도축장 유래 산양난자의 단위 발생 유기 방법에 따른 체외 발달

윤윤진[1], 박경진[1], 박희성[1,2,*]
[1]경남과학기술대학교 동물생명과학과, [2]재래유전자원연구소

In Vitro Development of Goat Parthenogenetic Oocytes Derived from Different Activation Methods

Yun Jin Yun[1], Kyeong Jin Park[1] and Hee Sung Park[1,2,*]
[1]Department of Animal Science and Biotechnology, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Korea
[2]Research Center of Native Gene Resource, Jinju 660-758, Korea

ABSTRACT

Efficient oocyte activation is a key step for the success of nuclear transfer in cloning. Ionomycin sequentially combined with 6-DMAP is now widely used to activate normal oocytes for analytical studies of oocyte activation and to activate reconstructed oocytes after nuclear transfer. The present study investigated sources of oocytes, duration of ionomycin and 6-DMAP, laser and electric stimulation in goat oocyte activation in order to optimize the protocols. Goat ovaries were collected in individual abattoirs during the breeding season and were delivered to the laboratory within 6 h in saline with 100 IU/ml streptomycin and 0.05 mg/ml penicillin. The oocytes were denuded from the cumulus cell by pipetting with 0.2% hyaluronidase in PBS at 20~22 hr post maturation. Oocytes with the polar body were selected and assigned to four groups for parthenogenetic activation. To examine the effect of duration of ionomycin treatment, oocytes after 20~22 hr of maturation were treated with 2.5 uM ionomycin for 1 or 5 min times and then cultured in 2 mM 6-DMAP for 2 or 4 hr. The activated oocytes were cultured in mSOF at 38.5℃ in CO_2 5%, O_2 5% and N_2 90% multi incubator. Cleavage and blastocyst development was observed at 48 hr and day 8 of culture *in vitro*, respectively. Activation rates of oocytes exposed to ionomycin for 1 min(86.4%) were significantly higher than those treated for 5 min(74.3%) duration. This indicated that 1 min ionomycin treatment was most suitable for activation of goat oocytes. The duration of 6-DMAP treat duration was in 2 mM 6-DMAP for 2 hr after 1 min exposure to 2.5 uM ionomycin. The activation rate of oocytes incubated in 6-DMAP for 2 hour(82.5%) was significantly higher than those in oocytes treated with 4 hr(75.5%).

(Key words : oocytes, CIDR, activation, ionomycin, 6-DMAP, goat)

서 론

재래산양은 우리나라 고유의 유전자원으로서 형질전환 복제와 같은 첨단생명공학 연구에 매우 적합한 동물이다. 근년에 와서 산양을 이용한 연구의 필요성이 점차 확대되고 있는 실정이며, 이를 위해서는 무엇보다도 도축장 유래 난포란의 이용과 같은 난자의 대량 확보 방안이 시급히 마련되어야 할 것이다. 재래산양은 계절번식을 하는 특성을 갖고 있으면서 사육두수가 적고 소나 돼지처럼 도축체계가 확립되어 있지 못하여 일시에 난자의 다량 확보가 불가능한 실정이다(박 등, 2004).

난자의 활성화는 동물 복제를 위한 핵이식기술에 있어서 가장 중요한 과정이다. 또한 난자의 활성화 처리에 의한 단위 발생과 단위 발생란의 체외배양 기술은 수정과 초기수정란의 체외발달을 이해하는데 많은 기여를 해왔으며, 세포의 signaling의 일반적인 원리를 이해하는 데도 매우 유용하다(Lan 등, 2005). 세포질의 활성화를 유도하는 방법으로는 에탄올(Cuthbertson, 1981), strontium(Wakayama, 1998), calcium ionophore(Ware 등, 1989), ionomycin(Loi 등, 1998), cycloheximide(Presicce과 Yang, 1994) 등 화학적인 방법과 저온처리(Moor와 Crosby, 1985), 전기자극법(Tarkowski 등, 1970), 최근에는 초음파 자극(Sato 등, 2005) 방법이 시도되고 있다. 그러나 이들 방법들 중 단일 방

† 이 논문은 2008학년도 기성회 해외중기연수 지원에 의하여 연구되었음.
* Correspondence : E-mail : hspark@gntech.ac.kr

법만으로 활성화를 유도하였을 때는 대부분의 활성화처리 난자는 활성화 처리 후 1개의 전핵형성과 제 2극체가 방출되기 때문에 배반포기로의 발달이 이루어지지 않는다(Wang 등, 1998). 그러나 제 2극체의 방출을 억제하는 6-dimethylaminopurine(6-DMAP), cycloheximide(CHX) 및 cytochalasin B(CB) 등과 병행해서 사용하면 포유동물 난자의 활성화를 향상시킬 수 있다(Fukui 등, 1992). 에탄올+CHX(Presicce와 Yang, 1994), 에탄올+6-DMAP(Ledda 등, 1996), ionophore+6-DMAP(Susko-Parrish 등, 1994), ionophore+ CHX(Jones 등, 1995) 및 Ionomycin+DMAP(Susko-Parrish 등, 1994) 등과 같이 병행사용 방법은 단위 발생과 배반포기로의 발달을 유도하는 매우 효과적인 방법이다.

Ionomycin과 6-DMAP는 산양 난자 활성화 연구(Loi 등, 1998)와 핵이식 난자의 활성화(Keefer 등, 2001; Reggio 등, 2001)에 가장 널리 사용되고 있는데, 대부분의 반추동물 난자의 활성화는 5～10 uM 농도에서 4～5분 처리 후 1.9～2 mM 농도의 6-DMAP에서 3～6시간처리 한다. 체세포 핵이식에 의한 최초의 복제산양은 전기자극+CB(Baguisi 등, 1999) 처리 방법을 사용하였으나, 산양난자의 활성화 효율은 소 난자에 비하여 낮은 실정이다. 산양의 활성화 처리 방법은 다양하지 못하며 주로 ionomycin과 6-DMAP 처리 방법이 산양의 복제 수정란 활성화 방법으로 주로 사용되어 왔다(Keefer 등, 2001; Park 등, 2007). 최근에 새로운 방법들이 시도되고 있으며, 초음파를 이용한 물리적 자극에 의한 활성화 방법으로도 양호한 결과를 얻고 있다(Sato 등, 2005).

본 연구는 동물 복제 및 형질 전환 동물 생산 등의 연구에 기초자료를 제공하고자 재래산양의 체내 및 도축장 유래 체외성숙 난자에 단위 발생을 유도하여 회수난자의 조건과 활성화방법이 단위 발생란의 체외발달율에 미치는 영향을 조사하여 최적의 활성화 방법을 확립하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 회수

본 연구에서 언급하지 않은 모든 시약은 Sigma Aldrich Korea에서 구입하여 사용하였다. 도축장 유래 미성숙 난포란의 회수는 난소를 적출하여 penicillin G(100 μg/ml)와 streptomycin(100 μg/ml)이 함유된 생리식염수(28～30℃)가 들어 있는 보온병에 담아 5시간 이내에 실험실로 운반하여 난소 표면의 이물질과 조직을 제거한 후 생리식염수로 2～3회 세척하였다. 18～21 gauge 주사침이 부착된 10 ml 주사기로 2～6 mm 가시난포로부터 난포액과 난포란을 동시에 흡입하여 회수하였다. 채집한 난포란은 10% FBS(Gibco, U.S.A.)가 첨가된 TCM-199 (Gibco, U.S.A.)배양액으로 4～5회 세척한 다음 난구세포의 부착정도와 세포질이 충실한 것만 선별하여 사용하였다.

2. 체내성숙 난자의 회수

체내성숙 난자 회수를 위한 산양은 생후 10～15개월령의 체중이 15～25 kg 전후의 성숙한 미경산 재래산양으로서 본 대학교 종합농장(위도, 35°10')에서 사육하면서 본 연구에 사용하였다. 사양 관리는 일반 관행법에 따라 사육하되, 농후 사료는 추가 급여하고 물은 자유섭취토록 하였다.

난자의 회수를 위한 과배란 유기는 먼저 발정동기화를 위하여 progesterone 제제인 CIDR(Progesterone 0.3 g, Eazi Breed, InterAg, New Zealand)를 10일간 질 내에 삽입하고, 과배란 처리는 FSH(Folltropin-V, Vetrepharm, Canada)를 CIDR 삽입 8, 9, 10일째에 12시간 간격으로 70 mg을 감량법으로 투여하였다. $PGF_2\alpha$(Lutalyse, Upjohn, USA)는 8일째에 FSH와 함께 10 mg 투여하고 CIDR 제거는 10일째에 제거와 동시에 hCG(Chorulon, Intervet, Netherland) 400～600 IU를 투여하여 과배란을 유도하였다. 본 연구는 산양의 번식기인 10～2월 사이에 실시하였으며 PGF_2a를 투여한 다음날부터 발정관찰을 실시하였다.

체내 성숙난자의 회수는 hCG 투여 후 35～40시간에 외과적인 방법으로 산양의 복정중선을 절개하여 난관을 관류하여 회수하였다. 먼저 과배란 처리한 산양을 약 24시간 절식시킨 다음 2% xylazine(Rompun, 바이엘, 한국)을 체중 kg당 0.2 mg씩 근육주사하여 진정마취시키고, Zoletil 50(VIRBAC Lab. France)을 정맥주사하여 마취를 유도하였다. 마취가 도입된 산양은 복정중선을 절개하여 catheter(Tom Cat, Kendall Co., USA)를 난관누두부로 삽입하여 5～10 ml의 PBS 배양액을 난관 자궁접합부 쪽에서 주입하여 회수하였다.

3. 난포란의 체외성숙

체외성숙 배양액은 TCM-199 배양액에 10% FBS, sodium pyruvate(0.2 mM/ml), streptomycin(100 μg/ml), penicillin G (100 μg/ml)와 LH(10 μg/ml), FSH(10 μg/ml), estradiol-17β(1 μg/ml), cysteamine(0.1 mM/ml) 및 cystine(0.2 mM/ml) 를 첨가하여 사용하였으며, 체외성숙 배양액을 4-well dish에 0.5 ml씩 분주하여 38.5℃ CO_2 배양기(5% CO_2, 95% air, 96～98% 습도)에서 20시간 전 배양을 실시하여 평형을 유도한 후 well 당 10～15개씩의 난포란을 옮겨 배양기내에서 20～22시간 동안 배양을 실시함으로써 체외성숙을 유도하였다.

4. 단위 발생 유기 및 체외배양

회수한 체내 성숙 난자는 0.3% hyaluronidase가 첨가된 TCM-199 배양액으로 3～5분간 처리하여 난구세포를 제거한 다음 사용하였다. 단위 발생유기는 먼저 화학적 방법으로 ionomycin(2.5 μM) 용액에서 5분간 처리한 후 30 mg/ml 농도의 FAF-BSA 용액에서 3분간 세척한 다음 2 mM의 6-DMAP 용액에서 4시간 동안 처리하는 관행적인 방법을 기본으로 하여 ionomycin 5분 6-DMAP 2시간처리, ionomycin 1분, 6-DMAP 2시

간 및 4시간 동안 처리하였다. 또한 물리적인 방법으로 전기자극, 전기 자극 및 6-DMAP 2시간, laser자극 및 6-DMAP를 2시간 처리하여 단위 발생을 유도하였다. 전기 자극은 전기 세포융합장치(BTX, USA)로 실시하였으며, 이때 배지는 0.05 mM $CaCl_2$, 0.1 mM $MgSO_4$ 및 0.5 mM Hepes가 첨가된 0.3M mannitol 용액을 사용하였다. 전기의 세기는 직류전류(DC)로 2.30 kv/cm, 20 μsec, 1회 통전하여 활성화를 유도하였다. Laser system(MTM, Switzerland)을 이용한 단위 발생 유기는 Park 등(2001)의 zona drilling 방법을 응용하여 실시하였다. 즉, laser system 이 부착된 도립현미경하에서 laser 전용 렌즈(×400)로 난자의 투명대와 가까운 세포질 또는 투명대에 맞춘 다음 40～60 μsec의 강도로 laser를 2～3회 투과시켰다. 단위 발생란의 체외배양은 0.8% BSA가 첨가된 mSOF 배양액(5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2, 96～88% humidity, 38.5℃)에서 7～8일간 배양을 실시하였다.

5. 통계학적 분석

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

결 과

1. 활성화 처리시간에 따른 체외발달

도축장유래 체외성숙 난자(72.7%)와 체내성숙 난자(82.1%)를 ionomycin과 6-DMAP처리를 하였을 때 분할은 차이가 없었으며, 배반포기로의 발달율은 체외 성숙난자(20.0%)보다 체내성숙 난자(41.3%)가 유의적(p<0.05)으로 높았다(Table 1). Ionomycin과 6-DMAP의 적정 처리 시간을 검토하고자 ionomycin 5분+6-DMAP 4시간(73.1%) 및 ionomycin 5분+6-DMAP 2시간(72.0%) 처리하였을 때 분할율은 차이가 없었으며, 배반포기로의 발달율도 각각 22.2 및 21.0%로서 차이가 없었다(Table 2). Ionomycin 1분+6-DMAP 4시간 및 ionomycin 1분+6-DMAP 2시간 처라하였을 때도 분할율은 차이가 없었으며, 배반포기로의 발달율도 25.0 및 21.6%로서 차이가 없었다(Table 3).

2. 활성화 처리 방법에 따른 체외발달

활성화 처리 방법에 있어서 전기자극 및 전기자극+DMAP 2시간 처리하였을 때 분할율은 62.0 및 64.0%로서 차이가 없었으나, laser+6-DMAP 2시간 처리하였을 때 10.0%보다는 유의적(p<0.05)으로 높았다. 배반포기로의 발달율은 전기자극+6-

Table 1. Development of goat oocytes activated by different oocytes source

Oocytes*	No. of oocytes activation	No. of oocytes cleaved (%)	No. of blastocyst (%)
In vivo (ovulated)	56	46 (82.1)[a]	19 (41.3)[a]
In vitro (follicle)	55	40 (72.7)[a]	8 (20.0)[b]

* Ionomycin 5 min - 6-DMAP 4 hrs treatment.
** Values with different superscripts in the same column are significantly different(p<0.05).

Table 2. Development of goat oocytes activated by 5min ionomycin combined with 6-DMAP treatment time derived from *in vitro* follicular oocytes

Activation	No. of oocytes activation	No. of oocytes cleaved (%)	No. of blastocyst (%)
Iono 5 min-DMAP 4 h	52	38 (73.1)	8 (21.0)
Iono 5 min-DMAP 2 h	50	36 (72.0)	8 (22.2)

* Values in the same column are not significantly different(p>0.05).

Table 3. Development of goat oocytes activated by 1min ionomycin combined with 6-DMAP treatment time derived from *in vitro* follicular oocytes

Activation	No. of oocytes activation	No. of oocytes cleaved (%)	No. of blastocyst (%)
Iono 1min-DMAP 4h	52	37 (71.1)	8 (21.6)
Iono 1min-DMAP 2h	53	40 (75.5)	10 (25.0)

* Values in the same column are not significantly different (p>0.05)

Table 4. Development of goat oocytes activated by electric pulses and laser stimulation derived from *in vitro* follicular oocytes

Activation	No. of oocytes activation	No. of oocytes cleaved (%)	No. of blastocyst (%)
Electric alone	50	31 (62.0)[a]	0 (0.0)[b]
Electric-DMAP 2 h	50	32 (64.0)[a]	4 (12.5)[a]
Laser-DMAP 2 h	50	5 (10.0)[b]	0 (0.0)[b]

[*] Values with different superscripts in the same column are significantly different($p<0.05$).

DMAP 2시간 처리가 12.5%였으나, 전기자극 및 laser+6-DMAP 2시간 처리구에서는 배반포기로의 발달이 전혀 이루어지지 않았다(Table 4).

고 찰

난자의 활성화는 동물 복제에 있어서 핵이식 후 발달에 반드시 필요한 과정으로서 동물의 종에 따라서 활성화처리 방법을 달리 하여야 한다. 산양 난자의 활성화를 위하여 저온처리, 전기자극, 에탄올 처리, ionomycine 및 strontium 처리 등 다양한 방법들이 시도되어 왔다. 세포질 활성화를 위하여 ionomycin과 strontium 같은 물질을 처리하면 세포질에 축적되어 있는 칼슘의 방출로 인하여 intracellular free Ca^{2+}의 증가를 조장한다. 또한 전기자극 및 에탄올 처리를 하면 세포내 배양액으로 인하여 칼슘의 유입이 촉진된다(Loi 등, 1998).

Lan 등(2005)은 27시간 동안 체외성숙을 유도한 산양난자에 5 uM 농도의 ionomycin을 1분간 처리하고, 6시간 후에 6-DMAP를 처리하였을 때 95%의 분할율을 보여 3～9분 처리(57～80%)보다 높다고 하였다. 뿐만 아니라 체외성숙란을 2.5 uM 농도의 ionomycin 1분 처리 후 6-DMAP를 2, 4 및 6시간 처리하였을 때 처리구(88～94%)간에 차이가 없었으며, 6-DMAP 농도는 2 및 4 mM에 처리하였을 때가 90% 이상으로서 0.5 및 1 mM보다 유의적으로 높았다고 하였다. 따라서 산양의 난자는 넓은 범위의 ionomycin 농도에서도 활성화가 일어나는 것을 볼 수 있다. 본 연구 결과보다는 다소 높은 성적이나 체외 성숙시간과 ionomycin과 6-DMAP간의 처리간격 등이 본 연구와는 차이가 있고, 본 연구의 체내 성숙난자의 경우는 분할율뿐만 아니라 배반포기로의 발달율도 매우 높게 나타났다. 또한 Liu 등(2011)도 산양 복제란을 융합 후 활성화처리를 2 및 3시간 후에 처리하였을 때는 배반포기로의 발달율이 17 및 20%로서 차이가 없다고 하였다. 따라서 2 mM 이하의 적은 양과 지나치게 긴 처리시간은 오히려 분할율이나 발달율에 나쁜 영향을 미치는 것으로 생각된다.

6-DMAP 처리에 의하여 대부분의 난자가 제 2극체의 방출 없이 1개의 전핵이 형성되며, 염색체는 anaphase Ⅱ(A-Ⅱ)에서 telophase Ⅱ(T-Ⅱ) 상태로 된다. 산양 난자는 ionomycin 처리 후 3시간부터 전핵 형성이 시작되어 5시간째에 대부분 완료된다 2시간째에 A-II에서 T-II로 되며, 제 2극체는 2시간째에 방출되기 시작하여 4시간째에 완료된다(Lan 등, 2005). 따라서 Ionomycin과 6-DMAP처리는 처리시간, 농도, 처리시점 등이 산양난자의 활성화에 영향을 미친다. Guo 등(2009)은 산양 체외성숙란에 전기자극만 주었을 때 분할(64%)은 일어나지만, 배반포기로의 발달은 이루어지지 않았으나, 전기자극 후 6-DMAP 처리를 하였을 때 11%의 배반포기로 발달율을 보였다고 하였다. 본 연구에서도 전기세기, 전기 자극방법, 체외성숙 시간 조절 등 다양한 방법을 시도하여 보았으나, 배반포기로의 발달은 이루어지지 않았다.

산양 핵이식란의 융합 및 활성화를 위한 전기자극은 일반적으로 2.2～3.2 kv/cm 세기로 가하지만 1.2 kv/cm에서부터 cytolysis가 일어난다. 일반적으로 산양의 난자는 다른 동물에 비하여 전기의 세기가 높은 편이다. 본 연구에서 일정수준 이상으로 전기 세기를 높이면 분할율은 높아지지만, 배반포기로의 발달율은 오히려 낮은 경향을 보였다.

Mori 등(2008)은 초음파 자극에 의한 단위 발생 유기의 원리는 명확하지는 않지만, 초음파 자극은 세포막의 pore를 형성하여 extracellular Ca^{2+}의 유입에 의하여 난자의 활성화가 유도되는 것으로 추측하였다. 각종 물질을 내부로의 이송을 보다 쉽게 만들어 세포내의 흡수를 촉진한다고 하였다. 초음파 자극 후 CHX를 40 ug/ml를 2시간 처리하였을 때 분할율이 69%였으며, 배반포기로의 발달율도 36%로서 대조구(15%)보다 유의적으로 높았다고 하였다. 따라서 본 연구의 laser 자극에 의한 활성화 처리도 이와 유사한 원리라고 생각되어 실시를 하였으나, 낮은 분할율을 보였다. 초음파 자극 등 물리적 자극에 의한 활성화 처리는 앞으로 좀 더 세밀한 검토가 필요한 것으로 생각된다.

재래산양은 유용단백질 생산을 위한 형질전환 복제동물 생산관련 연구에 있어서 생체반응기로서 적합한 동물이나, 현재의 복제산양 생산 효율은 다른 종에 비하여 매우 낮은 실정이다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 무엇보다도 양질의 난자의 대량 확보 방안, 핵이식기법 개발, 핵이식란의 활성화 효율 개선, 산양 수정란의 배양 체계 확립, 이식기법의 개발 등이 시급한 실정이다 이상의 결과로 볼 때 재래산양의 활성

화 처리는 기존의 여러 가지 방법에 비하여 ionomycin과 6-DMAP 병용 처리가 적합하며, 처리 시간은 각각 1분(ionomycin) 및 2시간(6-DMAP)이 적합한 것으로 생각된다.

결 론

본 연구는 동물 복제 및 형질 전환 동물 생산 등의 연구에 기초자료를 제공하고자 재래산양의 도축장 유래 체외성숙 난자에 단위 발생을 유도하여 활성화 방법에 따른 단위 발생란의 체외 발달율을 조사하여 최적의 활성화 방법의 체계를 확립하고자 실시하였다.

도축장 유래 난포란의 회수는 난소를 적출하여 생리식염수가 들어 있는 보온병에 담아 5시간 이내에 실험실로 옮겨, 난소의 난포로부터 흡입하여 채란을 하였다. 체내 성숙난자의 회수는 체중 15～25 kg 전・후의 성숙한 미경산 재래산양에 과배란을 유기하여 난자를 외과적 방법으로 회수하였다. 활성화 처리는 전기자극, laser 자극법과 ionomycin + 6-DMAP를 처리하여 단위 발생을 유도하였으며, 단위 발생란의 배양은 mSOF 배양액으로 6～8일 동안 체외배양을 실시하였다.

도축장 유래 체외성숙 난자와 체내성숙 난자를 ionomycin과 6-DMAP처리를 하였을 때 분할은 차이가 없었으며, 배반포기로의 발달율은 체외 성숙난자(20.0%)보다 체내성숙 난자(41.3%)가 유의적($P<0.05$)으로 높았다. Ionomycin 5분+6-DMAP 4시간 및 ionomycin 5분+6-DMAP 2시간 처리하였을 때 분할율은 차이가 없었으며, 배반포기로의 발달율도 차이가 없었다. Ionomycin 1분+6-DMAP 4시간 및 ionomycin 1분+6-DMAP 2시간 처리하였을때 분할율은 차이가 없었으며, 배반포기로의 발달율도 차이가 없었다. 활성화 처리 방법에 있어서 전기자극 및 전기자극+DMAP 2시간 처리하였을 때 분할율은 62.0 및 64.0%로서 차이가 없었으나, laser+6-DMAP 2시간 처리하였을때의 10.0%보다는 유의적($p<0.05$)으로 높았다. 배반포기로의 발달율은 전기자극+6-DMAP 2시간 처리가 12.5%였으나 전기자극 및 laser+6-DMAP 2시간 처리구에서는 배반포기로의 발달이 전혀 이루어지지 않았다.

이상의 결과로 볼 때 재래산양의 활성화 처리는 기존의 여러 가지 방법에 비하여 ionomycin과 6-DMAP 병용처리가 적합하며, 처리시간은 각각 1분(ionomycin) 및 2시간(6-DMAP)이 적합한 것으로 생각된다.

참고문헌

Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempes MM, Cammuso C, Williams JL, Nima SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overstrom EW and Echelard Y. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. Nat. Biotechnol. 17:456-461.

Cuthbertson KS, Whittingham DC and Cobbold PH. 1981. Free Ca^{2+} increases in exponential phase during mouse oocyte activation. Nature 194:754-757.

Guo J, Liu F, Guo Z, Li Y, Zhixing AN and Li X. 2009. *In vitro* development of goat parthenogenetic and somatic cell nuclear transfer embryos derived from different activation protocols. Zygote 18:51-59.

Keefer CL, Baldassarre H, Keyston R, Wang B, Bhatia B, Bilodeau AS, Zhou JF, Leduc M, Downey BR, Lazaris A and Karatzas CN. 2001. Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transferred and non-transferred fetal fibroblasts and *in vitro*-matured oocytes. Biol. Reprod. 64:849-856.

Fukui Y, Sawai K, Furudate M, Sato N, Iwazumi Y and Ohsaki K. 1992. Parthenogenetic development of bovine oocytes treated with ethanol and cytochalasin B after *in vitr*o maturation. Mol. Reprod. Dev. 33:357-362.

Jones KT, Carroll J and Whittingham DG. 1995. Ionomycin, thapsigargin, ryanodine and sperm induced Ca^{2+} release increase during meiotic maturation of mouse oocytes. J. Biol. Chem. 270:6671-6677.

Lan GC, Han D, Wu YG, Han ZB, M SF, Liu XY, Chang CL and Tan JH. 2005. Effects of duration, concentration, and timing of ionomycin and 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) treatment on activation of goat oocytes. Mol. Reprod. Dev. 71:380-388.

Ledda S, Loi P, Bogliolo L, Moor RM and Fulka J. Jr. 1996. The effect of 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) on DNA synthesis in activated mammalian oocytes. Zygote 4:7-9.

Liu J, Li LL, DU S, Bai XY, Zhang HD, Tang S, Zhao MT, Ma BH, Quan FS, Zhao XE and Zhang Y. 2011. Effects of interval between fusion and activation, cytochalasin B treatment, and number of transferred embryos, on cloning efficiency in goats. Theriogenology 76:1076-1083.

Loi P, Ledda S, Fulka J Jr, Cappai P and Moor RM. 1998. Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: Effect of activation protocols. Biol. Reprod. 58:1177-1187

Moor RM and Crosby IM. 1985. Temperature-induced abnormalities in sheep oocytes during maturation. Reprod. Fertil. 75:467-473.

Mori H, Mizobe Y, Inoue S, Uenohara A, Takeda M, Yoshida M and Miyoshi K. 2008. Effects of cycloheximide on par-

thenogenetic development of pig oocytes activated by ultrasound treatment. J. Reprod. Dev. 54:364-369.

Park HS, Jin JI, Hong SP, Lee JS and Jung JY. 2001. Effects of laser drilling on blastocyst hatching and pregnancy rates from *in vitro* produced cattle embryos. Theriogenology Abst. 55:352.

Park HS, Jung SY, Kim TS, Park JK, Moon TS, Hong SP, Jin JI, Lee JS, Lee JH, Sohn SH, Lee CY and Moon YS. 2007. Production of cloned Korean native goat (*Capra hircus*) by somatic cell nuclear transfer. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 20:487-495.

Presicce GA and Yang X. 1994. Parthenogenetic development of bovine oocytes matured *in vitro* for 24 hr and activated by ethanol and cycloheximide. Mol. Reprod. Dev. 38:380-385.

Reggio BC, James AN, Green HL, Gavin WG, Behboodi E, Echelard Y and Godke RA. 2001. Cloned transgenic offspring resulting from somatic cell nuclear transfer in the goat: Oocytes derived from both follicle stimulating hormone-stimulated and non-stimulated abattoir derived ovaries. Biol. Reprod. 65:1528-1533.

Sato K, Yoshida M and Miyoshi K. 2005. Utility of ultrasound stimulation for activation of pig oocytes matured *in vitro*. Mol. Reprod. Dev. 72:396-403.

Susko-Parrish JL, Leibfriend-Rutledge ML, Northey DL, Schutzkus V and First NL. 1994. Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. Dev. Biol. 166:729-739.

Tarkowski AK, Witkowska A and Nowicka J. 1970. Experimental parthenogenesis in the mouse. Nature 226:162-165.

Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR and Yanagimachi R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. Nature 394:369-374.

Wang WH, Mqchaty Z, Abeydeera LR, Prather RS and Day BN. 1998. Parthenogenetic activation of pig oocytes with calcium ionophore and the block to sperm penetration after activation. Biol. Reprod. 58:1357-1366.

Ware CB, Barnes FL, Maiki-Laurila M and First NL, 1989. Age dependence of bovine oocyte activation. Gamete Res. 22:265-275.

박희성, 정수영, 김태숙, 이명열, 진종인, 홍승표, 이지삼, 김충희. 2004. 재래산양의 과배 란처리에 있어서 회수시간이 난자의 회수율에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지 19: 113-119.

(접수: 2012. 1. 10 / 심사: 2012. 1. 12 / 채택: 2012. 1. 24)