

생쥐 난자의 단위발생에 관한 연구

I. Ethanol 및 hyaluronidase처리에 의한 단위발생유기

이효종·하대식*·강태영·최민철

경상대학교 수의과대학

경상남도 보건환경연구원*

(1992년 8월 11일 접수)

Parthenogenetic development of mouse eggs

I. Parthenogenetic activation by ethanol and hyaluronidase treatments

Hyo-jong Lee, Dae-sik Ha*, Tae-young Kang, Min-cheol Choi

College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

*Kyongsangnam-Do Provincial Government Institute of Health and Environment**

(Received Aug 11, 1992)

Abstract : This experiment was carried out to find out the best condition for the parthenogenetic activation of mouse eggs by treating ethanol and hyaluronidase. For the parthenogenetic activation of eggs with ethanol, cumulus cell enclosed or denuded eggs were treated with 7% ethanol in D-PBS for 5, 7 or 9 minutes. For the activation of eggs with hyaluronidase, the eggs with cumulus masses were released into D-PBS with 100 unit hyaluronidase and treated for 10, 12 or 13 minutes. All of the treated eggs were incubated in BMOC-3 solution for 5 hours at 37°C at an atmosphere of 5% CO₂ in air. The types of parthenogenetic eggs were morphologically classified into haploid, diploid, immediate cleavage eggs under an inverted microscope.

The results obtained in this experiment were summarized as follows :

1. High activation rate(99%) had been achieved by treating the eggs with 7% ethanol for 7 minutes.
2. With 100 IU hyaluronidase, high activation rate(94%) had been achieved by treating for 12 minutes.
3. The most frequent type of parthenogenetic eggs activated with ethanol or hyaluronidase was haploid ($p < 0.05$).
4. The eggs collected from 18 to 22 hours post HCG injection showed higher activation rate than the eggs collected at 16 hours post HCG injection.
5. No significant difference ($p > 0.05$) in activation rate was shown in strain of mouse and in presence of cumulus cells.

Key words : parthenogenesis, ethanol, hyaluronidase, mouse egg.

* 이 논문은 1990년도 교육부 학술연구조성비에 의한 자유공모과제로 선정되어 연구되었음.

서 론

단위발생(parthenogenesis)이란 “웅성배우자의 공헌 없이 자성배우자만으로 태아를 형성하는 것”을 의미한다고 한다.¹ 또한 단위발생은 난자의 활성화에 의하여 유기되는데 활성화란 미수정란이 수정시와 같이 반휴지기 상태에서 일련의 빠른 형태학적 및 생리학적 변화가 야기되는 것을 일컫는다.²

단위발생을 유기시키기 위하여 난자를 활성화시키는 방법에 있어서는 전기자극법^{3,4}, avertin 등을 이용한 마취제 처리법⁵⁻⁷, 삼투압 조절법¹⁸, hyaluronidase 등을 이용한 효소처리법^{9,10}, ethanol 처리법¹¹⁻¹³, 열처리법¹⁴, $Ca^{++}-Mg^{++}-H^{+}$ ionophore(A23187) 처리법^{15,16}, 단백질합성억제제 처리법¹⁷ 광범위한 방법이 강구되어 왔다. 이러한 시도들은 난자 세포막의 전기적 특성의 변화⁶, 난자세포내의 Ca^{++} 의 변화^{18,19}, 난자세포내의 pH의 변화²⁰, 세포막의 투과성 변화²¹, 세포체질의 붕괴²², 수정과 유사한 난막반응유도 등²¹이 단위발생유기를 유기하는 것으로 주장되고 있으나 아직까지 그 기전에 대하여 명확히 규명되어 있지 않다. 생쥐에 있어서는 비교적 다른 포유동물종에 비하여 단위발생을 쉽게 일으킬 수 있으나 아직까지 25 체절기 태아 이후로는 발달시키지 못하고 있다.^{23,24}

근년에는 이 기술을 소^{3,25} 산업적으로 유용한 동물에 적용시키고자 하는 시도가 이루어지고 있으나 아직까지는 초보적인 단계에 있으므로 앞으로 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 본다. 한편으로는 발생학적으로 모성유전자의 역할과 부성유전자의 역할 규명을 위하여 단위 발생란을 이용하기도 하며,²⁶ 핵치환 기술을 병용하여 유전학적으로 동일한 개체를 다량생산하는 cloning기술개발에도 이 기법이 활용되어지고 있다.^{11,27,28}

본 연구에서는 생쥐난자를 모델로 하여 ethanol과 hyaluronidase를 처리하여 처리시간에 따른 발생유기 효과에 관하여 비교 조사하고 난자의 성숙도, 생쥐의 계통, 난구세포의 존재 여부에 따른 단위발생 유기효율 및 단위발생란의 형태학적 분류 등을 조사하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

공시동물 : 본 시험에 사용된 동물은 ICR, C57BL/6J, CBA 계통의 생쥐로서 생후 4~6주령, 체중 15~20g의 미성숙 암컷을 사용하였다.

공시동물의 사육조건으로서 실내온도는 20~23°C로 유지하고 조명은 1일 14시간(08:00~22:00)으로 조절

하고 물과 사료(실험동물용 펠릿사료, 삼양사)는 자유로이 급식시켰다.

과배란 유기 및 채란 : 과배란은 PMSG(Peamax, Japan) 5 IU를 생쥐의 복강내에 주사하고 48~50시간 후에 HCG(Sigma Chem. Co., USA) 5 IU를 동일한 방법으로 주사하여 유기시켰다. 미수정란의 채란은 hCG투여후 16, 18, 20 및 22시간에 경추탈구법으로 도살하여 복강을 개방하고 난관 및 자궁을 노출시킨 다음 자궁난관접합부와 난소사이에 있는 난관을 적출하였으며 이들 적출된 난관은 ethanol용액 소적 또는 100IU의 hyaluronidase가 용해되어 있는 Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS, Sigma Chem. Co., USA)에 담은 다음 fiber optic light illuminator가 부착된 Stereomicroscope(Swift, England)하에서 난관팽대부를 26 gauge needle로 천자함으로써 채란하였다.

단위발생의 유기

1) Ethanol 처리에 의한 단위발생유기시험 : Ethanol 처리에 의한 단위발생유기 방법은 Kaufman¹의 방법에 준하되 일부 수정하여 실시하였다. Ethanol용액은 D-PBS에 무수 ethanol(Sigma Chem. Co., USA)을 혼합하여 최종농도를 7%로 조정하여 제조하였다. 채란된 난자를 Ethanol 용액에 각각 5, 7 및 9분동안 처리한 다음 HEPES-BMOC-3 액 소적에 5~6회 세척한후 $NaHCO_3$ -BMOC-3액에 담아 37°C 배양기(5% CO_2 , 95% air)에서 4~5시간동안 배양한후 단위발생유기율을 조사한 다음 단위발생란을 형태별로 분류하였다.

2) Hyaluronidase 처리에 의한 단위발생유기시험 : Hyaluronidase 처리에 의한 단위발생 유기법은 Graham과 Dussen⁹, Kaufman 등¹⁰의 방법에 준하되 일부 수정하여 실시하였다. Hyaluronidase 용액은 D-PBS에 100 IU의 hyaluronidase(Type 1-s, Sigma Chem. Co. USA)를 용해시켜 준비하였다. Culture dish(60×15mm, 녹십자, 한국)에 hyaluronidase용액 소적에 적출된 난관을 담은후 난관 팽대부를 천자하여 난자를 회수한 다음 이 회수된 난자는 hyaluronidase용액 첫 소적에서 2~3분간 노출시켜 난구세포피를 제거한 다음 이 용액 소적으로 세척하고 최종 소적으로 옮겨져 일정한 시간동안 처리하였다. 처리시간은 첫 소적에 노출된 순간부터 10, 12 및 13분간으로 각각 HEPES-BMOC-3액에 5~6회 세척한후 $NaHCO_3$ -BMOC-3액에 4~5시간동안 배양을 실시하여 단위발생유기율을 조사한 다음 단위발생란의 형태별로 분류하였다.

3) 난자의 성숙도에 따른 단위발생유기시험 : HCG 주사후 16, 18, 20 및 22시간에 채란된 난자를 hyaluronidase로 난구세포를 제거하고 1)과 같은 방법으로

7% ethanol 용액으로 5분간 처리하여 이들의 단위발생 유기를 조사 및 형태학적 분류를 실시하였다.

4) 생쥐의 strain별 단위발생유기시험 : 생쥐의 계통별로 ICR, C57BL/6J 및 CBA계통의 생쥐로부터 채란된 난자를 1)과 같은 방법으로 7% ethanol 용액에 5분간 처리하여 단위발생을 유기하고 이들의 단위발생 유기를 조사 및 형태학적 분류를 실시하였다.

5) 난구세포 존재 여부에 따른 단위발생 유기시험 : HCG 주사후 18~20시간에 채란된 난자를 hyaluronidase로 난구세포가 제거된 것과 제거되지 않은 것으로 구분하여 1)과 같은 방법으로 7% ethanol 용액에 5분간 처리하여 이들의 단위발생유기율의 차이 및 단위발생란의 형태학적 차이 등을 조사하였다.

6) 단위발생란의 형태학적 분류 : 단위발생유기후 4~5시간의 배양이 끝난 난자들은 도립현미경(100 X, Olympus, Japan)하에서 Graham과 Deussen⁹ 및 Kaufman과 Sachs²⁹의 판정기준 방법에 준하여 감수분열과 세포분열의 유무에 따라 다음과 같이 분류하였다.

(1) 반수체란(Haploid) : 제2극체와 하나의 전핵을 가지고 있는 난자

(2) 분할란(Immediate cleavage) : 제2극체를 형성하는 대신에 반으로 분할된 난자.

(3) 이배체란(Diploid) : 제2극체가 억제되어 1개 또는 2개의 전핵을 가지고 있는 난자

통계학적 분석 : Steel과 Torrie³⁰에 의한 방법에 준하여 각 처리군간의 유의성 검정은 χ^2 -test를 실시하였다.

결 과

Ethanol처리시간에 따른 단위발생유기효과 : HCG 주

사후 18~20 시간에 채란된 난자를 7% ethanol 용액에 5, 7 및 9분간 처리하였을 때 이들의 단위발생 유기를 및 형태학적 변화는 Table 1에 나타난 바와 같다.

7% ethanol을 5, 7 및 9분간 처리하였을 때 그 단위발생 유기율은 각각 96, 99 및 96%로서 높은 단위발생유기율을 보였고 처리시간에 따른 단위발생유기율에 있어서는 유의할만한($p < 0.05$) 차이가 없었다. 생쥐난자의 단위발생을 유기하기 위하여 7% ethanol을 사용할 경우에는 7±2분 처리하는 것이 적합한 것으로 사려된다.

7% ethanol로서 생쥐난자를 활성화시켰을 때 5분 및 7분간 처리시에는 반수체란이 각각 66 및 88%로 가장 많이 나타났고 9분간 처리시에는 분할란이 가장 많이 나타났다.

Hyaluronidase 처리시간에 따른 단위발생 유기 효과 : Hyaluronidase 처리시간에 따른 단위발생유기율은 10분이 72%, 12분이 94% 및 13분이 86%로서 이들중 12분간 처리하였을 때가 유의적($p < 0.05$)으로 단위발생유기율이 높았다. Hyaluronidase 처리로는 ethanol 처리에서 보다 높은 단위발생유기율을 기대하기 어렵다고 본다.

Hyaluronidase를 10분, 12분 및 13분간 처리하였을 때 분할란이 각각 14, 22 및 21%로서 처리시간이 길면 약간 증가하는 경향이었으나 유의적인 차이는 없었고, 반수체란에서는 10, 12 및 13분간 처리하였을 때 각각 67, 59 및 69%로서 단위발생 유기된 란 중 가장 많이 나타나는 경향을 보였으나 처리시간별 유의적인 차이는 역시 없었고, 이배체란인 경우에도 처리시간별 유의차는 없었다.

난자의 성숙도에 따른 단위발생유기효과 : ICR 생쥐에 HCG 주사후 16, 18, 20 및 22시간에 채란된 난자들

Table 1. Effects of duration of ethanol treatment on activation of mouse eggs

Treatment	Time of treatment (min.)	No. of eggs treated	No. of eggs activated(%)	No. of activated eggs by type (%)		
				Haploid	Diploid	Immediate cleavage
Ethanol	5	372	357(96) ^a	234(66) ^b	56(16) ^b	67(19) ^a
	7	175	175(99) ^a	153(88) ^c	1(0.6) ^a	20(12) ^a
	9	52	50(96) ^a	16(32) ^a	3(6) ^{ab}	31(62) ^b
Total		599	581(97)	403(69)	60(10)	118(20)

The values with different letters in the same column are significantly different($p < 0.05$).

Table 2. Effects of duration of hyaluronidase treatment on activation of mouse eggs

Treatment	Time of treatment (min.)	No. of eggs treated	No. of eggs activated(%)	No. of activated eggs by type (%)		
				Haploid	Diploid	Immediate cleavage
Hyaluronidase	10	50	36(72) ^a	24(67) ^a	7(19) ^b	5(14) ^a
	12	78	73(94) ^b	43(59) ^a	14(19) ^a	16(22) ^a
	13	49	42(86) ^{ab}	29(69) ^a	4(10) ^a	9(21) ^a
Total		177	151(85)	96(63)	25(17)	30(20)

The values with different letters in the same column are significantly different($p < 0.05$).

Table 3. Effect of oocyte age on activation of mouse eggs

Hours post HCG injection	No. of eggs treated	No. of eggs activated (%) [*]	No. of activated eggs by type(%)		
			Haploid	Diploid	Immediate cleavage
16	209	176(84) ^a	90(43)	78(37)	8(3)
18	223	209(94) ^b	130(62)	35(17)	44(21)
20	141	129(92) ^b	66(51)	6(5)	57(44)
22	100	95(95) ^b	48(51)	8(8)	39(41)

* The values with different letters in the same column are significantly ($p < 0.05$) different.

Table 4. Ethanol-activation rates and types of eggs from different strain of mouse

Strain of mouse	No. of eggs treated	No. of eggs activated (%) [*]	No. of activated eggs by type(%)		
			Haploid	Diploid	Immediate cleavage
ICR	617	548(89)	389(71)	29(5)	130(24)
C57BL/6J	58	53(91)	38(72)	4(8)	11(21)
CBA	46	42(91)	37(88)	3(7)	2(5)

* There was no significant ($p > 0.05$) different in activation rates between strain of mouse.

Table 5. Ethanol-activation rates and types of eggs with or without cumulus cells

Group of eggs	No. of eggs treated (No. of replication)	No. of eggs activated (%) [*]	No. of activated eggs by type(%)		
			Haploid	Diploid	Immediate cleavage
Cumulus-enclosed	617(29)	548(89)	389(71)	29(5)	130(24)
Cumulus-free	385(21)	329(85)	202(62)	31(9)	96(29)

* There was no significant ($p > 0.05$) different between cumulus-enclosed and cumulus-free eggs.

hyaluronidase로 난구세포를 제거하고 이들을 7% ethanol로 5분간 처리하였을 때 단위발생유기율을 조사하고 이들 단위발생란을 형태학적으로 분류하였던 결과는 Table 3에 나타난 바와 같다. 단위발생유기율은 HCG 주사후 18, 20 및 22시간에 채란된 난자에서 각각 94, 92 및 95%로서 HCG 주사후 16시간에 채란된 난자에서의 단위발생유기율(84%)에 비하여 유의적($p < 0.05$)으로 높았다.

생쥐의 strain 별 단위발생유기효과 : ICR, C57BL/6J 및 CBA 계통의 생쥐로부터 채란된 난자를 7% ethanol로 5분간 처리하였을 때 이들의 단위발생유기율을 조사하고 단위발생란의 형태학적 분류를 실시하였던 결과는 Table 4에 나타난 바와 같다.

ICR, C57BL/6J 및 CBA 생쥐난자의 단위발생유기율은 각각 89, 91 및 91%로서 높은 비율을 보였으며 strain 간에는 유의할만한 차이가 없었다($p > 0.05$). 또한 이들의 형태학적 분류에서는 반수체란이 각각 71, 72 및 88%를 차지하였다.

난구세포 존재여부에 따른 단위발생유기효과 : ICR 생쥐에 hCG 주사후 18~20시간에 채란된 난자를 한 처리군에서는 난구세포에 싸여진 채로 다른 한 처리군에서는 hyaluronidase의 처리로 난구세포를 제거한 다음 ethanol 처리에 의하여 이들의 단위발생유기율 및 이들 단위발생유기란의 형태학적 분류를 조사한 결과는 Tab-

le 5에 나타난 바와 같다. 난구세포가 제거된 난자의 단위발생유기율은 85%로서 난구세포가 싸여진 난자의 단위발생유기율 89%에 비하여 다소 낮았으나 유의할만한 차이점은 보이지 않았다($p > 0.05$).

단위발생유기란의 형태학적 분류에 의하면 이 두 처리군에서 반수체란이 각각 71 및 62%로서 가장 많이 나타났고, 분할란은 각각 24 및 29%를 나타내었다.

고 찰

생쥐의 난자에서 ethanol을 처리하여 단위발생을 유도한 예는 Cuthbertson¹²이 처음 시도한 이래 처리시간과 그 농도에 따라 단위발생유기효과에 대하여 Kaufman¹⁰과 한 등³¹에 의해 연구발표된 바가 있다. Kaufman¹⁰과 Webb 등³³은 생쥐난자를 HCG 주사후 17시간과 20시간에 채취하여 7% ethanol 용액에 4, 5분간 처리함으로써 각각 82.5% 및 92.4%의 단위발생유기율을 얻었다. 본 실험에서 HCG 주사후 18~20시간에 채란된 난자를 7% ethanol 용액에 5분간 처리하였을 때의 단위발생유기율은 97% 및 7분간 처리하였을 때의 단위발생유기율은 99%로서 더욱 높은 단위발생유기율을 얻었다. 또한 O'Neill 등³⁴이 보고한 성적 56.5%보다 훨씬 높은 성적을 얻었다.

Ethanol이 생쥐난자를 활성화시키는 기전은 명확하지 않으나 Cuthbertson et al¹²은 세포내 Ca^{2+} 의 일시적 급

증가에 의하여 난자가 활성화된다고 하며 Whitaker와 Aitchison³⁵ 및 Zimmerman과 Vienken³⁶은 이러한 유입은 phosphatidyl inositol의 가수분해조절로 인한 ethanol과 A23187에 의해 protein kinase(PK) 단위발생유기물 간접적으로 자극하였기 때문이라고 하였으며 Hoek et al³⁷은 난자의 PK는 plasma membrane에 ethanol과 A23187과 같은 소수성 인자의 직접적인 상호작용에 의해 일시적인 phospholipase C활성화에 의해 영향을 받는다고 한다.

Hyaluronidase 처리에 의해 단위발생유기는 Graham과 Deussen⁹, Iles et al³²과 Kaufman et al²⁹에 의하여 시도된 바 있으나 이들은 모두 처리시간에 따른 단위발생유기율을 조사한 바는 없다. Hyaluronidase 처리법으로 Graham과 Deussen⁹이 얻은 단위발생유기율은 70~90%이었고, O'Neill et al³⁰이 얻은 단위발생유기율은 66%이었다. 본 실험에서 hyaluronidase 처리시간 10분에서 72%, 12분에서 94%, 13분에서 86%이었으며 그중 처리시간이 12분이었을 경우 그 단위발생유기율이 가장 높게 나타났고 상기 보고자들의 성적보다도 나은 결과를 얻었다. Cuthbertson⁸은 M-16에 ethanol 농도를 8.6%로 2분간 처리하였을 경우에는 91.9%의 단위발생유기율을 얻을 수 있다고 하였으므로 ethanol 농도를 높일 경우에는 상대적으로 처리시간을 짧게 주는 것이 좋을 것으로 사료되며 D-PBS 대신에 M-16을 사용하여서도 높은 단위발생유기율을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

난자의 성숙도에 따른 단위발생유기효과를 조사하기 위하여 HCG 주사후 16시간 부터 2시간 간격으로 22시간까지 채란된 난자를 ethanol 처리로 단위발생을 유지시켜 본 바 16시간에 채란된 난자보다는 18~22시간에 채란된 난자에서 유의적으로($p < 0.05$) 높은 유기율을 보였다. 이러한 결과는 Kaufman¹⁰ 및 한 등³¹의 보고와 일치하였다. Collas et al³⁸은 성숙된 난자일수록 배란 직후의 난자에 비하여 전기적 자극에 의하여 활성이 잘 일어나나 난자의 과립현상(fragmentation)과 붕괴(lysis)에 의한 사멸율이 높으므로 배란후 25시간이상 경과된 난자를 단위발생에 이용하는 것은 부적합하다고 한다.

본 실험에서 ICR, C57BL/6J 및 CBA 계통간에 단위발생율의 차이는 나타나지 않았다. 그러나 이들의 체외 배양 또는 체내이식시의 발달능력에 대하여는 더욱 조사하여 보아야할 것으로 사려된다.

결 론

본 연구는 생쥐에서 단위발생유기방법을 개발 확립하고자 실시하였다. 과배란처리에 의하여 회수된 난자를 7% ethanol 용액 및 hyaluronidase용액 처리시간, 난자

의 성숙시간, 생쥐의 strain별, 난구세포의 존재여부에 따른 단위발생유기효과를 단위발생유기율 및 형태학적으로 반수체, 이배수체 및 분할란의 발생빈도를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 난자를 7% ethanol에 7분간 처리하였을 경우 단위발생유기율은 99%로서 단위발생유기율이 가장 높았다.
2. 난자를 100 IU hyaluronidase에 10, 12 및 13분간 처리하였을 때 12분에서 단위발생유기율이 가장 높게(94%) 나타났다.
3. 단위발생유기란의 형태는 ethanol 처리군과 hyaluronidase 처리군에서 반수체란이 분할란이나 이배체란에 비하여 발생빈도가 높았다.
4. HCG 주사후 18~22시간에 채란된 난자가 16시간에 채란된 난자에 비하여 높은 단위발생유기율을 보였다.
5. 생쥐의 계통 및 난구세포의 존재여부는 난자의 단위발생유기율에 유의할 만한 차이를 나타내지 않았다.

사사 : 본 연구 수행에 있어서 생쥐공급에 협조하여 주신 유한양행에 깊이 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Kaufman MH. The chromosome complement of single-pronuclear haploid mouse embryos following activation by ethanol treatment. *J Embryol Exp Morph* 1982 ; 71 : 139-154.
2. Solter D, Biczysko W, Graham C, et al. Ultrastructure of early development of mouse parthenogenesis. *J Embryol Exp Zool* 1974 ; 188 : 1-24.
3. Kono T, Iwasaki S, Nakahara T. Parthenogenetic activation by electric stimulus of bovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenol* 1989 ; 32 : 569-576.
4. Onodera M, Tsunoda Y. Parthenogenetic activation of mouse and rabbit eggs by electric stimulation *in vitro*. *Gamete Res* 1989 ; 22 : 277-283.
5. Kaufman MH. Parthenogenetic activation of mouse oocytes following avertin anesthesia. *J Embryol Exp Morph* 1975 ; 233 : 941-946.
6. Seeman P, Chen SS, Chan-Wong M, et al. Calcium reversal of nerve blockage by alcohols, anesthetics, tranquilizers and barbiturates. *Can J Physiol Pharmacol* 1974 ; 52 : 526-534.
7. Siracusa G, Whittingham DF, Codonesu M, et al. Local anesthetics and phenothiazine tranquilizers in-

- duce parthenogenetics activation of the mouse oocyte. *Develop Biol* 1978 ; 65 : 531~535.
8. Kaufman MH, Surani MAH. The osmolarity of mouse parthenogenesis. *J Embryol Exp Morph* 1974 ; 31 : 513~526.
 9. Graham CF, Deussen ZA. *In vitro* activation of mouse eggs. *J Embryol Exp Morph* 1974 ; 31 : 497~512.
 10. Kaufman MH. Parthenogenesis in the mouse. *Nature, Lond* 1973 ; 242 : 457~476.
 11. Barton SC, Adams CA, Norris ML, et al. Development of gynogenetic and parthenogenetic inner cell mass and trophoctoderm tissues in reconstituted blast oocyst in the mouse. *J Embryol Exp Morph* 1985 ; 90 : 267~285.
 12. Cuthbertson KSR, Whittingham DG, Cobbold PH. Free Ca increases in exponential phases during mouse oocyte activation, *Nature* 1981 ; 294 : 754~757.
 13. Cuthbertson KSR. Parthenogenetic activation of mouse oocytes *in vitro* with ethanol and benzylalcohol. *J Exp Zool* 1983 ; 226 : 311~314.
 14. Balkier H, Tarkowski AK. Diploid parthenogenetic mouse embryo produced by heat-shock and cytochalasin B. *J Embryol Exp Morph* 1976 ; 35 : 25~39.
 15. Ware CB, Barnes FL, Maiki-Lauria M, et al. Age dependence of bovine oocyte activation. *Gamete Research* 1989 ; 22 : 265~275.
 16. Aoyagi Y, Kameyama K, Takeda T. Artificial activation of bovine oocytes matured *in vitro* by electric shock or exposure to ionophore A23187. *Theriogenology* 1992 ; 37 : 188.
 17. Ridgway EB, Gilkey JC, Juffe LF. Free calcium increases explosively in activation medulca eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977 ; 74 : 623~627.
 18. Rickords LF, White Kl. Electrofusion-induced intracellular Ca^{2+} flux and its effect on murine oocyte activation. *Mol Reprod Develop* 1992 ; 31 : 152~159.
 19. Fissore RA, Robl JM. Intracellular Ca^{2+} response of rabbit oocytes to electrical stimulation. *Mol Reprod Develop* 1992 ; 32 : 9~16.
 20. Siracusa G, Whittingham DF, Codonesu M, et al. Parthenogenetic activation of mouse oocytes induced by inhibitors of protein synthesis. *J Embryol Exp Morph* 1978 ; 43 : 157~166.
 21. Johnson JD, Epel D, Paul M. Intracellular pH and activation of sea urchin eggs after fertilization. *Nature, Lond* 1976 ; 262 : 661~654.
 22. Patterson HL, Zamboni L. Cortical granule loss in parthenogenetic ova activated by electrical shock. *In Proceedings of the 9th Annual Meeting of the Society for the study of Reproduction* 1976 : Abstract, No. 123.
 23. Kaufman MH, Barton SC, Surani MAH. Normal postimplantation development of mouse parthenogenetic embryos to the forelimb bud stage. *Nature London* 1977 ; 265 : 53~55.
 24. Surani MAH, Barton SC. Development of gynogenetic eggs in the mouse ; Implications for parthenogenetic embryos. *Science* 1983 ; 222 : 1034~1036.
 25. Nagai T. Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes *in vitro* with ethanol. *Gamete Res* 1987 ; 16 : 243~249.
 26. Barra J, Renard JP. Diploid mouse embryos constructed at the late 2-cell stage from haploid parthenotes and androgenotes can develop to term. *Development* 1988 ; 102 : 773~779.
 27. Hoppe PC, Illmensee K. Full-term development after transplantation of parthenogenetic embryonic nuclei into fertilized mouse eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982 ; 9 : 1912~1916.
 28. Tsunoda Y, Yasui T, Okubo Y, et al. Development of one or two blastomeres from eight-cell mouse embryos to term in the presence of parthenogenetic eggs. *Theriogenol* 1987 ; 28 : 615~623.
 29. Kaufman MH, Sachs L. Complete preimplantation development in culture of part henogenetic mouse embryos. *J Embryol Exp Morph* 1976 ; 35 : 179~190.
 30. Steel RGD, Torrie JH. Principles and procedures of statistics. *McGraw Hill Book Co New York USA* 1960.
 31. 한용만, 백청순, 이경아 등. 생쥐에 있어서 Ethanol 處理에 의한 單爲發生의 誘起. 한국축산학회지 1987 ; 29(9) : 383~389.
 32. Iles SA, Mcburney MW, Bramwellim SR, et al. Development of parthenogenetic and fertilized mouse embryos in the uterus and in extra-uterine sites. *J Embryol Exp Morph* 1975 ; 34 : 387~405.
 33. Webb M, Sarahk H, Marobernard. Parthenogenesis and cytoskeletal organization in aging mouse eggs. *J Embryol Exp Morph* 1986 ; 95 : 131~145.
 34. O'Neil GT, McDougall RD, Kaufman MH. Ultra-

- tructural analysis of the second meiotic spindle in ethanol-induced parthenogenes. *Gamete Res* 1989 ; 22 : 285~299.
35. Whitaker MJ, Aitchison MJ. Calcium-dependent polyphosphoinositide hydrolysis is associated with exocytosis *in vitro*. *Fed Eur Biochem Soc Lett* 1985 ; 182 : 119~124.
36. Zimmerman U, Vienken J. Electric field-induced cell-to-cell fusion. *J Member Biol* 1982 ; 67 : 165~182.
37. Hoek BJ, Thomas AP, Rubin R, et al. Ethanol-induced mobilization of calcium by activation of phosphoinositide-specific phospholipase C in intact hepatocytes. *J Biol Chem* 1987 ; 262 : 682~691.
38. Collas P, Balise JJ, Hofman GA, et al. Electrical activation of mouse oocytes. *Theriogenology* 1989 ; 32 : 835~844.
-