

생쥐 원형정자세포의 미세주입에 의한 수정

이상민 · 백청순 · 구덕본 · 김모경 · 김진희 · 박흥대* · 이훈택 · 정길생

건국대학교 생명과학연구원, 동물자원연구센터

Fertilization by Microinjection of Mouse Round Spermatid

Lee, S. M., C. S. Baik, D. B. Koo, M. K. Kim, J. H. Kim, H. D. Park*, H. T. Lee and K. S. Chung

Animal Resources Research Center, Academy of Life Science, Kon-Kuk University

SUMMARY

This study was carried out to investigate the fertilizing ability of round spermatids isolated from seminiferous tubules. A round spermatid was introduced into the perivitelline space of a mature oocyte using Leitz micromanipulators and then subjected to electrofusion. Electrofusion was induced by applying a single DC pulse of 90V with a duration of 60 μ sec using Model 611 Square Wave Stimulator (Phipps and Bird, U.S.A) in 0.3 M sucrose fusion medium containing 0.05 mM CaCl₂ and 0.1 mM MgSO₄. Oocyte pre-activation was conducted by exposure to a single DC(80V, 80 μ sec) pulse in electrofusion medium at 1 hour before electrofusion. The incidence of fusion with pre-activated oocytes (23.8%, 57/239) was higher than that with nonactivated oocytes (6.7%, 3/45). The most of electro-stimulated mouse oocytes cleaved regardless of the success or failure of fusion. Karyotyping of embryos that developed into blastocysts after exposure to the fusion pulse were performed. We found that blastocysts from the fused oocytes were diploid whereas blastocysts from the unfused oocytes were haploid. About 11.7 and 11.5% of fused and unfused oocytes were developed to the blastocyst stage, respectively. There was no significant difference between the developmental potentials of fused and unfused oocytes. Therefore, these results suggest that the mouse mature oocyte can be fertilized by fusion with a round spermatid and subsequently developed normally.

I. 서 론

포유동물에 있어서의 개체발생은 생체내 혹은 생체 외에서 정자가 성숙을 완료한 난자의 세포질속으로 침입한 다음, 난자의 세포질내에 존재하는 maturation promoting factor(MPF)가 활성화되어 응성 및 자성전핵을 형성한다. 그 후 형성된 두개의 전핵의 융합

을 통하여 전능성을 가진 1-세포기 수정란을 형성함으로써 개체발생이 시작된다. 따라서 서로 다른 형태를 가진 자성과 응성의 생식세포들이 수정을 유도하기 위해서는 이들 생식세포의 성장과 성숙이 완료되어야만 한다. 즉 자성 생식세포는 수정적기인 제2감수분열 중기까지 성숙한 다음, 배란이 유도되고 수정에 참여함으로써 활성화되어 제2감수분열을 완료하게 된다. 이에 반해 응성생식세포는 수정적기인 제2난모세포를 만

* 대구대학교 공과대학 생물공학과(Dept. of Biotechnology, College of Engineering, Tae-Gu University)

나기 전에 감수분열을 완료한 후, 형태변화를 통하여 성장과 성숙을 완료하게 된다. 특히 정자의 형성과정 에 있어서 정소에서 제2감수분열 완료 직후의 웅성 생 식세포를 원형정자세포(round spermatid)라 하며, 이 세포는 반수성(haploid)의 염색체를 가진 발생초 기의 정자세포로서 정소와 정소상체에서 복잡한 화학 적 구조적 변화를 통하여 생물학적 기능이 완전한 정 자로 발생하게 된다.

최근 체외수정의 효율 증진과 남성불임증의 치료수 단으로서 원형정자세포의 이용 가능성이 검토되고 있 다. 즉, 핵치환시 사용하는 미세조작기법과 전기자극 에 의한 세포융합법을 이용하여 원형 정자세포를 성숙 이 완료된 제2난모세포의 세포질 속으로 도입하여 수 정을 유도하려는 연구가 활발히 진행되어 왔다(Ogura와 Yanagimachi, 1993; Ogura 등, 1993, 1994).

현재 미세조작기를 이용하여 시도되고 있는 미세수 정기술은 intracytoplasmic sperm injection(IC-SI), subzonal insemination, zona drilling 및 zona cracking 등의 기술이며, 이 기술은 모두 성공적으로 이용되고 있다. 그 중에서도 가장 효율적으로 사용되고 있는 방법은 한개의 성숙한 정자만을 난자의 세포 질내에 직접 주입하여 수정을 유도하는 ICSI가 최근 에는 제일 각광을 받고 있다. ICSI에 의한 미세수정법 은 인간을 비롯한 몇몇 포유동물에서 상당히 양호한 성적(Palermo 등, 1992; Van Steirteghhe 등, 1994) 이 보고되고 있다. 그러나 ICSI는 효과적인 방법이기 는 하지만 주입용 pipette를 세포질 속으로 직접 주입 하는데 따른 물리적인 손상이 크다. 특히 생쥐의 난자 는 상대적으로 크기가 작기 때문에 미세주입에 의한 세포질의 물리적 손상이 더욱 크므로 성공적으로 ICSI를 실시하기 위해서는 난자에 대한 물리적 손상을 줄일 수 있는 특별한 장치를 장착해야만 한다(Kimura 등, 1995).

이에 Ogura와 Yanagimachi(1993)는 hamster에서 미세조작기법으로 원형정자세포의 핵을 제2난모세 포의 세포질 속으로 직접 주입하여 수정을 유도한 다음 2세포기까지 발달시키는데 성공하였으나, 그 이후의 배발생은 불가능하였다고 한다. 그리고 Ogura 등 (1993)은 핵 치환시 사용하는 미세조작기법과 세포융 합법을 도입하여 hamster 난자의 위관강속으로 원형 정자세포를 주입할 경우, 웅성 및 자성전핵의 형성과

핵인 및 새로운 DNA의 합성이 관찰되었고, 융합된 난 자 등이 2-세포기까지 발달하는 것을 확인하였다. 그 리고 이 연구진은 다음 실험(1994)에서 세포의 생존 성을 높이기 위하여 난자의 조작온도를 10℃로 조절한 다음 생쥐의 난자에 미세수정을 실시한 결과, 조작된 95%가 2-세포기까지 발달하였고 6마리의 산자를 성공 적으로 생산하였다.

이에 본 연구에서는 미세조작 기법과 전기융합법을 병용하여 생쥐의 정소에서 채취한 발생초기의 원형정 자세포를 성숙이 완료된 제2감수분열 중기의 난모세포 의 위관강 속에 주입하여 수정을 유도한 다음, 주입된 원형정자세포가 정상적인 수정능과 그 이후의 배발생 능을 갖고 있는지의 여부를 확인하고자 실험을 실시하 였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물

공시동물은 ICR 계통의 생쥐로서 자성생쥐는 4-6주 령, 체중은 15~20g이었고, 웅성생쥐는 10~14주령, 체중은 30~45g의 성숙이 완료된 생쥐를 사용하였다. 이들 생쥐의 사육조건은 일조시간을 14시간으로 조절 하고, 고형사료와 식수는 무제한 공급하였다.

2. 배양액

본 연구에 사용된 기초배양액은 CZB액(Chatot 등, 1989)이었고, 전기자극에 의한 원형정자세포와 난 모세포의 세포질과의 융합 및 난모세포의 활성화를 위 한 배양액은 0.05 mM CaCl₂와 0.1 mM MgSO₄가 첨가된 0.3 M sucrose 용액을 사용하였다. 먼저 난자 의 회수 및 원형정자세포와 전기융합된 난자의 배양을 위한 배양액은 기초배양액을 사용하였고, 회수된 난모 세포의 난구세포를 제거하는 데에는 기초배양액에 300μg/ml의 hyaluronidase를 첨가하여 사용하였다. 그리고 원형정자세포를 난자의 위관강 속에 주입하여 수정을 유도하는 미세조작용 배양액은 기초배양액에 HEPES가 첨가된 배양액을 사용하였다. 이들 모든 배양액은 pH는 7.2~7.4, 삼투압은 280~290 mOsm 로 조정하였고, 사용직전에 0.22μm Millipore filter 로 여과 제균한 다음, 4℃ 냉장고에 보관하면서 사용 하였다.

3. 난자의 미세수정을 위한 준비

자성생쥐의 복강내에 5IU의 Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG ; Pregnenol, Australia)을 주사한 다음, 48시간 후에 동일한 방법으로 5IU의 human Chorionic Gonadotropin (hCG; Sigma, U.S.A.)를 주사하여 과배란을 유도하였다. 제 2 감수분열 중기의 난자는 hCG주사후 14~16시간째에 난관 팽대부에서 회수한 다음 난구세포를 제거하였다. 신선배양액으로 세척한 다음, 난모세포의 활성화를 위하여 미리 준비된 세포융합용 배양액에서 3~5분간 평형을 실시하였다. 그 후 실체현미경하에서 고정된 세포융합용 배양액으로 채워진 fusion chamber속의 200 μ m 거리의 두 전극 사이에 옮기고, 통전 지속시간은 60 μ sec, 90 V의 직류전압 1회의 전기자극 처리로 난자의 활성화를 유도하였다(이 등, 1994).

4. 원형정자 세포의 준비

웅성생쥐의 정소를 회수한 다음, erythrocyte-lysing buffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 2 mM EDTA, pH 7.2)에서 정소막을 제거했다. BSA

가 함유되지 않은 HEPES-CZB 배양액에서 곡세정관을 아주 작게 세절한 다음, 피펫으로 부드럽게 pipetting함으로써 각각의 정자세포를 분리하고, 이들 세포 부유액은 70 μ m nylon mesh를 사용하여 여과후 1,000 rpm에서 4분간 원심분리를 실시하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 0.1~0.2 mg/ml의 pronase를 함유한 HEPES-CZB배양액 (BSA무첨가)으로 약 1분간 처리한 후 1,300 rpm에서 4분간 원심분리 후 재차 상층액을 제거하고 BSA가 함유된 HEPES-CZB 배양액을 첨가하여 성숙중이거나 성숙한 원형정자 세포나 정자가 응집되어 있는 세포괴를 4~5회 부드럽게 pipetting을 한 후 이를 세포 부유액으로부터 제거시켰다. 동일한 배양액으로 1,000 rpm에서 4분간 원심으로 2~3회 세척한 후 4 $^{\circ}$ C냉장고에 보관하면서 실험에 공시하였다(Fig. 1). 채취된 생쥐의 원형 정자세포는 크기가 약 10 μ m로서, 형태학적인 특징으로는 뚜렷한 등근 핵과 그 중심부에 핵인을 가지고 있었다.

5. 원형정자세포의 난자내주입을 위한 미세조작과 전기융합

꿀지거나 초기 두모기의 원형정자세포를 활성화가

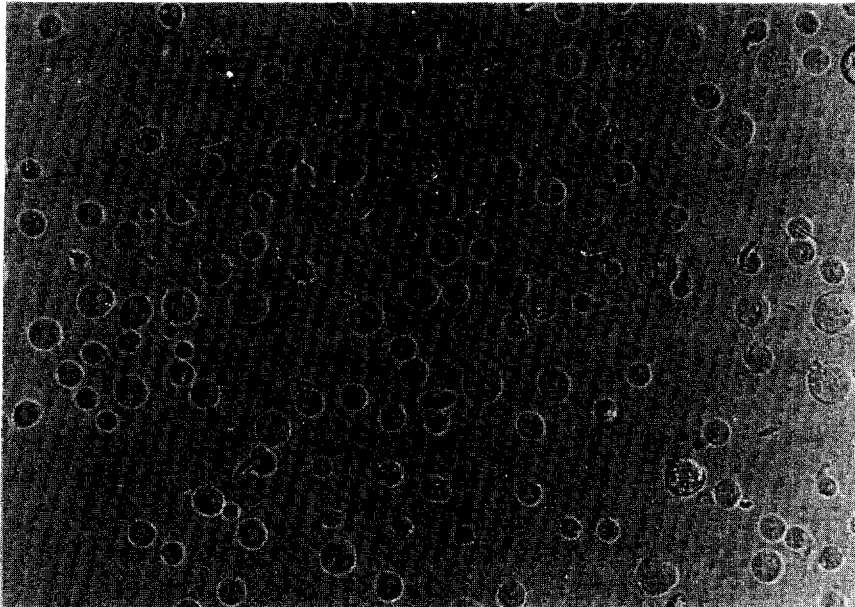


Fig. 1. Spermatogenic cells isolated from seminiferous tubules of mouse ($\times 320$). sc, spermatocyte; rs, round spermatid; Round bodies smaller than spermatids are residual bodies without a nucleus (arrowhead).

유도된 난모세포의 위란강 속으로 주입하기 위한 미세 조작장치는 미분간섭장치(DIC)가 장착된 inverted 현미경(Zeiss, Germany)에 mechanical type의 Leitz micromanipulator를 장착하여 사용하였다 (Fig. 2). 정자세포의 주입용 pipette은 내경을 약 $10\mu\text{m}$ 정도로 제작하여 사용하였다. 미세조작시 주입용 pipette속으로 원형 정자세포를 다수 흡인한 다음, 각각의 난모세포의 위란강속에 1개씩 주입하였다. 이렇게 원형정자세포의 주입이 성공적으로 완료된 난모세포는 융합용 배양액으로 옮겼다. 원형정자세포와 난자의 세포질이 두 전극에 평행하게 mouth pipette으로 정렬시킨 다음 난모세포의 활성화와 동일한 전기자극처리 조건에서 실시하였다. 이때 사용된 세포융합기는 Model 611 Square Wave Stimulator (Phlips and Bird, U.S.A.)였으며, fusion chamber는 실험실에서 자체 제작한 것을 사용하였고, 한번의 세포 융합에 동시에 난자의 수는 2개로 제한하였다. 전기자극 처리가 완료된 난자는 신선한 기초배양액에서, 3회 세척하고, $20\mu\text{l}$ 의 배양용 배양액속으로 옮겨 실험 목적에 따라 적절한 시간동안 배양하였다.

6. 세포융합의 판정

세포융합 판정은 15분 간격으로 난자를 관찰하여 난자의 표면에 원형정자세포의 존재 유무에 따라 융합 여부를 판정하였다. 융합되지 않은 원형정자세포는 위란강내에서 뚜렷하게 존재하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3a).

7. 전기자극 난자의 체외배양

융합이 완료된 난자와 융합이 유도되지 않은 난자를 각각 선별하여 배양용 배양액 소직 ($10\sim 20\mu\text{l}$)에서 37°C , 5% CO_2 , 95% 공기조건하의 CO_2 배양기에서 96시간 동안 배양하면서 24시간 간격으로 배의 발생을 조사하였다.

8. 염색체 분석

배반포 단계까지 발달한 수정란을 0.004% colcemid(Gibco, USA)가 함유된 배양액에서 3시간 배양하였다. 이어 1% sodium citrate 용액에서 20~30분간 저장액 처리를 실시하였으며, 저장액 처리 후 배반포

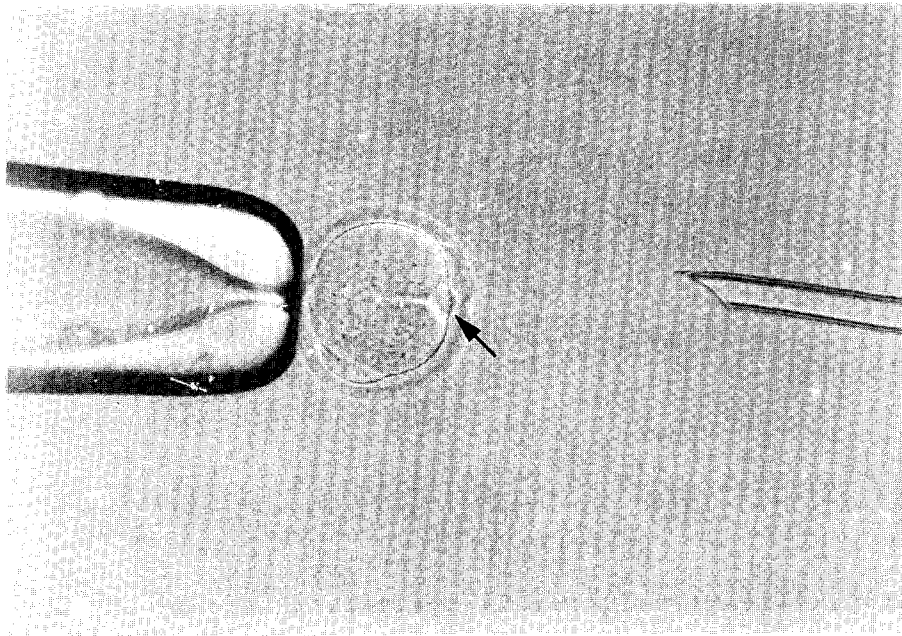
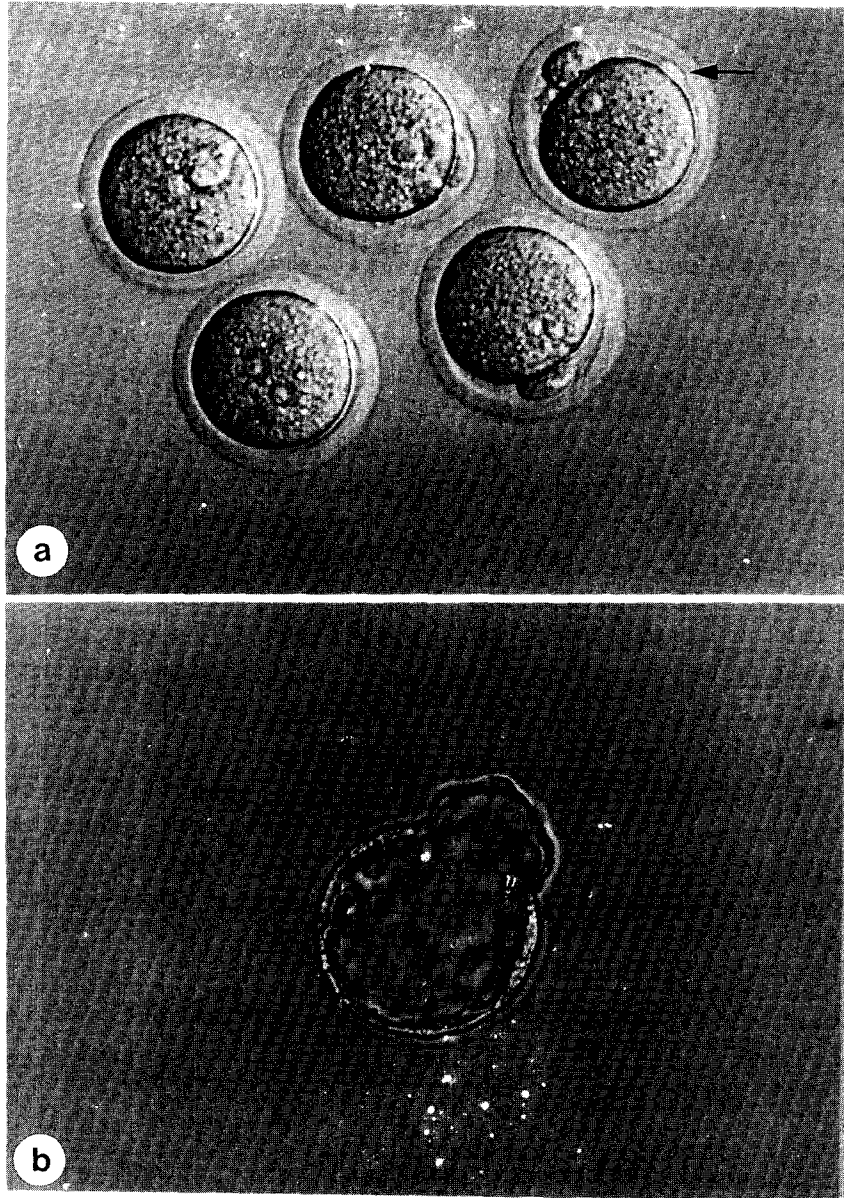


Fig. 2. Mouse round spermatid (arrow) microinjected into the perivitelline space of mouse oocyte ($\times 320$).



**Fig. 3. a. Electrofused and unfused (arrow) mouse oocytes after electrofusion ($\times 320$).
b. Blastocyst developed from electrically fused mouse oocyte.**

를 slide glass상에 놓고 고정액 (methanol:acetic acid = 3:1)을 4~5적 떨어뜨려 고정시켰다. 고정액이 완전히 증발하기 전에 고정액을 다시 1~2방울 추가하여 떨어뜨린 다음, 공기중에서 건조하였다. 완전

히 건조된 표본은 4% Giemsa 염색액에 침적하여 20~30분간 염색한 다음, 증류수로 세척하고 재차 공기중에서 건조시켰다. 염색된 표본은 위상차현미경하에서 관찰하면서 염색체수를 조사하였다.

9. 통계처리

난자의 세포융합율과 배발생율은 모두 χ^2 검정으로 통계 처리를 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

전기융합을 실시하기 전 난자에 가한 전기자극이 원형정자세포 세포질의 융합효율에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 1에 제시한 바와 같다. 그리고 이들을 전기자극 후 세포 상호간의 융합을 조사한 결과 대부분 전기자극 후 약 20~60분 사이에 융합이 완료되었다(Fig. 3a).

Table 1에서 보는 바와 같이, 전기자극 처리에 의해 난자의 활성화가 유도되지 않은 난자에 주입된 원형정자세포의 전기융합에 의한 융합율은 시험된 총 45개의 난자중에서 단지 3개만이 융합되어 약 6.7%의 융합율을 나타내었다. 반면 사전 전기자극에 의해 활성화가 유도된 난자의 위관강 속에 주입된 원형정자세포와 세포질과의 전기융합 효율은 총 239개의 난자중에서 57개가 융합되어 그 융합효율은 23.8%이었다. 그러나 사전 전기자극 유무에 따른 융합효율의 통계적 유의차는 없었다.

본 연구에서 얻은 결과는 생쥐에 있어서 Ogura 등(1993)의 융합율 8.7%보다는 양호한 성적이었다고, hamster의 융합율 20~40%와는 거의 일치하거나 약

간 떨어지는 성적이었다. 이러한 차이는 동물종의 차이외에도 사용하는 전기자극의 강도, 통전 지속시간 및 통전횟수의 차이와 전기융합 용액의 차이에서 비롯된다고 본다. Ogura 등(1993)은 mannitol용액을 사용한 것과 달리 본 연구에서는 sucrose 용액을 사용한 데서 상당한 차이가 발생한 것으로 생각된다. 이러한 결과로 보아 원형정자세포와 난자의 세포질과의 전기융합을 실시하기 전에 난모세포를 전기자극하여 활성화를 유도하면 보다 양호한 전기융합성적을 얻을 수 있다고 생각된다. 즉 난모세포의 원형질막은 자연적인 수정이나 단위발생에 의해 난자의 활성화가 이루어진 다음 여러가지 생화학적, 생리학적 변화를 겪게 되고, 이러한 변화가 세포 상호간의 융합을 용이하게 하는 것으로 생각된다. 그러나 전기융합시 융합되는 두 세포의 크기에 상대적으로 큰 차이가 있을 경우, 유사한 크기의 두 세포를 융합하는 것보다 훨씬 어려운 것으로 알려져 있다 (Bate 등, 1987; Smith와 Wilmut, 1989). 따라서 미세조작기법과 전기융합법에 의한 저조한 미세수정의 성공율을 높이기 위해서는 원형정자세포와 난자 세포질 간의 융합효율을 높일 수 있는 개선된 방법의 개발이 필요하다고 생각된다.

전기자극에 의해 원형정자세포와 난자 세포질과의 전기융합이 완료된 난자와 융합이 이루어지지 않은 난자를 선별하여 CO₂ 배양기에서 96시간동안 배양하면서 24시간 간격으로 배발생율을 관찰한 결과를 Table 2에 제시하였다.

Table 1. Effect of pre-electroactivation of mouse oocytes on electrofusion of spermatid-oocyte pairs

Pretreatment	N [#]	No. of oocytes	No. (%) of oocytes fused
None	3	45	3(6.7) ^a
Electroactivation*	17	239	57(23.8) ^b

* Electroactivation was given about 1-2 hours before electrofusion.

[#] No. of replicated experiments

^{a,b} P>0.05

Table 2. *In vitro* development of fused and unfused mouse oocytes

Oocytes	No. of oocytes	No. (%) of embryos developed to			
		2-cell	4-cell	Morula	Blastocyst
Fused oocytes	60	27(45.0)	18(30.0)	10(16.7)	7(11.7)
Unfused oocytes	182	79(43.4)	51(28.0)	29(15.9)	21(11.5)

Table 2에서 보는 바와 같이, 원형정자세포가 난자의 세포질과 융합된 57개의 난자 중에서 상실배와 배반포까지 발달한 난자는 각각 10개와 7개로서 그 비율은 각각 16.7과 11.7%였고, 융합되지 않은 난자는 182개중에서 21개가 배반포 단계까지 발달하여 그 비율은 11.5%로서 두 구간에 유의차는 인정되지 않았다. 그러나 융합된 난자의 경우 배반포까지 발달한 난자들은 형태학적으로 정상적이었고, 이들의 염색체를 분석한 결과도 이배체(diploid) 상태의 정상적인 염색체 수를 가지고 있었다(Fig. 4). 이와 같은 결과는 원형정자세포에 의해 미세수정된 난자는 정상적인 배반포(Fig. 3b)로 발달할 수 있다는 것을 보여준다.

그러나 전반적으로 배반포로의 발생율이 저조한데, 그 원인은 원형정자세포와 난자의 세포질을 전기융합시키기 전에 배란된 난자의 활성화를 유도할 시기 등의 문제에서 기인되었다고 사료된다. 난자의 세포질 속으로 침입한 정자가 전핵을 형성하여 정상적인 개체로 발생하기 위해서는 난자의 세포질내에 존재하는 여러 가지 MPF가 활성화 되어야 하며, 이러한 변화가 일어나지 않으면 침입한 정자가 응성전핵으로 변형되지 않아 배발생은 정지된다 (Henery와 Kaufman, 19

93). Szöllösi 등(1988)에 의하면 생쥐 흥선세포의 핵을 전핵이 형성된 난자의 세포질 내에 주입하면, 흥선세포의 핵은 remodelling과 reprogramming이 유도되지 않았다고 보고하였다. 그것은 세포질 내에 존재하는 MPF가 전핵을 형성하는데 모두 소모되어 주입된 흥선세포의 핵을 전핵과 같은 기능적인 핵으로 remodelling과 reprogramming을 유도시킬 수 없기 때문이라고 하였다. 더욱이 난자가 전핵을 형성하는데 필요한 세포질 인자는 난자가 활성화된 후 1시간내에 모두 소모된다고 하였다. 그러나 간기의 핵을 제2감수분열 중기의 난모세포 내에 주입하면, 이핵은 전기융합에 의해 난모세포의 세포질과 융합되고 난모세포의 활성화가 유도되며 세포질의 MPF는 융합된 간기의 핵에 작용하여 premature chromosome condensation, chromosome decondensation 및 nuclear swelling으로 이어지는 nuclear remodelling과 nuclear reprogramming을 유도하여 전능성을 가진 1-세포기 수정란이 만들어지고 정상적인 산자의 발생도 가능하다고 한다 (Willadsen, 1986; Stice와 Robl, 1988; Prather 등, 1989; Smith와 Wilmut, 1989; Bondioli 등, 1990; Collas와 Robl, 1991; Heyman,

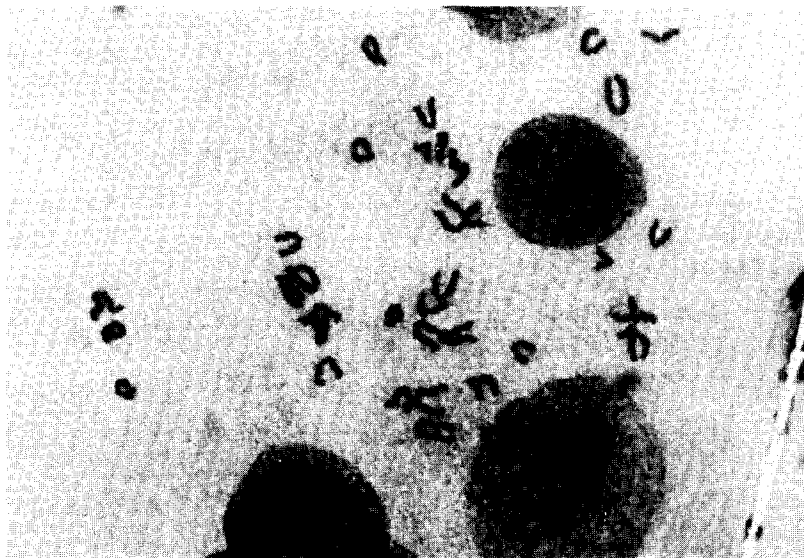


Fig. 4. Diploid chromosomes of mouse blastocyst developed from electrofused oocyte with spermatid.

1990). 마찬가지로 생쥐와 인간의 활성화되지 않은 난 모세포 내에 성숙한 정자를 주입한 다음 난자의 활성화를 유도하면 정자는 난자의 세포질내 MPF의 작용에 의해 전핵을 형성하게 된다. 이는 모세포가 있다 (Clark와 Masui, 1986; Schmiady와 Kentenich, 1989). 이상의 모세포들을 종합하여 고찰할 때 원형정자세포 주입후의 배발생율을 높이기 위해서는 난자의 활성화를 유도한 다음 늦어도 1시간 내에 전기융합을 유도시킬 필요가 있다고 사료된다.

따라서 본 연구의 결과에서, 비록 석조한 성직이기는 했지만 생쥐의 원형정자세포를 배란된 난자의 위관강내에 미세주입기를 사용하여 주입한 다음, 전기적으로 융합을 유도함으로써 난자의 정상적인 전핵의 형성과 배발생을 유도할 수 있다는 것을 알 수 있다. 또한 발생이 완료되지 않은 원형정자세포로도 성숙이 완료된 정자와 같이, 수정에 공여하여 개체의 발생을 유도할 수 있다는 것이 본 연구에서 확인되었다고 본다.

IV. 적 요

본 연구에서는 생쥐의 정소에서 채취된 발생과정 중의 원형정자세포를 배란된 난자의 위관강내에 미세주입기로 주입하고, 전기융합을 유도한 다음 정상적인 전핵의 형성과 배발생의 상태를 관찰하였다. 위관강 내에 주입된 원형정자세포와 난자 세포질간의 융합 효율은 전기융합전에 전기 자극에 의해 활성화시킨 난자의 경우는 23.8%로 활성화가 진행되지 않은 난자의 6.7%보다 양호하였다. 그리고 두 세포가 서로 완전히 융합되는 데에는 대부분의 세포에서 약 20~40분의 시간이 소요되었다. 한편 전기 자극에 의해 융합이 이루어진 난자가 배란포기까지 발달하는 비율은 11.7%였고, 융합되지 않은 난자의 그것은 11.5%로서 두 치리 사이에 유의차는 인정되지 않았다. 그러나 융합이 완성된 난자는 정상적인 전핵을 형성하였고, 이배체의 염색체를 보유하고 있었으며, 핵으로 관찰되었지만 융합이 이루어지지 않은 난자는 모두 만수채로시 전기 자극에 의해 단위발생이 유도된 것으로 판명되었다. 이러한 결과는 원형정자세포가 유전적으로 개체발생의 잠재능력을 가지고 있으며, 성숙한 정자 대신으로도 사용할 수 있다는 것을 시사한다.

V. 인용문헌

1. Bates, G.W., J.A. Saunders and A.E. Souers. 1987. Electro-fusion principles and applications. In: Cell Fusion, A.E. Souers, ed. New York : Plenum Press, pp. 367-395.
2. Bondioli, K.R., M.E. Westhusin and C.R. Looney. 1990. Production of identical offspring by nuclear transfer. Theriogenology 33:165-174.
3. Chatot, C.L., C.A. Ziomek, B.D. Bavister, J. L. Lewis and I. Torres. 1989. An improved culture medium supports development of randombred I cell mouse embryos *in vitro*. J. Reprod. Fert. 86:679-688.
4. Clark, H.J. and Y. Masui. 1986. Transformation of sperm nuclei to metaphase chromosomes in the cytoplasm of maturing oocytes of the mouse. J. Cell Biol. 102:1039-1046.
5. Collas, P. and J.M. Robl. 1991. Relationship between nuclear remodeling and development in nuclear transplant rabbit embryos. Biol. Reprod. 45:455-465.
6. Herery, C.C. and M.H. Kaufman. 1993. The incidence of aneuploidy after single pulse electroactivation of mouse oocytes. Mol. Reprod. Dev. 34:299-307.
7. Heyman, Y., P. Chesne and J.P. Renard. 1990. Reprogramming complete de noyaux embryonnaires congeics, apres transfer nucleaire chez le lapin. C.R. Acad. Sci., Paris. 311:321-326.
8. Kimura, Y. and R. Yanagimachi. 1995. Intracytoplasmic sperm injection on the mouse. Biol. Reprod. 52:709-720.
9. Ogura, A., J. Matsuda and R. Yanagimachi. 1994. Birth of normal young after electrofusion of mouse oocytes with round spermatids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:7460-7462.

10. Ogura, A., R. Yanagimachi and N. Usui. 1993. Behaviour of hamster and mouse round spermatid nuclei incorporated into mature oocytes by electrofusion. *Zygote*, 1:1-8.
11. Ogura, A. and R. Yanagimachi. 1993. Round spermatid nuclei injected into hamster oocytes form pronuclei and participate in syngamy. *Biol. Reprod.* 48:219-225.
12. Palermo, G., H. Horich, D. Devroey and A. C. Van Steirteghem. 1992. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocytes. *Lancet*, 340:17-18.
13. Prather, R.S., M.M. Sims, G.G. Maul, N.L. First and G. Schatten, 1989. Nuclear laminin antigens are developmentally regulated during porcine and bovine embryogenesis. *Biol. Reprod.* 41:123-132.
14. Schmiady, H. and H. Kentenich. 1989. Premature chromosome condensation after *in vitro* fertilization. *Human Reprod.* 4:689-695.
15. Smith, L.C. and I. Wilmut. 1989. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development *in vivo* of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol. Reprod.* 40:1027-1035.
16. Stice, S.L. and J.M. Robl. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplants rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 39:657-664.
17. Szöllösi, D., R. Czolowska, M. Szöllösi and A.K. Tarkowski. 1988. Remodeling of mouse thymocyte nuclei depends on the time of their transfer into activated, homologous oocytes. *J. Cell Sci.* 91:603-613.
19. Van Steirteghem, A., J. Liu, H. Joris, Z. Nagy, C. Staessen, M. Camus, A. Wisanto, E. Van Assche and P. Devroey 1994. Assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Repro. Fertil. Dev.* 6:85-91.
20. 이상진, 구덕분, 이상민, 박흥대, 정순영, 이훈택, 정길생. 1994. 핵치환에 의한 clone animal의 생산에 관한 연구. I. 생쥐수정란의 세포막 융합과 난모세포의 활성화에 미치는 전기자극의 효과. *한국축번식학회지*. 18:217-228.