

소 체세포 핵이식기술의 효율 증진에 관한 연구

양윤희 · 최종엽 · 이상영¹ · 박춘근 · 양부근 · 김정익 · 정희태[†]

강원대학교 동물자원과학대학

Study on the Improvement of Bovine Somatic Cell Nuclear Transfer Technique

Yang, Y. H., J. Y. Choi, S. Y. Lee¹, C. K. Park, B. K. Yang, C. I. Kim and H. T. Cheong[†]

College of Animal Resource Science, Kangwon National University

ABSTRACT

This study was conducted to examine the effects of oocyte maturation period, phytohemagglutinin-P (PHA-P) treatment and activation agent on the enucleation, fusion, activation or *in vitro* development of bovine nuclear transfer embryos. Bovine oocytes were enucleated at 16~24 h of *in vitro* maturation (IVM). Adult ear skin cells treated or non-treated with PHA-P were transferred into enucleated oocytes. Reconstituted oocytes treated or non-treated with PHA-P were fused by a pulse of 1.5 kV/cm for 30 μ sec. Fused oocytes were activated with a combination of calcium ionophore (A23187) and cycloheximide (CHXM) or dimethylaminopurine (DMAP), and cultured *in vitro* for 7~9 days. Enucleation rate was significantly increased when oocytes were matured for 16~18 h (70.2~92.3%, $P<0.05$) compared to that of oocytes were matured for 20~24 h (44.3~53.4%). The location of metaphase-II plate was far off from the 1st polar body as maturation time was increased. PHA-P treatment of donor cells or reconstituted oocytes significantly improved fusion rate ($P<0.05$). Cleavage and blastocyst formation rates were significantly increased after activation with a combination of A23187 and DMAP (78.6% and 32.9%, respectively) compared to those of embryos activated with a combination of A23187 and CHXM (48.5 and 15.2%, respectively). From the present result, it is suggested that high enucleation efficiency can be obtained by using oocytes matured for 18 h. It also shows that PHA-P treatment can improve the fusion rate, and activation with a combination of A23187 and DMAP can enhance the embryo development.

(Key words : Nuclear transfer, Efficiency, *In vitro* development, Bovine somatic cells)

I. 서 론

체세포 핵이식 기술의 효율에 영향을 주는 탈

핵, 융합, 활성화와 같은 기술적인 요인들은 가장 근본적인 요인으로 인식되면서도 여전히 개선해야 할 부분이 남아 있다. 탈핵 효율을 개선하고자 하

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

¹ 경상남도 첨단양돈연구소 생명공학과

[†] Corresponding author: Dept. of Veterinary Medicine, College of Animal Resource Science, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Korea. E-mail: htcheong@kangwon.ac.kr

는 연구(Critser 등, 1986; Westhusin 등, 1992; Smith 등, 1993; Mohamed 등, 1999; Dominko 등, 2000; Liu 등, 2000, Yin 등, 2002)가 다양하게 시도되었으나, 현재로서는 UV 하에서 핵의 위치를 확인하면서 탈핵을 실시하는 방법(Critser 등, 1986; Westhusin 등, 1992; Smith 등, 1993; Dominko 등, 2000)이 높은 탈핵 효율을 얻을 수 있는 유일한 방법이라 해도 과언이 아니다. 그러나, 이 방법은 난자에 치명적인 영향을 주어, 핵이식란의 발육저하를 가져올 수 있다는 단점이 있으므로, 제1극체를 기준으로 하여 주변의 세포질을 소량 흡입 제거하는 기존의 탈핵법을 개선하여 사용하는 것이 효과적일 수 있다.

체세포는 분할구 이식과 달리 donor 세포의 크기가 작아 전기융합 시 어려움이 따르므로 체세포 핵이식의 융합율을 높이기 위한 방법의 개선이 필요하다. Keefer 등(1994)과 Wells 등(1997)은 식물성 혈구 응집소인 PHA-P (Phytohemagglutinin-P)를 이용하거나, 재구축배의 dehydration/rehydration법을 이용하여 donor 세포와 수핵란 세포질간의 접촉을 용이하게 하는 방법을 시도하기도 하였다. 반면에 체세포 핵을 수핵란의 세포질에 직접 주입하는 방법(Wakayama 등, 1998; Ogura 등, 2000)으로 낮은 융합율을 극복할 수 있으나, 융합 방법에 비해 조작이 어렵다는 단점이 있다. 일반적으로 많은 연구에서 전기융합방법이 사용되고 있다는 점을 고려할 때 세포간 접촉을 유도하는 방법 등 융합율을 높이기 위한 방안이 고안되어야 한다.

수핵란의 활성화는 전기자극이나 ethanol, calcium ionophore (A23187), ionomycin과 같은 화학적인 처리로 세포질 내 calcium 농도를 증가시켜 MPF (maturation promoting factor)의 활성을 감소시키고, 단백질합성 억제제인 cycloheximide (CHXM) (Presicce와 Yang, 1994, Liu 등, 1998b)나 protein serine/threonine kinase (또는 인산화) 억제제인 6-dimethylaminopurine (DMAP)을 병용 처리하는 방법(Susko-Parrish 등, 1994)이 고안되었다. 그러나 CHXM과 DMAP의 작용 기작의 차이가 핵이식란의 활성화와 배 발달에 미치는 영향에 대해서는 명확하게 밝혀진 것이 없다.

본 연구에서는 수핵란의 체외성숙시간에 따른 탈핵 효율, PHA-P처리에 의한 전기융합 효율 및 핵이식란의 활성화 방법을 검토함으로써 소 체세포 핵이식의 효율성을 개선하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난포란의 채취 및 성숙배양

도축장에서 회수된 난소의 난포로부터 미성숙 난자를 채취하여 난구세포가 균일하고 세포질이 균질한 것만을 선별하여 16~24시간 성숙배양하였다. 난포란의 성숙배양액은 TCM-199액 (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)에 10% FBS (Gibco-BRL), 0.2 mM Na-pyruvate, 0.02 U/ml FSH (Sigma, St. Louis, MO, USA), 1 μ g/ml 17 β -estradiol (Sigma) 및 50 μ g/ml gentamicin (Gibco-BRL)을 첨가한 것을 사용하였다.

2. 체세포의 준비

한우 암소의 귀 피부조직으로부터 체세포를 회수하여 10% FBS, 0.2 mM Na-pyruvate 및 50 μ g/ml gentamicin이 함유된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco-BRL)액 내에서 배양하여 4~6회 passage 후 동결보존하였다가 핵이식에 사용하였다. 용해된 세포는 핵이식 전에 4-well dish에서 약 1주일간 배양하여 높은 세포밀도 (confluence 상태)를 만들어 줌으로서 G0/G1기에 동조를 유도하였다.

3. 미수정란의 탈핵

모든 미세조작은 실온에서 Nomarski optic과 Narishige 미세조작기가 갖춰진 도립현미경을 이용하여 cytochalasin B (CB)를 함유한 TCM-199 + 3 mg/ml BSA의 배양소적 내에서 실시하였다. 체외에서 16~24시간 체외 성숙시킨 난포란의 난구세포를 제거한 후, 세포질의 색조가 균일하고 제 1극체가 확인된 난자만을 선별하여 제 1극체와 주변의 세포질을 약 1/3정도 흡입하여 metaphase-II(M-II)기 염색체를 제거하는 방법으로 탈핵을 실시하였다. 탈핵 조작된 세포질은 1 μ g/ml의 Hoechst 33342

(Sigma)를 함유한 TCM-199액에 15분간 염색 (Westhusin 등, 1992)하여 형광현미경으로 탈핵 여부를 검사하였다.

4. 핵이식, 전기융합 및 활성화

핵이식 조작은 Campbell 등(1996)의 방법에 준하여 실시하였다. 핵이식 전 일부 donor 세포 또는 융합 전 재구축배는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA-P (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)가 함유된 TCM-199 + 3 mg/ml BSA 배양액 내에서 15분간 배양한 후 이식하거나 전기융합에 공시하였다. 재구축배는 0.1 mM MgSO_4 , 0.05 mM CaCl_2 , 0.05 mg/ml BSA를 첨가한 0.3 M mannitol 용액을 넣은 wire chamber (0.5-mm 폭)에서 1.5 kV/cm의 직류 (DC) 전류를 BTX 200 세포융합장치 (BTX, San Diego, CA, USA)를 이용하여 30 μsec 간 1회 통전하여 융합을 유지하였다. 융합 후 1시간에 융합이 확인된 핵이식란은 10 μM 의 A23187 (Sigma)로 5분간 처리 후 즉시 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 CHXM (Sigma), 또는 2 mM의 DMAP (Sigma)을 함유한 체외배양액의 drop 내로 옮겨 4~5시간 동안 배양하여 활성화를 유지시켰다.

5. 핵이식란의 체외배양

활성화처리 후 핵이식란은 3 mg/ml BSA가 함유된 CR1aa 배양액의 50 μl drop으로 옮겨 5% CO_2 및 39°C의 조건 하에서 48시간 배양하면서 극체 방출 유무 및 분할율을 검사하였다. 분할된 핵이식란은 10% FBS를 함유한 CR1aa 내로 옮겨 5~7일간 추가 배양하여 배반포 형성율을 검사하였다.

6. 실험설계

실험 1) 성숙시간이 탈핵율에 미치는 영향을 검토하기 위해 미성숙란을 16, 18, 20, 22 및 24시간 성숙 후 탈핵을 실시하였다. 또한 동일한 시간에 성숙난자를 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Hoechst 33342로 15분간 염색하여 염색체의 위치를 확인하였다.

실험 2) 융합 전 PHA-P 전처리 유무 및 처리방법이 융합율에 미치는 영향을 검토하기 위해 donor 세포 처리구와 재구축란 처리구 및 무처리구

로 나누어, 각 처리구간 융합율 및 체외 발육율을 검토하였다.

실험 3) CHXM 과 6-DMAP 처리가 재구축란의 활성화와 체외발육율에 미치는 영향을 검토하였다.

7. 통계처리

실험의 결과는 Duncan 다중검정에 의해 유의성을 검정하였다.

III. 결 과

1. 난자의 성숙 시간이 탈핵율에 미치는 영향

각 성숙시간별 염색체의 위치(Fig. 1)를 확인한 결과, 시간이 경과할수록 극체와의 거리가 떨어지는 현상을 보여, 성숙 후 16 및 18시간째는 M-II기 염색체가 각각 100% 와 65.6%(80/122)가 극체 주변(위치 1)에 존재한 반면, 20~24시간째는 11.2~15.6% 만이 극체 주변인 1번 위치에 존재하였다 (Table 1). 극체 방출율은 난자의 성숙시간이 경과함에 따라 증가하여 성숙 후 24시간에 약 70%의 난자가 극체를 방출하였다. 한편, 탈핵율은 어린 난자의 경우에 유의적으로 높아, 성숙 후 16시간째 92.3%가 탈핵되었으나, 극체 방출율은 10.5%에 불과하였다($P < 0.05$). 성숙 후 18시간째는 48%(131/273)가 극체를 방출하였고, 그 중 70.2%(92/131)가

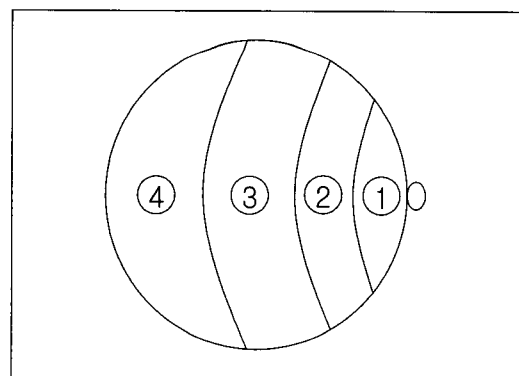


Fig. 1. Diagrammatic representation of metaphase-II plate location as related to polar body (PB).

Table 1. Effect of *in vitro* maturation period on the location of metaphase-II (M-II) plate in bovine oocytes

Maturation period	No. of oocytes	No. (%) of oocytes with M-II plate in various location			
		1	2	3	4
16h	11	11(100.0) ^a	0(0.0) ^a	0(0.0) ^a	0(0.0) ^a
18h	122	80(65.6) ^b	30(24.6) ^b	6(4.9) ^a	6(4.9) ^a
20h	128	20(15.6) ^c	45(35.2) ^{bc}	40(31.2) ^b	23(18.0) ^b
22h	134	15(11.2) ^c	56(41.8) ^c	48(35.8) ^b	15(11.2) ^{ab}
24h	86	11(12.8) ^c	43(50.0) ^c	26(30.3) ^b	6(7.0) ^a

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

Table 2. Effect of *in vitro* maturation period on the 1st polar body extrusion and enucleation rates of bovine oocytes*

Maturation period	No. of oocytes	No. (%) of oocytes		No. (%) of total oocytes extruded 1st PB at 24 h
		Extruded 1st PB	Enucleated	
16h	124	13(10.5) ^a	12(9.7) ^a	91(73.4)
18h	273	131(48.0) ^b	92(33.7) ^b	188(68.8)
20h	226	140(61.9) ^c	62(27.4) ^c	159(70.3)
22h	225	148(65.8) ^c	62(27.6) ^c	162(72.0)
24h	171	118(68.7) ^c	62(36.3) ^c	118(69.0)

*PB: polar body.

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

탈핵되었다(Table 2). 성숙 후 20~24시간까지는 극체 방출율이 유의적으로 높은 반면, 탈핵율은 유의적으로 감소하였다(P<0.05).

2. PHA-P 처리가 융합율에 미치는 영향

Donor 세포 처리구(67.2%, 86/125)와 재구축란 처리구(64.5%, 78/121)간의 융합율은 유의적 차이를 보이지 않았지만 두 처리구 모두 무처리구(50.4%, 61/121)에 비해서는 유의적으로 높은 융합율을 나타내었다(P<0.05). 배반포까지의 발육율은 21.4~25.4%로 각 처리구별 유의차는 인정되지 않았다(Table 3).

3. 융합 후 활성화 처리방법이 배 발달에 미치는 영향

융합 후 활성화 처리에 따른 핵이식란의 분할율 및 배반포 발육율은 A23187+DMAP 처리구가 78.6%(55/70)와 32.9%(23/70)로 A23187+CHXM 처리구(48.5% 와 15.2%)에 비하여 유의적으로(P<0.05) 높게 나타났다(Table 4).

IV. 고찰

일반적으로 핵이식용 수핵란은 M-II기의 성숙 난자를 이용하며 제 1 극체를 중심으로 주변의 일

Table 3. Effect of PHA-P treatment on fusion rate and the development of nuclear transfer embryos*

Treatment	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes fused	No. (%) of embryos developed to		
			2-Cell	Morula	Blastocyst
Donor cells	125	84(67.2) ^a	50(59.5) ^a	22(26.2)	18(21.4)
Reconstituted eggs	121	78(64.5) ^a	59(75.6) ^b	22(28.2)	20(25.6)
Control	121	61(50.4) ^b	36(59.0) ^a	18(29.5)	15(24.6)

*PHA-P: Phytohemagglutinin-P.

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

Table 4. Effect of activation agent on the development of nuclear transfer embryos

Activation agents*	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to		
		2-Cell	Morula	Blastocyst
A23187+DMAP	70	55(78.6) ^a	26(37.1)	23(32.9) ^a
A23187+CHXM	66	32(48.5) ^b	16(24.2)	10(15.2) ^b

*DMAP: 6-dimethylaminopurine, CHXM: cycloheximide.

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

부 세포질을 흡입 제거하는 방법으로 탈핵을 실시한다. 수핵란의 체외성숙시간은 탈핵 효율에 영향을 미치는 요인 중의 하나로 여겨지는데, 본 연구에서는 성숙 후 16~24 시간에 두 시간 간격으로 탈핵을 실시한 결과, 성숙시간이 20시간 이상 연장되면 탈핵 효율이 감소됨이 확인되었다. 이는 M-II기 염색체의 위치 변화와 관계가 있는 것으로 판단된다. 제 1 극체와 M-II기 염색체와의 거리는 성숙 후 시간이 경과됨에 따라 멀어진다는 보고가 있는데, 어린 난자의 경우 microfilament에 의해 감수분열 방추사와 염색체의 위치가 난자의 외곽에 유지되나, 노화된 난자의 경우 microfilament가 소실되어 염색체가 난자의 중앙으로 이동된다(Zernicka-Goetz 등, 1993). 또한, hGC 주사 후 배란된 생쥐 난자의 제 1 극체는 무작위적으로 이동하여, 단지 10%의 난자만이 제 1 극체 바로 아래 M-II기 핵이 위치한다고 보고되었다(Kono 등, 1991). 본 연구에서도 성숙시간별 제 1 극체를 기준으로 핵의 위치를 확인한 결과, 16~18시간 성숙된 난자의

염색체 위치는 제 1 극체와 근접하여 탈핵이 가장 용이할 것으로 생각되는 1, 2번 위치에 90% 이상 존재하였으나, 성숙시간이 연장됨에 따라 제 1 극체와 염색체의 거리가 멀어졌다.

전기융합 시 수핵란 세포질과 donor 세포의 접착 정도는 융합율에 영향을 미치는 것으로 여겨져, Keefer 등(1994)은 소에서 donor 세포로 ICM를 이용한 핵이식에서 탈핵된 수핵란에 ICM 세포를 삽입하기 전에 세포의 집합을 유도하는 PHA-P를 처리한 후 융합율을 비교한 결과 무처리구에 비해 융합율이 높게 나타났다. 본 실험에서는 PHA-P의 처리방법을 donor 세포 처리구와 재구축란 처리구로 나누어 융합율을 비교하였는데, 두 처리구간의 융합율에는 유의적 차이는 없었지만 무처리구에 비해서는 유의적으로 증가되었다. PHA-P 처리에 따른 핵이식란의 배반포기까지의 발육율은 유의적 차이가 없었으므로, PHA-P가 핵이식란의 배 발달에는 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다. PHA-P 이외에도 융합액 내 Ca^{2+} 농도를 1.0 mM로 높여

융합율을 높이기도 하였다(Cheong 등, 2002).

체세포 핵이식란의 활성화는 단위발생 활성화를 기초로 이루어지고 있는데, 전기자극, ethanol 또는 A23187 등과 DMAP(Cibelli 등, 1998)이나 CHXM(Kato 등, 1998) 등의 병용처리 방법으로 체세포 핵이식에 의한 복제 소 생산에 성공하였다. 본 실험에서는 A23187 처리 후 CHXM과 DMAP 나누어 배 발달율을 비교한 결과, DMAP 처리구의 배반포기까지의 발육율이 CHXM 처리구보다 유의적으로 높게 나타났다. 이와 같은 결과는 이전 연구자들의 보고(Liu 등, 1998; Rho 등, 1998; Lim 등, 2000)와도 일치한다. DMAP 처리가 염색체의 분리와 제 2 극체 방출을 방지하여 이배체(diploid) 활성화를 유도하는 반면(Susko-Parrish 등, 1994), CHXM은 염색체의 분리와 제 2 극체의 방출을 억제하지 못하는 것으로 여겨진다. 본 실험에서는 활성화 처리 후 염색체의 분리나 극체상 방출을 확인하지 않았지만, 소 수정란의 핵이식에서 donor 핵의 세포주기가 G1기에 동조되지 않은 경우는 활성화 후 극체상의 방출이 확인되었고(Cheong 등 1999), 세포주기를 혈청기아 처리에 의해 G0/G1에 동조시킨 후 A23187+CHXM로 활성화 처리하였을 때도 24.5%의 극체상 방출이 확인되었다(Choi 등, 2000).

본 실험 결과는 성숙 후 18시간에 탈핵을 실시하는 것이 효과적이며, donor 세포 또는 융합 전 재구축란의 PHA-P 처리가 융합을 향상시킬 수 있고, 융합란을 A23187과 DMAP의 병용처리로 난자의 활성화 및 배반포 발육율을 향상시킬 수 있음을 나타낸다.

V. 요약

본 연구는 난자의 성숙시간, PHA-P 처리 또는 활성화 방법이 소 미수정란의 탈핵, 재구축란의 융합, 활성화 또는 체외발육에 미치는 영향을 검토하였다. 미수정란은 성숙 후 16~24시간에 탈핵을 실시하고, PHA-P 처리 또는 무처리된 귀 피부세포를 이식 후 전기융합을 실시하였다. 후자의 경우는 융합 전에 PHA-P로 15분간 배양하였다. 융합란은

A23187과 CHXM 혹은 DMAP의 병용처리에 의해 활성화를 유지하고, 7~9일간 체외배양하였다. 탈핵율은 성숙 후 16~18시간에 실시한 경우(70.2~92.3%)가 성숙 후 20~24시간(44.3~53.4%)에 비하여 유의적으로 높았다($P<0.05$). M-II기 염색체의 위치는 성숙배양 시간이 길어짐에 따라 제 1 극체와의 간격이 멀어졌다. Donor 세포 혹은 재구축란에 PHA-P를 처리한 경우는 무처리구에 비하여 융합율이 향상되었다($P<0.05$). 핵이식배의 분할율 및 배반포 발달율은 A23187+DMAP 처리구에서 78.6%와 32.9%로, A23187+CHXM 처리구에 비하여 유의적으로 높았다($P<0.05$). 본 실험 결과는 성숙 후 18시간에 탈핵을 실시하는 것이 효과적이며, donor 세포 또는 융합 전 재구축란의 PHA-P 처리가 융합을 향상시킬 수 있고, 또한, 융합란을 A23187과 DMAP으로 병용처리 함으로써 난자의 활성화 및 배반포 발육율을 향상시켜, 결과적으로 핵이식기술의 효율성을 증진시킬 수 있을 것으로 사료된다.

VI. 인용문헌

1. Campbell, K. H. S., McWhir, J., Ritchie, W. A. and Wilmut, I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380: 64-66.
2. Cheong, H. T., Park, C. K., Yang, B. K. and Kim, C. I. 1999. Cytogenetic properties of bovine reconstituted embryos by cell cycle-controlled nuclear transfer. *Korean J. Reprod.* 23:271-278.
3. 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.* 61:488-492.
4. Choi, J. Y., Kwon, D. J., Kim, C. I., Park, C. K., Yang, B. K. and Cheong, H. T. 2000. Effect of

- quiescent treatment on nuclear remodeling and *in vitro* development of nuclear transfer embryos derived from bovine fetal fibroblast cells. Korean J. Reprod. 24:217-222.
5. Cibelli, J. B., Stice, S. L., Golueke, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C., Abel Ponce de Leon, F. and Robl, J. M. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. Science 280:1256-1258.
 6. Critser, E. S. and First, N. L. 1986. Use of a fluorescent stain for visualization of nuclear material in living oocytes and early embryos. Stain. technol. 61:1-5.
 7. Dominko, T., Chan, A., Simerly, C., Luetjens, C. M., Hewitson, L., Martinovich, C. and Schatten, G. 2000. Dynamic imaging of the metaphase II spindle and maternal chromosomes in bovine oocytes: implications for enucleation efficiency verification, avoidance of parthenogenesis, and successful embryogenesis. Biol. Reprod. 62:150-154.
 8. Im, G. S., Yang, B. S., Park, S. J., Yang, B. C., Chang, W. K. and Park, C. S. 2000. Studies on activation regimen for nuclear transfer in Hanwoo. Korean J. Anim. Reprod. 24:281-288.
 9. Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H. and Tsunoda, Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. Science 282:2095-2098.
 10. 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.
 11. Kono, T., Kwon, O. Y. and Nakahara, T. 1991. Development of enucleated mouse oocytes reconstituted with embryonic nuclei. J. Reprod. Fertil. 93:165-172.
 12. Liu, L., Ju, J. C. and Yang, X. 1998. Parthenogenetic development and protein patterns of newly matured bovine oocytes following chemical activation. Mol. Reprod. Dev. 49:298-307.
 13. Liu, J. L., Wang, M. K., Sun, Q. Y., Xu, Z. and Chen, D. Y. 2000. Effect of telophase enucleation on bovine somatic nuclear transfer. Theriogenology 54:989-998.
 14. Mohamed Nour, M. S. and Takahashi, Y. 1999. Preparation of young preactivated oocytes with high enucleation efficiency for bovine nuclear transfer. Theriogenology 51:661-666.
 15. Ogura, A., Inoue, K., Ogonuki, N., Nouchi, A., Takano, K., Nagano, R., Suzuki, O., Lee, J., Ishino, F. and Matsuda, J. 2000. Production of male cloned mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature Sertoli cells. Biol. Reprod. 62:1579-1584.
 16. Presicce, G. A. and Yang, X. 1994. Nuclear dynamics of parthenogenesis of bovine oocytes matured *in vitro* for 20 and 40 hours and activated with combined ethanol and cycloheximide treatment. Mol. Reprod. Dev. 37: 61-68.
 17. 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.
 18. Smith, L. C. 1993. Membrane and intracellular effects of ultraviolet irradiation with Hoechst 33342 on bovine secondary oocytes matured *in vitro*. J. Reprod. Fertil. 99:39-44.
 19. Susko-Parrish, J. L., Leibfried-Rutledge, M. L., Northey, D. L., Schutzkus, V. and First, N. L. 1994. Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. Dev. Biol. 166:729-739.
 20. 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.
21. Westhusin, M. W., 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.
22. Yin, X. J., Tani, T., Yonemura, I., Kawakami, M., Miyamoto, K., Hasegawa, R., Kato, Y. and Tsunoda, Y. 2002. Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes. Biol. Reprod. 67:442-446.
23. Zernicka-Goetz, M., Kubiak, J. Z., Antony, C. and Maro, B. 1993. Cytoskeletal organization of rat oocytes during metaphase II arrest and following abortive activation: A study by confocal laser scanning microscopy. Mol. Reprod. Dev. 35:165-175.
- (접수일자: 2003. 6. 2. / 채택일자: 2003. 7. 2.)