

질환모델마우스 생산을 위한 체세포핵이식방법 개선;

I. 탈핵 및 재조합난자 생산기법 최적화

전수현 · 심호섭 · 정형민 · 이병천¹ · 이은송² · 고정재 · 신태형³ ·

박 찬 · 황우석^{1,4} · 차광렬 · 임정목^{4,†}

포천중문의과대학교 의학과·차병원 여성의학연구소

Improvement of Somatic Cell Nuclear Transfer Technology for the Production of Disease Model Mouse: I. Optimization of Oocyte Enucleation and Reconstruction

S. H. Jun, H. S. Shim, H. M. Chung, B. C. Lee¹, E. S. Lee², J. J. Ko, T. Shin³,
C. Park, W. S. Hwang^{1,4}, K. Y. Cha and J. M. Lim^{4,†}

*College of Medicine, Pochon CHA University and Infertility Medical Center of
CHA General Hospital, Seoul 135-081, Korea*

SUMMARY

This study was undertaken to optimize enucleation and reconstitution methods for the production of cloned mice by somatic cell nuclear transfer. Outbred ICR mouse oocytes at the metaphase-II stage were retrieved from female mice superovulated by PMSG and hCG. In Experiment 1, oocytes were enucleated in medium supplemented with cytochalasin B (CCB) of 3 levels (0, 7.5 or 15 $\mu\text{g/mL}$), and higher rate of enucleation was obtained at 7.5 and 15 $\mu\text{g/mL}$ than at 0 $\mu\text{g/mL}$. In Experiment 2, oocytes enucleated in 7.5 $\mu\text{g/mL}$ CCB-containing medium were reconstituted with different types of somatic cell by following methods; 1) cumulus cells by direct cell injection, 2) cumulus cells by electric fusion (1.25 kV/cm, 2 pulses for each 70 μs) or 3) STO cells by the electrofusion. Electrofusion of STO cells with enucleated oocytes yielded the greatest ($P < 0.05$) rate of reconstitution without lysis (76%) than any other combinations. Although significant decrease in the rate of somatic cell introduction was found, the electrofusion of cumulus cells yielded better rate of reconstitution than direct injection (0 vs. 18%). In Experiment 3, the duration of electric stimulation for the fusion was changed to either 50 μs or 90 μs , but no significant improvement of reconstitution efficacy was obtained.

In conclusion, this study showed that ICR mouse oocytes could be used for the production of reconstituted oocytes and a fusion method of 1.25 KV/cm with 2 pulses using STO cell was the optimal.

(Key words : mouse, nuclear transfer, STO, fusion)

본 연구는 2000년 한국과학재단 목적기초연구과제 (1999-2-205-002-5) 연구비에 의하여 수행되었음.

¹서울대학교 수의과대학 (Col. Vet. Med., Seoul Nat'l Univ.)

²강원대학교 수의학과 (Dept. Vet. Med., Kangwon Nat'l Univ.)

³텍사스 A & M 대학교 수의과대학 (Col. Vet. Med., Texas A & M Univ.)

⁴서울대학교 농생명공학부 (School Agr. Biotech., Seoul Nat'l Univ.)

[†]Correspondence

서 론

복제양 Dolly의 탄생 이래, 체세포 핵 이식 기법을 이용한 특정동물 생산이 모색되었으며 (Campbell 등, 1996; Campbell, 1999; Wilmut 등, 1998), 현재 유선세포, 난구세포, 난관상피세포, 귀세포 및 태아섬유아세포 유래의 복제 면양 (Wilmut 등, 1997; Schnieke 등, 1997), 소 (Kato 등, 1998; Cibelli 등, 1998; Wells 등, 1999; Dominko 등, 1999; 황 등, 1999; Shiga 등, 1999; Hill 등, 2000) 및 염소 (Baguisi 등, 1999) 생산이 성공되었다. 의 과학 분야에 다양하게 이용되는 마우스도 체세포 미세주입법을 이용한 복제동물 생산이 최근 이루어졌으며 (Wakayama 등, 1998), 동 기법의 구축에 의하여 특수목적 질환모델동물의 효율적 생산이 가능하여질 것이다. 그러나 마우스난자는 세포막이 외부충격에 취약하고 투명대의 탄성이 높기 때문에 체세포 핵 이식을 위한 탈핵 및 외래 핵 주입이 타 동물에 비하여 비교할 수 없을 정도로 어렵다. 따라서 기존의 체세포 핵 이식 기술을 이용한 복제마우스 생산은 아직까지 미비한 수준에 머물러 있으며, 이의 개선을 위한 연구가 세계 각국에서 활발히 진행되고 있다.

본 연구진은 효율적인 마우스 체세포 핵 이식 기법 개발을 위하여 기존방법을 다음과 같이 개선하려고 하였다. 우선 생산원가가 저렴한 outbred 마우스를 수핵난자 생산에 이용할 것이며 이를 위하여 ICR 마우스를 이식을 위한 cytoplasm 작성에 공여하였다. 다음, 재조합 난자의 효율적 생산을 위하여 기존 cumulus cell 이의 상업화 되어 있는 세포주를 공여 체세포로 사용한다. 또한 마우스난자가 가지고 있는 미세조작에 대한 취약성을 극복하기 위하여 세포주입법 대신 전기융합법에 의한 재조합 난자 생산을 도모한다. 따라서, 본 연구는¹⁾ 탈핵과정에 사용되는 cytochalasin B 농도조절을 통한 탈핵기법의 최적화, 2) 공여체세포로서의 cumulus cell 및 상업적으로 시판되는 STO cell 효용성 비교, 3) 체세포 미세주입법 및 전기융합법의 재조합 난자 작출 효율성 검토, 그리고 4) 전기융합법 개선을 위한 최적 통전조건 설정을 시도하였

다.

재료 및 방법

1. 공여핵의 준비

본 실험에 공여하는 체세포 중 cumulus cell은 3~4 주령 암컷 ICR 마우스에서 채취하였다. PMSG (5 IU/mL, Folligon; Intervet Co., The Netherlands) 및 hCG (5 IU/mL Chorulon; Intervet Co., The Netherlands)의 복강 내 투여를 통하여 과배란 유도를 한 후 hCG 투여 14 시간에 도살하였으며, 캐란된 난구세포-난자복합체(cumulus-oocyte complex; COC)를 회수하였다. 이후 0.1%(v/v) hyaluronidase 용액을 이용하여 cumulus cells을 단일세포로 분리하여 이식에 공여하였다.

STO cell (CRL-1503)은 American Type Culture Collection (ATCC; NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 체세포이식 7일 전에 동결보존된 STO cell을 용해 후 FBS (15%)가 첨가된 DMEM 배양액 3 mL를 함유한 6-well dish에 3.5×10^5 개씩 분주하였다. 이후, 37°C, 5% CO₂ 포화습도공기 기상하에 배양하였다. 핵 이식을 위하여 이식 직전 0.25% (v/v) trypsin EDTA을 이용하여 37°C, CO₂ 배양기 내에서 5분간 정치하였으며, 800×g에서 5분간 원심 세정하였다. 원심 pellet은 15% (v/v) fetal bovine serum (FBS; cat no.10082-147, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)이 첨가된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco BRL)에 부유하여 실험에 사용하였다.

2. 수핵난자의 준비

COCs는 과배란 처치 후 도살한 마우스의 난관관류를 통하여 회수하였다. 회수된 COCs는 Heps buffered CZB 용액으로 3회 세정한 후 형태적 정상성을 갖는 것만을 실험에 공여하였다. 이후, COCs를 0.1% (v/v) hyaluronidase 함유 Heps-buffered CZB로 처리하여, 반복 pipetting에 의하여 cumulus cells를 제거하였다. 분리된 성숙난자는 10 μg/mL Hoechst 33342로 형광염색하였다. 탈핵은 난자를 상이농도의 CCB (C-6762, Sigma)로 30분 처리한 후 이행하였으며 12 μm micropipet이 장착

된 Piezo micromanipulator (PMAS-CT150, Prime tech, Tokyo, Japan)를 사용하였다. 또한 형광장치가 부착된 inverted microscope (Eclipse TE-300, Nikon, Tokyo, Japan) 하에서 핵의 위치를 확인하며 탈핵을 수행하였다.

3. 핵이식, 재조합난자 작출 및 배양

탈핵 후 세포붕괴 없이 정상형태를 유지하는 cytoplasm을 inverted microscope 하에서 미세조작기(Narishige, Nikon, Japan)의 holding pipet에 고정하였다. 이후 난자 재조합은 실험설계에 따라 두 가지 방법으로 이행되었다; 1) 준비된 체세포를 Piezo micromanipulator에 부착된 12 μm micropipet으로 직접 세포질 내에 주입하는 방법 (직접주입법) 또는 2) 각각의 체세포를 perivitelline space에 주입한 후 전기자극으로 세포질과 융합하는 방법 (전기융합법). 전기융합법의 경우, 공여핵이 도입된 cytoplasm는 융합배지 (100 μM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 와 10 μM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 첨가 0.25 M Mannitol 용액)를 채운 3.2 mm electric chamber에 정치시켰으며, 전류방향과 직각이 되도록 위치조정하였다. 이후 Electro Cell Manipulator (ECM 2001; BTX, San Diego, CA, USA)를 이용하여 통전압 1.25 kV/cm, 2 pulses 조건으로 융합을 수행하였으며 실험계획에 의거하여 통전시간을 조정하였다. 재조합 난자는 3시간 동안 500 μl 의 modified preimplantation (mP)-1 (Park et al., 2000) 배양액에 정치시킨 후 10 mM Sr^{2+} 과 5 $\mu\text{g/ml}$ cytochalasin B가 첨가된 mP-1 배양액에서 6시간 동안 활성화 자극을 이행하였다. 활성화처리 재조합난자는 5 μl 의 mP-1 배양액의 droplet에 위치시킨 후 37°C, 5% CO_2 , 포화습도 공기 기상 하에서 48시간 동안 배양하였다.

4. 실험 Design 및 통계학적 분석

실험 1에서는 최적 탈핵조건을 설정하기 위하여 탈핵공여 난자를 0, 7.5 및 15 μl CCB 로 각각 처리하였다. 실험 2에서는 재조합난자의 효율적 작출을 위하여 탈핵란을 다음과 같은 공여체세포 및 이식방법으로 재조합하였다: 1) cumulus cell + 직접주입법, 2) STO cell + 직접주입법, 3) STO cell + 전기융합법. 실험 3에서는 최적 전기융합조건을

설정하기 위하여 통전시간을 감축 (50 μs) 또는 증가(90 μs)하여 융합을 시행하였다. 각각의 실험 처리 후 탈핵 (실험 1), 주입성공, 재조합난자 정상 및 분할 (실험 3)을 등을 비교하였다. 각각의 parameters에 대한 통계학적 분석을 위하여 SAS program에 포함되어 있는 proc-glm model 및 ANOVA를 이용하였으며, 개별 parameter에서 model 효과가 발견되었을 경우 최소자승법에 의하여 각 실험 구 간 유의수준을 검증하였다 ($p < 0.05$).

결 과

1. CCB 가 탈핵에 미치는 영향 (Table 1)

CCB-free 배양액에서 탈핵을 실시하였을 때 난자는 모두 lysis 되었으나 7.5 $\mu\text{g/ml}$ 와 15 $\mu\text{g/ml}$ cytochalasin B 배양액의 경우 탈핵성공율은 73% 및 79% 로 유의적 ($P < 0.05$)으로 증가되었다. 그러나, 두 농도 간 탈핵율의 차는 발견되지 않았다.

2. 재조합난자의 효율적 작출을 위한 공여체세포 선발 및 융합방법 설정 (Table 2)

각 실험구에서 공여란 탈핵 성공율은 73~79%로 유의적 차가 발견되지 않았다. cumulus cell을 직접주입법과 전기융합법으로 탈핵난자에 재조합하였을 때 주입성공률은 각각 100% 및 81%로 전기융합법에서 유의적으로 감소되었다. 그럼에도

Table 1. Enucleation^a of ICR mouse oocytes treated with different concentrations of cytochalasin B (CCB) in manipulation medium

Oocytes treated with CCB of ($\mu\text{g/ml}$)	No. of oocytes (%)	
	Provided	Enucleated
0	100	0(0) ^b
7.5	100	73(73) ^c
15	100	79(79) ^c

Model effect of the number of oocytes successfully enucleated, which was indicated as P value, was 0.0001.

^a Micropipets of 10 to 13 μm in diameter were used for enucleation of mouse oocytes.

^{bc} Different superscripts in each parameter are significantly different, $P < 0.05$.

Table 2. Morphological integrity of ICR mouse oocytes reconstituted with either cumulus cells or STO cells by microinjection or electric fusion^b.

Methods of reconstitution	Somatic cells used for reconstitution	No. of oocytes (%)			
		Provided	Enucleated ^c	Successfully introduced somatic cells ^d	With no lysis after reconstitution ^e
Microinjection	Cumulus	89	68 (79)	68 (100) ^f	0 (0) ^f
Fusion	Cumulus	73	53 (73)	43 (81) ^g	8 (19) ^g
Fusion	STO	114	84 (74)	72 (86) ^{fg}	55 (76) ^h

Model effects of the number of oocytes enucleated, successfully introduced somatic cells and with no lysis after reconstitution, which were indicated as P value, were 0.8456, 0.0014, 0.0001, respectively.

^a Microinjection of cumulus cells was performed by microinjection pipets of 7 to 8 μm in diameter.

^b Electric fusion was conducted by exposure to electric field of 1.25 kV DC for 70 $\mu\text{seconds}$, twice.

^c Percentage of the number of oocytes provided

^d Percentage of the number of oocytes enucleated

^e Percentage of the number of oocytes successfully introduced somatic cells.

^{fg} Different superscripts in each parameter are significantly different, $P < 0.05$.

불구하고 재조합란을 전기융합법에 의하여 작출한 경우 직접주입법보다 유의적으로 높은(0% vs. 18%) 조합 후 형태적 정상성을 나타내었다. 전기 융합법에 의하여 재조합란자를 작출시, STO cell 을 융합하는 경우 cumulus cell에 비하여 조합 후 형태적 정상성이 현저하게 증가되었다(19% vs 76%). 또한 동 방법의 주입성공율을 cumulus cell

직접주입법과 비교하였을 때 유의적으로 감소되지 않았다 (100% vs. 86%).

3. 통전시간이 융합률과 분할률에 미치는 영향 (Table 3)

통전시간의 증감에 따른 융합률 및 분할율은 50, 50, 70, 90 μs 에 있어서 각각 91, 80, 89% 및 60,

Table 3. Morphological integrity of ICR mouse oocytes reconstituted with STO cell by different electric fusion procedures.

Methods of electric fusion	No. of oocytes (%)			
	Enucleated	Successfully introduced with STO cells ^a	With no lysis after reconstitution ^b	Cleaved ^{cd}
1.25kV for 50 μs , twice	57	53 (93)	48 (91)	29 (60)
1.25kV for 70 μs , twice	59	55 (93)	44 (80)	26 (59)
1.25kV for 90 μs , twice	53	47 (89)	42 (89)	27 (64)

Model effects of the number of oocytes successfully fused with STO cells, with no lysis after reconstitution and cleaved, which were indicated as P value, were 0.6296, 0.2197 and 0.8792, respectively.

^a Percentage of the number of oocytes enucleated

^b Percentage of the number of oocytes successfully fused with STO cells

^c Percentage of the number of oocytes with no lysis after reconstitution

^d Reconstituted oocytes were activated by 10 mM Sr^{2+} and 5 $\mu\text{g/mL}$ Cyclochalasin B that added to Ca^{2+} -containing preimplantation-1 medium for 6 hours.

59, 64%로 각 처리구간 유의차를 나타내지 않았다.

고 찰

본 실험의 결과 체세포핵이식을 통한 복제동물 생산에 교잡종 ICR 마우스 성숙난자가 수핵 cytoplasm로서 이용가능 함이 명확히 밝혀졌다. 또한 cumulus cell 및 시판 중인 STO cell은 공여 체세포핵으로 이용이 가능하지만, cumulus cell보다는 STO cell이, 공여 체세포핵의 직접주입보다는 전기융합방법이 재조합난자 작출에 더욱 효과적인 것으로 밝혀졌다. 수핵 cytoplasm의 준비를 위하여 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CCB를 이용하고, STO cell을 공여체 세포로 cytoplasm와 1.25 kV, 2회의 통전조건으로 90 μs 간 통전자극을 실시하였을 때 융합난자의 89%가 재조합 후 형태적 정상성을 나타내었으며 그 중 64%가 2-세포기 이상까지 발생하였다. 본 연구결과는 STO cell을 이용한 마우스 재조합난자의 생산을 최초로 시도한 보고이다.

체세포 핵 이식에 필수적인 탈핵과정 수행을 위하여 사용되어진 CCB는 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 가장 효과적이었다. 그러나 이러한 CCB의 농도는 상대적으로 생물활성이 강한 D type의 이용에 의하여 감소·변경될 수 있다. 서로 다른 type의 cytochalasin 및 최적농도물질 사용과 함께 시술자의 경험도 탈핵과정의 성공을 위한 중요한 요인이라고 사려되며, 본 연구에서도 시술자의 경험증가에 따른 효율성의 증대가 관찰되었다 (unpublished data).

체세포 핵 이식 과정에 있어서 일반적으로 전기 자극을 통한 체세포와 cytoplasm의 전기적 융합방법이 사용되고 있다. 그러나, 마우스의 경우 체세포 직접주입법을 주로 시행하고 있으며 Wakayama 등이 동 기법에 의한 산자출생을 최초로 보고하였다. 그러나 이의 효율성은 극히 저조하며, 동 방법의 개선을 위하여 전기융합법이 최근 이용되기 시작하였다 (Campbell, 1999; Kato 등, 1998; Wells 등, 1999). ICR 마우스의 경우 난자세포질의 취약성 및 투명대 특성을 고려할 때 일반적으로 사용되는 F1 마우스에 비하여 세포주입의 물리적 충격을

감당할 수 없을 것으로 사료되었으며 cumulus cell을 이용한 실험결과에서도 이러한 면이 증명되었다(Table 2). 따라서 전기융합법으로 재조합난자 생산을 도모한 결과, 전기장도 및 통전시간을 1.25 kV/cm, 2 pulse, 70 μs 로 고정한 상태로 STO cell의 융합 및 분할이 효과적으로 유도되었다. 본 실험 결과, 공여세포의 크기가 체세포 핵 이식난자의 전기융합에 긍정적 영향을 미치는 사실이 간접적으로 확인되었다. 직경이 큰 STO (평균 13 μm) 세포는 직경이 작은 cumulus cell (평균 8 μm)에 비해 높은 융합률을 나타내며 이는 cytoplasm 세포막과 접촉하는 체세포의 표면적 증가가 원인이라고 사료된다 (Tao 등, 1999).

본 실험은 마우스난자에 주는 전기융합의 충격을 최소화하기 위하여 통전압을 1.25 kV/cm으로 최소화 하였다. 그러나 예비실험의 결과 동 전압의 single pulse는 융합 유도율이 저조하였기 때문에 통전압 자극횟수를 1.25 kV/cm, 2 pulses로 설정하였다. 동 조건 하에 통전시간을 감소 및 증가시켰을 때, 융합률 (각각 91, 80, 89%)과 분할률 (각각 60, 59, 64%)의 유의적 증감을 발견할 수 없었다. 그러나 상대적으로 90 μs 에서 가장 높은 분할율을 나타내었기 때문에 향후 실험에서는 동 기법을 마우스 체세포 재 조합난자 생산을 위한 기본융합 조건으로 설정할 것이다.

본 연구결과는 공여체세포 선별을 통하여 전기 융합의 효율성이 개선될 수 있음을 명확히 시사하고 있다. 지금까지 체세포 복제마우스의 생산은 cumulus cell (Wakayama 등, 1998), Sertoli cell (Wakayama 등, 1998) 및 epithelial cell (Kato 등, 1999) 등이 이용되어 왔다. 본 실험에서도 cumulus cell을 전기융합에 공여하였으나, STO cell의 대치 사용에 의하여 재 조합난자 생산성이 증가되었다. STO cell은 구입 및 준비가 간편하고, 타 세포에 비하여 상대적으로 크기 때문에 용이하게 미세조작을 수행할 수 있다. 본 연구결과에서 STO cell 공여에 의하여 재조합난자 생산성 및 분할율이 현저하게 개선되었으나 대부분의 재조합난자가 2-세포기에 발육을 정지하였다. 이는 STO cell의 이식 시 세포주기 불일치를 포함한 재조합과정의 문제에서 기인하였을 것이다. 또한 체세포핵이식에 공

여되는 STO cell의 유용성에 관하여서는 아직까지 보고되어지지 않았기 때문에 공여핵 종류, 휴지기 유도, 재조합난자 발생 및 STO cell의 유용성에 관한 다양한 연구가 추진되어야 할 것이다. 이러한 모든 연구는 체세포이용 복제마우스 생산기법의 효율성 증대에 크게 기여할 것으로 사료된다.

적 요

Cumulus 및 STO 세포를 공여핵으로 한 ICR mouse의 핵이식에 있어서 CCB의 농도가 탈핵에 미치는 영향, 직접체세포주입법 및 전기융합기술 효율성 비교 및 통전조건이 재조합난자생산 및 발생에 미치는 영향 등을 검토하였다.

1. 탈핵은 7.5 $\mu\text{g/ml}$ CCB가 첨가된 배지에서 가장 성공적으로 수행되었다.
2. ICR 마우스 재조합난자 생산에 있어서 공여핵의 직접주입법보다는 전기융합법을 이용하는 것이 효율적이었으며 cumulus cell보다는 세포 크기가 큰 STO세포를 이용하는 것이 효과적이었다.
3. 핵이식란에 통전강도를 1.25 kV/cm, 2 pulses로 고정하고 통전시간을 50 μs , 70 μs , 90 μs 로 변화시켰을 때 통전시간의 차이는 융합률과 분할률에 큰 영향을 주지 못하였다.

참고문헌

- Baguisi A, Behboodi E, Melica DT, Pollock JS, Destrempe MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porer CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomdk CA, Meade HM, Fodke RA, Favin WG, Overstrom EW, and Echelard Y. et al. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Biotech.*, 17:456-461.
- Campbel KHS, 1999. Nuclear transfer in farm animal species. *Seminars in Cell & Dev. Biol.*, 10:245-252.
- Campbel KHS, McWhir J, Ritchie KA and Wilmut I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 380:64-66.
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke 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.
- Dominko T, Mitalipova M, Haley B, Beyhan Z, Memili E, McKusick B, and First NL. 1999. Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biol. Reprod.*, 60:1496-1502.
- Hill JR, Winger QA, Long CR, Looney CR, Thompson JA and Westhusin ME. 2000. Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Biol. Reprod.*, 62(5):1135-40.
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, and Tsunoda Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cell of a single adult. *Science*, 282:2095-2098.
- Kato Y, Yabuuchi A, Motosugi N, Kato JY, and Tsunoda Y. 1999. Developmental potential of mouse follicular epithelial cells and cumulus cells after nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 60: 1110-1114.
- Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott 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.
- Shiga K, Fujita T, Hirose K, Sasae Y and Nagai T. 1999. Production of calves by transfer of nuclei from cultured somatic cells obtained from Japanese black bulls. *Theriogenology*, 52(3):527-35.
- Tao T, Boquest AC, Machaty Z, Petersen AL, Day BN and Prather RS. 1999. Development of pig embryos by nuclear transfer of cultured fibroblast cells. *Cloning*, 1:55-62.

- Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR and Yanagimachi R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394:369-374.
- 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.
- Wilmot I, Young L and Campbell KHS. 1998. Embryonic and somatic cell cloning. *Reprod. Fertil. Dev.*, 10:639-643.
- Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ and Campbell KH. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells, *Nature*, 385:810-3.
-

(접수일: 2000. 11. 15 / 채택일: 2000. 12. 10)