

## 활성화 및 배양조건이 돼지 단위발생란의 발달 및 Apoptosis에 미치는 영향

황인선<sup>1,2</sup> · 서진성<sup>1</sup> · 정희태<sup>2</sup> · 임기순<sup>1,\*</sup>

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

### Apoptosis and Development of Porcine Parthenogenetic Embryos Activated and Cultured in Different Condition

In-Sun Hwang<sup>1,2</sup>, Jin-Sung Seo<sup>1</sup>, Hee-Tae Cheong<sup>2</sup> and Gi-Sun Im<sup>1,\*</sup>

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

<sup>2</sup>School of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

#### ABSTRACT

This study investigated apoptosis and *in vitro* development of parthenogenetic preimplantation porcine embryos. *In vitro* matured oocytes for 42~44 h were used. Apoptotic cell death was analyzed by using a terminal deoxynucleotidyl transferase mediated deoxyuridine 5-triphosphate nick-end labling (TUNEL) assay. In experiment 1, oocytes were activated with two electric pulses (DC) of 1.2 kV/cm for 30  $\mu$ sec (E), E + 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) or E + cycloheximide (CH) and cultured in PZM-3 under 5% CO<sub>2</sub> in air at 38.5°C. In experiment 2, oocytes were activated by E and cultured in PZM-3 or NCSU-23 under a gas atmosphere of 20% O<sub>2</sub> (5% CO<sub>2</sub>, in air) or 5% O<sub>2</sub> (5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>) at 38.5°C. Oocytes activated with E+6-DMAP or E+CH showed higher blastocyst rates (36.3% and 32.5%) compared to E alone (27.7%). The frequency of apoptosis according to treatments were 5.3%, 7.7% and 7.1%, respectively. Oocytes activated with E alone showed lower ( $P<0.05$ ) frequency of apoptosis compared to other groups. In experiment 2, parthenotes cultured in PZM-3 showed slightly higher blastocyst rates (28.2% and 29.7%) compared to NCSU-23 (22.6% and 24.4%) regardless of atmosphere. Blastocysts generated in PZM-3 showed lower ( $P<0.05$ ) apoptosis rate under 20% O<sub>2</sub> (9.2% vs 16.9%), whereas those in NCSU-23 had slightly lower apoptosis rate under 5% O<sub>2</sub> (14.0% vs 18.4%). This result represents that activation method and culture condition could affect the frequency of apoptosis as well as *in vitro* developmental rate.

(Key words : Apoptosis, Parthenogenesis, Activation, *In vitro* culture)

#### 요 약

본 연구는 활성화처리 방법 및 배양 조건이 돼지 단위발생란의 체외발달 및 apoptosis에 미치는 영향을 알아보기 위해 실시되었다. 도축장 유래 난소로부터 채취된 미성숙 난자를 42~44시간 동안 성숙배양한 후 사용하였다. Apoptosis는 TUNEL 방법을 사용하여 조사하였다. 실험 1에서는 성숙배양된 난자들을 electric pulse(1.2 kV/cm for 30  $\mu$ sec 2회, E), E + 6-dimethylaminopurine(6-DMAP) 또는 E + cycloheximide(CH) 방법으로 활성화 처리하여 PZM-3를 이용하여 5% CO<sub>2</sub>, 38.5°C에서 배양하였다. 실험 2에서는 전기자극을 이용하여 활성화처리된 난자들을 각각 PZM-3 또는 NCSU-23 배양액 내에서 배양하였다. 각 배양액 내의 난자들은 각각 20% O<sub>2</sub> 또는 5% O<sub>2</sub> 조건으로 나뉘어 배양되었다. E + 6-DMAP(36.3%) 또는 E + CH 구(32.5%)에서 E 구(27.7%)보다 유의적으로 높은 배반포 형성율을 보였다( $P<0.05$ ). 처리별 apoptosis 발생율은 각각 5.3%(E), 7.7%(6-DMAP) 및 7.1%(CH)였다. 실험 2에서는 PZM-3 구의 배반포 형성율이 NCSU-23 구에 비하여 산소분압조건과 관계없이 다소 높았다(28.2~29.7% vs. 22.6~24.4%). PZM-3 및 20% O<sub>2</sub> 조건하에서 유의적으로 낮은 apoptosis 발생 비율을 나타냈다(9.2%,  $P<0.05$ ). 그러므로 돼지 단위발생란을 chemical agent를 이용한 추가 활성화처리 후 PZM-3, 20% O<sub>2</sub> 조건으로 배양하면 더 나은 배반포 발생율을 얻을 수 있다고 생각된다.

#### 서 론

체세포 복제기법을 이용한 복제는 형질전환동물 및 바이오 장기를 제공할 수 있는 가능성을 가지고 있다. 초

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

급속 번역 관련 유전자가 제거된 복제돼지가 생산된 이후로 체세포 복제기법을 이용한 복제돼지 생산은 더욱 중요하게 생각되고 있다(Lai 등, 2002; Pelps 등, 2003). 이 같은 성공적인 복제돼지 생산에 관한 보고에도 불구하고 체세포를 이용한 복제돼지 생산효율은 이식된 난자들 중 5% 미만이 산자로 태어날 정도로 그 효율이 저조한 실정이다(Walker 등, 2002).

돼지 복제란 생산효율에 영향을 미치는 요인으로는 수핵란과 공여세포간의 세포주기, 제핵, 융합, 활성화처리 및 배양조건 등을 들 수 있다. 이 중 재구축된 핵이식란의 활성화 과정을 이해하는 것은 핵이식수정란의 배반포까지의 발달능력을 증진시켜 복제돼지를 생산효율을 높일 수 있는 필수적인 요소라고 생각되어 왔다. 돼지 핵이식란을 활성화시키기 위해 Ca-ionophore/6-DMAP(De Sousa 등, 1999), ionomycin/6-DMAP(Wells 등, 1999) 및 cycloheximide/cytochalasin B(Zakharichenko 등, 1999) 같은 chemical agent들이 사용되어 왔다. 배란된 난자는 metaphase II 상태에서 정지되어 정자의 침입 또는 외부 자극에 의한 세포질 내 칼슘 수준의 증가 없이는 감수분열을 재개하지 못한다. 가장 효율적인 활성화 처리 방법을 찾기 위한 연구는 지금도 여전히 수행되고 있다.

또한, 돼지복제수정란의 낮은 체외발달율에 영향을 미치는 요인의 하나로 배양조건을 들 수 있다. 체외에서 생산된 1세포기의 난자를 난관 내에서 배양하면 배반포의 질이 향상된다는 보고(Funahashi 등, 1994)는 배양조건이 발달율에 영향을 미친다는 사실을 나타내 준다. 체외배양조건을 개선하기 위한 연구들이 수행된 결과, 현재까지 돼지수정란을 체외에서 배양하기 위해 NCSU-23(North Carolina State University-23), Whitten medium, BECM-3(Beltsville Embryo Culture Medium-3) 및 PZM-3(Porcine Zygote Medium-3) 등이 개발되어 사용되어 왔다(Bekmann과 Day, 1993; Petters와 Well, 1993; Dobrinsky 등, 1996; Yoshioka 등, 2002). 배양조건 개선을 위해 번식기관 내의 산소분압이 일반 대기 중보다 낮다는 사실이 고려되어야 한다. 산소분압이 돼지난자의 체외발달에 영향을 미친다고 보고되고 있다(Machaty와 Prather, 1998).

그러므로, 본 연구는 전기자극 후 chemical agent를 이용한 추가 활성화처리 및 배양조건이 단위발생된 돼지 난자의 발달 및 apoptosis에 미치는 영향을 알아보고자 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 실체 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-glu-

cose, 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 PBS에 넣어 5분간 vortexing 하여 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 µsec 동안 처리하였다. 전기자극을 이용하여 활성화 처리된 난자들은 각각 0.2 mM thimerosal 10분(Thi) + 8 mM dithiothreitol 30분(DTT), 2 mM 6-dimethylaminopurine 3시간(6-DMAP) 및 10 µg/ml cycloheximide 6시간(CH)를 사용하여 추가 활성화 처리되었다.

### 체외배양

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

### Apoptosis 분석

Apoptosis 분석을 위해 6일째에 배반포를 이용하여 0.1% polyvinylpyrrolidone(PVP)이 첨가된 PBS를 사용하여 2회 세척하였다. 세척된 난자들은 4% paraformaldehyde 내에서 24시간 동안 실온에서 보관한 후 0.5% Triton X-100을 이용하여 membrane permeabilization을 1시간 동안 실시하였다. TUNEL 분석은 *in situ* cell death detection kit(TMR red, Roche, Mannheim, Germany)을 사용하였다. 고정된 난자들은 TUNEL 반응액 내에 위치되어 38.5°C에서 1시간 동안 배양되었다. 배양 후 세척된 난자들을 10 µg/ml Hoechst 33342를 포함한 배양액 내로 옮겨 38.5°C에서 30분 동안 배양하였다. 난자들을 3회 세척 후에 mounting medium (Vectashield, Vector Laboratories, Inc, CA)을 사용하여 슬라이드 위에 고정시켰다. 관찰전까지 슬라이드는 -20°C에서 보관되었다. Apoptosis와 세포수는 형광현미경 하에서 관찰하였다(Fig. 1).

### 실험설계

#### 실험 1

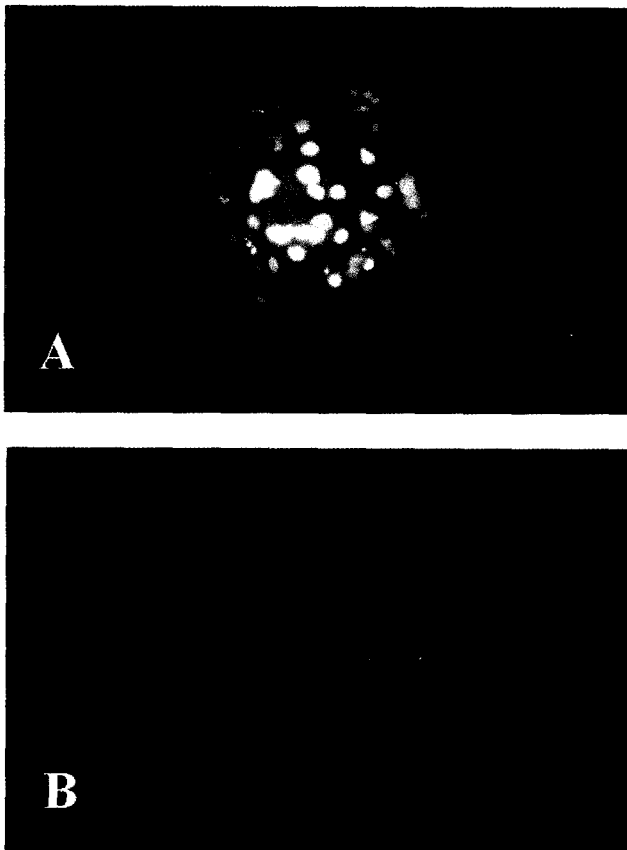


Fig. 1. Apoptosis in porcine parthenogenetic blastocyst. A: total cell B: apoptotic cell.

체외 성숙이 완료된 난자들을 세 그룹으로 나누었다. 첫 번째 그룹은 전기자극만을 이용하여 활성화 처리하였다. 두 번째 그룹은 전기자극 후 6-DMAP을 이용하여 3 시간 동안 처리하였다. 세 번째 그룹은 전기자극 후 cycloheximide를 이용하여 6시간 동안 처리하였다.

**실험 2**

체외성숙이 완료된 난자들을 각각 PZM-3 또는 NCSU-23을 사용하여 배양하였으며, 각 배양액 내에서 배양되는 난자들은 20% 또는 5%의 O<sub>2</sub> 조건으로 나누어 배양되었다.

**통계처리**

난분할율, 배반포율, TUNEL은 ArcSin에 의해 변형되었으며, 모든 데이터는 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**

**실험 1**

전기자극 후 cycloheximide 또는 6-DMAP에 의한 추가 활성화 처리된 난자들의 단위발생 후 배반포까지의 발달능력(32.5~36.3%)이 전기자극만으로 활성화된 난자들(27.7%)보다 유의적(P<0.05)으로 높은 것으로 나타났다(Table 1). 또한, 전기자극 후 cycloheximide 또는 6-DMAP에 의해 추가 활성화 처리된 구에서 생산된 배반포들의 apoptosis 발현비율(7.1~7.6%)이 전기자극만으로 활성화되어 생산된 배반포(5.3%)보다 유의적으로 높게 나타났다(P<0.05).

**실험 2**

단위발생률의 발육은 비록 유의적인 차이는 없지만 산소분압에 관계없이 PZM-3 내에서 배양된 난자들의 배반포까지의 발달율(28.2~29.7%)이 NCSU-23 내에서 배양된 난자의 배반포 발달율(22.6~24.4%)보다 다소 높았다(Table 2). PZM-3 내에서 배양된 난자들 중 20% 산소분압 하에서 배양된 난자들의 apoptosis 발현비율이 PZM-3, 5% O<sub>2</sub> 및 NCSU-23, 20% O<sub>2</sub> 배양구에 비하여 유의적으로 낮았다(9.2% vs. 16.9~18.4%, P<0.05).

**고 찰**

자연조건에서 배란된 난자는 일반적으로 metaphase II기이며 이 시기의 난자들은 정자의 침입이 없으면 감수분열을 재개할 수 없다. 성숙이 완료된 난자의 감수분열을 억제하는 인자는 MPF(maturation promoting fac-

Table 1. Development and apoptosis 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) | % TUNEL (Mean±SE)      |
|------------|------------------------|----------------------------------|------------------------------|------------------------|
| E          | 271                    | 212(61.0±4.23)                   | 64(27.7±1.88) <sup>b</sup>   | 5.3±0.48 <sup>b</sup>  |
| E + 6-DMAP | 264                    | 218(65.8±3.46)                   | 100(36.3±1.96) <sup>a</sup>  | 7.7±0.65 <sup>a</sup>  |
| E + CH     | 278                    | 231(66.9±4.24)                   | 78(32.5±1.85) <sup>ab</sup>  | 7.1±0.73 <sup>ab</sup> |

\* E, Electric activation; 6-DMAP, 2 mM 6-dimethylaminopurine; CH, 10 µg/ml cycloheximide.

<sup>a,b</sup> Values with different superscripts in the same column differ significantly (P<0.05).

Table 2. Development and apoptosis of porcine PA oocytes produced from different culture conditions

| Medium | O <sub>2</sub> concentration | No. of oocytes examined | No. of cleaved oocytes (Mean±SE) | No. of blastocysts (Mean±SE) | % TUNEL (Mean±SE)       |
|--------|------------------------------|-------------------------|----------------------------------|------------------------------|-------------------------|
| PZM    | 20%                          | 144                     | 114(61.3±5.54)                   | 32(29.7±2.43)                | 9.2±1.92 <sup>b</sup>   |
|        | 5%                           | 142                     | 114(61.9±6.23)                   | 29(28.2±3.15)                | 16.9±1.45 <sup>a</sup>  |
| NCSU   | 20%                          | 141                     | 109(60.3±1.93)                   | 19(24.4±4.56)                | 18.4±2.21 <sup>a</sup>  |
|        | 5%                           | 141                     | 117(64.5±1.93)                   | 18(22.6±3.51)                | 14.0±1.25 <sup>ab</sup> |

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

tor)이다. MPF는 GVBD(germinal vesicle breakdown), chromosome condensation 및 spindle formation 등을 통해 난자를 성숙시켜 난자를 metaphase II기에 머무르게 한다(Campbell 등, 1993; Collas 등, 1993). 이 시기에 정자의 난자 내 침입은 세포질 내 주기적인 칼슘 수준 증가를 일으키며, 이는 MPF를 불활성화시켜 난자의 감수분열을 재개시킨다. 핵이식기법을 이용한 복제수정란의 생산에는 일반적으로 수행란으로 metaphase II기에 있는 난자들이 이용된다. 따라서, 정자 침입에 의해 유기되는 난자 세포질 내의 칼슘 수준 증가를 모방할 외부 자극이 성공적인 체세포핵이식기법을 이용한 수정란 생산에 필수적이다. 세포질 내 Ca<sup>2+</sup> oscillation을 유기시키기 위한 방법들 중에서 전기자극 또는 chemical agent 같은 칼슘 수준 증가제와 cycloheximide 같은 단백질 합성 억제제 또는 6-DMAP와 같은 단백질 인산화 억제제를 병행하여 사용하는 방법이 포유동물 난자의 활성화에 성공적으로 사용되어 왔다. 단백질 합성 억제제는 cyclin B의 합성 및 재 축적을 제한함에 의해 MPF의 재활성화를 막는다(Presicce와 Yang, 1994). 단백질 인산화 억제제는 MAPK를 불활성화시켜 MPF의 kinase 활성을 저해한다(Motlik 등, 1998; Gordo 등, 2000). 따라서, 이들 두 가지의 chemical을 사용하면 지속적으로 MPF의 수준을 낮추어 효율적인 난자의 활성화를 유도할 수 있다고 생각된다.

Apoptosis는 정상 또는 병적인 자극에 노출된 후 세포가 사멸되는 생리적인 과정이다. Apoptosis는 착상전 포유동물 배에서 발생되며 배 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 소의 경우 8 세포기 이후에 나타난다고 보고되었다(Matwee 등, 2000; Ranger 등, 2001; Fahrudin 등, 2002; Hao 등, 2004). Alexander 등(2005)은 cycloheximide 또는 6-DMAP에 의해 활성화된 번양의 수정란이 염색체 이상 현상을 보였다고 보고하였다. 단위발생란의 경우 각각 18.2%(CH) 및 28.9%(6-DMAP)였으며, 복제수정란의 경우 각각 6.4%(CH) 및 10.4%(6-DMAP)였다. Hao 등(2004)은 단위발생란의 경우 체외수정란보다 세포수는 적고 apoptosis의 발현비율은 상대적으로 높는데, 이 같은 현상은 단위발생란의 높은 haploid 비율(62.5%)이 하나의 원인이라고 보고하였다. 이상의 연구 결과들을 살펴볼 때, 6-DMAP 또는 CH 같은 chemical agent들은 돼지 단위발생란의 배반포까지의 발달율을 높이는 동시에 apoptosis 발현비율을 높이는 것

으로 생각된다.

본 연구의 단위발생란 발육 결과는 PZM-3 내에서 배양된 단위발생란 및 핵이식란의 배반포까지의 발달율이 NCSU-23 배양액 내에서 배양된 난자들보다 유의적으로 높았다는 이전의 보고와 일치된다(Im 등, 2004). NCSU-23 내에서 생산된 배반포들의 경우, 산소분압이 5%일 때 20%보다 apoptosis 발현 비율이 다소 낮았다. 이는 생식기<sup>1</sup>내보다 높은 산소분압은 난자의 배양 중 ROS(reactive oxygen species)의 형성을 증가시킬 수 있으며, 이는 DNA 손상 등을 일으켜 세포수와 apoptosis에 영향을 미치기 때문으로 생각된다(Bavister, 1998; Yuan 등, 2003). 그러나 PZM-3 내에서 5% 산소분압 하에서 배양된 경우 배반포의 apoptosis 발현 비율이 20% 보다 높게 나타났다. 이 같은 차이는 난자들이 대사환경에 반응하는 정도가 다르기 때문이라고 할 수 있다(Barnett 등, 1996). PZM-3의 경우 필수아미노산 및 비 필수아미노산을 포함하고 있지만, NCSU-23은 그렇지 않다. 아미노산 첨가는 착상전 배 발달에 유익한 영향을 준다. 비 필수아미노산의 경우 초기 배 발달에 효과적이며, 필수아미노산의 경우 총 세포수 및 ICM의 수를 증가시키는 것으로 알려져 있다(Ho 등, 1995; Walker 등, 1996; Krisher 등, 1999; Thuan 등, 2002). 따라서 배양조건의 개선은 산소분압의 차에서 유발되는 발달을 저하를 극복하고 배 발달에 더 나은 환경을 조성할 수 있다고 생각된다.

## 인용문헌

- Alexander B, Coppola G, Berardina D, Rho GJ, St John E, Bett DH, King WA (2005): The effect of 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) and cycloheximide (CHX) on the development and chromosomal complement of sheep parthenogenetic and nuclear transfer embryos. *Mol Reprod Dev* 73:20-30.
- Barnett DK, Bavister BD (1996): What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence? *Mol Reprod Dev* 43:105-33.
- Bavister BD(1998): Role of oviductal secretions in embryonic growth *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology*

- nology 29:143-154.
4. Bekmann LS, Day BN (1993): Effect of NaCl concentration and osmolarity ion culture of the early stage porcine embryos and viability of embryos cultured in a selected superior medium. *Theriogenology* 39:611-22.
  5. Campbell KHS, Ritchie WA, Wilmot I (1993): Nuclear cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos : Implications for deoxyribonucleic acid replication and development. *Biol Reprod* 49:933- 942.
  6. Collas P, Sullivan EJ, Barnes FL (1993): Histone H1 kinase activity in bovine oocytes following calcium stimulation. *Mol Reprod Dev* 34:224-231.
  7. 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.
  8. Dobrinsky JR, Johnson LA, Rath D (1996): Development of a culture medium (BECM-3) for porcine embryos: Effect of bovine serum albumin and bovine serum on embryo development. *Biol Reprod* 55:1069-1074.
  9. 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.
  10. Funahashi H, Stumpf TT, Terlouw SL, Cantley TC, Rieke A, Day BN (1994): Developmental ability of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 41:1425-1433.
  10. Gordo AC, Wu H, He CL, Fissore RA (2000): Injection of sperm cytosolic factor into mouse metaphase II oocytes induces different developmental fates according to the frequency of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations and oocyte age. *Biol Reprod* 62:1370-1379.
  11. Hao Y, Lai L, Mao J, Im GS, Bonk A, Prather RS (2004): Apoptosis in parthenogenetic preimplantation porcine embryos. *Biol Reprod* 70:1644-1649.
  12. Ho Y, Wigglesworth K, Eppig JJ, Schultz RM (1995): Preimplantation development of mouse embryos in KSOM: augmentation by amino acids and analysis of gene expression. *Mol Reprod Dev* 41:232-238.
  13. 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.
  14. Krisher RL, Lane M, Bavister BD (1999): Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semidefined and defined culture media. *Biol Reprod* 60:1345-52.
  15. 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-galactosyl-transferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295:1089-1092.
  16. Machaty Z, Prather RS (1998): Strategies for activating nuclear transfer oocytes. *Reprod Fertil Dev* 10:599-613.
  17. Matwee C, Bette DH, King WA (2000): Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote* 8:57-68.
  18. Motlik J, Pavlok A, Kubelka M, Kalous J, Kalab P (1998): Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. *Theriogenology* 49:461-469.
  19. Petters RM, Well KD (1993): Culture of pig embryos. *J Reprod Fertil* 48(Suppl): 61-73.
  20. Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, Boone J, Wells KD, Chen SH, Ball S, Specht SM, olejaeva IA, Monahan JA, Jobst PM, Sharma SB, Lamborn AE, Garst AS, Moore M, Demetris AJ, Rudert WA, Bottino R, Bertera S, Trucco M, Starzl TE, Dai Y, Ayares DL (2003): Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* 299:414-414.
  21. Presicce GA, Yang X (1994): Nuclear dynamics of parthenogenesis of bovine oocytes matured for 20 and 40 hours and activated with combined ethanol and cycloheximide treatment. *Mol Reprod Dev* 37:61-68.
  22. Ranger AM, Malynn BA, Korsmeyer SJ (2001): Mouse models of cell death. *Nat Genet* 28:113- 118.
  23. Thuan NV, Harayama H, Miyake M (2002): Characteristics of preimplantational development of porcine parthenogenetic diploids relative to existence of amino acids *in vitro*. *Biol Reprod* 67: 1688-1698.
  24. Walker SC, Shin TY, Zaunbrecher GM, Romano JE, Johnson GA, Bazer FW, Piedrahita JA (2002): A highly efficient method for porcine cloning by nuclear transfer using *in vitro*-matured oocytes. *Cloning Stem Cells* 41:123-132.
  25. Walker SK, Hill JL, Kleemann DO, Nancarrow CD (1996): Development of ovine embryos in synthetic oviductal fluid containing amino acids at oviductal fluid concentrations. *Biol Reprod* 55:703-708.
  26. 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.
  27. Yoshioka K, Suzuki T, Tanaka A, Anas IMK, Iwamura S (2002): Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol Reprod* 66:112-119.
  28. Yuan YQ, Van Soom, Coopman FOJ, Mintiens K, Boerjan ML, Van Zeveren A, De Kruif A, Peelman LJ (2003): Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology* 59:1585-1596.
  29. Zakhartchenko V, Durcova-Hills G, Stojkovic M, Scherthaner 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.

(접수일자: 2006. 3. 7 / 채택일자: 2006. 3. 15)