

Ethanol, Ca²⁺-Ionophore 및 Strontium이 돼지 난자의 활성화와 체외 발달에 미치는 영향

안현정 · 이지용 · 강만중 · 문승주[†]
전남대학교 농업생명과학대학 동물자원학부, 농업과학기술연구소

Activation and *In Vitro* Development of Porcine Oocytes Treated with Ethanol, Ca²⁺-Ionophore and Strontium

H. J. Ahn, J. W. Lee, M. J. Kang and S. J. Moon[†]

Department of Animal Science, Insti. of Ag. Sci and Tech., College of Agriculture & Life Science, Chonnam National University

SUMMARY

The objective of this study was to examine the optimal concentration and the exposure time of ethanol, Ca-ionophore, and strontium to achieve massive recipient oocytes in porcine. The cleavage (51.4% vs. 21.3~44.3%) and embryo development rates (45% vs. 13.3~29.9%) were significantly higher ($P<0.05$) in oocytes treated with 10% ethanol for 10 min than other treatments. The oocytes treated with 25 mM Ca-ionophore for a minimum of 2 min and 20 mM strontium for a minimum of 6 h showed significantly higher cleavage and embryo development rates than those of other treatments ($P<0.05$). Cleavage rate with duplicated ethanol treatment was significantly lower than those with ethanol alone ($P<0.05$). The cleavage rate and embryo development rates were significantly lower in duplicated strontium treatment than those in both alone and combination ($P<0.05$). But the cleavage and embryo development rates in treatment with Ca-ionophore were significantly higher in combined treatment (Ca-ionophore and cycloheximide) than those in single or duplicated treatment ($P<0.05$). These results might induce establishment of the optimal concentration and the exposure time on activation media to build up activation condition of porcine oocytes.

(Key words : activation, porcine, ethanol, Ca-ionophore, strontium)

서 론

활성화 자극에 의한 단위 발생(parthenogenesis)이란 미 수정 난자가 웅성 생식 세포와의 유전적 결합 없이 자성배우자 단독으로 배를 생성시키는 생식 과정(Kaufman, 1978)을 말하며, 이러한 단위 발생은 수정에 의한 난자의 활성화를 이해하는데 커다란 도움을 줄 수 있고, 가축의 개량 및 번식에 유용한 수단이다. 또한 복제 동물이나 형질 전환 동물의 대량 생산을 위해서는 수핵란의 대량 확보가 절실한데, 이를 위해서도 단위 발생은 필수적인 단계이다. 특히 돼지의 경우, 체외에서 생산되어진 난모세포 및 수정란을 이용한 산자 생산이나 핵치환에 의한 산자 생산의 효율이 타 종에 비하여 떨어지기 때문에 이를 극복하기 위해서는 자연적인 수정 과정과 같은 난모세포의 활성화가 매우 중요하다. Pincus와 Enzmann(1935)가 토끼 난자의 활성화를 처음으로 보고한 이후 난자의 활성화를 유도하기 위한 다양한 방법들 즉, 전기 자극이나 자외선, 진동 등의 물

리적 자극법(Kurome 등, 2003; Park 등, 2001), ethanol 처리법(Loi 등, 1998; Presicce와 Yang, 1994), Ca²⁺-ionophore 처리법(Aoyagi 등, 1992; Ware 등, 1989), strontium 처리법(Marcus 등, 1990; Wakyama 등, 1998), cycloheximide와 6-DMAP와 같은 단백질 합성 억제제 처리법 및 단백질 인산화 억제제 처리법(Lee 등, 2004; Roh와 Hwang, 2002; Grupen 등, 2002), 효소 처리법(Lee 등, 1992; Kaufman 등, 1973) 및 삼투압 조절 처리법(Rickords와 White, 1992) 등이 연구되어져 왔다. 그러나 단백질 합성 억제제인 cycloheximide만으로는 돼지 난자의 제 2감수 분열 증기로부터 감수 분열의 재개를 시킬 수 없었으며(Rozinek 등, 1996; Ding 등, 1992), Ca²⁺-ionophore와 전기 자극법 및 ethanol 등의 Ca²⁺수준 증가제 만을 이용하여 난자를 활성화 시키면 histone H1 Kinase가 불활성화 되어 감수 분열이 재개되지만 일정 시간이 흐르면 kinase가 재활성화 되는 문제가 발생하며(Swann과 Lai, 1997; Soloy 등, 1997), 과도하거나 부족한 Ca²⁺ 자극은 단위 발생란의 발달에 손상을 입힐 수 있다(Collas 등,

^{*} 본 연구는 2004년 전남대학교 학술비 연구지원에 의하여 연구되었음.

[†] Correspondence : E-mail : sjmoom@chonnam.ac.kr

1993). 이를 극복하기 위한 방법으로 병용 처리법이 연구되어지고 있는데, 반복적인 Ca^{2+} 수준 증가 물질의 중복 처리를 통하여 높은 수준의 Ca^{2+} 농도가 난자 세포내에 계속 유지되면서 CSF와 MPF의 불활성화를 유도하게 하거나, 단백질 합성억제제와의 병용 처리를 통하여 CSF의 재생성을 방지하여 난자의 활성화율을 높일 수 있다(Shi 등, 1993). 따라서 본 연구는 strontium, ethanol, Ca^{2+} -ionophore과 같은 Ca^{2+} 수준 증가 물질들의 단독, 중복 및 cycloheximide와 병용 처리를 통하여 돼지 난자의 최적의 단위 발생 조건을 규명하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시 난포란의 채취

본 실험에 공시한 난포란은 도축직 후 정상 생식기를 가진 암돼지에서 적출한 난소로부터 채취하였다. 적출한 난소는 35°C, 0.9% 생리식염수로 1~2회 세척한 후 동일 생리식염수에 침지하여 30분~1시간 이내에 실험실로 운반하였으며, 생리식염수로 2~3회 세척한 다음 실험에 공시하였다. 난포란은 18-gauge, 10 ml 주사기로 3~6 mm의 난포로부터 난포액과 함께 흡입 채취하였다. 채취된 난포란은 실체 현미경(Nikon, Japan) 하에서 난구 세포의 치밀도에 따라 난세포질이 검고 균일하며 난구 세포층이 전체적으로 치밀하게 분포되어 있는 난포란을 A형, 난세포질이 검고 균일하고 난구 세포층이 전체적으로 분포되어 있지만 부분적으로 상실된 난포란을 B형, 난세포질이 균일하지 못하고 난구세포가 거의 부착되지 않은 난포란을 C형 및 D형으로 구분하였으며 모든 난포란은 실체 현미경하에서 난세포질의 상태가 균일한 A형과 B형 난포란을 선별하여 실험에 공시하였다.

2. 난포란의 체외 성숙

본 실험에 사용되었던 체외 성숙 배양액으로 Whitten's medium을 기본으로 사용하였으며, 사용 전 pH 7.2로 조정하고 0.22 μ m syringe filter(Sartorius, Germany)로 여과한 후 39°C, 5% CO₂ 배양기 내에서 평형시킨 후 사용하였다. 회수된 난포란은 10% FBS(Welgene, Korea)와 호르몬(10 IU/ml PMSG, 10 IU/ml hCG(Daesung, Korea))이 첨가된 배양액을 4well-dish(Nunc, Denmark)에 500 μ l씩 분주하고 mineral oil(Acros, USA)로 피복한 후 각 well 당 50개씩 옮겨 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 22시간 배양하였고 이 후 호르몬이 첨가되지 않고 10% FBS가 첨가된 Whitten's medium에서 22시간 배양함으로써 총 44시간 동안 배양하여 체외 성숙을 유도하였다.

3. 난자의 활성화

44시간 동안 체외 성숙된 난자는 0.1% hyaluronidase(Sig-

ma, USA)에서 pipetting하여 난구 세포를 제거하였다. 난자의 활성화는 실체 현미경하에서 난세포질이 검고 균일하며, 제 1극체가 뚜렷한 난자만을 선별하여 ethanol(Sigma, USA), Ca^{2+} -ionophore(Sigma, USA), strontium(Sigma, USA)을 이용하여 단독 및 중복 처리에 따른 난자의 활성화율을 조사하였다. Cycloheximide(Sigma, USA)을 이용한 병용 처리에 대한 난자의 활성화율 조사는 다음과 같이 실시하였다.

먼저 단독 처리에 따른 난할율 및 체외 배발달 성적을 얻기 위하여 ethanol은 5, 10, 15% 농도에서 5, 10, 20분 동안 처리하였으며, Ca^{2+} -ionophore는 5, 15, 25 μ M 농도에서 2, 7, 15분 동안 처리하였다. Strontium은 10, 20, 40 mM 농도에서 4, 6, 8시간 동안 처리하여 단독 처리 시 최적의 농도와 시간을 결정하였다. Ethanol을 이용한 중복 처리는 10% ethanol에서 10분간 2회 처리하였으며, cycloheximide와의 병용 처리는 10% ethanol에서 10분간 처리한 후 5 μ g cycloheximide을 이용하여 6시간 처리하였다. Ca^{2+} -ionophore를 이용한 중복 처리는 25 μ M 농도에서 2분간 2회 처리하였으며, cycloheximide와의 병용 처리는 Ca^{2+} -ionophore 처리 후 5 μ g cycloheximide을 이용하여 6시간 처리하였다. Strontium을 이용한 중복 처리는 20 mM에서 6시간 2회 처리하였으며, cycloheximide와의 병용 처리는 strontium 처리 후 5 μ g cycloheximide을 이용하여 6시간 처리하였다.

4. 체외 배양

Ethanol, Ca^{2+} -ionophore 및 strontium에 의해 활성화된 난자는 10% FBS가 첨가된 Whitten's medium으로 2~3회 세척한 후 60 mm petri-dish에 60 μ l씩 분주하고 mineral oil로 피복한 후 난포란을 각 well당 20개씩 옮겨 39°C, 5% CO₂, 포화 습도 배양기 내에서 120시간 동안 배양하여 시간의 경과에 따라 체외 발달성적을 조사하였다. 난할율은 활성화 처리 후 체외 배양 48시간째 확인하였으며, 48시간마다 신선 배양액으로 교체하였다.

5. 통계 분석

본 연구 결과는 SAS Package 9.1를 이용하여 통계 처리를 실시하였으며, 처리간 평균비교는 Duncan 검정법을 이용하여 유의성 검정을 실시하였다.

결 과

1. 단독 처리 시 난할율 및 체외 배발달 성적

Ethanol 농도 5, 10, 15%를 이용하여 난자의 활성화율 5, 10, 15분간 유지하였을 때 난할율은 10% 농도에서 10분간 노출시켰을 때 51.4%로 다른 처리구에 비하여 유의적으로 높게 나타났다($P < 0.05$) 가장 낮은 난할율은 20% 농도에서 5분간 처리

하였을 때 21.3%였다. 또한 체외 배발달 성적도 노출 시간 10분, 농도 10%와 15%에서 각각 45%와 48.1%로 타 처리구의 29.2%에서 13.3%의 성적보다 유의적으로 높은($P<0.05$) 배발달율을 보였다(Table 1). Ca-ionophore 단독 처리는 5, 15, 25 μ M 농도에서 각각 2, 7, 15분간 활성화를 유지하였다(Table 2). 난할율은 노출 시간 2분, 처리농도 25 μ M에서 60.9%, 처리 농도 15 μ M에서 51.1%, 노출 시간 7분 처리 농도 25 μ M에서 51.9%로 타 처리구에 비하여 유의적으로 높았다($P<0.05$). 체외 배발달 성적도 난할율과 마찬가지로 노출시간 2분, 처리농도 25 μ M로 처리하였을 때 41.3%로 유의적으로 높은 결과를 보였다. Table 3에는 10, 20, 40 mM 농도에서 4, 6, 8시간 strontium 단독 처리한 결과를 나타내었다. 난할율은 노출시간 6시간, 농도 20 mM로 처리했을 때 63.7%로 타 처리구에 비하여 유의적으로 높았으며($P<0.05$) 체외 배발달율도 20.0%로 타 처리구에 비하여 유의적으로 높았다($P<0.05$).

2. 증복 및 병용 처리 후 난할율 및 체외 배발달 성적

Ethanol 증복 처리 시 난할율은 42.5%로 단독 처리 시 53.6%보다 유의적으로 낮았고($P<0.05$), cycloheximide와 병용 처리 시 난할율도 46.4%로 단독처리할 때보다 낮았으나 통계적인 유의차는 없었다. 체외 배발달율도 증복 처리에서가 단독 및 병용 처리할 때보다 유의적으로 낮았다($P<0.05$). 단독 및 병용 처리 간에는 병용 처리할 때 체외 배발달율이 20.0%로 25.5%

Table 1. Effects of ethanol concentration and exposure time on cleavage and *in vitro* development of activated porcine oocytes

Exposure time (min)	Concentration (%)	No. of oocytes		No. (%) of oocytes developed to morulae (120 h)
		Treated	Cleaved (%)	
5	5	90	24 (26.7) ^d	12 (13.3) ^c
	10	85	27 (31.8) ^c	14 (16.5) ^c
	15	80	18 (22.5) ^d	13 (16.3) ^c
10	5	106	47 (44.3) ^b	31 (29.2) ^b
	10	111	57 (51.4) ^a	50 (45.0) ^a
	15	104	39 (37.5) ^c	50 (48.1) ^a
20	5	80	17 (21.3) ^d	15 (18.8) ^c
	10	82	27 (32.9) ^c	15 (18.3) ^c
	15	90	20 (22.2) ^d	14 (15.6) ^c

^{a-d} Different superscripts within the same column denote significant differences ($P<0.05$).

인 단독 처리할 때보다 낮았으나 통계적인 유의차는 없었다 (Table 4). Ca-ionophore 단독, 증복 및 cycloheximide와 병용 처

Table 2. Effects of Ca-ionophore concentration and exposure time on cleavage and *in vitro* development of activated porcine oocytes

Exposure time (min)	Concentration (μ M)	No. of oocytes		No. (%) of oocytes developed to morulae (120 h)
		Treated	Cleaved (%)	
2	5	90	40 (44.4) ^b	28 (31.1) ^a
	15	90	46 (51.1) ^a	31 (34.4) ^a
	25	92	56 (60.9) ^a	38 (41.3) ^a
7	5	100	42 (42.0) ^b	29 (29.0) ^b
	15	98	46 (46.9) ^b	34 (34.7) ^a
	25	104	54 (51.9) ^a	37 (35.6) ^a
15	5	105	39 (37.1) ^c	21 (20.0) ^b
	15	100	41 (41.0) ^b	22 (22.0) ^b
	25	108	47 (43.5) ^b	30 (27.8) ^b

^{a-c} Different superscripts within the same column denote significant differences ($P<0.05$).

Table 3. Effects of strontium concentration and exposure time on cleavage and *in vitro* development of activated porcine oocytes

Exposure time (h)	Concentration (mM)	No. of oocytes		No. (%) of oocytes developed to morulae (120 h)
		Treated	Cleaved (%)	
4	10	195	42 (21.5) ^d	20 (10.3) ^c
	20	234	94 (42.3) ^c	36 (15.4) ^b
	40	216	69 (31.9) ^d	22 (10.2) ^c
	10	159	54 (34.0) ^d	20 (12.6) ^b
6	20	165	105 (63.7) ^a	33 (20.0) ^a
	40	165	87 (52.7) ^b	27 (16.4) ^b
	10	162	48 (29.6) ^d	15 (9.3) ^c
8	20	180	99 (55.0) ^b	23 (12.8) ^b
	40	180	80 (44.4) ^c	17 (9.4) ^c

^{a-d} Different superscripts within the same column denote significant differences ($P<0.05$).

리 결과는 Table 5에 제시하였다. Ca-ionophore 중복 처리 시 난할율은 56.0%로 단독 처리 시 58.3%와 차이가 없었다. 그러

Table 4. Effects of ethanol repeating or combination with cycloheximide on activation of porcine oocytes matured *in vitro*

Activation treatment	No. of oocytes		No.(%) of oocytes developed to morulae (120 h)
	Treated	Cleaved (%)	
Ethanol	110	59 (53.6) ^a	28 (25.5) ^a
Ethanol+ ethanol	120	51 (42.5) ^b	19 (15.8) ^b
Ethanol+ cycloheximide	125	58 (46.4) ^a	25 (20.0) ^a

^{a,b} Different superscripts within the same column denote significant differences ($P < 0.05$).

Table 5. Effect of Ca-ionophore and cycloheximide on activation of porcine oocytes matured *in vitro*

Activation treatment	No. of oocytes		No. (%) of oocytes developed to morulae (120 h)
	Treated	Cleaved (%)	
Ca-ionophore	120	70 (58.3) ^b	31 (25.8) ^b
Ca-ionophore+ Ca-ionophore	125	70 (56.0) ^b	38 (30.4) ^b
Ca-ionophore+ Cycloheximide	135	95 (70.4) ^a	49 (36.3) ^a

^{a,b} Different superscripts within the same column denote significant differences ($P < 0.05$).

Table 6. Effect of strontium and cycloheximide on activation of porcine oocytes matured *in vitro*

Activation treatment	No. of oocytes		No. (%) of oocytes developed to		
	Treated	Cleaved (%)	48 h		120 h
			2cell	4cell	Morulae
Strontium	160	100 (62.5) ^a	68 (42.5) ^a	22 (13.8) ^b	32 (20.0) ^a
Strontium+strontium	200	100 (50.0) ^b	78 (39.0) ^b	22 (11.0) ^b	22 (11.0) ^b
Strontium+cycloheximide	230	147 (63.9) ^a	106 (46.1) ^a	41 (17.8) ^a	53 (23.0) ^a

^{a,b} Different superscripts within the same column denote significant differences ($P < 0.05$).

나 cycloheximide와 병용 처리 시 난할율 70.4%로 단독 또는 중복처리시 보다 유의적으로 높게 나타났다($P < 0.05$). 한편, 체외 배발달율도 병용처리시 36.3%로 단독 및 중복 처리 결과보다 유의적으로 높았다($P < 0.05$). Strontium 단독 처리시 난할율은 62.5%를 얻을 수 있었으나 중복 처리시에는 50%로 낮은 결과를 나타내었다. 또한 cycloheximide와 중복 처리하였을 때에는 난할율이 63.9%로 단독 처리와 유의적인 차이가 없었다. 그리고 체외 발달율에서도 유의한 결과를 나타내었다.

고 찰

일반적으로 포유 동물 난자는 성숙 완료 후 제2차 난모세포 상태로 분열 과정이 휴지되며 정자 침입 등 외부 자극이 없으면 감수 분열을 재개할 수 없다. 감수 분열 정지 현상은 MPF(maturation promoting factor)의 활성화에 의해 유지되어진다(Watanabe 등, 1989). 감수분열이 정지된 난모세포에 정자 침입 등 자극이 가해지면 난세포질 내 Ca^{2+} 농도의 급격한 증가가 일어나고(Kline 등, 1992) Cyclin B와 CSF의 합성을 억제하는 MPF의 불활성화가 일어나서 감수분열이 재개되어진다(Hashimoto와 Kishimoto, 1998; Ruso 등, 1998). 본 연구에서 ethanol을 이용한 난할율과 배발달성적은 ethanol의 농도 10%, 처리 시간 10분일 때 타 처리구에 비하여 유의적으로 높아($P < 0.05$), 돼지 난자 활성화 유기를 위하여 ethanol 처리 시 ethanol의 최적 농도와 노출 시간은 10%와 10분간 처리하는 것이 적합할 것으로 생각된다. Fukui 등(1992)은 소 난자 활성화 유기 시 ethanol 농도 7%, 노출 시간 5분 동안 처리하였을 때 활성화율이 높았다는 보고와 Minamihashi 등(1993)이 소 난자 활성화 유기 시 ethanol 농도 7%와 노출 시간 0.5, 1, 2, 3, 4, 5분 동안 처리한 결과 2, 3, 5분 동안 처리한 구에서 0.5분 처리한 구에 비하여 활성화율이 유의적으로 높게 나타났다는 보고와는 차이를 보였다. 이는 종간의 차이와 성숙 시간의 차이 때문으로 생각된다. Ca-ionophore를 이용한 돼지 난자의 활성화 처리 결과는 노출 시간 2분 처리, 농도 25 μM 일 때 난할율과 배발달율이 유

의적으로 높은 결과를 보였다. 이러한 결과는 Funahashi 등 (1994)의 결과와 유사하였고, Marketa 등(2003)이 Ca-ionophore 농도 25 μ M에서 10분 동안 처리했을 때 활성화율이 52%로 타 처리구에 비하여 유의적으로 높았다는 보고와 일치하였다.

한편 strontium 처리 시 본 연구 결과는 노출 시간 6시간, 농도 20 mM로 처리하였을 때 난할율과 배발달 성적이 유의적으로 높았다. Simone 등(2004)이 소 난자 활성화 유기를 위하여 strontium 처리의 노출시간 6시간, 처리 농도 20 mM에서 난할율이 66.7% 배반포배 발달 성적이 13.3%를 보였다는 보고와 유사한 경향을 보였으나 Loren과 Orle(2006)이 마우스 난자 활성화 처리를 위한 strontium 처리농도 1.74, 5, 10, 15 mM, 처리 시간 1.5, 3, 6간, 12시간 처리 결과 활성화율은 농도와 처리시간에 따라 차이가 없었으나 배반포배까지 발달율은 처리시간이 길어질수록 유의적으로 낮았다는 보고와는 차이가 있었다. Ethanol, Ca-ionophore 등 Ca²⁺ 수준 증가제 만을 이용하여 난자의 활성화를 유도하였을 경우 histone H1 Kinase가 불활성화되어 난자의 감수 분열은 재개되지만 일정 시간이 지나면 kinase의 재활성화 문제가 발생한다(Soloy 등, 1997; Swann과 Lai, 1997; Presicce와 Yang, 1994; Callas 등, 1993). 또한 너무 많거나 부족한 Ca²⁺ 자극은 활성화된 난자의 배발달에 손상을 입힐 수 있기 때문에(Callas 등, 1993) 이러한 문제점을 극복하기 위하여 중복 및 병용 처리 방법이 연구되어지고 있다. Ethanol 중복 처리는 단독 처리할 때보다 난할율이 유의적으로 낮게 나타났고 cycloheximide와 병용 처리할 때도 통계적인 유의차는 없으나 낮게 나타났다. 이러한 결과는 소의 경우 단독 처리보다 병용 처리할 때 활성화율이 높다는 보고(Shi 등, 1993; Yang 등, 1992)와는 큰 차이를 보였다. 이와 같이 난할율과 배발달율이 낮게 나타난 본 연구 결과는, 중복 및 병용 처리 시 활성화제의 과도한 작용으로 돼지 난세포질이 손상되었기 때문으로 생각되어진다. Ca-ionophore의 중복 처리 시 난할율은 단독 처리할 때와 차이가 없었고 cycloheximide와 병용 처리할 때 난할율과 배발달율이 높게 나타났다. 이러한 결과는 칼슘 증가제와 단백질 합성 억제제의 병용처리 시 활성화율이 높게 나타났다는 일련의 보고들(Liu 등, 1998; Rho 등, 1998; Presicce와 Yang, 1994; Collas 등, 1993)과 일치하는 경향이었다. 또한 strontium의 중복 처리 결과는 단독 및 병용 처리 결과보다 난할율과 배발달을 모두 유의적으로 낮았다. Simone 등(2004)이 소 난자를 strontium과 ionomycin 병용 처리한 결과, 난할율은 높았으나 유의적인 차이가 없었다는 보고와 유사한 경향을 보였다.

본 연구 결과를 종합해 보면 돼지 난자의 활성화 유기를 위하여 활성화제의 농도 및 노출 시간은 ethanol의 경우 10%, 10분, Ca-ionophore 25 μ M, 2분 그리고 strontium 20 mM, 6시간이 적합하였다. Ethanol과 strontium의 중복 및 병용 처리는 돼지 난자의 난할율과 배발달 성적을 오히려 낮게 하는 결과를

보였는데, 이는 돼지 난자의 화학적 자극에 대하여 민감도가 높아 난세포질의 손상에 기인한 것으로 생각된다. 따라서 돼지 난자 활성화율을 높이기 위한 칼슘 증가제, 단백질 합성 억제제 및 인산화 억제제의 단독, 중복, 병용처리 등 효과적인 처리 방법의 확립이 필요하다고 생각된다.

적 요

본 연구는 효율적인 돼지 난자의 활성화를 통한 수핵란의 대량 확보를 위하여 ethanol, Ca-ionophore 및 strontium의 최적 농도 및 노출 시간을 규명하기 위하여 실시되었다. Ethanol은 10%에서 10분간 노출시켰을 때 난할율과 배발달 성적이 각각 51.4%와 45%로 다른 처리구에 비하여 유의적으로 높았으며 ($P<0.05$), Ca-ionophore는 25 μ M에서 2분간 노출시켰을 때 난할율과 배발달 성적이 유의적으로 높았다. 또한 strontium은 20 mM에서 6시간 노출시켰을 때 난할율과 배발달 성적 모두 유의적으로 높았다($P<0.05$). Strontium 중복 처리는 단독 및 병용 처리할 때보다 난할율과 배발달을 모두 유의적으로 낮았다($P<0.05$). 이러한 결과는 돼지 난자의 활성화 조건을 확립하기 위한 활성화제의 최적 농도와 노출 시간 확립에 기여할 수 있으리라 생각된다.

참고문헌

- Aoyagi Y, Kameyama and Takeda T. 1992. Artificial activation of bovine oocytes matured *in vitro* by elective shock or exposure to ionophore A23187. *Theriogenology*, 37:188 (Abstr.).
- Collas P, Fissore R, Robl JM, Sullivan EJ and Barnes FL. 1993. Electrically induced calcium elevation, activation and parthenogenetic development of bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 34:212-223.
- Ding J, Moor RM and Foxcroft GR. 1992. Effects of protein synthesis on maturation, sperm penetration and pronuclear development in porcine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 40:253-258.
- Fukui Y, Sawai K, Furudate M, Sato N, Iwazumi Y and Ohsaki K. 1992. Parthenogenetic development of bovine oocytes treated with ethanol and cytochalasin M after *in vitro* maturation. *Mol. Reprod. Dev.*, 33:357-362.
- Funahashi H, Cantley TC, Stumpf TT, Terloiw SL and Day BN. 1994. *In vitro* development of *in vitro* matured porcine oocytes following chemicals activation or *in vitro* fertilisation. *Bio. Reprod.*, 50:1072-1077.
- Hashimoto N and Kishimoto T. 1998. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation promoting factor during

- mouse oocytes maturation. *Dev. Biol.*, 126:242-252.
- Kaufman MH. 1973. Parthenogenesis in the mouse. *Nature*, 242: 457-476.
- Kline D and Kline JT. 1992. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev. Biol.*, 149:80-89.
- Kurome A, Fujimura T, Miyazaki and Nagashima H. 2003. Comparison of electro-fusion and intra-cytoplasmic nuclear transfer injection methods in pig cloning. *Cloning and Stem Cell*, 5: 367-378.
- Lee JW, Tian XC and Yang X. 2004. Optimization of parthenogenetic activation protocol in porcine. *Mol. Reprod. Dev.*, 68:51-57.
- Liu L, Ju JC and Yang X. 1998. Parthenogenetic development and protein patterns of newly matured bovine oocytes after chemical activation. *Mol. Reprod. Dev.*, 49:298-307.
- Loi P, Ledda S, Fulka Jr, Cappai P and Moor RM. 1998. Development of parthenogenetic and cloned bovine embryo : Effect of activation protocols. *Biol. Reprod.*, 58:1177-1187.
- Loren J and Orle LK. 2006. The employment of strontium to activate mouse oocytes : effects on spermatid-injection outcom. *Reproduction*, 131:259-267.
- Marcus GJ. 1990. Activation of cumulus cells-free mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 26:159-162.
- Minamihashi A, Watson AJ, Watson PH, Church RB and Schultz GA. 1993. Bovine parthenogenetic blastocytes following *in vitro* maturation and oocytes activation with ethanol. *Theriogenology*, 40:63-76.
- Park KW, Chung HT, Lai L, Kuhholzer B, Samuel M, Bonk A, Im GS, Rieke A, Murphy C, Carter DV and Prather RS. 2001. Production of nuclear transfer-derived swine that express the enhanced green fluorescent protein. *Anim. Biotech.*, 12:173-181.
- Pincus G and Enzmann EV. 1935. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. I. The activation of ovarian eggs. *J. Exp. Med.*, 62:665-675.
- Presicce GA 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.
- Rho GJ, Wu B, Kawarsky S, Leibo SP and Betteridge KJ 1998. Activation regimens to prepare bovine oocyte. *Mol. Reprod. Dev.*, 50:485-492.
- Rickords LF and White KL. 1992. Electrofusion induced intracellular Ca^{2+} flux and its effect on murine oocytes activation. *Mol. Reprod. Dev.*, 32:152-159.
- Rozinek J, Peter J, Grocholova R and Jilek 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.
- Russo GI, Wilding M, Marino M and Dale B. 1998. Ins and outs of meiosis in ascidians. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 9:559-567.
- 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.).
- Simone CM, Claudia LVL and Joaquim MG. 2004. Activation and early parthenogenesis of bovine oocytes treated with ethanol and strontium. *Anim. Reprod. Sci.*, 81:35-46.
- Soloy E, Kauka J, Viuff D, Smith SD, Calleson SD and Greve T. 1997. Time course of pronuclear deoxyribonucleic acid synthesis in parthenogenetically activated bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, 57:27-35.
- Swann K and Lai FA. 1997. A novel signaling mechanism for generating Ca^{2+} oscillations at fertilization in mammals. *Bioassays*, 19:374-378.
- Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR and Yanagimachi R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394:369-374.
- Ware CB, Barnes FL, Maiki-Laurila M and First NL. 1989. Age dependence of bovine oocyte activation. *Gamete Res.*, 22: 265-275.
- Watanabe N, Vande Woude GF, 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.