

핵이식을 위한 한우 난자 활성화 처리방법에 관한 연구

임기순[†] · 양보석¹ · 박성재 · 양병철 · 장원경 · 박창식²

축산기술연구소, 육종번식과

Studies on Oocyte Activation Regimen for Nuclear Transfer in Hanwoo(Korean Cattle)

Im, G. S.[†], B. S. Yang¹, S. J. Park, B. C. Yang, W. K. Chang and C. S. Park²

National Livestock Research Institute, Division of Genetics and Reproduction

ABSTRACT

This experiment was carried out to investigate the optimal activation condition for parthenogenetic development. In order to activate oocytes at 22 h post onset of maturation, the oocytes were subjected to 5 μ M ionomycin(I) for 5 min, 10 μ M calcium ionophore(Ca) for 5 min, 2 mM 6-dimethylamino-purine(DMAP) for 3 h and 10 μ g/ml cycloheximide(CH) for 6 h alone or in combination. The activated oocytes were cultured in modified CR_{1aa} at 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂.

1. The cleavage rates after 48 h culture of oocytes treated with I, Ca, DMAP and CH were 12.7%, 14.1%, 28.9% and 22.9%, respectively. There was no blastocyst formation.
2. The cleavage rates after 48 h culture of oocytes treated with I + DMAP, I + CH, Ca + DMAP and Ca + CH were 96.9%, 82.1%, 93.1% and 84.7%, respectively. Developmental rates to blastocysts were 10.4%, 5.3%, 17.6% and 7.1%, respectively. When oocytes were treated with I or Ca followed by DMAP, the blastocyst formation rate was significantly higher than other groups(P<0.05).
3. According to single activation treatment, pronucleus formation rates were 5.4%, 3.6%, 28.3% and 28.8%, respectively. Whereas, all oocytes treated with the combined activation agents formed 100% pronucleus.

(Key words : Parthenogenetic development, Cleavage rates, Activation agents)

I. 서론

핵이식에 사용되는 수핵란으로 성숙이 완료된 난자가 사용되어 왔다. 성숙이 완료된 난자는 일반

적으로 제 2차 성숙분열 중기 상태이며 이 시기의 난자는 수정 또는 기타의 외부자극 없이는 감수분열을 재개할 수 없다. 따라서 핵이식을 성공적으로 수행하기 위해서는 난자 활성화과정을 이해하는 것이 필수적인 요소이다. 성숙이 완료된 난자가 감

[†] Corresponding Author : National Livestock Research Institute, RDA, Suwon 441-350, Korea,

E-mail : gsim@nlri.go.kr

¹ 제주농업시험장(Cheju Agricultural Experiment Station, RDA)

² 충남대학교 축산학과(Dept. of Animal Science, Chungnam National University)

수분열을 재개하지 못하도록 하는 것은 난자 내에 높은 수준으로 유지되는 성숙촉진인자(maturation promoting factor, MPF)이다. 이는 c-mos protein 또는 세포정적인자(cytostatic factor, CSF)에 의해 일정수준으로 유지된다. MPF는 serine/threonine protein kinase이며 catalytic subunit인 cyclin dependent kinase 1(p34^{cdc2})와 regulatory subunit인 cyclin B로 구성되어 있으며, 이는 핵막붕괴(nuclear envelope breakdown), 염색체응축(chromosome condensation) 및 방추사형성(spindle formation)등을 통해 난자를 성숙시켜 제 2성숙분열 중기상태에 머무르게 한다(Campbell 등, 1993 ; Collas 등, 1993a). 수정은 난자의 세포질 내 칼슘수준을 주기적으로 증가시켜 MPF를 불활성화시킨다고 알려져 있으며(Fissore 등, 1992 ; Liu 등, 1998a,b), MPF가 불활성화되면 난자는 감수분열을 재개하게 된다.

Pincus와 Enzmann(1935)에 의해 처음으로 포유동물 난자의 활성화가 보고된 이후로 핵이식기술을 발달시키기 위해 난자를 활성화시키기 위한 많은 연구가 이루어져 왔다. 소의 난자는 calcium ionophore, aging, electric pulse, ionomycin, ethanol, cycloheximide 및 6-dimethylaminopurine 등을 이용한 여러 가지 외부자극에 의해 활성화될 수 있다고 보고되었다(Nagai, 1987 ; Ware 등., 1989 ; First 등, 1992 ; Powell 과 Barnes, 1992 ; Campbell 등, 1993 ; Prochazka 등, 1993 ; Shi 등, ; 1993 ; Stice 와 Keefer, 1992 ; Takano 등, 1993 ; Yang 등, 1993a,b ; Stice 등, 1994 ; Susko-Parrish 등, 1994 ; Lavoit 등, 1996 ; Saeki 등, 1997 ; Samake 와 Smith, 1997 ; Ha 등, 1998 ; Rho 등, 1998).

Calcium ionophore, electric pulse, ionomycin, ethanol과 같은 칼슘수준 증가제만을 이용하여 난자를 활성화시키면 histone H1 kinase가 불활성화되어 감수분열이 재개되지만 일정시간이 흐르면 kinase가 재활성화된(Soloy 등, 1997 ; Swann과 Lai, 1997 ; Collas 등, 1993a,b ; Presicce와 Yang, 1994a,b). 반면에 반복적인 칼슘수준증가자극은 재활성화를 지연시켜준다. 또한 높은 수준의 칼슘농도가 난자의 세포질 내에 계속 유지되면 CSF가 불활성화되고 이는 MPF의 불활성화를 유도한다.

MPF가 불활성화되었을 때 단백질합성억제제를 처리하면 CSF가 재생성되는 것을 방지할 수 있다. 이와 같은 이유로 칼슘수준증가제와 단백질합성억제제 또는 인산화억제제를 병행하여 처리하면 감수분열재개 및 난자활성화를 증가시킬 수 있다고 보고되었다(Yang 등, 1992, 1994 ; Shi 등, 1993 ; Presicce와 Yang, 1994a,b ; Susko-Parrish 등, 1994).

따라서 본 연구는 칼슘수준증가제 또는 단백질합성/인산화억제제 단독 또는 병행처리가 난자의 단위 배 발생에 미치는 영향을 알아보기 위해 실시되었다.

II. 재료 및 방법

1. 난자채취 및 성숙배양

도축장에서부터 채취된 난소를 25~30°C로 유지된 생리식염수가 들어 있는 보온병에 넣어 실험실로 운반하였다. 운반된 난소들을 생리식염수로 세척하여 난자흡인 전까지 보관하였다. 18 gauge 주사바늘이 부착된 주사기를 이용하여 2~6mm의 난포로부터 난포액을 흡인하여 5% FBS (fetal bovine serum, GIBCO, USA)가 첨가된 D-PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, GIBCO)내에 위치시켰다. 채취된 난포액을 실체현미경하에 위치시켜 COCs(cumulus-oocytes complexes)를 관찰하였다. 3~4개의 난구세포층 및 좋은 세포질을 가진 난자만을 선별하여 성숙배양시켰다. 선별된 COCs는 10% FBS 및 1% antibiotic-antimycotic solution(GIBCO)이 첨가된 TCM199(tissue culture medium 199, GIBCO)을 사용하여 3회 세척된 뒤 35mm dish내의 500 μ l drop에 위치되어 22시간동안 배양되었다. 배양조건은 5% CO₂, 95% air, 38.5 °C였다.

2. 활성화 처리

22시간 동안 성숙배양 후 난구세포를 제거하기 위해 COCs를 0.1% hyaluronidase가 첨가된 PBS배지에서 난구세포를 제거하였다. 난구세포가 제거된 난자들 중 제 1극체가 방출된 난자만을 선별하

여 무작위로 처리에 할당하였다. 활성화처리를 위하여 선별된 난자들을 5 μ M ionomycin(Sigma, USA)에 5분, 10 μ M calcium ionophore(Sigma, USA)에 5분, 10 μ g/ml cycloheximide(Sigma, USA) 6시간, 2mM 6-dimethylaminopurine(Sigma, USA) 3시간 동안 단독 또는 병행하여 처리하였다.

3. 발생배양

활성화처리가 완료된 난자들을 modified CR_{1aa}으로 3회 세척한 후 발생배양에 공시되었다. 발생배양은 500 μ l의 modified CR_{1aa}가 들어있는 four well dish (Nunc, USA) 내에서 이루어졌다. 처음 3일간은 3mg/ml BSA(Sigma, USA)가 첨가된 modified CR_{1aa}를 사용하여 배양을 실시하였으며, 나머지 4일간은 1.5mg/ml와 5% FBS가 첨가된 modified CR_{1aa}을 사용하여 배양을 실시하였다. 배양조건은 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂였다.

4. 전핵관찰

전핵형성여부를 관찰하기 위하여 활성화처리된 난자를 활성화처리 후 6시간째에 고정시켰다. 난자를 고정액(acetic acid 3 : ethanol 1) 내에 24시간 이상 침지시킨 후 1% aceto-orcein 액으로 염색을 실시하고 25% aceto-orcein 액으로 세척하였다. 염색이 완료된 난자는 200배의 배율 하에서 전핵형성 여부를 관찰하였다.

5. 실험설계

1) 실험 1. 활성화제 단용처리에 의한 단위 배 발생

- Treatment 1. 5 μ M ionomycin에 5분
- Treatment 2. 10 μ M calcium ionophore에 5분
- Treatment 3. 10 μ g/ml cycloheximide 6시간
- Treatment 4. 2mM 6-dimethylaminopurine 3시간

2) 실험 2 활성화제 병행처리에 의한 단위 배 발생

- Treatment 1. 5 μ M ionomycin에 5분 + 2mM 6-dimethylaminopurine 3시간

Treatment 2. 5 μ M ionomycin에 5분 + 10 μ g/ml cycloheximide 6시간

Treatment 3. 10 μ M calcium ionophore에 5분 + 2mM 6-dimethylaminopurine 3시간

Treatment 4. 10 μ M calcium ionophore에 5분 + 10 μ g/ml cycloheximide 6시간

6. 통계분석

본 연구로부터 얻은 자료는 SAS package를 이용하여 분산분석을 하였으며, 처리간의 유의성은 Duncan's multiple range test를 이용하여 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

활성화제 단용 처리에 의한 난자의 단위 배발생은 Table 1과 같이 I, Ca, DMAP 및 CH에 의해 단용 처리된 난자의 48시간 난분할율은 12.7~28.9%였고, 배반포는 형성되지 않았다. 단용 처리된 난자의 전핵형성율은 Table 3에 나타난 바와 같이 3.6~28.8%였다.

본 연구에서 I 또는 Ca 단용처리구의 난분할율이 DMAP 또는 CH 단용처리구 보다 낮게 나타났다. Calcium ionophore 또는 ionomycin 같은 칼슘수준증가제에 의한 세포 내 일시적인 칼슘수준 증가는 MPF수준을 높은 상태로 유지시켜주는 CSF를 파괴하고 이는 MPF의 불 활성화를 유도하여 난자를 제 2차 성숙분열 중기로부터 벗어나 감수분열을 재개하도록 유도한다. 그러나 정자의 침입에 의해 유지되는 주기적인 세포 내 칼슘수준증가와 달리, 칼슘수준증가제에 의한 일시적인 칼슘수준증가는 CSF의 재생성을 막을 수 없기 때문에 최초자극 후 일정시간 후에는 불 활성화된 MPF가 다시 활성화된다. 이 같은 세포주기 초기의 MPF 재활성화는 성숙전 염색체응축(premature chromosome condensation, PCC)을 유도하며, PCC는 난자의 세포주기를 제 2성숙분열중기로 유도한다. 그 결과 난자의 발육이 낮아지게 된다(Collas 등, 1993 a,b, Prochazka 등, 1993 ; Kono 등, 1989 ; Liu 등, 1998a,b ; Wu 등, 1997). 반면에 단백질합성/인산

Table 1. Parthenogenetic development of oocytes by activation agents in Hanwoo

Activation agents ¹	No. of oocytes treated	No.(%) of oocytes developed to		
		2 cell		Blastocysts
		24 h	48 h	
I	79	9(11.4) ^b	10(12.7) ^b	0(0.0)
Ca	85	9(10.6) ^b	12(14.1) ^b	0(0.0)
DMAP	83	18(21.7) ^a	24(28.9) ^a	0(0.0)
CH	83	8(9.6) ^b	19(22.9) ^a	0(0.0)

^{a,b} Means with different superscripts within the same columns were significantly different(P<0.05).

¹I : 5 μ M ionomycin for 5 min, Ca : 10 μ M calcium ionophore for 5 min, DMAP : 2mM 6-dimethylaminopurine for 3 h and CH : 10 μ g/ml cycloheximide for 6 h.

Table 2. Parthenogenetic development of oocytes by combined activation agents in Hanwoo

Activation agents ¹	No. of oocytes treated	No.(%) of oocytes developed to		
		2 cell		Blastocysts
		24 h	48 h	
I + DMAP	96	87(90.6) ^a	93(96.9) ^a	10(10.4) ^{ab}
I + CH	95	42(44.2) ^b	78(82.1) ^c	5(5.3) ^b
Ca + DMAP	102	85(83.3) ^a	95(93.1) ^{ab}	18(17.6) ^a
Ca + CH	98	38(38.8) ^b	83(84.7) ^{bc}	7(7.1) ^b

^{a,b,c} Means with different superscripts within the same columns were significantly different(P<0.05).

¹I + DMAP : 5 μ M ionomycin for 5 min followed by 2 mM 6-dimethylaminopurine for 3 h, I + CH : 5 μ M ionomycin for 5 min followed by 10 μ g/ml cycloheximide for 6 h, Ca + DMAP : 10 μ M calcium ionophore for 5 min followed by 2 mM 6-dimethylaminopurine for 3 h and Ca + CH : 10 μ M calcium ionophore for 5 min followed by 10 μ g/ml cycloheximide for 6 h.

Table 3. Pronucleus formation of oocytes by activation agents in Hanwoo

Activation agents ¹	No. of oocytes treated	No. of oocytes with pronucleus	Activation rate (%)
I	55	3	5.4 ^b
Ca	55	2	3.6 ^b
DMAP	53	15	28.3 ^a
CH	52	15	28.8 ^a

^{a,b} Means with different superscripts within the same columns were significantly different(P<0.05).

¹I : 5 μ M ionomycin for 5 min, Ca : 10 μ M calcium ionophore for 5 min, DMAP : 2 mM 6-dimethylaminopurine for 3 h and CH : 10 μ g/ml cycloheximide for 6 h.

화역제제인 CH 또는 DMAP에 의해 처리된 난자들은 MPF가 불활성화되고 MPF가 불활성화된 상

태에서 일정시간 동안 배양되므로 칼슘수준증가에 의해 처리되었을 때 보다 난분할율이 높게

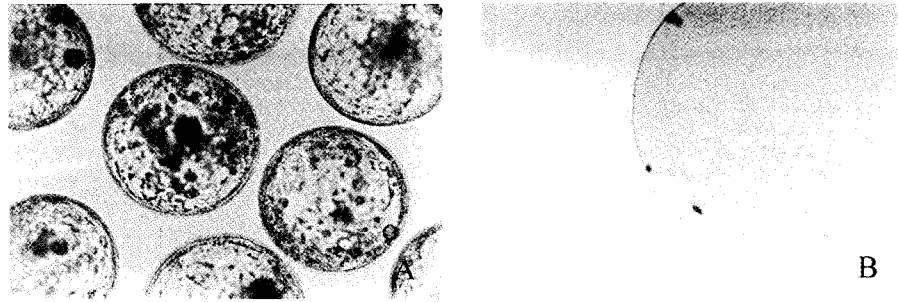


Fig. 1. A: Expanded blastocysts produced from the oocytes activated by Ca + DMAP, and B: Pronucleus formed at 6 h following DMAP single treatment for 3h.

Table 4. Pronucleus formation of oocytes by combined activation agents in Hanwoo

Activation agents ¹	No. of oocytes treated	No. of oocyte with pronucleus	Activation rate(%)
I + DMAP	55	55	100
I + CH	57	57	100
Ca + DMAP	43	43	100
Ca + CH	44	44	100

¹I + DMAP : 5 μ M ionomycin for 5 min followed by 2 mM 6-dimethyl-aminopurine for 3 h, I + CH : 5 μ M ionomycin for 5 min followed by 10 μ g/ml cycloheximide for 6 h, Ca + DMAP : 10 μ M calcium ionophore for 5 min followed by 2 mM 6-dimethylaminopurine for 3 h and Ca + CH : 10 μ M calcium ionophore for 5 min followed by 10 μ g/ml cycloheximide for 6 h.

나타난 것으로 사료된다(Shi 등, 1993 ; Samake와 Smith, 1997). 또한 칼슘수준증가제로 단용처리된 난자들의 전핵형성율이 매우 낮게 나타났는데 이는 칼슘수준 증가제는 감수분열은 재개시키지만 전핵을 형성시키지 못한다는 보고들(Soloy 등, 1997 ; Swann과 Lai, 1997 ; Collas 등, 1993a,b ; Presicce과 Yang, 1994a)과 일치한다. 또한 이 결과는 활성화제제 단용처리에 의한 활성화율이 40 % 를 넘지 않았다는 기존의 보고들과 일치한다(Nagai, 1987 ; Ware 등, 1989 ; First 등, 1992 ; Shi 등, 1993).

활성화제 병용처리에 의한 배 발생은 Table 2와 같이 I+DMAP, I+CH, Ca+DMAP 및 Ca+CH에 의해 병행처리된 난자의 48시간 난분할율은 82.1~96.9%였고, 배반포발생율은 5.3~17.6%였다. 병행처리된 난자들은 Table 4에 나타난 바와 같이 모두 전핵을 형성하였다. 본 연구에서 단위 배발생

에 의한 배반포까지의 발달은 난자가 칼슘수준증가제 및 단백질합성/인산화억제제에 의해 병행 처리되었을 경우에만 이루어졌다. 이 결과는 칼슘수준증가제 처리 후 단백질합성/인산화억제제에 의해 활성화 처리되었을 때 각각의 제제에 의해 단독으로 처리되었을 때보다 난분할율 및 배반포 발생율이 높았다는 이전의 보고들(Collas 등, 1993a ; Presicce와 Yang, 1994a,b ; Takahashi 등, 1996 ; Tanaka와 Kanakawa, 1997 ; Liu 등, 1998a,b)과 일치하며, 활성화제제 각각에 의한 단용처리로는 만족할만한 활성화율을 얻을 수 없는 반면에 병행처리에 의해서 높은 활성화율 및 단위발생 배반포를 생산할 수 있다는 사실을 나타내준다.

또한, 칼슘수준증가제와 DMAP를 병행하여 처리했을 때의 배반포 발생율이 CH를 처리했을 때보다 유의적으로 높게 나타났다. 이는 이전 연구자들의 보고(Liu 등, 1998a,b ; Rho 등, 1998 ;

Presicce와 Yang, 1994a)와도 일치하는 결과이다. DMAP는 제 2극체의 방출과 염색체분리를 방지함으로써 diploid activation을 유도하지만(Susko -Parrish 등, 1994), CH는 그렇지 못하기 때문에 haploid activation을 유도한다. 이 같은 차이의 원인은 아직까지 확실하게 밝혀지지 않았다. 그러나 Collas와 Robl(1990)은 CH와 함께 cytochalasin B를 처리하면 제 2극체의 방출을 억제하여 난자를 정상적인 ploidy 상태로 유지할 수 있다고 보고하였다. 또한 Liu 등(1998a,b)도 만일 CH와 함께 cytochalasin B를 사용하면 haploid activation을 방지할 수 있을 것이라고 보고하였다.

결론적으로 핵이식란의 발육율을 높이기 위해서는 칼슘수준증가제 처리 후 단백질합성/인산화 억제제를 병행하여 처리하는 것이 바람직하다고 사료된다.

IV. 요약

활성화처리를 위해 22시간 성숙된 난자를 5 μ M ionomycin(I)에서 5분, 10 μ M calcium ionophore (Ca)에서 5분, 2 mM 6-dimethylaminopurine (DMAP)에서 3시간 및 10 μ g/ml cycloheximide (CH)에서 6시간 동안 단용 또는 병용 처리하였다. 활성화 처리된 난자는 mCR_{1aa}배양액 내에서 배양되었으며, 배양조건은 5% CO₂, 95% air 또는 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ 이었다.

1. I, Ca, DMAP 및 CH에 의해 처리된 난자의 48시간 난할율은 각각, 12.7%, 14.1%, 28.9% 및 22.9%였다. 그러나, 배반포는 형성되지 않았다.
2. I + DMAP, I + CH, Ca + DMAP 및 Ca + CH에 의해 처리된 난자의 48시간 난할율은 각각, 96.9%, 82.1%, 93.1% 및 84.7%였고, 배반포 발생율은 각각, 10.4%, 5.3%, 17.6% 및 7.1%로, I 및 Ca를 이용하여 세포 내 칼슘수준을 증가시킨 후, DMAP로 3시간 동안 배양하였을 때, 배반포 발생율이 유의적으로 높았다($P < 0.05$).
3. I, Ca, DMAP 및 CH에 의해 단용 처리된 난자

의 전핵 발생율은 각각, 5.4%, 3.6%, 28.3% 및 28.8%였다. 그러나, 병용 처리된 난자는 100%의 전핵 형성율을 나타냈다.

V. 인용문헌

1. Campbell, K.H.S., Ritchie, W. A. and Wilmut, I. 1993. Nuclear cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos : Implications for deoxyribonucleic acid replication and development. *Biol. Reprod.* 49:933~942.
2. Collas P. and Robl, J. M. 1990. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. *Biol. Reprod.* 43:877~884.
3. Collas, P., Sullivan, E.J. and Barnes, F.L. 1993a. Histone H1 kinase activity in bovine oocytes following calcium stimulation. *Mol. Reprod. Dev.* 34:224~231.
4. Collas, P., Fissore, R., Robl, J.M., Sullivan, E. J. and Barnes, F.L. 1993b. Electrically induced calcium elevation, activation and parthenogenetic development of bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 34:212~223.
5. First, N.L., Leibfried-Rutledge, M.L., Northey, D.L. and Nuttleman, P.L. 1992. Use of matured oocytes 24hr of age in bovine nuclear transfer. *Theriogenology* 37 :211(Abstr.).
6. Fissore, R.A., Dobrinsky, J.R., Balise, J.J., Duby, R.T. and Robl, J.M. 1992. Patterns of intracellular Ca²⁺ concentrations fertilized bovine eggs. *Biol. Reprod.* 47:960~969.
7. Ha, R.J., Yin, X.J., Kang, D.W., Park, J.K., Song, S. Y., Kong, I. K., Lee, H.J. and Park, C. S. 1998. Parthenogenetic activation and development of rabbit oocytes following electric stimulation or ionomycin plus-dimethylaminopurine. *Theriogenology* 49:153 (Abstr.).
8. Kono, T., Iwasaki, S. and Nakahara, T. 1989.

- Parthenogenetic activation by electric stimulus of bovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 32:569.
9. Lavoit, M. C., Rumph, N.D., de la Fuente, R., Barnes, F., King, W.A. and Betteridge, K. J. 1996. The influence of cytoplasmic age on the development of embryos made by nuclear transfer. *Theriogenology* 45:286(Abstr.).
 10. Liu, L, Ju, J.C. and Yang, X. 1998a. Parthenogenetic development and protein patterns of newly matured bovine oocytes after chemical activation. *Mol. Reprod. Dev.* 49:298~307.
 11. Liu, L., Ju, J.C. and Yang, X. 1998b. Differential inactivation of maturation promoting factor and mitogen-activated protein kinase following parthenogenetic activation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 59:537~545.
 12. Nagai, T. 1987. Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes with ethanol. *Gamete Res.* 16:243~249.
 13. Pincus, G. and Enzmann, E.V. 1935. The comparative behaviour of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. I. The activation of ovarian eggs. *Journal of Experimental Medicine* 62:665~675.
 14. Powell, J.W. and Barnes, F.L. 1992. The kinetics of oocyte activation and polar body formation in bovine embryo clones. *Mol. Reprod. Dev.* 33: 53~58.
 15. Presicce, G.A. and Yang, X. 1994a. Nuclear dynamics of parthenogenesis of bovine oocytes matured for 20 and 40 hours and activated with combined ethanol and cycloheximide treatment. *Mol. Reprod. Dev.* 37:61~ 68.
 16. Presicce, G.A. and Yang, X. 1994b. Parthenogenetic development of bovine oocytes matured for 24h and activated by ethanol and cycloheximide. *Mol. Reprod. Dev.* 38:380~385.
 17. Prochazka, R., Durnford, R., Fiser, P.S. and Marcus, G.J. 1993. Parthenogenetic development of activated mature bovine oocytes. *Theriogenology* 39:1025~1032.
 18. Rho, G.J., Wu, B., Kawarsky, S., Leibo, S.P. and Betteridge, K. J. 1998. Activation regimens to prepare bovine oocyte. *Mol. Reprod. Dev.* 50:485~492.
 19. Saeki, K., Nagao, Y., Kishi, M. and Nagi, M. 1997. Developmental capacity of bovine oocytes following inhibition of meiotic resumption by cycloheximide or 6-dimethylaminopurine. *Theriogenology* 48:1161~1172.
 20. Samake, S. and Smith, L.C. 1997. Synchronization of cell division in eight-cell bovine embryos produced : effects of 6-dimethylaminopurine. *J. Reprod. Fertil.* 110:21~27.
 21. Shi, Z., Jiang, S. and Yang, X. 1993. Synergistic effect of A23187 and cycloheximide allows effective activation of freshly matured bovine oocytes. *Theriogenology* 38: 309(Abstr.).
 22. Soloy, E., Kauka, J., Viuff, D., Smith, S.D., Calleson, S.D. and Greve, T. 1997. Time course of pronuclear deoxiribonucleic acid synthesis in parthenogenetically activated bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 57:27:35.
 23. Stice, S.L. and Keefer, C.L. 1992. Improved developmental rates for bovine nucleus transfer embryos using cold shock activated oocytes. *Biol. Reprod.* 42(Suppl.1):166(Abstr.).
 24. Stice, S.L., Keefer, C.L. and Matthews, L. 1994. Bovine nuclear transfer embryos : oocyte activation prior to blastomere fusion. *Mol. Reprod. Dev.* 38:61~68.
 25. Susko-Parrish, J.L., Leibfried-Rutledge, M.L., Notthy, D. L., Schutzkus, V. and First, N. L. 1994. Inhibition of protein kinase after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. *Developmental Biology*

- 166:729~739.
26. Swann, K. and Lai, F.A. 1997. A novel signaling mechanism for generating Ca^{2+} oscillations at fertilization in mammals. *Bioassays* 19:371~378.
 27. Takahashi, S., Kubota, C., Ogata, Y., Tokunaga, T. and Imai, H. 1996. Parthenogenetic activation and development of bovine oocytes treated with protein synthesis or protein phosphorylation inhibitors. *The rriogenology* 45: 156(Abstr.).
 28. Takano, H., Koyama, K., Kozai, C., Kato, Y. and Tsunoda, Y. 1993. Effect of aging of recipient oocytes on the development of bovine nuclear transfer embryos *in vivo*. *Therriogenology* 39:909~917.
 29. Tanaka, H. and Kanakawa, H. 1997. Influence of combined activation treatments on the success of bovine nuclear transfer using or aged oocytes. *Anim. Reorod. Sci.* 49:113~123.
 30. Ware, C.B., Barnes, F.L., Maiki-Laurila, M. and First, N. L. 1989. Age dependance of bovine oocyte activation. *Gamete Res.* 22:265~275.
 31. Wu, B., Igotz, G., Currie, W.B. and Yang, X. 1997. Dynamics of maturation promoting factor and its constituent proteins during maturation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 56: 253~259.
 32. Yang, X., Presicce, A., Moraghan, L., Jiang, S. and Foote, R.H. 1994. Synergistic effect of ethanol and cycloheximide on activation of freshly matured bovine oocyte. *Therriogenology* 41:395~403.
 33. Yang, X., Jiang, S. and Foote, R.H. 1993a. Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. *Mol. Reprod. Dev.* 34:94~100.
 34. Yang, X., Jiang, S. and Shi, Z. 1992. Improved activation by combined cycloheximide and electric pulse treatment of bovine follicular oocytes matured for 23~24hr. *Biol. Reprod.* 46 (Suppl):117(Abstr.).
 35. Yang, X., Jiang, S., Farrell, P., Foote, R.H. and McGrath, A.B. 1993b. Nuclear transfer in cattle : effect of nuclear donor cells, cytoplasm age, co-culture and embryo transfer. *Mol. Reprod. Dev.* 35:29~36.
- (접수일자 : 2000. 8. 19. / 채택일자 : 2000. 9. 20.)