

수핵란 세포질의 세포주기 조절에 의한 소 체외수정란의 핵이식

정희태 · 임석기* · 박춘근 · 양부근 · 김정익
강원대학교 축산대학

Nuclear Transplantation of Bovine IVF Embryos by Cell Cycle Control of Recipient Cytoplasm

Cheong, H. T., S. K. Im*, C. K. Park, B. K. Yang and C. I. Kim
College of Animal Agriculture, Kangwon National University

SUMMARY

This study was conducted to investigate the effect of S-phase synchronized nuclear transfer on the development of nuclear transplant bovine embryos. A blastomere derived from the 16~32 cell stage bovine embryos was transferred into an enucleated metaphase II (M II) oocytes or activated S-phase eggs. From the M II-phase and S-phase nuclear transfer, 6.3%(4/63) and 13.8%(9/65) of nuclear transplant embryos developed to the blastocyst stage, respectively. In the S-phase nuclear transfer, maximal proportion of embryos developed to the blastocyst stage(16.6%) was obtained after the recipient cell was activated 8 h prior to receiving a donor nucleus. M II-phase nuclear transplant embryos showed the PCC state of their nuclear at 1.5~2 h after fusion, whereas, S-phase nuclear transplant embryos did not undergo PCC. The result of this study suggests that if blastomeres of unknown cell-cycle-stage are used, S-phase nuclear transplantation through the activation of enucleated oocytes prior to fusion enhances development of nuclear transplant embryos. This result also suggests that the interval time from oocyte activation to cell fusion may affect the development of nuclear transplant embryos.

Key words: nuclear transfer, activation, cell-cycle-stage, S-phase cytoplasm, bovine.

I. 서 론

포유동물 수정란의 핵이식 기술은 발육도중에 있는 배 유래의 핵을 탈핵 미수정란 세포질에 이식함으로써 개체를 생산해 내는 기술이나, 이 경우 핵과 세포질간의 복잡한 상호작용이 핵이식란의 발육에 영향을 미치게 된다. 그 중에서도 핵과 세포질의 세포주기단계(cell-cycle-stage)가 가장 중요한 요소로 인식되고

있는데(Collas 등, 1992; Cheong 등, 1993, 1994), 토끼(Collas 등, 1992)와 생쥐(Cheong 등, 1993)의 경우, G1 기의 핵을 제 2 감수분열중기(metaphase II 기; M II 기) 난자의 탈핵 세포질에 이식하였을 경우에는 핵이식배의 발육능이 향상되었으나, S기의 핵을 이식한 경우는 발육능이 현저히 저하되었다. 수정란의 핵을 M II 기 탈핵 세포질에 이식할 경우, 핵의 미성숙염색체응축(premature chromosome condensation; PCC)이 일시적으로 일어나게 되는데

본 연구는 1995년도 동물자원연구센터 학술지원금에 의하여 연구되었음.

(Collas 등, 1992; Cheong 등, 1993), PCC 이후의 핵의 형태적 변화가 핵의 세포주기단계에 따라 다양하게 나타나, 그에 따라 핵이식배의 발육능도 영향을 받는 것으로 보고되었다(Cheong 등, 1993). 따라서 미수정란의 탈핵 세포질을 수핵란으로 이용할 경우는 이식할 분할구핵의 세포주기단계를 G1기에 동조시키는 것이 핵이식란의 정상적인 발육을 위한 중요한 요인으로 인식되어져 왔다(Collas 등, 1992; Cheong 등, 1993).

소의 핵이식 연구에 있어서도 donor핵의 세포주기 단계를 초, 중, 후기로 나누어 핵이식배의 발육능을 검토한 시도가 있었으나(Stice 등, 1993), 실험동물에서와 같은 결과를 얻는데는 실패하였다. 생쥐나 토끼의 초기배와 달리, 소 수정란의 경우 2 세포기 이후는 G1기가 극히 짧거나 결여되어 있기 때문에, 소 수정란의 분할구 핵의 세포주기단계를 G1기에 동조시키는 것이 매우 어렵거나 심지어 불가능할 수 있음이 시사되었다(Barnes 와 Eyestone, 1990). 한편, 체내에서 회수된 25~48 세포기 수정란 세포의 세포주기단계를 histone H1 kinase 불활성을 측정하는 방법으로 검토한 결과, 분할구 핵의 약 80% 이상이 DNA 합성기인 S기에 머물러 있음이 확인되었다(Barnes 등, 1993a). 이와 같은 결과에 근거하여 분할구 핵의 세포주기를 동조시키는 대신, 대부분 분할구의 세포주기단계가 S기에 있을 것으로 가정하고, 역으로 핵이식전에 미수정란의 세포질의 활성화를 유지하여 S기에 동조시킨 후, 핵을 이식하는 방법으로 핵이식 배반포를 얻었다는 보고가 있다(Barnes 등, 1993a; Kono 등, 1994; Aoyagi 등, 1994).

본 연구는 체외성숙, 체외수정 소 난자 및 수정란을 이용하여 핵이식을 실시하고, 수핵란 세포질의 활성화 처리에 의한 S기 동조가 핵이식배의 발육능에 미치는 영향을 검토하기 위하여 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난자 및 배의 준비

도축장에서 회수한 난소로부터 난포액을 흡입하는 방법으로 미성숙 난자를 채취한 후, 실제 현미경하에서 난자 위주의 난구세포가 균일하고 세포질이 균질한 것만을 선별하였다. 난포란의 체외성숙은 TCM-199

배양액에 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS, Gibco, NY, USA)과 FSH(Sigma, St. Louis, MO, USA) 0.02U/ml 및 estradiol-17 β (Sigma) 1 μ g/ml이 함유된 배양액 50 μ l의 소적중 10여개씩의 난포란을 넣고 paraffin oil로 피복하여 5% CO₂, 95% 공기 및 39 $^{\circ}$ C의 온도조건하에서 22~24 시간 배양하였다.

성숙된 난포란은 5mM caffeine, 10 μ g/ml heparin, 3mg/ml BSA와 2.5 \times 10⁶정자/ml이 함유된 BO액(Brackett와 Oliphant, 1975) 50 μ l의 소적중 10여개씩 옮겨 넣고 5% CO₂, 95% 공기 및 39 $^{\circ}$ C의 온도조건하에서 18~20시간 체외수정 하였다. 수정후 난자는 체외배양액(TCM-199 + 3mg/ml BSA)으로 세척하고 난구세포가 붙어있는 채로 체외배양액 내에서 36~40시간 배양 후 2~8세포기로 발육한 수정란은 동일한 배양액내에서 4~5일간 난구세포더미와 공동배양하여 16~32 세포기로 발육된 수정란을 공핵란으로 공시하였다. 한편, 수핵란은 22~24시간 체외성숙된 난포란을 150 IU/ml의 hyaluronidase를 함유한 1ml의 체외배양액이 들어있는 원심관에 옮겨, vortex mixer로 3분간 처리하여 난구세포를 제거한 후, 세포질의 색조가 균일하고 제1극체가 확인된 난자만을 공시하였다.

2. 미수정란의 탈핵 및 활성화

미수정란의 탈핵은 5 μ g/ml cytochalasin B(CB)와 20% FBS가 함유된 수정 PBS(modified phosphate buffered saline; mPBS)액내에서 Prather 등(1987) 및 김 등(1993)의 방법에 준하여 염색체를 제거하는 방법으로 실시하였다. 미수정란의 염색체 제거는 injection pipette를 이용하여 제1극체와 주변의 세포질을 약 1/3정도 흡입 제거하였다. MII기 난자에서의 핵이식(MII기 핵이식)을 위해서는 나머지 난세포질 부분을 1 μ g/ml 농도의 Hoechst 33342로 20분간 처리하여 형광현미경 하에서 염색체의 유무를 확인하고, 탈핵이 확인된 난자만을 수핵란 세포질로 사용하였다. 그러나 S기 난자에의 핵이식(S기 핵이식)을 위하여는 염색에 의한 탈핵 여부 검사를 실시하지 않고, 핵이식전에 난세포질의 활성화를 실시하고, 활성화처리 후 극체를 방출하지 않은 미수정란을 탈핵란으로 판단하여 수핵란 세포질로 공시하였다.

S기 핵이식을 위한 미수정란 세포질의 활성화처리는 $10\mu\text{M}$ 의 Ca^{2+} -ionophore(A23187; Sigma)로 5분간 처리한 후 곧바로 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 cycloheximide(Sigma)와 $3\text{mg}/\text{ml}$ BSA가 첨가된 TCM-199 용액의 소적($50\mu\text{l}$)내로 옮겨 6시간 동안 배양하였다. 활성화처리 후 핵이식까지의 경과시간의 영향을 검토하기 위한 실험에서는 cycloheximide처리 후 탈핵란을 핵이식전까지 배양액내에서 0~4시간 배양하였다.

3. 핵이식

Donor 용 수정란은 0.25% pronase 용액으로 2~3분간 처리하여 투명대를 제거하고, Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 이 포함되지 않은 PBS(PBS-)액 내에서 pipetting에 의하여 분할구를 분리하였다. Donor 배의 단일할구는 injection pipette내로 흡인하여 탈핵을 실시한 구멍을 통하여 탈핵란 세포질의 위란강내로 주입하였다.

4. 전기융합

핵이식란의 전기융합은 BTX-200 세포융합장치(BTX, San Diego, CA, USA) 및 1.0mm폭의 wire chamber를 사용하여 Cheong 등(1993) 및 김 등(1994)의 방법에 준하여 실시하였다. 핵이식란은 0.1mM MgSO_4 , 0.05mM CaCl_2 및 0.05mg/ml BSA가 첨가된 0.3M mannitol 용액을 넣은 wire chamber의 양전극 사이로 옮겨, 0.6MHz, 12V/mm의 교류(AC)전류를 6초간 통전하여 분할구와 세포질의 접촉면이 양전극에 수평이 되도록 유도하고, 이어서 1.25 kV/cm의 직류(DC)전류를 $70\mu\text{sec}$ 간 2회 통전하여 세포융합을 유도하였다. 통전 후 핵이식란은 즉시 $3\text{mg}/\text{ml}$ BSA가 첨가된 TCM-199 액내에서 수회 세척후 체외배양용 배지내에서 융합 여부를 관찰하였다.

5. 핵이식배의 체외배양

S기 핵이식의 경우, 융합란은 곧바로 체외배양배지내로 옮겨졌으나, M II기 핵이식의 경우는 융합 후 수핵란 세포질을 위의 난세포질 활성화처리와 같은 방법으로 처리하여 난세포질의 활성화를 유기한 후 체외배양에 공시하였다. 핵이식배는 $3\text{mg}/\text{ml}$ BSA가 첨가된 TCM-199 액의 $50\mu\text{l}$ 소적내에서 사전에 준비되어진 난구세포터미와 함께 5% CO_2 , 95% 공기 및 39°C 의

온도조건하에서 8~9일간 공동배양하여 분할을 및 발육율을 검사하였다.

6. Whole-mount 표본의 제작

핵이식란의 PCC여부를 검사하기 위하여 일부 핵이식배는 전기융합 후 1.5~2시간에 고정하여 whole-mount 표본을 제작하였다. 핵이식배를 vacellin과 paraffine혼합물(9:1)로 4각에 소적을 배치한 slide glass 위에 소량의 배양액과 함께 옮겨놓고 커버글라스로 가볍게 압착하였다. 그 후 acetic acid와 ethanol을 3:1로 혼합한 고정액으로 24~72시간 고정한 후 0.5% aceto-orcein으로 1~3분간 염색하고 25% aceto-glycerol로 세척하여 위상차현미경($\times 400$)으로 핵의 형태를 관찰하였다.

7. 통계처리

실험결과는 Chi-square 검정에 의하여 유의성을 검정하였다.

III. 결 과

1. 수핵란 세포질의 세포주기단계의 영향

분할구 핵을 각각 M II기 미수정란 및 활성화처리 후 6시간째의 S기 난자의 탈핵 세포질에 이식하여 체외발육율을 검토한 결과를 Table 1에 나타내었다. 배반포기로 발육된 수정란의 비율은 M II기 핵이식 및 S기 핵이식에서 각각 6.3%(4/63) 및 13.8%(9/65)로 S기 핵이식의 경우가 M II기 핵이식에 비하여 2배 이상 높았으나, 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

2. 활성화 후 경과시간의 영향

S기 핵이식의 경우, 난 세포질의 활성화 후 융합시까지의 경과시간이 핵이식란의 발육에 미치는 영향을 검토한 결과, 활성화 개시 후 6, 8 및 10시간에 핵이식 및 전기융합을 실시한 경우의 배반포 발육률은 각각 11.5%(6/52), 16.6%(9/54) 및 13.7%(7/51)로 유의적인 차이는 인정되지 않았으나, 8시간의 경우가 다소 높은 배반포 발육률을 나타내었다(Table 2).

3. 핵이식란의 염색체용측 유무 검토

M II기 핵이식 및 S기 핵이식란을 각각 세포융합

Table 1. Effect of recipient cell cycle stage on the development of nuclear transplant embryos

Recipient cell cycle stage ^a	No. (%) of eggs / fused / manipulated	No. (%) of embryos developed to		
		2-Cell	Morula	Blastocyst
M II	63 / 69(91.3)	52(82.5)	7(11.1)	4(6.3)
S	65 / 73(89.0)	57(87.7)	13(20.0)	9(13.8)

^a M II : metaphase II -phase, S: S-phase(6 h post activation)

Table 2. Effect of interval time between activation and fusion on the development of nuclear transplant embryos

Interval time between activation and fusion(h)	No. (%) of eggs / fused / manipulated	No. (%) of embryos developed to		
		2-Cell	Morula	Blastocyst
6 h	52 / 59(88.1)	37(71.2)	8(15.4)	6(11.5)
8 h	54 / 61(88.5)	48(88.9)	12(22.2)	9(16.6)
10 h	51 / 58(87.9)	42(82.4)	9(17.6)	7(13.7)

Table 3. Nuclear morphology of nuclear transplant eggs 1.5~2 h after fusion

Recipient cell cycle stage ^a	No. of eggs treated	Nuclear morphology ^b	
		PCC(%)	NPCC(%)
M II	29	28(96.6)	1(3.4)
S	25	—	25(100.0)

^a M II : metaphase II -phase, S: S-phase

^b PCC: premature chromosome condensation, NPCC: non-PCC

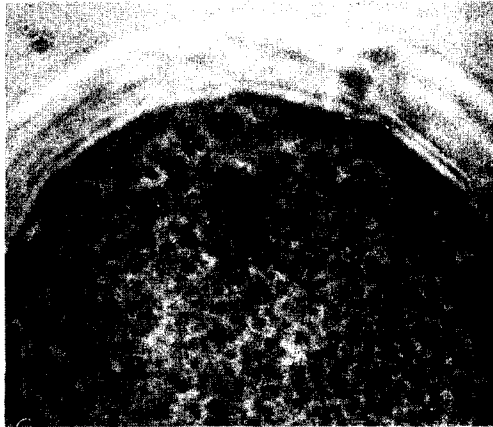


Fig. 1. Nuclear morphology of M II -phase nuclear transplant embryos at 1.5~2 h after fusion. The embryo showed the PCC state of the donor nucleus.

후 1.5~2시간 췌에 고정하여 이식된 핵의 미성숙염

색체응축(PCC) 여부를 검사한 결과, M II기 핵이식란은 96.6%(28/29)가 PCC의 형태를 보인 반면 (Fig. 1), S기 핵이식란의 경우는 PCC가 관찰되지 않았다(Table 3).

IV. 논 의

소 수정란의 핵을 탈핵 미수정란 세포질에 이식할 경우, 핵이식란의 발육에 영향을 주는 요소 중의 하나가 탈핵란 세포질의 활성화였다. 소 미수정란의 경우, 성숙직후의 어린 난자는 mouse 등에서의 같이 전기융합시에 주어지는 전류에 의하여 활성화 되는 확률이 적어, 활성화 유기를 위한 별도의 수단을 사용하지 않으면 핵이식란의 발육능이 매우 저조하였다. 수핵란 세포질의 활성화를 위한 방법으로, 성숙배양후 24시간에 탈핵을 실시하고, 30~43시간까지 세포질을 과성숙시킨 후 핵이식 및 전기융합을 실시하는 방법이 사용되어 왔다(Sims 등, 1991; Barnes 등, 1993b;

Stice 등, 1993). 최근에는 성숙 직후의 어린 난자에 전기자극, 에탄올처리 또는 Ca^{2+} -ionophore처리 후 단백질합성 억제제인 cycloheximide로 추가배양하여 주는 방법에 의하여 높은 활성화율을 얻을 수 있음이 확인되었으며(First 등, 1992; Presicce와 Yang, 1994), 이 조건에 의하여 어린 난자를 이용한 핵이식에도 성공하고 있다(First 등, 1992; Aoyagi 등, 1994). 본 연구에서도 성숙 직후의 어린 난자에 탈핵을 실시하고, 핵이식후 cycloheximide 처리로 난세포질의 활성화를 유기하여 저조하지만 핵이식 배반포를 얻는데 성공하였다. 배반포까지의 발육률이 저조한 이유는 난세포질의 활성화에 원인이 있는 것이라기 보다는 미수정란 세포질에 이식된 핵의 형태변화에 기인된 것으로 사료된다(Cheong 등, 1993, 1994). 성숙 직후의 어린 난자는 성숙촉진인자(maturation promoting factor; MPF)의 활성이 높아, 이식된 핵은 이식 직후 PCC현상을 일으키게 되고(Collas 등, 1992; Cheong 등, 1993), PCC이후 핵의 형태는 이식된 핵의 세포주기단계에 따라 다양할 수 있음이 보고되었다(Cheong 등, 1993). M II기 난자에 간기의 핵을 이식할 때, G1기 이외의 핵을 이식하면 정상적인 염색체 구성을 가지지 못하기 때문에 핵이식배의 정상적인 발육이 기대될 수 없다(Cheong 등, 1993; Campbell 등, 1994). 본 실험에서는 공핵란의 세포주기단계를 G1기에 동조시키기 위한 조작을 행하지 않았기 때문에 배반포로의 발육율이 저조한 것으로 판단된다.

미수정란 세포질의 핵이식전 활성화처리는 세포질의 세포주기를 M II기에서 간기로 이행시키게 되며, 활성화 후 경과시간에 따라 대략적인 세포주기단계를 추정할 수 있다. 소 1 세포기 수정란의 경우는 수정 후 6시간 까지가 G1기이며, S기는 G1기 종료 후 약 8시간 동안으로 추정하고 있다(Barnes와 Eyestone, 1990). 따라서 본 실험에서 난세포질의 세포주기단계는 최초 활성화처리 후 약 6시간 이후부터 대략적인 S기로 추정할 수 있다. 본 시험의 결과 donor핵의 세포주기단계를 동조시키지 않은 상태에서 M II기 핵이식 보다는 S기 핵이식의 경우가 다소 높은 배반포 발육율을 나타냈으나, S기 동조 핵이식의 비교우위를 판단할 수 없었다. Aoyagi 등(1994) 및 Barnes 등(1993a)은 S기 동조 핵이식에 의하여 핵이식배의 발육능이 향상되었다고 보고하였다. 공핵란 분할구의 세포주기단

계가 대부분 S기에 동조된 것으로 가정하고, 수핵란 세포질의 세포주기단계를 S기에 동조시켜 핵이식한 경우, 이식된 핵은 PCC현상을 보이지 않고 세포질과 세포주기단계가 동조되기 때문에 정상적인 염색체 구성을 가지고 정상적으로 발육을 할 수 있는 것으로 추측하고 있다.

수핵란 세포질의 세포주기단계가 활성화 후 6시간부터 S기로 이행한다고 하나, 단순히 활성화 후 6시간째에 핵이식을 실시함으로써 정확하게 S기에 동조되었다고 할 수 없다. S기 핵이식이라 할지라도 DNA 합성이 개시되는 초기 S기와 DNA 합성이 거의 완료되어 가는 후기 S기로 구분되어질 수 있다. Collas 등(1992)은 M II기 난자에 핵이식이라도 초기 S기의 핵을 이식할 경우는 G1기의 핵을 이식한 경우에서처럼 높은 배반포 발육율을 얻을 수 있다고 보고하였다. 소 수정란 세포의 경우, S기에 속하는 시간은 대략 8시간 정도로 추정하고 있어(Barnes와 Eyestone, 1990), donor 핵이 S기에 속해 있다고 하더라도 정확히 S기의 어느 시기에 속해 있는지를 판단하기는 어렵다. 따라서, 본 연구에서 수핵란 세포질의 활성화 후 시간이 핵이식란의 발육에 미치는 영향을 검토한 결과, 활성화 후 8시간 경에 핵이식 및 융합을 실시한 경우에 핵이식란의 발육능이 다소 향상되는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 활성화 후 9시간에 핵이식 및 융합을 실시하여 24%의 배반포 발육율을 얻었다는 Kono 등(1994)의 보고와 비슷한 경향을 보인다.

이상의 결과는 세포주기단계가 명확하지 않은 소 수정란의 핵을 이식할 경우에는 핵이식 및 융합전에 탈핵란 세포질을 활성화시켜 S기로 이행되도록 하므로써 핵이식배의 발육을 증진시킬 수 있음을 시사한다. 또한 세포질의 활성화로부터 융합까지의 시간을 8시간 정도로 유지하여 줌으로써 발육율이 향상될 수 있음을 시사한다.

V. 적 요

본 연구는 체외성숙, 체외수정 소 난자 및 수정란을 이용하여 핵이식을 실시하고, 수핵란 세포질의 활성화처리에 의한 S기 동조가 핵이식배의 발육능에 미치는 영향을 검토하기 위하여 실시하였다. 소 16~32 세포기 수정란 유래의 분할구를 M II기 또는 활성화처리

에 의하여 S기로 이행된 난자의 탈핵세포질에 이식하여 핵이식란의 발육능을 비교하였다. 또한 S기 핵이식의 경우 활성화 후 융합까지의 시간간격이 핵이식란의 발육에 미치는 영향을 검토하였다. MⅡ기 및 S기 난자에의 핵이식 결과 각각 6.3%(4/63) 및 13.8%(9/65)가 배반포로 발육되었다. S기 핵이식의 경우, 활성화 개시 후 8시간에 핵이식 및 세포융합을 실시한 경우가 6 및 10시간후 핵이식에 비하여 배반포 발육율이 다소 높았다(16.6%). 핵이식란의 융합후 핵의 PCC여부를 검사한 결과, MⅡ기 핵이식란은 96.6%(28/29)가 PCC의 형태를 보인 반면, S기 핵이식란의 경우는 PCC가 관찰되지 않았다. 이상의 결과는 세포주기단계가 명확하지 않은 소수정란의 핵을 이식할 경우에는 핵이식 및 융합전에 탈핵란 세포질을 활성화시켜 S기로 이행되도록 하므로써 핵이식배의 발육을 증진시킬 수 있음을 시사한다. 또한 세포질의 활성화로부터 융합까지의 시간을 8시간 정도로 유지하여줌으로써 발육율이 향상될 수 있음을 시사한다.

VI. 인용문헌

1. Aoyagi, Y., M. Konishi, T. Wada and T. Takedomi. 1994. Unaged bovine oocytes successfully develop to blastocysts after parthenogenetic activation or nuclear transfer. *Theriogenology* 41:157(abstr.).
2. Barnes, F. L., P. Collas, R. Powell, W. A. King, M. Westhusin and D. Shepherd. 1993a. Influence of recipient oocyte cell cycle stage on DNA synthesis, nuclear envelope breakdown, chromosome constitution, and development in nuclear transplant bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 36:33-41.
3. Barnes, F. L., M. Emdebrock, C. Loony, R. Powell, M. Westhusin, and K. Bondioli. 1993b. Embryo cloning in cattle: the use of *in vitro* matured oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 97:317-320.
4. Barnes, F. L. and W. H. Eyestone. 1990. Early cleavage and the maternal zygotic transition. *Theriogenology* 33:141-152.
5. Brackett, B. G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.* 12:260-274.
6. Campbell, K. H. S., P. Loi, P. Cappai and I. Wilmut. 1994. Improved development to blastocyst of ovin nuclear transfer embryos reconstructed during the presumptive S-phase of enucleated activated oocytes. *Biol. Reprod.* 50:1385-1393.
7. Cheong, H. T., Y. Takahashi and H. Kanagawa. 1993. Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. *Biol. Reprod.* 48:958-963.
8. Cheong, H. T., Y. Takahashi and H. Kanagawa. 1994. Relationship between nuclear remodeling and subsequent development of mouse embryonic nuclei transferred to enucleated oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 37:138-145.
9. Collas, P., J. J. Balise 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.
10. First, N. L., M. L. Leibfried-Rutledge, D. L. Northey and P. R. Nettleman. 1992. Use of *in vitro* matured oocytes 24 hr of age in bovine nuclear transfer. *Theriogenology* 37:211 (abstr).
11. Kono, T., Y. Sotomaru, F. Aono, T. Takahashi, I. Ogiwara, F. Sekizawa, T. Arai and T. Nakahara. 1994. Effect of ooplast activation on the development of oocytes following nucleus transfer in cattle. *Theriogenology* 41:1463-1471.
12. 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.
13. Presicce, G. A. 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.
14. Sims, M. M., C. F. Rosenkrans, Jr. and N. L. First. 1991. Development *in vitro* of bovine embryos derived from nuclear transfer. *Theriogenology* 35:272(abstr).
 15. Stice, S. L. and C. L. Keefer. 1993. Multipul generational bovine embryo cloning. *Biol. Reprod.* 48:715-719.
 16. Stice, S. L., C. L. Keefer, M. Maki-Laurila and L. Matthews. 1993. Donor blastomere cell cycle stage affects developmental competence of bovine nuclear transfer embryos. *Theriogenology* 39:318(abstr).
 17. 김정익, 양부근, 정희태. 1993. 핵이식에 의한 소 난자및 초기배의 핵-세포질의 상호작용에 관한 연구. *한국가축번식학회지* 17:287-294.
 18. 김정익, 정희태, 박춘근, 양부근. 1994. 소 체외수정란의 단일분할구와 제핵미수정란 융합배의 초기발생에 관한 연구. *한국가축번식학회지* 18:121-126.