

수핵란의 활성화 시간에 따른 소 체세포 핵이식란의 발육

박선영¹ · 권대진¹ · 박춘근¹ · 양부근¹ · 정희태^{2,*}

¹강원대학교 동물생명과학대학, ²강원대학교 수의학부대학

Development of Somatic Cell Nuclear Transfer Bovine Embryos following Activation Time of Recipient Cytoplasm

Sun-Young Park¹, Dae-Jin Kwon¹, Choon-Keun Park¹, Boo-Keun Yang¹ and Hee-Tae Cheong^{2,*}

¹College of Animal Life Sciences and ²School of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to examine the effects of pre activation treatment and activation time of recipient cytoplasm on the development of bovine somatic cell nuclear transfer(NT) embryos. Donor cells were transferred and electrofused to enucleated oocytes before(pre-AC) or after activation(post-AC). Activation was induced with a combination of Ca²⁺-ionophore(A23187) and DMAP. NT embryos were cultured in CR1aa containing 3 mg/ml BSA for 9 days. Some NT embryos were fixed at 0.5 to 2.5 hr after fusion(for post-AC) or activation(for pre-AC) for confocal microscopy. Developmental rate to the blastocyst stage was slightly high in the post-AC group(20.6%) compared to that of pre-AC group(15.3%). However, developmental speed of embryos in the pre-AC group was faster than that of embryos in the post-AC group. Developmental rates to the blastocyst stage were similar among different activation time before fusion(0.5, 2 and 4 hr). The result of the present study suggests that development and nuclear morphology are affected by the activation status of the recipient cytoplasm before fusion.

(Key words : SCNT, Activation time, MPF activity, *In vitro* development, Bovine)

요 약

본 연구는 융합 전 수핵란의 활성화 처리 유무와 활성화 처리 시간이 소 체세포 유래 핵이식란의 체외 발육능에 미치는 영향을 검토하기 위해 수행하였다. 소 체외성숙란의 탈핵 후 체세포 핵을 이식하고 일부는 전기 융합 후 활성화를 유기하였고(pre-AC), 일부는 먼저 활성화 처리 후 융합을 실시(post-AC)하였다. 난자의 활성화는 Ca²⁺-ionophore(A23187)로 처리 후 DMAP로 4시간 배양하는 방법으로 유기하였다. 핵이식란은 CR1aa액에서 9일간 배양하여 발육율을 검토하였으며, 활성화 후 30분~2.5시간에 고정하여 confocal microscope 하에서 핵형 변화를 검사하였다. 배반포기까지 발육율은 post-AC구(20.6%)가 pre-AC(15.3%)보다 다소 높게 나타났다. 또한 활성화 처리를 하여 핵이식란의 배 발달을 비교한 결과 post-AC구가 더 늦은 배 발달 속도를 나타내었다. Post-AC구를 활성화 후 30분, 2시간, 4시간으로 나누어 융합하여 발육율을 검토한 결과 발육율에 차이가 없었다. 본 연구의 결과는 수핵란의 활성화 시간에 따라 핵이식란의 발육 및 핵형이 영향을 받을 수 있음을 시사한다.

서 론

체세포 핵이식에 의한 복제 동물의 생산은 면양(Wilmut 등, 1997)을 비롯한 다양한 동물에서(Cibelli 등, 1998; Wakayama 등, 1998; Onishi 등, 2002; Galli 등, 2003; Woods 등, 2003) 보고되고 있다. 그러나 전체적인 복제과

정의 낮은 효율과 수정란 단계와 태아 발육 단계에서의 높은 손실 등을 고려할 때, 핵이식에 의해 생산된 수정란의 착상 전 초기 발육을 조절하는 메커니즘에 대한 연구가 필요하다. 재구축란의 발육에 영향을 미치는 요인으로 는 공여핵의 기원, 공여핵과 탈핵된 수핵란의 세포 주기와 세포질의 활성화 등을 들 수 있다. 그 중 세포질의 활성화는 핵이식 과정의 필수적인 요소이다.

* 본 연구는 2004년도 농림기술개발사업 기획연구과제의 연구지원(300012-5)에 의해 수행되었음.

† Corresponding author : Phone: +82-33-250-8659, E-mail: htcheong@kangwon.ac.kr

난자의 성숙 과정에서 가장 중요한 것은 MPF(maturation promoting factor; 성숙촉진인자)라고 불리는 세포질 인자이다. MPF는 cyclin B와 P34^{cd2}라는 두 개의 단백질 복합체로서 알려져 있고, kinase 활성은 단백질 kinase의 인산화 상태에서의 변화와 cyclin B와의 관련에 의해서 조절된다. 세포분열 주기 동안 P34^{cd2}의 농도는 일정하게 남아 있지만 cyclin의 농도는 다양하다. P34^{cd2} kinase의 활성은 세포가 유사분열 또는 감수분열 재개를 촉진시키고, 핵막붕괴(nuclear envelop break down, NEBD), 염색체 응축, 세포골격의 재구성 그리고 세포 형태의 변화를 가져온다(Nurse, 1990). Cyclin B의 proteolytic degradation은 MPF의 불활성화를 유도하고 난자가 metaphase기로부터 감수분열이 재개될 수 있도록 한다(Lorca 등, 1993).

난자 성숙 시 MPF 활성은 제 1차와 제 2차 감수분열 중기(metaphase)에서 최고조에 달한다. 난자가 MII기에 정지되었을 때, MPF 활성은 높게 남아 있지만, 수정 또는 활성화 시에 MPF 활성은 신속하게 감소한다(Campbell 등, 1993). 활성화되지 않은 난자에 이식된 핵은 수핵란 세포질의 높은 MPF 활성에 의하여 핵막 붕괴(nuclear envelop break down, NEBD)가 일어나고 미성숙염색체 응축(premature chromosome condensation, PCC)이 일어난다. 그 후 활성화에 의하여 핵막이 다시 형성되고 DNA 합성이 시작된다. 이 과정에서 정상적인 염색체 구성을 가지는 재구축란은 정상적으로 분할하여 배반포까지 발육하고 이식 후 산자로 발달된다. 반면에 수핵란으로 활성화된 난자를 사용할 경우 이식된 핵의 NEBD와 PCC는 일어나지 않으나 핵이식시 공여 세포의 세포 주기와 상관없이 DNA 합성이 일어난다(Campbell 등, 1996). 이것은 핵이 팽창되는 동안 NEBD와 PCC 없이도 이식된 핵의 초기화가 가능함을 시사한다.

본 연구는 융합 전 수핵란의 활성화 처리 유무와 활성화 처리 시간이 소 체세포 유래 핵이식란의 체외 발육능에 미치는 영향을 검토하기 위해 수행하였다.

재료 및 방법

난포란의 채취 및 성숙배양

도축장에서 난소를 회수하여 직경 2~7 mm의 난포로부터 난포액을 흡입하여 미성숙 난자를 채취하였다. 채취된 난자는 실제 현미경하에서 난구세포가 균일하고 세포질이 균질한 것만을 선별하여 성숙배양에 이용하였다. 난포란의 체외성숙은 TCM-199액(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)에 10% 소태아 혈청(fetal bovine serum; FBS, Gibco-BRL), 0.2 mM Na-pyruvate, 0.02 IU/ml FSH(Sigma, St. Louis, MO, USA), 1 µg/ml 17β-estradiol(Sigma) 및 50 µg/ml gentamycin(Gibco-BRL)이 함유된 성숙배양액을 50 µl의 소적으로 만들어 paraffin oil로 피복하고 각 소적 당 10개의 난포란을 넣어 18~20시간 배양하였다.

체세포의 준비

소의 귀 피부세포를 배양하여 약 4회 정도 passage한

다음 동결하여 LN₂ 용기 내에 보관하며 사용하였다. 동결보존된 체세포는 사용 전에 융해하여 5% CO₂ 및 39 °C의 조건에서 10일 이상 장기 배양하여 높은 세포 밀도(confluence 상태)를 만들어 줌으로써 G0/G1기에 동조시켰다. 배양된 세포의 G0/G1기 동조 여부는 본 실험에서는 검토하지 않았으나 별도의 실험에서 90% 이상의 세포가 G0/G1기에 동조되는 것으로 확인되었다(Cheong 등, 2003).

Demecolcine 처리

체외에서 18~20시간 성숙시킨 난포란을 1 ml TCM-199액과 1% hyaluronidase가 들어 있는 원심관에 옮겨 vortex mixer로 5분간 처리하여 난구세포를 제거한 후, 세포질의 색조가 균일한 난자를 실험에 따라 제 1극체가 확인된 난자를 이용하였다. 난구세포가 제거된 난자는 0.4 µl/ml demecolcine으로 40분간 처리하고, 3 mg/ml BSA를 함유한 TCM-199액의 drop으로 옮겨 15분간 정지시킨 후 chromosome mass의 돌출이 확인된 난자를 실험에 이용하였다(Yin 등, 2002).

미세조작

모든 미세 조작은 실온에서 DIC 장치와 Narishige 미세조작기가 갖춰진 독립현미경을 이용하여 실시하였다. 탈핵은 5 µg/ml cytochalasin B(CB)가 함유된 mPBS(modified phosphate buffered saline)액의 배양소적(50 µl) 내에서 제 1극체와 주변의 세포질을 약 1/3 정도 흡입하여 제 2 유사분열 중기 염색체를 제거하는 방법으로 실시하였다. 탈핵된 세포질은 1 µg/ml의 bisbenzimidazole(Hoechst 33342, Sigma)를 함유한 TCM-199액에 15분간 염색하여 형광현미경으로 탈핵 여부를 검사하였다. 핵이식 조작은 TCM-199 + 3 mg/ml BSA 내에서 실시하였다. 배양된 체세포는 0.05% trypsin-EDTA 용액으로 1~3분간 처리하여 pipetting에 의하여 배양접시의 저면에서 분리하였다. 분리된 체세포는 200×g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 3 mg/ml BSA를 함유한 TCM-199액의 drop에 보관하여 사용하였다. Donor 세포는 직접 injection pipette으로 흡입하여 탈핵을 실시한 구멍을 통하여 탈핵란 세포질의 위관강 내로 주입하였다.

재구축란의 전기융합 및 활성화

재구축란의 전기융합은 BTX 세포융합장치(BTX, San Diego, CA, USA) 및 1 mm폭의 wire chamber를 사용하여 실시하였다. 재구축란은 0.1 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂, 0.05 mg/ml BSA를 첨가한 0.3 M mannitol 용액을 넣은 wire chamber의 양 전극 사이로 옮겨, pipette을 이용하여 donor 세포와 수핵란 세포질의 접촉면이 양 전극에 수평이 되도록 유도하고, 이어서 1.5 kV/cm의 직류(DC)전류를 30 µsec 간 1회 통전하였다. 통전 후 즉시 TCM-199 + 3 mg/ml BSA액 내에서 수회 세척 후 배지 내에서 0.5~1시간 후에 세포의 융합 여부를 관찰하였다. Post-activation(post-AC) 처리구는 융합 전에 10 µM의 A23187(Sigma)로 5분간 처리한 후 2 mM의 6-dimethylaminopurine(6-DMAP, Sigma)을 함유한 체외배양액(아래 참조)액의 drop 내로 옮겨 4시간 동안 배양하며 배양 중 0.5 및 2시간 또는 배양종료 후(A23187 처리 후 4시

간) 융합을 실시하였다. 한편, pre-activation(pre-AC) 처리구는 융합 확인 후 10 µM의 A23187로 5분간 처리 후 즉시 2 mM의 6-DMAP을 함유한 체외배양액의 drop 내로 옮겨 4시간 동안 배양하여 활성화를 유지하였다. 일부 핵이식란은 융합 후 0.5, 1.5 및 2.5시간에 whole-mount 및 면역형광검사에 공시하였다.

핵이식란의 체외배양

활성화 처리 후 핵이식란은 3 mg/ml BSA가 함유된 CR1aa 배양액의 50 µl drop으로 옮겨 5% CO₂ 및 39°C의 조건하에서 48시간 배양하여 분할율을 검사하였다. 분할된 핵이식란을 10% FBS를 함유한 CR1aa 내로 옮겨 7일간 추가 배양하여 배반포 형성율을 검사하였다.

MPF Kinase Assay

MPF kinase assay는 Anas 등(1999)의 방법에 따라 ME-SACUP cdc2 kinase assay kit(MBL, Nagoya, Japan)으로 catalytic subunit인 cdc2 kinase의 활성을 측정하였다. 요약하면, 난구세포를 제거한 20개의 난자는 cdc2 kinase sample buffer(50 mM Tris HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0.01 % Brij 35, 1 mM phenyl-methyl- sulfonylfluoride, 0.05 mg/ml leupeptin, 50 mM 2-mercaptoethanol, 25 mM β-glycerophosphate 및 1 mM Na-orthovanadate, MBL)에서 두 번 세척한 다음 5 µl buffer의 microtube에 옮겨 -80°C에서 동결 저장하였다가 용해하여 측정하였다. 난자 추출액(5 µl)은 25 mM Hepes buffer(MBL), 10 mM MgCl₂(MBL), 0.1 mM ATP, 10 % biotinylated MV 펩티드(Ser-Lue-Tyr-Ser-Ser-Pro-Gly-Gly-Ala-Tyr-Cys ; MBL)가 함유된 45 µl kinase assay buffer와 혼합하여, 30°C에서 30분 동안 배양하였다. 인산화 반응은 200 µl의 stop reagent(50 mM EDTA 을 포함하는 PBS ; MBL)로 정지시켜 13,000 xg에서 15초 동안 원심분리하였다. Cdc2 kinase 활성은 ELISA 법에 의해 측정하였는데, 각각 100 µl의 반응액을 biotinylated MV peptide의 인산화 형태를 인식하는 monoclonal antibody가 깔린 각각의 microwell로 옮겨 25°C에서 60분 동안 배양하여 PBS로 5번 세척하였다. 그 후 100 µl의 horseradish peroxidase conjugated streptavidin solution을 각각 첨가하여 25°C에서 30분을 동안 배양한 후 세척하여 100 µl의 POD substrate solution을 넣어 추가적으로 5분 동안 배양하였다. 최종적으로 100 µl의 stop solution(20% H₃PO₄)을 각각의 well에 넣고, microplate를 이용하여 492 nm로 흡광도를 측정하였다.

실험 설계

실험 1) 융합 전후 활성화 처리에 따른 발육을 검토: 핵이식란을 융합 전(post-AC구) 혹은 융합 후(pre-AC구)에 활성화 처리한 다음 9일간 배양하여 분할율과 배반포 형성율을 검사하였다.

실험 2) 융합 전후 활성화 처리에 따른 발육속도 검토: 핵이식란을 실험 1과 같이 구분하여 융합 후 9일간 배양하며 상실배와 배반포기까지의 발육속도를 검사하였다.

실험 3) 융합 전 활성화 처리 시간에 따른 발육을 검토: 핵이식란을 융합 전 0.5, 2, 4시간에 활성화 처리(post-AC구)를 하여 9일간 배양하여 융합 전 활성화 처리 시간별 분할율과 배반포 형성율을 검사하였다.

실험 4) 활성화 처리 후 시간별 MPF 수준 변화 검토: MII기 난자의 활성화 처리 후 0.5, 2, 4시간에 각각 난자의 MPF 수준을 검사하였다.

통계처리

실험의 결과는 Duncan 다중검정에 의해 유의성을 검정하였다.

결 과

융합 전후 활성화 처리에 따른 발육을

핵이식란의 융합 전 활성화 처리구(post-AC구)와 융합 후 활성화 처리구(pre-AC구)의 배반포기 발달율을 검토한 결과, post-AC구가 20.6%로 15.3%인 pre-AC구보다 다소 높게 나타났으나 유의차는 없었다(Table 1).

융합 전후 활성화 처리에 따른 발육속도 검토

핵이식란의 상실배기 혹은 배반포기까지 발육 속도를 검토한 결과, pre-AC구는 핵이식 후 6일차에 상실배로 발달하여 7일차에 배반포가 주로 관찰된 반면 post-AC구는 7일차부터 상실배로 발달하여 8일차 이후에 배반포가 관찰되었다. 그러나 전체적인 배 발달율에는 차이가 없었다(Fig. 1).

융합 전 활성화 처리 시간에 따른 발육을 검토

Post-AC구의 경우 융합 전 활성화 처리 시간이 핵이식란의 발육에 미치는 영향을 검토한 결과(Table 2), 배반포 발육율은 핵이식 후 0.5, 2 및 4시간에 융합한 시험구간에 유의적인 차이가 없었다(17.2~20.5%).

활성화 처리 후 시간별 MPF 수준 변화 검토

Table 1. Effect of activation time on the development of nuclear transfer oocytes

Treatments	No. of embryos fused(%)	No.(%) of embryos developed to		
		2-Cell	Morula	Blastocyst
Pre-AC	124/178(69.7) ^a	114(91.9)	26(21.0)	19(15.3)
Post-AC	141/180(78.3) ^b	131(92.9)	35(24.8)	29(20.6)

* AC, activation.

^{a,b} Values with different superscripts differ(p<0.05).

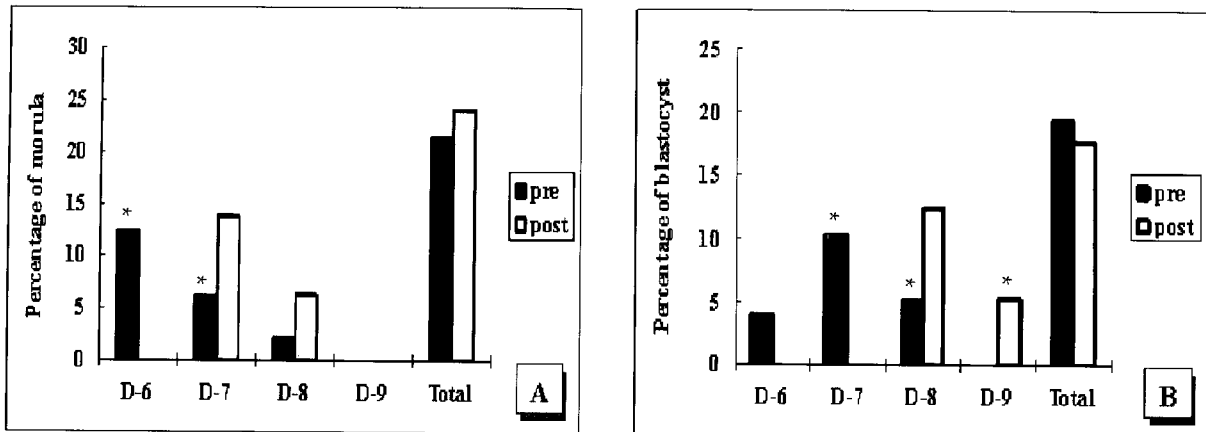


Fig. 1. The developmental patterns of nuclear transfer embryos. The proportion of NT embryos that reached the morula (A) and blastocyst (B) stage by Days 6~9. *Values in the same day and same stage significantly differ ($p < 0.05$).

Table 2. *In vitro* development of nuclear transfer embryos activated at various times before fusion

Time post-activation(h)	No. of embryos fused/manipulated(%)	No.(%) of embryos developed to		
		2-Cell	Morula	Blastocyst
0.5	88/115(76.5)	81(92.0)	21(23.9)	18(20.5)
2	56/74(75.7)	47(83.9)	13(23.2)	11(19.6)
4	58/76(76.3)	48(82.8)	12(20.7)	10(17.2)

MII기 난자의 MPF 수준을 100으로 보았을 때, 활성화 처리 후 0.5, 2 및 4시간째의 MPF 수준은 각각 32.5, 26.2, 19.0으로 현저히 감소하는 경향을 나타내었다($p < 0.05$, Fig. 2).

고찰

소 수정란의 핵을 탈핵 미수정란 세포질에 이식할 경

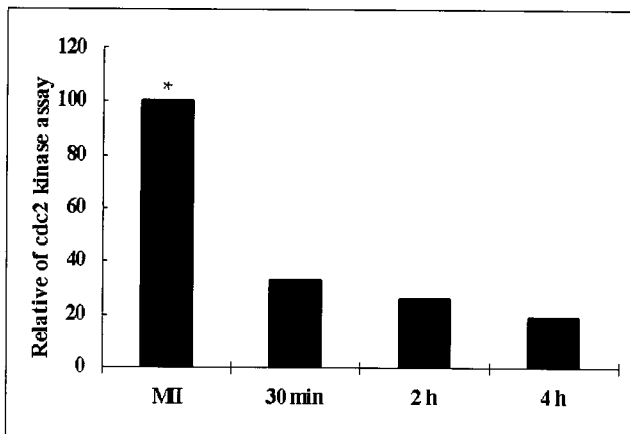


Fig. 2. The cdc2 kinase activity of bovine oocytes following time post-activation. The activity level in MII oocytes is defined as 100%. Data are expressed as relative percentage of the level of p34^{cdc2} activity in bovine oocytes. *Significantly differ ($p < 0.05$).

우, 핵이식란의 발육에 영향을 주는 요소 중의 하나가 탈핵란 세포질의 활성화이다. 미수정란의 경우는 수정 시에 일어나는 세포질의 활성화 과정을 거치지 않은 상태이므로 핵이식 과정에서 반드시 활성화 되어야 한다. 수핵란의 불충분한 활성화는 복제 효율을 낮추는 주요한 요인으로 작용한다. 일반적인 핵이식 연구에서는 활성화 되지 않은 난자를 체세포 핵이식의 수핵세포질로 이용하였다 (Takahashi 등, 1998; Tani 등, 2001). 그러나 소(Bordignon과 Smith, 1998)에서 활성화 후 telophase의 염색체를 제거하거나 생쥐(Baguisi와 Overstrom, 2000)에서 활성화 후 demecolcine으로 화학적 탈핵하여 준비한 세포질이 체세포 복제 동물을 생산하는데 유용하다고 보고되어, 융합 전에 활성화된 세포질도 체세포 핵의 reprogramming을 지지하는 것으로 판단된다. 본 연구에서는 활성화된 세포질(post-AC)이 비활성화된 세포질(pre-AC)보다 다소 높은 배발달율을 나타내었는데, 핵의 염색체가 감수분열 중기의 활성화 되지 않은 세포질에 노출되었을 때 나타나는 다양한 리모델링형태 때문으로 판단된다(Cheong 등, 1994). 한편, 배아의 발육속도에 있어서는 post-AC구에서 더 늦은 발육속도를 보였는데 이는 전핵기 시간이 pre-AC 구에 비하여 길어지는 것에 기인하는 것으로 판단된다(미제시).

핵이식배의 발생능은 핵과 세포질간의 융합시간 및 세포질의 활성화 시기(Collas와 Robl, 1990)에 의해서도 영향을 받는다. 핵이 비활성화된 난자에 주입하였을 때는 빠르게 핵막 붕괴가 일어나고, 염색체는 난세포질에 노출되어 초기화된다. 이식된 핵의 난세포질 내 노출시간 연장은 핵의 초기화와 재구성을 촉진한다고 보고되었다

(Ware 등, 1989). Wakayama 등(1998)은 생쥐 체세포 핵이식에서 핵이식과 동시에, 핵이식 후 1~3시간 내 및 3~6시간에 각각 활성화 처리한 결과, 핵이식 후 일정 시간이 경과된 후 활성화 하는 것이 핵이식 즉시 실시한 경우에 비하여 높은 상실배기 및 배반포기 발육율을 얻었다. 반대로 활성화된 난자에 주입하였을 때는 핵막이 붕괴되지 않으며, 공여 염색체는 난세포질에 직접적으로 노출되지 않는다. 난자의 MPF 활성화는 제 1차와 2차 감수분열 중기(metaphase)에서 최고조에 달하는데, 난자가 MII기에 정지되었을 때, MPF 활성화는 높게 남아 있지만 수정 또는 활성화 시에 MPF 활성화는 신속하게 감소한다 (Campbell 등, 1993). 공여세포의 세포 주기와 수핵란의 활성화 처리 시간은 핵이식란의 배반포로의 체외 발육에 영향을 미친다(Satoshi 등, 2002). Vignon 등(1998)은 탈핵된 난자를 노화와 냉각으로 수핵세포질의 낮은 MPF를 유도하고 송아지나 태아세포를 공여세포로 이용하여 재구성된 핵이식란이 배반포기와 산자까지 발육하였다고 보고하였다. 이 결과는 수핵세포질 내 높은 MPF 활성화 체세포 핵이식란의 발육에 필수적인 것이 아니며, 체세포 핵의 reprogramming을 위한 다른 필수적인 요인이 수핵세포질 내에 존재한다는 것을 나타낸다. 본 연구에서는 핵이식 후 0.5, 2 및 4시간에 활성화 처리를 한 결과, 처리구 간에 유의적인 차이가 없었다. 이는 일단 활성화된 이후의 세포질은 다소 시간이 경과하여도 세포질적 요인의 변화가 크지 않음을 시사한다.

이식된 핵의 완벽한 초기화와 후기 배의 정상적인 발육을 위해서는 각 동물 종에 적당한 수핵란의 세포질을 규명하고 찾아냄으로써 양질의 세포질을 제공하는 것이 매우 중요하다. 또한 핵의 reprogramming과 관련된 구체적인 핵-세포질 상호 작용의 기전을 밝히기 위해서는 활성화 시간뿐 아니라 활성화 형태, 세포 주기와의 관계 등 세포학적 특성에 관한 연구가 필요하다고 판단된다.

인용문헌

1. Anas MK, Shoho A, Shimada M, Terada T (2000): Effects of wortmannin on the kinetics of GVBD and the activities of the maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase during bovine oocyte maturation *in vitro*. *Theriogenology* 53:1797-1806.
2. Baguisi A, Overstrom EW (2000): Induced enucleation in nuclear transfer procedures to produce cloned animals. *Theriogenology* 53:209 (Abstr).
3. Bordignon V, Smith LC (1998): Telophase enucleation: an improved method to prepare recipient cytoplasts for use in bovine nuclear transfer. *Mol Reprod Dev* 49:29-36.
4. Campbell KHS, Ritchie WA, Wilmut I (1993): Disappearance of maturation promoting factor and the formation of pronuclei in electrically activated *in vitro* matured bovine oocytes. *Theriogenology* 39: 199 (Abstr).
5. Campbell KHS, Loi P, Otaegui PJ, Wilmut I (1996): Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Rev Reprod* 1:40-46.
6. Cheong HT, Takahashi Y, Kanagawa H (1992): Development of mouse embryonic nuclei transferred to enucleated oocytes. *Jpn J Vet Res* 40:149-159.
7. Cheong HT, Takahashi Y, Kanagawa H (1994): Relationship between nuclear remodeling and subsequent development of mouse embryonic nuclei transferred to enucleated oocytes. *Mol Reprod Dev* 37: 138-145.
8. Cheong HT, Park TM, Ikeda K, Takahashi Y (2003): Cell cycle analysis of bovine cultured somatic cells by flow cytometry. *Jpn J Vet Res* 51:95-103.
9. Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, León AP, Robl JM (1998): Cloned transgenic calves produced from non-quiescent fetal fibroblasts. *Science* 280:1256-1258.
10. Collas P, Robl JM (1990): Factors affecting efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. *Biol Reprod* 43:877-884.
11. Galli C, Lagutina I, Crotti G, Colleoni S, Turini P, Ponderato N, Duchi R, Lazzari G (2003): A cloned foal born to its dam twin. *Nature* 424:635.
12. Lorca T, Cruzalegui FH, Fesquet D, Cavadore JC, Mery J, Means A, Doree M (1993): Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature* 366:270-273.
13. Nurse P (1990): Universal control mechanism regulating the onset of M-phase. *Nature* 344:503-507.
14. Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, Perry ACF (2002): Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 289:1188-1190.
15. Satoshi K, Yasumitsu N, Naojiro M, Masayasu Y, Hiroshi I (2002): Dependence of DNA synthesis and *in vitro* development of bovine nuclear transfer embryos on the stage of the cell cycle of donor cells and recipient cytoplasm. *Biol Reprod* 67:643-647.
16. Takahashi S, Kubota C, Nakahara H, Shimizu M, Tokunaga T, Yamaguchi M, Imai H (1998): Importance of cytoplasmic factor after oocyte activation on development of somatic cell-nuclear transferred bovine embryos. In: Laruia A, Gandolfi F, Erne G, Gianaroli L (eds), *Gametes: Development and Function*. Sero Symposium 607(Abstr).
17. Tani T, Kato Y, Tsunoda Y (2001): Direct exposure of chromosomes to nonactivated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming. *Biol Reprod* 64:324-330.
18. Vignon X, Chesne P, Le Bourhis D, Flechon JE, Heyman Y, Renard JP (1998): Developmental potential of bovine embryos reconstructed from enucleated matured oocytes fused with cultured somatic cells. *CR Acad Sci III* 321:735-745.

19. Wakayama T, Perry ACF, Zuccoti M, Johnson KR, Yanagimach R (1998): Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394:369-394.
20. Ware CB, Barnes FL, Maili-Laurila M, First NL (1989): Age dependence of bovine oocyte activation. *Gamete Res* 22:265-275.
21. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS (1997): Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813.
22. Woods GL, White KL, Vanderwall DK, Li GP, Aston KI, Bunch TD, Meerdo LN, Pate BJ (2003): A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science* 301:1063.
23. Yin XJ, Tani T, Yonemura I, Kawakami M, Miyamoto K, Hasegawa R, Kato Y, Tsunoda Y (2002): Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes. *Biol Reprod* 67:442-446.
(접수일자: 2006. 7. 25 / 채택일자: 2006. 8. 28)