

## 소, 돼지, 생쥐, 사람의 체세포와 소 난자를 이용한 이종간 핵 이식

박세영 · 김은영 · 이영재 · 윤지연 · 길광수 · 김선균 · 이창현 · 정길생<sup>1</sup> · 박세필<sup>†</sup> · 임진호<sup>2</sup>

마리아 기초의학연구소/마리아 생명공학연구소

## Interspecies Nuclear Transfer using Bovine Oocytes Cytoplasm and Somatic Cell Nuclei from Bovine, Porcine, Mouse and Human

Park, S. Y., E. Y. Kim, Y. J. Lee, J. Y. Yoon, K. S. Kil, S. G. Kim, C. H. Lee,  
K. S. Chung<sup>1</sup>, S. P. Park<sup>†</sup> and J. H. Lim<sup>2</sup>

Maria Infertility Medical Institute/Mariabiotech

### ABSTRACT

This study was designed to examine the ability of the bovine (MII) oocytes cytoplasm to support several mitotic cell cycles under the direction of differentiated somatic cell nuclei of bovine, porcine, mouse and human. Bovine GV oocytes were matured in TCM-199 supplemented with 10% FBS. At 20 h after IVM, recipient oocytes were stained with 5  $\mu$ g/ml Hoechst and their 1st polar body (PB) and MII plate were removed by enucleation micropipette under UV filter. Ear skin samples were obtained by biopsy from an adult bovine, porcine, mouse and human and cultured in 10% FBS added DMEM. Individual fibroblast was analysed chromosome number to confirm the specificity of species. Nuclear transferred (NT) units were produced by electrofusion of enucleated bovine oocytes with individual fibroblast. The reconstructed embryos were activated in 5  $\mu$ M ionomycin for 5 min followed by 1.9 mM 6-dimethylaminopurine (DMAP) in CR1aa for 3 h. And cleaved NT embryos were cultured in CR1aa medium containing 10% FBS on monolayer of bovine cumulus cell for 8 days. Also NT embryo of 4~8 cell stage was analysed chromosome number to confirm the origin of nuclear transferred somatic cell. The rates of fusion between bovine recipient oocytes and bovine, porcine, mouse and human somatic cells were 70.2%, 70.2%, 72.4% and 63.0%, respectively. Also, their cleavage rates were 60.6%, 63.7%, 54.1% and 62.7%, respectively, there were no differences among them. *in vitro* development rates into morula and blastocyst were 17.5% and 4.3% in NT embryos from bovine and human fibroblasts, respectively. But NT embryos from porcine and mouse fibroblasts were blocked at 16~32-cell stage. The chromosome number in NT embryos from individual fibroblast was the same as chromosome number of individual species. These results show that bovine MII oocytes cytoplasm has the ability to support several mitotic cell cycles directed by newly introduced nuclear DNA.

(Key words: Interspecies nuclear transfer, Bovine oocytes, Cytoplasm, Somatic cell, Chromosome number)

<sup>†</sup> Corresponding author : Maria Infertility Medical Institute/Mariabiotech, Seoul 130-110, Korea, Tel: 02-924-8757  
Fax: 02-924-9083, E-mail: spark@mariababy.com

<sup>1</sup> 건국대학교 축산대학 (College of Animal Husbandry, Konkuk University)

<sup>2</sup> 마리아 병원 (Maria Hospital, Seoul 130-110, Korea)

## I. 서 론

양서류에서 시작되어 이어진 포유류에서의 핵 이식 (nuclear transfer) 기술의 발달은 핵 이식 후의 난자의 분화과정과 그 가역성에 관한 기초적인 의문제기에 해답을 주었다 (Briggs과 King, 1952; McKinnell, 1962; McGrath과 Solter, 1983; Willadson, 1986). 다양한 상태의 핵은 제핵 난자에 이식 후 재구축 (reprogramming) 되며, 새로운 발달이 가능하다. 지금까지 수정란 분할구 (Willadson, 1986; Prather 등, 1987; Stice와 Robl, 1988; Prather, 1989; Cheong 등, 1993; Meng 등, 1997), 내부세포괴 (Keefer 등, 1994), 배아세포 (Sims와 First, 1994; Campbell, 1996), 배아세포주 (Wells 등, 1993), 원시생식세포 (Robertson, 1997), 태아섬유아세포 (Schnieke 등, 1997; Wilmut 등, 1997; Cibelli 등, 1998), 그리고 체세포 (Wilmut 등, 1997; Wakayama 등, 1998)를 사용하여 핵이식으로 생산된 복제란으로부터 산자들이 태어났다. 그러나 핵 이식은 그 동안의 많은 성과에도 불구하고 효율성이 낮으며, 핵이식란을 이식하여 태어난 산자의 생존율은 종에 상관없이 3%를 넘지 못한다고 보고되고 있다 (Wilmut 등, 1997; Wakayama 등, 1998).

수핵난자와 공여세포핵간의 적절한 세포주기가 이해될 때 핵이식으로 새롭게 만들어진 접합체 (zygote)의 활성화를 위한 새로운 기술을 향상시킬 수 있다 (Dominko 등, 1999; Wakayama 등, 1998). 핵이식의 많은 문제점 중의 하나는 수핵 난자 세포질을 효과적으로 이용하지 못하는 것이다. 이와 같은 수핵 난자의 성숙에 대한 불완전한 이해, 이용의 제한, 고비용 등은 수핵난자로 공통으로 사용될 수 있는 세포질 (common cytoplasm) 을 사용할 수 있다면 극복될 수 있다 (Dominko 등, 1999). 핵 이식 과정 중에 수핵 난자와 주입된 공여 핵간 상호작용의 연구를 위한 이러한 수핵난자의 common model의 발달은 핵이식 연구를 진행하는데 있어서 많은 도움이 될 것이다.

본 연구는 몇몇 포유류로부터 얻은 공여세포핵의 발생능을 돕기 위한 수핵난자로 소 난자의 세

포질을 사용하였으며, 공통 세포질로써의 능력을 시험하였다. 소 난자와 소, 사람, 돼지, 생쥐의 체세포와의 결합에서 유래한 각 종별 핵이식란의 융합율, 분할율, 배발달률 그리고 염색체 수를 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 소 난자의 회수

본 실험에 공시될 소 난자는, 도축장에서 채취한 난소를 2~4시간 이내에 32~37°C로 유지하여 실험실로 운반한 뒤 직경이 2~6 mm의 난포로부터 채취하여 사용하였다. 실체 현미경하에서 획득된 미성숙 난자는 난구세포가 균일하고 세포질이 균질한 난자만을 선별하였고 TL-HEPES로 세척하여 10% FBS가 첨가된 TCM-199 (Gibco, USA)에 0.2 mM sodium pyruvate, 1 µg/ml FSH, 1 µg/ml estradiol - 17β와 125 µg/ml gentamycin을 첨가하여 5% CO<sub>2</sub>, 39°C 조건하에서 20시간 체외배양하여 성숙을 유도하였다.

### 2. 귀세포의 분리, 배양 및 보존

종간 핵이식에 사용될 소, 사람, 돼지, 생쥐 귀의 체세포는 각종의 피부조직을 일부 회수한 다음 세척하여 0.1% collagenase로 1시간 처리한 뒤 200 µg로 원심분리하고 상층액을 제거한 후 세포를 얻었다. 회수된 귀세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM 3 ml에 재 부유시켜 25T 조직 배양 용기에 넣어 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건하에서 배양하였다. 세포는 3세대 배양한 후 10% DMSO와 15% FBS를 함유한 DMEM용액에 부유시켜 vial에 넣어 -70°C 냉동고에서 동결한 후, LN<sub>2</sub> 용기 내에 보관하였다. 실험에 공시할 때에는 용해하여 2번 세대 후부터 사용하였고 최대 10세대까지의 배양된 체세포를 이용하였다. 핵 이식에는 0.5% FBS를 함유한 DMEM 배양액에서 5일 정도 휴면처리한 세포를 사용하였다.

### 3. 미수정란의 탈핵

공통 세포질을 제공할 소 수핵 난자는 0.1% hyaluronidase가 첨가된 TL-HEPES 배양액에서 난

구세포를 제거한 뒤 제 1극체가 방출된 난자만을 선별하여 사용하였다. 탈핵할 난자는 0.5  $\mu\text{g/ml}$  Hoechst 33342 (Sigma, St. Louis, MO)와 7.5  $\mu\text{g/ml}$  cytochalasin B가 첨가된 TCM-HEPES용액에서 15분간 염색한 뒤 형광현미경하에서 제 1극체와 핵을 제거하였다. 핵이 제거된 난자는 핵이식 전까지 1시간정도 회복기간을 주었다.

#### 4. 핵이식

핵이식에 사용될 공여 체세포는 0.25% trypsin - EDTA 용액으로 처리하여 단일세포로 분리한 후 10% FBS가 첨가된 HBSS로 2회 세척하였고 0.5% FBS가 첨가된 D-PBS에서 다시 세척한 후 사용하였다. 처리된 체세포는 직경이 10~15  $\mu\text{m}$ 인 것으로 선택하여 핵이 제거된 소 난자에 주입하였다. 체세포가 주입된 난자는 1mm 전기융합접시에서 0.3 M mannitol용액을 사용하여 BTX세포융합장치로 1.5 kV/cm의 직류 (DC)로 30  $\mu\text{sec}$ 로 2회 통전하였다. 이 때 주입된 체세포와 탈핵난자 세포질의 접촉면은 양전극에 평행이 되도록 하였다. 융합여부는 전기자극 30분 후에 관찰하였다. 융합된 핵이식란은 5  $\mu\text{M}$  ionomycin에서 5분 노출시키고, 이어서 2.0 mM 6-dimethylaminopurine (DMAP) 에서 3시간 배양하여 활성화율을 유도하였다.

#### 5. 핵이식란의 체외배양

핵 이식 후 활성화 처리된 난자는 주입된 체세포

포의 중에 상관없이 3mg/ml fatty acid-free BSA 가 들어있는 CR1aa용액에 옮겨 배양하였다. 배양 24시간 째 분열된 분할구가 보이는 난자는 10% FBS가 들어있는 CR1aa용액에서 소 난구 세포와 공배양하였고, 39 $^{\circ}\text{C}$  배양기에서 5~7일간 배양하여 배반포 형성을 관찰하였다.

#### 6. 염색체 분석

염색체 분석에 공시된 각종의 체세포와 핵이식란(4~8 세포기, 핵 이식후 30~36시간째)은 colcemid로 1시간 처리 후 저장성 용액 (0.075 M KCl)에서 15분간 노출된 뒤 3:1 methanol-acetic acid로 고정하였다. 고정 후에 slide glass에 도말하고 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간동안 aging시킨 후 gimsa 염색하여 관찰하였다.

#### 7. 통계처리

중간 핵이식 후의 발달율에 대한 결과는 SAS program을 이용하여 분석하였으며, 처리간 유의성은 Duncan's multiple range test를 이용하여 검정하였다.

### III. 결 과

#### 1. 이종간 핵이식란의 발달

소, 돼지, 생쥐, 사람 각각의 체세포를 이용한 핵이식란의 융합율은 Table 1에서 보는 바와 같이

**Table 1. *In vitro* development of intra- and interspecies nuclear transfer embryos produced in bovine cytoplasm**

Donor cell species	No (%) of				
	NT embryos	Fusion (%)	Cleaved (%)	>16cell on day 3	M & Bla* on day 7
Bovine	94	66 (70.2)	40 (60.6)	11 (27.5) <sup>ab</sup>	7 (17.5) <sup>a</sup>
Porcine	259	182 (70.2)	116 (63.7)	15 ( 8.2) <sup>ab</sup>	NA**
Mouse	268	194 (72.4)	105 (54.1)	15 ( 7.7) <sup>b</sup>	NA**
Human	119	75 (63.0)	47 (62.7)	16 (34.0) <sup>a</sup>	2 ( 4.3) <sup>b</sup>

\* Morula and blastocyst.

\*\* Not available.

<sup>ab</sup> Different superscripts within the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ).

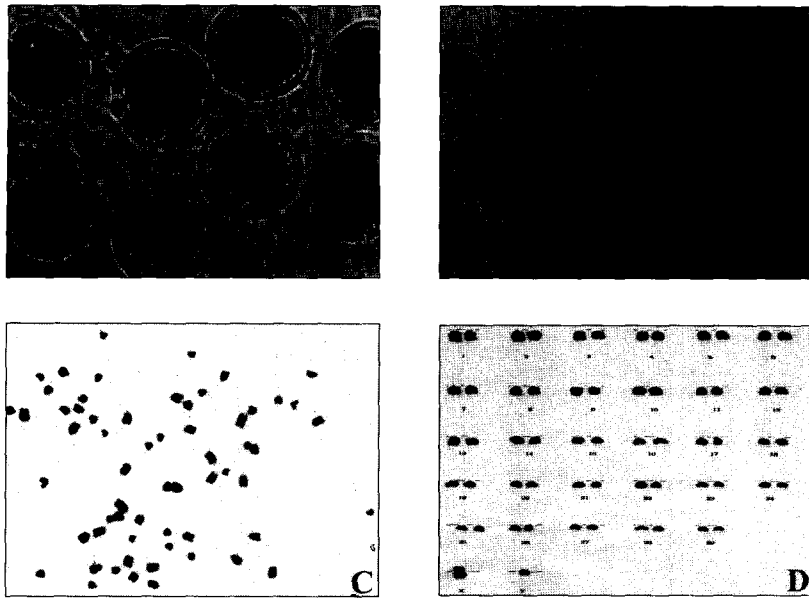


Fig. 1. *In vitro* development of bovine oocytes after nuclear transfer of bovine somatic cells. A: 4~8 cell embryos recovered at 48 h after activation ( $\times 200$ ). B: Hatched blastocyst at 7~8 days after activation ( $\times 200$ ). C: Metaphase spread from bovine ear cell (n=60) ( $\times 1000$ ). D: Karyotype (60, XX) of 4~8 cell NT embryo using bovine somatic cells ( $\times 1000$ ).

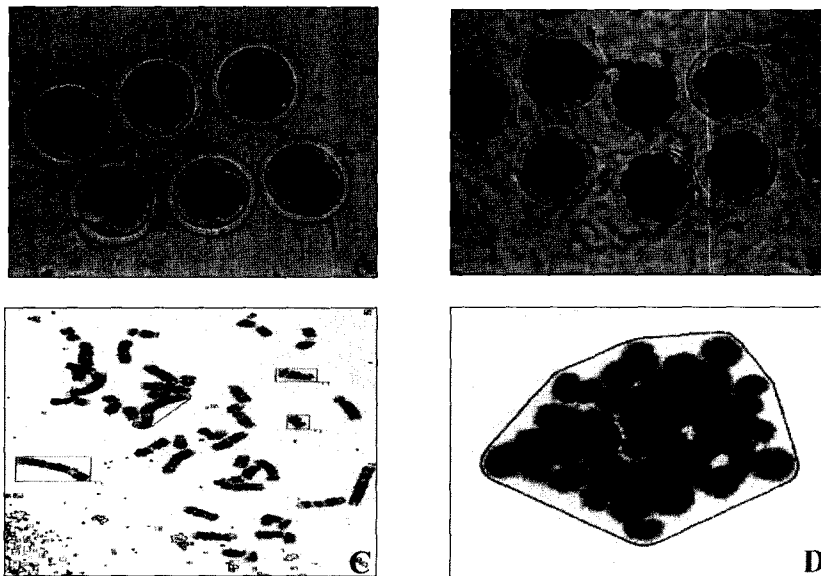
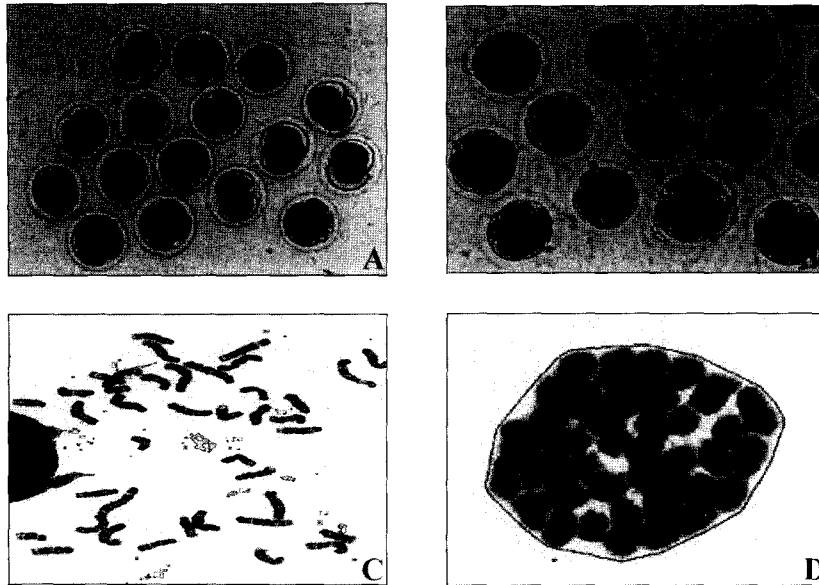


Fig. 2. Bovine oocytes supports development of embryos produced by NT of somatic cell nuclei from porcine. A: 2 cell at 24 h after activation ( $\times 200$ ). B: 8~16 cell at 48 h after activation ( $\times 200$ ). C: Metaphase spread from donor cell (porcine ear cell, n=38) ( $\times 1000$ ). D: Metaphase spread from 4~8 cell NT embryo using porcine somatic cells (n=38) ( $\times 1000$ ).



**Fig. 3. Bovine oocytes supports development of embryos produced by NT of somatic cell nuclei from mouse. A: 2 cell at 24 h after activation ( $\times 200$ ). B: 8~16 cell at 48 h after activation ( $\times 200$ ). C: Metaphase spread from mouse ear cell ( $n=40$ ) ( $\times 1000$ ). D: Metaphase spread from 4~8 cell NT embryo using mouse somatic cells ( $n=40$ ) ( $\times 1000$ ).**

70.2% 70.2% 72.4%와 63.0%로 유의차가 없었으며, 체외분할 ( $\geq 2$ cell cleavage)을 또한 60.6%, 63.7%, 54.1%와 62.7%로 유의차가 없었다. 각 종별로 체외분할이 일어난 시기를 조사한 결과 종에 관계없이 대체로 활성화 처리 후 24시간째에 대부분 일어나는 것을 볼 수 있었다. 그러나 돼지, 생쥐, 사람의 경우 16세포기까지는 소와 비교하였을 때 약간 빠르게 발달하였는데 점차적으로 분할이 계속 이루어지면서 발달시기가 종 특이적인 특성을 나타내는 것을 볼 수 있었다. 16세포기까지의 소, 돼지, 생쥐, 사람 각각의 체세포를 이용한 핵이식란의 발달률은 27.5%, 8.2%, 7.7%와 34.0%를 나타내었다 (Table 1). 이종간 핵이식의 후기 배발달 (상실배와 배반포) 률을 살펴보면 소와 사람의 체세포를 사용했을 경우 17.5%, 4.3%의 결과를 나타내었으며, 돼지와 생쥐의 체세포를 사용한 경우 16세포기 이후 단계에 발달중지 현상을 볼 수 있었다. 또한 각 종으로부터 얻은 핵이식란이 정상적인 발달이 이루어지고 있는지 확인하기 위하여 발달

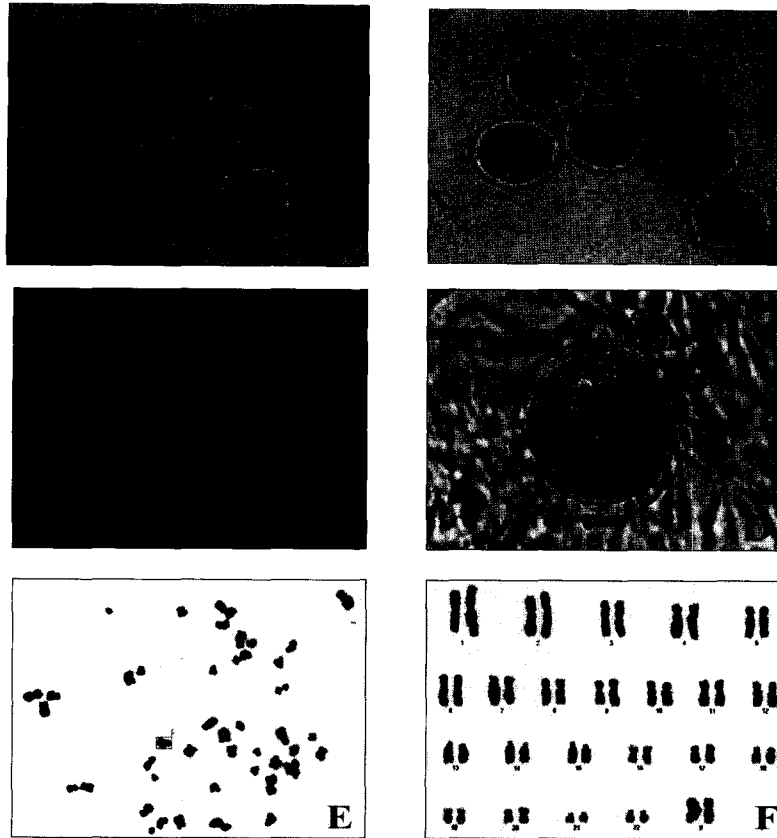
중인 난자를 hoechst로 염색하여 각 할구의 DNA유무를 확인하였는데 Fig. 4C에서 처럼 사람뿐만 아니라 다른 종에서도 정상임을 확인하였다.

## 2. 염색체 분석

공여핵으로 사용하였던 소, 돼지, 생쥐, 사람 각각의 체세포는 이미 염색체분석을 통하여 이미 그 수가 60, 38, 40, 46개로 정상임을 확인 (Fig. 1C, 2C, 3C, 4E) 한 후에 실험에 공여하였다. 또한 4~8 세포기 정도의 각 종별 핵이식란 분할구를 분석에 사용하였을 때, 공여핵으로 사용된 종의 염색체 수와 일치하는 결과를 볼 수 있었다 (Fig. 1D, 2D, 3D, 4F).

## IV. 고 찰

본 연구는 소 난자가 이종간 핵치환에 있어서 공여핵으로 이용될 수 있음을 나타낸다. 비록 일부의 종에서는 16세포기 이후단계에서 발달 중지현



**Fig. 4.** Bovine oocytes supports development of embryos produced by NT of somatic cell nuclei from human. A: 2 cell at 24 h after activation ( $\times 200$ ). B: 8 cell at 40 h after activation ( $\times 200$ ). C: Hoechst stained 16 cell embryo ( $\times 1000$ ). D: Hatching blastocyst recovered at 6~7 days after activation ( $\times 1000$ ). E: Metaphase spread from human ear cell ( $n=46$ ) ( $\times 1000$ ). F: Karyotype of 4~8 cell NT embryo using human somatic cells (46,XX) ( $\times 1000$ ).

상을 나타내지만 배반포기배로의 발달 가능성을 나타내었고, 사람의 체세포를 이용한 경우 4.3%의 배반포 형성을 얻을 수 있었다. 본 연구에서의 융합율과 분할율은 실험에 사용된 공여핵간에 유의적 차이가 없었다. 이러한 결과는 동종간의 핵이식에 있어서의 융합율이 이종간 핵이식 융합율보다 더 낮은 결과를 나타낸 Dominko (1999) 등의 결과와는 일치하지 않았다. 효과적인 융합은 건강한 세포막뿐만 아니라 수핵난자의 원형질막과 공여핵의 원형질막간의 접촉하는 정도에 좌우된다고 한다. 덧붙여 난자와 접촉하는 핵의 세포막의 비율은 적절한 전기충격의 강도와 시간에 의해서 결정된다

고 한다. 그럼에도 불구하고 융합된 핵이식란들은 16 세포기 정도까지만 높은 비율로 분할하는 것을 볼 수 있다. 정상적인 수정란에서의 배발생 초기에서는 난자의 세포질에 저장되어 있는 모계유전물질에 의해 조절된다. 그러나 발달이 진행될수록 종특이적 발달단계의 배성유전자활성 (embryonic genome activation)에 의존하게 된다 (Telford, 1990). 이것은 rat의 경우 2~4세포기, 소와 돼지의 경우 늦은 4세포기, 양에 있어서 8세포기에 그리고 사람은 4~8세포기에 일어난다고 알려져 있다. 이러한 변환 (transition)시기를 나타내는 형태적 특징은 체외배양 중의 발달중지현상으로 나타난다고 한다

(Crosby 등, 1988). 하여간에 본 연구에서는 돼지, 생쥐와 사람의 체세포를 핵이식에 이용하였을 때, 16세포기까지의 발달을 얻을 수 있었고 이러한 결과는 Dominko (1999)의 결과와도 유사하다. 특히, 사람의 경우 16세포기 이후 단계인 배반포기배까지 발달한 (4.3%) 본 실험의 결과는 Dominko (1999)의 실험에서 전체적으로 높은 발달율을 보이는 cynomolgus monkey의 경향과 미루어볼 때 유사하여, 좀 더 구체적인 연구가 요구되지만 소 난자가 사람 체세포핵의 수핵란으로서 이용 가능함을 나타낸다고 볼 수 있다.

공여핵의 종에 상관없이 핵이식배는 CR1aa에서 배양하였고, 분할율의 경우 높은 비율을 나타내었다. 본 실험에서는 분할시기가 종에 관계없이 24시간 정도로 일정한 것으로 나타내었는데 이는 Dominko 등 (1999)의 결과와 일치하는 것을 보였다. 하지만 발달이 진행될수록 종 특이적 성향을 나타내어 돼지, 생쥐, 사람의 경우 16세포기까지는 소와 비교하였을 때 약간 빠르게 발달하는 것을 볼 수 있었던 점도 Dominko 등 (1999)의 결과와 일치하였다. 그러나 발달이 진행될수록 소가 아닌 다른 종의 체세포핵을 사용하는 경우 16세포기 이후단계에서는 발달의 저해 현상이 나타나 배반포기배의 형성이 미약하여, 이종간 핵 치환에 있어서는 종특이적 배양환경에 대한 연구가 필요하다는 것을 알 수 있었다. 본 연구 과정 중 발달중지현상을 극복하기 위하여 소 난관상피세포와의 공배양을 비롯한 여러 가지 공배양을 실시하였다. 돼지, 생쥐, 사람의 자궁상피세포와 각종의 핵이식란을 공배양하였으나 기존의 난구세포와의 배양보다 좋은 결과를 나타내지는 못하였다 (미제시). 또한 배양액 내에 항산화제와 glucose 첨가를 각각 실시하였으나 공배양과 마찬가지로 별다른 차이를 볼 수 없었다 (미제시). 이와 같이 이종간 핵이식란의 발달중지현상을 극복하기 위해서는 더욱 많은 연구가 필요할 것 같다.

특히 본 실험에서는 Fig. 1부터 4에서 제시한 바와 같이 핵이식 전단계에서, 체세포의 염색체를 조사하여 비정상 유무를 확인하였을 때, 각종이 보유하는 정상 염색체 수를 보유함을 확인하였고, 또한

체세포 핵이식 후 30~36시간 쯤 얻어진 4~8세포기배의 염색체분석 결과 공여핵의 종과 일치하는 염색체 수를 나타내어 소난자를 수핵란으로 이용하여도 우리가 원하는 종의 핵이식란을 얻을 수 있다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Dominko 등 (1999)의 실험에서는 제시하지 못한 것으로 이종간 핵치환 시 반드시 조사되어야 할 중요한 자료로서 그 의의가 있다.

본 연구의 결과를 종합해 볼 때 성숙한 소 난자의 세포질은 소뿐만 아니라 돼지, 생쥐, 사람과 같은 다양한 포유류의 핵을 사용하여 핵이식을 하였을 때에도 발달이 가능하다는 것을 보여주고 있다. 이러한 연구의 더 나은 성과는 나아가서 이종간 배아 줄기세포기술이나 배아 세포주 확립에 도움을 줄 것으로 본다.

## V. 요약

본 연구는 몇몇 포유류로부터 얻은 공여세포핵의 proliferation을 돕기 위한 수핵란자로 소 난자의 세포질을 사용하였으며, 공통 세포질로써의 능력을 시험하였다. 소 난자와 소, 사람, 돼지, 생쥐의 체세포와의 결합에서 유래한 각 종별 핵이식란의 융합율, 분할율, 배발달률 그리고 염색체 수를 조사하였다.

1. 소, 돼지, 생쥐, 사람 각각의 체세포를 이용한 핵이식란의 융합율은 70.2%, 70.2%, 72.4%와 63.0%로 유의차를 보이지 않았다.
2. 소, 돼지, 생쥐, 사람 각각의 체세포를 이용한 핵이식란의 체외분할 ( $\geq 2$ cell cleavage)을 또한 60.6%, 63.7%, 54.1%와 62.7%로 유의차가 없었다.
3. 각 종별로 체외분할이 일어난 시기를 조사한 결과 종에 관계없이 대체로 활성화 처리 후 24시간 쯤에 대부분 일어나는 것을 볼 수 있었다. 그러나 점차적으로 분할이 계속 이루어지면서 발달시기가 종 특이적인 특성을 나타내는 것을 볼 수 있었다.
4. 이종간 핵이식의 후기 배발달 (상실배와 배반포) 률을 살펴보면 소와 사람의 체세포를 사용

했을 경우 17.5%, 4.3%의 결과를 나타내었으며, 돼지와 생쥐의 체세포를 사용한 경우 16세포기 이후 단계에 발달중지 현상을 볼 수 있었다.

5. 4~8 세포기 정도의 각 종별 핵이식란 할구를 분석에 사용하였을 때, 공여핵으로 사용된 종의 염색체 수와 일치하는 결과를 볼 수 있었다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 성숙한 소 난자의 세포질은 소뿐만 아니라 돼지, 생쥐, 사람과 같은 다양한 포유류의 핵을 사용하여 핵이식을 하였을 때에도 발달이 가능하다는 것을 보여주고 있다.

## VI. 인용문헌

1. Briggs, R. and King, T. J. 1952. Transplantation of living cell nuclei from blastula cells into enucleated frog's eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 38:455-463.
2. Campbell, K. H. S., McWhir, J. and Ritchie, W. A. 1996. Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 380:64-66.
3. Cheong, H., 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.
4. Crosby, I. M., Gandolfi, F. and Moor, R. M. 1988. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 82:769-775.
5. Cibelli, J. B., Stice, S. L., Golueke, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C., Poncede Leon, A. and Robl, J. M. 1998. Cloned transgene calves produced from non quiescent fetal fibroblasts. *Science*, 280:1256-1258.
6. Dominko, T., Mitalipova, M., Haley, B., Beyhan, Z., Memili, E., McKusick, B. and First, N. L. 1999. Bovine oocytes cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biol. Reprod.*, 60:1496-1502.
7. Keefer, C. L., Stice, S. L. and Matthews, D. L. 1994. Bovine inner cell mass as donor nuclei in the production of nuclear transfer embryos and calves. *Biol. Reprod.*, 50:935-939.
8. Mccarthy, J. and Solter, D. 1983. Nuclear transplantation in mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science*, 220:1300-1302.
9. McGrath, J. and Solter, D. 1983. Nuclear transplantation in mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science*, 1983. 220:1300-1302.
10. McKinnell, R. G. 1962. Intraspecific nuclear transplantation in frogs. *J. Hered.*, 53:100-207.
11. Prather, R. S., Barns, F. L., Sims, M. M., Robl, J. M., Eyestone, W. H. and First, N. L. 1987. Nuclear transplantation in bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.*, 37:859-866.
12. Prather, R. S., Sims, M. M. and First, N. L. 1989. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol. Reprod.*, 41:414-418.
13. Robertson, D. 1997. "Gene," another landmark in farmyard cloning. *Nat. Biotechnol.*, 1997. 15:833.
14. Schnieke, A. E., Kind, A. J., Ritchie, W. A., Mycock, K., Scott, A. R., Ritchie, M., Wilmut, I. Colman, A. and Campbell, K. H. S. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 278:2130-2133.
15. Sims, M. M. and First, N. L. 1994. Production of fetuses from totipotent cultured bovine inner cell mass cells. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 60:6143-6147.
16. Stice, S. L. and Robl, J. M. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplantation in rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 39:657-664.
17. Telford, N. A., Watson, A. J. and Schultz, G. A. 1990. Transition from the maternal to



- embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol. Reprod. Dev.*, 26:90-100.
18. Wakayama, T., Perry, A. C. F., Zuccotti, M., Johnson, K. R. and Yanagimachi, R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394:369-374.
19. 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.
20. Willadson, S. M. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, 320:63-65.
21. 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.
- (접수일자: 2002. 5. 18. / 채택일자: 2002. 7. 29.)