

## 물리적 탈핵 방법이 소 복제수정란의 발달 능력에 미치는 영향

김세웅<sup>1,2</sup> · 이민정<sup>1</sup> · 황인선<sup>1</sup> · 배성훈<sup>1</sup> · 양병철<sup>1</sup> · 임기순<sup>1</sup> · 성환후<sup>1</sup> · 양보석<sup>1</sup> · 정희태<sup>3</sup> · 김동훈<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 축산연구소, <sup>2</sup>강원대학교 동물생명과학대학, <sup>3</sup>강원대학교 수의학부대학

## Effect of Mechanical Enucleation Methods on Development of Bovine Nuclear Transfer Embryos

Se-Woong Kim<sup>1,2</sup>, Min-Jung Lee<sup>1</sup>, In-Sun Hwang<sup>1</sup>, Sung-Hoon Bae<sup>1</sup>, Byoung-Chul Yang<sup>1</sup>, Gi-Sun Im<sup>1</sup>, Hwan-Hoo Seong<sup>1</sup>, Boh-Suk Yang<sup>1</sup>, Hee-Tae Cheong<sup>3</sup> and Dong-Hoon Kim<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>National Livestock Research Institute, RDA, Suwon 441-706, Korea

<sup>2</sup>College of Animal Life Science and <sup>3</sup>School of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

### ABSTRACT

The aim of this study was to examine the effect of mechanical enucleation methods, aspiration and squeezing, on the developmental ability of nuclear transfer bovine embryos. Enucleated oocytes made by both enucleation methods were fused to adult ear skin cells. After 7 days of culture, developmental ability up to blastocyst stage was similar in both squeezing (33.6±15.7%) and aspiration enucleation methods (31.9±13.4%). The proportion of blastocysts at Day 8 of culture was also similar between the aspiration (37.8±10.4%) and squeezing enucleation s (35.3±15.1%). The mean cell number in Day 7 blastocysts was also similar between the both groups (aspiration: 110.3±39.2 vs. squeezing: 103.7±42.8). The ratio of apoptotic cells was also found to be not significant different between the both groups (aspiration: 2.8±2.6% vs. squeezing: 4.3±4.4%). These results suggest that aspiration and squeezing methods, as mechanical enucleation technique, are both useful for the production of bovine somatic cell nuclear transfer embryos.

(Key words : Nuclear transfer, Mechanical enucleation, Aspiration, Squeezing, Bovine)

### 요 약

본 연구는 물리적 탈핵 방법인 aspiration 방법과 squeezing 방법을 사용해 핵이식된 소 체세포 복제란의 발달능을 조사하였다. 두 방법에 의해 탈핵된 수핵란에 한우 귀피부 세포를 융합하여 체외에서 7~8일간 배양하여 발육능을 검사하였다. 배양 7일째 배반포 발달율은 aspiration 방법 (31.9±13.4%)과 squeezing 방법 (33.6±15.7%) 간에 차이가 없었다. 또한 배양 8일째 배반포 발달율도 squeezing 방법 (35.3±15.1%)과 aspiration 방법 (37.8±10.4%) 간에 차이가 없는 것으로 나타났다. 배양 7일째 배반포의 평균 세포수에 있어 각 처리 간에 차이가 없는 것으로 조사되었으며 (aspiration: 110.3±39.2, squeezing: 103.7±42.8), 세포자연사의 비율에 있어서도 역시 유의적인 차이가 없는 것으로 조사되었다 (aspiration: 2.8±2.6%, squeezing: 4.3±4.4%). 본 연구의 결과는 물리적 탈핵 방법인 aspiration 방법과 squeezing 방법 모두 소 체세포 복제수정란의 생산을 위한 유용한 방법임을 보여준다.

### 서 론

체세포 핵이식 방법은 복제된 양, 소, 생쥐, 면양 그리고 돼지 (Campbell 등, 1996; Wilmut 등, 1997; Wakayama 등, 1998; Baguisi 등, 1999; Polejaeva 등, 2000)를 생산하기 위한 성공적인 방법으로 사용되고 있다. 복제된 수정란 생산과 관련된 두 가지 중요한 요소는 복제하고자 하는 대상의 공여세포와 수핵란이 필요하며, 이 두 가

지 요소는 핵이식 시 서로 상호 작용하여 발달 과정 중 핵의 초기화 및 발달시 필요한 유전능력 획득에 영향을 준다. 그러므로 복제동물 생산을 위해서는 완벽히 탈핵된 수핵란의 준비가 중요한 요소로 작용한다. 대부분의 동물 중에서, 제 1극체를 기준으로 하여 작은 유리관 (직경: 20~25 μm)을 사용해 제 1극체와 주위의 적은 양의 세포질을 제거하는 "blind enucleation" 방법을 사용하여 탈핵을 하게 된다. 하지만 소 (Nour와 Takahashi, 1999)와 토끼 (Mitalipov 등, 1999)의 연구에서 제 1극체와 근접하게 위

† Corresponding author : Phone: +82-31-290-1633, E-mail: kimdhj@hanmail.net

치하는 Metaphase II (MII) spindle은 50% 미만인 것으로 보고하여, 많은 MII 단계의 난자에서 제 1극체 근처에 MII spindle이 존재하지 않음을 알 수 있다. 탈핵시 일정량의 세포질 제거는 제 1극체와 MII spindle의 상호 관계가 파괴되어 탈핵 후 잔여 핵 물질이 존재하는 수핵란 발생이 문제가 되며 (Li 등, 2004), 또한 많은 양의 세포질을 제거하면 이식된 핵의 초기화 및 지속적인 발달 능력을 감소시킨다.

효율적인 탈핵 방법들은 많은 연구자들에 의해 보고되었다. 탈핵 방법은 물리적인 방법, 이 방법과 병행해 Hoechst 33342와 자외선 (UV)을 사용하는 방법, 그리고 화학적 첨가물을 처리하는 방법이 있다. 비록 UV 하에서 탈핵하는 방법 (Kubota 등, 2000; Onishi 등, 2000; Loi 등, 2001)으로 난자를 생산하였지만, Hoechst 33342와 UV를 사용하는 방법은 탈핵 후 세포질에 존재하는 mtDNA의 손상을 초래하여 결과적으로 생존율을 감소시키는 것으로 보고되고 있다 (Dominko 등, 2000). 또한 화학적 탈핵 방법으로 etoposide (Elsheikh 등, 1998), etoposide와 cycloheximide (Fulka와 Moor 1993), ethanol과 demecolcine (Ibanez 등, 2003) 등 화학물질을 수핵란에 처리하여 탈핵에 사용하였다. 그러나 화학적 탈핵 방법은 분화율을 감소시키며 보편적인 물리적 탈핵 방법과 비교해 발달율이 낮은 것으로 나타났다 (Elsheikh 등, 1998; Gasparrini 등, 2003). 최근에 demecolcine을 사용한 화학적 탈핵 방법으로 생쥐 (Baguishi와 Overstrom 2000)와 돼지 (Yin 등, 2002; Kawakami 등, 2003)에서 난자 생산을 보고하였다. Demecolcine 처리에 의한 화학적 탈핵 방법은 탈핵시 적은 양의 세포질을 제거할 수 있는 장점을 가지고 있지만, 화학적 처리 후 물리적 탈핵 방법이 수반되어 탈핵을 수행하게 되므로 물리적 탈핵 방법의 효율성 증진은 복제 수정란 생산 기술에 있어 꼭 필요하다.

따라서, 본 실험에서는 물리적 탈핵 방법인 aspiration과 squeezing 방법을 사용하여 물리적 탈핵 방법에 따라 복제수정란 발달 과정에서 배반포 발달과 세포수 및 세포자연사에 미치는 영향에 대해 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 난포란의 회수 및 체외 성숙

도축장에서 도살된 소의 난소를 적출하여 30~35°C의 생리식염수가 충만된 보온병에 담아서 실험실까지 운반한 후, 10 ml 주사기에 18G 주사침을 이용하여 직경 2~7 mm 가시난포로부터 채취하였다. 채취된 난자는 실체현미경 하에서 난구세포가 치밀하게 부착되고 세포질이 균일한 난자만을 선별하여 체외성숙에 공시하였다. 체외성숙에 사용된 배양액은 10% FBS (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)가 함유된 TCM199 (Gibco-BRL)에 10 µg/ml FSH-P (Follitropin-V, Vetrepharm, London, UK), 0.2 mM sodium pyruvate, 1 µg/ml estradiol-17 그리고 10 ng/ml EGF를 첨가하여 사용하였다. 미성숙난자는 4-well multidish (Nunc, Roskilde, Denmark)를 사용해 mineral oil이 피복된 500 µl 체외성숙용 배양액에 30~50개의 난자를 침적하여, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기 그리고 39°C

조건의 배양기에서 20시간 동안 체외성숙을 실시하였다. 체외성숙이 유도된 난자는 0.1% hyaluronidase와 vortex mixer를 이용해 난구세포를 제거한 후, 실체현미경하에서 세포질이 균일하고 제 1극체가 뚜렷하게 보이는 것만을 선별하여 핵이식에 사용하였다.

### 핵이식 및 체외배양

본 실험에 사용된 체세포는 한우 귀세포를 사용하였다. 공여세포는 25 cm<sup>2</sup> 크기의 Tissue culture flask (Falcon, Becton Dickenson Lab.)에 10% FBS가 첨가된 DMEM (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)에서 confluent 될 때까지 배양하였다. 배양된 체세포는 0.05% FBS가 포함된 PBS로 세척 후, 0.5% Trypsin-EDTA에서 3분 동안 처리하였으며, 부유된 세포는 세척을 위하여 1,200 rpm에서 5분 동안 원심분리를 2회 실시한 후, 핵이식에 사용되었다. 체외성숙된 난자는 탈핵용 배양액 소적에서 제 1극체와 주변의 핵을 제거하였다. 탈핵된 난자는 공여세포를 위한 강으로 미세주입한 후 융합을 실시하였다. 융합은 Zimmerman cell fusion medium이 채워진 100 mm plastic dish 위에서 양쪽 전극이 연결된 스테인리스 needle을 이용하여 난자 부분과 주입된 세포를 일직선상으로 맞춘 후, 전기세포융합기 (ET-3, GOKU, Japan)를 이용하여 25 V, 10 µ sec 동안 1회의 DC pulse를 가하여 융합하였다. 융합된 난자는 10 µ M Ca<sup>2+</sup> ionophore에서 5분간 처리한 다음, 2 mM DMAP에서 3시간 동안 활성화 처리를 하였다. 핵이식된 난자는 0.3% BSA (Fatty acid free)가 첨가된 CR2aa 배양액에서 3일 동안 배양한 후, 5% FBS와 0.15% BSA가 첨가된 CR2aa 배양액에서 5일 동안 배양을 실시하였다. 배양 7일 후, 배반포 단계까지 발달한 복제 수정란은 세포수와 세포자연사를 분석하기 위해 고정하였다.

### 난자의 탈핵

탈핵 방법은 물리적인 방법의 차이에 따라 aspiration 방법과 squeezing 방법을 사용하였다. Aspiration 방법은 7.5 µg/ml cytochalasin B (CB)가 함유된 TCM199 +20% FBS에서 탈핵을 실시하였으며, 제 1극체와 주변의 세포질을 10~15% 정도 aspiration하여 핵을 제거하였다 (Fig. 1 (A), (B)). Squeezing 방법은 50 µg/ml phytohemagglutinin-P (PHA-P)가 함유된 TCM199+20% FBS에서 탈핵을 실시하였으며, glass 피펫을 사용하여 제 1극체 주변의 투명대를 절개한 후, 다시 glass 피펫을 사용하여 난자에 압력을 가해 제 1극체와 핵을 포함하는 세포질을 20~25% 정도 pushing하여 핵을 제거하였다 (Fig. 1 C, D). 탈핵된 난자들은 10 µg/ml Hoechst 33342를 사용해 30분간 염색한 다음, 형광현미경을 사용해 탈핵 여부를 검사하였다.

### 세포자연사 분석

세포자연사 분석을 위해 배양 7일째 배반포를 사용하였으며, 0.3% PVP가 첨가된 PBS에 3번 세척 후, 4% (v/v) paraformaldehyde 고정액에서 24시간 동안 4°C에서 고정하였다. 세포막 침투성을 높이기 위해 0.5% Triton X-100이 함유된 PBS에서 1시간 동안 실온에서 처리하였고, 배반포에서 세포자연사가 유발된 세포의 존재를 분석하기 위해 TUNEL (*In Situ* Cell Death Detection

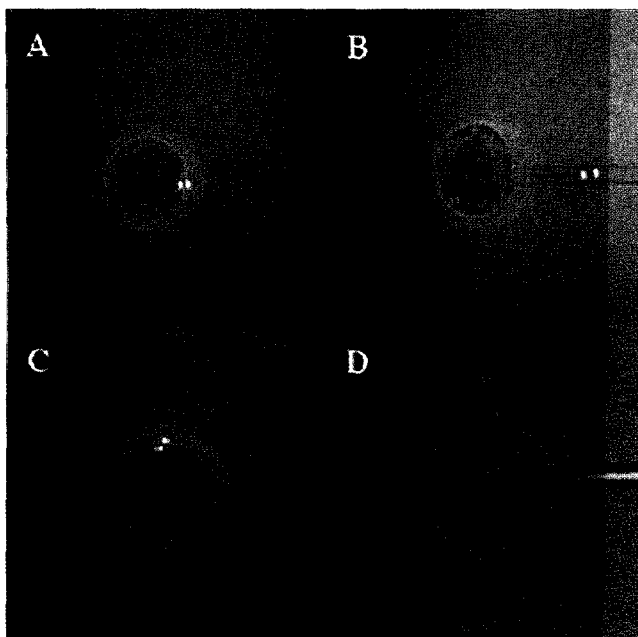


Fig. 1. Mechanical enucleation of bovine mature oocytes. (A), (B): aspiration enucleation by grind pipette. (C), (D): squeezing enucleation by needle pipette. 1<sup>st</sup> polar body and Metaphase II spindle were stained by Hoechst 33342 (blue).

Kit, TMR red; Roche, Mannheim, Germany) 분석방법을 사용하였다. 고정된 배반포는 39°C 배양기에서 1시간 동안 TUNEL 반응액에서 처리하였고, 재차 세척 후 전체 세포수를 분석하기 위하여 10 µg/ml Hoechst 33342에서 30분 동안 염색하였다. 염색된 배반포는 slide glass 위에 antifade solution (Vectashield, Vector Laboratories Inc, CA)을 이용하여 mount 하였다. 그리고 배반포의 전체 세포수와 세포자연사가 유발된 세포수는 형광현미경 하에서 관찰하였다 (Fig. 2).

통계처리

본 실험결과로 얻어진 자료는 SAS package를 이용하여 각 처리간의 Duncan's *t*-test 및 LSD 방법을 이용하여 유의차를 검정하였다.

결 과

물리적 탈핵 방법에 따른 탈핵율

물리적 탈핵 방법으로 aspiration과 squeezing 방법을 사용하여 탈핵율을 비교하였다. 탈핵율은 탈핵 후 Hoechst 33342로 염색해 탈핵된 세포질 내에 잔여 핵이 존재하는지, 그리고 정확하게 MII spindle과 제 1극체에 존재하는 핵이 세포질 외부로 제거되었는지에 따라 판단하였다 (Fig. 1). 탈핵율은 aspiration 방법이 82.3% (51/ 62) 그리고 squeezing 방법이 84.1% (53/63)를 나타내, 두 방법 간에 차이가 없는 것으로 나타났다.

물리적 탈핵 방법에 따른 배반포 발달율

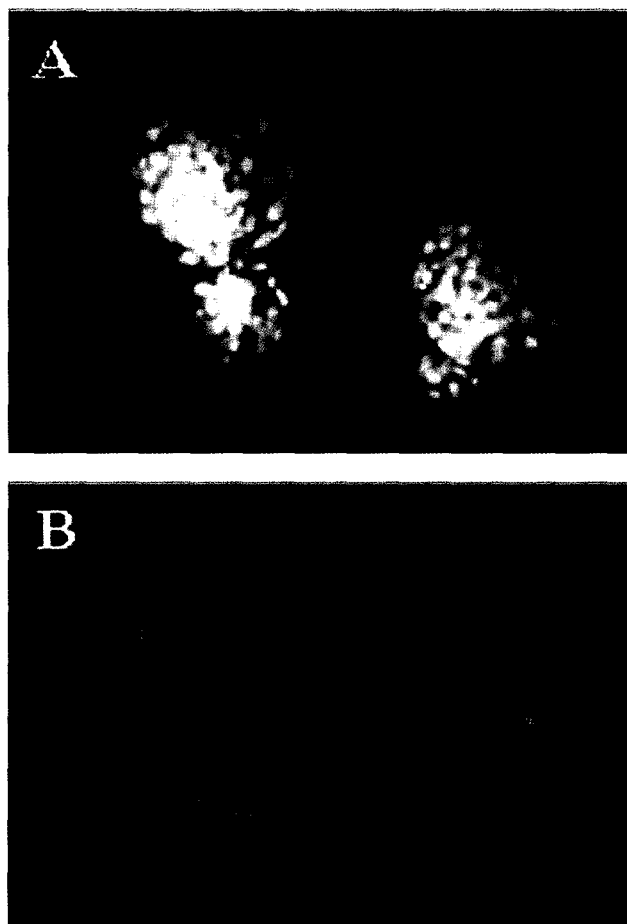


Fig. 2. Total and apoptotic cells in bovine nuclear transfer blastocysts. (A): total cells (Hoechst 33342, blue). (B): apoptotic cells (TUNEL, red).

물리적 탈핵 방법에 따른 핵이식 후 수정란 발달율을 비교한 결과 (Table 1), 핵이식 후 융합율과 분할율은 aspiration 방법 (74.3%와 85.4%)과 squeezing 방법 (70.4%와 76.8%) 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았지만, aspiration 방법이 약간 높은 융합율과 분할율을 나타냈다. 체외에서 7일간 배양을 실시하여 배반포 발달율을 조사한 결과는 aspiration 방법이 31.9±13.4% 그리고 squeezing 방법이 33.6±15.7%로서 두 방법 간에 차이를 나타내지 않았으며, 또한 배양 8일째 배반포 발달율을 조사한 결과도 aspiration 방법 (37.8±10.4%)과 squeezing 방법 (35.3±15.1 %) 간에 차이가 없는 것으로 나타났다.

물리적 방법에 따른 세포수와 세포자연사

물리적 탈핵 방법에 따라 생산된 배반포 세포수를 조사한 결과는 aspiration 방법 (110.3±39.2)과 squeezing 방법 (103.7±42.8) 간에 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다 (Table 2). 배반포에서 세포자연사가 유발된 세포 비율에 있어서도 aspiration 방법 (2.8±2.6%)과 squeezing 방법 (4.3±4.4%) 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았지만, aspiration 방법에서 다소 낮은 세포자연사 비율을 나타냈다 (Table 2).

Table 1. Developmental potential of bovine somatic cell nuclear transfer embryos according to mechanical enucleation methods

Method	No. of oocytes	No. (%) of oocytes fused	No. of oocytes cleaved (Mean%±SE)	No. of blastocysts (Mean%±SE)	
				D-7	D-8
Aspiration	265	197 (74.3)	167 (85.4±7.9)	74 (31.9±13.4)	80 (37.8±10.4)
Squeezing	250	176 (70.4)	136 (76.8±9.1)	62 (33.6±15.7)	65 (35.3±15.1)

Table 2. Total cell and apoptotic cell number of bovine somatic cell nuclear transfer embryos according to mechanical enucleation methods

Method	No. of blastocysts*	No. of (Mean±SE)		
		Total cell	Apoptotic cell	Apoptotic cell (%)
Aspiration	19	110.3±39.2	2.7±2.2	2.8±2.6
Squeezing	18	103.7±42.8	3.7±3.3	4.3±4.4

\* Embryos were cultured for 7 days after nuclear transfer.

## 고찰

핵이식의 탈핵 방법은 적은 양의 세포질을 제거함과 동시에 정확하게 핵을 제거하는데 목적이 있다. 적은 양의 세포질을 제거함은 핵이식 이후 수정란 발생 동안 수정란의 질을 결정짓는 중요한 요소이며, 정확한 탈핵은 핵이식 이후 발생하는 수정란에 있어 배수체를 유지하며, 핵의 초기화에 관여하여 이후 발달 과정에 영향을 미친다 (Renard 등, 2003). 본 연구에서는 효과적인 탈핵 방법을 확인하기 위해서 물리적 탈핵 방법인 aspiration과 squeezing 방법을 비교하였다.

Aspiration 방법은 일반적으로 사용되는 탈핵 방법으로 injection 피펫을 직접 난자의 제 1극체가 있는 부위의 세포질에 주입하여 세포질을 일부 흡입하여 탈핵하는 방법이다. 그리고 squeezing 방법은 glass 피펫을 사용해 제 1극체 주위의 투명대를 절개한 다음 glass 피펫으로 난자를 눌러서 탈핵을 하는 방법이다. 본 실험에서 탈핵 방법에 따라 탈핵율을 비교했을 때, 탈핵 방법 간에 차이를 나타내지 않았다. 탈핵시 핵을 제거하기 위해서는 세포질 제거는 필수적인 요소이다. 하지만 정확하게 핵을 제거하기 위해서는 많은 양의 세포질을 제거해야만 하며 이 요소들을 충족시키기 위해서는 적절한 세포질을 제거함과 동시에 정확한 핵을 제거해야만 한다. Aspiration 방법은 적은 양의 세포질을 제거하지만 피펫을 사용하여 세포질을 흡입하는 과정 동안 난자 세포질에 직접적으로 피펫이 닿아 세포질에 있는 막 구조의 손상을 초래할 수 있다. 이러한 세포질 손상은 microfilament의 회복에도 영향을 주며, 핵이식 후 발달과 분화에 영향을 줄 수 있다 (Tesarik 등, 2003). 탈핵시 cytochalasin B(CB)의 사용은 탈핵과정 동안 microfilament의 파괴를 억제하여 발달 과정에서 세포분열에 관련이 있는 microfilament의 손상을 최소화 함으로서 aspiration 방법에 효율적으로 이용될

수 있다 (Christian 등, 2004). Squeezing 방법은 aspiration 방법에 비해 세포질에 직접적인 접촉은 없지만 많은 양의 세포질을 제거해야 하기 때문에 세포질에 존재하는 핵 이외에 다른 단백질 물질들을 제거할 수 있으며, 이때 제거되는 단백질에는 핵 주위에 위치한 microfilament 또한 포함될 수 있다. 따라서 세포막에 존재하는 microfilament 단백질의 제거는 이후 발달 과정 동안 microfilament에 의해 세포가 분열되는 효율을 감소시켜 세포질의 fragmentation을 초래할 수 있다고 보고하고 있다 (Alikani 등, 2005). 본 연구에서 물리적 탈핵 방법에 따른 복제수정란의 배반포 발달율을 조사한 결과는 두 방법 간에 차이가 없는 것으로 나타났다 (Table 1 참조). 이러한 결과는 squeezing 및 aspiration 방법 모두 소 복제수정란 생산을 위한 효과적인 탈핵 방법임을 재확인해 주고 있다.

체외생산된 배반포의 질을 평가하는데 있어서 배반포의 세포수 및 세포자연사 (apoptosis)가 유발된 세포수는 중요한 요소이다. 배반포의 세포수는 착상전 수정란의 생존성에 대한 정확한 지표가 되며 (Papaioannous와 Ebert, 1988), 이러한 세포수는 체외배양조건, 미세조작과 같은 수정란의 성장환경에 의하여 영향을 받는 것으로 보고되고 있다 (Stojkovic 등, 1998; Koo 등, 2002). 세포자연사는 환경적 스트레스 그리고 염색체 이상에 의하여 유발되는 것으로 알려져 있다 (Hardy, 1997; Matwee 등, 2000). 수정란에서의 세포자연사는 체내수정란에 비해서 체외수정란에서 많이 유발되며, 이러한 세포자연사의 유발 정도는 배양액과 배양방법과 같은 배양 환경에 의존적인 것으로 보고되고 있다 (Brisson과 Schultz, 1997). 최근 보고에 의하면 복제수정란이 체외수정란에 비하여 세포자연사가 유발되는 비율이 유의하게 높은 것으로 나타났으며, 이것은 초기 복제수정란의 발달에 있어 초기화 과정에서 비정상적인 발생에 기인한 것으로 추정하고 있다 (Fahrudin 등, 2002). 복제수정란의 초기화시 세포주기를 조절하

는 단백질인 MPF (Czolowska 등, 1986)의 활성화는 핵의 핵막 붕괴 (NEBD), 염색체 응축 (PCC)과 전핵 형성 과정에 중요하게 작용한다. 기존 화학적 탈핵 방법들은 화학적 물질을 처리하여 탈핵율을 증가시키는 방법으로 사용하였는데, 화학적 물질의 처리는 MPF의 활성을 억제해 결과적으로 이후 발달 과정에 부정적인 영향을 준다고 보고하고 있다 (Wakayama 등, 1998). 본 연구에서 물리적 탈핵 방법에 따른 복제수정란의 세포수 및 세포자연사를 조사한 결과는 실험에 이용된 두 방법 간에 세포수 및 세포자연사에서 유의한 차이가 없었지만, aspiration 방법이 squeezing 방법에 비해 세포수는 다소 많고, 세포자연사는 다소 적은 경향을 나타냈다 (Table 2 참조). 이러한 결과는 탈핵시 aspiration 방법이 squeezing 방법에 비해 적은 양의 세포질을 제거하기 때문인 것으로 사료된다.

복제수정란 생산 효율에 있어서 외부 환경에서의 미세 조작 소요시간도 중요한 요소 중에 하나이다. 본 연구에서 탈핵에 요구되는 미세조작 시간은 두 방법 간에 차이가 없었으나, 공여세포를 주입하는 과정에 있어서는 aspiration 방법에 의하여 탈핵된 난자의 경우에는 두명대 절개 부위가 squeezing 방법에 의한 것보다 상대적으로 작아서, 절개부위를 찾는 어려움으로 인하여 보다 많은 시간이 소요되는 경향이 있었다 (미제시).

본 연구의 결과들을 종합해 볼 때, 물리적 탈핵 방법인 aspiration 방법과 squeezing 방법 둘다 소 복제수정란을 생산하기 위한 효과적인 방법이며, 그 효율에 있어서 차이가 없음을 확인하였다. 따라서 복제수정란을 생산하기 위해서 사용되는 물리적 탈핵 방법은 연구실의 환경과 연구자의 편의 등을 고려하여 그 방법을 선택하는 것이 바람직하다고 사료된다.

## 인용문헌

1. Alikani M, Schimmel T, Willadsen SM (2005): Cytoplasmic fragmentation in activated eggs occurs in the cytokinetic phase of the cell cycle, in lieu of normal cytokinesis, and in response to cytoskeletal disorder. *Mol Hum Reprod* 11:335-344.
2. Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Desrempes MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overstrom EW, Echelard Y (1999): Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol* 17:456-461.
3. Baguisi A, Overstrom EW (2000): Induced enucleation in nuclear transfer procedures to produce cloned animals. *Theriogenology* 54:209 (Abstr).
4. Brison DR, Schultz RM (1997): Apoptosis during mouse blastocyst formation; evidence for a role survival factors including transforming growth factor alpha. *Biol Reprod* 56:1088-1096.
5. Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I (1996): Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380:64-66.
6. Christian S, Susan N, Antoine S-C, Marc M, Francois P, Marc-Andre S (2004): Comparison of bulk enucleation methods for porcine oocytes. *Mol Reprod Dev* 67:70-76.
7. Czolowska R, Waksmundzka M, Kubiak JZ, Tarkowski AK (1986): Chromosome condensation activity in ovulated metaphase II mouse oocytes assayed by fusion with interphase blastomeres. *J Cell Sci* 84:129-138.
8. Dominko T, Mitalipova M, Haley B, Beyhan Z, Memili M, First N (1998): Bovine oocyte as a universal recipient cytoplasm in mammalian nuclear transfer. *Theriogenology* 49:385(Abstr).
9. Elsheikh AS, Takahashi Y, Katagiri S, Kanagawa H (1998): Functional enucleation of mouse metaphase II oocytes with etoposide. *Jpn J Vet Res* 45:217-220.
10. Fahrudin M, Otoi T, Karja NWK, Mori M, Murakami M, Suzuki T (2002): Analysis of DNA fragmentation in bovine somatic nuclear transfer embryos using TUNEL. *Reproduction* 124:813-819.
11. Fulka J Jr, Moor RM (1993): Noninvasive chemical enucleation of mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 34:427-430.
12. Gasparrini B, Gao S, Ainslie A, Fletcher J, McGarry M, Ritchie WA, Springbett AJ, Overstrom EW, Wilmut I, De Sousa PA (2003): Cloned mice derived from embryonic stem cell karyoplasts and activated cytoplasts prepared by induced enucleation. *Biol Reprod* 68:1259-1266.
13. Hardy K (1997): Cell death in the mammalian blastocyst. *Mol Hum Reprod* 3:919-925.
14. Ibanez E, Albertini DF, Overstrom EW (2003): Demecolcine induced oocyte enucleation for somatic cell cloning: coordination between cell-cycle egress, kinetics of cortical cytoskeletal interactions, and second polar body extrusion. *Biol Reprod* 68:1249-1258.
15. Kawakami M, Tani T, Yabuuchi A, Kobayashi T, Murakami H, Fujimura T, Kato Y, Tsunoda Y (2003): Effect of demecolcine and nocodazole on the efficiency of chemically assisted removal of chromosomes and the developmental potential of nuclear transferred porcine oocytes. *Cloning Stem Cells* 5:379-387.
16. Koo D-B, Kang Y-K, Choi Y-H, Park J-S, Kim H-N, Oh K-B, Son D-S, Park HD, Lee K-K, Han Y-M (2002): Aberrant allocations of inner cell mass and trophoctoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. *Biol Reprod* 67:487-492.
17. Kubota C, Yamakuchi H, Tochoroki J, Mizoshita K, Tabara N, Barber M, Yang X (2000): Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:990-995.
18. Li GP, White KL, Bunch TD (2004): Review of enu-

- cleation methods and procedures used in animal cloning state of the art. *Cloning Stem Cells* 6:5- 13.
19. Loi P, Ptak G, Barboni B, Fulka J Jr, Cappai P, Clinton M (2001): Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat Biotechnol* 19:962-964.
  20. Matwee C, Betts DH, King WA (2000): Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote* 8:57-68.
  21. Mitalipov SM, White KL, Farrar VR, Morrey J, Reed WA (1999): Development of nuclear transfer and parthenogenetic rabbit embryos activated with inositol 1,4,5-trisphosphate. *Biol Reprod* 60:821- 827.
  22. Nour MS, Takahashi Y (1999): Preparation of young preactivated oocytes with high enucleation efficiency for bovine nuclear transfer. *Theriogenology* 51: 661- 666.
  23. Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, Perry AC (2000): Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 289:1188- 1190.
  24. Papaioannous VE, Ebert KM (1988): The preimplantation pig embryo cell number and allocation to trophoctoderm and inner cell mass of the blastocyst *in vivo* and *in vitro*. *Development* 102:793-803.
  25. Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S; Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KH (2000): Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407:86- 90.
  26. Renard JP, Zhou Qi, LeBourhis D, Chavatte-Palmer P, Hue I, Heyman Y, Vignon X (2003): Nuclear transfer technologies: between successes and doubts. *Theriogenology* 57:203-222.
  27. Stojkovic M, Buttner M, Zakhartchenko V, Berm G, Wolf EA (1998): Reliable procedure for differential staining of *in vitro* produced bovine blastocysts; comparison of tissue culture medium 199 and Menezes's B2 medium. *Anim Reprod Sci* 50:1-9.
  28. Tesarik J, Martinez F, Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Mendoza C, Greco E (2003): Microfilament disruption is required for enucleation and nuclear transfer in germinal vesicle but not metaphase II human oocytes. *Fertil Steril* 79:677-681.
  29. Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R (1998): Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394:369- 374.
  30. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH (1997): Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810- 813.
  31. 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. 8. 10 / 채택일자: 2006. 9. 11)