵이식 수정란의 체외발달에 미치는 영향

이효종 · 정미경\* · 전병균\* · 최민철 · 최상용 · 박충생\*  
경상대학교 수의학과, 축산학과\*

### Effect of Oocyte Age on Electrofusion and *In Vitro* Development of Nuclear Transplant Embryos in Rabbits

H. J. Lee, M. K. Chung\*, B. G. Jeon\*, M. C. Choi, S. Y. Choi and C. S. Park

*Departments of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University*

#### SUMMARY

The long term goal of this research is to develop an efficient procedure for large scale production of genetically identical or cloned animals. To improve nuclear transplanted efficiency in the rabbit, this study evaluated the age of nuclear recipient oocytes on the different steps of nuclear transplantation. The ovulated oocytes in different ages were collected from the superovulated does by flushing oviducts with Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS) supplemented with 10% fetal calf serum(FCS) from 13 to 15, 17 to 20 and 23 to 26 hours after hCG injection. The denuded oocytes were used as nuclear recipient cytoplasm following enucleation by micromanipulation. The blastomeres separated from the 8-cell embryos were used as nuclear donor.

The enucleated oocytes receiving a blastomere in the perivitelline space were fused in the 0.28 M mannitol solution at 1.5 kV/cm, 60 sec for three times. The fused oocytes were co-cultured with the monolayered rabbit oviductal epithelial cells in TCM-199 solution with 10% FCS for 72 hours at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator.

The cultured nuclear transplant embryos and *in vivo* developed embryos collected at 72 hours after hCG injection were stained with Hoechst 33342 dye. Their cell numbers were counted under a fluorescent microscope.

The results obtained were summarized as follows :

1. The aged oocytes(20 hrs. post hCG) showed significantly( $P < 0.05$ ) higher fusion rates(70 ~ 90%) than the recently ovulated oocytes(30.8%)
2. The aged oocytes which were electrically activated and fused at 20 hours developed to blastocyst at significantly( $P < 0.05$ ) high rate, while none of the recently ovulated oocytes developed to blastocyst.
3. Even though the aged oocytes at 23~26 hours showed higher fusion rate(85.7%), not only they were inadequate to manipulate but also their developmental potential to

\* 이 연구는 1992년도 한국과학재단에서 지원한 특정기초연구 사업비로 연구되었음(KOSEF : 92-24-00-10)

\* 경상대학교 농과대학(Department of Animal Science, Gyeongsang National University)

blastocyst was highly impaired.

4. The developmental potential *in vitro* of nuclear transplant embryos was significantly retarded than *in vivo* developed embryos.

## 서 론

핵이식은 유전적으로 동일한 산자를 다량 생산하기 위한 방법중 가장 효과적이다. 핵이식은 탈핵된 난자속으로 유전정보를 가지고 있으며 아울러 전능성이 있는 할구를 이식하여 새로운 다수의 배로 발달시키는 것이다. 성숙된 난자는 핵을 재프로그래밍 할 수 있는 능력과 새로운 배로 발달시킬 수 있는 요인을 가지고 있다(Chang, 1954; Biggers, 1986). 성숙된 난자에서 공핵란의 재프로그래밍이 일어난다는 표시는 핵이식 수정란의 발달에서 평가될 수 있다. 제 2감수분열 중기의 난자를 탈핵시킨 다음 수핵란으로 사용하여 핵이식 기법과 수정란이식 기법으로 양(Willadsen, 1986; Smith 등, 1989), 소(Parther 등, 1987; Bondioli 등, 1990) 그리고 돼지(Parther 등, 1989) 등에서 산자의 생산을 보고하고 있다. 그러나 핵이식의 효율은 아직도 낮다. McGrath와 Solter(1983)에 의해 고안된 원형질막을 파괴하지 않고 제 1극체와 인접한 부분의 세포질을 흡입함으로써 난자의 탈핵을 하는 기술의 개발로 일대 전환을 가져왔다.

탈핵을 하고 난 다음 할구를 위관강속으로 주입하여서 핵융합을 실시한다. 이 같은 난자와 할구의 융합은 Zimmermann 등 (1982)에 의해 확립된 전기적 방법에 의한 핵융합을 실시한다. 또한 난자의 활성화를 유도하기 위하여 ethanol(Cuthbertson, 1981; Cuthbertson, 1983; Barton 등, 1985; 한 등, 1987; 이 등, 1992), hyaluronidase (Kaufman, 1973; 이 등, 1992),  $Ca^{2+}$ 가 없는 배양액(Whittingham과 Siracusa, 1978),  $Ca^{2+}$ 의 주입(Fulton과 Whittingham, 1978),  $Ca^{2+}$ -ionophore(Ware 등, 1989) 등 많은 보고가 있었다. 그러나 이 전기적인 방법은 융합과 난자의 활성화를 동시에 이룰 수가 있다. 보고된 전기의 강도와 지속시간은 종마다 크게 차이가 날지라도 핵융합율은 보통의 실험동물에서 70~80%의 성적을 보이고 있다. 그러나 이러한 핵이식에서 제한요소로 작용하는 것은 난자의 활성

화이고, 난자의 성숙도가 진행될수록 난자의 활성화는 더 쉽게 이룰 수 있다고 보고하고 있다(Collas 등, 1989). 그러나 난자의 성숙도가 진행될수록 핵융합이 낮아진다고 하였다.

또한, Webb 등 (1986)은 난자의 성숙도가 진행될수록 제 1극체와 인접한 원형질막의 부분에 존재하고 있던 metaphase II에 존재하는 방추사가 난자의 중심쪽으로 이동을 한다고 보고하고 있다. 그러므로 난자의 나이가 진행될수록 최근에 배란된 난자보다 탈핵의 성공율이 낮다. 또한 제 1극체는 난자의 성숙도가 진행될수록 분열이 일어난다고 보고하고 있다. 제 1극체의 분열은 난자의 성숙도가 많이 진행된 상태이고 이것은 탈핵율을 낮추는 요인으로 작용을 한다. Collas 등(1989)은 반복적인 자극으로 난자의 활성화를 높일 수 있다고 보고하고 있으며, 또한 최근에 배란된 난자를 탈핵을 하고 할구를 주입하고 성숙도가 진행된 다음 핵융합과 활성화를 하여 보다 좋은 결과를 보고하고 있다(Collas 등, 1989).

그러므로 본 실험에서는 핵이식의 효율을 증진시키기 위하여 토끼를 모델동물로 사용하여 난자의 성숙도별 핵융합율과 최적의 배발달율을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시동물 및 사양관리

본 실험에 사용된 공시동물은 New-Zealand White 종의 성숙된 토끼로서 연암원예축산전문대학으로부터 공급받았으며 사용전에 분리 사육하였고 물과 사료는 자유로이 급식하였다.

### 2. 수핵난자(nuclear recipient oocytes)의 확보

핵을 수여받을 난자는 다음과 같은 방법으로 확보하였다. 먼저 성숙된 암토끼에서 PMSG(PE-AMAX<sup>®</sup>, Japan) 100 IU를 근육주사하고 3일후 hCG(Puberogen<sup>®</sup>, Japan) 100 IU를 정맥주사하여 과배란을 유기하였다. hCG 주사 후 13~15, 17~20

및 23~26 시간에 암토끼를 chlorpromazine HCl 과 ketamine HCl로 전신마취한 다음 개복수술하여 난관으로 부터 성숙난자를 10%의 FCS가 함유된 D-PBS 액으로 회수하였다. 회수된 난자를 hyaluronidase (SIGMA Co., U.S.A.) 1 mg/ml이 함유된 배양액에 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 7 분간 처리한 다음 fire-polished pipette으로 흡입을 반복함으로써 난구세포를 제거하여 제 1극체가 명확히 보이고 세포질이 충실한 난자를 수핵란으로 사용하였다.

### 3. 공핵수정란(nuclear donor embryos)의 확보

핵을 수핵난자에 공급할 수정란은 전항 2와 같은 방법으로 먼저 성숙된 암토끼를 과배란시킨 다음, 성숙된 수토끼와 교미시켰다. hCG 주사 후 44 시간째에 채란을 하여 8 세포기에 있는 수정란을 회수하였다. 회수된 수정란은 0.5%의 pronase에 8 분간 처리한 다음 150 μm 정도의 pipette으로 투명대를 제거하고 이들을 다시 50 μm 정도 되는 pipette으로 Ca<sup>2+</sup>와 Mg<sup>2+</sup>가 없는 PBS에서 할구를 분리하였다. 분리된 할구는 미세조작에 사용하였다.

### 4. 미세조작에 의한 탈핵과 핵주입

수핵란의 탈핵을 위한 미세조작은 Stice와 Robl (1988)의 방법에 준하여 실시하였다, 즉, 수핵난자와 공핵 수정란으로 부터 분리된 할구세포를 7.5 μg/ml의 cytochalasin B (Sigma Co., U.S.A.)와 10% FCS가 함유된 D-PBS에서 미세조작 15 분전에 전처리를 하였다. 미세조작을 위하여 micro-manipulators (Narishige Co., Japan)를 Nikon Diaphot(DIC) 도립현미경(Nikon Co., Japan)위에 장치하였다. 탈핵은 McGrath와 Solter(1983)의 Non-distructive 조작법에 의하여 실시하였다. 즉, 성숙된 난자로 부터 핵을 제거하기 위하여 30~35 μm의 연마된 미세 pipette을 투명대 내로 진입시키고 제 1극체와 그 주위에 위치하는 핵을 원형질막에 싸여진 채로 흡입하여 제거하였다. 한편, 공핵수정란으로 부터 분리된 할구세포 하나를 미세 pipette에 흡입하고 이를 미세조작으로 탈핵된 수핵난자의 원형질 바깥 위관막강에 주입하였다.

### 5. 핵융합

핵이 주입된 난자는 Robl 등(1987)의 방법에 따라 핵융합을 실시하였다. 전기자극은 이 등(1993)의 방법에 따라 전압, 통전시간 및 통전횟수를 정하였다. 즉, 이들 난자를 100 μM CaCl<sub>2</sub> 및 MgCl<sub>2</sub>가 함유된 0.28 M mannitol 용액으로 세척한 다음 paraffin oil이 덮여 있는 소적에 옮기고 electro cell manipulator(Eyela Co., Japan)에 장치되어 있는 두 전극 사이에서 핵의 융합과 난자의 활성화를 유도하였다. 융합조건은 직류전류로서 전압을 1.5 kV/cm, 통전시간은 60 sec로 3 반복 통전하였다.

### 6. 핵이식 수정란의 체외배양과 할구수 조사

융합이 확인된 수정란은 4-well dish에 10% FCS가 포함된 TCM-199 배양액에 옮겨 토끼난관상피 세포의 monolayer가 형성된 것과 같이 37°C의 5% CO<sub>2</sub> 배양기내에서 72 시간 공배양하였다.

배양기간 동안 이들 핵이식 수정란의 상살배와 배반포 형성율을 조사하였고, 핵융합 후 72 시간째에 Pursel 등(1985)의 방법에 따라 Hoechst 33342로서 핵염색을 실시하여 할구수를 조사하였다. 또한, 체내에서 수정 후 72 시간째에 자궁각으로 부터 채취된 수정란의 할구수도 아울러 조사하여 핵이식 수정란과의 할구수를 비교하였다.

### 7. 통계학적 분석

실험결과는 Chi-square test와 T-test를 실시하여 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 수핵난자의 성숙도에 따른 핵 융합 효과

수핵난자는 hCG 주사 후 13~15, 17~20 및 23~26 시간에 채란된 미수정란을 구분하여 사용하고, 핵의 공급은 8 세포기에 있는 수정란으로부터 할구세포를 분리하여 사용하였다. 핵융합조건을 DC 1.5 kv/cm, 60 μsec, 3 회 pulses로 하여 수핵난자의 성숙도에 따른 핵융합율을 조사한 결과는 Table 1에서와 같다.

Table 1. Effects of age of oocytes on electrofusion in nuclear transplant rabbit oocytes

Age of oocytes (hrs. post hCG)	No. of oocytes used	No. of oocytes fused	Fusion** rate (%)
13 ~ 15	26	8	30.8 <sup>a</sup>
17 ~ 20	109	73	70.0 <sup>b</sup>
14 / 20***	199	178	89.5 <sup>b</sup>
23 ~ 26	14	12	85.7 <sup>b</sup>

\* Eight-cell stage embryos were used as nuclear donor.

\*\* The values with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

\*\*\* 14/20 ; Oocytes were collected 14 hrs. after hCG injection. Following nuclear transplantation and *in vitro* culture for 2 ~ 4 hrs. the oocytes were electrically stimulated at 20 hrs. after hCG injection.

수핵난자의 성숙도가 hCG 주사 후 13~15, 17~20 및 23~26 시간인 것에서 각각 30.8, 70.0 및 85.7%의 핵융합율을 보였다. 13~15 시간의 것이 유의적 ( $P < 0.05$ )으로 낮은 핵융합율을 보였으며, 17~20 및 23~26 시간대의 난자 성숙도에는 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

Modlinski와 Smorag(1991)은 토끼에서 hCG 주사 후 16~17 시간대의 수핵난자에 8 세포기 할구를 핵이식하였던 바 82.5%의 융합율을 보였는데 이러한 결과는 본 실험의 결과와 비슷한 성적이었다. 이등(1993)이 토끼 수핵난자의 전기자극에 의한 활성화와 체외발달에 관한 조사에서 hCG 주사 후 18~20 시간된 난자에서 가장 높은 활성화율과 배발달율을 보였는데 핵이식 후의 융합율과 체외발달율에서도 역시 hCG 주사 후 17~20 시간에 전기자극(1.5 kV/cm, 60 sec, 3 회)을 줄 경우 가장 좋았다. 난자의 성숙도는 활성화 효율에서와 같이 핵이식후 융합율에도 영향을 미치는 것으로 판단된다. 그러나 탈핵 성공율은 조사되지 않았기 때문에 난자의 핵형이 정상이 되어서 발달되었는지 확실하지는 않다. 13~15 시간에 채란하여 미세조작을 한 후 20 시간에 핵의 융합을 실시하였을 때가 17~20 시간에 채란하여 바로 핵융합을 실시하였을 때보다도 높은 핵융합(89.5%)을 보였다. 17~20 시간에 채란된 난자는 제 1극체의 분열이 일어나 성숙도가 많이 지나간 것으로 판단되며, 또한 23~26 시간에 채란된 난자는 토끼에서만 존재하는 난관에서 분비되는 당단백질 성분인 mucin 층이 난자를 둘러싸고 있어서 미세조작이 용이하지 않았다.

Zimmerman과 Vienken(1982)에 의하면 난자의 나이가 진행될수록 원형질막의 단백질과 지질의 변화로 인하여 융합율이 낮아진다고 보고하였다. 이러한 결과에서 최근에 배란된 난자는 탈핵의 성공율은 높고 융합율과 활성화율이 낮다고 사료된다. 토끼에서 탈핵의 성공율을 높이기 위해서는 hCG 주사 후 13~15 시간에 채란과 탈핵을 실시하고 전기자극을 hCG 주사 후 17~20 시간에 하는 것이 효율적이라고 사료된다.

## 2. 수핵난자의 성숙도에 따른 핵이식 난자의 체외 발달 능력

수핵난자를 hCG 주사 후 13~15 및 17~20 시간에 채란하여 8-세포기의 할구세포와 전기자극으로 핵융합을 실시하고 수핵난자의 성숙도에 따른 핵이식 수정란의 체외발달율을 조사한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같다.

난자의 성숙도가 13~15 및 17~20 시간대에서는 상실배(36.4 vs 52.4%)까지의 발달율에는 유의적인 차이가 없었으나, 배반포기 (0.0 vs 26.2%)까지의 발달율에는 유의적인 차이를 나타내었다. 예비 실험에서 23~26 시간대의 난자에서는 융합은 이루어졌으나 배발달은 저조하여 본 실험에서 23~26 시간대에서는 실시하지 않았다.

이러한 결과는 Modlinski와 Smorag (1991)은 16~17 시간대의 수핵난자의 성숙도에서 16.9%의 배반포기까지의 발달율을 얻었으며, Collas와 Robl(1990)은 핵이식 후 cytochalasin B(7.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )에 1 시간동안 배양후 체외발달을 유도하였을 때 배

반포기까지의 발달율을 44%의 높은 성적을 얻었다. 이러한 결과와 비교하여 볼때 본 실험에서 융합은 17~20 및 23~26 시간대에서 잘 일어나며, 핵이식 후 배발달은 17~20 시간대에서의 성적과는 다소 낮으나 대체로 비슷한 성적을 얻었다. 또한 13~15 시간에 채란을 하여 탈핵과 할구주입을 하고 20 시간째에 핵융합을 실시하는 것이 탈핵의 성공율을 높이고 핵융합과 체외발달율을 향상시키는데 유리한 것으로 나타났다.

### 3. 핵이식 수정란의 체외발달 능력 비교

hCG 주사 후 72 시간에 토끼의 자궁각으로부터 채란한 배반포기의 수정란, 체외에서 72 시간 배양한 핵이식 수정란을 Hoechst 33342로서 핵염색을 시행하여 이를 조사함으로써 핵이식 배의 체외발달 능력을 비교 검토하였던 결과는 Table 3에 나타난 바와 같다. 핵이식 수정란의 평균 할구수는 43.6개였고 체내에서 발달한 수정란의 78.8개에 비하면 유의적으로 적었다. 이로서 핵이식 배는 체외배양에서 발생이 지연되는 것을 알 수 있으며, 이러한 결과는 앞으로 핵이식 배의 체내이식에 있어서 수란 축과의 발정동기화 또는 이식적기를 판단하는 지표로 활용될 것이다.

## 적 요

복제배 및 복제동물을 보다 효율적으로 생산하기 위한 핵이식 기술을 개발함에 있어서 핵이식에 가장 적합한 수핵난자의 성숙도를 알아보기 위하여 본 실험은 수행되었다. New-Zealand White 종의 성숙된 암토끼를 PMSG 100 IU를 근육주사한 다음 72 시간 후 hCG 100 IU를 이정맥주사하여 과배란시킨 다음 13~15, 17~20 및 23~26 시간째 전신 마취시켜 개복수술을 실시하고 난관에서 배란된 난자를 채란하였다. 이들로 부터 난구세포를 제거하고 미세조작으로 탈핵을 한 다음 8 세포기의 할구를 위관강내에 주입을 하였다. 할구와 난자의 세포질 사이의 원형질막의 융합은 전기적 방법으로 직류전류 1.5 kV/cm의 전압, 60 sec의 통전시간으로 3 회 통전을 하여 실시하였다. 융합이 확인된 난자들은 10% FCS가 함유된 TCM-199 배양액에 넣고 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 배양기내에서 72 시간 동안 배양하여 이들의 체외발달능력을 조사하였고 또한 hCG 주사 후 72 시간된 수정란을 회수하여 이들과의 발달능력을 비교하였다. 핵이식 및 전기융합은 17~20 시간(70.0%), 23~26 시간(85.7%)에 실시한 난자와

Table 2. Effect of age of recipient oocytes on *in vitro* development following nuclear transplantation in rabbit embryos

Age of oocytes (hrs. post hCG)	No. of oocytes used	No. and (%) of embryos developed to**			
		2-cell	4-cell	Morula	Blastocyst
13 ~ 15	22	8(36.4)	8(36.4)	8(36.4) <sup>a</sup>	0(0.0) <sup>a</sup>
17 ~ 20	42	39(92.9)	33(78.6)	22(52.4) <sup>a</sup>	11(26.2) <sup>b</sup>
14 / 20***	29	21(72.4)	20(69.0)	16(55.2) <sup>a</sup>	6(20.7) <sup>b</sup>

\* Eight-cell stage embryos were used as nuclear donor.

\*\* The values with different superscripts within in the same column are significantly different (P<0.05).

\*\*\* 14/20 : Oocytes were collected 14 hrs. after hCG injection. Following nuclear transplantation and *in vitro* culture for 2 ~ 4 hrs. the oocytes were electrically stimulated at 20 hrs. after hCG injection.

Table 3. Comparison of number of blastomeres following *in vitro* culture of nuclear transplant embryos with intact embryos at 72 hrs. after hCG injection

Type of embryos	No. of embryos stained	No. of blastomeres (Mean ± SEM)
Intact	10	78.8 ± 4.2 <sup>a</sup>
Nuclear transplant	11	43.6 ± 3.2 <sup>b</sup>

\* The values with different superscript are significantly different (P<0.05).

14 시간에 채란을 하고 20 시간(89.5%)에 전기자극으로 융합을 한 난자와의 핵융합율에서 유의적인 차이를 나타내지 않았고, 13~15 시간(30.8%)에 채란된 난자의 융합율은 유의적( $P < 0.05$ )으로 낮았다. 또한 배반포로의 발달율에서도 17~20 시간(26.2%) 및 14 시간에 채란을 하고 20 시간(20.7%)에 융합을 한 결과에서 배발달율에서 유의적인 차이를 보이지 않았고, 13~15 시간에 채란을 하여 미세조작과 융합을 한 난자에서는 전혀 배반포까지 자라지 않았다. 그러나 난자의 성숙도가 진행될 수록 탈핵의 어려움이 있으므로 14 시간에 채란된 난자를 미세조작을 한 다음 20 시간에 전기적 융합을 실시하는 것이 좋을 것이라고 사료된다. 그리고 72 시간에 채란한 수정란과 핵이식한 수정란의 할구수 조사를 하여 발달능력을 비교한 결과 핵이식 수정란( $43.6 \pm 3.2$ )이 72 시간에 채란한 수정란( $78.8 \pm 4.2$ )보다 발달이 지연되는 것을 알 수 있었다.

## 사 사

본 연구를 수행하는데 있어서 좋은 토끼를 착오 없이 공급하여 준 연암원예축산전문대학과 토끼 사육에 협조하여준 본 대학교 부속동물사육장과 셋별 농장에 감사드리며 아울러 micromanipulator system 이용에 도움을 준 공동실험실습관에 심심한 감사를 드립니다.

## 참고문헌

- Barton SC, Adams CA and Norris ML. 1985. Development of gynogenetic and parthenogenetic inner cell mass and trophoctoderm tissues in reconstituted blastocyst in the mouse. *J. Embryol. Exp. Morph.* 90:267~285.
- Biggers JD. 1986. The potential use of artificially produced monozygotic twins for comparative experiment. *Theriogenology* 26:1~25.
- Bondioli KR, Westhusin ME and Loomey CR. 1990. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenology* 33:165~174.
- Chang MC. 1954. Fertilization of rabbit ova and the effect of temperature *in vitro* on their subsequent fertilization and activation *in vivo*. *J. Exp. Zool.* 125:127~150.
- Collas P and Robl JM. 1989. Age of the recipient oocyte for nuclear transplantation in the rabbit. *Biol. Reprod.* 40(Suppl 1):110(Abstract 188).
- Collas P and Robl JM. 1990. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. *Biol. Reprod.* 43:877~884.
- Cuthbertson KSR. 1981. Parthenogenetic activation of mouse oocytes *in vitro* with ethanol and benzylalcohol. *J. Exp. Zool.* 226:311~314.
- Cuthbertson KSR, Whittingham DG and Cobbold PH. 1983. Free  $Ca^{2+}$  increase in exponential phases during mouse oocyte activation. *Nature* 294:754~757.
- Fulton BP and Whittingham DG. 1978. Activation of mammalian oocytes by intercellular injection of calcium. *Nature* 273:149~151.
- Kaufman MH. 1973. Parthenogenesis in the mouse. *Nature* 242:475~476.
- McGrath J and Solter D. 1982. Nuclear transplantation of rat embryos. *J. Exp. Zool.* 248:303~305.
- Modlinski JA and Smorag ZA. 1991. Preimplantation development of rabbit embryos after transfer of embryonic nuclei into different cytoplasmic environment. *Mol. Reprod. Dev.* 28:361~372.
- Parther RS, Barnes FL, Sims MM, Robl JM, Eyestone WH and First NL. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.* 37:859~866.
- Parther RS, Sims MM and First NL. 1988. Nu-

- clear transplantation in the early porcine embryo. *Theriogenology* 29:290(abstract.).
- Pursel VG, Wall RJ, Rexroad Jr. CE, Hammer RE and Brinster RL. 1985. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenology* 24: 687~691.
- Robl JM, Prather R, Barnes FL, Eyestone WH, Northey D, Gilligan B, and First NL. 1987. Nuclear transplantation in bovine embryos. *J. Anim. Sci.* 64:642-647.
- Robl JM, Prather R, Eyestone W, Barners F, Northey D, Gilligan B, First NL. 1987. Nuclear transplantation in bovine embryos. *Theriogenology* 25:189(Abstrat).
- Smith LC, and Wilmut I. 1989. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the early development *in vivo* of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol. Reprod.* 40: 1027~1035.
- Stice SL. and Robl JM. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 39:657~664.
- Ware CB, Barnes FL, Maiki-Laurila M and First NL. 1989. Age dependence of bovine oocytes activation. *Gamete Res.* 22:265~275.
- Webb M, Howlett SK and Marot B. 1986. Parthenogenesis and cytoskeletal organization in aging mouse eggs. *J. Embryol. Exp. Morph.* 95:131~145.
- Whittingham DG and Siracusa G. 1978. The involvement of calcium in the activation of mammalian oocytes. *Exp. Cell Res.* 113: 311~317.
- Willadsen SM. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 320:63~65.
- Zimmermann U and Vienken J. 1982. Electric field-induced cell-to-cell fusion. *J. Membr. Biol.* 67:165~182.
- 이효종, 최민철, 최상용, 박충생, 윤창현, 강대진. 1993. 반복핵이식에 의한 복제동물 생산에 관한 연구. I. 토끼 수핵난자의 전기자극에 의한 활성화. *한국수정란이식학회지* 8(2):151~154.
- 이효종, 하대식, 강태영, 최민철. 1992. 생쥐난자의 단위발생에 관한 연구. I. Ethanol 및 hyaluronidase 처리에 의한 단위발생의 유기. *대한수의학회지* 32(4):663~669.
- 한용만, 백정순, 이경아. 1987. 생쥐에 있어서 Ethanol처리에 의한 단위발생의 유기. *한국축산학회지* 29(9):383~389.