

## 돼지 체외수정란 및 단위발생란의 미세관 형성 및 메틸화 양상

박주희<sup>1</sup> · 김호정<sup>1</sup> · 이범기<sup>1</sup> · 권대진<sup>1</sup> · 황인선<sup>2</sup> · 박춘근<sup>2</sup> · 양부근<sup>2</sup> · 정희태<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>강원대학교 수의학부대학, <sup>2</sup>동물생명과학대학

## Microtubule Assemblies and Methylation Patterns of Porcine IVF and Parthenogenetic Embryos

Joo-Hee Park<sup>1</sup>, Ho-Jeong Kim<sup>1</sup>, Beom-Ki Lee<sup>1</sup>, Dae-Jin Kwon<sup>1</sup>, In-Sun Hwang<sup>2</sup>, Choon-Keun Park<sup>2</sup>,  
Boo-Keun Yang<sup>2</sup> and Hee-Tae Cheong<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>School of Veterinary Medicine and <sup>2</sup>College of Animal Life Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

### ABSTRACT

This study was performed to confirm the microtubule assemblies and methylation patterns of porcine IVF and parthenogenetic embryos. Cumulus-oocyte complexes were collected and matured *in vitro* for 42 hr. Oocytes were fertilized by prepared fresh sperm or activated parthenogenetically by exposure to electric stimulation and 6-dimethylaminopurine. Porcine IVF and parthenogenetic embryos were cultured *in vitro* for 6 days. Embryos were stained by immunofluorescence staining method to observe the dynamic of nucleus and microtubules in the first mitotic phase and the methylation patterns in different developmental stages. After then, samples were confirmed and analyzed through a laser-scanning confocal microscope. IVF embryos had a centrosome originated from sperms, which was shown a  $\gamma$ -tubulin spot. However,  $\gamma$ -tubulin spot was not observed in parthenogenetic embryos. A lower methylation level was observed in IVF embryos compared to parthenogenetic ones at the morula and blastocyst stages. In conclusion, it is considered that microtubule assemblies and genetic regulation mechanism differ between parthenogenetic and IVF embryos.

(Key words : Microtubule, Methylation, IVF, Parthenogenesis, Porcine)

### 서 론

포유동물의 난자에 있어서 방추미세관은 정상적인 발육을 위해 분할구 간 유전물질들을 정확하게 전달시키는 중요한 역할을 가지고 있다. 체세포의 유사분열기 동안 핵은 한 쌍의 염색체로 응축되며, 이후 유사분열 방추에 의해 양쪽으로 분리된다. 이 시기에 중심체(centrosome)는 분리되고 핵의 양 극으로 이동하여 한 쌍의 양극성 방추를 형성한다. 그러나 돼지(Kim 등, 1996), 면양(Le Guen과 Crozet, 1989) 및 소(Long 등, 1993)와 같은 종의 성숙된 난자에서는 중심체가 관찰되지 않는 것으로 보고되었으며, 이러한 종에서는 기능적인 미세관형성중심(microtubule organizing center, MTOC)이 방추극을 형성하는 것으로 알려져 있다. 접합자의 경우, 정자 유래 중심소체(centriole)가 난자세포질 내에 존재하는 중심체 단백질들을 결합시켜 MTOC를 형성하게 되어 정자로부터 유래된 정상적인 형태의 성상체가 관찰되지만, 단위발생란의 경

우 기능적인 MTOC로부터 미세관망(microtubular network)이 형성되는 것으로 알려져 있다(Schatten 등, 1992; Kim 등, 1996; Holy와 Schatten, 1997).

DNA 메틸화는 유전자 발현의 조절기작 중의 하나로 DNA 염기서열을 메틸기로 치환시켜 DNA의 반응성을 낮추고 안정성을 높여 유전자 발현을 억제하는 기전으로 유전자 발현에 관여하며, 생식 유전자의 부모 대립형질인자에 붙어 유전자각인 발현에 중요한 역할을 한다(Latham 등, 1995; Reik과 Walter, 2001). 분화된 체세포에서의 DNA 메틸화 형태는 Dnmt1에 의해 안정화되고 유지된다(Surani, 1998; Reik과 Walter, 2001). 초기배 발달 동안 유전자 전반에 걸쳐 DNA 메틸화 수준이 낮아지며, 이는 Dnmt1의 결핍으로 인해 일어나는 것으로 알려져 있다(Howlett과 Reik, 1991; Monk 등, 1991; Carlson 등, 1992; Rougier 등, 1998). 이러한 현상은 난자의 전능성 획득에 중요한 필수적인 과정으로 여겨지고 있다. 체세포에서와 같이 수정 직전 정자와 난자의 DNA는 높은 수준으로 메틸화 되어 있으나, 수정 후 급격한 변화를 겪게 된다. 정자의 경우, 수정 후 첫

\* 이 논문은 2006년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2006-311-F00018).

\* Corresponding author : Phone: +82-33-250-8659, E-mail: htcheong@kangwon.ac.kr

번째 DNA 복제 시기에 급격히 탈메틸화가 일어나지만 자성전핵의 경우는 옹성전핵에서와 같은 재프로그래밍 과정을 거치지 않아 접합자시기에 정자 유래 핵과 난자 유래 핵은 서로 다른 재프로그래밍 양상을 보인다(Dean 등, 2001; Santos 등, 2002).

본 연구는 돼지난자를 이용하여 모계 유전자로만 이루어진 단위발생란과 자성 및 옹성 유전자로 이루어진 체외수정란에서의 초기 방추 형성 과정과 전핵시기 및 이후 발육 단계별 메틸화의 변화 양상을 검토하기 위해 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 난포란의 채취 및 성숙배양

도축장에서 도살된 암태지의 난자를 회수하여 25~30°C의 생리식염수 용액에 넣어 실험실로 운반하여 직경이 3~6 mm의 난포로부터 18 G 주사바늘이 부착된 주사기로 난포액을 흡입하여 채란하고, 채취된 난자를 0.1%(w/v) polyvinyl alcohol(PVA, Sigma, St. Louis, MO, USA)이 첨가된 Tyrode's lactate (TL)-Hepes액으로 3번 세척한 뒤 실험실 미경하에서 난구세포가 균일하고 세포질이 균질한 것만을 선별하여 난자성숙에 공시하였다. 난포란의 성숙배양을 위해 0.6 mM cysteine(Sigma), 10 ng/ml EGF(Sigma), 10 IU/ml pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG), human chorionic gonadotropin(hCG), 10%(v/v) porcine follicular fluid(PFF)가 첨가된 NCSU-23 배양액 500  $\mu$ l의 소적을 만들어 paraffin oil로 피복하고 성숙배양 2~3시간 전에 5% CO<sub>2</sub>, 39°C 온도조건하에서 평형시켰다. 각 소적당 100개의 난포란을 넣어 22시간 배양하고, 이후 호르몬이 첨가되지 않은 배양액으로 옮겨 20시간 동안 배양하였다.

### 체외수정

정액은 영서AI센터에서 채취한 것을 받아 17°C 냉장고에서 보관하였다. 보관된 정액은 900  $\times$ g에서 5분간 1회 원심분리 후 정자 세척액(DPBS(-), 0.1% BSA, 100  $\mu$ g/ml penicillin-G, 75  $\mu$ g/ml streptomycin)으로 2회 원심분리하여 세척하였다. mTBM(113.1 mM NaCl, 3.0 mM KCl, 7.5 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 20.0 mM tris, 11.0 mM glucose, 5.0 mM Na-pyruvate)을 기본 배양액으로 하여 1 mM caffeine(Sigma), 0.1% BSA를 첨가한 수정 소적(50  $\mu$ l)에 0.3% hyaluronidase(Sigma)를 이용하여 난구세포를 제거한 성숙난자를 소적당 15개씩 넣은 후 정자의 최종 농도가 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 정자/ml 이 되도록 정자를 주입하여 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 6시간 배양하였다.

### 단위발생

성숙된 난자의 활성화를 유기하기 위하여 0.3% hyaluronidase를 이용하여 난구세포를 제거한 후 융합액(300 mM mannitol, 0.1% PVA, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM MgSO<sub>4</sub>)에서 150 V/mm, 30  $\mu$ sec, 1회의 조건으로 제 1차 활성화 자극을 주고 mTCM(TCM-199, 0.1% PVA, 3.05 mM D-glucose, 0.91 mM Na-pyruvate, 25.07 mM NaHCO<sub>3</sub>, 25 mM Hepes, 75  $\mu$ g/ml penicillin-G, 50  $\mu$ g/ml streptomycin,

0.57 mM cysteine) 소적에서 1시간 배양하였으며, 이후 100 V/mm, 50  $\mu$ sec, 2회의 조건으로 제 2차 활성화 자극을 준 후 6-dimethylaminopurine(Sigma)에서 4시간 배양하였다.

### 체외배양

체외수정란 및 단위발생란은 paraffin oil로 피복된 50  $\mu$ l의 PZM-3(Yoshioka 등, 2002) 소적으로 옮겨 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 6일간 배양하며 시험에 공시하였다.

### 면역형광염색을 통한 핵형 및 Tubulin 관찰

체외수정란 및 단위발생란의 tubulin 관찰을 위하여 체외수정 및 활성화 처리 후 20시간에 각각 40~150여개씩 고정 및 염색하였다. 고정은 4%(w/v) paraformaldehyde가 첨가된 PBS로 30분간 처리하였으며, 고정된 난자는 3%(w/v) BSA가 첨가된 PBS를 이용하여 4°C에서 2~7일간 저장한 후, 투과성을 높이기 위해 0.1% Triton X-100과 3%(w/v) BSA가 첨가된 PBS로 37°C에서 30분간 처리하였다. 이후 0.01% Triton X-100이 첨가된 PBS로 2~3회 세척하고, blocking 액(150 mM glycine, 0.3% BSA가 첨가된 PBS)으로 37°C에서 30분간 처리하였다. 미세관의 관찰을 위해 mouse monoclonal antibody against  $\beta$ -tubulin(Sigma)과 Alaxa-488 goat anti-mouse IgG(Molecular Probes, Eugene, OR, USA)을 각각 37°C에서 1시간 처리하였다. 중심체의 관찰을 위해 rabbit monoclonal antibody against  $\gamma$ -tubulin(Sigma)과 Alaxa-546 goat anti-rabbit IgG(Molecular Probes)을 각각 37°C에서 1시간 처리하였다. DNA를 염색하기 위하여 2  $\mu$ g/ml의 hoechst 33342 내에서 30분간 배양하였다. 미세관과 DNA가 염색된 난자를 slide glass로 옮겨 Vecta-Shield anti-fade(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)로 피복하고 cover slip으로 덮어 표본을 제작하였다. 제작된 표본은 공초점주사현미경(laser-scanning confocal microscope; Zeiss LSM 510, Jena, Germany)을 이용하여 미세관과 핵의 형태를 관찰하였다.

### Confocal Microscopy를 이용한 메틸화 검사

DNA 메틸화 양상의 검사는 Kwon 등(2008)의 방법에 의하여 실시하였다. 단위발생 및 체외수정란을 각 발육 단계별로 각각 20~30여개씩 실온에서 4% (w/v) paraformaldehyde가 첨가된 PBS로 15분간 고정하였다. 고정된 난자는 투과성을 높이기 위해 0.2% Triton X-100이 첨가된 PBS로 실온에서 15분간 처리하였다. 이후 5-methylcytidine(5-MeCyd)을 관찰하기 위하여 2M HCl로 30분간 처리한 후 100 mM Tris-HCl(pH 8.5)로 10분간 중화시켰다. 처리된 난자는 0.05% Tween-20이 첨가된 PBS로 30분간 세척하고, 1%(w/v) BSA 및 0.05% Tween-20이 첨가된 PBS를 이용하여 4°C에서 1~7일간 저장하였다. 5-MeCyd를 염색하기 위하여 mouse anti 5-methylcytidine(Serotec Ltd, Oxford, UK)를 PBS액으로 희석하여(1:50) 37°C에서 1시간 처리한 후 2~3회 세척하였다. 이후 1:100으로 희석된 Alaxa-488 goat anti-mouse IgG (Molecular Probes)로 37°C에서 40분간 처리한 후 2~3회 세척하였다. 염색질을 염색하기 위하여 2  $\mu$ g/ml의 hoechst 33342 내에서 30분간 배양하였다. 이후 slide glass로 옮겨 Vecta-Shield anti-fade (Vector Laboratories)로 피복하고 cover slip으로 덮어 표본을 제작

하였다. 제작된 표본은 공초점주사현미경(laser-scanning confocal microscope; Zeiss LSM 510)을 이용하여 5-MeCyd와 핵의 형태를 관찰하였다. DNA와 메틸화의 양적 분석을 위하여 Image J 1.37v의 LSM reader를 이용하였다.

통계 처리

체외수정란 및 단위발생란의 메틸화 양상에 대한 결과는 statistical analysis system(SAS)의 ANOVA를 이용하여 통계처리 하였으며, Duncan 다중검정을 통해 유의성을 검증하였다.

결 과

체외수정란 및 단위발생란의 미세관 형태

체외수정 및 단위발생란의 유사분열 진행과정에 따른 핵과 미세관의 형태를 검토한 결과(Fig. 1과 2), 체외수정란의 경우 유사분열중기에  $\beta$ -tubulin(Fig. 1C2)과 함께  $\gamma$ -tubulin spot 형태의 MTOC(Fig. 1C3)가 관찰되어 정자 유래 중심체가 형성되는 것을 확인할 수 있었으나, 단위발생란의 경우는  $\gamma$ -tubulin spot 형태의 MTOC는 관찰되지 않았고 대신 핵 주변에 작고 많은 무중심체성 방추(acentrosomal spindle)가 형성되었으며(Fig. 2 B3), 이것이 유사분열 중기 핵의 양극으로 뭉쳐 기능적인 MTOC의 역할을 수행하였다(Fig. 2 C3).

체외수정란 및 단위발생란의 메틸화 양상

발육단계별 체외수정란과 단위발생란의 메틸화 양상을 공초점주사현미경으로 분석한 결과(Fig. 3), 1 세포기에서는 체외수정란 및 단위발생란 모두 50% 전후의 높은 메틸화 정도가 나타났다. 단위발생란의 경우, 2세포기로 발달하면서 급격한 탈메틸화가 일어났으나, 이후 단계에서는 추가적인 탈메틸화 없이 수정란에서보다 메틸화 수준이 높게 유

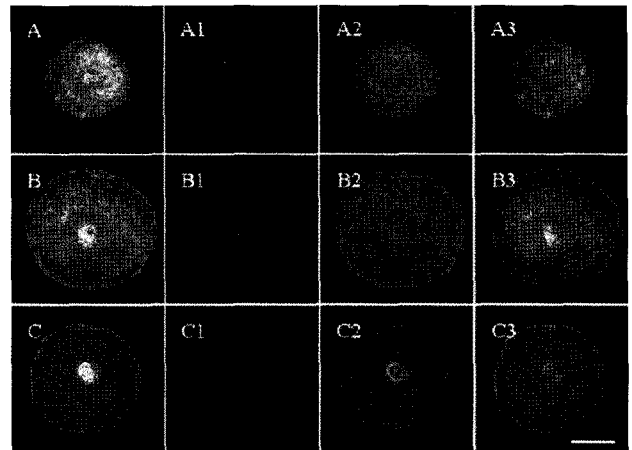


Fig. 2. Distribution of microtubules in the first mitotic phase of parthenotes. A) Interphase. B) Prophase. C) Metaphase. A~C) Merged images, A1~C1) DNA (blue), A2~C2)  $\beta$ -tubulin (green), A3~C3)  $\gamma$ -tubulin (spindle aster; MTOC, red). Scale bar indicates 50  $\mu$ m.

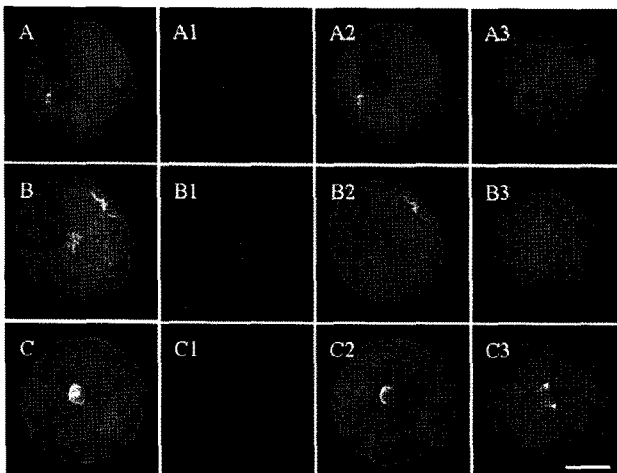


Fig. 1. Distribution of microtubules in the first mitotic phase of IVF embryos. A) Interphase. B) Prophase. C) Metaphase. A~C) Merged images, A1~C1) DNA (blue), A2~C2)  $\beta$ -tubulin (green), A3~C3)  $\gamma$ -tubulin. Arrow heads show  $\gamma$ -tubulin spots (MTOC). Scale bar indicates 50  $\mu$ m.

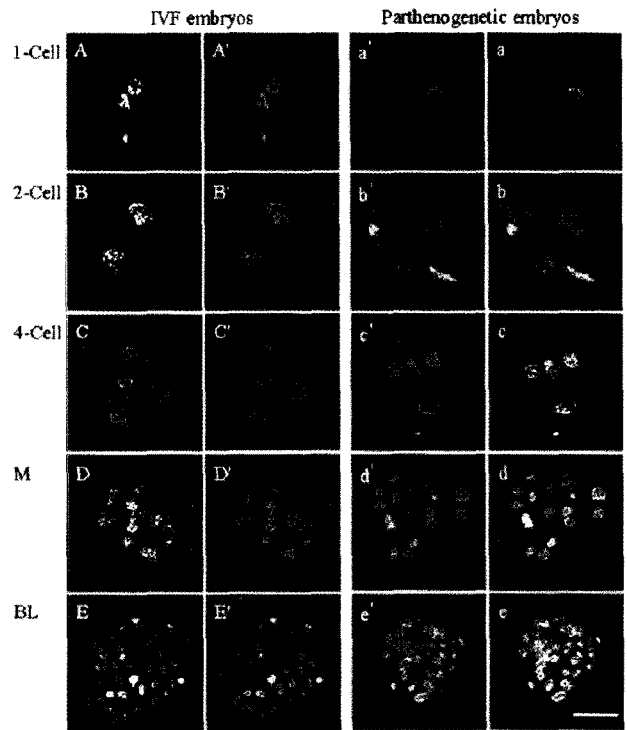
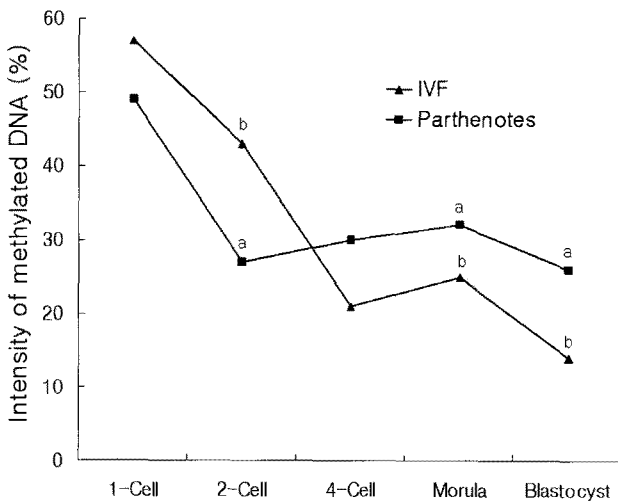


Fig. 3. Methylation patterns in IVF and parthenogenetic embryos at various developmental stages. Nucleus (blue) and 5-MeC (green) were visualized using laser scanning confocal microscopy. M, morula; BL, blastocyst. A~E and a~e are merged images. Scale bar indicates 50  $\mu$ m.

지되었다. 이와는 달리 체외수정란에서는 4세포기까지 급격한 탈메틸화가 일어나 단위발생란의 탈메틸화 수준과 역전되었고, 상실배기부터는 단위발생란에 비해 유의적으로 낮은 탈메틸화 수준을 나타내어 배반포기에서 가장 낮은 탈메틸화 수준을 나타내었다(Fig. 4).



**Fig. 4. Methylation levels in IVF and parthenogenetic embryos at various developmental stages.** The methylation intensity in IVF and parthenogenetic embryos at various developmental stages are presented as methylated DNA/total DNA intensity. <sup>ab</sup>Different letters indicate significant differences within a stage ( $p < 0.05$ ).

## 고 찰

세포분열 시 중요한 역할을 하는 중심체는 대부분의 동물 세포에 존재한다. 중심체의 대부분은 pericentrin과  $\gamma$ -tubulin으로 이루어져 있으며(Gould와 Borisy, 1977; Stearns 등, 1991), MTOC로써 기능하여 염색체 분리시 미세관이 형성된다. 최근 마우스 난자의 성숙 시 방추미세관의 형성 과정에 관한 연구에서, 제1감수분열 시기의 난자에서 NEBD가 일어나기 전에 80개 이상의 방추성상체(spindle aster)가 관찰되었으며, 전기(prophase) 시기를 거쳐 이러한 방추성상체들이 염색체의 양 극으로 합쳐져 분열 중기의 방추극이 형성됨을 보고하였다(Schuh와 Ellenberg, 2007). 돼지 단위발생 및 감수분열 시기에서의 방추미세관의 형성 양상과는 달리, 돼지 수정란의 경우 정자 두부의 신장 이후 정자로부터 유래한 방추성상체(중심체)가 전핵의 양 극에 형성되었으며, 중기(metaphase)의 양극에 방추미세관이 형성되었다(Schatten 등, 1992; Kim 등, 1996; Holy와 Schatten, 1997). 본 연구의 결과, 돼지 단위발생란의 경우, 마우스 난자의 성숙시기에서와 같이 제1세포주기의 유사분열 전기에 핵 주위의 세포질에 많은 방추성상체가 관찰되었으며, anaphase A 시기에는 중심체성 방추성상체가 없는 양극의 미세관망이 관찰되었다.

유전자각인(Genomic imprinting)은 DNA 메틸화, histone의 변화, noncoding RNA 및 특수한 염색체의 구조에 의해 조절되며, 특히 DNA 메틸화가 주요 요인으로 여겨지고 있다(Lewis 등, 2004). 마우스의 단성수정란(uniparental embryos)을 이용한 연구에서 부계 유전자는 배 외막 조직의 발달에 관여하는 반면, 모계 유전자의 경우는 태아의 발달에 필수적인 것으로 나타났으며, 이는 부계 또는 모계 유전자에서의 다른 유전자각인에 의한 결과로 사료되고 있다(Surani 등, 1984). 본 연구에서 단위발생란의 경우 2세포기 이후에 추가적인 탈메틸화가 일어나지 않고 배반포기까지

높은 수준으로 유지되었다. 특히 배성 유전자 활성화(genomic activation)이 일어난다고 알려진 4세포기 시기에서조차 체외수정란에서보다 높은 메틸화 수준을 유지하고 있어 이후 발육에 관련된 여러 유전자들의 발현이 억제되는 것으로 사료된다. 체외수정란의 경우, 자성전핵과 웅성전핵에서의 탈메틸화 양상이 다르게 나타나는 것으로 보고되었다(Dean 등, 2001). 마우스의 경우, 수정 직후 첫 번째 DNA 복제 이전 시기에 웅성 전핵에서만 탈메틸화 현상이 급격하게 일어나, 이후 핵의 전능성 획득에 있어 중요한 과정일 것으로 추측하고 있다(Santos 등, 2002). 또한, 토끼와 양의 경우 수정 직후 자성·웅성 전핵 모두에서 높은 메틸화 양상이 나타났으며, 소의 경우 부분적으로 탈메틸화가 일어나는 것으로 보고되었다(Beaujean 등, 2004; Shi 등, 2004). 본 연구의 결과, 접합자 시기에서는 체외수정란 및 단위발생란 모두 높은 메틸화 양상을 보여, 수정 후 정자 유래 핵의 탈메틸화 양상은 종에 따라 다르게 일어나는 것으로 사료된다. 체외수정란의 경우, 배성 유전자 활성화 시기인 4세포기에 급격한 탈메틸화가 일어났으며 이후 배반포기에서 가장 낮게 나타났다. 마우스 배반포의 경우 내부 세포괴(ICM: inner cell mass)에서만 새로운 메틸화가 일어나는 것으로 밝혀져 이후 세포 특성이 구별되는 중요한 작용으로 사료되고 있다(Santos 등, 2002). 본 연구에서 단위발생란의 배반포에서는 모든 분할구에서 비슷한 메틸화 수준이 관찰되었으나, 수정란의 경우 분할구에 따라 불균질적인 메틸화 양상이 관찰되어, 마우스 수정란과 같이 배반포기에 세포 특성이 구별되어 있음을 시사한다.

## 인용문헌

1. Beaujean N, Taylor J, Gardner J, Wilmut I, Meehan R, Young L (2004): Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod* 71:185-193.
2. Carlson LL, Page AW, Bestor TH (1992): Localisation and properties of DNA methyltransferase in preimplantation mouse embryos: Implications for genomic imprinting. *Genes Dev* 6:2536-2541.
3. Dean W, Santos M, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, Reik W (2001): Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci* 98:13734-13738.
4. Gould RR, Borisy GG (1977): The pericentriolar material in Chinese hamster ovary cells nucleates microtubule formation. *J Cell Biol* 73:601-615.
5. Holy J, Schatten G (1997): Recruitment of maternal material during assembly of the zygote centrosome in fertilized sea urchin eggs. *Cell Tissue Res* 289:285-297.
6. Howlett SK, Reik W (1991): Methylation levels of maternal and paternal genomes during preimplantation development. *Development* 113:119-127.
7. Kim NH, Simerly C, Funahashi H, Schatten G, Day BN (1996): Microtubule organization in porcine oocytes during fertilization and parthenogenesis. *Biol Re-*

- prod 54:1397-1404.
8. Kwon DJ, Park CK, Yang BK, Cheong HT (2008): Control of nuclear remodelling and subsequent *in vitro* development and methylation status of porcine nuclear transfer embryos. *Reproduction* 135:649-656.
  9. Latham KE, Rambhatla L, Hayashizaki Y, Chapman VM (1995): Stage-specific induction and regulation by genomic imprinting of the mouse U2afbp-rs gene during preimplantation development. *Dev Biol* 168:670-676.
  10. Le Guen P, Crozet N (1989): Microtubule and centrosome distribution during sheep fertilization. *Eur J Cell Biol* 48:239-249.
  11. Lewis A, Mitsuya K, Umlauf D, Smith D, Dean W, Walter J, Higgins M, Feil R, Reik W (2004): Imprinting on distal chromosome 7 in the placenta involves repressive histone methylation independent of DNA methylation. *Nat Genet* 36:1291-1295.
  12. Long CR, Pinto-Correia C, Duby RT, Ponce De Leon FA, Boland MP, Roche JF, Robl JM (1993): Chromatin and microtubule morphology during the first cell cycle in bovine zygotes. *Mol Reprod Dev* 36:23-32.
  13. Monk M, Adams RL, Rinaldi A (1991): Decrease in DNA methylase activity during preimplantation development in the mouse. *Development* 112:189-192.
  14. Reik W, Walter J (2001): Genomic imprinting: Parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2:21-32.
  15. Rougier N, Bourchis D, Gomes DM, Niveleau A, Plachot M, Paldi A, Viegas-Pequignot E (1998): Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. *Genes Dev* 12:2108-2113.
  16. Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W (2002): Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* 241:172-182.
  17. Schatten H, Walter M, Biessmann H, Schatten G (1992): Activation of maternal centrosomes in unfertilized sea urchin eggs. *Cell Motil Cytoskeleton* 23:61-70.
  18. Schuh M, Ellenberg J (2007): Self-organization of MTOCs replaces centrosome function during a centrosomal spindle assembly in live mouse oocytes. *Cell* 130:484-498.
  19. Shi W, Dirim F, Wolf E, Zakhartchenko V, Haaf T (2004): Methylation reprogramming and chromosomal aneuploidy in *in vivo* fertilized and cloned rabbit preimplantation embryos. *Biol Reprod* 71:340-347.
  20. Stearns T, Evans L, Kirschner M (1991):  $\gamma$ -Tubulin is a highly conserved component of the centrosome. *Cell* 65:825-836.
  21. Surani MA (1998): Imprinting and the initiation of gene silencing in the germ-line. *Cell* 93:309-312.
  22. Surani MA, Barton SC, Norris ML (1984): Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 308:548-550.
  23. Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka I, Anas IMK, Iwamura S (2002): Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol Reprod* 66:112-119.
- (접수일자: 2009. 1. 30 / 채택일자: 2009. 3. 11)