

활성화된 수핵란을 이용한 핵이식기법의 개선

윤희준 · 이효중* · 최상용* · 박충생**
경상대학교 축산진흥연구소

An Improved Method to Prepare Activated Cytoplasts for Use of Nuclear Transplantation in Rabbits

X. J. Yin, H. J. Lee, S. Y. Choe and C. S. Park**
Institute for Development of Livestock Production, Gyeongsang National University

SUMMARY

Enucleation of oocytes is an important limiting step for embryo cloning. We propose an enucleation technique based on the removal of chromatin after oocyte activation by aspirating the second polar body containing complemented chromatin. In a preliminary experiment to determine an optimal age of oocytes enucleation in rabbits, oocytes were enucleated at 15~20 hours post hCG. Recently ovulated oocytes were enucleated at a higher rate than aged oocytes. Microsurgical removal of the complemented chromatin in the second polar body was significantly more effective in enucleating than aspiration of a larger cytoplasm volume surrounding the first polar body of metaphase-arrested oocytes(96.8% versus 70.4%; $P < 0.05$). Moreover, compared with a nuclear transplantation protocol based on enucleation of metaphase-arrested oocytes and preactivated oocytes followed by treatment with 5 μ M ionomycin for 5 min and 2 mM DMAP for 1 hr, there was no significant difference in the rate of blastocyst development. The ease with which modified technique can be performed is likely to render this technique widely useful for research and practice on mammalian cloning.

(Key words : enucleation, oocyte activation, ionomycin, DMAP, nuclear transfer, rabbit)

서 론

1952년 Briggs와 King이 개구리에서 처음으로 핵이식산자를 보고한 이래, 생쥐(Choe 등, 1992),

토끼(이 등, 1994), 양(Willadsen, 1986), 돼지(Prather 등, 1989)와 소(Robl 등, 1987)에서도 핵이식에 의한 산자가 보고되어 복제동물의 생산 가능성이 입증되었으며 오늘날에는 계대배양한

* 경상대학교 수의과대학 수의학과(Department of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University)

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

† 본 연구는 1997~1998년 농림부 첨단기술개발과제 연구비에 의하여 연구되었음.

stem cell이나 (Campbell 등, 1996) 체세포인 유선 세포핵을 이용하여 (Willmut 등, 1997) 복제양을 생산하기에 이르렀다. 그러나 핵이식 기술은 수핵란의 탈핵, 핵의 주입 등 숙련된 미세조작을 요구하고 있으며 작출한 수정란을 이식시 낮은 산자률을 나타내어 실용화를 제한하고 있다(Kruip와 den Daas, 1997).

성숙된 난자는 maturation promoting factor (MPF)를 높게 유지하고 있으며 이는 핵막의 소실(nuclear envelope breakdown)과 염색체의 응축(chromatin condensation)을 유기한다(Nurse, 1990). 수정이나 외부의 활성화 작용으로 난자를 활성화시 난자내의 MPF는 활성이 떨어지며 난자는 간기로 전이한다. 또 정상상태의 대부분의 상질배 단계의 할구는 세포 분열간기에 와 있으므로 활성화된 난자에 핵이식시 핵막의 소실이나 염색체 응축과 같은 핵에 좋지 않은 영향으로 인정되는 작용을 피할 수 있다고 보고하고 있다(Barnes 등, 1993; Campbell 등, 1993). 이러한 측면에서 면양에서는 MPF가 떨어진 활성화된 난자를 사용하여 높은 배반포 발달률을 얻었으며, 산자 생산에도 성공하였으며(Campbell 등, 1993), 소에서는 Aoyagi 등(1994), Kono 등(1994) 및 Stice 등(1994, 1996) 도 탈핵된 M II기 난자를 인위적으로 활성화 자극을 준 다음, 이것을 수핵란으로 사용할 때 성숙된 M II기의 난자를 사용할 때보다 높은 배반포로의 발달률을 얻었으며, Stice 등 (1994) 도 역시 같은 방법으로 산자 생산에 성공하였다. 또 난자의 활성화 방법에 있어서 전기자극대신 ionomycin과 단백질 효소억제제인 DMAP를 사용하여 난자를 활성화시키므로 소 (Peura 등, 1997; Lewis 등, 1997; Lavoit 등, 1997b), 양(Loi 등, 1997; Lavoit 등, 1997a), 토끼(Yin 등, 1998; 하 등, 1998)의 핵이식 수정란의 높은 체외발달을 혹은 임신율을 보고하고 있다. 하지만 핵이식은 조작상 숙련된 기술을 필요로 하고 있으며 특히 미세조작에서 수핵란의 탈핵은 제 1극체와 주변의 염색질을 제거하는 방법이 많이 사용되고 있고 이는 형광현미경에서 핵염색후 확인해야 하는 번거로움과 부작용이 우려되고 있다(Prather 등, 1989; Westhusin 등, 1992). 더욱

이 확실한 핵제거를 위하여 거의 1/5~1/3의 세포질의 제거는 세포질내 함유된 미지의 세포질인자의 소실을 가져오며 체적이 작은 후기배의 할구 세포를 공핵세포로 사용할 때 융합율을 떨어뜨린다. 그러므로 간편하고 핵만 제거하는 탈핵법의 개발은 핵이식을 실용화시키는데 중요한 과제로 되고 있다.

본 실험에서는 토끼 난자를 ionomycin과 DMAP의 복합활성화 방법으로 활성화시킴으로써 응축된 난자핵이 제2차 극체와 함께 밖으로 도출되는 자체탈핵을 유도하고 제2극체 돌기만 제거하므로서 난자핵을 쉽게 제거하며 핵이식 후 체외발달율을 비교 조사하여 핵이식에 있어서 핵만 쉽게 제거하는 방법을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용된 공시동물은 New-Zealand White 종의 체중이 3kg 전후인 성숙된 토끼로서 연암원예축산전문대학으로부터 공급받았으며 빛(light: 14시간, dark: 10시간)을 조절하여 분리 사육하였고 물과 사료(토끼용 펠릿사료, 퓨리나사료)는 자유로이 급식하였다.

2. 수핵난자와 공핵수정란의 준비

난자의 확보를 위한 과배란 유기는 성숙한 암토끼를 10 mg의 FSH(Folltropin[®], Vetrepharm Co., Australia)를 1일 2회 3일간 근육주사하였고, 마지막 투여 12시간 후 hCG(Peamax[®], Japan)를 100 IU를 정맥주사하였다. 난자는 hCG 주사 후 13~15 시간에 암토끼를 chlorpromazine HCl과 ketamine HCl로 전신마취한 다음 개복수술하여 난관으로 부터 배란된 성숙난자를 10% FCS가 함유된 D-PBS로 회수하였다. 회수된 난자는 300 IU/ml의 hyaluronidase(Sigma Chemical Co., U.S.A.)에서 39°C, 5% CO₂조건에서 7분간 배양한 다음, 150 μm fire-polished pipette으로 난구세포를 제거하여 제1극체가 명확하고 세포질이 충실한 것을 공시난자로 사용하였다.

핵을 수핵난자에 공급할 수정란의 확보는 상기

방법으로 과배란을 유기한 다음 토끼를 성숙된 수토끼와 교미후 32-세포기에 있는 수정란을 회수하고 이들로부터 할구를 분리하여 실험에 사용하였다.

3. 수핵란의 탈핵 및 핵염색

1) Non-preactivated group

McGrath와 Solter (1983)의 non-distruptive 조작법에 의하여 실시하였다. 즉 M II단계의 성숙된 난자로 부터 핵을 제거하기 위하여 외경 30 μ m의 연마된 미세 pipette을 투명대 내로 진입시키고 제1극체와 그 주위에 위치하는 핵을 원형질막에 싸여진 채로 흡입하여 제거하였다. 또 수핵난자의 채란시간에 따른 탈핵효율을 조사하고자 hCG 투여 후 15~16, 16~17 및 19~20시간대에 채란된 난자를 사용하여 상기방법으로 탈핵후 5 μ g/ml Hoechst 33342가 함유된 D-PBS에서 5분간 염색한 후 형광현미경 아래서 탈핵 여부를 판단하였다.

2) Preactivated group

새로 고안된 탈핵법(modified enucleation technique)에 의하여 hCG 투여 16~20시간 후에 채란한 난자를 5 μ M의 ionomycin 용액에서 5분 침지한 후 2.0 mM의 DMAP 용액에서 0.5시간 이상 배양하면 활성화 처리한 대부분의 난자에서 제2극체가 돌출되며 난자의 핵은 응축되어 제2극체와 함께 형질막에 싸여진 채로 위란막강으로 돌출되는 자체탈핵현상(Fig. 1A)이 관찰되었다. 이러한 현상을 응용하여 위와 같이 처리된 난자를 외경 10~20 μ m의 연마된 미세 pipette을 투명대 내로 진입시키고 돌출된 제2극체와 제1극체만 제거함으로써 탈핵을 완료하였다(Fig. 1B). 탈핵은 제2극체가 돌출하는 0.5시간대에 7.5 μ g/ml의 cytochalasin B와 2.0 mM의 DMAP, 10% FCS가 함유된 D-PBS에서 진행하였으며 DMAP처리 2시간 이내에 탈핵을 완료하였다.

4. 난자의 활성화처리

Non-preactivated group의 난자의 활성화는 탈

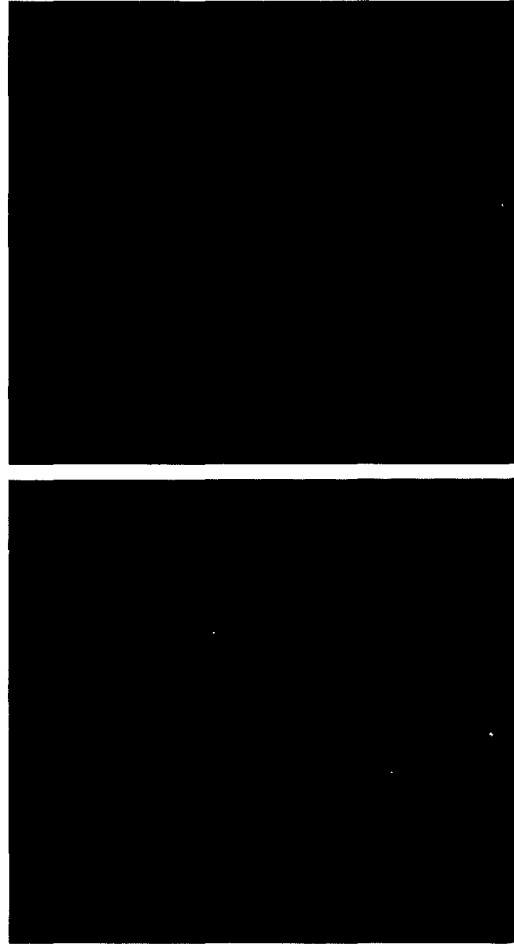


Fig. 1 Outline of the procedure for preparing activated recipient oocytes for enucleation. A: A self-enucleated oocytes. Note that the entire chromatin complements are extruded into the second polar body. B: Enucleation of the first and second polar bodies by micromanipulation.

핵된 난자를 5 μ M의 ionomycin 용액에서 5분 침지한 후 2.0 mM의 DMAP 용액에서 2시간 처리하였다.

5. 핵주입 및 융합

공핵수정란으로 부터 분리된 할구세포 하나를 미세 pipette에 흡입하고 이를 미세조작으로 탈핵된 수핵난자의 원형질 바깥 위란막강에 주입하였

Table 1. Successful enucleation of rabbit oocytes in different ages by micromanipulation

Age of oocytes (hrs post hCG)	No. of oocytes used	No. of oocytes manipulated(%)	No. of oocytes successfully enucleated(%)
15~16	81	79(97.5)	58(73.4) ^a
16~17	36	33(91.7)	25(75.8) ^a
19~20	44	41(93.2)	24(58.5) ^b

* The values with different superscripts in the same column were significantly different(P<0.10).

Table 2. Enucleation efficiency of preactivated rabbit oocytes following ionomycin and DMAP treatments

Treatment groups	No. of oocytes used	No. of oocytes manipulated	No. of oocytes enucleated(%)
Non-pretreated	107	98	69(70.4) ^a
Pretreated	96	93	90(96.8) ^b

* The values with different superscripts in the same column were significantly different(P<0.05).

다. 핵이 주입된 난자는 이 등(1993)의 방법에 따라 핵융합을 실시하였다. 전기자극의 전압은 1.25 kV/cm, 통전시간은 60 μ sec 및 통전횟수는 1회로 정하였다. 융합과 난자의 활성화를 위한 용액은 Ca^{2+} , Mg^{2+} 이 함유되지 않은 0.28 M mannitol 용액으로 활구가 이식된 난자를 이 용액으로 세척한 electrode chamber에 융합용액을 700 μ l 씩 넣고 핵이식관을 옮겨 정렬시킨 후 Electro Cell Manipulator 200(BTX, Inc., U.S.A.)로 핵의 융합을 유도하였다. 세포질과 핵의 융합이 확인된 난자는 7.5 μ g/ml의 cytochalasin B와 10% FCS가 함유된 TCM-199배양액 (Earl's salt, Sigma Chem. Co., U.S.A.)에서 1시간 동안 배양한 다음 공배양하였다.

6. 통계학적 분석

실험결과는 Chi-square test를 실시하여 처리군간의 차이에 대한 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 수핵난자 채란시간에 따른 탈핵효율

난자의 채란시간에 따른 탈핵의 효율을 알아보고자 hCG 투여 후 15~20시간에 난자를 채란하여 미세조작후 난자의 탈핵 여부를 검사하였던

결과는 Table 1에서 보는 바와 같다.

hCG 투여 후 15~16시간에 채란한 난자는 73.4%의 탈핵률을 보였고, 16~17 시간의 난자는 75.8%의 탈핵률을 보였으며, 19~20 시간의 난자에서는 58.5%의 탈핵률을 보여 채란시간에 따라 탈핵률은 유의적(p<0.10) 차이를 나타내었다.

2. 개선된 탈핵방법에 의한 탈핵효율

hCG 투여 15~16시간후에 채란한 난자를 미세조작하여 제1극체와 극체 주위 염색질을 제거함으로써 핵을 제거하는 대조구와 5 μ M의 ionomycin 용액에서 5분 침지한 후 2.0 mM의 DMAP 용액에서 2시간 처리하여 제2극체 돌출을 유도하고 이를 제거함으로써 제2극체내에 있는 응축된 핵을 동시에 제거하는 새로운 방법(new method)을 사용하여 탈핵율을 비교하였는 바 Table 2에서 보는 바와 같다.

대조구에서는 70.4%의 탈핵율을 보였지만 새로 개선된 탈핵방법을 사용할 때 96.8%의 탈핵율을 보여 유의적 차이를 나타내었다(P<0.05).

3. 새로운 탈핵방법에 의한 핵이식 수정란 작출 효과

기존탈핵법과 새로운 탈핵법을 사용하여 핵이식하였을 때 수정란에서 각각 80.4 및 88.2%의 핵

Table 3. Electrofusion and *in vitro* development of rabbit NT embryos reconstituted with preactivated c non-preactivated oocytes

Treatment groups	No. of oocytes used	No. of embryos fused(%)	No. of embryos cultured	No. of embryos developed to(%)	
				2-cell	Blastocyst
Non-preactivated	102	82(80.4) ^a	28	20(71.1)	11(39.3) ^a
Preactivated	51	45(88.2) ^a	12	9(75.0)	3(33.3) ^a

* There was no significant difference in development rate and fusion rate between the two groups.

융합률을 보여 핵융합률에 있어서는 서로 유의적인 차이는 나타나지 않았으며 배반포까지의 발달률에서는 39.3%와 33.3%를 나타내어 유의적 차이를 나타나지 않았다(Table 3).

고찰

hCG 투여후 15~16시간에 채란한 난자를 미세조작하여 제1극체와 극체 주위 염색질을 제거한 후 5 μ g/ml의 Hoechst 33342가 함유된 D-PBS에서 염색한 후 형광현미경하에서 탈핵 여부를 판단하였다. 탈핵되지 않은 미세조작된 난자는 5 μ M의 ionomycin용액에서 5분 배양한 후 DMAP용액에서 2시간 처리하였을 때 탈핵되지 않은 난자의 98.87%는 제2극체를 방출하였으며 탈핵된 난자는 제2극체를 방출하지 않았다. 탈핵되지 않은 난자의 핵은 응축되어 제2극체내에 있었다. 이로써 미세조작한 난자를 제2극체의 출현 여부로서 탈핵 여부를 확인할 수 있음을 알 수 있었다.

핵이식 방법에 있어서 탈핵은 하나의 중요한 기술이지만 현재 대부분의 포유류 핵이식에서는 난자의 제1극체와 극체 주변의 염색질을 제거하는 미세조작에 탈핵을 의존하고 있으며 이는 숙련된 기술과 경험이 필요하다. 탈핵 효과를 높이기 위하여 DNA 염색액을 조작용액에 첨가하고 형광현미경으로 확인하는 방법을 사용하고 있으나 이러한 방법들은 여전히 숙련된 기술을 요구하고 있으며 이것들은 핵이식 기술의 보편화를 제한하고 있다(First와 Prather, 1991; Robl 등, 1992). 정상적인 난자의 발달은 metaphase I에서 anaphase I 그리고 metaphase II에서 an-

aphase II로 발달되며 이 과정에서 제1극체와 제2극체를 방출한다. 본 실험에서 metaphase II 단계의 핵이 남아 있는 난자를 ionomycin에서 5분 배양후 DMAP용액에서 2시간 처리하면 제2극체가 돌출되며 핵은 응축되어 극체 내에 들어 있어 이는 ionomycin의 활성화 작용과 DMAP의 핵 응축작용의 복합결과라고 사료되며, 이는 Fulka와 Moor(1993)는 MI 단계의 마우스 난자를 50 μ g/ml의 etoposid(ETO)와 50 μ g/ml의 cycloheximide(CHXM)에 배양시 96%의 난자에서 염색체는 응축되어 제1극체와 같이 방출되는 자체탈핵을 나타냈다는 것과 유사하다.

핵이식시 공핵관과 수핵관의 정확한 재구성이 수행되기 위해서는 완전한 탈핵이 선행되어야 한다. 토끼 난자에 있어서 Collas와 Robl (1990)은 제1극체와 주변의 염색체를 흡입 제거시 탈핵 pipette에서 MII기의 핵이 확인 가능하므로 육안으로 직접 탈핵을 확인하였다고 보고하고 있으나, Adenot 등(1997)과 Heyman 등 (1990)은 토끼에서 DNA 염색액을 사용하여 형광현미경하에서 탈핵을 확인하였다. 본 실험실에서도 수년간 육안으로 탈핵확인 가능 여부를 시도하였지만 정확한 판정이 불가능하여 임의로 제1극체 주변의 염색질을 제거하는 방법을 사용하여 왔다. 본 실험에서는 MII기의 난자를 사용하여 제1극체와 그 주변의 세포질을 1/5 혹은 1/6을 제거한 후 ionomycin과 DMAP용액을 처리하여 제2극체의 출현 여부로 탈핵률을 조사한 결과 hCG주사후 15~17시간의 난자는 73.4, 75.8%의 탈핵율을 보이는 반면, 19~20 시간의 난자에서는 58.5%의 탈핵율을 보여 탈핵율이 유의적으로 저하되었다. 이러한 결과는 배란 직후의 난자의 핵은 제1극체 바로 안

쪽 세포질에 위치하지만 시간이 경과되면 핵은 중앙으로 이동하여 탈핵을 어렵게 하는 것으로 알려져 왔지만 다른 한편으로 난구세포 제거시 제1극체의 이동이 더욱 큰 원인이 됨을 본 실험에서 알 수 있었다. 이의 근거는 정상난자를 ionomycin과 DMAP 처리시 제2극체의 위치는 20% 정도가 제1극체와 떨어져 있거나 반대쪽에 있었음이 확인되었다. 제1극체의 위치 이동은 난구세포 제거방법과 관련되어 있고 이는 조작자의 숙련도와 난구세포 제거 방법과 관련이 있다고 사료된다. 이러한 탈핵 성적은 소(Parther 등, 1987)에서 60%, 양에서(Smith와 Wilmut, 1989) 68%와 돼지에서(Prather 등, 1989) 74%와 유사한 성적을 나타내고 있다. Bordignon와 Smith (1998)는 24시간과 30시간 성숙시킨 소 난자를 7%의 ethanol용액에서 7분 처리후 25℃ 혹은 4℃에서 3시간 방치시 난자는 활성화되어 제2극체를 방출하며 탈핵은 제2극체와 인접하여 있는 Telo-phase 단계의 난자핵을 적은 양의 세포질과 함께 제거함으로써 98%의 탈핵율을 보여 무작위로 많은 양의 세포질을 제거하는 방법에서 59%의 탈핵율보다 좋은 결과를 보이고 있다. 이는 본 실험의 96.8%와 70.4%의 탈핵율과 유사한 결과를 보이고 있으나 핵의 발달에서 차이를 나타냈으며 이는 활성화 약물에 따른 차이라고 사료된다. 본 실험은 토끼에 있어서 ionomycin과 DMAP용액으로 활성화 처리하여 제2극체의 돌출을 유도하고 이를 제거함으로써 제2극체내에 응축된 핵을 동시에 제거하는 개선된 방법을 사용함으로써 DNA 염색과 형광현미경 아래에서 확인하는 번거로움과 유해함을 피할 수 있으며 간편하고 탈핵율이 높다. 그리고 작은 내경의 탈핵 피펫을 사용함으로써 난자의 손상을 최소한 줄일 수 있었다. 핵이식에 있어서 탈핵과정중 DNA염색액이 함유된 조작용액에서 작업하거나 작업후 형광현미경 아래에서 확인하는 방법을 사용하는 것 외에 미성숙난자를 약물처리로서 제1극체와 함께 자체탈핵을 유도하는 방법(Fulka와 Moor, 1993), mucin을 제거한 세포질을 원심분리하는 방법(Tatham 등, 1995) 등이 시도되고 있으나 일반적으로 이들의 여러 가지 제한성으로 제1극체와 주위 세포질을

제거하는 방법을 많이 사용하고 있다. 본 실험에서는 기존탈핵법과 새로운 탈핵법을 사용하여 핵이식시 각각 80.4 및 88.2%의 핵융합율을 보여 핵융합율에 있어서는 서로 유의적인 차이는 나타나지 않았지만, 근래에 와서는 공핵란의 공급원으로서 크기가 작은 후기배의 태아세포나 체세포를 사용함으로써 더욱 적은 세포질의 제거는 융합율을 높이기 위해 필요하다. 이 점에서 본 방법은 탈핵법에서의 효과적인 방법으로 사료된다. 그리고 기존 탈핵법과 새로운 탈핵법을 사용하여 핵이식하였을 때 핵이식 수정란의 배반포까지의 발달률에서는 유의적 차이가 없었으므로 핵이식 수정란 생산에서도 효과적인 방법으로 사료된다.

적 요

본 연구는 토끼난자에 있어서 배란 후 경과시간에 따른 탈핵률을 조사하고 ionomycin과 DMAP을 사용하여 활성화와 아울러 자체 탈핵을 유도하는 방법을 고안하였으며 아울러 이들의 탈핵효율과 핵이식후 체외발달을 확인한 결과는 다음과 같다.

1. hCG 주사후 15~16 시간에 채란된 토끼난자는 73.4%의 탈핵률을 보였고, 16~17시간에는 75.8%, 19~20 시간에는 58.5%의 탈핵률을 보여 토끼난자의 탈핵은 hCG 주사후 17시간 이내에 실시함이 효과적임을 알 수 있었다.
2. 제1극체와 극체주위 염색질을 제거하므로써 핵을 제거하는 기존방법에서는 70.4%의 탈핵률을 보였지만 개선된 방법을 사용할 때 96.8%의 탈핵률 보여 탈핵률이 향상되었다.
3. 개선된 탈핵방법으로 핵이식하였을 때 88.2%의 핵융합률과 33.3%의 배반포 발달률을 보여 기존의 탈핵방법과 대등한 효과가 인정되었으며 활용성이 있음을 확인하였다.

참고문헌

Adenot PG, Szollosi MS, Chesne P, Chastant S and Renard JP. 1997. *In vivo* aging of

- oocytes influences the behavior of nuclear transferred to enucleated rabbit oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 46: 325-336.
- Ayogi Y, Konishi M, Wada T and Takedomi T. 1994. Unaged bovine oocytes successfully develop to blastocysts after parthenogenetic activation of nuclear transfer. *Theriogenology*, 41: 157(abstract).
- Barnes FL, Collase P, Powell R, King WA, Westhusin M, Shepherd D. 1993. Influence of recipient oocyte cell cycle stage on DNA synthesis, nuclear envelope break down, chromosome constitution, and development in nuclear transplant bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 36:33-41.
- Briggs R and King TJ. 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 38:455-463.
- Bordignon V and Smith LC. 1998. Telophase enucleation: An improved method to prepare recipient cytoplasts for use in bovine nuclear transfer. *Molecular Reproduction and Development*, 49:29-36.
- Campbell KHS, Loi P, Otaegui PJ and Wilmut I. 1993. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 49:40-46.
- Campbell KHS, Mcwhir J, Ritchie WA and Wilmut I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 380:64-66.
- Choe SY, Park HS, Lee HJ and Park CS. 1992. Production of cloned mice by transplantation of nucleus from eight-cell embryos. *Korean J. Anim. Science*, 34(2):89-96.
- Collas P and Robl JM. 1990. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. *Biol. Reprod.*, 43:877-884.
- Fulka, Jr. J and Moor RM. 1993. Noninvasive chemical enucleation of mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 34: 427-430.
- Heyman Y, Chesne P and Penard JP. 1990. Full-term reprogramming of frozen embryonic nuclei after nuclear transfer in the rabbit species. 1990. *C.R. Acad. Sci. Paris. t. 311, Serie III*, p.321-326.
- Kono T, Sotomaru Y, Apno F, Takahashi T, Ogiwara I, Sekizawa F, Arai T and Nakahara T. 1994. Effect of ooplast activation on the development of oocytes following nucleus transfer in cattle. *Theriogenology*, 41: 1463-1471.
- Kruip TAM, den Dass JHG. 1997. *In vitro* produce and cloned embryos. Effect on the pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology*, 47:43-52.
- Lavoit MC, Rumph ND, Fuente R, Barnes F, King WA and Betteridge KJ. 1997. The influence of cytoplasmic age on the development of embryos made by nuclear transfer. *Theriogenology*, 47:286(abstract).
- Lavoit MC, Rumph ND, Moens A, King WA, Plante Y, Johnson WH, Ding J and Betteridge KJ. 1997. Development of bovine nuclear transfer embryos made with oogenesis. *Theriogenology*, 56:194-199.
- Lewis IM, Peura TT and Trounson AO. 1997. Post-transfer viability of bovine nuclear transfer embryos cultured as aggregates or as individual clones. *Theriogenology*, 47: 231(abstract).
- Liu L, Dai YF and Moor RM. 1997. Nuclear transfer in sheep embryos: The effect of cell-cycle coordination between nucleus and cytoplasm and the use of *in vitro* matured oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 47: 255-264.
- Loi P, Ledda S and Cappai P. 1997. Nuclear dynamics and developmental potential of

- sheep nuclear transfer embryos treated with protein kinase inhibitor 6-dimethylaminopurine. *Theriogenology*, 47:232(Abs-tract).
- Nurse P. 1990. Universal control mechanism regulation onset of M-phase. *Nature*, 344: 503-508.
- Peura TT, Wild SP and Trounson AO. 1997. The effect of cytoplasmic volume on development of bovine nuclear transfer embryos derived from *in vivo* donor embryos. *Theriogenology*, 47:235(Abstract).
- Prather RS, Barnes FL, Sims MM, Robl JM, Eyestone WH, First NL. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryo: Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.*, 37:859-966.
- Prather RS, Sims MM and First NL. 1989. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol. Reprod.*, 41: 414-418.
- Robl JM, Prather R, Barnes FL, Eyestone W, Northey D, Gilligan B and First NL. 1987. Nuclear transplantation in bovin embryos. *J. Anim. Sci.*, 64: 642-647.
- Smith LC and Wilmut I. 1998. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development *in vivo* of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol. Reprod.*, 40: 1027-1035.
- Stice SL, Keefer CL and Matthews L. 1994. Bovine nuclear transfer embryos: oocyte activation prior to blastomere fusion. *Mol. Reprod. Dev.*, 38: 61-68.
- Stice SL, Strelchenko NS, Keefer CL and Matthews L. 1996. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic following nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 54:100-110.
- Tatham BG, Dowsing AT, Trouson AO. 1995. Enucleation by centrifugation of *in vitro* matured bovine oocytes for in nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 53(5) 1088-1094.
- Willadsen SM. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, 320:63~65.
- Wilmut I, Mcwhir J, Ritchie WA and Campbell KHS. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385:810~813.
- Yin XJ, Cho CY, Kong IK, Cho SY, Park CS and Lee HJ. 1998. Production of second generation rabbit embryos by nuclear transfer. *Theriogenology*, 49(1): 331(Abs-tract).
- 이효종, 전병균, 윤희준, 이경미, 송상현, 공일근, 노규진, 최민철, 최상용, 박충생. 1994. 핵이식에 의한 복제토끼 생산. *한국수정란이식학회지*, 9(2):161-165.
- 하란조, 강다원, 최창용, 윤희준, 강태영, 최상용, 이효종, 박충생. 1998. Ionomycin과 6-dimethylaminopurine이 토끼의 난자활성화와 핵이식배 생산효율에 미치는 효과. *한국수정란이식학회지*, 13:11-19.

(접수일자 : 1998. 11 10/채택일자 : 1998. 12. 10)