

## 세포 융합액 중의 $Ca^{2+}$ 농도가 소 체세포 핵이식란의 융합, 핵형 및 체외발육에 미치는 영향

조재원 · 김정익 · 박춘근 · 양부근 · 정희태<sup>†</sup>  
강원대학교 동물자원과학대학

## Effect of $Ca^{2+}$ Concentration in Fusion Medium on the Fusion, Nuclear Morphology and Development of Bovine Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos

Cho, J. W., C. I. Kim, C. K. Park, B. K. Yang and H. T. Cheong<sup>†</sup>  
College of Animal Resource Science, Kangwon National University

### ABSTRACT

This study was conducted to investigate the effect of  $Ca^{2+}$  concentration in fusion medium on the fusion, nuclear morphology and the development of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. Bovine skin cells were transferred into an enucleated oocyte and fused with cytoplasm in the fusion medium containing with 0.05 to 1.0 mM  $CaCl_2$ . Nuclear transfer embryos were activated with a combination of A23187 and cycloheximide. Nuclear transfer embryos were fixed at 3 h after fusion or cultured for 7~8 days. Fusion rate was significantly ( $P<0.01$ ) increased by increasing the  $Ca^{2+}$  concentrations in the fusion medium from 0.05 mM (56.6%) to 0.5 mM (80.1%) and 1.0 mM (84.3%). More than 80% of reconstituted embryos underwent premature chromosome condensation (PCC) with 0.05, 0.1 mM  $CaCl_2$ , whereas 54.5% and 59.3% of embryos formed pronucleus (PN) directly without PCC in the 0.5 and 1.0 mM  $CaCl_2$  groups. Blastocyst formation rates were significantly ( $P<0.05$ ) different between 0.1 mM and 1.0 mM  $CaCl_2$  groups. From the present result, it is suggested that the elevated  $Ca^{2+}$  concentrations in fusion medium can enhance the fusion and blastocyst formation rates of bovine nuclear transfer embryos.

(Key words : Somatic cell nuclear transfer,  $Ca^{2+}$  concentration, Fusion rate, *In vitro* development, Bovine)

### I. 서 론

체세포 핵이식에 의한 복제동물 생산은 여러 가지 기술적인 요인에 의해 영향을 받을 수 있는데,

특히 핵이식과정 중, 핵과 세포질의 융합은 핵이식란의 제작에 필수적인 요소이다. 체세포 핵이식은 수정란 분할구 핵이식과 달리 donor세포의 크기가 작기 때문에 체세포와 수정란 세포질과의 융합에 어려움이 있다. 따라서 체세포 핵이식 시 융합율을

본 연구는 2001년 농림기술개발사업 기획연구과제의 연구지원(300012-5)에 의해 수행되었음.

<sup>†</sup> Corresponding author : Department of Veterinary Medicine, College of Animal Resource Science, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, E-mail : htcheong@kangwon.ac.kr

높이기 위한 다양한 방법이 핵과 세포질의 전기융합 시에 적용되었다(Lavoir 등, 1997; Wells 등, 1997, 1999). Lavoire 등(1997)은 핵과 세포질간의 접착력을 향상시키기 위해 핵이식용 배양액 내에 phytohemagglutinin-P를 첨가하였고, Wells 등(1997)은 핵을 삽입하는 동안 세포질을 dehydrate 시킨 후 융합하기 전 rehydrate 시켜 공여세포와 수핵란 세포질간의 접착을 용이하게 하는 방법을 사용하기도 하였다. 그럼에도 불구하고 전기자극에 의한 소 체세포 핵과 세포질의 융합율은 수정란 핵의 융합율에 비하여 매우 낮아 체세포 핵이식의 효율을 저해하는 중요한 요인으로 작용하고 있다.

한편, 난자 활성화용액 내  $Ca^{2+}$  수준이 난자의 활성화와 발달에 영향을 미치고, 부족하거나 과도한  $Ca^{2+}$  자극은 소 단위발생란의 발달에 손상을 입힐 수 있다고 보고(Collas 등, 1993)하여, 소 체세포 핵이식 시 융합액 내 적절한  $Ca^{2+}$  농도의 조절이 필요함을 시사하였다. 최근 돼지 핵이식 시 융합액 내  $Ca^{2+}$  농도를 증가시켜 추가적인 활성화 처리 없이도 융합율과 배반포 형성율을 향상시킬 수 있음이 보고되었다(Cheong 등, 2002). 이는 높은 농도의  $Ca^{2+}$  자극이 활성화를 향상 뿐 아니라 융합율 향상에도 효과적이며 핵이식란의 생산효율을 증진시킬 수 있음을 시사하는 것이다.  $Ca^{2+}$ 은 핵이식란의 활성화를 유지하기 위해 대부분의 핵이식 기법에서 사용됨에도 불구하고, 단위발생란의 발달에 미치는 영향에 대해서는 많은 연구가 이루어졌으나  $Ca^{2+}$  농도가 융합율과 핵이식란의 발달에 미치는 영향에 대한 연구는 거의 없다.

따라서, 본 연구는 소 체세포를 이용한 핵이식 시 융합액 내  $Ca^{2+}$  농도가 소 체세포 핵이식란의 융합과 핵형의 변화, 체외발육에 미치는 영향을 검토하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 난포란의 채취 및 성숙배양

도축장에서 난소를 회수하여 직경이 2~7 mm의 난포로부터 난포액을 흡입하여 미성숙 난자를 채취하여 난구세포가 균일하고 세포질이 균질한

것만을 선별하여 성숙배양에 이용하였다. 난포란의 성숙배양액은 TCM-199액(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)에 10% FBS (fetal bovine serum, Gibco-BRL), 0.2 mM Na-pyruvate, 0.02 U/ml FSH (Sigma, St. Louis, MO, USA), 1  $\mu$ g/ml 17  $\beta$ -estradiol(Sigma) 및 50  $\mu$ g/ml gentamycin(Gibco-BRL)이 함유된 성숙배양액을 50  $\mu$ l의 소적으로 만들어 mineral oil로 피복하고 성숙배양 2~3시간 전에 5% CO<sub>2</sub>, 39°C의 조건하에서 평형시킨 후, 각 소적 당 10개의 난포란을 넣어 18~20시간 배양하였다.

### 2. 체세포의 분리, 배양 및 보존

체세포의 분리 및 배양은 Wilmut 등(1997)의 방법에 준하였다. 한우의 귀 피부조직을 안과용 가위로 잘게 썰어 15ml 원심관에 옮겨 넣고 0.05% trypsin-EDTA (Gibco-BRL) 10 ml를 혼합하여 37°C에서 30분간 진탕한 후 5분간 정치하여 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액은 200×g로 5분간 원심 분리하여 세포를 회수하였다. 회수된 피부세포는 10% FBS, 0.2mM Na-pyruvate 및 50  $\mu$ g/ml gentamycin이 함유된 DMEM액 3 ml에 재 부유시켜 25 ml 배양병 내에 넣어 5% CO<sub>2</sub> 및 39°C의 조건에서 배양하였다. 배양액은 매 3일 간격으로 신선 배양액으로 교환하였으며, 세포가 약 90% 정도 confluence 되었을 때 1:2 비율로 passage를 반복하였다. 약 4회 정도 passage한 세포는 염색체분석에 의해 정상 염색체 수를 확인하였다. 회수된 세포는 10% DMSO 및 10% FBS를 함유한 DMEM 용액 중에 1×10<sup>5</sup>/ml 세포농도로 부유시켜 3 ml 냉동 vial에 1 ml씩 넣어 -70°C 냉동고 내에서 overnight하여 동결한 후 LN<sub>2</sub>용기 내에 보관하였다.

### 3. 체세포의 휴면처리

동결보존 된 체세포는 사용 전에 용해하여 7 ml의 세포배양액으로 200×g의 조건에서 5분간 원심 분리하여 세척한 다음 재 부유시켜 4-well dish에 0.5 ml씩 분주하여 5% CO<sub>2</sub> 및 39°C의 조건에서 배양하였다. 세포의 휴면처리는 생리적인 방법으로, 세포를 8~10일간 장기 배양하여 높은 세포 밀도(confluence 상태)를 만들어 줌으로서 G0/G1

기에 동조시킨 후 핵이식에 이용하였다.

#### 4. 미수정란의 탈핵

체외에서 18~20시간 체외 성숙시킨 난포란을 1ml의 TCM-199액이 들어있는 원심관에 옮겨 vortex mixer로 5분간 처리하여 난구세포를 제거한 후, 세포질의 색조가 균일하고 제 1극체가 확인된 난자만을 수핵란용으로 사용하였다. 모든 미세조작은 실온에서 실시하였으며, 미수정란의 탈핵은 수정 PBS(modified phosphate buffered saline; mPBS)액의 배양소적(50  $\mu$ l) 내에서 제 1극체와 주변의 세포질을 약 1/3정도 흡입하여 제 2유사분열 중기 염색체를 제거하는 방법으로 실시하였다. 탈핵 조작된 세포질은 1  $\mu$ g/ml의 Hoechst 33342(Sigma)를 함유한 TCM-199액에 15분간 염색(Westhusin 등, 1992)하여 형광현미경으로 탈핵 여부를 검사하였다.

#### 5. 핵이식

핵이식 조작은 5  $\mu$ g/ml cytochalasin B(CB)가 함유된 mPBS액 내에서 Campbell 등(1996)의 방법에 준하여 실시하였다. Donor용 체세포는 위와 같은 방법으로 준비하여 0.05% trypsin-EDTA 용액으로 1 분간 처리하여 pipetting에 의하여 배양접시의 저면에서 분리한 후, 200 $\times$ g에서 5 분간 원심 분리하여 상층액을 제거한 후 3mg/ml BSA를 함유한 TCM-199액의 drop에 보관하여 사용하였다. Donor 세포는 직접 injection pipette으로 흡입하여 탈핵을 실시한 구멍을 통하여 탈핵란 세포의 위관강 내로 주입하였다.

#### 6. 재구축란의 전기융합 및 활성화

재구축란의 전기융합은 Cheong 등(1993)의 방법에 준하여 BTX 세포융합장치(BTX, San Diego, CA, USA) 및 0.5 mm폭의 wire chamber를 사용하여 실시하였다. 재구축란은 0.1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.05, 0.1, 0.5 또는 1.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05 mg/ml BSA를 첨가한 0.3 M mannitol 용액을 넣은 wire chamber의 양전극 사이로 옮겨, pipette을 이용하여 체세포와 세포질의 접촉면이 양전극에 수평이 되도록 유

도하고, 이어서 1.5 kV/cm의 직류(DC)전류를 30  $\mu$ sec 간 1회 통전하였다. 통전 후 즉시 TCM-199 + 3 mg/ml BSA액 내에서 수회 세척 후 배지로 옮겨졌고, 융합 실시 후 30분에 세포의 융합 여부를 관찰하였다. 핵이식란의 활성화를 유기하기 위하여 융합이 확인된 재구축란만을 융합 처리 1시간 후에 10  $\mu$ M의 Ca<sup>2+</sup>-ionophore (A23187; Sigma)로 5분간 처리 후 즉시 10  $\mu$ g/ml 농도의 cycloheximide(CHXM, Sigma)로 5시간 활성화를 유기시켰으며, 핵이식란의 일부는 3시간째 whole-mount에 공시하였다.

#### 7. 핵이식란의 체외배양

활성화처리 후 핵이식란은 3mg/ml BSA를 함유한 CR1aa액의 50  $\mu$ l drop으로 옮겨 5% CO<sub>2</sub> 및 39  $^{\circ}$ C의 조건하에서 40~42시간 배양한 후, 분할을 검사하였다. 핵이식란의 분할 후 10% FBS를 함유한 CR<sub>1aa</sub> 내에서 추가로 5~6일간 배양하여 배반포 형성율을 검사하였다.

#### 8. Whole-mount 표본의 제작

핵이식란의 PCC 여부 및 핵형을 검사하기 위하여 일부 핵이식란은 전기융합 3시간 후에 고정하여 표본을 제작하였다. 핵이식란을 vaseline과 paraffin 혼합물(9:1)로 사각에 소적을 배치한 slide glass 위에 소량의 배양액과 함께 옮겨놓고 cover glass로 가볍게 압착하였다. 그 후 ethanol과 acetic acid를 3:1로 혼합한 고정액으로 24시간 고정한 후 aceto-orcein으로 5분간 염색하고 25% aceto-glycerol로 세척하여 DIC(differential interference contrast)가 장착된 위상차 현미경( $\times$ 400)으로 핵의 형태를 관찰하였다.

#### 9. 통계처리

실험의 결과는 LSD-test에 의하여 유의성을 검정하였다.

### III. 결 과

#### 1. 융합액 내 Ca<sup>2+</sup>농도가 재구축배의 융합에 미치는 영향

융합액 내  $Ca^{2+}$  농도(0.05~1.0 mM)에 따라 융합율을 검토한 결과,  $CaCl_2$  농도가 0.05 mM에서 0.5 및 1.0 mM로 증가함에 따라 융합율이 56.6%에서 80.5 및 84.3%로 유의적( $P<0.01$ )으로 증가하였다(Fig. 1).

## 2. 융합액 내 $Ca^{2+}$ 농도에 따른 핵형의 변화

융합액 내  $Ca^{2+}$  농도에 따른 재구축배의 핵형을 검토한 결과  $CaCl_2$  농도 0.05와 0.1 mM에서는 염색체응축(premature chromosome condensation, PCC) 이후 염색질괴를 형성하는 난자의 비율이 88.4%와 84.0%로 나타난 반면, 0.5와 1.0 mM에서는 PCC 형태를 거치지 않고 융합 직후 전핵을 형성하는 난자의 비율이 54.5%와 59.3%로 나타나 융합액 내  $Ca^{2+}$  농도가 증가함에 따라 PCC 형태를 거치지

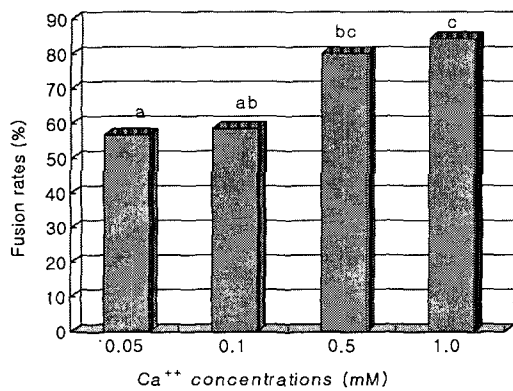


Fig. 1. Effect of  $Ca^{2+}$  concentration in fusion medium on the fusion rate (a,b:  $P<0.01$ ).

않고 전핵을 형성하는 난자의 비율이 증가하는 경향을 보였다(Table 1).

## 3. $Ca^{2+}$ 농도에 따른 핵이식란의 발육능

융합액 내  $Ca^{2+}$  농도에 따른 상실배기 발육율에 있어서는 유의적인 차이가 나타나지 않았지만 배반포 형성율에 있어서 1.0mM  $CaCl_2$ 에서는 배반포 발육율이 30.6%로 나타난 반면, 0.1 mM  $CaCl_2$ 에서는 20.0%로 나타나 유의적( $P<0.05$ )인 차이를 나타냈다(Table 2).

## IV. 고찰

소 체세포를 탈핵 미수정란 세포질에 이식할 경우, 핵이식란의 발육에 영향을 주는 요인 중의 하나가 탈핵된 세포질의 활성화이다. 수핵란 세포질의 활성화를 위한 방법으로, 성숙직후의 난자에 전기자극, 에탄올처리 또는  $Ca^{2+}$ -ionophore 처리 후, 단백질 합성 억제제인 cycloheximide나 6-DMAP (dimethylaminopurine)으로 추가 배양하여 주는 방법에 의하여 높은 활성화율을 얻을 수 있음이 확인되었으며(First 등, 1992; Presicce와 Yang, 1993), 이 조건에 의하여 난자를 이용한 핵이식에도 성공하였다(First 등, 1992; Aoyagi 와 Konish, 1994). 또한 최근 돼지 핵이식 시 융합액 내  $Ca^{2+}$  농도를 증가시켜 추가적인 활성화 처리 없이도 융합율과 배반포 형성율을 향상시킬 수 있음이 보고되었는데 (Cheong 등, 2002), 이것은 체세포 핵이식 시 융합

Table 1. Effect of  $Ca^{2+}$  concentration in fusion medium on nuclear morphology\*

$Ca^{2+}$ con. (mM)	No. of NTs	Chromatin clumps (%)			NPCC (%)		Non-AC (%)
		1	2	$\geq 3$	1PN	2PN	
0.05	52	26(50.0) <sup>a</sup>	14(26.9) <sup>a</sup>	6(11.5)	4( 7.7) <sup>b</sup>	0(0.0) <sup>b</sup>	2(3.8)
0.1	50	24(48.0) <sup>a</sup>	14(28.0) <sup>a</sup>	4( 8.0)	5(10.0) <sup>b</sup>	0(0.0) <sup>b</sup>	3(6.0)
0.5	55	14(25.5) <sup>b</sup>	5( 9.1) <sup>b</sup>	5( 9.1)	29(52.7) <sup>a</sup>	1(1.8) <sup>b</sup>	1(1.8)
1.0	54	12(22.2) <sup>b</sup>	4( 7.4) <sup>b</sup>	4( 7.4)	28(51.9) <sup>a</sup>	4(7.4) <sup>a</sup>	2(3.7)

\* NPCC : non-premature chromosome condensation, AC : activation, PN : pronucleus,

NTs : nuclear transfer embryos.

<sup>a,b</sup> Values with different superscripts in the same column differ ( $P<0.05$ ).

**Table 2. Effect of Ca<sup>2+</sup> concentration in fusion medium on the development of bovine nuclear transfer embryos**

Ca <sup>2+</sup> con. (mM)	No. of NTs*	No. (%) of embryos developed to			
		2-Cell	8-Cell	Morula	Blastocyst
0.05	50	37(74.0)	24(48.0)	14(28.0)	11(22.0) <sup>ab</sup>
0.1	50	31(62.0)	19(38.0)	13(26.0)	10(20.0) <sup>b</sup>
0.5	50	35(70.0)	27(54.0)	16(32.0)	11(22.0) <sup>ab</sup>
1.0	49	25(51.0)	19(38.8)	16(32.7)	15(30.6) <sup>a</sup>

\* NTs : nuclear transfer embryos.

<sup>ab</sup> Values with different superscripts differ (P<0.05).

액 내 적절한 Ca<sup>2+</sup> 농도의 조절이 필요하며, 비교적 높은 수준의 Ca<sup>2+</sup> 자극이 더 높은 융합과 활성화를 야기함으로써 핵이식란의 발달을 향상시킬 수 있음을 시사한다. 본 연구에서도 융합액 내 Ca<sup>2+</sup> 농도가 증가함에 따라 융합율이 증가하여 Ca<sup>2+</sup>이 재구축배의 공여 체세포와 수핵란 세포질간의 접촉을 강하게 하여 융합율을 향상시킬 수 있음을 보여주었다.

본 연구에서 체세포 핵이식 후 고정 표본을 제작한 결과, 융합액 내 Ca<sup>2+</sup> 농도가 증가함에 따라 PCC 형태를 거치지 않고 융합 직후 전핵을 형성하는 난자의 비율이 유의적으로 증가하였는데, Ca<sup>2+</sup> 농도의 증가가 활성화 강도를 증가시켜 세포의 융합 진행속도보다 활성화가 빠르게 진행된 결과로 보여진다. 돼지 체세포 핵이식의 경우에도, Ca<sup>2+</sup> 농도가 증가함에 따라 PCC를 거치지 않고 직접 전핵을 형성하는 난자의 비율이 증가되었다는 비슷한 보고가 있다(Cheong 등, 2002). 소의 핵이식의 경우, 어린 난자를 사용하므로 인해 비록 전기융합 후 추가적인 활성화 자극이 없으면 Ca<sup>2+</sup>의 농도 증가에 관계없이 분할율이 저조했지만(자료 미 제시) 본 실험의 결과는 세포 외 Ca<sup>2+</sup> 농도의 증가가 전기자극 직후 세포 내 Ca<sup>2+</sup> 유입을 증가시켜 활성화를 증진시킨다는 보고(Sun 등, 1992)와 대체로 일치하는 것으로 판단된다.

본 연구에서는 소 체세포 핵이식 시 부족하거나 과도한 Ca<sup>2+</sup> 농도에 관해 직접적으로 실험한 바는 없으나, 1.0 mM의 CaCl<sub>2</sub>를 융합액 내에 첨가했을

시 융합율이 유의적(P<0.01)으로 증가했으며, 0.1과 1.0 mM에서 배반포 형성을 역시 유의적(P<0.05)인 차이를 보여 융합액 내 1.0 mM의 Ca<sup>2+</sup> 농도가 소 체세포 핵이식 시 효과적이라 사료된다. 이러한 차이가 단순히 Ca<sup>2+</sup> 농도의 증가에 따른 활성화 강도의 증가에서 온 결과인지, 융합 후 핵형 변화의 차이에서 온 것인지는 명확하지 않다. 그러나 쥐의 경우, 활성화가 융합보다 빨리 진행되어 PCC를 거치지 않고 바로 전핵을 형성한 경우는 배반포 발육율은 증가된 반면, 염색체이상 등의 문제가 야기되는 것으로 보고되었다(Cheong 등, 1994). 반면, 소 체세포 핵이식의 경우, PCC가 일어난 일부 재구축란의 염색질이 활성화 이후 불규칙적으로 분열되어 극체상의 방출을 보이며 배반포 발육을 저해하는 것으로 나타났는데, 세포의 세포주기를 G0/G1에 동조하여도 PCC 이후 비정상적인 염색질분열 현상이 관찰되었다(최 등, 2000). 또한 생쥐에서와 달리 소 핵이식란의 초기화에 PCC가 필수적이지 아닐 수 있음도 활성화 후 난자를 이용한 핵이식 실험에서 시사되었다 (Barnes 등, 1993).

결론적으로, 본 연구의 결과는 융합액 내 일정량의 Ca<sup>2+</sup> 농도의 증가는 소 체세포 핵이식란의 융합율을 증가시키고 융합 후 핵상 변화에 영향을 주며 핵이식란의 배반포 발육율을 향상시킬 수 있음을 시사한다.

## V. 요약

소 체세포 핵이식 시 융합액 내  $Ca^{2+}$  농도에 따른 융합율, 핵형의 변화, 배 발달율을 검토한 결과는 다음과 같다.

1. 융합액 내  $Ca^{2+}$  농도를 0.05, 0.1, 0.5 및 1.0 mM로 각기 다르게 처리한 결과, 0.5와 1.0 mM의  $CaCl_2$  에서 융합율이 80.5 와 84.3%로 나타나 0.05 mM  $CaCl_2$  에서의 융합율 56.6%에 비하여 유의적( $P < 0.01$ )으로 높았다.
2. 융합액 내  $Ca^{2+}$  농도에 따른 재구축배의 핵형을 검토한 결과,  $CaCl_2$  농도 0.05와 0.1 mM 에서는 88.4와 84.0%의 난자가 PCC이후 염색질괴를 형성한 반면, 0.5와 1.0 mM 에서는 54.5와 59.3%가 PCC 형태를 거치지 않고 직접 전핵을 형성하여,  $Ca^{2+}$  농도가 증가함에 따라 PCC 형태를 거치지 않고 직접 전핵을 형성하는 난자의 비율이 증가하였다.
3. 핵이식란의 체외 발육율을 검토한 결과, 1.0 mM  $CaCl_2$ 에서는 배반포 발육율이 30.6%로 나타난 반면, 0.1 mM  $CaCl_2$ 에서는 20.0%로 나타나 유의적( $P < 0.05$ )인 차이를 나타냈다.

본 연구의 결과는 융합액 내  $Ca^{2+}$  농도의 증가가 소 체세포 핵이식란의 융합율 및 배반포 발육율을 향상시킬 수 있음을 시사한다.

## VI. 인용문헌

1. Aoyagi, Y. and Konish, M. 1994. Studies on development into blastocyst of *in vitro* matured and artificial bovine oocytes-mixed activation method by use of electric pulse,  $Ca^{2+}$ -ionophore and cycloheximide. J. Reprod. Dev. 40:5-11.
2. Barnes, F. L., Collas, P., Powell, R., King, W. A., Westhusin, M. and Shepherd, D. 1993. Influence of recipient oocytes cell cycle stage on DNA synthesis, nuclear envelop breakdown, chromosome constitution, and development in nuclear transplant bovine embryos. Mol. Reprod. Dev. 36:33-41.
3. Campbell, K. H. S., Loi, P., Otaegui, P. J. and Wilmut, I. 1996. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. Rev. Reprod. 1:40-46.
4. Cheong, H. T., Park, K. W., Im, G. S., Lai, L., Sun, Q. Y., Day, B. N. and Prather, R. S. 2002. Effect of elevated  $Ca^{2+}$  concentration in fusion/activation medium on the fusion and development of porcine fetal fibroblast nuclear transfer embryos. Mol. Reprod. Dev. in press.
5. Cheong, H. T., Takahashi, Y. and Kanagawa, H. 1993. Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. Biol. Reprod. 48:958-963.
6. Cheong, H. T., Takahashi, Y. and Kanagawa, H. 1994. Relationship between nuclear remodeling and subsequent development of mouse embryonic nuclei transferred to enucleated oocytes. Mol. Reprod. Dev. 37:138-145.
7. Collas, P., Fissore, R., Robl, J. M., Sullivan, E. J. and Barnes, F. L. 1993. Electrically induced calcium elevation, activation, and parthenogenetic development of bovine oocytes. Mol. Reprod. Dev. 34:212-223.
8. First, N. L., Leibfried-Rutledge, M. L., Northey, D. L. and Nuttleman, P. R. 1992. Use of *in vitro* matured oocytes 24hr of age in bovine nuclear transfer. Theriogenology 37:211(abstr.).
9. Lavoit, M. C., Rumph, N., Moens, A., King, W. A., Plante, Y., Tohnson, W. H., Ding, J. and Betteridge, K. J. 1997. Development of bovine nuclear transfer embryos made with oogonia. Biol. Reprod. 56:194-199.
10. Presicce, G. A. and Yang, X. 1993. Dynamics of activation of *in vitro* matured bovine follicular oocytes following combined ethanol and cycloheximide. Mol. Reprod. Dev. 38:380-385.
11. Sun, F. Z., Hoyland, J., Huang, X., Mason, W. and Moor, R. M. 1992. A comparison of intracellular changes in porcine eggs after fertilization and electroactivation. Development 115: 947-956.

12. Wells, D. N., Misica, P. M., Day, A. M. and Tervit, H. R. 1997. Production of cloned lambs from an established embryonic cell line: A comparison between *in vivo*- and *in vitro*-matured cytoplasts. Biol. Reprod. 57 : 385-393.
13. Wells, D. N., Misica, P. M. and Tervit, H. R. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. Biol. Reprod. 60:996-1005.
14. Westhusin, M. E., Levanduski, M. J., Scarborough, R., Looney, C. R. and Bondioli, K. R. 1992. Viable embryos and normal calves after nuclear transfer into Hoechst stained enucleated demi-oocytes of cow. J. Reprod. Fertil. 95:475-480.
15. Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. and Campbell, K. H. S. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature 385:810-813.
16. 최종엽, 권대진, 김정익, 박춘근, 양부근, 정희태. 2000. 세포의 휴면처리가 소 태아섬유아세포 유래 핵이식란의 핵상변화와 체외발육에 미치는 영향. 한국가축번식학회지 24:217-222. (접수일자 : 2001. 12. 27. / 채택일자 : 2002. 1. 28.)