

## 세포조작 기술을 이용한 새로운 축산개량증식 체계 개발

### I. 소 난포란의 성숙시기가 제 1극체 출현율과 핵제거율에 미치는 영향

임경순 · 김현종 · 오성종\* · 양보석\*

서울대학교 농업생명과학대학 동물자원학과

## Development of a New Improvement and Multiplication System in Domestic Animals Using a Embryonic Manipulation Technique I. Effect of Maturation Time on the Extrusion Rate of First Polar Body and the Enucleation Rate of Bovine Follicular Oocytes

Im, K. S., H. J. Kim, S. J. Oh\* and B. S. Yang\*

Department of Animal Science and Technology, College of Agriculture and  
Life Science, Seoul National University, Suweon, 441-744, Korea

### SUMMARY

In this study, methods on fabrication of microtool and setting of micromanipulator were examined and relationship between first polar body extrusion rate and maturation time of follicular oocyte, enucleation rate and repetition of trial, and enucleation rate and maturation period were investigated. The results are as follows:

1. Suitable outside diameter of micropipette tube was 1 mm. Holding pipette with less than diameter of oocyte was fitted for manipulation, and zona dissection needle was easily operated when its sharp-point had diameter of about 8  $\mu\text{m}$  and length of 300  $\mu\text{m}$ . The injection pipette with 20~35  $\mu\text{m}$  outside diameter was adequate for injection of blastomere into perivitelline space.
2. Separation of blastomere was effective when zona pellucida had cut with zona dissection needle and the embryo was pipetted gently with the pipette that had narrower diameter than that of embryo until separation of blastomeres had completed.
3. The extrusion rate of first polar body was 78% during 20~24 hours incubation for maturation.
4. According to repetitions of micromanipulation, the enucleation rate was increased to 85% and the time required for enucleation of a oocyte was shortened to 3 min.
5. The extrusion rate of first polar body and enucleation rate were 82 and 76% respectively, in the group of the oocytes cultured for 22 hours. However in the group cultured for 24 hours, the extrusion rate of first polar body and enucleation rate were 53 and 100% respectively.

---

\* 축산기술연구소 (National Livestock Research Institute)  
이 논문은 한일과학 기술협력 합의과제로 1994년도 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

## I. 서 론

1983년 McGrath와 Solter가 포유동물에서 처음으로 핵이식한 생쥐난자를 대리모에 이식하여 성공적으로 산자를 얻은 이래, Wiladson(1986), Prather 등(1987), Robl 등(1987) 많은 연구자들이 난자내 핵이식에 관한 연구를 수행하였다. 그 결과 초기배 핵의 전능성(totipotency)을 유지하는 분화한계, 세포와 핵을 전기적으로 융합하여 재프로그래밍할 수 있는 전압과 통전시간, 재프로그래밍되어 생성된 배의 할구들의 전능성 유지, 미수정란의 세포질을 활성화시키는 인자들, 핵의 기능, 핵과 세포질의 상호작용 등이 규명되었으며, 또한 핵이식 기법을 이용하면 유전적으로 동일한 개체를 다수 생산할 수 있다는 것이 규명되었다.

핵이식이 이루어진 난자는 일련의 확립된 체외배양 방법을 이용하여 용이하게 발달시킬 수 있으며(박 등, 1994), 또한 수핵란으로 이용되는 미수정란의 세포질내 인자들을 활성화시켜 이식된 핵을 재프로그래밍하여 정상배로 발달시키는 활성화방법들도 밝혀졌다(Balakier와 Tarkowski, 1976; Ozil, 1990; Presicce와 Yang, 1994; 김 등, 1994). 한편 공란핵과 수핵란을 융합시키는 방법으로 1981년 Illmensee와 Hoppe는 배의 세포질에 핵을 이식하는 방법을, McGrath와 Solter(1983)는 불활화한 Sendai virus를 이용하여 세포막을 파괴하지 않고 성공적으로 핵을 융합시키는 방법을, 그리고 Kubiak와 Tarkowski(1985)는 전기융합법을 응용하여 융합에 관련된 인자들을 정확히 조절하여 더욱 성공적이며 반복성있는 핵융합 방법을 확립하였다. 그러나 기존에 이용되고 있는 제핵과정과 미세조작과정에 관한 연구는 거의 없는 실정이다.

본 연구에서는 난포란의 성숙시기에 따른 핵의 출현 비율, 미세조작기법의 숙련도가 핵제거율 그리고 난포란의 핵제거 시기가 핵제거율에 미치는 영향을 검토하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 난포란의 준비 및 체외성숙

도축장의 암소에서 회수한 난소를 penicillin G (100 IU/ml)와 streptomycin (100 µg/ml)이 첨

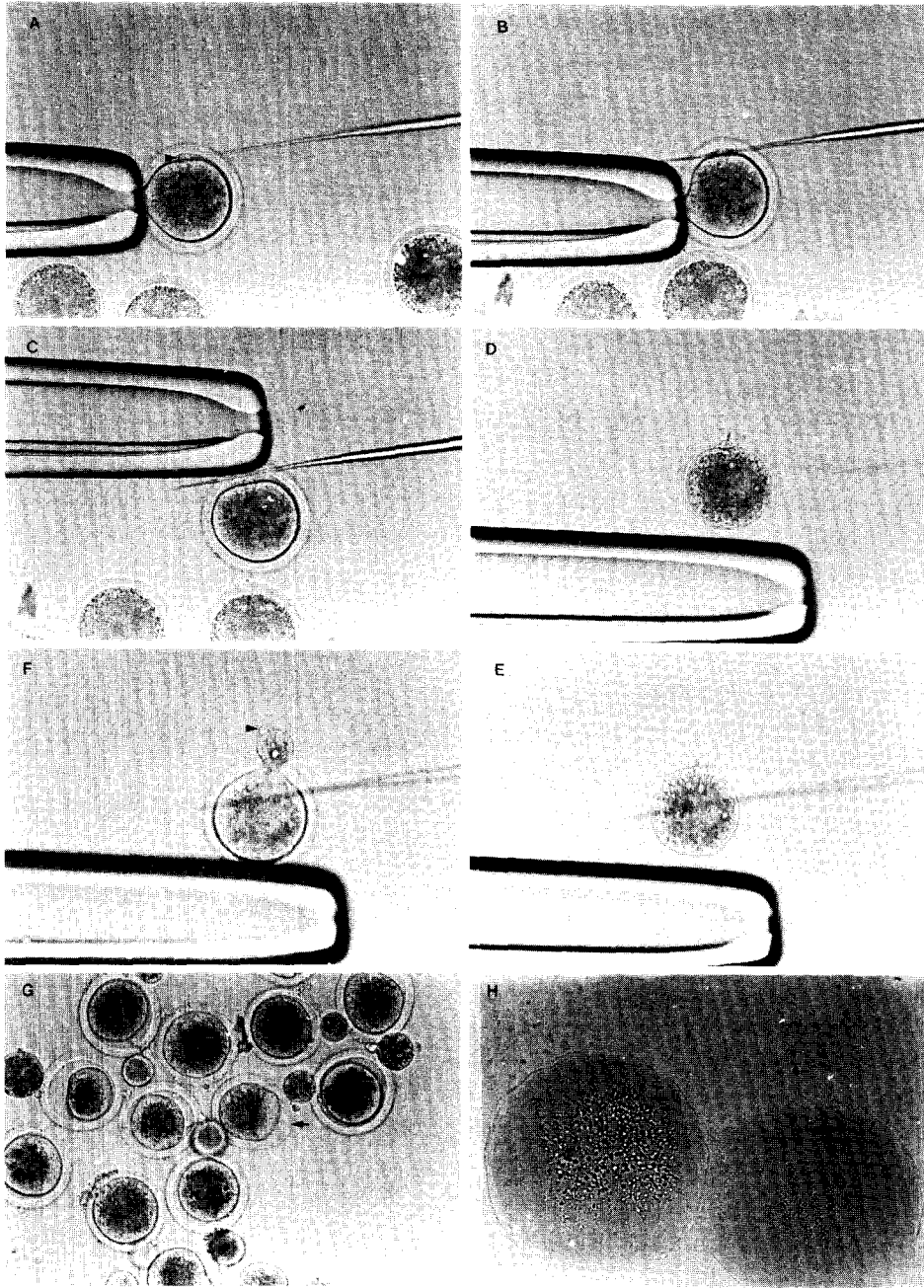
가된 식염수에 담긴 상태로 보온병의 온도를 35~38°C로 유지하여 실험실로 옮겼다. 실험실에서 다시 난소를 세척한 후 물기를 제거하고 18G 주사침이 꽂힌 10 ml 주사기로 외관상 1~7 mm 직경인 난포들만 골라서 난포액을 흡입하여 페트리 접시에 옮겼다. 실험현미경 아래에서 여러겹의 난구세포층이 탄탄하게 잘 부착된 균일한 색깔의 난구세포-난모세포 복합체를 선별하여 PBS로 세척했다. 성숙 배양액으로 세척한 후 약 30개의 난구-난모세포 복합체들을 1 ml의 성숙 배양액에서 배양하였다. 난포란은 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기, 39°C, 높은 습도조건에서, 24시간 배양하였다. 성숙배양액은 TCM-199에 25mM HEPES buffer, 10% 소태아 혈청, 0.11 mg/ml Na-pyruvate, 1 µg/ml FSH, 2 IU/ml LH, 1 µg/ml E<sub>2</sub>, 50 g/ml gentamycin, 100 IU/ml penicillin G, 100 µg/ml streptomycin sulfate을 첨가하여 사용하였다 (Im et al., 1995).

### 2. 난포란의 단위 발생

상기 방법으로 30시간 성숙배양한 난모세포-난구세포 복합체를 hyaluronidase (Sigma, USA) 300IU 가 든 phosphate-buffered saline (PBS)에서 vortex mixer로 3분간 진동하여 난구세포를 제거한 난자를 신선한 PBS로 씻은 후, 7% ethanol(v/v)이 든 PBS에서 7분간 활성화시켰다. 활성화한 난모세포를 5 µg/ml cytochalasin D (CD)가 든 TCM-199 + 10% FCS에서 7시간 노출 후, TCM-199 + 10% FCS 소직으로 옮겨 cumulus monolayer위에서 5~6일간 배양하였다.

### 3. 미세관의 제작

난자를 고정하기위한 고정 피펫은 microcapillary tube (Narishige GD-1)를 puller (Narishige PB-7)에 고정한 후 가열하여 당겨진 tube의 외경 100~120µm 부위를 microforge (Narishige MF-90)의 유리볼에 고정 가열시킨 후 당겨서 유리볼에 대해 수직으로 끊어지게 했다. 유리볼 상부에서 말단이 깨끗하게 끊어진 관을 다시 고정가열하여 끊어진 말단이 녹아 안으로 말려들어가게 하였다(Malter, 1992). 투명대를 절단하는데 사용하는 투명대 절개침 역시 microcapillary tube (GD-1)를 puller (PB-7)로 당긴



**Fig. 1.** Procedure of enucleation of *in vitro* matured oocyte.

**A:** holding and puncturing zona pellucida of oocyte (Arrow head indicates the first polar body. ); **B:** piercing zona pellucida; **C:** cutting zona pellucida; **D:** dissected zona pellucida; **E:** pressing oocyte; **F:** enucleated oocyte; **G:** enucleated oocytes (Arrow indicates the deformed oocyte.); **H:** stained oocytes (The left is enucleated and the right has metaphase plate. ; Arrow indicates the MII plate.)

후, 외경 20~30  $\mu\text{m}$ 에서 끊어 tube의 침단이 유리본에 부착한 상태로 가열하여 당겨 끝이 뾰족하게 뿔리게 하였다. 난황주위강에 할구주입용으로 사용하는 주입 피펫은 puller로 당긴 후 microforge로 외경 20~35  $\mu\text{m}$ 에서 끊어 사용하였다.

#### 4. 난모세포의 극체출현 검사

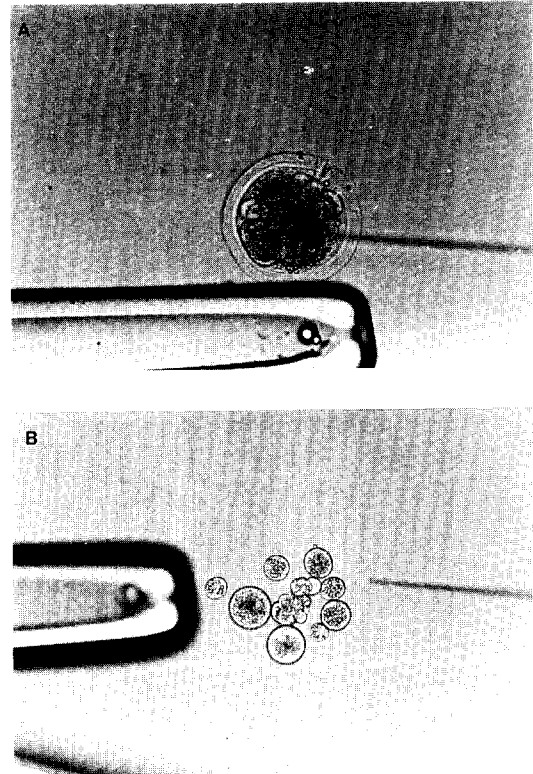
난포란을 CO<sub>2</sub>배양기에서 20~32시간 배양하면서 매 2시간 간격으로 검경하여 극체가 방출된 난자들을 선별하여 핵염색하였다.

#### 5. 수핵란으로부터 핵의 제거

22~24시간 성숙시킨 난모세포들을 hyaluronidase 300 IU가 든 PBS에서 vortex mixer로 3분간 진동하여 난구세포를 제거하고 극체가 보이는 난자들만 골라서 제핵에 이용하였다. 제핵 전에 난자를 CD 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  든 TCM 199에서 10분간 정치한 후 같은 배양액 30  $\mu\text{l}$  소적내로 옮겨 미세조작기가 장착된 독립현미경(Nikon-Narishige NT-88)아래에서 Fig. 1(AF)과 같은 조작으로 제핵하였다 (Takahashi, 1995). 제핵한 난자는 CO<sub>2</sub>배양기에서 30분간 배양하여 세포질이 정상형태로 돌아가게 한 후 rapid staining (Byun 등, 1991)하여 잔존 핵유무를 검사하였다.

#### 6. 할구의 분리

할구분리방법은 널리 이용되는 단백질 분해효소를 이용한 방법, acidic tyrode's solution을 사용하는 방법, 투명대를 절단 후 직경이 작은 피펫으로 흡입하는 방법을 사용하였다. 단백질 분해효소를 사용한 방법으로 0.5% protease (P4880, Sigma)를 함유한 PBS (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> free; CMF)에서 난모세포의 투명대가 확장 용해되는 것을 확인한 후 pipetting하여 투명대를 제거하였다. Acidic tyrode's solution(T1788, Sigma)을 이용한 방법으로는 37℃의 용액내에서 난모세포의 투명대가 녹는 것을 검사하였다. 투명대절단 방법은 투명대를 미세조작기 아래에서 투명대 절개침으로 크게 절단한 후, 0.125% trypsin(T8253, Sigma)과 0.05% EDTA(E6758, Sigma)가 든 CMF소적으로 난자를 옮긴 후 실체현미경 아래에서 난자보다 작은 직경의 피펫으로 pipetting하여 할구를 분리하였다.



**Fig. 2. Separation of blastomeres of parthenogene.**  
A: dissected zona pellucida, B: separated blastomeres.

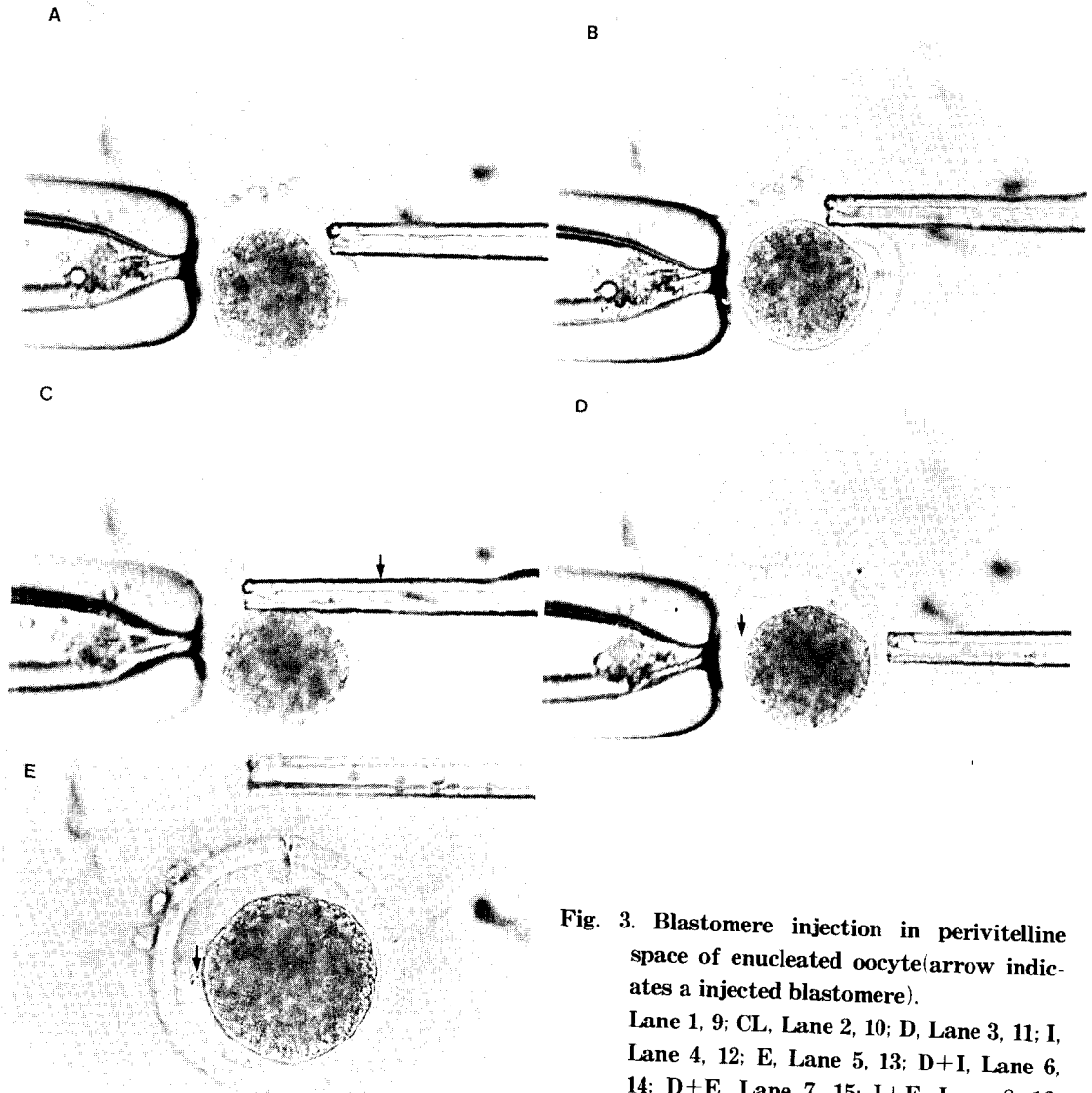
#### 7. 수핵란에 할구 주입

CD 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 함유된 TCM 199 30  $\mu\text{l}$  소적에 제핵난자를 넣고 Fig. 3과 같이 제핵 때 잘려진 틈으로 주입 피펫을 삽입하고 흡입된 할구를 주입하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 미세관 제작법과 미세조작관 장치방법의 영향

미세관들(microtools)을 직접히 제작하므로 난자의 조작효율을 높일 수 있었다. 평소에 충분한 수의 미세관들을 제작하여, 보관하고 있으면 조작에 요하는 시간과 노력을 줄일 수 있었다. 피펫은 외경 1 mm가 적합하였고, 고정 피펫(Fig. 1.A의 왼쪽 피펫)은



**Fig. 3.** Blastomere injection in perivitelline space of enucleated oocyte (arrow indicates a injected blastomere).

Lane 1, 9; CL, Lane 2, 10; D, Lane 3, 11; I, Lane 4, 12; E, Lane 5, 13; D+I, Lane 6, 14; D+E, Lane 7, 15; I+E, Lane 8, 16; D+I+E.

난자의 크기보다 조금 작은 것이 조작에 용이하였다. 그리고 투명대 절개침(Fig. 1.A의 오른쪽 피켓)은 끝이 뾰족하여, 직경 8  $\mu\text{m}$  정도로 가는 부위의 길이가 300  $\mu\text{m}$  정도 유지되어야 절단이 용이하였다. 주입 피켓은 할구의 크기에 따라 관의 직경을 20~35  $\mu\text{m}$  정도로 만들어 사용했을 때 할구의 이식이 용이하였다.

Prather 등 (1987), Robl 등 (1987), 김 등 (1994), 박 등(1994)은 수핵란을 제핵 피켓으로 핵이 포

함된 karyoplast를 흡입하여 핵을 제거하였다. Malter(1992)는 제핵 피켓으로 투명대를 뚫을 수 있게 관의 말단의 일부분을 1~2  $\mu\text{m}$  정도 뾰족하게 뽑았으며, 투명대 통과에 저항을 없애기 위해 미세연마기로 말단을 사각지게 갈아 날카롭게 하였다. 또한 분리된 할구를 주입하는 방법도 뚫어진 투명대를 통하여 할구를 수핵란의 난황주위강에 주입하기 위하여 관의 말단을 불화수소로 녹여 내경을 얇게 하여 큰 할구를 주입할

수 있게 하였다.

본 실험에서는 투명대를 절단하여 난자를 살짝 눌러 극체와 핵을 제거하였으며, 투명대에 넓은 절단면이 생겨 할구주입을 위한 섬세한 주입 피펫은 필요치 않았다(Takahashi, 1994).

미세조작기에 미세관을 장치하는데 있어서 미세관을 두번 꺾는 방법은 적합하지 않았으나 장치하기는 쉽고 조작성이 정확하였다. 한번 꺾는 방법은 제작이 쉽고, 미세조작기에 맞으나, 조작성이 부정확한 면이 있었다. 한번 꺾는 방법으로 일반 배양 접시 (Falcon #3001, BD, USA; 직경 35 mm, 높이 10 mm)를 사용할 경우 접시의 외곽 벽에 피펫이 걸려 조작성이 안된다는지, 고정 피펫과 투명대 절개침이 일직선으로 되지 않고 엇갈리는 경우가 많았다(Malter, 1992). 본 연구에서는 두번 꺾는 방법은 적합하지 않아 한번 꺾는 방법을 사용하였다. 이때 접시가 맞지 않을 경우 직경이 큰 접시 (Falcon #3002; 직경 60 mm, 높이 15 mm)를 사용하여 미세관이 접시의 외곽 벽에 걸리지 않고 접시 내로 들어오게 하거나, 외곽 벽이 낮은 접시 뚜껑을 사용하여 외곽 벽에 걸리지 않게 하였으며, 두개의 피펫이 평행이 이루어지지 않은 경우 다시 장작하여 최대한 평행이 되게 하였다.

## 2. 할구분리 방법의 비교

본 실험에서는 3가지 방법으로 투명대를 제거한 후, 할구를 분리하였다. 난자를 0.5% protease 용액에서 5분 정도 노출 후 투명대가 팽윤, 용해했을 때, 피펫팅하여 투명대를 쉽게 제거하였으나, 세포질이 단단해지는 변형이 일어났다. Acidic tyrode's solution으로 투명대를 녹였을 때 투명대의 일부가 용해되었으나 일부는 세포질에 붙어 제거가 불가능하였다. 물리적으로 투명대의 일부를 찢어, 난자보다 작은 피펫으로 배를 부드럽게 피펫팅했을 때 세포에 손상을 주지 않고 쉽

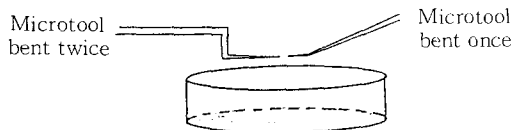


Fig. 4. Microtools to be accommodated on the culture dish (adapted from Malter, 1992).

게 할구들을 분리할 수 있었다.

Pratt (1987)는 다수의 배의 투명대를 제거할 때는 물리적 방법보다는 화학적 방법이 더욱 유리하다고 하였으며, acidic Tyrode's solution이나 pronase solution같은 화학적 방법을 사용할 때는 solution의 조성과 삼투압이 성공에 중요한 요소라고 했다. 그리고 acidic Tyrode's solution을 이용할 경우 37°C 온도를 유지하는 것도 중요하다고 하였다. Smith와 Wilmot (1990)는 할구분리시 중요시되어야 할 사항은 세포에 손상을 가장 적게 주며 할구를 분리할 수 있는 발달단계라 하였다.

삼투압이나 세포내 성분을 변화시켜 세포를 응축시키는 방법이나, pH를 이용하여 세포를 용해시키는 방법은 숙련이 필요하며 세포질에 손상을 크게 주기 때문에, 상실배 단계에서 compaction이 일어나기 전에 배보다 직경이 작은 피펫으로 부드럽게 pipetting하는 것이 세포에 손상을 가장 적게 주고 할구를 분리하는 방법이다.

## 3. 난포란의 성숙시기와 제 1 극체 출현

난포란의 성숙기간 중 제 1극체 출현을 현미경하에서 관찰하고 염색하여 M II 상태를 검사한 결과는 Table 1과 같다.

처음 71개의 난모세포를 CO<sub>2</sub>배양기에서 배양하여 성숙시켰는데 성숙개시 후 20시간째에 13개의 난자에서 극체가 방출되었다. 13개를 제외하 나머지 58개 중 20개는 성숙 22시간째에 극체가 방출되었으나 염색검사에서 1개는 극체가 아니었다. 나머지 38개 중 24시간째에 추가로 23개가 극체를 방출했는데, 22시간째의 극체보다 선명한 형태를 보였다. 24시간 이후부터는 극체가 방출되는 정도가 낮았으며 극체로 판단되었던 것도 염색결과 세포질파쇄(fragment)로 판명되었다. 32시간째에도 극체를 방출하지 않는 난모세포가 3개 있었는데 이들 중 2개는 MII로 발달하였으나, 외견상 극체는 방출하지 않았으며, 나머지 1개는 핵상태가 비정상적이었다.

본 연구에서 제 1극체 출현율은 22시간째에 46%, 24시간째에 78%였는데, 임 등(1993)은 제외 성숙물로 판정한 극체 출현율은 70% 였다고 하였다. 본 연구에서는 성숙 22시간째보다 24시간째에 극체의 형태가 선명했으며, 32시간에는 1% 내외의 극체가 방출하였

**Table 1. First polar body extrusion during maturation of follicular oocyte**

Maturation time (hr)	No. of oocytes observed	No. of oocytes with first polar body		Error
		Without staining(%)	With staining(%)	
20	71	13 (18)	13 (18)	
22	58	20 (28)	19 (27)	1
24	38	23 (32)	23 (32)	
26	15	4 (6)	4 (6)	
28	11	3 (4)	2 (4)	1
30	8	4 (6)	-	4
32	4	1 (1)	1 (1)	

다. 한편 수정시기를 지난 미수정 난자는 노화가 진행되어 세포질이 파쇄되는 정도가 증가한다고 하였는데 (Hafez, 1993) 본 연구에서도 28시간 이후부터는 극체처럼 보였으나 실제로 핵이 없는 단순한 세포질 파쇄인 것이 관찰되었다. 따라서 극체 방출로 본 최적의 제핵시기는 체외성숙개시 후 24시간째로 사료된다.

#### 4. 실험의 반복이 제핵률에 미치는 영향

실험의 반복이 제핵률에 미치는 영향은 Table 2와 같다.

성숙 24시간째 난자 중 제 1극체 출현률은 1, 2 및 3차 실험에서 각각 63, 62 및 83%로 공시한 난자 중 62~83%가 극체 출현률을 보였다. 극체를 가지고 있는 난자 중 제핵되는 난자의 비율은 1, 2 및 3차 실험에서 각각 77, 76 및 85%로 3번째 실험에서 가장 높았

다. 따라서 3차에 걸쳐 총 79개의 난자를 제핵했을 때 제 1극체가 있는 난자는 78%가 제핵이 가능하였으며 제핵률은 실험을 거듭할 수록 높아졌으며, 한편 난자 1개를 제핵하는데 소요되는 시간도 5~6분에서 3분으로 단축되었다.

#### 5. 성숙시간이 제핵률에 미치는 영향

성숙시간이 극체 출현률과 제핵률에 미치는 영향은 Table 3과 같다.

성숙 22와 24시간째의 극체 출현률은 82와 53%로 22시간이 24시간보다 높았다. 한편 제핵률은 성숙 22와 24시간이 각각 76과 100%로 24시간이 22시간보다 높았다. 난자 1개를 제핵하는데 요하는 시간은 3분으로 성숙 22와 24시간간에 차이가 없었다. 성숙 22시간 된 난자는 제 1극체 출현률은 높으나 제핵률이 낮은

**Table 2. Effect of repetition of experiment on enucleation rate**

Repetition of experiment	No. of oocytes used	No. of oocytes with polar body(%)	No. of enucleated oocytes (%)	Enucleation time(min) /oocyte
1st	35	22 (63)	17 (77)	5
2nd	60	37 (62)	28 (76)	6
3rd	24	20 (83)	17 (85)	3
Total	119	79 (66)	62 (78)	5

**Table 3. Effect of maturation time on enucleation rate**

Maturation time(hr.)	No. of oocytes used	No. of oocytes with polar body(%)	No. of enucleated oocytes (%)	Enucleation time(min) /oocyte
22	51	42 (82)	34 (76)	3
24	57	30 (53)	30 (100)	3

것으로 보아 제핵이 어려운 난자가 존재하는 것으로 시사된다. 한편 성숙 24시간째의 난자는 제 1극체 출현율은 낮으나 제핵은 용이한 것으로 시사된다.

제 1극체 출현율이 22시간째가 24시간째보다 높은 것은 김과 박(1988)과 서 등(1990)의 결과와 상반되는데, 이는 24시간째보다 22시간째가 극체를 구분하기가 상대적으로 어려웠기 때문이었다고 사료된다. Takahashi (1994)는 성숙 22, 24, 26, 32 및 44시간째의 제핵률이 각각 89.5, 93.3, 85.4, 69.1 및 58.8%로 24시간 때에 최고의 제핵률을 얻을 수 있었으며, 시간이 경과함에 따라 제핵률이 급격하게 떨어졌다고 보고하였다. Collas와 Robl (1990)도 노화된 난자들은 극체가 퇴행하여 제핵효율이 유의적으로 떨어진다고 보고하였다.

#### IV. 적 요

본 연구에서는 미세관 제작법과 미세조작관의 장치법과 할구분리방법을 검토하고 난포란의 성숙시기와 극체출현율, 실험반복과 제핵률 및 성숙시간과 제핵률에 관하여 검토하였으며 그 결과는 다음과 같다.

1. 피펫관의 외경은 1 mm가 적합하였고, 고정 피펫관의 외경은 난자의 크기보다 조금 작은 것이 조작에 용이하였고 투명대 절개침은 끝이 뾰족하고 직경이 8  $\mu$ m인 부위가 300  $\mu$ m길이 정도 되어야 절단에 용이하였다. 주입 피펫은 직경 20~35  $\mu$ m가 할구 이식에 적합하였다.
2. 할구분리방법은 물리적으로 투명대를 찢고 난자보다 작은 피펫으로 난자를 부드럽게 피펫팅하여 할구를 꺼내는 것이 효과적이었다.
3. 난자의 78%가 성숙배양 20~24시간 사이에 제 1극체를 방출하였다.
4. 제핵조작을 반복할수록 제핵률이 높아(85%)졌으며 난자 1개를 제핵하는데 요하는 시간(3분)도 단축되었다.
5. 성숙 22시간된 난자는 제 1극체 출현율이 82%로 높았으나 제핵률은 76%로 낮았다. 한편 성숙 24시간된 난자는 제 1극체 출현율이 53%로 약간 낮았으나 제핵률은 100%로 높았다.

본 연구 수행에 있어서 현미미세조작기와 연구환경을 제공해 준 축산기술연구소와 연구수행에 협조해 준

오성종, 양보석 연구사에 심심한 감사를 표한다. 또한 소 난자의 핵이식 기술을 지도하여 준 일본 축산시험장의 Dr. Hanada, Dr. Imai, Dr. Tokunaga 및 Dr. Takahashi에게 감사한다.

#### V. 인용문헌

1. Balakier, H. and A.K. Tarkowski. 1976. Diploid parthenogenetic mouse embryos produced by heat shock and cytochalasin B. J. Embryol. exp. Morph. 35:25-39.
2. Collas, P. and J.M. Robl. 1990. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. Biol. Reprod. 43:877-884.
3. Hafez, E.S.E. 1993. Transport and survival of gametes. In: E.S.E. Hafez ed. Reproduction in farm animals. Lea & Febiger, Philadelphia. pp.162-163.
4. Illmensee, K. and P.C. Hoppe. 1981. Nuclear transplantation in *Mus musculus*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. Cell 23:9-18.
5. Im, K.S., H.J. Kim, K.M. Chung, H.S. Kim, K.W. Park and K. Niwa. 1995. Effect of granulosa and cumulus cells on in vitro development of bovine follicular oocytes. AJAS. 8:317-320.
6. Kubiak, J.Z. and A.K. Tarkowski. 1985. Electrofusion of mouse blastomere. Exp. Cell. Res. 157:561-566.
7. Malter, H.E. 1992. Tools and techniques for embryological micromanipulation. In: Cohen, J., H.F. Malter, B.E. Talansky and J. Grifo eds. Micromanipulation of human gametes and embryos. Raven Press, NY, pp. 250-297.
8. McGrath, J. and D. Solter. 1983. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. Science 220: 1300-1302.
9. Ozil, J.P. 1990. The parthenogenetic devel-



- opment of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation, *Development* 109:117-127.
10. Prather, R.S., F.L. Barnes, M.M. Sims, J. M. Robl, W.H. Eyestone and N.L. First. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.* 37:859-866.
  11. Pratt, H.P.M. 1987. Isolation, culture and manipulation of pre-implantation mouse embryos. In: Monk, M. ed. *Mammalian development*. IRL Press, Oxford, England. pp. 13-42.
  12. Presicce, G., and X. Yang. 1994. Nuclear dynamics of parthenogenesis of bovine oocytes matured in vitro for 20 and 40 hours and activated with combined ethanol and cycloheximide treatment. *Mol. Reprod. Dev.* 37:61-68.
  13. Robl, J.M., R. Prather, F., Barnes, W. Eyestone, D. Northey, B. Gilligan and N.L. First. 1987. Nuclear transplantation in bovine embryos. *J. Anim. Sci.* 64:642-647.
  14. Smith, L.C. and I. Wilmut. 1990. Factors affecting the viability of nuclear transplanted embryos. *Theriogenology* 33:153-164.
  15. Willadsen, S.M. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 320:63-65.
  16. 高橋清也. 1994. 畜産における最新技術(4)-クローン家畜の作出技術. *畜産の研究* 48:527-534.
  17. 김상근, 박향균. 1988. 소 난포란의 체외성숙과 수정에 관한 연구. *한국가축번식학회지* 12:112-119.
  18. 김정익, 정희태, 박춘근, 양부근. 1994. 소 체외수정란의 단일분할구와 제핵미수정란 융합배의 초기 발생에 관한 연구. *한국가축번식학회지* 18:121-126.
  19. 박충생, 공일근, 노규진, 이효종, 최상용. 1994. 한우 체외수정란을 이용한 핵 이식배의 체외발달에 관한 연구. 18:113-119.
  20. 변태호, 이상호, 송해범. 1991. 가축 난자핵의 급속 염색법 개발. *한축지*. 33:25-31.
  21. 서태광, 정법식, 김규현, 전익수, 유재웅, 박수봉, 박향균. 1990. 한우에 있어서 난포란의 체외성숙에 영향을 미치는 요인에 관한 연구. *한국가축번식학회지* 14:263-271.
  22. 임경순, 김형선, 정구민, 박연진, 김현중, 박광욱. 1993. 발정혈청 및 양수가 소 난포란의 체외성숙에 미치는 영향. *한축지*. 35:163-167.