

한우 체세포를 이용한 핵이식에서 전기융합 방법이 융합율 및 배발달율에 미치는 영향

김 은 국[†] · 김 정 옥
호 산부인과

Effect of Electric Fusion Methods on Cell Fusion Rate and Embryo Development by Somatic Cell Nuclear Transfer in Korean Native Cattle(KNC)

E. K. Kim[†] and J. W. Kim

Ho Woman's Clinic

SUMMARY

This study was conducted to investigate the effect of electric fusion methods on cell fusion rate and embryo development by somatic cell nuclear transfer in Korean Native Cattle. The KNC ear cell was cultured *in vitro* for confluency in serum starvation condition(DMEM +0.05% FBS) for cell confluency. The zona pellucida of IVM oocytes were partially dissection using micro pipette. Ear cells were transferred into an enucleated oocyte. The reconstructed embryos were electrically fused with Zimmermann Cell Fusion Medium(ZCFM). Nuclear transfer embryos were activated with a combination of 10 μ m calcium ionophore(5 min) and 2.0mM 6-DMAP(3 hr). The activated embryos were cultured in CR1-aa medium containing 0.3% BSA or 10% FBS at 37°C, 90% N₂, and 5% CO₂ in incubator for 6 days.

The fusion rates were 51.6%(chamber) and 68.9%(needle), respectively and there were significantly difference between the fusion method(P<0.05). But, lysis rates were not significantly different(10.7%, 11.5%), respectively.

The cleavage rates were significantly different between the chamber method(73.2%) and needle method(80.3%), respectively(P<0.05). The rates of early embryos(2~4cells) and blastocysts of chamber and needle methods were 54.1%, 61.1% and 18.4%, 26.3% respectively, and needle method was significantly higher than chamber method(P<0.05). But, morulae formation rate were not significantly differences between the chamber(6.7%) and needle(6.2) method(P<0.05).

These result suggest that electric fusion of needle method was to be profitable for nuclear transfer embryo fusion rate, blastocyst formation rate and reduce of oocyte lysis.

(Key words : electric fusion, nuclear transfer, lysis)

서 론

1997년 영국의 Wilmut 등이 유선세포를 이용하여 복제양 Dolly를 만들어 낸 후(Wilmut 등, 1997),

[†] Correspondence : E-mail : cruz3876@hanmail.net

다양한 체세포를 이용하여 특정동물의 복제 생산이 보고되고 있다. 많은 연구자들에 의해 태아섬유아세포(fibroblast ; Schnieke 등, 1997), 배아간세포(embryonic stem cell ; First 등, 1998), 태아피부 및 근육세포(fibro skin and muscle ; Vignon 등, 1998) 등을 이용한 복제수정란 연구가 진행되고 있고, 현재 소를 비롯한 다양한 동물의 핵이식 복제산자가 보고되고 있다(Zakhartchenko 등, 1999 ; Wells 등, 1999 ; Kato 등, 1999 ; Cibelli 등, 1998 ; Wakayama 등, 1998 ; Schnieke 등, 1997).

이러한 핵이식 기술은 우량동물의 번식이나 멸종위기에 처한 동물의 보존, 질환동물 생산, 장기이식용 동물생산 및 세포·유전자치료와 같은 장기이식 대체용 동물생산에 활용할 수 있어 축산 및 의학분야에서도 활용가치가 매우 높은 기술이다.

일반적인 핵이식 과정은 미세조작 현미경과 Micro tools을 이용하게 되는데, 먼저 체외에서 성숙시킨 M II 단계의 난자에서 핵을 제거하고 공여 핵을 주입한 후 전기융합을 실시하여 체외배양과정을 거쳐 체내에 이식을 하게 된다(Annelies 등, 1993). 전기자극에 의한 세포융합의 기본 원리는 전기자극이 세포에 가해지는 동안, 공여핵의 막과 수용란의 세포질 막이 일시적으로 불안정한 상태 하에 놓이게 됨으로써 두 세포막이 융합되는데(Sowers, 1989 ; Zimmermann과 Vienken, 1982), 이러한 방법은 기존의 생물학적, 화학적인 세포융합법과 달리 전기자극에 관련된 전장, 통전횟수, 충전시간 등과 같은 여러 가지 물리적인 요소들을 정확히 측정할 수 있고, 아주 짧은 시간 동안 세포융합 물질에 세포를 노출시킴으로써, 일관된 세포의 융합효율 및 생존성을 얻을 수 있는 장점이 있다(Mitani 등, 1993 ; Annelies 등, 1993 ; Tsunoda 등, 1987). 적절한 전기융합 조건은 세포의 종류와 형태에 따라 달라지며(Tatham 등, 1996) 공여세포와 수핵세포질 사이의 비율이 달라지는데(Zakhartchenko 등, 1997), 이러한 전기적인 변이는 융합 후 배발달율에도 영향을 미치게 된다(Koo 등, 2000). 특히 체세포는 세포의 크기가 작아서 전기융합시 어려움이 많아 융합율을 높이기 위한 방법의 개선이 필요한데, 융합율을 높이기 위해 핵이식 배지에 PHA-P(phytohemagglutinin-P)를 첨가하여

체세포와 수핵란 사이의 접촉을 용이하게 하거나(Lavoir 등, 1997 ; Wells 등, 1997 ; Keefe 등, 1994), 전기융합 후 배지에 세포질 안정물질인 cytochalasin B를 첨가하기도 하였다(Annelies 등, 1993 ; Li 등, 2002).

체세포 주입 후 전기융합을 실시할 때 보통 wire 형태의 electric chamber를 이용하여 주입된 체세포와 electric chamber가 직각이 되게 정렬을 시킨 후 높은 전압으로 전기융합을 실시하는데, 정렬 과정에서 많은 시간이 필요하게 되고 힘들게 주입한 체세포가 세포질과 떨어지는 경우가 발생하여 많은 체세포 주입 난자가 lysis 되거나 융합에 실패하게 된다.

따라서 본 실험은 Chamber를 이용한 간접적인 전기융합 방법과 Needle을 이용한 직접적인 전기융합 방법이 체세포 주입 수정란의 융합율 및 체외 배발달율에 미치는 영향을 비교하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 수핵난자의 체외성숙

본 실험에 사용된 난소는 도살 직후 한우 암소에서 적출하여 penicillin G(100 units/ml)와 streptomycin sulfate(100 µg/ml)가 함유된 생리식염수(30~36℃)에 넣어 2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 항생제가 첨가된 신선한 생리식염수로 난소 표면을 3~4회 세척 후 18 gauge의 주사침이 부착된 10cc disposable syringe를 이용하여 난포의 크기가 3~6mm인 난포에서 난포액과 난포란을 함께 흡입하여 채란하였다. 흡입된 난포액을 80mm petri-dish에 담아 실험현미경 하에서 pasteur pipette을 이용, Wiemer 등(1991)의 방법을 참고하여 난구세포가 3층 이상으로 치밀하게 부착되어 있고 세포질이 균일한 난자만을 선별하였다. 선별된 난자는 Heps-buffered tissue culture medium 199(TCM-199 ; Gibco, USA)에 2~3회 세척을 한 후 10% 우혈청(Fetal Bovine Serum ; FBS, Gibco, USA)을 첨가한 TCM-199에 넣은 후 39℃, 90% N₂, 5% CO₂ 배양기 내에서 20~22시간 동안 체외성숙을 유도하였다.

2. 공여세포 준비

한우 성숙의 귀 조직을 5×5mm 정도 절제하여 Ca²⁺과 Mg²⁺ free PBS에서 2~3회 세정 후 멸균 편셋과 메스를 이용하여 세절하고 0.05% trypsin (Gibco, USA)과 1mM EDTA(Sigma, USA)의 혼합액을 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 포화습도 배양기에서 30~60분 동안 정치시켰다. 그 후 PBS로 원심 분리 세정을 2~3회 실시하여 trypsin과 EDTA를 제거한 후 DMEM(Gibco, USA) + 10% FBS (Gibco, USA) + 10% Antibiotic antimycotics (Gibco, USA) 배양액이 들어있는 culture flask (Falcon, USA)에 분주하여 배양을 실시하였는데, 배양 12시간 후 바닥에 붙지 않는 세포는 제거하고 그 후 24시간마다 신선한 배양액으로 교체하면서 일주일 간 배양을 실시하였다. 계대배양 공여세포는 10% DMSO(Sigma, USA)가 첨가된 DMEM 배양액으로 동결보존해 두고, 핵이식에 사용할 때는 37℃ 온수에 용해하여 동결보호제를 제거하였다. 그 후 10% FBS가 첨가된 신선한 DMEM 배양액으로 배양한 세포가 dish 바닥에 monolayer를 충분히 형성하였을 때 0.5% FBS가 첨가된 DMEM 배양액으로 3~4일간의 serum starvation(Campbell 등, 1996)을 실시하여 세포주기를 G0 또는 G1기로 유도한 다음 공여세포로 사용하였다.

3. 난구세포의 제거 및 탈핵

체외에서 성숙된 난자를 0.1% hyaluronidase (Sigma, USA)가 들어있는 PBS(Gibco, USA)와 함께 conical tube에 넣고 vortex mixer로 1분간 처리하여 난구세포를 제거하였다. 난구세포 제거 후 세포질의 색조가 균일하고 제 1극체가 방출된 난자만을 선별하여 TCM-199으로 2~3회 세척하였다. 세척한 난자는 10μl PHA-P와 20% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액 내에서 탈핵을 실시하였는데, 모든 미세조작은 실온에서 DIC(differential interference contrast)가 장착된 도립현미경 (Nikon, Japan ; 200)하에서 실시하였다.

모든 micro tools은 자체 제작을 하였는데 Suter 사 capillary tube를 사용하여 보정용(holding) pipette, 탈핵용(enucleation) pipette 및 주입용(injection) pipette을 각각 제작하였다. 보정용 피펫은 외

경이 160~180μm, 탈핵과 주입용 pipette은 외경이 20~30μm가 되도록 하였고 제작이 완료된 주입용 pipette은 불화수소(J. T. Baker)로 내부를 매끄럽게 만든 후 증류수로 세척하고 polyethoxyethanol (Sigma, USA)로 코팅 후 사용하였다. 탈핵 방법은 먼저 난자의 극체가 12시 방향이 되도록 고정시킨 후 극체 바로 윗 부분을 slicing하고 탈핵용 pipette을 이용하여 위에서 아랫 방향으로 눌러 제 1극체와 소량의 세포질을 빼내었는데 모든 과정은 20분이 내에 실시하였다.

탈핵이 끝난 난자는 20% FBS와 0.1% antibiotic-antimycotic(Gibco, USA)가 첨가된 TCM-199에서 30분간 배양을 실시하였다.

4. 핵이식

공여핵으로는 귀세포를 이용하였는데 petri-dish에 0.5% FBS가 첨가된 PBS drop과 10μl PHA-P와 20% FBS가 첨가된 TCM-199 drop을 만든 후 PBS drop에는 공여세포를, TCM-199 drop에는 탈핵난자를 넣은 후 외경이 20~30μm인 주입용 pipette을 이용, 공여세포를 흡입하여 탈핵시 만들어진 투명대의 slit을 통해 위관강에 주입하였는데, 주입시 세포질과 공여핵이 서로 떨어지지 않고 붙어 있도록 최대한 안으로 밀어 넣었고 이 작업 역시 20분이 넘지 않도록 하였다. 공여핵 주입 후 전기적 융합을 실시할 때까지 20% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액에 넣어 incubator 안에서 배양하였다.

5. 전기융합

전기융합 배지로는 Zimmermann Cell Fusion Medium(ZCFM)을 사용하였다. 융합에 앞서 배지 사이의 농도충격을 최소화 하기 위해 4well-dish에 TCM : ZCFM 비율이 3:7, 1:9, 0:10으로 만들어 체세포 주입 난자의 평형을 유도하였다. 평형 방법 및 시간은 상온에서 TCM-199 배지에 있는 체세포가 주입된 난자를 pasteur pipette을 이용하여 단계별로 희석된 ZCFM 배지 상부에 살며시 올려놓은 후 자연적으로 4well-dish 바닥에 가라앉으면 다음단계 배지로 옮기는 방법을 이용하였으며 전기융합은 37℃로 셋팅된 warm plate에서 실시하였다.

1) Electric chamber를 이용한 간접적인 전기융합 세포융합기로는 BTX 2000(San Diego, CA, USA)을 사용하였는데 1.0mm 간격의 electric chamber를 융합을 할 때마다 ZCFM 융합배지로 세척하고 융합배지를 채운 후, 전극의 +, - 방향과는 상관없이 수핵란과 주입된 체세포의 위치가 전류방향과 수직이 되도록 micro pipette을 이용하여 수동으로 조정하였다. 그 후 180V, 20 μ /sec로 1회 통전하여 융합을 실시하였다.

2) Needle을 이용한 직접적인 전기융합

세포융합기로는 Fusihira(ET-3, Japan)을 사용하였는데 80mm petri-dish에 ZCFM 융합배지를 채운 후 핵이식란을 넣고 수핵란과 공여핵의 위치를 3시(+) 또는 9시(-) 방향에 위치시킨 후 미세조작기를 이용하여 약간의 압력을 가한 후 25V, 10 μ /sec 로 1회 통전하여 융합을 실시하였다.

6. 핵이식 수정란의 활성화

전기융합이 끝난 핵이식 난자는 20% FBS가 첨가된 TCM-199에서 30분간 배양한 후 실체현미경 하에서 정상적인 융합유무를 확인하였는데, 주입한 체세포가 보이지 않는 난자는 융합 난자로 간주하고 활성화 처리에 들어갔다. 먼저 10 μ m calcium ionophore(Sigma, USA)가 첨가된 CR1-aa에서 5분간 활성화 후 2.0mM 6-DMAP(Sigma, USA)가 첨가된 CR1-aa에서 3시간 동안 활성화를 실시하였다.

7. 핵이식 수정란의 배양

핵이식 수정란은 38.5 $^{\circ}$ C, 90% N₂, 5% CO₂로 조정된 배양기에서 6일간 배양하였는데, 처음 3일은 0.3% BSA(Sigma, USA)가 첨가된 CR1-aa 배양액

에서 배양을 실시하였고 배양 4일째부터는 10% FBS가 첨가된 CR1-aa 배양액에서 배양을 실시하여 배반포배까지의 발달을 유도하였다.

8. 유의성 검증

본 실험에서 얻어진 결과는 SAS package를 이용하여 실시하였으며 요인의 유의성 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 융합방법에 따른 핵이식 수정란의 융합율

전기자극 융합방법에 따른 귀세포와 수핵난자간의 융합율과 lysis율은 Table 1과 같다.

세포융합기 BTX 2000과 1.0mm 간격의 electric chamber를 이용하여 180V, 20 μ /sec로 1회 통전하여 융합을 시도했을 때 체세포 융합율과 lysis율은 각각 51.6%, 10.7%를 보였다. 한편 Fusihira 융합기에 needle을 연결하여 체세포 주입 수정란에 직접 25V, 10 μ /sec로 1회 통전하여 융합을 시도했을 경우 체세포 융합율과 lysis율은 각각 68.9%, 11.5%로 chamber를 이용하여 간접적인 전기자극을 주었을 때보다 유의적으로 높은 융합율을 보였고(P < 0.05), lysis 비율은 약간 높았으나 유의적인 차이를 보이지 않았다.

복제수정란을 생산하기 위해서는 제핵을 실시한 난자와 공여핵을 융합시키는 과정이 필수적인데, 체세포를 이용할 경우가 할구를 이용하는 것보다 융합율이 저하되는 것으로 알려져 있다. 특히 전압은 세포융합율에 중요한 영향을 미치며 Zimmerman과 Vienken은 세포가 작을수록 높은 전압이 요구된다고 보고하였다(1982). 일반적으로 소

Table 1. Effect of electric fusion methods on the fusion rate and lysis rate of cloned embryos produced by somatic cell nuclear transfer in Korea Native Cattle

Fusion method	No. of fusing	No. of fused(%)	No. of non-fused(%)	No. of lysis(%)
Chamber	1855	958(51.6) ^b	698(37.6) ^a	199(10.7)
Needle	2170	1495(68.9) ^a	425(19.6) ^b	250(11.5)

^{ab} Different superscripts with column denote significant differences(p<0.05).

Table 2. Effect of electric fusion methods on the development of cloned embryos by somatic cell nuclear transfer in Korea Native Cattle

Fusion method	No. of oocytes	No. of cleaved oocytes	No. of embryos developed to		
			2~4 cells	Morula	Blastocyst
Chamber	958	701(73.2) ^b	518(54.1) ^b	64(6.7)	176(18.4) ^b
Needle	1495	1200(80.3) ^a	914(61.1) ^a	93(6.2)	392(26.3) ^a

^{a,b} Different superscripts with column denote significant differences($p < 0.05$).

체세포 핵이식에 있어 융합율은 전압과 통전시간에 따라 50~80% 정도이며(Goto 등, 1999 ; Zakharchenko 등, 1999 a,b ; Kato 등, 1998 ; Wells 등, 1998), 높은 전압은 세포의 lysis를 유발시킨다고 하였는데(Zakharchenko 등, 1995) 본 실험에서도 비슷한 결과를 보여주었다.

2. 전기융합 방법에 따른 핵이식 수정란의 체외 발달

융합 후 체외 배양에 있어서는 초기배 발달과정인 배양 3일째까지는 0.3%의 BSA가 첨가된 배지에, 그 이후에는 10% FBS가 첨가된 배지에 배양하며 관찰하였는데, chamber와 needle을 이용한 융합방법에 따른 난할율 및 배 발달율은 Table 2와 같다.

높은 전압을 간접적으로 이용한 chamber를 사용했을 때 73.2%의 난할율로, needle을 이용하여 낮은 전압을 직접적으로 사용했을 시 80.3%보다 유의적으로 낮은 난할율을 보였다. 초기배 상태인 2~4 세포기 역시 각각 54.1%, 61.1%를 보임으로써 needle방법이 유의적으로 높은 발달율을 보였다. 상실배 단계는 각각 6.7%와 6.2%로 비슷한 발달율을 보였지만 이식 가능한 단계인 배반포배 발달율은 needle을 사용하여 융합을 시도한 체세포 복제란이 26.3%로 chamber를 사용하여 융합을 시도한 구 18.4% 보다 유의적으로 높은 발달율을 보였다($P < 0.05$).

체세포 핵이식에서 전기융합 과정은 필수적인 과정인데 전압은 융합율에 가장 큰 영향을 준다. 세포가 작을수록 더 높은 전압이 요구되지만(Zi-

mmerrmann and Vienken, 1982), 전압이 낮으면 세포의 융합이 이루어지지 않게 되고, 너무 높으면 cell lysis의 원인이 된다(Zakharchenko 등, 1995). 본 실험에서도 chamber를 이용하여 높은 전압을 가하는 것보다 needle을 이용하여 낮은 전압을 가하는 구에서 유의적으로 높은 융합율을 보였다. 또한 소의 체세포 핵이식에서 융합율은 50~80%로 보고되고 있는데(Goto 등, 1999 ; Kato 등, 1998 ; Wells 등, 1998 ; Zakharchenko 등, 1999a,b), 본 실험에서도 chamber, needle을 이용한 두 구 모두 51.6~68.9%의 융합율을 보임으로써 비슷한 결과를 나타냈다. 하지만 체세포 복제수정란의 전기융합 시 전극의 거리, 전압, 통전시간, 통전회수, 배양액, 기구 등에 따라 많은 차이가 있으므로 자기 실험실 고유의 최적 세포융합 조건을 확립해야 할 것으로 생각된다.

적 요

복제수정란 생산에 있어서 수핵란 내 체세포 주입 후 전기적인 융합은 필수과정인데, 이 과정을 거치는 동안 많은 수의 체세포 주입 난자가 융합에 실패하거나 lysis가 일어나게 된다. 본 실험에서는 한우 체세포를 이용하여 핵이식을 실시한 후 수핵세포질과 융합을 시도할 때 전기융합 방법에 따른 융합율과 배발달율을 검토하고자 실시하였다. 공여세포는 한우 귀 세포조직을 채취하여 0.05% trypsin과 EDTA가 첨가된 D-PBS로 세포를 분리한 후 DMEM 배양액으로 계대배양을 실시하여 사용하였다. 핵이식을 위하여 체외성숙시킨 난자

를 탈핵용 micro pipette을 이용하여 투명대를 절개하고 수핵난자의 극체와 핵을 제거한 후 공여세포를 주입하였으며, 핵이식 수정란은 직접, 간접적인 전기적 자극으로 융합을 실시한 후 calcium ionophore와 6-DMAP를 이용하여 활성화를 유도하였다. 활성화된 수정란은 38.5°C, 90% N₂, 5% CO₂로 조정된 배양기에서 처음 3일은 0.3% BSA가 첨가된 CR1-aa 배양액에서, 배양 4일째부터는 10% FBS가 첨가된 CR1-aa 배양액에서 배양을 실시하였다. 본 연구결과를 요약하면 다음과 같다.

전기자극 융합방법에 따른 수핵난자의 융합율과 lysis율은 electric chamber를 이용하여 간접융합을 실시하였을 경우 51.6%와 10.7%를 보였고, needle을 이용하여 직접 융합을 실시하였을 경우 68.9%의 융합율과 11.5%의 lysis율을 보임으로써 needle을 이용한 직접융합 방법이 유의적으로 높은 융합율을 보였다(P<0.05).

융합 후 체외 발달과정을 살펴보면 난할율에 있어서 needle을 이용했을 시 80.3%로 chamber를 이용했을 시 73.2%보다 유의적으로 높은 난할율을 보였다. 초기배 발달단계인 2~4세포기의 발달율 역시 needle을 사용한 구가 61.1%로 chamber를 사용한 구 54.1%보다 유의적으로 높은 차이를 보였다. 상실배 단계는 chamber를 사용한 구가 6.7%로 needle을 사용한 구 6.2%보다 약간 높았지만 유의적인 차이는 없었다. 하지만 이식 가능한 단계인 배반포배 발달율에 있어서는 needle을 사용하여 융합을 시도한 구가 26.3%로 chamber를 사용한 구 18.4%보다 유의적으로 높은 발달율을 보였다(P<0.05).

electric chamber를 이용하여 전기융합을 시도시 전류가 흐르는 wire와 주입된 체세포가 직각을 이루도록 정렬을 시키느라 많은 시간이 소요되고, 주입한 체세포가 세포질과 떨어진 난자는 전기자극을 주어도 융합이 일어날 수 없으며, 높은 전압을 사용하기 때문에 융합된 복제란의 lysis가 많이 발생하는게 가장 큰 단점으로 꼽을 수 있다. 하지만 미세조작기와 needle 방법을 이용하면 낮은 전압을 이용하여 융합을 시도하기 때문에 복제란의 lysis를 줄일 수 있고, 전극과 체세포 주입란을 정렬시키는 과정이 생략되어 시간이 절약되며, 결정

적으로 주입된 체세포가 세포질과 떨어져 있더라도 미세조작기로 약간의 압력을 가하여 전기자극을 가할 수 있어서 보다 높은 융합율과 배반포배 발달율을 얻을 수 있기 때문에 needle을 이용한 직접적인 전기융합 방법이 체세포 복제수정란 생산에 효과적이라고 사료된다.

참고문헌

- Annelies EP, Wouter G VanInzen, Tanja AE and Van Acheterberg Kruij, Theo AM, De Laat Siegfried and Weima Sjerp M. 1993. Nuclear transfer and electrofusion in bovine *in vitro*-matured/*in vitro*-fertilized embryos ; Effect of media and electrical fusion parameters. Mol. Reprod. Dev., 36:307-312.
- Cibelli JB, Stice SL, Golucke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA and Robl JM. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. Science, 280: 1256-1258.
- First NL, Sims MM, Park SP and Kent-First MJ. 1998. Systems for production of calves from cultured bovine embryonic cells. Reprod. Fert. Dev., 6:553-562.
- Goto Y, Kaneyama K, Kobayashi S, Imaj K, Shin-Noh M, Tsujino T, Nakano T, Matsud S and Nakane S. 1999. Birth of cloned calves derived from cultured oviductal epithelial cells of a dairy cow(Rapid communication). Anim. Sci., 70:243-245.
- Kato M, Yamnouchi K, Ikawa M, Okabe M, Naito K and Tojo H. 1999. Efficient selection of transgenic mice embryos using EGFP as a marker gene. Mol. Reprod. Dev., 54:43-48.
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H and Tsunoda Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. Science, 282:2095-2098.
- Keefer CL, Stice SL and Matthews DL. 1994. Bovine inner cell mass as donor nuclei in the

- production of nuclear transfer embryos and calves. *Biol. Reprod.*, 50:935-939.
- Koo DB, Choi YH, Park JS, Kim HN, Kang YK, Lee CS, Han YM, Park HD and Lee KK. 2000. *In vitro* development of bovine nuclear transfer embryos reconstructed with fetal fibroblasts. *Korean J. Animal Reprod.*, 24(4):407-417.
- Lavoie MC, Rumph N, Moens A, King WA, Plante Y, Tohnson WH, Ding J and Betteridge KJ 1997. Development of bovine nuclear transfer embryos made with oogonia. *Bio. Reprod.*, 56: 194-199.
- Li guang-peng, Chen da-yuan, Lian li, Han zhi-ming, Zhuzi-yu and George Seidel Jr. 2002. Rabbit cloning ; Improved fusion rates using cytochalasin B in the fusion buffer. *Mol. Reprod. Dev.*, 61:187-191.
- Mitani T, Utsumi K and Iritani A. 1993. Developmental ability of enucleated bovine oocytes matured *in vitro* after fusion with single blastomeres of eight-cell embryos matured and fertilized *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 34:314-322.
- Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scoot AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A and Campbell KHS. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 278:2130-2133.
- Sowers AE. 1989. The mechanism of electroporation and electrofusion in erythrocyte membranes. In "Electroporation and electrofusion in cell biology"(E. Neuman, A.E. Sowers, and C.A. Jordan, eds.), Plenum Press, New York. pp. 229-256.
- Tatham, BG, Giliam, KJ and Trounson, AO. 1996. Electrofusion parameters for nuclear transfer predicted using isofusion contours produced with bovine embryonic cells. *Mol. Reprod. Dev.*, 43:306-312.
- Tsunoda Y, Kato Y and Shioda Y. 1987. Electrofusion for the pronuclear transplantation of mouse eggs. *Gamete Research*, 17:15-20.
- Vignon X, Chesne P, LeBourhis D, Heyman Y and Renard JP. 1998. Developmental potential of bovine embryos reconstructed with somatic nuclei from cultured skin and muscle fetal cells. *Theriogenology*, 49:392.
- Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR and Yanagimachi R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cummulus cell nuclei. *Nature*, 394:369-374.
- Wells David, Palva M, Misica H, Robin T and William H Vivanco. 1998. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby island cattle bree. *Reprod. Fertil. Dev.*, 10:369-378.
- Wells DN, Misica PM, Day AM and Tervit HR. 1997. Production of cloned lambs from an established embryonic cell line : A comprairson between *in vivo*- and *in vitro* matured cytoplasts. *Biol. Reprod.*, 57:385-393.
- Wells DN, Misica PM and Tervit HR. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol. Reprod.*, 60:996-1005.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ and Campbell KHS. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385:810-813.
- Wiemer KE, Waston AJ, Polanski V, McKenna AI, Fick GH and Schultz GA. 1991. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of bovine embryos., *Mol. Reprod. Dev.*, 30:330-338.
- Zakhartchenko V, Scherthaner WP, Brem G and Wolf E. 1997. Karyoplast-cytoplast volume ration in bovine nuclear transfer embryos ; Effect on development potential. *Mol. Reprod. Dev.*, 48:332-338.

Zakhartchenko V, Scherthner W, Prella K, Stojkovic P, Brem G and Wolf E. 1999a, Nuclear transfer in the bovine embryo : Developmental potential of cultured adult cells. Theriogenology, 51:218

Zakhartchenko V, Durcova-Hills G, Stojkovic M, Scherthner W, Prella K, Steinborn R, Muller M, Brem G and Wolf E. 1999b. Effects of serum starvation and re-cloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal

fibroblasts, J. Reprod. Fertil., 115:325-331.

Zakhartchenko V, Wolf E, Palma GA and Brem G. 1995. Effect of donor embryo cell number and cell size on the efficiency of bovine embryo cloning. Mol. Reprod. Dev., 42:53-57.

Zimmermann U and Vienken J. 1982. Electric field-induced cell to cell fusion. J. Membrane Bio., 67:165-182.

(접수일: 2003. 11. 15/ 채택일: 2003. 12. 17)