

## Chemical Agent를 이용한 추가 활성화 처리가 돼지 단위발생란의 발달에 미치는 영향

서진성<sup>1,2</sup> · 황인선<sup>1</sup> · 김세웅<sup>1</sup> · 박효숙<sup>1</sup> · 김동훈<sup>1</sup> · 양병철<sup>1</sup> · 공일근<sup>2</sup> · 양보석<sup>1</sup> · 임기순<sup>1,\*</sup><sup>1</sup>농촌진흥청 축산연구소, <sup>2</sup>순천대학교 동물자원학과

## Development of Porcine Parthenogenetic Oocytes Activated with Different Combination of Chemicals

Jin-Sung Seo<sup>1,2</sup>, In-Sun Hwang<sup>1</sup>, Se-Woong Kim<sup>1</sup>, Hyo-Suk Park<sup>1</sup>,  
Dong-Hoon Kim<sup>1</sup>, Byoung-Chul Yang<sup>1</sup>, Il-Keun Kong<sup>2</sup>, Boh-Suk Yang<sup>1</sup> and Gi-Sun Im<sup>1,\*</sup><sup>1</sup>National Livestock Research Institute, RDA, Suwon 441-706, Korea<sup>2</sup>Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

## ABSTRACT

Artificial activation of oocytes is a prerequisite for the successful cloning by nuclear transfer. This study investigated the effect of the different combination of activation agents such as electric pulse (E), thimerosal (Thi) + dithiothreitol (DTT), 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) or cycloheximide (CH) on the developmental ability of porcine embryos derived from parthenogenetic activation (PA). PA embryos activated with chemicals showed significantly higher developmental rate to the blastocyst stage compared to the embryos activated with E alone (21.5~28.1% vs. 18.0%, respectively). Of chemicals, Thi + DTT supported higher development to the blastocyst stage (28.1%). There was no significant difference in 1 pronucleus (PN) formation rate (59.9~64.7%), but 2PN formation rate was significantly higher in PA embryos with additional activation using chemicals (7.2~9.7%). In conclusion, this study shows that chemical activation after electric pulse can increase the development of porcine PA embryos.

(Key words : Porcine, Parthenogenetic activation, Thi+DTT, 6-DMAP, Cycloheximide)

## 요 약

핵이식 방법을 이용하여 성공적인 복제를 이루기 위해서 인위적인 활성화 처리는 필수적인 요소이다. 본 연구는 전기자극에 의해 활성화된 난자를 chemical agent를 이용하여 추가적인 활성화 처리를 하였을 때 돼지 단위발생란의 발달에 미치는 영향을 알아보려고 수행되었다. 체외에서 40~44시간 동안 배양된 난자를 전기자극(E)으로 활성화 처리한 후 Thimerosal + Dithiothreitol(Thi+DTT), 6-Dimethylaminopurine(6-DMAP) 및 Cycloheximide(CH)를 사용하여 추가 활성화 처리를 하였다. 활성화 방법(E, E+Thi+DTT, E+6-DMAP 및 E+CH)에 따른 단위발생란의 배반포까지의 발달율을 조사한 결과, chemical agent에 의해 추가 활성화된 단위발생란이 전기자극만으로 처리된 구의 단위발생란보다 유의적으로 높은 발달율을 보였다(21.5~28.1% vs. 18.0%,  $P<0.05$ ). 특히, E+Thi+DTT를 이용하였을 때 발달율이 유의적으로 높게 나타났다(28.1%,  $P<0.05$ ). 활성화 처리별 진행 형성율을 조사한 결과, chemical agent에 의해 추가 활성화 처리된 구에서 하나의 극체(1PN) 형성률은 처리별로 차이를 보이지 않았으나(59.9~64.7%), 2PN 형성률은 추가 활성화 처리구에서 전기자극만을 사용하였을 때보다 유의적으로 높게 나타났다(7.2~9.7% vs. 4.3%,  $P<0.05$ ). 이상의 결과를 살펴볼 때, 전기자극 후 chemical agent를 이용한 추가 활성화는 단위발생란의 배반포까지의 발달능력을 증가시키는 것으로 생각된다.

## 서 론

영국의 Wilmut 등(1997)이 면양의 유선 상피세포를 이용하여 모체와 유전 형질이 동일한 복제양 'Dolly'를 생산한 이후로, 체세포 핵이식을 이용한 복제 동물의 생산은

마우스, 소, 염소, 돼지, 고양이 등 여러 종에서 보고되어져 왔다. 그러나 핵이식에 의한 복제 동물 생산은 난산, 높은 유산율 및 출생 후 초기 사망과 생후 초기 사망의 주 원인으로 생각되는 거대산자증후군(Large Offspring Syndrome)과 같은 문제들에 의해 그 효율성이 저조한 실정이다.

\* Corresponding author : Phone: +82-31-290-1623, E-mail: gsim@rda.go.kr

체세포 복제기법을 이용한 복제 돼지 생산은 바이오장기를 생산할 수 있는 가능성을 가지고 있기 때문에 중요하게 생각되고 있다. 돼지 복제는 여러 가지 요인에 의해 영향을 받으며 대부분은 아직까지 잘 알려져 있지 않다. Tao(1999) 등이 돼지 복제 수정란 생산에 관한 보고를 한 이후로 지금까지 돼지 복제 수정란의 발달율을 증가시키기 위한 많은 연구가 수행되어져 왔다(Cheong 등, 2000; Ikeda와 Takahashi, 2001; Hyun 등, 2003; Im 등, 2005). 그러나 돼지 복제란의 발달 능력은 아직까지 낮은 상태이다. 돼지 복제 수정란의 발달에 영향을 미치는 여러 가지 요인 중에 재구축된 핵이식란의 활성화 처리가 융합 후 배반포까지의 발달에 가장 필수적인 요소라고 생각되어 왔다(Tao 등, 1999; De Sousa 등, 2002). 현재까지 돼지 핵이식란을 활성화시키기 위한 매우 다양한 활성화 방법들이 사용되어져 왔다. 일반적으로 배란된 난자는 metaphase II 상태에서 정지되어 외부의 자극이 없이는 감수분열을 재개하지 못한다. 그러므로 체세포 핵이식을 성공적으로 수행하기 위해서는 인위적인 활성화가 필수적인 과정이다.

Pincus와 Enzmann(1935)이 처음으로 포유동물 난자의 활성화에 대해 보고한 이후로 chemical agent 및 전기자극을 이용한 다양한 활성화 처리가 시도되어져 왔다. 그러나 가장 효율적인 활성화 처리 방법을 찾기 위한 연구는 지금도 여전히 수행되어지고 있다. Polejava 등(2000)은 돼지 난자를 전기자극으로만 활성화 처리하여 최초의 복제돼지를 생산하였으며 그 후로 전기자극을 이용한 활성화 처리가 가장 많이 사용되고 있다(Ohnishi 등, 2000; Betthausen 등, 2002; Lai 등, 2002). 전기자극에 의한 활성화 처리는 일시적으로 세포 내 칼슘 농도의 증가를 야기시킨다. 이 같은 일시적인 칼슘 농도의 증가는 제 2차 감수분열을 재개시킬 수 있지만 이후 계속되는 전핵 형성 및 후속 배 발달에 충분하지 않다(Swann and Ozil, 1994; Wang 등, 1998). 이 같은 이유로 세포 내 칼슘 농도 증가제인 calcium ionophore, 그리고 단백질 합성 억제제인 cycloheximide 및 단백질 인산화 억제제인 6-DMAP를 조합하여 사용하고 있다(Cibelli 등, 1998; De Sousa 등, 1999; Wells 등, 1999; Zaharchenko 등, 1999). Machaty 등(1997)은 thimerosal(Thi)과 dithiothreitol(DTT)을 이용하여 돼지 난자의 완벽한 활성화를 야기시켰다고 보고하였으며, Tao 등(1999)도 돼지 핵이식란을 Thi+DTT로 처리하여 배반포까지의 발달을 얻었다고 보고하였다.

그러므로, 본 연구는 전기자극 후 chemical agent를 이용한 추가 활성화 처리가 단위발생된 돼지 난자의 발달에 미치는 영향을 알아보려고 실시되었다.

## 재료 및 방법

### 난포란 채취 및 체외성숙

도축장으로부터 채취된 난소를 30~35°C로 유지된 0.9% 생리식염수 용액에 넣어 실험실로 운반하였다. 직경 3~6 mm의 난포로부터 18 gauge 주사바늘이 부착된 주사기로 난포액을 흡입하여 미성숙 난자를 채취하였다. 채취한 난자는 실제 현미경 하에서 난구세포 및 세포질이

균질한 것을 선별하여 0.1% PVA(Polyvinyl alcohol)가 첨가된 TL-Hepes에 3회 세척 후에 성숙배양에 이용하였다. 성숙배양액은 0.1% PVA(w/v), 3.05 mM D-glucose, 0.91 mM sodium pyruvate, 0.57 mM cysteine, 0.5 µg/ml lutenizing hormone, 0.5 µg/ml follicle stimulating hormone, 75 µg/ml penicillin G 및 50 µg/ml streptomycin이 첨가된 TCM-199(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)을 사용하였다. 성숙배양은 4-well dish(Nunc, Roskilde, Denmark)를 이용하여 well당 50~70개의 난자를 넣어 40~44시간 동안 실시하였다. 배양조건은 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub>였다.

### 활성화 처리

40~44시간 성숙배양된 난자를 0.1% PVA와 0.1% hyaluronidase가 포함된 TL-Hepes에 넣어 5분간 vortexing하여 난구세포를 제거하였다. 난구세포가 제거된 난자들 중 제 1 극체가 방출된 난자만을 선별하여 사용하였다. 난구세포가 제거된 난자들을 BTX-Cell Manipulator 200(BTX, San Diego, CA, USA)을 이용하여 활성화 처리를 하였다. 활성화용 배지는 1.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM MgCl<sub>2</sub> 및 0.5 mM Hepes가 첨가된 0.3 M mannitol을 사용하였다. 사용된 전압은 1.2 kV/cm의 DC pulse를 1초 간격으로 2회 30 µs 동안 처리하였다. 전기자극을 이용하여 활성화 처리된 난자들은 각각 0.2 mM thimerosal(Thi) 10분 + 8 mM dithiothreitol(DTT) 30분, 2 mM 6-dimethylamino-purine(6-DMAP) 3시간 및 10 µg/ml cycloheximide (CH) 6시간을 사용하여 추가 활성화 처리되었다.

### 핵이식란의 체외배양

활성화 처리가 완료된 난자들은 mineral oil로 피복된 500 µl의 PZM-3(Im *et al.*, 2004)가 들어 있는 4-well dish 내에서 배양되었다. 배양조건은 5% CO<sub>2</sub>, 38.5°C였다. 난분할율 및 배반포 형성율은 각각 3일과 6일째 평가되었다.

### Differential Staining

배반포의 inner cell mass(ICM)와 trophectoderm(TE)을 측정하기 위하여 propidium iodide(Sigma, P-4170; PI)와 bisBenzimide(Sigma, B-2261)를 사용하여 differential staining을 실시하였다. 투명대를 0.5% pronase(Sigma, P-6911) 용액을 처리하여 용해시킨 후 TL-Hepes로 3회 세척하였다. 투명대가 용해된 배반포를 Rabbit anti-pig whole serum(Sigma, P-3164)이 1:5로 첨가된 TL-Hepes 내에서 1시간 배양한 후 난자를 3회 세척하였다. 세척된 난자들은 guinea pig complement(Sigma, S-1639)가 1:10으로 첨가된 TL-Hepes 내에서 1시간 동안 배양되었다. 이 배양액 내에는 PI와 bisBenzimide가 각각 10 µg/ml 첨가되었다. 염색된 배반포를 slide glass에 위치시켜 형광 현미경(Nikon Corp., Tokyo, Japan) 하에서 배반포의 ICM과 TE를 각각 조사하였다.

### 핵상 분석

Hoechst staining를 사용하여 전핵 형성을 조사하였다(Koo 등, 2000). 재구축 및 활성화 처리 후 6시간 후에 난

자를 2% formaldehyde가 첨가된 D-PBS 내에 위치시켜 4°C에서 24시간 동안 고정한 후 slide glass에 위치시킨 후 10 µg/ml Hoechst를 사용하여 전핵을 염색하였다. 염색된 난자의 전핵 형성 여부를 형광현미경(Nikon Corp., Tokyo, Japan) 하에서 관찰하였다.

#### 통계처리

분할율, 배반포율, 세포수 및 전핵 형성율은 Statistical Analysis System의 Generalized Linear Model procedure (Proc-GLM)를 사용하여 분석하였다. 자료의 유의차는 Duncan's multiple range-test를 사용하여 나타내었고, 모든 자료는 Least Square (LS) mean± SEM으로 나타내었다. 유의차는  $P<0.05$  수준에서 검정하였다.

## 결 과

#### 단위발생란의 발육능

활성화처리에 따른 난자의 발육율을 검토한 결과, 분할율은 각 처리구간 (66.7~79.6%)에 유의적인 차이를 보이지 않았지만 배반포 발생율은 추가적인 chemical agent로 처리된 구들에서 전기자극으로만 처리된 구보다 유의적으로 높았다(21.5~28.1% vs 18.0%,  $P<0.05$ ). 특히, 전기자

극 후 Thi+DTT를 이용하여 추가 활성화 처리를 하였을 때 6-DMAP 또는 CH를 사용한 처리구보다 유의적으로 높은 배반포 형성율을 보였다(Table 1).

#### 배반포의 세포수 및 ICM/TE 구성

각 처리구별로 세포수 및 세포의 구성을 검토한 결과, ICM(9.9~14.4%)과 TE(85.6~90.1%) 및 총 세포수는 각 처리구간에 차이가 없었다(Table 2).

#### 활성화 형태

단위발생란의 활성화 후 6시간에 핵의 형태를 검토한 결과(Table 3), 활성화가 유기된 난자의 대부분은 1PN의 구조를 나타내었으나(59.9~64.7), 6-DMAP 추가 처리구에서는 전기자극만 처리한 대조구에 비하여 2PN 형성율이 유의적으로 높았다(9.7 vs 4.3,  $P<0.05$ ).

## 고 찰

본 연구의 결과는 돼지 단위발생란을 전기자극 후 chemical agent를 이용하여 추가 활성화 처리하면 전기자극만으로 처리되었을 때보다 배반포 단계까지의 발달을 증가시킬 수 있다는 사실을 보여준다. Metaphase II 상태

Table 1. Developmental ability of porcine PA oocytes produced from different activation methods

Activation*	No. of treated oocytes	No. of cleaved oocytes (Mean±SE)	No. of blastocysts (Mean±SE)
Control(E)	139	113(66.7±3.2)	26(18.0±0.7) <sup>c</sup>
Thi + DTT	140	111(79.6±2.6)	39(28.1±2.3) <sup>a</sup>
6-DMAP	140	99(71.3±3.1)	23(21.5±0.9) <sup>bc</sup>
CH	140	104(74.2±2.9)	9(23.1±1.4) <sup>b</sup>

\* Control, 2 DC pulses of 1.2 kV/cm for 30 µsec; Thi+DTT, 0.2 mM thimerosal for 10 min and 8 mM dithiothreitol for 30 min; 6-DMAP, 2 mM 6-dimethylaminopurine for 3 h; CH, 10 µg/ml cycloheximide for 6 h.

<sup>a-c</sup> Values with different superscripts differ significantly ( $P<0.05$ ).

Table 2. Cell number in porcine PA blastocyst produced from different activation methods

Activation*	No. of blastocysts	No. of cells (Mean±SE)			Ratio of ICM : TE cell number (mean±SE)
		ICM	TE	Total	
Control(E)	25	101( 9.9±2.1)	914(90.1±2.1)	1,015	11.7±3.0
Thi+DTT	39	177(11.2±1.0)	1,432(88.9±1.0)	1,609	12.9±1.4
6-DMAP	30	151(13.3±1.5)	984(86.8±1.5)	1,135	15.7±2.1
CH	32	180(14.4±0.6)	1,086(85.6±0.6)	1,266	17.2±0.8

\* Control, 2 DC pulses of 1.2 kV/cm for 30 µsec; Thi+DTT, 0.2 mM thimerosal for 10 min and 8 mM dithiothreitol for 30 min; 6-DMAP, 2 mM 6-dimethylaminopurine for 3 h; CH, 10 µg/ml cycloheximide for 6 h.

Table 3. Nuclear morphologies of PA embryos at 6h after activation

Activation	No. of oocytes	No. of oocyte 6h post fusion (Mean%±SE)		
		MI	1PN	2PN
Control(E)	70	23(33.0±1.5)	42(60.1±3.9)	3(4.3±1.5) <sup>b</sup>
Thi+DTT	72	21(29.4±3.0)	45(62.2±4.2)	5(7.2±1.8) <sup>ab</sup>
6-DMAP	72	22(30.5±1.2)	43(59.9±1.2)	7(9.7±1.2) <sup>a</sup>
CH	71	19(27.0±2.0)	46(64.7±2.6)	6(8.4±1.4) <sup>ab</sup>

\* Control, 2 DC pulses of 1.2 kV/cm for 30  $\mu$ sec; Thi+DTT, 0.2 mM thimerosal for 10 min and 8 mM dithiothreitol for 30 min; 6-DMAP, 2 mM 6-dimethylaminopurine for 3 h; CH, 10  $\mu$ g/ml cycloheximide for 6 h.

<sup>a-c</sup> Values with different superscripts differ significantly ( $P<0.05$ ).

에 있는 포유동물 난자의 활성화는 다양한 화학적 또는 물리적인 자극에 의해서 유도되어질 수 있으며, 또한 배란 후 aging에 의해서도 야기되어질 수 있다. 최근의 연구들은 aging되지 않은 난자를 복수의 전기자극 또는 단백질 합성억제제/인산화 억제제 등을 병행 처리하여 활성화 효율을 증가시키는데 중점을 두고 연구가 진행되어지고 있다. 최근의 돼지 복제 연구에서는 융합 후 핵이식란을 calcium ionophore 23187/cycloheximide 또는 ionomycin/6-DMAP를 이용하여 활성화 처리하고 있다(Betthausen 등, 2000; Cheong 등, 2000; Koo 등, 2000). 포유동물 난자의 활성화는 세포 내 칼슘 농도가 증가됨에 의해 시작되어지는데 이는 세포 외의 칼슘이 세포 내로 유입되면서 시작된다(Sun 등, 1992). 전기자극은 세포정적인자(CSF)의 불활성화를 통해 세포내 칼슘 수준을 증가시켜 감수분열을 재개시킬 수 있다(Zernicka-Goetz 등, 1995; Parrington 등, 1996). 그러나 전기자극에 의해 상승된 칼슘 수준은 일시적이며 단위발생 및 핵이식란의 지속적인 발달에 충분하지 않다. 반복적인 전기자극에 의한 칼슘 수준 증가는 kinase의 재 활성화를 지연시킬 수 있다. 상승된 칼슘 수준이 지속적으로 유지되면 CSF가 불활성화 되고 이는 MPF를 불활성화 시킨다. 이 상태에서 단백질 합성억제제는 CSF가 재활성화 되는 것을 차단한다. 이 같은 이유로 전기자극, calcium ionophore 및 ionomycin 같은 칼슘 수준 증가제와 CH 및 6-DMAP 같은 단백질합성/인산화 억제제를 이용한 복합적인 활성화 처리가 복제기법의 효율을 증가시키기 위해 사용되어지고 있다.

Sulfhydryl reagent인 thimerosal은 소(Fissore 등, 1995) 및 돼지(Machaty 등, 1997)에서 sulfhydryl group을 산화시킴에 의해 calcium oscillation을 일으킨다. Tao 등(1999)은 Thi+DTT에 의해 활성화된 돼지 핵이식란이 배반포기까지 발달할 수 있다고 보고하였다. 또한, 본 연구에서 전기자극 후 chemical agent에 의해 추가 활성화된 단위발생란이 전기자극만으로 활성화된 난자보다 더 높은 ICM:TE 비율을 나타냈다. 이전의 보고들에 의하면 체내, 체외 및 핵이식 유래 배반포의 ICM:TE 비율은 각각 44~50%, 16~17% 및 17%였다(Machaty 등, 1998; Koo 등, 2004). 핵이식 수정란의 ICM과 TE의 비정상적인 비율은 비정상적인 태반 또는 초기 태아 손실의 원인이

될 수 있으며, 착상 후에도 영향을 미칠 수 있다(Koo 등, 2004). 이 같은 결과로 볼 때 전기자극 후 chemical agent를 이용한 추가 활성화는 핵이식 수정란의 ICM:TE 비율을 조절하여 착상 후의 발달에까지 영향을 미칠 수 있을 것으로 생각된다.

Chemical agent에 의한 추가 활성화 처리를 받은 난자의 경우, 전핵 형성이 전기자극만으로 활성화된 처리구보다 빨리 이루어졌다. 이는 활성화제 처리가 전핵 형성 및 그 후의 발달에도 영향을 미치는 것으로 해석된다. 그러므로 이 결과는 일회적인 칼슘 수준 증가는 감수분열의 재개를 유도할 수는 있지만, 연속적인 칼슘 수준 증가는 전핵 형성을 촉진시키고 그 후의 지속적인 발달에도 영향을 미친다는 보고와도 일치한다(Swann과 Ozil, 1994; Zhu 등, 2002).

본 연구의 결과에 의하면 전기자극 후 chemical agent를 이용한 추가 활성화는 돼지 단위발생란의 배반포까지의 발달 능력을 증가시키는데 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

## 인용문헌

1. Betthausen J, Forsberg E, Augenstein M, Childs L, Eilertsen K, Enos J, Forsythe T, Golueke P, Jurgella G, Koppang R, Lesmeister T, Mallon K, Mell G, Misica P, Pace M, Pfister-Genskow M, Strelchenko N, Voelker G, Watt S, Tompson S, Bishop M (2002): Production of cloned pigs from *in vitro* systems. *Nat Biotechnol* 18:1055-1059.
2. Cheong HT, Ikeda K, Martinez Diaz MA, Katagiri S, Takahashi Y (2000): Development of reconstituted pig embryos by nuclear transfer of cultured cumulus cells. *Reprod Fertil Dev* 12:15-20.
3. Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Poncede Leon A, Robl JM (1998): Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280:1256-1258.
4. De Sousa PA, Dobrinsky JR, Zhu J, Archibald AL,

- Ainslie A, Bosma W, Bowering J, Bracken J, Ferrier PM, Fletcher J, Gasparrini B, Harkness L, Johnston P, Ritchie M, Ritchie WA, Travers A, Albertini D, Dinnyes A, King TJ, Wilmut I (2002): Somatic cell nuclear transfer in the pig: Control of pronuclear formation and integration with improved methods for activation and maintenance of pregnancy. *Biol Reprod* 66:642-650.
5. De Sousa PA, Winger Q, Hill JR, Jones K, Watson AJ, Westhusin ME (1999): Reprogramming of fibroblast nuclei after transfer into bovine oocytes. *Cloning* 1:63-69.
  6. Fissore RA, Pintos-Correia C, Robl JM (1995): Inositol triphosphate-induced calcium release in the generation of calcium oscillations in bovine eggs. *Biol Reprod* 53:766-744.
  7. Hyun SH, Lee GS, Kim DY, Kim HS, Lee SH, Kim S, Lee ES, Lim JM, Kang SK, Lee BC, Hwang WS (2003): Effects of maturation media and oocytes derived from sows or gilts on the development of cloned pig embryos. *Theriogenology* 59:1641-1649.
  8. Ikeda K, Takahashi Y (2001): Effects of maturational age of porcine oocytes on the induction of activation and development *in vitro* following somatic cell nuclear transfer. *J Vet Med Sci* 63:1003-1008.
  9. Im GS, Lai L, Liu Z, Hao Y, Wax D, Bonk A, Prather RS (2004): *In vitro* development of preimplantation porcine nuclear transfer embryos cultured in different media and gas atmospheres. *Theriogenology* 61:1125-1135.
  10. Im GS, Yang BS, Lai L, Liu Z, Hao Y, Prather RS (2005): Fragmentation and development of preimplantation porcine embryos derived by parthenogenetic activation and nuclear transfer. *Mol Reprod Dev* 71:159-65.
  11. 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.
  12. Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS (2002): Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295:1089-1092.
  13. Machaty Z, Wang WH, Day BN, Prather RS (1997): Complete activation of porcine oocytes induced by the sulfhydryl reagent, thimerosal. *Biol Reprod* 57:1123-1127.
  14. Machaty Z, Prather RS (1998): Strategies for activating nuclear transfer oocytes. *Reprod Fertil Dev* 10:599-613.
  15. Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, Perry ACF (2000): Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 289:1188-1190.
  16. Parrington J, Swann K, Shevchenko VI, Sesay AK, Lai FA (1996): Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble regulation to oocyte maturation. *Nature* 379:364-368.
  17. Pincus G, Enzmann H (1935): The comparative behaviour of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. I. The activation of ovarian eggs. *Journal of Experimental Medicine* 62:665-675.
  18. Polejava IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Dai RF, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KHS (2000): Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407:86-90.
  19. Sun FZ, Hoyland J, Huang X, Mason W, Moor RM (1992): A comparison of intracellular changes in porcine eggs after fertilization and electroactivation. *Development* 115:947-956.
  20. Swann K, Ozil J-P (1994): Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. *Int Rev Cytol* 152:183-222.
  21. 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.
  22. Wang WH, Abeydeera LR, Prather RS, Day BN (1998): Functional analysis of activation of porcine oocytes by spermatozoa, calcium ionophore, and electrical pulse. *Mol Reprod Dev* 51:346-353.
  23. Wells DN, Misica PM, Tervit HR (1999): Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod* 60:996-1005.
  24. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS (1997): Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813.
  25. Zakhartchenko V, Durcova-Hills G, Stojkovic M, Schernthaner W, Prella K, Steinborn R, Muller M, Brem G, Wolf E (1999): Effects of serum starvation and re-cloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts. *J Reprod Fertil* 114:325-331.
  26. Zernicka-Goetz M, Ciemerych MA, Kuibiak JZ, Tarkowski AK, Maro B (1995): Cytostatic factor inactivation is induced by a calcium-dependent mechanism present until the second cell cycle in fertilized but not in parthenogenetically activated mouse eggs. *J Cell Sci* 108:469-474.
  27. Zhu J, Telfer EE, Fletcher J, Springbett A, Dobrinsky JR, De Sousa PA, Wilmut I (2002). Improvement of an electrical activation protocol for porcine oocytes. *Biol Reprod* 66:635-641.

(접수일자: 2006. 2. 4 / 채택일자: 2006. 3. 4)