

## 재래산양의 체내 및 체외유래 난자의 활성화 처리방법 및 배양조건이 단위발생란의 체외발달에 미치는 영향

박희성<sup>†</sup> · 김태숙 · 이윤희 · 정수영 · 이명열 · 진종인 · 박준규 · 이지삼 · 김충희

진주산업대학교 동물생명과학과 · 동물생명산업지역협력연구센터

### 초 록

본 연구는 동물복제 및 형질전환 동물생산 등의 연구에 기초자료를 제공하고자 재래산양의 oocyte를 단위발생을 유도하여 회수난자의 조건, 활성화방법, 배양조건 등이 단위발생란의 체외발달에 미치는 영향을 조사하여 재래산양의 최적의 배양조건을 확립하고자 실시하였다.

난자의 회수는 체중 15~25 Kg 전·후의 성숙한 미경산 재래산양에 FSH와 PMSG를 사용하여 과배란을 유도하여 hCG 투여 후 제 35시간째에 외과적인 방법으로 *in vivo* (체내성숙) 난자는 난관을 관류하는 방법으로 회수하였고, *in vitro* (체외성숙) 난자는 난포로부터 흡입하여 난포란을 채취하여 약 22시간 체외성숙을 실시하였다. 활성화 처리는 전기자극법과 Ionomycin + 6-DMAP를 처리하여 단위발생을 유도하였다. 복제수정란의 배양은 M16, TCM-199 및 mSOF 배양액으로 6~7일 동안 체외배양을 실시하였다. 활성화를 유도하기 위하여 전기자극 및 ionomycin + 6-DMAP 처리를 하였을 때 분할율은 각각 64.1 및 76.5%로서 이들간에 차이는 없었다. 배반포기로의 발달율은 전기자극방법으로는 전혀 발달이 이루어지지 않았으나, ionomycin + 6-DMAP 처리방법에서는 15.6%가 배반포로 발달하였다. *In vivo* 난자와 *in vitro* 난자를 활성화를 유도하였을 때 분할율은 86.8 및 69.0%로서 이들간에 유의적인 차이는 없었다. 4-세포기(93.9% vs 66.1%), 8-세포기(90.9% vs 37.0%) 및 상실배기(89.4% vs 23.6%)는 이들간에 유의적( $P < 0.05$ )인 차이가 있었으며, 배반포기로의 발달율은 체내성숙난자가 50.0%로서 체외성숙난자의 0.8%보다는 유의적으로 높았다. 활성화를 유도한 난자를 mSOF 배양액으로 체외배양을 실시하였을 때 분할율은 81.0%로서 TCM-199 + oviduct cell 의 64.3% 및 M16 배양액의 51.6%보다는 높게 나타났다. 배반포기로의 발달율은 mSOF 배양액에서는 23.4%가 발달하였으나, TCM-199 + oviduct cell 배양액과 M16 배양액에서는 전혀 발달이 이루어지지 않았다. 이상의 결과는 포유동물 난자의 단위발생의 유도 및 체외배양시 난자의 공급원, 난자의 활성화 방법 및 배양조건 등이 차후 단위발생란의 체외발달에 크게 영향을 미칠 수 있는 근거를 제시해 준다.

(주제어 : Activation, Oocyte, Ionomycin, 6-DMAP, *In vivo*, mSOF, Blastocyst, Caprine)

### 서 론

생명공학기술은 동물복제나 형질전환동물의 생산뿐만 아니라 단위발생에 의한 "아버지 없는 생쥐"가 태어나는 수준에 까지 이르렀다. 이러한 단위발생에 관한 연구는 Pincus와 Enzmann(1935)이 포유동물 난자의 활성화를 실시한 이래 전기자극법(Tarkowski 등, 1970; Wilmut 등, 1997), 효소처리법(Kaufman, 1973), 에탄올처리법(Loi 등, 1998), calcium ionophore 처리법(Steinhardt 등, 1974), strontium 처리법(Wakayama 등, 1998), ionomycin처리법(Loi 등, 1998) 등 다양한 방법들이 시도되어 왔다. 오늘날에는 복제수정란의 생산효율을 높이기 위하여 핵이식란의 세포질 활성화에 중점을 두고 많은 연구가 이루어져 왔으며, 전기융합 후 일정시간이 경과되면 화학적 또는 전기적인 방법으로 활성화 처리를 하여 remodeling을 유도한 핵

이식란이 우수한 발육을 보여 융합 이후 일정시간 동안 MPF 수준을 높게 유지하여 remodeling을 거치는 것이 이식된 핵의 reprogramming에 유리하다(Wells 등, 1998). 또한 탈핵난자에 활성화 자극을 주어 세포주기를 간기로 전환시킨 후 핵이식을 실시하면 핵이식란의 발달율을 향상시킬 수 있으며, 최근에는 ionomycin을 이용해서 활성화를 유도한 다음 histone kinase inhibitor인 6-dimethylaminopurine(DMAP)을 처리하는 병용처리법이 높은 활성화율과 배반포기로의 발달율을 얻을 수가 있는 것으로 알려져 있다(Kono 등, 1994; Loi 등, 1998).

활성화 처리법은 핵이식에 있어서 반드시 필요한 응용 기술로서 가축의 개량 및 번식에 유용한 수단 중의 하나이며, 나아가 형질전환동물의 생산을 통한 대체 장기 생산, 생체 물질 생산, 세포 분화, 유전자 치료 등 인간의 질병 치료 기술에 응용이 가능하다. 이에 재래산양은 번식·생리적으로 매우 중요한 가치를 지니고 있을 뿐만 아니라 고유

\* 본 연구는 한국과학재단 지정 진주산업대학교 동물생명산업지역협력연구센터(과제번호: R12-2002-001-01004-0)의 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

<sup>†</sup> Corresponding author : Dept. of Animal Science & Biotechnology, Jinju National University, Jinju, 660-758, Korea. E-mail : hspark@jinju.ac.kr

의 유전자원 보존 측면에서도 핵이식과 같은 다양한 연구를 통하여 개량체계의 확립이 요구된다. 그러나 재래산양은 단위발생을 포함한 체세포 핵이식과 형질전환에 관한 연구는 그 예가 극히 적다(Zou 등, 2002; Keefer 등, 2002; Reggio 등, 2001).

본 연구는 동물복제 및 형질전환동물 생산 등의 연구에 기초자료를 제공하고 재래산양의 난자에 단위발생을 유도하여 회수난자의 조건, 활성화 방법, 배양조건 등이 단위발생란의 체외발달에 미치는 영향을 조사하여 최적의 배양조건을 확립하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 공시동물

공시동물은 체중 15~25 Kg 전후의 성숙한 미경산 재래산양으로서 진주 근교의 사육농가로부터 임상적으로 건강하다고 인정되는 것을 구입하여 인근의 임대농장에서 사육하면서 내·외부 기생충구제와 일정기간 동안 적응시킨 다음 본 연구에 사용하였다. 사양관리는 일반 관행법에 따라 사육하되 농후사료는 추가급여하였으며, 식염과 물은 자유 섭취도록 하였다.

### 과배란 유도

난자의 회수를 위하여 과배란유기를 실시하였으며, 먼저 발정 동기화를 위하여 progestagen 제제인 CIDR(Progesterone 0.3 g, Eazi Breed, InterAg, New Zealand)를 10일간 질내에 삽입하고 과배란 처리는 FSH(Follitropin-V, Vetrepharm, Canada)를 CIDR 삽입 8, 9, 10일째에 12시간 간격으로 70 mg을 감량법으로 투여하였으며, PMSG(Folligon, Intervet, Netherland)의 경우는 1,000 IU를 CIDR 삽입 제 8일째에 1회 투여하였다. PGF<sub>2α</sub>(Lutalyse, Upjohn, U.S.A.)는 8일째에 FSH 또는 PMSG와 함께 10 mg 투여하고 CIDR 제거는 10일째에 제거와 동시에 hCG (Chorulon, Intervet, Netherland) 400 IU를 투여하여 과배란을 유도하였다.

### 난자의 회수 및 검사

난관으로부터 체내 성숙 난자는 외과적으로 난관을 관류하는 방법으로 회수하였다. 먼저 과배란 처리한 산양을 약 24시간 절식시킨 다음 2% xylazine(Rompun, Bayer, Korea)을 체중 kg당 0.2 mg씩 근육주사하여 진정마취시키고, HCl ketamine(Ketamine, Yuhan, Korea)을 체중 kg당 11mg씩 근육주사하여 마취를 유도하였다. 마취가 도입된 산양은 복정중선을 절개하여 난관과 난소를 체외로 노출시킨 다음 배란점을 확인한 후 난자의 회수를 위하여 catheter(Tom Cat, Kendall Co., U.S.A.)를 난관누두부로 삽입하여 5~10 ml의 M2(Sigma Co., U.S.A.) 배양액을 난관자궁접합부 쪽에서 주입하여 관류하였다. 체외성숙 난자의 회수는 성숙난자를 회수한 다음 난소의 난포로부터 22G needle 이 부착된 5 ml 주사기로 난포액과 난포란을 흡입하여 회수하였다. 회수한 체내성숙난자 및 체외성숙난자 모두 hCG 투여 후 35~40시간째에 회수하였다.

### 난포란의 체외성숙

회수한 난포란의 체외성숙은 25 mM의 Hepes가 첨가된 TCM-199 체외성숙용 기본배양액에 10% GS, 10 µg/ml LH(luteinizing hormone), 1 µg/ml estradiol 17-β 및 5 µg/ml FSH(follicular stimulating hormone)을 첨가하여 5% CO<sub>2</sub> 98~99% 습도, 39°C 배양기 내에서 약 12시간 정도 전 배양을 시킨 다음 4 well-dish(NUNC, Denmark)에 well 당 15~20개의 미성숙 난포란을 주입하여 22~24시간 동안 배양함으로써 체외성숙을 유도하였다.

### 활성화 처리

Oocyte의 전기자극에 의한 활성화 처리는 전기세포융합 장치(BTX, U.S.A)로 실시하였으며, 배지는 0.05 mM CaCl<sub>2</sub> (Sigma, U.S.A), 0.1 mM MgSO<sub>4</sub>(Sigma) 및 0.5 mM Hepes (Sigma)가 첨가된 0.3 M Mannitol(Sigma) 용액을 사용하였다. Oocyte를 chamber로 옮겨 양 전극 사이에 일렬로 주입하여 직류전류(DC)로 1.30~2.46 kv/cm, 15~30 µsec, 1 또는 2회 통전하여 세포융합을 유도하였다. 통전 후 핵이식란은 10% GS가 첨가된 M16 배양액으로 배양을 실시하였다. 약물처리법은 5 µM의 ionomycin 용액에서 5분, 2 mM 6-DMAP 용액에서 4시간 동안 처리하여 활성화를 유도하였다.

### 단위발생란의 체외배양

단위발생란의 배양은 10% GS가 첨가된 M16 배양액, 10% FBS와 난관상피세포가 첨가된 TCM-199 배양액(5% CO<sub>2</sub>, 95% air, 96~98% humidity, 39°C) 및 0.8% BSA가 첨가된 mSOF 배양액(5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>, 96~98% humidity, 39°C)에서 6~7일 동안 배양을 실시하였다.

### 통계학적 분석

실험결과와 통계학적 분석은 SAS package를 이용하여 실시하였으며, GLM(General Linear Model) procedure를 적용하여 각 요인의 least square mean을 구하여 요인간의 유의차를 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 활성화 유도 방법에 따른 단위발생란의 체외발달

산양의 체내 및 체외성숙란을 전기자극 및 ionomycin + 6-DMAP를 처리하여 활성화를 유도하였을 때 분할율과 체외발달율을 조사한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다.

활성화를 유도하기 위하여 전기자극 및 ionomycin + 6-DMAP 처리를 하였을 때 분할율은 각각 64.1 및 76.5%로서 이들간에 유의적인 차이는 없었다. 4-세포기로의 발달율은 43.9 및 67.0%로서 ionomycin + 6-DMAP 처리방법이 높았으며, 8-세포기(39.0% vs 49.1%), 상실배기(31.7% vs 41.0%)로의 발달율도 차이가 없었다. 그러나 배반포기로의 발달율은 전기자극방법으로는 전혀 발달이 이루어지지 않았으나, ionomycin + 6-DMAP 처리방법에서는 15.6%가 배반포로 발달하였다.

Tao 등(1999)은 돼지에서 전기자극에 의한 단위발생란

Table 1. Effect of different activation on *in vitro* development of caprine parthenogenetic oocytes

Activation	No. of activated oocytes	No. of oocytes cleaved(%)	No. of oocytes development to(%)			
			4-cell	8-cell	Molrula	Blastocyst
Electric stimul.	64	41(64.1)	18(43.9)	16(39.0)	13(31.7)	0( 0.0)
Iono+DMAP	285	218(76.5)	146(67.0)	107(49.1)	89(41.0)	34(15.6)

\* Values in the same column are not significantly different( $P < 0.05$ ).

의 배반포기로의 발달율은 15.7~27.6%로서 배양액에 따라서 다소 차이가 있다고 하였다. Koo 등(2000)은 전기자극에 의한 단위발생란의 배반포기로의 발달율은 22.4±7.2%로서 핵이식란(9.4±0.9%)과 체외수정란(21.4±1.9%)보다 높다고 보고하였다. 본 연구결과 다른 동물에서와는 달리 재래산양의 경우는 전기자극에 의한 단위발생란의 경우 비정상적인 분할이 많았으며, 체외배양시간이 길어질수록 fragmentation이 많았다. 전기 세기를 1.30~2.47 kv/cm까지 다양하게 주어봤으나, 2.0 kv/cm 이하에서는 할구의 분할자체가 명확하지가 않았다. 따라서 재래산양의 단위발생에 관한 연구는 좀더 세밀히 분석과 검토가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

#### 회수난자의 조건에 따른 단위발생란의 체외발달율

*In vivo* (체내성숙난자)와 *in vitro* (체외성숙난자)를 ionomycin + 6-DMAP 를 처리하여 활성화를 유도하였을 때 분할율과 체외발달율을 조사한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다.

*In vivo* 난자와 *in vitro* 난자를 활성화를 유도하였을 때 분할율은 86.8 및 69.0%로서 이들간에 유의적인 차이는 없었다. 4-세포기(93.9% vs 66.1%), 8-세포기(90.9% vs 37.0%) 및 상설배기(89.4% vs 23.6%)는 이들간에 유의적( $P < 0.05$ )인 차이가 있었으며, 배반포기로의 발달율은 체내성숙난자

가 50.0%로서 체외성숙난자의 0.8%보다는 유의적으로 높았다.

Park 등(2001)은 돼지의 체외성숙란에서 전기자극에 의한 단위발생란의 분할율은 79.3%로서 핵이식란(24.5%)에서 보다 높다고 하였으며, 배반포기로의 발달율은 26.8%라고 보고하였다. 산양의 단위발생에 관한 연구는 체내성숙난자 뿐만 아니라 체외성숙난자에 대한 연구보고도 없어서 직접적인 비교는 불가능하다. 돼지의 경우도 거의 대부분이 체외성숙난자를 이용하여 단위발생에 관한 보고만 다소 있다. 아마도 이러한 이유 중의 하나는 산양의 경우 사육두수가 소나 돼지처럼 많지 않기 때문에 도축장으로부터의 난소 확보가 거의 불가능하다고 할 수 있다. 특히 우리나라 재래산양의 경우 사육두수가 계속 감소하고 있으며, 산양육이 식육으로 이용되기보다는 강장식품으로 취급을 받고 있는 실정이다. 따라서 도축장에서 도축되기보다는 상당부분이 음성적으로 도축되고 있기 때문에 난소의 확보는 거의 불가능하다고 할 수 있다.

#### 배양조건에 따른 단위발생란의 체외발달율

Ionomycin + DMAP를 처리하여 활성화를 유도한 난자를 체외배양을 실시하였을 때 분할율과 체외발달율을 조사한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다.

활성화를 유도한 난자를 mSOF 배양액으로 체외배양을

Table 2. Effects of different source of oocytes on *in vitro* development of caprine parthenogenetic oocytes

Oocytes source	No. of activated oocytes	No. of oocytes cleaved(%)	No. of oocytes development to(%)			
			4-cell	8-cell	Molrula	Blastocyst.
<i>In vivo</i>	76	66(86.8) <sup>a</sup>	62(93.9) <sup>a</sup>	60(90.9) <sup>a</sup>	59(89.4) <sup>a</sup>	33(50.0) <sup>a</sup>
<i>In vitro</i>	184	127(69.0) <sup>a</sup>	84(66.1) <sup>b</sup>	47(37.0) <sup>b</sup>	30(23.6) <sup>b</sup>	1 (0.8) <sup>b</sup>

\* Values with different superscripts in the same column are significantly different( $P < 0.05$ ).

Table 3. Effects of different culture condition on *in vitro* development of caprine parthenogenetic oocytes

Media	No. of activated oocytes	No. of oocytes cleaved(%)	No. of oocytes development to(%)			
			4-cell	8-cell	Molrula	Blastocyst.
M16	95	49(51.6) <sup>a</sup>	23(46.9) <sup>b</sup>	4( 8.2) <sup>b</sup>	0( 0.0) <sup>b</sup>	0( 0.0) <sup>b</sup>
TCM-199 +oviducts	28	18(64.3) <sup>a</sup>	4(22.2) <sup>b</sup>	2(11.1) <sup>b</sup>	2(11.1) <sup>b</sup>	0( 0.0) <sup>b</sup>
mSOF	179	145(81.0) <sup>a</sup>	137(94.5) <sup>a</sup>	117(80.7) <sup>a</sup>	100(69.0) <sup>a</sup>	34(23.4) <sup>a</sup>

\* Values with different superscripts in the same column are significantly different( $P < 0.05$ ).

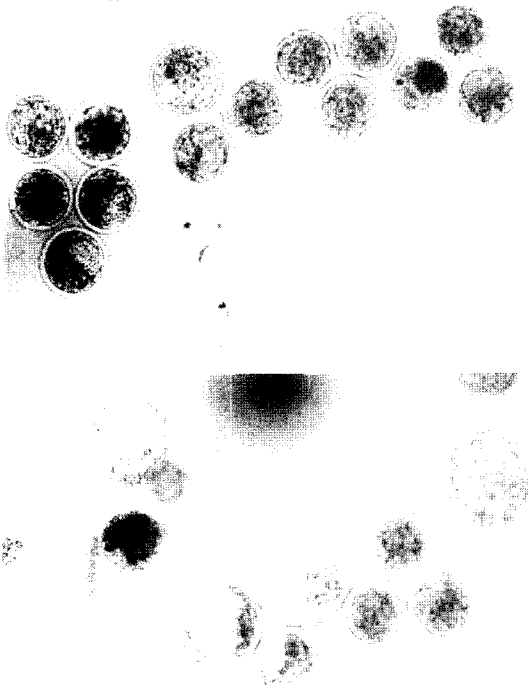


Fig. 1. *In vitro* development of caprine parthenogenetic oocytes to morula and blastocyst.

실시하였을 때 분할율은 81.0%로서 TCM-199 + oviduct cell의 64.3% 및 M16 배양액의 51.6%보다는 높았다. 4-세포기 및 8-세포기로의 체외발달율도 mSOF 배양액 94.5 및 80.7%로서 유의적으로 높게 나타났다. 상실배기로의 발달율은 mSOF 배양액에서는 69.0%였으나, TCM-199 + oviduct cell 배양액은 11.1%로서 매우( $P < 0.05$ ) 낮으며, M16 배양액에서는 전혀 발달이 되지 않았다. 뿐만 아니라 배반포기로의 발달율도 mSOF 배양액에서는 23.4%가 발달하였으나, TCM-199 + oviduct cell 배양액과 M16 배양액으로 배양을 실시하였을 때는 전혀 발달이 이루어지지 않았다( $P < 0.05$ ).

산양이나 면양의 활성화에 관한 연구가 없어서 직접적으로 비교하기는 어려우나 Onishi 등(2000)은 돼지 난포란을 활성화하여 NCSU-23 배양액으로 체외배양을 실시하였을 때 배반포기로의 발달율이 21.4~31.2%였으나, mWM 배양액에서는 1.0~4.0% 배반포로 발달하여 배양액에 따라서 발달율의 차이가 있다고 하였다. 박 등(2002)은 돼지에서 단위발생 유도란의 배반포로의 발달율이 6.4%로서 핵이식란의 9.8%와 유의적인 차이가 없다고 하였다. 이러한 결과는 동물종과 배양액(NCSU-23)의 차이에 기인한 것으로 생각된다.

#### Effects of Activation Treatments and Culture Condition on *In Vitro* Development of Caprine *In Vivo* and *In Vitro* Oocytes

Park, H. S., T. S. Kim, Y. H. Lee, S. Y. Jung, M. Y. Lee, J. I. Jin, J. K. Park, J. S. Lee and C. H. Kim

Department of Animal Science and Biotechnology & RAIRC, Jinju National University

#### ABSTRACT

This study was conducted to examine whether activation treatments, source of oocytes and culture conditions affect *in vitro* developmental ability of caprine oocytes. Mature Korean native goats were pretreated with intravaginal CIDR for 10 days. The goats were then treated with a single intramuscular injection of 1,000 IU PMSG on Day 8 or twice daily injection of a total of 70 mg FSH for 3 days from Day 8 of CIDR insertion for superovulation. All the goats were injected with 10 mg PGF<sub>2α</sub> on Day 8 and 400 IU hCG on Day 10 of CIDR. Oocytes were surgically collected by oviduct flushing(*in vivo* maturation) or direct follicle aspiration(*in vitro* maturation) through mid-ventral incision at 35 h after hCG injection. Fifteen to twenty oocytes were placed in TCM-199 medium containing 25 mM Hepes and hormones under mineral oil at 39°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air for 22 to 24 h. After maturation, the oocytes were activated by electric stimulation or ionomycin + 6-DMAP. The activated oocytes were then cultured in M16, TCM-199 and mSOF media supplemented with proteins at 39°C for 6 to 7 days.

Activation treatments did not affect cleavage of the oocytes. The cleavage rates were 64.1% (41/64) in oocytes activated by electric stimulation and 76.5% (218/285) in oocytes activated by ionomycin + 6-DMAP. The proportion of development to blastocyst was 15.6% (34/218) in oocytes activated by ionomycin + 6-DMAP, but activation by electric stimulation did not support embryos developed beyond morula stage. There were no differences in the cleavage rates of activated oocytes experiencing *in vivo* (86.8%, 66/76) and *in vitro* maturation (69.0%, 127/184). However, the development rate to blastocyst stage was significantly ( $P < 0.05$ ) higher for oocytes matured *in vivo* (50.0%, 33/66) compared to *in vitro* (0.8%, 1/127). Culture conditions did not affect the cleavage of activated oocytes. The cleavage rates were 51.6% (49/95) in M16, 64.3% (18/28) in TCM-199 and 81.0% (145/179) in mSOF, respectively. By contrast, the development rate of activated oocytes to stage was greater ( $P < 0.05$ ) for oocytes cultured in mSOF medium (23.4%, 34/145) than in M16 or TCM-199 (0.0%). Our results suggest that source of oocytes and culture conditions are major factors affecting *in vitro* development of caprine parthenogenetic oocytes.

(Key words : Activation, Oocyte, Ionomycin, 6-DMAP, *In vivo*, mSOF, Blastocyst, Caprine)

## 인용문헌

1. Keefer CL, Keyston R, Lazaris A, Bhatia B, Begin I, Bilodeau AS, Zhou FJ, Kafidi N, Wang B, Baldassarre H, Karatzas CN (2002): Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. *Biol Reprod* 66:199-203.
2. Kaufman MH (1973): Parthenogenesis in the mouse. *Nature* 242:475-476.
3. Koo DB, Kang YK, Choi YH, Park JS, Han SK, Park IY, Kim SU, Lee KK, Son DS, Chang WK, Han YM (2000): *In vitro* development of reconstructed porcine oocytes after somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod* 63:986-992.
4. Kono T, Sotomaru Y, Aono F, Takahashi T, Ogiwara I, Sekizawa F, Arai T, Nakahara T (1994): Effect of ooplast activation on the development of oocytes following nucleus transfer in cattle. *Theriogenology* 41:1463-1471.
5. Loi P, Ledda S, Fulka Jr, Cappai P, Moor RM (1998): Development of parthenogenetic and cloned ovine embryo : Effect of activation protocols. *Biol Reprod* 58:1177-1187.
6. Park KW, Kühholzer B, Lai L, Machaty Z, Sun QU, Day BN, Prather S (2001): Development and expression of the green fluorescent protein in porcine embryos derived from nuclear transfer of transgenic granulosa-derived cells. *Anim Reprod Sci* 68:111-120.
7. Pincus G, Enzmarn EV (1935): The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. I. The activation of ovarian eggs. *J Exp Med* 62:665-675.
8. Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, Perry ACF (2000): Pig cloning by microneedle injection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 289:1188-1190.
9. Reggio BC, James AN, Green HL, Gavin WG, Behboodi E, Echelard, Godke RA (2001): Cloned transgenic offspring resulting from somatic cell nuclear transfer in the goat: oocytes derived from both follicle-stimulating hormone-stimulated and nonstimulated abattoir-derived ovaries. *Biol Reprod* 65: 1528-1533.
10. Steinhardt RA, Epel D, Carrol EJ, Yanagimachi R (1974): Is calcium ionophore a universal activator for unfertilised eggs?. *Nature* 252:41-43.
11. Tarkowski AK, Witkowska A, Nowicka J (1970): Experimental parthenogenesis in mouse. *Nature* 226: 62-165.
12. Tao T, Machaty Z, Boquest AC, Day BN, Prather RS (1999): Development of pig embryos reconstructed by microinjection of cultured fetal fibroblast cells into *in vitro* matured oocytes. *Anim Reprod Sci* 56:133-141.
13. Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R (1998): Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394:369-373.
14. Wells DN, Misica PM, McMillan WH, Tervit HR (1998): Production of cloned bovine fetuses following nuclear transfer using cells from a fetal fibroblast cell line. *Theriogenology* 49 : 330(abstr).
15. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS (1997): Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813.
16. Zou XG, Wang UG, Cheng Y, Yang YE, Ju HM, Tang HL, Shen Y, Mu ZY, Xu SF, Du M (2002): Generation of cloned goats (*Capra hircus*) from transfected foetal fibroblast cells, the effect of donor cell cycle. *Mol Reprod Dev* 61:164-172.
17. 박준규, 박희성 (2002): 전기적 융합조건이 돼지 핵이식 수정란의 융합 및 체외발달에 미치는 영향. *한국가축번식학회지* 26:125-132.

(접수일자: 2004. 5. 31. / 채택일자: 2004. 9. 20.)