

전기자극 후 Cycloheximide 처리가 돼지난자의 활성화에 미치는 효과

송상현 · 정기화[†] · 조현조¹ · 박충생
경상대학교 농업생명과학연구원

Effects of Cycloheximide on Development of *In Vitro* Matured Porcine Oocytes Activated following Electric Pulse

Song, S. H., K. H. Chung[†], H. J. Cho¹ and C. S. Park
Institute of Agriculture & Life Science, Gyeongsang National University

ABSTRACT

We investigated the optimal concentration and exposure time of cycloheximide(CHX) on development of activated porcine oocytes following electrical pulse(EP). After 42~44 h maturation, oocytes were treated with 0.1% hyaluronidase, and denuded cumulus cells by pipetting. Oocytes were stimulated by electric pulse (1.2 kV/cm, 30 μ sec, 1 pulse) or incubated for 3, 5 and 7 h in cycloheximide (1, 5 and 10 μ g/ml, respectively) following electric pulse, and cultured for 8 days.

Cleavage rate of oocytes activated with 10 μ g/ml CHX following EP was significantly ($P<0.05$) higher than those of 1 μ g/ml (86.8% vs. 74.4%). The developmental competence of oocytes incubated to 5 μ g/ml of CHX was significantly ($P<0.05$) higher development to blastocysts (13.3%), compared with 10 μ g/ml of CHX (5.6%). When the oocytes were activated with 5 μ g/ml CHX for 3, 5 and 7 h following EP, the cleavage rate of oocytes in 5 h group(86.6%) was significantly ($P<0.05$) higher than that in 3 h group(73.2%). The developmental rate of oocytes to morula in 5 and 7 h groups(26.7% and 16.4%) were significantly ($P<0.05$) high than that in 3 h group(14.5%). Matured oocytes were activated with electric pulse (EP) or electric pulse combined with cycloheximide (EP+CHX) and cultured for 8 days. The rate of cleavage and development to blastocyst (80.1% and 11.6%) of activated with EP group were similar to EP combined with CHX group. When activated with EP or EP combined with CHX, the mean cell number of blastocysts were less in the activated with EP (18.67 ± 5.53) than in the activated EP combined CHX (20.71 ± 6.16), but not significantly different.

This results suggest that, when the porcine oocytes were activated with CHX following EP, the developmental rate of activated oocytes can be improved by treated with a concentration of 5 μ g/ml CHX for 5 h exposure time.

(Key words : Porcine oocyte, Activation, Electric pulse, Cycloheximide)

[†] Corresponding author : kchung@gshp.gsnu.ac.kr

¹ 상주대학교 축산학과(Department of Animal Science, Sangju National University)

I. 서론

난자의 활성화는 정자의 침투에 의하여 자연적으로 유기되며 감수분열에 중요한 역할을 하는데, 난자의 인위적인 활성화도 감수분열을 완료시키고 핵이식 등의 세포조작기술에 아주 중요하게 이용되어진다. 성숙된 포유류 난자는 제 2감수분열 중기에서 발달이 정지되어 있는데, 이와 같은 발달중지현상을 제어하는 것은 maturation promoting factor (MPF)와 cytotstatic factor (CSF)이다(Watanabe 등, 1989). 그러나 cyclin B 또는 CSF의 합성을 억제하면 제2감수분열 중기에서의 발달중지현상을 해제시켜 발달을 재개할 수 있을 것이다. 인위적인 자극에 의한 세포내 칼슘농도의 증가는 MPF의 activity(Hashimoto와 Kishimoto, 1988)와 제2감수분열 중기에서 발달중지현상과 관련이 있는 CSF에 영향을 미친다(Masui, 1991). 정자의 난자내 침투없이 인위적으로 세포내 칼슘농도를 증가시킴으로써 포유류 난자를 인위적으로 활성화시킬 수 있는데, calcium ionophore(Ware 등, 1989), ethanol(Whittingham, 1980), strontium(Marcus, 1990) 등이 이용되지만, 돼지난자를 활성화시키는데는 효과적이지 못하였다(Didion 등, 1990; Funahashi 등, 1994; Hagen 등, 1991).

Wang 등(1998)은 여러 가지 인위적인 자극으로 돼지난자를 활성화를 유도하였으나 효과적으로 제 2감수분열기의 난자의 발달중지기에서 단백질합성을 억제할 수가 없었다. 여러 연구자들은 단백질합성을 억제제인 cycloheximide를 사용하여 소(Pressice와 Prather, 1994, Yang 등, 1994)와 돼지(Nussbaum과 Prahter, 1995)의 난자를 인위적으로 활성화할 수 있었다. 전기자극 후 cycloheximide로 활성화를 유도할 경우에는 cycloheximide에 적어도 4시간 이상 배양하였을 때 소 난자의 활성화를 유도할 수 있었다고 한다(Yang 등, 1992). First 등(1992)은 소의 핵이식시에 전기자극과 cycloheximide로 활성화 처리를 했을 때, 상실배와 배반포 수정란으로 발달을 할 수 있다고 하였고, Diana와 Prather(1995)는 전기자극 후 cycloheximide와

puromycin을 사용하여 체외성숙된 돼지난자를 성공적으로 활성화할 수 있었다고 하였다. Jilek 등(2000)은 calcium ionophore(25 μ M)처리 후 cycloheximide(10 μ g/ml)를 사용하여 높은 상실배와 배반포 수정란의 발달을 유도할 수 있었다. 단백질합성 억제제인 cycloheximide와 puromycin은 mouse(Siracusa 등, 1978; Clark와 Masui, 1983)와 소(Sirard 등, 1989; First 등, 1992; Yang 등, 1992, 1994)에서 전핵형성을 유기한다고 알려져 있다.

Cycloheximide(10 μ g/ml)는 돼지 난자의 난핵포붕괴를 억제한다(Fulka 등, 1986). 제1감수분열 중기에서 간기 핵의 형성을 유기하며, cycloheximide만으로는 돼지 난자의 제2감수분열 중기로부터 감수분열을 재개시킬 수가 없었다(Ding 등, 1992; Mattioli 등, 1991; Rozinek 등, 1996)

본 연구에서는 전기자극 후 cycloheximide의 적정농도와 배양시간이 체외성숙된 돼지난자의 activation에 미치는 영향을 구명하고자 실험을 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난자채란 및 체외성숙

도축장에서 채취한 돼지의 난소는 28°C의 보온병에 담아서 실험실로 2시간 이내에 운반하였다. 운반된 난소는 항생제가 첨가된 따뜻한 생리식염수로 3회 세척 후, 18 G 주사침이 부착된 10ml의 주사기로 2~7 mm의 가시난포에서 미성숙난자와 난포액을 흡입하였다. 50 ml의 tube에서 20분 동안 정지 후, 상층액은 제거하고 정지된 pellet은 1% PVA가 첨가된 modified PVA-TL-Hepes 배양액으로 3회 정도 세척하였다. 난구세포가 균일하게 부착되고 세포질이 균일한 난자만을 실제현미경하에서 선별한 다음, 체외성숙배양액으로 3~4회 세척하여 500 μ l의 체외성숙배양액으로 옮겼다. 미성숙난자의 체외성숙은 호르몬이 첨가된 배양액에서 20~22시간 동안 배양한 다음, 호르몬이 첨가되지 않은 배양액에서 20~22시간 동안 추가로 배양하였다.

체외성숙배양액의 조성은 기본배양액인 NCSU

23에 난포액(10%), EGF(10 ng/ml) 및 cysteine(0.1 mg/ml)을 첨가하였다. 체외성숙배양액에 첨가하는 호르몬은 FSH(0.5 μ g/ml), LH(0.5 μ g/ml)와 estradiol-17 β (1 μ g/ml)을 각각 첨가하였다.

2. 난자의 활성화

42~44시간 동안 체외성숙된 난자는 0.1%의 hyaluronidase에서 pipetting으로 난구세포를 제거하였다. 난구세포가 제거된 난자는 극체가 있는 것만을 선별하여 실험에 공시하였다. 전기자극은 1.2 kV/cm의 전압으로 활성화를 유도하였으며, 전기자극 후 cycloheximide의 처리는 1, 5 및 10 μ g/ml의 농도로 3, 5 및 7시간 동안 incubation하여 돼지 난자의 활성화를 유도하였다.

난구세포가 제거된 돼지 난자는 0.3M mannitol이 첨가된 0.5 mm의 electrode사이에 난자를 정렬하여 전기자극을 가하거나 전기자극 후 cycloheximide를 처리하여 activation을 유도하였다.

3. 수정란의 배양

활성화된 돼지난자는 0.3% BSA가 첨가된 NC-SU-23 배양액에서 8일 동안 배양하였으며, 난자의 분할율은 활성화 처리 후 48시간 췌 확인하였으며, 7일째 배반포로 발달한 수정란을 Hoechst 33342로 염색하여 핵 수를 확인하였다.

4. 통계학적 분석

실험결과와 통계적 분석은 SAS package를 이용하여 실시하였으며, GLM(General Linear Model) Procedure를 적용하여 각 요인의 Least square me-

ans를 구하여 요인간의 유의성을 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 전기자극 후 cycloheximide의 농도가 돼지 난자의 발달에 미치는 효과

42~44시간 동안 체외성숙된 돼지 난자를 1.2 kV의 전압으로 전기자극 후 cycloheximide 1, 5 및 10 μ g/ml의 농도에서 각각 5시간 동안 배양한 결과는 Table 1과 같다. 난자의 분할율에 있어서 cycloheximide 농도 10과 1 μ g/ml 처리군에서 각각 86.8와 74.4%로서 유의적인($P < 0.05$) 차이가 나타났으나 5 μ g/ml 처리구와는 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 상실배로의 발달율은 차이가 없었으나 배반포기까지는 10 μ g/ml 처리구보다 5 μ g/ml 처리구에서 유의적으로($P < 0.05$) 높은 발달율을 나타내었다.

Nussbum과 Prather (1995)는 전기자극 후 5 μ g/ml의 cycloheximide로 돼지난자를 activation 시켰으며, Jarrel 등(1991)도 5 μ g/ml의 cycloheximide만으로 4-세포기 돼지 수정란의 단백질합성을 효과적으로 억제할 수 있었다고 한다. Ding 등(1992)은 cycloheximide 10 μ g/ml의 농도는 돼지난자의 단백질 합성을 억제할 수 있으나 그 이상의 농도에서는 세포막의 수송기능에 역효과를 나타낼 수 있다고 하였다. Jilek 등(2000)은 25 μ M의 calcium ionophore와 10 μ g/ml의 cycloheximide 농도로 충분히 돼지난자를 activation시킬 수 있었다고 하였다. 본 연구의 결과도 여러 연구자들과 같이 전기자극 후 cycloheximide 5 μ g/ml의 농도로 효과적인

Table 1. Effects of concentration of cycloheximide on development of porcine oocytes activated following electrical stimulation

Concentration of CHX (μ g/ml)	No. of oocytes examined	No.(%) of oocytes cleaved	No.(%) of embryo developed to	
			Morula	Blastocyst
1	145	108 (74.4) ^b	28 (19.3) ^a	10 (6.9) ^{ab}
5	143	116 (81.1) ^{ab}	29 (20.3) ^a	19 (13.3) ^a
10	160	139 (86.8) ^a	26 (16.3) ^a	9 (5.6) ^b

^{a,b} Values with different superscripts in the same column were significantly different ($P < 0.05$).

Table 2. Effects of incubation time to cycloheximide on development of porcine oocytes activated following electrical stimulation

Incubation time (h)	No. of oocytes examined	No.(%) of oocytes cleaved	No.(%) of embryo developed to	
			Morula	Blastocyst
3	131	96 (73.2) ^b	19 (14.5) ^b	8 (6.1) ^a
5	150	130 (86.6) ^a	40 (26.7) ^a	18 (12.0) ^a
7	158	124 (78.5) ^{ab}	26 (16.4) ^a	10 (6.3) ^a

^{a,b} Values with different superscripts in the same column were significantly different (P<0.05).

돼지난자 activation을 야기할 수 있었다.

간 동안에 나타난다(Nussbaum과 Prather, 1995).

2. Cycloheximide의 배양시간이 돼지 난자의 활성화에 미치는 효과

5 µg/ml의 cycloheximide에서 3, 5 및 7시간을 배양했을 때 activation된 돼지난자의 분할율 및 발달율은 Table 2와 같다. Cycloheximide를 3시간 동안 처리한 것보다 5시간 처리한 것(73.2와 86.6%)이 유의적으로(P<0.05) 높은 분할율을 나타내었으나 7시간 동안 처리한 것과는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 상실배의 발달율은 5와 7시간 처리구가 3시간 처리구에 비해 유의적으로(P<0.05) 높은 발달율을 보였으나, 배반포기에서는 유의적인 차이가 없었다.

Nussbaum과 Prather (1995)는 전기자극 단독처리보다 전기자극 후 5 µg/ml의 cycloheximide와 복합 처리하는 것이 돼지난자를 효과적으로 activation시킬 수 있었으며, cycloheximide에 배양시간은 6시간 보다 4시간이 더 효과적이었다고 하였다. 단백질 합성에 있어서 cycloheximide의 효과는 단백질 합성 억제제에 난자를 노출시킨 초기의 몇 시

3. 전기자극과 cycloheximide에 의해 활성화된 돼지 난자의 체외발달

체외성숙된 돼지난자를 전기자극 또는 전기자극 후 5 µg/ml cycloheximide를 5시간 처리하여 난자의 활성화를 유도한 결과는 Table 3과 같다. 전기자극 단독 또는 전기 자극 후 cycloheximide를 처리했을 때 난자의 분할율은 각각 77.2%와 80.1%였으며, 상실배(19.1%와 22.6%)와 배반포기배(6.6%와 11.6%)의 발달율도 처리간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

Cha 등(1997)은 전기자극 또는 전기자극 후 cycloheximide처리된 돼지 난자의 분할율, 상실배 및 배반포기배로의 발달율은 유의적인 차이가 나타나지 않았다고 보고하여 본 연구와 동일한 결과이었다. 그러나 Cheong 등(2000)은 전기자극 후 cycloheximide를 처리하여 토끼난자를 효과적으로 activation을 유도할 수 있었다고 하였고, Ikeda와 Takahashi(2001)도 돼지난자를 전기자극 후 cycloheximide를 처리하여 핵이식 돼지수정란의 발달을 향

Table 3. In vitro development of porcine oocytes activated by electrical stimulation plus cycloheximide

Activation treatment	No. of oocytes examined	No.(%) of oocytes cleaved	No.(%) of embryo developed to	
			Morula	Blastocyst
EP	136	105 (77.2)	26 (19.1)	9 (6.6)
EP+CHX	146	118 (80.1)	33 (22.6)	17 (11.6)

EP : electrical pulse (1.2 kV/cm, 30 µsec, 1 pulse).

EP+CHX : electrical pulse followed by cycloheximide(5 µg/ml for 5 hrs.).

Table 4. Number of nuclei of porcine blastocysts produced by activation in porcine oocytes matured *in vitro*

Activation treatment	No. of blastocysts examined	Number of nuclei (Mean \pm S.D.)
EP	12	18.67 \pm 5.53
EP+CHX	14	20.71 \pm 6.16

EP: electrical pulse (1.2 kV/cm, 30 μ sec, 1 pulse).

EP+CHX: electrical pulse followed by cycloheximide (5 μ g/ml for 5 hrs.).

상시켰다고 하여 본 연구와는 상반된 결과를 보고 하였다.

4. 전기자극 후 cycloheximide에 의한 활성화가 세포수에 미치는 영향

체외성숙된 돼지난자를 전기자극 또는 전기자극 후 5 μ g/ml cycloheximide에서 5시간동안 activation을 유도하였다. Activation된 돼지난자를 0.4%의 BSA가 첨가된 NCSU-23 배양액에서 7일 동안 배양한 배반포기 수정란을 Hochest 33342 염색액으로 염색하여 세포수를 조사한 결과는 Table 4와 같다. 처리구 각각의 핵 수는 18.6개와 20.7개로써 유의적인 차이는 없었다. Cha 등(1997)은 전기자극 또는 전기자극 후 cycloheximide처리에 의해 발달한 배반포기 수정란의 세포수는 유의적인 차이를 나타내지 않았다고 보고하여 본 연구와 유사한 경향을 보였다.

IV. 요약

본 연구에서는 전기자극 후 cycloheximide의 적정농도와 배양시간이 체외성숙된 돼지난자의 활성화에 미치는 영향을 조사하고자 실험을 수행하였다. 42~44시간 동안 체외성숙된 난자는 0.1%의 hyaluronidase에서 pipetting으로 난구세포를 제거한 후, 1.2 KV/cm의 전압으로 전기자극만 하거나, 전기자극 후 cycloheximide 1, 5 및 10 μ g/ml의 농도에서 각각 3, 5 및 7시간 동안 배양하는 구로 나누어 활성화를 유도하여 다음과 같은 결과를 얻었

다.

1. 난자의 분할율 cycloheximide 10 μ g/ml 처리군이 86.8%로 1 μ g/ml 처리군의 74.4%보다 유의적($P < 0.05$)으로 높았다. 배반포기 발달율은 10 μ g/ml 처리구보다 5 μ g/ml 처리구에서 유의적($P < 0.05$)으로 높았다.
2. 전기자극 후 cycloheximide에서 배양시간의 비교에 있어서 5시간 처리한 돼지난자의 분할율(86.6%)이 3시간 동안 처리한 난자보다 유의적($P < 0.05$)으로 높게 나타났다. 상실배의 발달율은 5시간과 7시간 동안 처리구(26.7%와 16.4%)에서 3시간 처리구(14.5%)보다 유의적($P < 0.05$)으로 높은 발달율을 나타냈다.
3. 전기자극을 단독처리하거나 전기 자극 후 cycloheximide를 복합처리한 돼지난자를 8일 동안 배양하였다. 전기자극 후 cycloheximide를 복합처리한 난자의 분할율(80.1%) 및 배반포기 발달율(11.6%)은 전기자극 단독처리한 난자의 분할율(77.2%) 및 배반포기 발달율(6.6%)과는 유의적인 차이가 없었다.
4. 체외성숙된 돼지난자를 전기자극 단독 또는 전기자극 후 cycloheximide 복합처리한 후 체외 발달한 배반포기 수정란의 핵 수는 각각 18.67 \pm 5.53개와 20.71 \pm 6.16개로써 유의적인 차이가 없었다.

이상의 결과를 요약하면, 전기자극을 단독 처리 하거나 전기 자극 후 cycloheximide를 복합처리한 돼지난자 발생율은 유의적인 차이가 없었으나, 전기자극 후 cycloheximide를 복합 처리 할 경우에는 5 μ g/ml의 농도로 5시간 동안 배양하는 것이 효과적으로 돼지난자의 activation을 유지할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 인용문헌

1. Cha, S. K., Kim, N. H., Lee, S. M., Baik, C. S., Lee, H. T. and Chung, K. S. 1997. Effects of cytochalsin B and cycloheximide on the activation rate, chromosome constituent and *in vitro* development of porcine oocytes following par-

- thenogenetic stimulation. *Reprod. Fertil. Dev.*, 9:441-446.
2. Cheong, H. T., Ikeda, K., Martinez, M. A., Katagiri, M. S. and Takahashi, Y. 2000. Development of reconstituted pig embryos by nuclear transfer of cultured cumulus cells. *Reprod. Fertil. Dev.*, 12:15-20.
 3. Clark, H. J. and Masui, Y. 1983. The induction of reversible chromosome decondensation by protein synthesis inhibiting during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev. Biol.*, 97:291-301.
 4. Diana, I. N. and Prather, R. S. 1995. Differential effects of protein synthesis inhibitors on porcine oocyte activation. *Mol. Reprod. Dev.*, 41:70-75.
 5. Didion, B. A., Martin, M. J. and Market, C. L. 1990. Parthenogenetic activation of mouse and pig oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*, 33:1165-1175.
 6. Ding, J., Moor, R. M. and Foxcroft, G. R. 1992. Effects of protein synthesis on maturation, sperm penetration and pronuclear development in porcine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 40:253- 258.
 7. First, N. L., Leibfreid-Rutledge, M. L., Northey, D. L. and Nuttleman, P. R. 1992. Use of *in vitro* matured oocytes 24 hr of age in bovine nuclear transfer. *Theriogenology*, 37:211 (Abstr.).
 8. Fulka, J. Jr., Fléchon, J. E., Motlík, J., Fulka, J. and Jílek, F. 1986. Effect of cycloheximide on nuclear maturation of pig and mouse oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 77 : 281-285.
 9. Funahashi, H., Cantley, T. C., Stumpf, T. T., Terlouw, S. L. and Day, B. N. 1994. *In vitro* development of *in vitro* matured porcine oocytes following chemicals activation or *in vitro* fertilisation. *Biol. Reprod.*, 50:1072-1077.
 10. Hagen, D. R., Prather, R. S. and First, N. L. 1991. Response of porcine oocytes to electrical and chemical activation during maturation *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 28 : 70-73.
 11. Hashimoto, N. and Kishimoto, T. 1988. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation promoting factor during mouse oocytes maturation. *Dev. Biol.*, 126:242-252.
 12. Ikeda, K. and Takahashi, Y. 2001. Effects of maturational age of porcine oocytes on the induction of activation and development *in vitro* following somatic cell nuclear transfer. *J. Vet. Med. Sci.*, 63:1003-1008.
 13. Jarrel, V. L., Day, B. N. and Prather, R. S. 1991. The transition from maternal to zygotic control of development occurs during the 4-cell stage in the domestic pig *Sus scrofa* : quantitative and qualitative aspects of protein synthesis. *Biol. Reprod.*, 44:62-68.
 14. Jílek, F., Hütteleová, R., Peter, J., Holubová, M. and Rozinek, J. 2000. Activation of pig oocytes using calcium ionophore: effect of protein synthesis inhibitor cycloheximide. *Anim. Reprod. Sci.*, 63:101-111.
 15. Marcus, G. J. 1990. Activation of cumulus cells-free mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 26: 159-162.
 16. Masui, Y. 1991. The role of cytostatic factor (CSF) in the control of oocyte cell cycle-a summary of 20 years study. *Dev. Growth Differ.*, 33 : 543-551.
 17. Mattioli, M., Galeati, G., Bacci, M. L. and Barboni, B. 1991. Changes in maturation-promoting activity in the cytoplasm of pig oocytes through maturation. *Mol. Reprod. Dev.*, 30:119-125.
 18. Nussbaum D. J. and Prather, R. S. 1995. Differential effects of protein synthesis inhibitors on porcine oocyte activation. *Mol. Reprod. Dev.*, 41: 70-75.
 19. Rozinek, J., Peter, J., Grocholova, R. and Jílek,

- F. 1996. Interphase-like chromatin configuration induced by cycloheximide in maturing pig oocytes: effects of protein phosphatase inhibitors. *Int. J. Dev. Biol.* 40:1171-1366.
20. Pressicce, G. A. and Prather, R. S. 1994. Nuclear dynamics of parthenogenesis of bovine oocytes matured *in vitro* for 20 and 40 hours and activated with combined with ethanol and cycloheximide treatment. *Mol. Reprod. Dev.*, 37:61-68.
21. Siracusa, G., Whittingham, D. G., Molinaro, M. and Vivarelli, E. 1978. Parthenogenetic activation of mouse oocytes induced by inhibitors of protein synthesis. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 43: 157-166.
22. Sirard, M. A., Florman, H. M., Leibfreid-Rutledge, M. L., Barnes, F. L. and First, N. L. 1989. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, 40 : 1257-1263.
23. Watanabe, N., Vande Woude, G. F., Ikawa, Y. and Sagatta, N. 1989. Specific proteolysis of the c-mos proto-oncogene product by calpain on fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature*, 342: 505-511.
24. Wang, W. H., Abeydeera, L. R., Prather, R. S. and Day, B.N. 1998. Functional analysis of activation of porcine oocytes by spermatozoa, calcium ionophore, and electrical pulse. *Mol. Reprod. Dev.*, 51:505-511.
25. Ware, C. B., Barnes, F. L., Maiki-Laurila, M. and First, N. L. 1989. Age dependence of bovine oocyte activation. *Gamete Res.*, 22:265-275.
26. Whittingham, D. G. 1980. Parthenogenesis in mammals. *Oxford Rev. Reproductive Biol.*, 2: 205-231.
27. Yang, X., Jiang, S. and Shi, Z. 1992. Improved activation by combined cycloheximide and electrical pulse treatment of bovine follicular oocytes matured *in vitro* for 23~24 hours. *Biol. Reprod.*, (Suppl) 46:117.
28. Yang, X., Pressicce, G. A., Morghan, L., Jiang, S. E. and Foote, R. H. 1994. Synergistic effect of ethanol and cycloheximide on activation of freshly matured bovine oocytes. *Theriogenology*, 41:395-403.
- (접수일자: 2002. 1. 21. / 채택일자: 2002. 2. 18.)