

## 토끼에서 미수정난자의 동결보존과 핵이식을 위한 수핵난자로서의 이용에 관한 연구

김창근 · 황성수 · 정영채 · 정영호\* · 손동수\*\* · 이종완\*\*\* · 이장희\*\*

중앙대학교 축산학과

### Cryopreservation of Unfertilized Oocytes and Use as Recipient Oocyte for Nuclear Transplant in Rabbits

Kim, C. K., S. S. Hwang, Y. C. Chung, Y. H. Chung\*, D. S. Son\*\*,

J. W. Lee\*\*\* and C. H. Lee\*\*

Department of Animal Science, Chung-Ang University, Ansong, Korea

#### SUMMARY

This study was conducted to investigate freezability of *in vivo* and *in vitro* matured rabbit oocytes, possibility of NT using frozen-thawed unfertilized oocytes, and NT efficiency by zona-slit micromanipulation. After freezing of *in vivo* matured oocytes, 33 to 49% of oocytes appeared normal morphology and 1.0M DMSO and 1.5M glycerol showed slightly high survival rate, but there was no difference in survival between two cryoprotectants. Freezability of *in vitro* matured oocytes was low in 1.5M glycerol and more sensitive to freezing. Efficiency of enucleation and fusion rate in method B was higher than that in method A and no difference in this efficiency was between 3 groups of oocytes in method B. Cleavage rate and developmental capacity to M+B stage of fused embryos derived from frozen oocytes was greatly lower than that from fresh oocytes, respectively(39.1% : 79.5% : 3.1% : 19.3%) and there was no difference in cleavage rate between DC voltages in two group oocytes. Additional incubation in cytochalasin B after electrical stimulation did not affect embryo development.

In conclusion, it is suggested that enucleation and nuclear transfer by slitting of zona is more effective method in rabbit and that further study on optimum freezing conditions for *in vitro* matured oocytes is necessary to use as recipient oocytes.

#### I. 서 론

소에서 체외성숙난자를 이용한 수정란의 체외생산  
기술이 산업화 되었고(Brackett와 Zuelka, 1993) 그

결과 체외성숙난자를 이용한 핵이식기술의 산업적 요  
구도 더욱 증대되고 있다. 그런데 핵이식배의 생산효  
율에 영향을 미치는 요인이 많기 때문에 핵이식배의  
생산효율이 낮은 상태이며 따라서 산업화의 속도가 늦  
어지고 있다. 최근 각 단계별로 기술이 크게 향상되고

\* 중부대학교 (Joongbu University, Keumsan, Korea)

\*\* 농촌진흥청 축산기술연구소(National Livestock Research Institute, RDA, Sunghwan, Korea)

\*\*\* 공주대학교 (Kongju University, Yesan, Korea)

이 논문은 1994년도 학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의해서 연구되었음.

있으며, 특히 제핵기술이 핵이식효율을 높이는데 있어서 매우 중요한 요인이 되고 있다 (Bondioli 등, 1990). 미세조작 방법으로는 현재 두가지 방법 즉, 투명대절개법 (Willadsen, 1986; Tsunoda 등, 1986)과 비외과적 흡입법 (Prather 등, 1987; Smith와 Wilmut, 1989)이 이용되고 있는데 이 두 방법을 이용한 핵이식효율은 동물종과 보고자에 따라 차이가 많다 (Robl과 First, 1985; Robl과 Stice, 1989; Chung 등, 1994). 최근 체외성숙난자의 동결화에 대한 관심이 고조되고 있다 (Herrler 등, 1991; Fuku 등, 1992; Lim 등, 1992; Otoi 등, 1993, 1995). 그러나 동결난자의 체외수정후 배반포 발생율은 매우 낮다. 김 등 (1995a)은 동결체내 성숙난자를 이용한 핵이식실험을 시도한 바 있다. 만일 체외성숙난자의 동결이용이 가능하게 될 경우 체외수정란 생산에서 뿐만 아니라 핵이식배 생산의 비용 절감과 공시난자의 이용효율이 크게 향상될 것으로 기대된다. 따라서 본 연구는 토끼를 이용하여 성숙 난자의 동결성을 조사하고 동결융해 성숙난자를 수핵난자로 이용이 가능한지를 알기 위하여 시도하였으며 동시에 미세조작방법간의 핵이식효율을 비교 검토하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시동물

수핵난자와 공핵수정란의 공급을 위하여 공시된 토끼는 성숙 New Zealand White종과 교잡종 토끼였다. 위임신을 방지하기 위하여 공시전 20일간 케이지에 개별 사육하였고 성토용의 펠렛 사료를 급여하였으며 물은 자유급수하였다.

### 2. 수핵난자

#### 1) 미성숙 난포란의 채란과 체외성숙

건강한 암토끼를 도살하여 난소를 떼어낸 다음 mPBS로 2~3회 난소를 씻은 후 mPBS액이 담긴 watch glass에서 23케이지 주사침으로 포상난포를 터뜨려 채란하였다. 채란된 난포란 중에서 난구세포층이 충실하고 세포질이 양호한 난자만을 선별하여 체외성숙에 이용하였다. 체외성숙 배양액은 호르몬과 항생제가 첨가된 TCM-199(10% FCS, 10 IU/ml HCG,

5 $\mu$ g/ml FSH, 1 $\mu$ g/ml estradiol-17 $\beta$ , 2종의 항생제)이었으며 35mm 배양접시에 100 $\mu$ l 소적을 만들고 한 소적에 15~20개의 난자를 넣고 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기, 100% 습도, 37 $^{\circ}$ C의 항온기조건에서 12시간 체외성숙시켰다.

### 2) 체내 성숙난자의 채란

성숙토끼를 과배란 처리한 후에 개복하고 난관을 관류하여 채란하였다. 과배란처리된 100IU PMSG (Serarumon, Japan)을 근육주사한 후 3일에 150IU HCG (유한양행, 한국)을 이정맥에 주사하였고, HCG 주사후 17~18시간에 채란하였다.

### 3) 체외·체내 성숙난자의 선별

체외 및 체내성숙 난자를 0.1% hyaluronidase (Sigma, USA)가 들어있는 시험관에 넣고 교반시킨 후 micropipette로 반복 흡입하여 난구세포를 제거하였으며, 세포질이 균일하고 충실하면서 제1극체가 뚜렷한 난자만을 선별하여 공시하였다.

### 4) 성숙난자의 동결과 융해

동결보존액은 DPBS액에 dimethyl sulfoxide (DMSO) 또는 glycerol의 최종농도가 1.0M 또는 1.5M이 되도록 하였다. 성숙난자를 DPBS액으로 2~3회 세척 후 10분간씩의 3단계법 (1M농도: 0.25M-0.5M-1.0M 순; 1.5M농도: 0.5M-1.0M-1.5M 순)으로 첨가하였다. 평형이 끝난 난자는 0.25-ml plastic straw (IMV, France)에 5~10개씩 넣고 봉인하였다. 동결과정은 동결기 (Planner, England)를 이용하여 Lim 등 (1991, 1992)의 방법에 준하였다. 20 $^{\circ}$ C에서 -5 $^{\circ}$ C까지 -0.7 $^{\circ}$ C/분의 속도로 하강한 후 -5 $^{\circ}$ C에서 식빙하고 15분간 유지한 다음 -32.5 $^{\circ}$ C까지 -0.5 $^{\circ}$ C/분의 속도로 냉각시킨 후 10분 뒤 straw를 액체 질소(-196 $^{\circ}$ C)에 침적하였다. 동결난자의 융해는 실온에서 5초간 방치한 다음 37 $^{\circ}$ C의 항온수조에 옮겨 30초간 융해하였다. 융해된 난자는 동결보존액 (1.0M 또는 1.5M)에 넣었다가 0.3M sucrose에서 10분간 동해방지제를 제거한 다음 신선 DPBS액으로 2~3회 세척후 TCM-199배양액으로 옮겨 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

### 5) 동결난자의 형태와 생존성 조사

동결용해한 난자를 1시간 배양한 다음 실체현미경 하에서 세포질의 과립상태 또는 응축 및 투명대의 분리 여부로서 형태를 조사함(Otoi 등, 1993)과 동시에 FDA검사(Schilling 등, 1982)로서 생존성 여부를 판정하였다.

### 3. 공핵수정란의 채란과 할구분리

성숙암토끼에 100IU PMSG를 근육주사한 후 3일에 수토끼와 2~3회 교미시킨 다음 150IU HCG를 이 정맥에 주사하여 과배란을 유기시켰다. HCG주사후 45~50시간에 0.6ml Zoletil 50(Virbac, France)으로 마취한 후 개복하고 난관을 관류하여 8~16세포기의 수정란을 채란하였다. 할구분리는 먼저 수정란의 난구세포와 투명대를 제거하기 위하여 0.25% pron-

ase(Sigma, USA)에서 15분간 처리하고 0.1% EDTA와 0.13% trypsin 이 첨가된  $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$  free PBS액으로 10분간 처리한 다음 micropipette로 반부 흡입하면서 할구를 분리하였다.

### 4. 수핵난자의 미세조작(제핵과 할구주입)

수핵난자의 제핵을 위하여 먼저  $7.5\mu\text{g/ml}$ 의 cytochalasin B와 10% FCS가 함유된 TCM-199액으로 10분간 전처리한 후 micromanipulator(Narishige, Japan)가 장치된 도립현미경(Nikon, Japan)을 이용하여 제핵과 할구주입이 행해졌다. 미세조작은 두가지 방법(방법 A와 B)으로 실시하였는데 방법 A는 Fig. 1과 같이 McGrath와 Solter(1983), Collas와 Robl(1990)의 투명대 통과법이었고, 방법 B는 Tsunoda 등(1986)과 Nagashima 등(1992)의 투명대 절개법을 약간 수정하였다. 즉, 투명대 절단은 이들과 같은

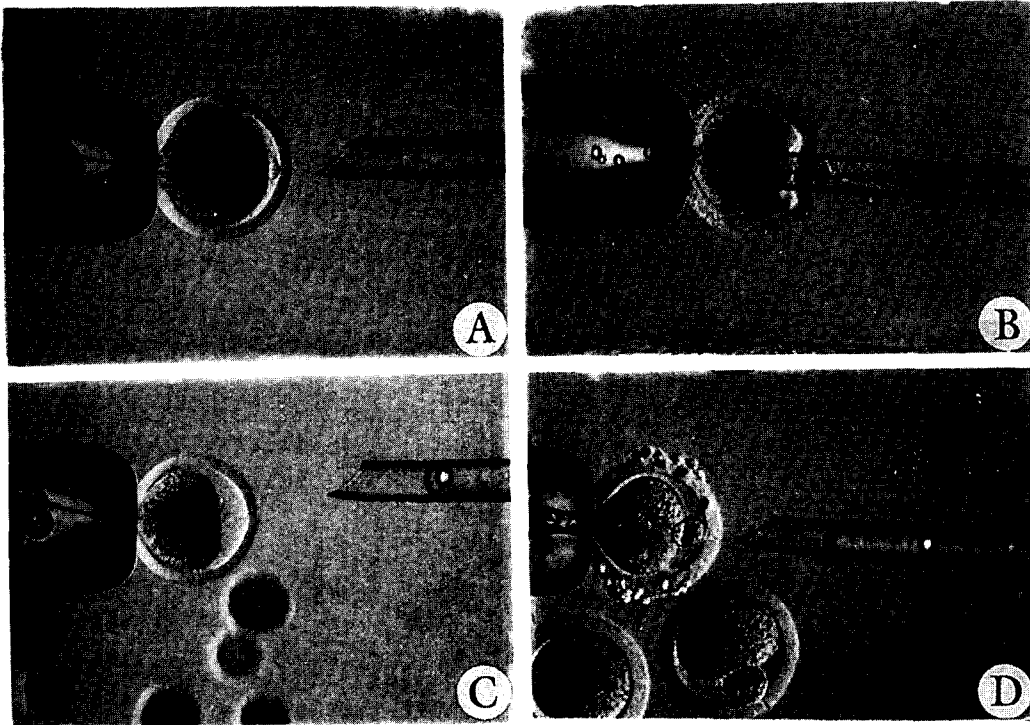


Fig. 1. Micromanipulation procedure by Method A.

A: Mature oocyte on holding pipette with polar body(PB), B: Enucleation of oocyte by aspirating PB and adjacent cytoplasm, C: Nucleus was removed and D: Introduction of blastomere in to perivitelline space.

방법으로 하였으나 제1극체와 주위 세포질을 흡입 pipette로 적당량(G)을 흡입한 다음 pipette를 빼낼 때 세포질을 밀어내면서 빼내었고 투명대 밖으로 나온 세포질부분이 투명대의 맞물림과 함께 pipette를 이용하여 절단되도록 유도하였다(Fig. 2). 할구이식은 8~16세포기의 단일할구를 흡입 pipette에 흡입한 후 제핵때에 만들어진 투명대 구멍을 통해서 주입하였다. 재구축된 난자는 전기융합전까지 12시간 추가 배양하였다.

## 5. 전기융합

주입할구와 수핵난자의 세포질과의 전기융합은 Electro cell manipulator(ECM 200, BTX, UAS)을 이용하여 Collas와 Robl(1990)의 방법에 준하였다. 재구축난자를 0.1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05mM CaCl<sub>2</sub>, 0.

05% BSA가 첨가된 0.3M mannitol 용합액이 들어 있는 wire electrode chamber의 양 전극 사이(0.5 mm간격)에 놓고 먼저 교류전류로서 할구와 세포질의 접촉면이 수평이 되도록 정열시킨 다음 직류전압으로 0.8 kV/cm 또는 1.0 kV/cm와 70 $\mu$ sec의 통전시간을 1회 또는 3회의 조건에서 융합을 실시하였다. 전기 융합처리후 cytochalasin B에서 배양효과를 조사한 실험에서는 융합처리후 7.5 $\mu$ g/ml가 함유된 TCM-199액으로 1시간 배양하였다.

## 6. 융합난자의 체외배양

통전후 30분에 융합된 난자는 10% FCS가 함유된 0.2ml TCM-199배양액에서 체외성숙과 같은 배양기 조건에서 체외배양하면서 난황율과 상실배·배반포로의 발생율을 조사하였다.

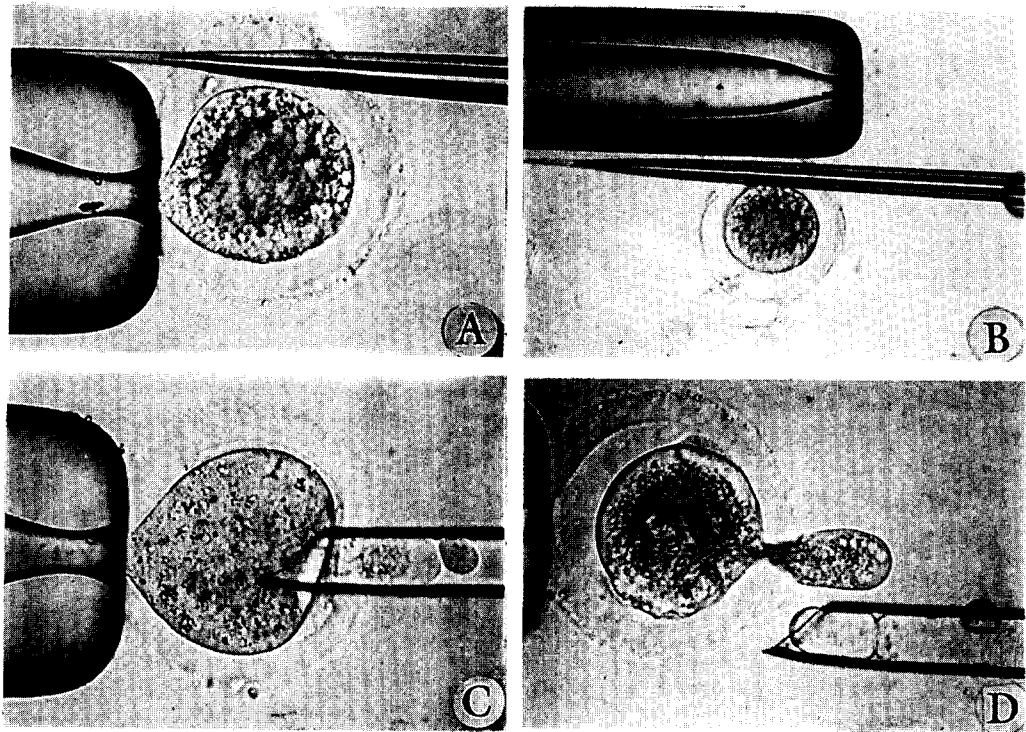


Fig. 2. Micromanipulation procedure by Method B.

A: Microneedle is threaded through zona pellucida(ZP). B: Oocyte is released from holding pipette, which is then used to massage ZP portion incorporated microneedle, C: Enucleation of oocyte by aspiration and D: Glass needle in process of removing extruded portion containing PB and adjacent cytoplasm.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 동해방지제간의 난자 동결성

DMSO와 glycerol에 의한 체내 성숙난자의 동결융해후 생존성에서 융해후 난자 회수율은 84~93%, 정상형태율 33~49%, FDA양성 난자는 23~36% 범위였다(Table 1). 동해방지제 간에나 농도 간에 유의성은 없었으나 DMSO에서는 1 M에서, glycerol에서는 1.5M에서 각각 생존성이 다소 높은 경향이 있었다. 체내 성숙난자의 동결결과에 근거하여 조사된 체외 성숙난자의 동결성은 DMSO(1.0M)가 glycerol(1.5M)보다 높았다(Table 2). 이상의 결과에서 융해후 정상형태율은 Fuku 등(1992), Lim 등(1992), 김 등(1995)보다는 다소 낮았으나, Otoi 등(1993)이 자궁내에서 배양한 결과와는 같은 수준이었다. 그러나 Otoi 등(1995)의 11~16%보다는 높았다. DMSO가 다소 생존성이 높았던 것은 Hernandez-Ledezma와 Wright(1989), Herrler 등(1991)과 같은 결과였다. 한편 체외성숙 난자에서 1.0 M보다 1.5 M glycerol에서 동결성이 낮았던 결과는 Lim 등(1991) 및 Otoi 등(1993)과 유사한 결과였다. 특히, 체외성숙난자의

경우, glycerol에서 현저히 동결성이 낮았던 결과는 Jackowsky 등(1980)의 보고와 같이 체외 성숙난자가 glycerol 농도에 대해 더욱 민감한데 기인된 것으로 사료되었고, 또한 성숙 정도와도 관련이 있을 것으로 생각되었다. Park와 Ruffing (1992)은 성숙난자보다 미성숙난자가 동결에 더 민감함을 보고한 바 있다.

#### 2. 미세조작방법 간의 제핵율과 융합율

Table 3에서 보는 바와 같이 체내 성숙난자와 체외 성숙난자에서 모두 방법 A보다 방법 B에서 제핵율과 융합율이 월등히 높았다. 특히 방법 B에서는 동결 체내 성숙난자에서도 비동결난자와 같은 정도의 제핵율과 융합율을 얻을 수 있었다. 현재 가축난자에서 이용되고 있는 미세조작 방법은 두가지로 구분되고 있다(Robl과 Stice, 1989). 이 두 방법 즉, 비외과적 투명대통과법(McGrath와 Solter, 1983; Prather 등, 1987; Stice와 Robl, 1988)과 투명대절개법(Willadsen, 1986; Tsunoda 등, 1986)중에서 어느 것이 핵이식효율이 우수한지에 대해서는 동물종과 보고자에 따라 차이가 있다(Robl과 First, 1985; Robl과 Stice, 1989; Chung 등, 1994). 여러 보고에서 투명대통과법이 주로 이용되고 있다. 그러나 Li 등(1992)은

**Table 1. Effect of cryoprotectant on survival of *in vivo* matured rabbit oocytes**

Type	Cyoprotectant Concentration (M)	No. (%) of oocytes		No. (%) of oocytes with	
		Frozen	Recovered	Normal <sup>1)</sup> morphology	FDA(+) <sup>2)</sup>
DMSO	1.0	173	149(86.1)	72(48.3)	53(35.6)
	1.5	75	70(93.3)	23(32.9)	19(27.1)
Glycerol	1.0	80	68(85.0)	25(36.8)	16(23.5)
	1.5	107	90(84.1)	44(48.9)	21(23.3)

<sup>1)</sup> Survival of oocytes was defined by observation of dark evenly granulated cytoplasm and irregular shaped oocytes with dark yellow cytoplasm were considered as dead oocyte.

<sup>2)</sup> Survivability based on oocytes stained positively with fluorescein diacetate.

**Table 2. Effect of cryoprotectant on survival of *in vitro* matured rabbit oocyte**

Cyoprotectant	No. (%) of oocytes		No. (%) of oocytes with*	
	Frozen	Recovered	Normal morphology	FDA(+)
DMSO (1.0 M)	83	78(94.0)	35(44.9)	36(43.7)
Glycerol (1.5 M)	61	56(91.8)	18(32.1)	6(10.7)

\* see Table 1.

**Table 3. Effect of micromanipulation method on enucleation and electrofusion of fresh and frozen-thawed mature oocytes**

Method *	Oocytes			No. (%) of oocytes		
	Type	Matured	Manipulated	Enucleated	Fused	
A	Fresh	<i>In vivo</i>	84	40(47.6)	32(80.0)	
		<i>In vitro</i>	70	25(35.7)	18(72.0)	
B	Fresh	<i>In vivo</i>	144	127(88.2)	122(96.1)	
		<i>In vitro</i>	49	40(81.6)	39(97.5)	
	Frozen	<i>In vivo</i>	79	63(79.7)	60(95.2)	

\* Method A(ZP-inserting with a aspiration pipette).

Method B(ZP-slitting with a fine glass needle): a procedure modified from those of Tsunoda et al.(1986) and Nagashima et al.(1992).

토끼에서, Nagashima 등(1992)은 돼지에서 투명대 절개법으로서 수핵난자의 원형질막 손상이나 파열을 현저히 줄일 수 있다고 보고한 바 있다. 한편 Chung 등(1994)은 두 방법간에 체핵효율에 차이는 없었으나 방법 A에서 소요시간이 크게 감소됨을 보고하였다. 본 연구진 (김 등, 1995b)은 토끼의 체내 성숙난자의 제 핵에서 효율이 낮아지는 가장 큰 원인중 하나가 원형질막의 파열에 기인됨을 경험한 바 있으며 본실험의 방법 B으로서 원형질막의 손상을 줄일 수 있었고 융합율도 크게 향상시킬 수 있었다.

### 3. 전압에 따른 융합율과 체외 배 발달

Table 4에 나타난 바와 같이 재구축 비동결난자의

융합율은 전압이나 pulse빈도간에 차이가 없었으나 평균난할율은 1.0kV/cm에서 다소 높았다. 한편 재구축 동결융해난자에서도 융합율은 비동결난자와 같은 결과였으나 평균난할율은 비동결난자의 절반 정도였다. 3회 pulse에서 난할율이 저하되는 경향이 있었으며, 특히 상질배·배반포의 발생율이 현저히 낮았다. 비동결난자에서 전압이나 pulse횟수에서 유의적 차이가 없었던 것은 토끼난자의 경우 활성화율에 대한 전압의 범위가 넓다고 한 보고와 일치된 결과라 할 수 있다(Stice와 Robl, 1988; Onodera와 Tsunoda, 1989; Modlinski와 Smorag, 1991). 그러나 Li 등(1992)이 전압은 다소 다르지만 3회 pulse에서 난할율이 크게 증가한다는 것과는 다른 결과였다. 또한 김

**Table 4. Effect of field strength and pulse number on fusion and *in vitro* development of reconstituted oocytes**

Recipient oocytes (IVM)	Pulse		No. (%) of oocytes		No. (%) of oocytes developed to			
	Strength (kV/cm)	Number	Reconstituted	Fused	≤4cells	8~16 cells	M+B	Total
Fresh	0.8	1	13	12(92.3)	—	7	2	9(75.0)
		3	28	25(89.6)	3	4	8	15(60.6)
	1.0	1	32	30(93.8)	16	6	4	26(86.7)
		3	16	16(100)	8	6	2	16(100)
	Total		89	83(93.2)	27	23	16(19.3)	66(79.5)
Frozen	0.8	1	18	17(94.4)	5	2	—	7(41.2)
		3	15	15(100)	1	—	—	4(26.7)
	1.0	1	19	18(94.7)	6	1	1	8(44.4)
		3	15	14(93.3)	4	—	1	5(35.7)
	Total		67	64(95.5)	18	4	2(3.1)	25(39.1)

**Table 5. Effect of cytochalasin B after electric stimulation on fusion and *in vitro* development of reconstituted *in vitro* matured oocytes**

Donor nuclei	Cytochalasin B	No. (%) of oocytes		No. (%) of oocytes developed to			
		Reconstituted	Fused	≤4cells	8~16cells	M+B	Total
Fresh	-	23	20(87.0)	7	4	6(30.0)	17(85.0)
	+	15	14(93.3)	5	3	3(21.4)	11(78.6)
Frozen	-	26	24(92.3)	5	1	6(25.0)	12(50.0)
	+	24	22(91.7)	4	4	4(18.2)	13(59.1)

등(1995b)의 결과보다 융합율과 난할율이 높게 나타난 것은 앞에서 언급한 바와 같이 투명대결개법을 이용한 미세조작의 결과로 사료된다. 동결융해난자를 수핵난자로 이용한 핵이식의 보고가 없기 때문에 동결융해난자의 체외수정과 배발생율에 대해 보고된 결과와 비교해 볼 경우 본 실험결과로 동결융해 성숙난자를 핵이식의 수핵난자로 이용이 가능함을 알 수 있었다. Herrler 등(1991)은 소에서 동결융해난자의 난할율이 비동결난자와 거의 같음을 보고하였고, Otoi 등(1993)은 동결난자로부터 배반포(4.8%)을 얻었다. 또한 Bos-Mikich 등(1995)은 초자화 동결로 높은 수정율을 보고하였으며, Fuku 등(1992)은 체외성숙난자의 동결로부터 송아지를 생산한 바 있다.

#### 4. 전기융합 처리 후의 cytochalasin B 효과

비동결 및 동결난자에서 전기융합 처리 후 cytochalasin B에서 배양하였을 때 모두 융합율과 배발생율의 증진효과는 나타나지 않았다(Table 5). 이 결과는 소에서 효과가 없었다는 Levaduski와 Wesrhusin(1990), Van Stekelenburg-Hamers 등(1993)과는 같은 것이었으나 소(Kinis 등, 1990), 양과 토끼(Smith와 Wilmut, 1989; Collas와 Robl, 1990)에서 배발생율이 개선되었던 결과와는 달랐다. 한편 Landa와 Hajkova(1990)는 소에서 1시간보다는 4~6시간에서 효과가 나타남을 보고한 바 있다. 그러나, cytochalasin B의 작용기전에 대해서는 아직 분명치 않기 때문에 앞으로 더욱 연구가 필요한 분야이다(Pinto-Correia 등, 1993).

## IV. 적 요

본 연구는 토끼에서 체내 및 체외 성숙난자의 동결

성과 동결융해후 핵이식의 수핵난자로의 이용 가능성을 조사함과 동시에 투명대결개법에 의한 핵이식효율을 알기 위하여 시도하였다. 체내 성숙난자의 동결융해후 정상형태율은 33~49%였으며, 1.0M DMSO와 1.5M glycerol 에서 다소 높았으나 동해방지제간에는 차이가 없었다. 체외성숙난자는 1.5M glycerol에서 정상형태와 생존성이 현저히 낮았다. 제핵율과 융합율은 미세조작 A방법보다 B방법에서 높았으며 B방법에서는 체내·체외성숙 및 체내성숙 동결수핵난자간에 차이가 없었다(80~88%). 동결수핵난자의 핵이식 후 난할율과 상실배·배반포의 발달율은 비동결 난자보다 현저히 낮았으며 (39.1%: 79.5% : 3.1% : 19.3%) 비동결 및 동결난자에 있어서 모두 전기 전압간에 난할율의 차이가 없었다. 융합처리후 B에서의 배양은 배발달에 영향이 없었다. 본 연구결과에서 동결체외성숙난자를 핵이식용의 수핵난자로 이용하기 위해서는 최적동결조건에 대한 보다 많은 연구가 필요함을 알 수 있었다.

## V. 인용문헌

1. Bondioli, K. R., M. E. Westhusin and C. R. Looney. 1990. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenology*, 33:165-174.
2. Bos-Mikich, A., M. J. Wood, C. J. Candy and D. G. Whittingham. 1995. Cytogenetical analysis and developmental potential of vitrified mouse oocytes. *Biol. Reprod.*, 53:780-785.
3. Brackett, B. G. and K. A. Zuelke. 1993. Analysis of factors improved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenol-*

- ogy, 39:43-64.
4. Chung, Y. C., C. K. Kim, X. X. Song, J. T. Yoon and S. H. Choi. 1994. Nuclear transplantation and electrofusion for cloning in bovine follicular oocytes. I. Comparison of removing and inserting methods of nuclei in recipient oocytes. *Proc. Mol. Biol. & Genet.*, 9:365-366.
  5. Collas, P. and J. M. Robl. 1990. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. *Biol. Reprod.*, 43:877-884.
  6. Fuku, E., T. Kojima, Y. Shioya, G. J. Marcus and B. R. Downey. 1992. *In vitro* fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. *Cryobiology*, 29:485-492.
  7. Hernandez-Ledezma, J. J. and R. W. Wright, Jr. 1989. Deep freezing of mouse one-cell embryos and oocytes using different cryoprotectants. *Theriogenology*, 32:735-743.
  8. Herrler, A., D. Rath and H. Nieman. 1991. Effects of cryoprotectants on fertilization and cleavage of bovine oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 35:212.
  9. Jackowsky, S., S. P. Leibo and P. Mazur. 1980. Glycerol permeabilities of fertilized and unfertilized mouse ova. *J. Exp. Zool.*, 211:329-341.
  10. Kinis, A., E. Vergos, M. Gallagher and I. Gordon. 1991. Factors affecting nuclear transfer in cattle using oocytes and embryos produced by *in-vitro* culture. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 43:261-262.
  11. Landa, V. and M. Hajkova. 1990. Diploidization of bovine oocytes matured *in vitro* and parthenogenetically activated by electric shock. *Fol. Biol.*, 36:145-152.
  12. Levanduski, M. J. and M. E. Westhusin. 1990. Effects of cytoskeletal inhibitors on fusion and development of bovine nuclear transfer embryos. *Theriogenology*, 33:273
  13. Li, X. F., G. M. Wu, L. L. Tan, S. J. Tan and K. H. Lu. 1992. Effects of electrical pulses on the nuclear transfer of rabbit oocytes matured *in vivo/in vitro*. 12th Int. Congr. Anim. Reprod., Vol. 2:709.
  14. Lim, J. M., Y. Fukui and H. Ono. 1991. The post-thaw developmental capacity of frozen bovine oocytes following *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology*, 35:1225-1235.
  15. Lim, J. M., Y. Fukui and H. Ono. 1992. Developmental competence of bovine oocytes frozen at various maturation stages followed by *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology*, 37:351-361.
  16. Modlinski, J. A. and Z. Smorag. 1991. Preimplantation development of rabbit embryos after transfer of embryonic nuclei into different cytoplasmic environment. *Mol. Reprod. Devel.*, 28:361-372.
  17. McGrath, J. and D. Solter. 1983. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science*, 220:1300-1302.
  18. Nagashima, H., H. Yamakawa and S. Saito. 1992. Transplantation of porcine blastomere nuclei into oocytes collected from prepubertal gilts. *J. Reprod. Dev.*, 38:73-78.
  19. Onodera, M. and Y. Tsunoda. 1989. Parthenogenetic activation of mouse and rabbit eggs by electric stimulation *in vitro*. *Gamete Res.*, 22:277-283.
  20. Otoi, T., S. Tachikawa, S. Kondo and T. Suzuki. 1993. Developmental capacity oocytes frozen in different cryoprotectants. *Theriogenology*, 40:801-807.
  21. Otoi, T., K. Yamamoto, N. Koyama and T. Suzuki. 1995. *In vitro* fertilization and development of immature and mature bovine oocytes cryopreserved by ethylene glycol with sucrose. *Cryobiology*, 32:455-460.



22. Park, J. E. and N. A. Ruffing. 1992. Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes. *Theriogenology*, 37:59-73.
23. Pinto-Correia, C., P. Collas, F. Able Ponce De Leon and J. M. Robl. 1993. Chromatin and microtubule organization in the first cell cycle in rabbit parthenotes and nuclear transplant embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 34: 33-42.
24. Prather, R. S., F. L. Barnes, M. M. Sins, J. M. Robl, W. H. Eyestone and N. L. First. 1987. Nuclear transpeantation of the bovine embryo : assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.*, 37:359-366.
25. Robl, J. M. and N. L. First. 1985. Manipulation of gametes and embryos in the pig. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 33:101-104.
26. Robl, J. M. and S. L. Stice. 1989. Prospects for the commercial cloning of animals by nuclear transplantation. *Theriogenology*, 31:75-84.
27. Schilling, E., H. Nieman and D. Smidt. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryo by fluorescence microscopy. In : *In vitro Fertilization and Embryo Transfer*, Ed. E. S. E. Hafez and K. Semm, MTP Press, Lancaster, England, pp. 349-355.
28. 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.
29. Stice, S. L. and J. M. Robl. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 39:657-664.
30. Tsunoda, Y., T. Yasui, K. Nakamura, T. Uchita and T. Sugie. 1986. Effect of cutting zona pellucida on the pronuclear transplantation in the mouse. *J. Exp. Zool.*, 240: 119-125.
31. Van Stekelenburg-Hamers, A. E. P., W. G. Van Inzen, T. A. E. Van Achterberg, T. A. M. Kruip, S. W. de Laat and S. M. Weima. 1993. Nuclear transfer and electrofusion in bovine *in vitro*-matured / *in vitro*-fertilized embryos : effect of media and electrical fusion parameters. *Mol. Reprod. Dev.*, 36:307-312.
32. Willadsen, S. M. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, 320:63-65.
33. 김창근, 정영채, 김홍률, 김수, 황성수, 이광원, 손동수, 윤종택, 정영호. 1995a. 체외성숙난자를 이용한 소의 핵이식배 생산에 관한 연구. *농업논문집 ('94 농업산학협동)*, 37:173-179.
34. 김창근, 정영채, 신억익, 임홍순, 김홍률, 정영호, 윤종택, 이종완, 권처진, 황성수. 1995b. 토끼에서 난포란을 이용한 핵이식배 생산에 관한 연구. *한국수정란이식학회지*, 10:105-113.