

한우 체외성숙란의 단위발생에 대한 전기자극의 효과

노규진 · 공일근* · 광대오** · 이효종 · 최상용 · 박충생*

경상대학교 수의학과

Effect of Electric Stimulation on Parthenogenesis of *In Vitro* Matured Oocytes from Korean Native Cows

G. J. Rho, I. K. Kong*, D. O. Kwack, H. J. Lee, S. Y. Choe and C. S. Park***

Department of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

SUMMARY

The suitable electric stimulation is essential for activation and fusion of oocytes before or after nuclear transplantation. The present study was undertaken to determine the optimal condition for the parthenogenetic activation of *in vitro* matured (IVM) bovine oocytes by electric stimulation. Different direct current (DC) electric voltage of 1.0, 1.5 and 2.0 kV/cm and pulse duration of 30, 60 and 120 μ sec were applied to the IVM oocytes in 0.3 M mannitol solution containing each 100 μ M CaCl₂ and MgCl₂. IVM oocytes at 24, 28 and 32 hours post-maturation (hpm) were also electrically stimulated at 1.5 kV/cm, for 60 μ sec. The stimulated oocytes were then co-cultured in TCM-199 solution containing 10% fetal calf serum with bovine oviductal epithelial cells for 7~9 days in a 5% CO₂ incubator at 39°C. Their activation and *in vitro* development to morula and blastocyst were assessed under an inverted microscope. The higher activation rates 62.8 and 63.4% and *in vitro* development rates to morula and blastocyst 5.1 and 10.9% were shown in the oocytes stimulated at the voltage of 1.0 and 1.5 kV/cm than 2.0 kV/cm, respectively. No significantly ($P < 0.05$) different activation rate was shown in IVM oocytes stimulated for 30, 60 and 120 μ sec, but developmental rates to morula and blastocyst was significantly ($P < 0.05$) higher in the oocytes stimulated for 30 μ sec (6.3%) and 60 μ sec (10.0%) than 120 μ sec (0.0%). The aged oocytes at 28 and 30 hpm showed significantly ($P < 0.05$) higher activation rates (72.7 and 79.7%) than the oocytes at 24 hpm (50.9%). Also, their developmental rates to morula and blastocyst were significantly ($P < 0.05$) higher in the oocytes at 28 (14.3%) and 32 hpm (15.9%) than 24 hpm (3.6%). From these results, it can be suggested that the optimal electric stimulation for IVM bovine oocytes is a DC voltage between 1.0 and 1.5 kV/cm, pulse duration of 30 or 60 μ sec, and the optimal age of IVM oocytes for electric activation is at 32 hpm.

Key words: parthenogenesis, *in vitro* maturation, oocytes and cattle

* 경상대학교 축산학과 (Department of Animal Science, Gyeongsang National University)

** 경상대학교 과학교육과 (Department of Science Education, Gyeongsang National University)

서 론

전능한(totipotent) 시기에 있는 수정란으로 부터 분리된 개개의 모든 핵을 공핵란으로 이용해서 탈핵된 난자에 이식하여 생산된 핵이식배는 유전적으로 동일한 형질을 가지게 되며, 이렇게 복제된 배는 유익한 유전자를 함유할 수 있다는 장점을 가지고 있기 때문에 핵이식응용기법은 종축개량을 위해서 가장 좋은 방법 중에 하나이다. 1983년 McGrath와 Solter가 포유류인 생쥐에서 핵이식을 성공시킨 이래, rat(Kono 등, 1988), 토끼(Lee 등, 1994; Collas와 Robl, 1990; Stice와 Robl, 1988), 돼지(Prather 등, 1987) 그리고 양(Smith와 Wilmut, 1989; Willadson, 1986) 등에서도 핵이식에 의한 산자를 생산하는데 성공함으로써 핵이식 기술의 응용으로 복제동물의 생산 가능성이 입증되었다.

이러한 핵이식의 목적을 달성하기 위해서는 수핵란의 활성화와 핵-세포질의 융합이 필수적으로 선행되어야만 한다. 다른 포유류의 난자와 유사하게소에 있어서도 세포분열 제 2중기에서 배란되며, 배란된 난자는 정자에 의한 수정이나 인공자극 등에 의한 자극이 있기 전까지는 감수분열 정지현상을 보이고 있다.

난자의 활성화를 유도하기 위해서는 물리·화학적 자극 즉, ethanol(Presicce와 Yang, 1994; Minamihashi 등, 1993; Lee 등, 1992; Nagai, 1987), 삼투압조절(Rickords와 White, 1992), hyaluronidase 등을 이용한 효소처리(Lee 등, 1992; Kaufman, 1973), Ca^{2+} ionophore 처리(Aoyagi 등, 1992; Ware 등, 1989) 및 전기적 방법(Lee 등, 1993; Onodera와 Tsunoda, 1989; Collas 등, 1989; Kono 등, 1989; Zimmermann과 Vienken, 1982) 등이 응용 연구되어 왔고, 핵-세포질의 융합은 미세외과적 방법(Illmense와 Hoppe, 1981)과 Sendai virus 매개에 의한 방법(McGrath와 Solter, 1983) 등이 개발되어 사용되어 왔으나 Sendai virus 매개에 의한 방법은 쥐 이외의 다른 포유류에서는 그 효과가 규명되지 않고 그 효율이 낮아 효과적이지 못하며, 전기적 자극은 막투과성 변화를 일으키며(Zimmermann과 Vienken, 1982) 그 반응은 빠르

고 수정시와 같은 완전한 포충립반응을 유도할 뿐만 아니라 수핵난자와 공핵할구의 융합에도 좋은 결과를 나타내기 때문에 난자의 활성화와 핵이식시 핵-세포질 융합을 유도하기 위해서 많이 응용되고 있다. 특히 수핵란은 분열 재개와 배발달주기를 시작하기 위해서는 활성화가 필수적이다. 활성화는 정상적인 수정에서 관찰이 되며, 이러한 활성화는 세포내 Ca^{2+} 의 상승으로 난자의 포충립반응과 투명대 반응에 기인된다는 견해가 지배적이다.

그러나 전기적 방법은 난자의 성숙도, 전압, 통전 시간 등에 따라 난자의 활성화율, 융합율 및 배발달율이 상이하게 나타난다. 핵이식의 생산성 효율을 상승시키기 위해서 다각적인 측면에서 연구가 진행되고 있지만, 아직까지 만족할 만한 성적은 기대하지 못하고 있는 실정이다. 따라서 본 실험에서는 수핵란의 활성화에 가장 적합한 난자의 성숙도, 전압 및 통전시간 등을 조사하여 핵이식기술에 대한 전기자극의 적정체계를 확립하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 체외성숙

본 실험에 사용된 한우 난소는 도살 직후 적출하여 penicillin G(100 units/ml)와 streptomycin(100 μ g/ml)이 함유된 생리식염수(25~28℃)에 넣어 2 시간 이내에 실험실로 운반하여 직경이 2~6 mm내의 난포에서 미성숙난포란을 채란하였으며, Wiemer 등(1991)의 방법에 준하여 난구세포층과 세포질의 충실도에 따라 Grade I, II 및 III으로 구분하고 본 실험에서는 Grade I만 선별하여 fetal calf serum(FCS; Gibco. Co., U. S. A.)이 10% 수준으로 첨가된 TCM-199(Earle's salt, 25 mM HEPES, Sigma Chem. Co., U. S. A.)에 sodium pyruvate(56 μ g/ml), streptomycin(100 μ g/ml), penicillin G(100 units/ml), amphotericin B(25 μ g/ml), LH(10 μ g/ml), estradiol-17 β (1 μ g/ml)와 FSH(35 μ g/ml)를 첨가하여 제조된 배양액을 4-well dish(Nunc)에 1ml씩 분주하여 CO₂ 배양기(39℃, 5% CO₂ in air)에서 최소한 18시간 이상 평형시킨 후 각 well당 10~15개의 미성숙난포란을 옮겨 넣은 후 22~24시간 배양하여 체외성숙을 유도

하여 공시난자로 사용하였다.

2. 난자의 활성화 자극

체외성숙된 난자의 난구세포를 hyaluronidase (300 IU/ml)가 함유된 phosphate buffered saline (PBS)에서 2~3분 처리후 pipetting으로 분리하고 100 μ M CaCl₂ 및 MgCl₂, 0.05 mg/ml BSA가 함유된 0.3 M mannitol 용액이 충전된 fusion chamber에 공시난자를 옮겨 두 전극 사이에 놓은 다음, 두 전극을 Embryonic Cell Fusion Equipment (EYELA, Co., Japan)에 장치하고 직류 전압은 1.0, 1.5 및 2.0 kV/cm에서, 통전시간은 30, 60 및 120 μ sec에서 1회의 통전횟수로 전기 자극을 가하였다. 난자의 성숙도에 따른 활성화율을 조사하기 위하여서는 체외성숙 후 24, 28 및 32시간의 난자를 전압 1.5 kV/cm, 통전시간은 60 μ sec 그리고 통전횟수는 1회로 고정하여 전기자극을 가하여 그에 따른 분할율 및 발달율을 비교, 조사하였다.

3. 난자의 체외배양

전기자극이 주어진 난자는 CO₂ 배양기(39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ in air)에서 TCM-199(10% FCS)배양액에 단층을 형성하고 있는 난관상피세포와 공배양하여 7~9일간 배양하였다. 배양액은 48시간 마다 신선 배양액으로 교환하였다.

4. 통계학적 분석

실험 결과의 통계학적 분석은 χ^2 -test를 실시하여 유의차를 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 전압에 따른 난자의 활성화 및 체외발달

전기자극을 받은 난자는 Ca²⁺ 이온이 형질막의 pore를 통해 난자내로 유입됨에 따라 활성화가 일어나며, 정상적인 수정반응에서도 난자내의 Ca²⁺ 농도가 일시적으로 상승된다(Fissore와 Robl, 1992). 따라서 Ca²⁺을 인위적으로 주입하거나, Ca²⁺ ionophore(Ware 등, 1989)를 이용해서 세포내 Ca²⁺ 이온의 일시적 농도 상승을 일으킴으로써 난자의 활성화가 진행되며(Collas 등, 1992; Ozil, 1990),

전기자극은 형질막의 분극을 일으켜 불안정화시키고 따라서 활성화를 유도하며(Knight 등, 1981), 또한 전기자극 자체는 Ca²⁺ 반응을 유도할 수 없고, 단지 Ca²⁺이 함유된 통전용액에서 Ca²⁺의 유입을 조절한다고 한다(Robl 등, 1992). Ca²⁺ 유입의 정확한 기전은 확실하게 알려져 있지 않지만, 전기자극에 의해 열려진 형질막 pore를 통해 일어난다는 것과 voltage-gated Ca²⁺ channel(Zimmerman과 Vi-enken, 1982)에 의해서 일어난다는 가설이 있다. 따라서 본 실험에서 체외성숙배양 후 28시간에 난구세포를 제거하고 100 μ M CaCl₂ 및 MgCl₂가 함유된 0.3 M mannitol 용액에 5분간 평형시킨 후 60 μ sec의 통전시간과 통전횟수를 1회로 고정하여 직류 전압을 1.0, 1.5 및 2.0 kV/cm로 전기자극을 가하여 활성화 및 체외발달을 조사하였다. 직류전압을 1.0 및 1.5 kV/cm를 가했을 때 난자의 활성화율은 62.8 및 63.4%, 후기배로의 발달율은 5.1 및 10.9%로 나타났으나, 전압을 2.0kV/cm로 올려서 자극한 경우에는 활성화율에서 38.8%로 저하되었고 후기배로 발달한 난자는 없었다(Table 1). 특히 2.0kV/cm에서 퇴행란의 발생이 증가되었다(미발표). 이러한 결과로써 높은 통전전압은 난자의 활성화와 발달에 나쁜 영향을 미치는 것으로 사료되며, 이는 1.5 kV/cm의 전압에서 토끼와 생쥐의 활성화율은 77과 78%, 배반포기배의 발달율은 25와 32%로 보고한 Onodera와 Tsunoda(1989)의 결과와 일치했다. 그러므로 체외성숙된 소 난자의 활성화를 위해서 전압의 범위는 1.0~1.5kV/cm가 적합할 것으로 기대된다.

2. 통전시간에 따른 난자의 활성화 및 체외발달

28시간 체외성숙시킨 난자를 1.5kV/cm의 직류 전압과 1회의 자극에서 30, 60 및 120 μ sec의 통전시간으로 전기자극을 가해 활성화율과 체외발달율을 조사하였다. 30, 60 및 120 μ sec의 통전시간에 따른 활성화율은 51.6, 61.5 및 52.3%로 각기 다른 통전시간에 대한 유의적 (P<0.05)인 차이는 없었고, 후기배로의 발달율에 있어서 30 및 60 μ sec의 통전시간에서는 6.3과 10.0%의 성적을 보였으나 120 μ sec의 통전시간에서는 후기배로의 발달을 볼 수 없었다(Table 2). 특히 120 μ sec의 통전시간에서 퇴

Table 1. Effect of electric voltage on activation and *in vitro* development of *in vitro* matured bovine oocytes

Electric voltage (kV/cm)	No. of eggs used	No. (%) of eggs activated	No (%) of eggs developed to /activated		
			2-cell	8-cell	Morula /Blastocyst
1.0	94	59(62.8) ^b	59(100)	18(30.5)	3(5.1) ^b
1.5	101	64(63.4) ^b	64(100)	24(37.5)	7(10.9) ^b
2.0	67	26(38.8) ^a	26(100)	5(19.2)	0(0.0) ^a

* Values with different superscripts were significantly different (P<0.05).

Pulse duration : 60 μ sec, pulse times : 1, activation time : 28 hours post-maturation

Table 2. Effect of pluse duration on activation and *in vitro* development of *in vitro* matured bovine oocytes

Pulse duration(μ sec)	No. of eggs used	No. (%) of eggs activated	No (%) of eggs developed to /activated		
			2-cell	8-cell	Morula /Blastocyst
30	62	32(51.6) ^a	31(100)	9(28.1)	2(6.3) ^b
60	65	40(61.5) ^a	40(100)	15(37.5)	4(10.0) ^b
120	44	23(52.3) ^a	23(100)	5(21.7)	0(0.0) ^a

* Values with different superscripts were significantly different (P<0.05).

Electric voltage : 1.5kV/cm, pulse times : 1, activation time : 28 hours post-maturation

Table 3. Effect of oocyte age on activation and *in vitro* development of *in vitro* matured bovine oocytes

Oocyte age (hrs. postmaturation)	No. of eggs used	No. (%) of eggs activated	No (%) of eggs developed to /activated		
			2-cell	8-cell	Morula /Blastocyst
24	55	28(50.9) ^b	28(100)	6(21.4)	1(3.6) ^b
28	77	56(72.7) ^a	56(100)	23(41.1)	8(14.3) ^a
32	79	63(79.7) ^a	63(100)	29(46.0)	10(15.9) ^a

* Values with different superscripts were significantly different (P<0.05).

Electric voltage : 1.5kV/cm, pulse duration : 60 μ sec, pulse times : 1

행란의 발생이 높게 나타났다(미발표). 이러한 결과는 전압을 높게 하거나 통전시간을 길게 하면 원형질막의 불안정과 세포질의 용해로 생존율이 감소된다고 한 Robl 등(1992), Smith 와 Wilmot(1989) 및 Clement-Sengwald(1989)(1989)의 보고와 같았다. 이는 1.5kV/cm의 전압으로 200 μ sec, 생쥐는 100 μ sec 통전시간으로 전기자극을 했을 때 가장 높은 활성화율과 배반포기배 발달율을 보고한 Onodera와 Tsunda(1989)의 결과와는 상이했지만, 토끼에서 1.5kV/cm의 전압으로 60 μ sec의 통전시간에서 가장 좋은 성적을 보고한 Lee 등(1994)의 결과와 일치하였다. 그러므로 소 난자의 활성화를 위해서는 1.0~1.5kV/cm의 직류전압에서 30~60 μ sec의 통전시간으로 전기자극을 가하는 것이 가장

좋은 활성화율과 배발달율을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

3. 성숙도에 따른 난자의 활성화 및 체외발달

다른 포유류의 난자와 유사하게 소에 있어서도 세포분열 제 2 중기에서 배란되며, 배란된 난자는 정자에 의한 수정이나 인공자극 등에 의한 자극이 있기 전까지는 감수분열 정지현상을 보이고 있다. 성숙된 난자는 cytostatic factor(CSF)나 c-mos 단백질 합성을 함성하여 maturation promoting factor(MPF)의 기능과 농도를 높게 유지하게 한다. 정상적인 수정반응에서 난자내 Ca²⁺농도의 일시적 상승으로 CSF를 낮추고 MPF를 비활성화시켜 감수분열 재개가 일어나며, 특히 CSF는 최근 배란된 난자

에서는 계속적으로 합성되지만, 다소 노화된 난자에서는 그렇지 않다. 그러므로 물리학적 자극에 의한 난자 활성화는 노화된 난자에서 빠르게 진행된다고 한다(Presicce와 Yang, 1994).

본 실험에서는 1.5kV/cm의 전압, 60 μ sec의 통전시간 및 1회의 자극으로 난자의 성숙도에 따른 활성화 및 체외발달율을 조사한 바, 체외성숙배양 후 24, 28 및 32시간이 진행된 난자의 활성화율은 50.9, 72.7 및 79.7%로써 28~32시간대의 난자에서 높게 나타났고, 체외발달율에 있어서도 3.6, 14.3 및 15.9%로써 28~32시간대의 난자에서 높은 발달율을 보였다. 이는 생쥐(Lee 등 1992; Collas 등, 1989), 토끼(Collas와 Robl, 1990), 소(Ware 등, 1989) 등의 보고에서 최근 배란된 난자보다 다소 노화된 난자에서 활성화율이 상승하였으며, 전기자극 이외의 활성화에 있어서도 Ca^{2+} ionophore 처리로써 체외성숙배양 후 30시간 진행된 난자에서 92%의 활성화율(Ware 등, 1989)과 7% ethanol 처리로써 체외성숙배양 후 34시간 진행된 난자에서 83%의 활성화율(Minamihashi 등, 1993)을 보고한 것과 유사한 결과를 보였다. 따라서 전기자극의 활성화효율을 상승시키기 위해서 체외성숙배양 후 28~32시간 진행된 난자를 이용하는 것이 효과적이라고 사료된다.

적 요

난자의 전기적 활성화에 대한 적정 통전전압과 통전시간 및 난자의 성숙시간을 조사하여, 핵이식 기법으로 체외성숙 난자를 수핵난자로 이용한 복제배 및 복제동물을 효율적으로 생산하기 위한 기초 자료를 제공코저 본 실험에 착수하였다. 체외성숙배양 후 28시간에 난구세포를 제거하고 100 μ M $CaCl_2$ 및 $MgCl_2$ 가 함유된 0.3M mannitol 용액에 5분간 평형시킨 후 60 μ sec의 통전시간과 통전횟수를 1회로 고정하여 직류전압을 1.0, 1.5 및 2.0 kV/cm로 전기자극을 가하여 활성화 및 체외발달율을 조사한 바, 1.0 및 1.5 kV/cm를 가했을 때 난자의 활성화율은 62.8 및 63.4%, 후기배로의 발달율은 5.1 및 10.9%로 나타났으나, 전압을 2.0 kV/cm로 올려서 자극한 경우에는 활성화율에서

38.8%로 저하되었고 후기배로 발달한 난자는 없었다. 28시간 체외성숙시킨 난자를 1.5kV/cm의 전압과 1회의 자극에서 30, 60 및 120 μ sec의 통전시간에 따른 활성화율은 5.16, 6.15 및 52.3%로 각기 다른 통전시간에 대한 차이는 없었지만, 후기배로의 발달율에 있어서 30 및 60 μ sec의 통전시간에서는 6.3과 10.0%의 성적을 보였으나 120 μ sec의 통전시간에서는 후기배로의 발달을 볼 수 없었다. 난자의 성숙도에 따른 활성화 및 체외발달율을 조사한 바, 체외성숙배양 후 24, 28 및 32시간이 진행된 난자의 활성화율은 50.9, 72.7 및 79.7%로써 체외성숙 후 28~32 시간대의 난자에서 높게 나타났고, 체외발달율에 있어서도 3.6, 14.3 및 15.9%로써 28~32시간대의 난자에서 높은 발달율을 보였다.

그러므로 소 체외수정란을 이용한 복제배의 효율적 생산을 위한 난자의 전기자극에 의한 활성화는 체외성숙배양 후 28~32시간 성숙된 난자를 1.5kV/cm의 전압과 60 μ sec의 통전시간에서 실시하는 것이 적합하다고 사료된다.

참고문헌

- Aoyagi Y, Kameyama and Takeda T. 1992. Artificial activation of bovine oocytes matured *in vitro* by electric shock or exposure to ionophore A23187. *Theriogenology* 37:188 (Abstr.).
- Collas P, Balise JJ, Hofmann GA and Robl JM. 1989. Electrical activation of mouse oocytes. *Theriogenology* 32:835-844.
- Collas P, Robl JM. 1990. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. *Biol. Reprod.* 43:877-884.
- Collas P, Balise JJ, Hofmann GA and Robl JM. 1992. Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 46:492-500.
- Clement-Sengewald A and Brem G. 1989. Electrofusion parameters for mouse two-cell embryos. *Theriogenology* 32:159-169.

- Fissore RA and Robl JM. 1992. Intracellular Ca^{2+} response of rabbit oocytes to electrical stimulation, *Mol. Reprod. Dev.* 32:9-16.
- Illmense K and Hoppe PC. 1981. Nuclear transplantation in *Musculus*: Developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell* 23:9-18.
- Kaufman MH. 1973. Parthenogenesis in the mouse. *Nature* 242:457-476.
- Knight DE. 1981. Rendering cells permeable by exposure to electric fields. *Techniques in Cellular Physiology*. Elsevier North Holland Scientific Publishers Ltd. 113:1-20.
- Kono T, Shioda Y, Tsunoda Y. 1988. Nuclear transplantation of rat embryos. *J. Exp. Zool.* 248:303-305.
- Kono T, Iwasaki S and Nakahara T. 1989. Parthenogenetic activation by electric stimulus of bovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 32:569-577.
- Lee HJ, Ha DS, Kang TY and Choi MC. 1992. Parthenogenetic development of mouse eggs I. Parthenogenetic activation by ethanol and hyaluronidase treatments. *Korean J. Vet. Res.* 32:663-669.
- Lee HJ, Choi MC, Park CS, Yun CH and Kang DJ. 1993. Study on production of cloned animals by recycling nuclear transplantation I. Activation of nuclear recipient oocytes by electrostimulation in rabbits. *Korean J. Emb. Trans.* 8:151-157.
- Lee HJ, Jeon BG, Yun HJ, Lee KM, Song SH, Kong IK, Rho GJ, Choi MC, Choe SY and Park CS. 1994. Production of cloned rabbits by nuclear transplantation (in press).
- McGrath J and Solter D. 1983. Nuclear transplantation in mouse embryos by microsurgery and cell fusion. *Science* 220:1300-1302.
- Minamihashi A, Watson AJ, Watson PH, Church RB and Schultz GA. 1993. Bovine parthenogenetic blastocysts following *in vitro* maturation and oocyte activation with ethanol. *Theriogenology* 40:63-76.
- Nagai T. 1987. Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes *in vitro* with ethanol. *Gamete Res.* 16:243-249.
- Onodera M and Tsunoda Y. 1989. Parthenogenetic activation of mouse and rabbit eggs by electric stimulation *in vitro*. *Gamete Res.* 22:277-283.
- Ozil JP. 1990. The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation. *Development*. 109:117-127.
- 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. Development*. 37:61-68.
- Prather RS, Barnes FL, Sims MM, Robl JM, Eyestone WH and First FL. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryo. Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.* 37:859-866.
- Rickords LF and White KI. 1992. Electroporation-induced intracellular Ca^{2+} flux and its effect on murine oocyte activation. *Mol. Reprod. Dev.* 31:152-159.
- Robl JM, Collas P and Fissore R. 1992. Electrically induced fusion and activation in nuclear transplant embryos. In 'Guide to electroporation and electrofusion' (Chang DC, Chassy BM and Saunders JA, eds.) Academic Press, Inc., San Diego. pp. 535-551.
- Smith LC and Wilmut I. 1989. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development *in vivo* of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol. Reprod.* 40:1027-1035.
- Stice SL and Robl JM. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos.

- Biol. Reprod. 39:657-664.
- Ware CB, Barnes FL, Meike-Laurila M and First NL. 1989. Age dependence of bovine oocyte activation. Gamete Res. 22:265-275.
- Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, McKenna AI, Fick GH and Schultz GA. 1991. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. Mol. Reprod. Dev. 30:330-338.
- Willadsen SM. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. Nature 320:63-65.
- Yang X. 1991. Embryo cloning by nuclear transfer in cattle and rabbit. Emb. Trans. Newslett. 9:10-22.
- Zimmermann U and Vienken J. 1982. Electric field-induced cell-to cell fusion. J. Membr. Biol. 67:165-182.