

최소의 귀세포를 이용한 핵이식에서 전기융합조건이 융합 및 배발달에 미치는 영향

최은주¹ · 이호준¹ · 민관식² · 김창근³ · 정영재³ · 윤종택[†]

한경대학교 유전공학연구소

Effect of Electric Purse Conditions on the Fusion and Development Embryos Produced by Ear Cell Nuclear Transfer in Brindle Coated Hanwoo (Korean Cattle)

Choi, E. J.¹, H. J. Lee¹, K. S. Min², C. K. Kim³, Y. C. Chung³ and J. T. Yoon[†]

Genetic Engineering of Institute, Hankyong National University

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the effects of embryo development by fusion condition on the nuclear transfer with brindle coated cow's ear cells. Ear cells were transferred into an enucleated oocyte and fused with cytoplasm in the fusion condition with 1.9kv/cm, 2.0kv/cm, 2.1kv/cm each 10 and 20 μ s duration. Nuclear transfer embryos were activated with a combination of 5 μ g/ml ionomycin and 1.9mM 6-DMAP (4min, 4h). Fusion rate was 51~68% range among fusion condition (1.9, 2.0, 2.1kv/cm; 10, 20 μ s). But, cytoplasm lysis rate was increased by higher electric condition (0~51.8% range). Each parameter's cleavage and blastocyst formation rate were 1.9kv/cm for 10 μ s (75.8 and 19.5%), 20 μ s (69.8 and 48.6%), 2.0kv/cm for 10 μ s (76.9 and 20.0%), 20 μ s (68.5 and 40.9%), 2.1kv/cm for 10 μ s (70.5 and 44.2%), 20 μ s (68.5 and 27.0%).

We compared the effectiveness of cloning for between brindle coated cow's ear cells and Hanwoo fetal fibroblast cells. There was no significant differences in the fusion rate and developmental rate to the blastocyst stage. After transfer of blastocysts derived from nuclear transfer embryos, pregnancy rates of the Hanwoo fetal fibroblast cells and brindle coated cow's ear cells were checked pregnant on day 60 as assessed by ultrasonography, 40% (2/5) and 15.8% (3/19), respectively.

This studies conclude that brindle coated cow's ear cells have the developmental potentiality to term by nuclear transfer. These results demonstrate that the increased the field strength was to be profitable for development of blastocyst or reduce of cytoplasm's damage than increasing the pulse duration.

* 본 연구는 2001년 농림기술개발사업 첨단기술과제의 연구지원에 의해 수행되었음.

† Corresponding author : TEL: 031-670-5094, E-mail: jtyoon@hnu.hankyong.ac.kr

¹ Hankyong Genometek. Co,

² Graduate School of Bio & Information Technology, Hankyong National University.

³ Department of Animal Science. Chung-Ang University.

I. 서 론

핵이식에 의한 복제 소 생산은 여러 종류의 체세포 핵이식으로 성공하고 있다(Cibelli 등, 1998; Kato 등, 1999; Wells 등, 1999; Zakhartchenko 등, 1999). 이러한 핵이식은 유전적 가치가 있는 동물을 복제할 뿐만 아니라, 멸종위기의 종을 보존하기 위한 방법으로 쓰인다(Dominko 등, 1999). 핵이식 과정은 일반적으로 미세조작에 의한 MⅡ 난자의 제핵과 전기융합에 의한 공여핵의 주입과정으로 이루어진다(Annelies 등, 1993). 융합에 미치는 요인으로는 세포의 크기, 융합배지, 전기자극 강도와 시간 등이다. Tatham 등(1996)은 적절한 전기융합 조건은 세포 종류와 형태에 따라 달라지며, Zakhartchenko 등(1997)은 공여세포와 수핵 세포질 사이의 비율에 따라 달라진다고 하였다. 또한, 이러한 전기적인 변이는 융합 후 배발달에도 영향을 미친다(Koo 등, 2000). 핵이식의 융합율을 높이기 위하여 융합 후 배지에 cytochalasin B를 첨가하거나(Annelies 등, 1993; Li 등, 2002), 핵이식용 배지에 phytohemagglutinin-P를 첨가하기도 한다(Lavoir 등, 1997).

체세포 핵이식에 의한 복제 기술은 멸종위기에 처한 종의 세포를 동결보존하여 'frozen zoo'로 유지하여 이후 복제를 위한 공여핵으로 이용될 수 있다(White 등, 1999). 최소는 전국적으로 100여 마리에 불과한 멸종위기의 우리나라의 고유종인 토종한우이다. 따라서 본 연구는 현재 명맥만 유지하고 있는 토종한우의 보존 및 개발 차원에서 최소의 귀세포를 이용하여 전기 융합 조건이 핵이식 수정란의 발달에 미치는 영향을 알아보고 궁극적으로 체세포 복제소의 생산 효율을 증진하고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 수핵 난자의 준비

1) 난포란의 채란 및 체외성숙

도축장에서 도축된 한우의 난소를 항생제(Peni-

cillin G 100IU/ml, Streptomycin 100 μ g/ml)가 첨가된 35 $^{\circ}$ C의 0.85% 생리식염수에 넣어, 2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 생리식염수로 3~4회 세정하고 18gauge 주사침이 부착된 10ml 주사기로 2~6mm의 난포에서 난포액과 난자를 흡입, 채취하였다. 난자는 난구세포가 치밀하며 3층 이상 난구세포가 부착되어 있으면서 세포질이 균일한 난자만을 선발하였다. 채취된 난자는 Hepes-buffered tissue culture medium199(TCM199; Gibco, USA)에 50 μ g/ml의 gentamycin(동신제약, 한국), 0.3% (w:v) fatty acid free bovine serum albumin(BSA; Sigam, USA)이 첨가된 기본 배양액으로 3~4회 세정한 후 10% 우혈청(fetal bovine serum; FBS, Gibco, USA), 2.5 μ g/ml FSH(sigma, USA), 1 μ g/ml estradiol-17 β (Sigma, USA), 20ng/ml epidermal growth factor(Sigma, USA) 및 50 μ g/ml gentamycin(동신제약, 한국)을 첨가한 TCM199 성숙배양액에 1~2회 세정 후 같은 배양액을 4-well dish(Nunc Co., Denmark)의 각 well당 500 μ l와 20~25개의 난포란을 넣고, 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기 내에서 18~20시간 동안 체외성숙을 유도하였다.

2) 난구세포의 제거 및 탈핵

성숙 후, metaphaseⅡ 단계의 체외성숙난자의 난구세포를 2.5mg/ml hyaluronidase(Sigma, USA)와 0.3%(w:v) BSA가 첨가된 TCM199 배양액이 분주된 35mm petri dish(Falcon, USA)에서 pipetting으로 완전히 제거한 후 제1극체가 보이는 난자만을 선별하여 0.3%(w:v) BSA가 첨가된 TCM199 배양액 배지에서 3번 세정하였다.

미세조작은 differential interference contrast (DIC)가 장착된 도립현미경(Olympus, Japan; \times 200)하에서 실시하였다. 수핵란은 TCM199에 7.5 μ g/ml cytochalasin B(Sigma, USA)가 있는 5 μ l drop으로 옮겼다. 난자의 투명대에 제1극체 부분을 slicing하여 slit을 만든 후 이 slit을 동서 방향으로 하여 제1극체와 소량(10~20%)의 세포질을 squeezing함으로써 탈핵하였다. 탈핵된 난자는 TCM199에 5 μ g/ml Hoechst 33342(Sigma, USA)가 첨가된 배지에서 5분간 배양한 후, 형광 하에서 탈핵 여부를 확인하였다.

2. 공여핵 준비

최소의 귀세포는 성숙의 귀 조직을 떼어내어 Ca^{2+} 과 Mg^{2+} -free PBS에서 3번 세정하였다. 멸균 가위와 칼로 세정한 후, 0.25%(w:v) trypsin, 1mM EDTA 용액(Gibco, USA)과 0.8% collagenase type II(Gibco, USA) 용액의 혼합액을 첨가하여 39°C, 5% CO₂ 포화습도 배양기내에 30~60분 동안 정치시켰다. 효소처리로 얻은 세포는 PBS로 원심 세정하였다. 최종 원심 세정 후, 침전세포와 조직편을 Dulbeccos modified Eagles medium(Gibco, USA)에 10%(v:v) 우혈청(FBS, Gibco, USA), 10%(v:v) antibiotic antimycotics, 24.9mM NaHCO₃가 첨가된 10cm culture dishes(Falcon, USA)내로 옮겼다.

핵이식에 이용된 세포는 8~15 계대 사이의 것으로 각 계대의 세포는 37°C에서 1분간 0.25% trypsin 용액 하에 배양하여 부유시킨 후 사용하였고 다음 계대를 위해 3개의 새로운 접시에 배분하였다. 핵이식을 위한 공여핵은 3~4일간의 serum starvation(Campbell 등, 1996)에 의한 혈청기아 배양이나 confluent monolayer를 이용하여 세포주기의 동기화를 유도하였다. 세포의 장기보존을 위하여 39°C, 5% CO₂에서 배양하여, 이후 10%(v:v) dimethyl sulfoxide(Sigma, USA)를 Dulbeccos modified Eagles medium(Gibco USA)에 10%(v:v) 우혈청(FBS, Gibco, USA), 10%(v:v) antibiotic antimycotics, 24.9mM NaHCO₃가 첨가된 배양 배지에 첨가하고 동결하여 액체질소에 저장하였다.

3. 핵이식

공여핵은 외경이 30~35 μ m의 주입용 pipette내로 흡입하여 탈핵시 만들어진 투명대의 slit을 관통한 다음 세포질과 투명대 사이의 위관강에 주입하여 핵이식란을 작성하였다. 주입 후, 재구조화하여 융합할 때까지 10% 우혈청이 첨가된 TCM199에 두었다.

4. 전기융합

재구조화된 핵이식란은 성숙개시 후 24시간에

0.26M mannitol(Sigma, USA), 0.1mM calcium(Sigma, USA), 0.1mM magnesium(Sigma, USA)과 0.1% PVA(Sigma, USA)가 혼합된 buffer에서 전기적으로 융합하였다. 융합은 상온에서 실시하였으며, 3.2mm 간격의 electric chamber에 융합 배지를 채운 후, 전류방향과 수직이 되도록 수핵란과 공여핵의 위치를 수동으로 조정하고, 세포융합기(BTX, USA)를 사용하였다. 전압은 1.9, 2.0, 2.1 및 2.2kv/cm 전압에서 각각 10 μ s과 20 μ s, 10 μ s 또는 20 μ s로 연속하여 두 번 통전하여 융합을 실시하였다.

5. 활성화

융합된 핵이식란은 화학적 활성화 처리된 4시간 동안 10% 우혈청이 첨가된 TCM199에서 배양하였다. 활성화는 TCM199에 희석한 5 μ M ionomycin(Sigma, USA) 40 μ l drop에서 4분간 정치한 다음 5분 동안 TCM199에서 세정하고 다시 4시간 동안 1.9mM 6-dimethyl-aminopurine(6-DMAP; Sigma, USA)에서 배양하였다.

6. 핵이식 수정란의 배양

핵이식 수정란의 배양은 39°C, 5% CO₂, 포화습도 배양기내에서 실시하였다.

소 핵이식란은 1% insulin-transferrin-selenium mixture(ITS; Sigma, USA)와 0.3%(w:v) BSA(Sigma, USA)가 포함된 CR1aa 배지 30 μ l drops에서 4일간 배양하고 5일째 수정란을 5% FBS가 첨가된 CR1aa 배지에서 cumulus cells와 공배양한 후 각각 배반포까지의 발달을 유도하였다.

7. 임신진단

핵이식 수정란은 이식 후 60일에 직장 검사법에 의한 태막낭 및 양막낭 촉진과 초음파 진단을 이용하여 수태 여부를 판정하였다.

8. 통계처리

실험 결과는 Anova test에 의해 유의성을 검정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 전기 자극의 융합 조건에 따른 최소 귀세포와 수핵세포질의 융합율

전기 자극의 융합조건에 따른 최소의 귀세포와 수핵난자간의 융합율과 lysis율은 Table 1과 같다. 융합율은 각 전기 자극조건에서 51~68%의 범위로 큰 차이가 없었으나, 난자 세포질의 lysis율에 있어서는 0~51.8%로 큰 차이가 있었다. 융합 후 난자의 lysis율은 1.9kv/cm의 10 μ s, 20 μ s에서 각각 0.0과 38.7%, 2.0kv/cm의 10 μ s, 20 μ s에서 각각 2.9와 37.5% 및 2.1kv/cm의 10 μ s, 20 μ s에서 각각 21.2와 51.8%를 나타내었다. 최소의 귀세포와 수핵난자과의 융합율은 1.9kv/cm 전압에서 10 μ s 동안 전기 자극하였을 때 68.5%와 0% lysis를 나타내어 가장 좋은 결과를 보였다.

2. 최소 귀세포의 핵이식후 배발달에 전기 융합 조건이 미치는 영향

핵이식 후 전기 자극 조건에 따른 난할율과 배반포 발생율은 Table 2와 같다. 난할율은 1.9kv/cm의

10 μ s, 20 μ s에서 각각 75.8과 69.8%, 2.0kv/cm의 10 μ s, 20 μ s에서 각각 76.9와 68.8%, 2.1kv/cm의 10 μ s, 20 μ s에서 각각 70.5와 68.5%로 큰 차이가 없었다. 그러나 배반포 발생율은 1.9kv/cm의 10 μ s, 20 μ s에서 각각 19.5와 48.6%, 2.0kv/cm의 10 μ s, 20 μ s에서 각각 20.0과 40.9%, 2.1kv/cm의 10 μ s, 20 μ s에서 각각 44.2와 27.0%로 각 조건에서 시간에 따른 차이를 보였다.

3. 한우 및 최소의 체세포 핵이식란의 이식후 수태율

한우와 최소의 체세포 핵이식란을 이식한 결과는 Table 3과 같다. 한우의 태아섬유아 세포를 핵이식한 후 생산된 배반포를 5마리의 젖소 수란우에 이식한 결과 2마리가 임신되었고(40.0%), 최소의 귀 세포를 핵이식하여 생산된 배반포를 19마리에 이식한 결과 3마리가 임신되었다(15.8%).

IV. 고 찰

Table 1. Effect of electric pulse conditions on the fusion rate of embryos produced by ear cell nuclear transfer in brindle coated Hanwoo

Fusion pulse	No. of		
	Fusing	Fused(%)	Lysis(%)
1.9kv/cm10 μ s	54	37(68.5)	0(0.0)
20 μ s	62	21(51.2)	24(38.7)
2.0kv/cm10 μ s	68	43(65.1)	2(2.9)
20 μ s	80	27(54.0)	30(37.5)
2.1kv/cm10 μ s	66	28(53.8)	64(21.2)
20 μ s	80	21(53.8)	42(51.8)

Table 2. Effect of electric pulse conditions on the development of embryos produced by ear cell nuclear transfer in brindle coated Hanwoo

Fusion pulse	No. of		
	Fused couplets	\geq 2cells(%)	Blasto/2-cell(%)
1.9kv/cm10 μ s	54	41(75.9)	8(19.5)
20 μ s	53	37(69.8)	18(48.6)
2.0kv/cm10 μ s	65	50(76.9)	10(20.0)
20 μ s	64	44(68.8)	18(40.9)
2.1kv/cm10 μ s	61	43(70.5)	19(44.2)
20 μ s	54	37(68.5)	10(27.0)

Table 3. Results of transfer of nuclear transfer embryo into recipient

Cell type	No. of	
	Recipients	Pregnancy(%)
Fetal fibroblast cell (Hanwoo)	5	2(40.0)
Ear cell(Brindle coated Hanwoo)	19	3(15.8)

본 연구에서 전통한우인 최소의 귀세포를 이용한 핵이식에서 수핵세포질과의 융합을 위한 전기조건을 검토하였다. 체세포 핵이식에서 전기융합 과정은 필수적인 과정이고, 융합율에 영향을 주는 인자 중 하나는 전압이다. 세포가 작을수록 더 높은 전압이 요구되지만(Zimmermann and Vienken, 1982) 융합에 필요한 이상의 전압은 cell lysis의 원인이 될 수도 있다(Zakharchenko 등, 1995). 세포사멸은 세포의 swelling에 의해 이루어지는데, 전압의 크기와 통전시간에 좌우된다. 소의 체세포 핵이식에서 융합율이 50~80%이다(Goto 등, 1999 ; Kato 등, 1998 ; Wells 등, 1998 ; Zakharchenko 등, 1999a,b).

Li 등(2002)는 같은 크기의 전압 상태에서 통전 시간을 길게 하였을 때 융합율이 높음을 보였으나, 임 등(2000)은 난구세포로의 핵이식에서 70V, 40 μ s, 두 번과 180V, 15 μ s, 한 번의 전기 자극 조건을 비교하였을 때 180V, 15 μ s, 한번의 전기 자극에서 유의적으로 높은 융합율을 보였다. 본 결과에서 보면 1.9~2.1kV/cm의 전압에서 각각 10 또는 20 μ s 동안 전기 자극을 주었을 때, 전압에 따른 융합율에는 차이가 없었으나, 각각의 전압에서 통전시간을 늘릴 경우 lysis율이 높아졌다. 따라서, 세포 융합을 위한 전기 자극 조건에서 전압을 높이는 것이 통전시간을 길게 하는 것보다 수핵난자의 세포질에 상해를 줄이고 배반포 발생에 유리하였다.

본 연구 결과 멸종 위기에 있는 최소를 체세포 복제하여 품종을 보존하고 대량생산할 수 있는 가능성을 확인하였다. 멸종위기의 포유류 종의 보존을 위한 체세포핵이식 기술에는 여러가지 필요조건이 있다. 종에 관련된 번식생리의 적절한 이해,

핵이식을 위한 핵의 reprogramming의 문제, 복제란의 이식을 위한 적절한 대리모 등(Wells 등, 1998)이다. 소 난자의 세포질은 여러 포유류의 성숙된 표피 섬유아 세포를 reprogram하여 상실배와 배반포까지 발달시킬 수 있지만(Dominko 등, 1999), 이때 연관성이 떨어지는 종은 좀더 빠른 시기에 퇴행하게 된다. 따라서 같은 종인 한우 난자의 세포질에 최소 귀세포의 이식은 reprogramming에 유리할 수 있다. 체세포 핵이식에서 공여세포의 종류와 관계없이 핵이식란은 형태적으로 배반포 단계까지 잘 발달하는 성공적인 재프로그래밍을 보인다. 그러나 수란우에 이식한 후 임신율은 최소의 귀세포를 사용하여 생산된 핵이식란보다 한우의 태아섬유아세포에 의해 생산된 핵이식란을 이식하였을 때 높은 결과(40.0 vs 15.8)를 보임으로써 이식된 핵이식란은 공여세포의 종류에 따라 수태율에 영향을 미칠 수 있다는 것을 알 수 있었다.

핵이식은 유산, 과체중 및 태반이상 등의 비정상적인 경우가 보고되고 있는데(Garry 등, 1996 ; Krui 등, 1997 ; Willson 등, 1995), 이는 핵이식 과정에서 자체의 결합이나, 배양된 공여세포와의 불완전한 핵의 재구축화 또는 체외성숙 및 수정란의 불완전한 배양체계의 결과일 수 있다(Hill 등, 1999 ; Wells 등, 1999). 이들 결합은 배아, 태아 및 태반의 발달과정의 주요한 단계에서 DNA methylation에 의해서 유전자 발현이 부적절하게 이루어지는 중요한 원인으로 알려지고 있다(Wells 등, 1999). 체세포를 이용한 핵이식에 의해 생산되는 배아 및 태아 발생에 있어서 공여 세포에 따른 영향과 reprogramming 기작에 대한 연구가 앞으로 필요한 것으로 사료된다.

결론적으로 우리나라 토종한우인 최소의 귀세포를 이용한 핵이식으로 유전자원의 복원과 보존이 가능하고, 핵이식에 있어서 공여세포와 세포질 간의 융합율과 lysis율은 전압과 통전시간에 영향을 받는 것으로 사료되었다.

V. 요약

최소의 귀세포를 이용한 핵이식 시에 전기 융합

조건이 핵이식란의 발생에 미치는 영향을 알아보고, 최소의 귀세포와 한우의 태아섬유아세포를 이용한 핵이식란을 이식하여 수태율을 비교하였다.

전기자극 조건에 따른 핵이식 후 융합율은 51~68%의 범위로 차이는 없었으나, lysis율은 1.9kv/cm의 10 μ s, 20 μ s에서 각각 0.0과 38.7%, 2.0kv/cm의 10 μ s, 20 μ s에서 각각 2.9와 37.5%, 2.1kv/cm의 10 μ s, 20 μ s에서 각각 21.2와 51.8%을 보였다.

난할율은 1.9kv/cm의 10 μ s, 20 μ s에서 각각 75.8과 69.8%, 2.0kv/cm의 10 μ s, 20 μ s에서 각각 76.9와 68.8%, 2.1kv/cm의 10 μ s, 20 μ s에서 각각 70.5와 68.5로 큰 차이가 없었다. 그러나 배반포 발생율은 1.9kv/cm의 10 μ s, 20 μ s 각각 19.5와 48.6%, 2.0kv/cm의 10 μ s, 20 μ s에서 각각 20.0과 40.9%, 2.1kv/cm의 10 μ s, 20 μ s에서 각각 44.2와 27.0%로 각 조건에서 시간에 따른 차이를 보였다.

핵이식에서 공여세포와 세포질간의 융합율과 lysis율은 전압과 통전시간에 영향을 받으며 전압을 높이는 것이 통전시간을 길게 하는 경우보다 수핵난자의 세포질에 상해를 줄이고 배반포 발생에 유리하였다.

한우의 태아섬유아세포의 핵이식후 생산된 배반포를 5마리의 수란우에 이식한 결과 두 마리가 임신되었고(40.0%), 최소의 귀 세포를 핵이식한 후 생산된 배반포를 19마리에 이식한 결과 3마리가 임신되었다(15.8%).

VI. 인용문헌

1. Annelies, E. P., Wouter, G. Van Inzen., Tanja, AE, Van Acheterberg., Kruij, Theo, AM., De, Laar, Siegfried. and Weima, Sijp, 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.
2. Cibelli, J. B., Stice, S. L., Golueke, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce, de, Leon, F. A. and Robl, J. M. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibro-
3. blasts. Science, 280:1256-1258.
3. Dominko, T., Mitalpova, M, Haley, B., Beyhan, Z., Memili, E., McKusick, B. and First, N. L. 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.
4. Gary, F. B., Adams, R., McCann, J. P. and Odde, K. G. 1996. Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. Theriogenology, 45:141-152.
5. Goto, Y., Kaneyama, K., Kobayashi, S., Imaj, K., Shin-Noh, M., Tsujino, T., Nakano, T., Matsuda, 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.
6. Hill, J. R., Roussel, A. J., Cibelli, J. B., Edwards, J. F., Hooper, N. L., Miller, M. W., Thompson, J. A., Looney, C. R., Westhusin, M. E., Robl, J. M. and Stice, S. L. 1999. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses(13case studies). Theriogenology, 51: 1451-1465.
7. Im, G. S., Yang, B. S., Park, S. J., Chang, W. K. and Park C. S. 2000. Effect of fusion procedure on the development of embryos produced by somatic cell nuclear transfer in Hanwoo(Korean cattle). Korean J. Animal Reprod., 24(4):365-373
8. 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.
9. 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.

10. Koo, D. B., Choi, Y. H., Park, J. S., Kim, H. N., Kang, Y. K., Lee, C. S., Han, Y. M., Park, H. D. and Lee, K. K. 2000. *In vitro* development of bovine nuclear transfer embryos reconstructed with fetal fibroblasts. Korean J. Animal Reprod., 24(4):407-417.
 11. Kruip, Th, A. M., and den. Daas, J. H. G. 1997. *In vitro* produced and cloned embryos ; effects on pregnancy, parturition and offspring. Theriogenology, 47:3-52.
 12. Lavoit, M. C., Rumph, N., Moens, A., King, W. A., Plante, Y., Tohnson, W. H., Ding, J. and Betteridge, K. J. 1997. Development of bovine nuclear transfer embryos made with oogonia. Biol. Reprod., 56:194-199.
 13. Li, guang-peng., Chen, da-yuan., Lian, li., Han, zhi-ming, Zhuzi-yu. and Georgee, Seidel, Jr. 2002. Rabbit cloning ; Improved fusion rates using cytochalasin B in the fusion buffer. Mol. Reprod. Dev., 61:187-191.
 14. Tatham, B. G., Giliam, K. J. and Trounson, A. O. 1996. Electrofusion parameters for nuclear transfer predicted using isofusion contours produced with bovine embryonic cells. Mol. Reprod. Dev., 43:306-312.
 15. Wells, D. N., Misica, P. M. and Tervit, H. R. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. Biol. Reprod. 60:996-1005.
 16. 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 breed. Reprod. Fertil. Dev., 10:369-378.
 17. White, Kenneth I., Thomas D, Bunch, Shoukhrat, Mitalipov and Reed, William A, 1999. Establishment of pregnancy after the transfer of nuclear transfer embryos produced from the fusion of argali(*Ovis ammon*) nuclei into Domestic sheep(*Ovis aries*) enucleated oocytes. Cloning, 1:47-54
 18. Wilson, J. M., Williams, J. D., Bondiolo, K. J., Looney, C. R., Westhusin, M. E. and McCalla, D. F. 1995. Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. Anim. Repro. Sci., 38:73-83
 19. Zakharchenko, V., Scherthaner, W. P., 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
 20. Zakhartchenko, V., Scherthaner, 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
 21. Zakhartchenko, V., Durcova-Hills, G., Stojkovic, M., Scherthaner, 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
 22. Zakhartchenko, V., Wolf, E., Palma, G. A. 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.
 23. Zimmermann, U. and Vienken, J. 1982. Electric field-induced cell to cell fusion. J. Membrane Bio., 67:165-182.
- (접수일자: 2003. 1. 14. / 채택일자: 2003. 2. 7.)