

돼지 난모 세포의 Ethanol 처리에 의한 단위 발생에 있어서 극체 방출란과 분할란 선별에 따른 배발달을 비교

김현종[†] · 조상래 · 최창용 · 최선호 · 한만희 · 손동수 · 이승수 · 상병돈 · 류일선 · 김인철 · 김성재 · 김일화¹ · 김상근² · 임경순³
축산과학원

Prediction of Parthenogenetic Developmental Potential by Polar Body Extrusion and First Cleavage on *In Vitro* Maturation and Development of Porcine Follicular Oocytes

H. J. Kim[†] , S. R. Cho, J. Y. Choe, S. H. Choi, M. H. Han, D. S. Son, S. S. Lee, B. D. Sang, I. S. Ryu, I. C. Kim, S. J. Kim, I. H. Kim¹, S. K. Kim² and K. S. Im³

National Institute of Animal Science, RDA

SUMMARY

The objective of this study was carried out to examine the selection effects of *in vitro* matured porcine follicular oocytes with polar body extrusion and early cleavage as non-invasive marker to know the developmental competence in advance. The porcine oocytes matured for 48 h were examined the polar body extrusion. The examined oocytes were matured for additional 16~18 h and activated with 7% ethanol and cultured in 5 μg/ml cytochalasin B for 5 h for diploid formation. The treated oocytes were cultured and examined the cleavage after 48 h and continued culturing for 5 days. The oocytes of 21.9% were discarded in morphological selection and 32.1% oocytes were discarded by failure of first polar body extrusion. The selected oocytes were matured and activated and then after 48 h the cleavage rates were examined. In morphologically selected oocytes, 15.8% oocytes were not cleaved and 52.6% oocytes were normally cleaved and 31.6% oocytes were hyper-cleaved over 8-cell stage. However in the first polar body extruded oocytes, 7.1% oocytes were not cleaved and 73.1% oocytes were normally cleaved and 19.8% oocytes were hyper-cleaved. The morphologically selected embryos that not cleavage-selected were developed in 16.7% up to blastocyst and the morphologically selected and cleavage-selected embryos were developed in 31.7%. The polar body extruded oocytes that were not carried out cleavage selection were developed in 39.0% and the polar body extruded and cleavage-selected embryos were developed 49.0%. The first cleavage timing was examined with 12 h interval after activation. In 0~12, 12~24, 24~36, and 36~48 h intervals, 4.1%, 68.6%, 19.1%, and 2.3% oocytes were cleaved and 5.9% oocytes were not cleaved until 48 h after activation. The cleaved oocytes in each interval were cultured and developed upto blastocyst with 0, 39.1, 9.5, and 0%, respectively. This results suggests that polar body extruded and cleaved at 12~36 h embryo has higher developmental potential than the others.

(Key words : polar body extrusion, cleavage, parthenogenesis, porcine follicular oocytes)

서 론

돼지 난소 내 난포란을 이용하여 형질 전환 돼지 생산이나 인공 장기 개발 등의 다양한 발생 공학 연구가 진행되고 있으나, 큰 난제중의 하나는 낮은 배발생능과 산자 생산율이라 할 수 있다(Vajta 등, 2007). 산자 생산을 향상시키기 위해 우수

한 발생능을 가진 난모 세포나 배아를 대리모에 이식하기 전에 선별하는 방법이 확보된다면 이러한 연구의 발전에 큰 기여를 할 것으로 예상된다. 난모 세포의 발생능은 다섯 가지로 분류될 수 있는데, 감수분열을 개재할 수 있어야 하고, 수정하여 분할할 수 있어야 하며, 배반포기로 발달할 수 있어야 하며, 임신이 되어야 하고, 마지막으로 건강한 산자로 태어나야

¹ 충북대학교 수의과대학(College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University)

² 충남대학교 수의과대학(College of Veterinary Medicine, Chungnam National University)

³ 서울대학교 동물자원과학과(Seoul National University)

[†] Correspondence : E-mail : hyunjong@rda.go.kr

한다(Sirard 등, 2006). 난모 세포의 세포질은 난모 세포의 성장과 더불어 mRNA 전사, 단백질 번역, 전사후 변경(Kastrop 등, 1991; Sirard 등, 1989) 등의 변화를 일으켜야 하며, 이 변화는 감수분열(Hunter와 Moor, 1987), 접합체의 활성화(Barnes와 First, 1991), 배반포 발생(De Sousa 등, 1998)에 필수적이다. 난모 세포 단계에서 비손상적 방법으로 발생능이 있는 난자를 선별하는 방법은 극체 선별과 세포질 선별이 있으며, 접합체에서의 선별은 핵인의 수와 분포, 그리고 배양 2일경의 선별로 세포질 파쇄, 할구의 수, 불균형 분할, 추가의 배양으로 배반포로 발생 등으로 배아의 개체 발생능의 예측을 보고하고 있다(Ebner 등, 2003). 그러나 한 가지 방법으로 선별뿐만 아니라 발달과정에서 여러 단계의 주의 깊은 선별을 통해 건강한 개체가 될 수 있는 후보 배아를 골라내는 것이 필요하며, 본 실험에서는 극체를 방출한 난자를 선별하고, 이후 분할된 난자를 선별했을 때 배발달율이 얼마나 향상되는지를 검토하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 준비 및 체외 성숙

도축장에서 암돼지에서 회수한 난소를 penicillin G(100 IU/ml)와 streptomycin(100 μ g/ml)이 첨가된 식염수에 담긴 상태로 보온병의 온도를 30~33°C로 유지하여 실험실로 옮겼다. 실험실에서 난소를 세척한 후 물기를 제거하고 18 G 주사침이 꽂힌 10 ml 주사기로 외관상 2~6 mm 직경인 난포들만 골라서 난포액을 흡입하여 페트리 접시에 옮겼다. 실체현미경 아래에서 여러 겹의 난구 세포층이 탄탄하게 잘 부착된 균일한 색깔의 난구 세포-난모 세포 복합체를 선별하여 phosphate-buffered saline(PBS)로 세척하였다. 성숙 배양액으로 세척한 후 약 100개의 난구-난모 세포 복합체들을 1 ml의 성숙 배양액에서 배양하였다. 난포란은 5% CO₂, 95% 공기, 38.5°C, 높은 습도 조건에서 48시간 배양하였다. 첫 24시간의 성숙 배양액은 NCSU23에 10% 돼지 난포액, 10 μ g/ml FSH(Sigma, USA), 35 μ g/ml LH(Sigma), 10 ng/ml EGF(Sigma), 100 IU/ml penicillin G, 100 μ g/ml streptomycin sulfate를 첨가하여 사용하였으며, 그 뒤 24시간에는 호르몬을 첨가하지 않은 성숙 배양액에서 추가로 배양하였다.

2. 난포란의 극체 확인 및 형태 선별

48시간 성숙 배양한 난모 세포-난구 세포 복합체를 hyaluronidase(Sigma) 300 IU가 든 PBS에서 난구 세포를 제거한 난자를 신선한 PBS로 세척 후, 실체 현미경 아래에서 극체의 방출 유무를 검사하였다. 퇴행하는 난자들은 세포질이 파손되거나 세포질이 검게 응축된 퇴행으로 추정되는 난자들을 분리하였다.

3. 난포란의 단위 발생

극체 방출 검사한 난자를 성숙 배양액에서 16~18시간 추가 배양한 후 PBS로 세척하고, 7% ethanol(v/v)이 든 PBS에서 7분간 활성화시켜 난모 세포를 5 μ g/ml cytochalasin B가 첨가된 TCM199+10% FCS에서 5시간 노출 후 PZM-5(IFP, Japan) 소적으로 옮겨 7일간 배양하였으며, 배양 4일째에 5% FCS를 첨가하였다. 난자를 성숙 65시간까지 노화시킨 것은 성숙배양 개시 후 56시간에서 68시간 사이에 활성화 처리했을 때 높은 배발달율을 보인 결과에 따른 것이다(김 등, 2005).

4. 분할란의 선별

활성화 처리 후 48시간째에 분할란을 선별하여 2~6세포기 상태를 정상으로 판정하고 미분할란이나 8세포기 이상의 난자들은 과분할 혹은 세포질 파쇄로 판단하여 분리하였다.

5. 통계 분석

실험 반복과 체외성숙, 극체 방출, 배발달 비율 간에 차이가 있는지를 조사하기 위해 두 처리 비교는 Minitab R14를 이용하여 χ^2 검정에 의한 독립성 검정을 실시하였으며, 다중비교는 Tukey의 다중검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 형태적 선별과 극체 선별한 난자들의 제거율, 정상 분할, 과분할, 미분할 비율 비교

돼지 난포란을 48시간 체외 성숙 후 형태적으로 세포질이 퇴행하는 난자들을 제거하고 단위 발생에 활용한 경우와 극체 방출란만을 선별하여 단위 발생에 활용한 경우에 따른 제거되는 난자의 비율과 총 처리 난자 대비 분할란의 비율을 알아본 결과는 Table 1과 같다. 선별 방법에 따라 제거된 난자와 활용한 난자의 수에 대하여 χ^2 검정에 의한 독립성 검정을 한 결과, 선별 방법과 난자의 수는 독립적이지 않았다($p < 0.01$). 퇴행하는 난자들만을 형태적으로 관찰하여 제거하고 사용한 난자의 비율은 78.1%였으나, 극체 방출이 확인되어 사용한 난자의 비율은 67.9%로 실험에 사용할 수 있는 난자의 수는 형태적으로 선별한 경우에서 유의적으로 많았으며, 그러나 총 처리 난자에서 분할한 난자의 수는 두 가지 선별 방법에 따라 차이를 보이지는 않았다.

퇴행한 난자들은 21.9%였으며, 극체를 방출하지 못한 난자들은 32.1%였다. 퇴행한 난자들은 대부분 극체를 방출하지 못하였으며, 퇴행하지 않은 난자들 중에도 극체를 방출하지 않은 난자들이 다수 포함되어 있었다. 극체를 방출하지 못한 난자들도 일부는 활성화처리 후 분할이 가능하며(35.9%) 낮은 비율이지만 배반포기까지 발달하였으나(14.1%), 극체를 방출한 난자의 분할율(94.2%)보다 유의적으로 낮고, 배반포 발달율(45.1%)도 유의적으로 낮아 전체 발달율을 저하시키는 것

Table 1. Comparison between selection methods of cytoplasm morphology and polar body extrusion on selection rate and cleavage rate of porcine follicular oocytes

Selection method	No. of oocytes treated	No. of oocytes discarded (%)	No. of oocytes selected (%)	No. of oocytes cleaved (%)
Morphological selection	320	70 (21.9) ^a	250 (78.1) ^a	214 (66.9) ^a
Polar body selection	520	167 (32.1) ^b	353 (67.9) ^b	328 (63.1) ^a

^{a,b} Values within columns with different superscripts are significantly different ($p < 0.01$).

으로 사료된다(김 등, 2006).

돼지 난포란의 체외 성숙 후 형태적으로 퇴행란을 제거하고 선별한 난자와 극체 방출한 난자만 선별하여 미분할란, 정상 분할란, 과분할란을 비교한 결과는 Table 2와 같다. 형태적으로 선별한 경우, 미분할율은 15.8%, 정상 분할이 52.6%, 과분할한 난자가 31.6%였다. 반면 극체 방출란만을 선별하여 활성화 처리한 경우, 미분할율은 7.1%, 정상 분할이 73.1%, 과분할한 난자가 19.8%였다. 선별 방법에 따라 미분할란, 정상 분할란, 과분할란간에 χ^2 검정에 의한 독립성 검정을 한 결과, 선별 방법에 따라 미분할율, 정상 분할율, 과분할율은 유의적으로 영향을 받았다($p < 0.01$).

극체 방출란을 선별한 경우, 난자의 핵형은 제2감수분열 중기상태의 metaphase plate를 관찰할 수 있는데, 극체를 방출하지 않은 난자는 핵이 팽화된 상태인 핵형이 39.1%, PCC 형태의 핵상이 19.6%, MI 형태의 핵상이 10.9%, MII이지만 극체가 관찰되지 않거나 매우 작은 상태인 경우가 13%, 핵이 응축된 형

태인 경우가 6.5%, 핵이 없는 경우가 8.7%를 보여 염색체 이상에 따른 미분할율이나 세포질 파쇄 등의 과분할 현상을 보여주는 것으로 추정된다(김 등, 2006). Hoa 등(2003)은 1 세포기에 발달이 중단되거나, 과분할, 핵의 응축 등은 아포토시스 과정을 겪는 배아의 특징이며, 핵이식 수정란의 경우 37.7%가 세포질 파쇄가 관찰되었고, 32.6%가 미분할되었으며, 체외 수정란의 경우 35.4%가 세포질 파쇄가 있었고, 22.4%가 미분할하였다고 보고하였으며, 이러한 결과는 본 실험의 결과인 형태적 선별에 따른 미분할율 15.8% 및 과분할율인 31.6%와 유사한 결과를 보였다.

2. 극체 방출 검사와 초기 분할 검사에 따른 배발달을 차이 외형적으로 퇴행하지 않은 난자를 선별하거나, 극체 방출란을 선별한 후 활성화처리 후 48시간체에 분할한 난자들을 선별하거나 하지 않은 후 배발달율을 검사한 결과는 Table 3과 같다. 외형적으로 퇴행하지 않은 난자들을 선별하여 분할

Table 2. Comparison between selection methods of cytoplasm morphology and polar body extrusion on cleavage condition of porcine follicular oocytes

Selection method	No. of oocytes treated	No. of oocytes non-cleaved (%)	No. of oocytes normally cleaved (%)	No. of oocytes hyper-cleaved (%)
Morphological selection	190	30 (15.8) ^a	100 (52.6) ^a	60 (31.6) ^a
Polar body selection	253	18 (7.1) ^b	185 (73.1) ^b	50 (19.8) ^b

^{a,b} Values within columns with different superscripts are significantly different ($p < 0.01$).

Table 3. Effects of oocyte selection method and cleavage selection at 48 h after activation on cleavage rate and development rate of porcine follicular oocytes

Selection method	Cleavage selection	No. of oocytes treated	No. of oocytes cleaved (%)	No. of blastocysts (%)
Morphology	Not determined	60	54 (90.0)	10 (16.7) ^a
Morphology	Selected	60	-	19 (31.7) ^{a,b}
Polar body	Not determined	100	93 (93.0)	39 (39.0) ^{a,b}
Polar body	Selected	100	-	49 (49.0) ^b

^{a,b} Values within columns with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

란을 선별하지 않고 배양하였을 때 배반포 발달율은 16.7%였으며, 외형적으로 퇴행하지 않은 난자들을 선별하여 48시간째에 분할란만을 선별하여 배양하였을 때 배반포 발달율은 31.7%였다. 한편, 극체를 방출한 난자들만을 선별하여 활성화 처리 후 48시간째에 분할란 선별을 하지 않고 계속 배양한 경우 배반포 발달율이 39.0%, 48시간째에 분할란만을 선별하여 배양한 경우 배반포 발달율이 49.0%였다.

퇴행하지 않는 난자들만을 선별하여 활성화 처리 후 배양할 때 얻을 수 있는 배반포 발달율이 16.7%인데 반해, 48시간째에 분할란만을 선별해도 월등히 배반포 발달율을 향상시킬 수 있었다. 이는 세포내 활성화가 미흡했거나, 난자 자체의 염색체 이상이나 세포질 이상에 따른 초기 분할 실패 난자를 제거하는 효과를 가져와 상대적으로 선별에 따른 배반포 발달율이 향상된 것으로 생각된다. 한편, 극체 방출란만을 선별하였을 때 39.0%의 배반포 발달율을 보여줘 극체를 정상적으로 방출한 난자들은 이미 높은 배반포 발달율을 가진 난자들만으로 선별된 것으로 보이며, 분할란만을 선별할 때 더욱 높은 배반포 발달율로 이어졌다.

분할란을 선별하여 배양할 때 활성화 처리 후 48시간째에 8세포기 이내의 난자들을 정상 분할란으로 보았으며, 8세포기를 넘어간 난자들을 과분할로 분류하여 이들의 배반포 발달율을 검토하였다. 분할란 선별 과정에서 분리된 정상 분할란과 과분할란, 미분할란을 활성화 처리 후 배양하여 배반포 발달율을 검사한 결과는 Table 4와 같다. 정상 분할란 난자들은 42.5%의 배반포 발달율을 보였으나, 과분할란 난자들은 4.5%, 48시간째에 분할하지 않은 난자들은 0%의 배반포 발달율을 보였다.

활성화 처리 후 48시간까지 분할하지 않은 난자들은 일부 2 세포기로 분할하였으나, 배반포기까지 발달하지는 못했으며, 48시간에 8세포기를 초과하여 분할한 난자들은 일부의 세포들은 핵이 없는 세포질 파쇄이거나 비정상적인 핵상태를 가지나, 일부의 정상적인 핵상태를 유지하는 세포들이 배반포기까지 발달을 지지하는 걸로 추정된다(Hao 등, 2003).

3. 돼지 난포란의 분할 시기에 따른 배반포 발달율 차이

Table 4. Comparison among the non-cleaved, normally cleaved and hyper-cleaved oocytes at 48 h after activation on development of porcine follicular oocytes

Cleavage selection	No. of oocytes treated	No. of blastocysts (%)
Non-cleaved	48	0 (0.0) ^a
Normally cleaved	160	68 (42.5) ^b
Hyper-cleaved	110	5 (4.5) ^a

^{a,b} Values within columns with different superscripts are significantly different ($p < 0.01$).

극체 선별을 실시하고 활성화 처리 후 12시간 간격으로 정상 분할란, 과분할란을 선별하여 미분할한 난모 세포는 다음 주기에 다시 분할 여부를 검사하여 48시간까지 분할한 난자들을 배양하여 배반포기까지 발달율을 조사한 결과는 Table 5에 제시되었다. 220개의 난자를 공시하여 활성화 처리 후 12시간 이내에 분할한 난자는 9개(4.1%)였으며, 12시간과 24시간 사이에 분할한 난자는 151개(68.6%), 24시간과 36시간 사이에 분할한 난자는 42개(19.1%), 36시간과 48시간 사이에 분할한 난자는 5개(2.3%)였다. 각 분할한 난자들을 배양하였을 때 배반포 발달율은 12시간과 24시간 사이에 분할한 난자들이 39.1%, 24~36시간 사이에 분할한 난자들이 9.5%였다. 0~12시간 사이와 36~48시간 사이에 분할한 난자들의 개수도 적지만 분할한 난자들은 배반포기까지 자라지 못하는 결과를 보여주었다. 시간 간격 간에 회수된 분할란을 배양하여 활성화 처리 후 12시간에서 24시간 사이에 총 공시란 220개 중 151개가 분할하여 68.6%가 분할하였으며, 24시간에서 36시간 사이에 총 공시란의 17.7%가 분할하여 12시간에서 36시간 사이에 86.3%가 분할하였다. 한편, 12시간에서 24시간 간격에서 분할한 151개 중 59개가 배반포기로 발달하여 39.1%가 배반포기까지 발달할 수 있는 발생율을 확인하였으며, 24시간에서 36시간 사이에 분할한 42개 중 4개가 배반포로 발달하여 9.5%가 배반포기로 발달할 수 있는 발생율을 보여주었다. 따라서 배반포 발달을 충분히 가진 난자들은 12시간에서 36시간 사이에는 분할하며, 특히 12시간에서 24시간 사이에 분할하는 난자들이 배양난자들의 배반포 발달율의 대부분에 기여하는 것으로 보인다.

첫 분할 시기는 수정란의 발생율을 예측하는 요인이 될 수 있으며(Kobayashi 등, 2004; Fenwick 등, 2002; Sakkas 등, 1998;

Table 5. Effect of first cleavage time after activation on development of porcine zygotes

Examined interval after activation (h)	0~12	12~24	24~36	36~48
No. of treated oocytes	220	211	60	18
No. of oocytes normally cleaved	7	142	39	5
No. of oocytes hyper-cleaved	2	9	3	0
No. of oocytes non-cleaved	211	60	18	13
No. of blastocysts/ cleaved (%)	0/9 (0.0) ^a	59/151 (39.1) ^b	4/42 (9.5) ^c	0/5 (0.0) ^a

^{a,b,c} Values within rows with different superscripts are significantly different ($p < 0.01$).

Shoukir 등, 1997), 소의 난모 세포의 첫 분할의 시기는 발달에 결정적이고 지속적으로 중요한 영향을 미친다(Lonergan 등, 1999; Van Soom 등, 1997). 소의 난모 세포를 활성화시켰을 때 24시간 이내에 86% 이상이 분할하였으며, 배반포기로 발달한 난자의 98%가 이때 분할한 난자라고 하였다(Amarath 등, 2007). 본 실험에서는 발달한 배반포 63개중 59개가 12시간에서 24시간 사이에 분할한 난자들이 기여하여 전체의 93.7%를 차지하였으며, 이는 Amarath 등(2007)이 보고한 결과와 유사하였다. 수정란의 첫 분할 시기는 유전적 요인(Warner 등, 1998), 수정란의 품질(Lonergan 등, 1999), 정자 요인(Ward 등, 2001; Eid 등, 1994), 수정란의 성(Avery 등, 1991; Tsunoda 등, 1985), 배양 조건(Peippo 등, 2001; Van Langendonck 등, 1997) 등이 발달기전을 조절하여 영향을 미친다고 알려져 있으나, 이들 요인들의 정확한 규명은 아직까지 밝혀지지 않았다.

적 요

본 연구에서 돼지 난포란에서 채취된 난모 세포들을 체외 성숙 후 형태적으로 선별하거나 극체 방출란을 선별하여 활성화 처리 후 48시간째에 분할란을 선별할 때 배발달율이 어느 정도 향상되는지를 검토하였다. 난모 세포를 48시간 성숙 배양 후 형태적 선별과 극체의 방출 유무를 검사하고, 선별된 난모 세포들을 16~18시간 추가 배양한 후 7% ethanol로 활성화시키고 5 μ g/ml cytochalasin B에 5시간 노출 후 PZM-5 배양액으로 7일간 배양하였으며, 배양 중 4일째 5% FBS를 추가하였다. 48시간 성숙 후 형태적으로 선별하였을 때, 21.9%가 제거되고 78.1%가 선별되었으며, 극체 방출란을 선별하였을 때, 32.1%가 제거되고, 67.9%가 선별되었다. 형태적으로 선별한 난자를 활성화 처리하여 48시간째에 분할율을 검사하였을 때, 15.8%가 분할하지 않았으며, 52.6%가 정상 분할하였고, 31.6%가 과분할하였으며, 극체 방출란을 선별하여 활성화 처리 후 분할율을 검사하였을 때 7.1%가 분할하지 않았으며, 73.1%가 정상 분할하였고, 19.8%가 과분할하였다. 체외 성숙된 난모 세포를 형태적으로 선별하고 활성화 처리 후 분할란을 선별하지 않았을 때, 16.7%가 배반포기로 발달하였고, 형태적으로 선별하고 분할란을 추가로 선별해 배양했을 때 31.7%가 배반포기로 발달하였으며, 극체 방출란만을 선별하여 활성화 처리 후 분할란을 선별하지 않았을 때 39.0%가 배반포기로 발달하였고, 극체 선별과 분할란 선별을 하였을 때 배반포기 발달율이 49.0%에 이르렀다. 48시간째 미분할 난자와 정상 분할 난자, 과분할 난자를 배양하였을 때 48시간째 미분할 난자는 배반포기로 발달하지 못했으며, 정상 분할 난자는 42.5%, 과분할 난자는 4.5%가 배반포기로 발달하였다. 분할하는 시기를 활성화처리 후 12시간 간격으로 조사하였을 때 0~12시간 사이에 4.1%가 분할하였고, 12~24시간 사이에 68.6%, 24~36

시간 사이에 19.1%, 36~48시간 사이에 2.3%, 48시간까지 미분할 난자가 5.9%였으며, 0~12시간 사이에 분할한 난자나 36~48시간 사이에 분할한 난자에서 배반포기로 발달한 난자는 없었으며, 12~24시간 사이에 분할한 난자의 39.1%, 24~36시간 사이에 분할한 난자의 9.5%가 배반포기로 발달하였다. 이상의 결과로 극체 방출란만을 선별하여 12~36시간 사이에 분할하는 난자들만을 선별하여 배양한다면 배발생능을 가진 난자들의 비율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- Amarath D, Kato Y and Tsunoda Y. 2007. Effect of the timing of first cleavage on *in vitro* developmental potential of nuclear-transferred bovine oocytes receiving cumulus and fibroblast cells. J. Reprod. Dev., Advance Publication.
- Avery B, Madison V and Greve T. 1991. Sex and development in bovine *in-vitro* fertilized embryos. Theriogenology, 35:953-963.
- Barnes FL and First NL. 1991. Embryonic transcription *in vitro* cultured bovine embryos. Mol. Reprod. Dev., 29:117-123.
- De Sousa PA, Caveney A, Westhusin ME and Watson AJ. 1998. Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenetic factors. Theriogenology, 49: 115-128.
- Ebner T, Moser M, Sommergruber M and Tews G. 2003. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development : A review. Hum. Reprod. Update, 9:251-262.
- Eid LN, Lorton SP and Parrish JJ. 1994. Paternal influence on S-phase in the first cell cycle of the bovine embryo. Biol. Reprod., 51:1232-1237.
- Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP and Herbert M. 2002. Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos *in vitro*. Hum. Reprod., 17:407-412.
- Hao Y, Lai L, Mao J, Im GS, Bonk A and Prather RS. 2003. Apoptosis and *in vitro* development of preimplantation porcine embryos derived *in vitro* or by nuclear transfer. Biol. Reprod., 69:501-507.
- Hunter AG and Moor RM. 1987. Stage-dependent effects of inhibiting ribonucleic acids and protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*. J. Dairy Sci., 70: 1646-1651.
- Kastrop PM, Bevers MM, Destree Oh and Kruip TA. 1991.

- Protein synthesis and phosphorylation patterns of bovine oocytes maturing *in vivo*. *Mol. Reprod. Dev.*, 29:271-275.
- Kobayashi T, Kato Y and Tsunoda Y. 2004. Effect of the timing of the first cleavage on the developmental potential of nuclear-transferred mouse oocytes receiving embryonic stem cells. *Theriogenology*, 62:854-860.
- Loneragan P, Khatir H, Piumi F, Rieger D, Humblot P and Boland MP. 1999. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 117:159-167.
- Peippo J, Kurkilahti M and Bredbacka P. 2001. Developmental kinetics of *in vitro* produced bovine embryos: the effect of sex, glucose and exposure to time-lapse environment. *Zygote*, 9:105-113.
- Sakkas D, Shoukir Y, Chardonnens D, Bianchi PG and Campana A. 1998. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as a indicator of embryo viability. *Hum. Reprod.*, 13:182-187.
- Shoukir Y, Campana A, Farley T and Sakkas D. 1997. Early cleavage of *in-vitro* fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum. Reprod.*, 12:1531-1536.
- Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML and First NL. 1989. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, 40:1257-1263.
- Sirard MA, Richard F, Blondin P and Robert C. 2006. Contribution of the oocytes to embryo quality. *Theriogenology*, 65:126-136.
- Tsunoda Y, Tokunaga T and Sugie T. 1985. Altered sex ratio of live young after transfer of fast- and slow- developing mouse embryos. *Gamete Res.*, 12:301-304.
- Vajta G, Zhang Y and Machaty Z. 2007. Somatic cell nuclear transfer in pigs: recent achievements and future possibilities. *Reprod. Fertil. Dev.*, 19:403-423.
- Van Langendonck A, Donnay I, Schuurbiens N, Auquier P, Carolan C, Massip A and Dessy F. 1997. Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. *J. Reprod. Fertil.*, 109:87-93.
- Van Soom A, Ysebaert MT and de Kruif A. 1997. Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in *in vitro*-produced bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 47:47-56.
- Ward F, Rizos D, Corridan D, Quinn K, Boland M and Loneragan P. 2001. Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryos development *in vitro* and fertility *in vivo*. *Mol. Reprod. Dev.*, 60:47-55.
- Warner CM, McElhinny AS, Wu L, Cieluch C, Ke X, Cao W, Tang C and Exlery GE. 1998. Role of the *ped* gene and apoptosis genes in control of preimplantation development. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 15:331-337.
- 김현종, 조상래, 최창용, 최선호, 한만희, 손동수, 김영근, 이승수, 류일선, 김인철, 김일화, 임경순. 2006. 돼지 난모 세포의 체외 성숙 후 극체 방출 및 미방출란의 핵형과 배발달율. *한국수정란이식학회지*, 21:169-175.
- 김현종, 최선호, 한만희, 손동수, 류일선, 김인철, 이장희, 김일화, 임경순, 조상래. 2005. 돼지 난모 세포의 단위발생에 있어서 성숙시간과 활성화 처리가 활성화와 발달에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지*, 20:25-33.

(접수일: 2007. 6. 22 / 채택일: 2007. 6. 26)