

핵이식 마우스 생산에 관한 연구

이병천·조충호·황우석
서울대학교 수의과대학
(1993년 2월 22일 접수)

Studies on production of nuclear transplanted mouse embryos

Byeong-chun Lee, Choong-ho Jo, Woo-suk Hwang
College of Veterinary Medicine, Seoul National University
(Received Feb 22, 1993)

Abstract : The present study was carried out to investigate the best condition for nuclear-cytoplasm fusion and *in vitro* culture of nuclear transplanted embryos and to investigate the production of nuclear transplanted offsprings.

The nuclei from 2-, 4- and 8-cell mouse embryos were transferred into enucleated 2-cell embryos, and the reconstituted embryos were submitted to direct current (DC) pulses at output voltage of 1.0, 1.5 and 2.0 kV/cm for 100, 150 and 200 μ sec to induce cell fusion.

1. The culture of intact or zona cut 2-cell embryos in the medium supplemented with cytochalasin B (5 μ g/ml) and colcemide (0.1 μ g/ml) for 30 and 60 minutes did not affect the development to later stage.

2. The *in vitro* developmental rates of group A (a nucleus from one of the blastomeres was removed) and B (electrofusion of group A) were significantly lower than that of control group ($p < 0.01$).

3. When nuclear transplanted embryos were submitted to electrofusion, the significantly higher fusion rates of 2-cell donor nuclei were achieved at the electric field strength of DC 1.5kV/cm for 100 and 150 μ sec, DC 2.0 kV/cm for 100~200 μ sec than DC 1.0 kV/cm for 100 and 150 μ sec ($p < 0.01$). The significantly higher fusion rates of 4-cell donor nuclei were achieved at DC 2.0 kV/cm for 100 and 150 μ sec than DC 1.0kV/cm for 100~200 μ sec ($p < 0.01$). These fusion rates in 8-cell donor nuclei were 88.7~99.3%.

4. The developmental potency to blastocyst in 2- and 4-cell donor nuclei was significantly higher in DC 1.0 and 2.0 kV/cm for 100~200 μ sec treated group and DC 2.0 kV/cm for 150 and 200 μ sec treated group ($p < 0.01$). The developmental potency to blastocyst in 8-cell donor nuclei was significantly higher in DC 2.0 kV/cm for 100 μ sec treated group than in DC 1.0 kV/cm for 100 μ sec treated group and DC 2.0 kV/cm for 150 and 200 μ sec treated group ($p < 0.01$).

5. The developmental potency to blastocyst after nuclear transplantation was significantly higher in 2-cell donor nuclei than in 8-cell donor nuclei ($p < 0.01$).

6. The success rate of nuclear injection into enucleated 2-cell embryos was significantly higher in 2-cell donor nuclei than in 4- or 8-cell donor nuclei ($p < 0.01$).

7. The culture time taken for the nuclear transplanted 2-cell embryos to blastocyst stage was significantly longer in 2-cell donor nuclei than in 8-cell donor nuclei ($p < 0.01$).

8. There was no significant difference in the developmental potency of nuclear transplanted embryos with-

in the concentration of EGF at 0 to 15 ng per ml of BMOC-3 solution.

9. The production rates of offspring after transfer of nuclear transplanted embryos to recipient mouse were significantly higher in 2-cell donor nuclei than in 8-cell donor nuclei ($p < 0.01$).

Key words : mouse, nuclear transplantation, electrofusion.

서 론

핵이식 수정란의 작성은 우량품종에서 유전적으로 동일한 개체를 단기간에 대량으로 육종, 증식 그리고 개량생산하는 측면에서 매우 유용한 분야이다.¹⁻⁶

핵이식 과정에 사용되는 미세조작술 또는 미세수술적 방법은 세포생물학, 발생학, 전기생리학, 임상 그리고 유전공학의 응용에 유용하게 이용되고 있다.⁷⁻¹⁶ 초기에 사용된 미세수술적 핵이식 방법은 세포질막을 관통하여 실시하였기 때문에 세포질에 많은 손상을 주어 성공률이 낮았다.¹⁷ 이러한 미세수술적 방법을 개선하여 세포질막을 관통하지 않고 탈핵 및 핵이식을 실시하는 방법이 도입되었는 바^{18,19} 즉, 끝이 예리한 탈핵용 pipette으로 투명대를 관통할 때 필연적으로 유발되는 세포질의 손상을 적게하기 위해 투명대를 절개하고 끝이 둔한 pipette으로 조작하는 것이다.²⁰

세포융합술은 포유동물의 접합체와 초기 수정란의 핵-세포질 상호작용에 관한 연구 및 이의 응용에 널리 이용되어 왔으며, 불활화한 HVJ(Sendai virus)¹⁸와 PEG(polyethylene glycol)^{21,22}가 세포융합 매개체로 이용되었다. 불활화한 HVJ는 핵과 함께 탈핵된 난에 주입되어 세포융합을 유도하였고¹⁸, PEG를 이용한 4배체 수정란 작성을 위해 Spindle²²은 투명대가 제거된 4세포기 수정란의 할구를 분리한 후 phytohemagglutinin(PHA)이 함유된 50%의 PEG액에서 20~30분간 처리하여 할구쌍의 융합을 유도하였으며, 융합후 체외배양시 대부분이 배반포로 발육하였다. 그러나 HVJ나 PEG를 세포융합 매개체로 이용할 경우 융합시 융합매개체에 노출되는 시간이 비교적 길고, 외부요인 및 각 실험실 조건이 융합성적에 영향을 줄 수 있으며, HVJ의 불활화 등 복잡한 과정이 요구된다. 또한 HVJ를 이용한 방법은 핵이식 수정란을 다시 핵이식에 이용하는 일련의 복제 과정을 수행할 수 없다는 단점이 있다.²³ 따라서 위의 단점을 보완할 수 있는 방법으로서 융합하려는 세포에 영향을 최소로 하고, 간편하며 반복 재현성이 있는 전기적 세포융합술이 연구되었다. 이러한 전기적 세포융합술은 물리적 수치를 정확하게 제어하여 완벽하게 재현할 수 있고, 세포가 융합매개체에 매우 짧은 시간(μ sec 범위) 노출된다는 장점이 있어²⁴ 면양^{25,26}, 토끼²⁷,

소^{9,28} 그리고 돼지²⁹⁻³² 등에서 이용되어 왔다.

마우스에서의 전기적 세포융합은 4배체 수정란의 작성^{33,34}, 2세포기 수정란에서 일측 할구를 탈핵후 나머지 할구와의 융합³⁴ 그리고 반수체의 2세포기 모계 단위생식란(parthenogenetic embryo)을 수핵란으로 하고 반수체의 부계 단위생식란(androgenetic embryo)을 공핵으로 한 2배체의 수정란 작성³⁵ 및 탈핵된 접합체에 2 또는 8세포기의 핵을 이식한 후의 세포융합³⁶ 등에 이용되어 왔다. 국내에서도 불활화한 HVJ를 이용하여 마우스 핵이식시 세포융합을 유기하였으나^{37,38} 전기적 세포융합의 응용은 보고되지 않았다.

핵이식 등 미세조작을 가한 수정란은 정상수정란에 비해 체외에서 후기배로의 발육률이 저하되는 것으로 보고되었는데 Ushijima와 Tsunoda³⁶는 탈핵된 미수정란에 2 및 8세포기의 핵을 이식시 배반포기로의 발육률은 각각 18 및 0%라고 하였다. 또한 Tsunoda et al³⁹은 탈핵된 2세포기 수정란에 4, 8 그리고 내세포괴의 핵을 이식시 배반포까지의 발육률은 4 및 8세포기에서 각각 72 및 32% 이었고 내세포괴의 핵을 이식시는 배반포까지 도달하지 못했다고 보고하였다. 이러한 이유는 수핵란과 이식한 공핵란의 발육단계 차이에 의한 부조화 및 체외조작에 의한 손상 등으로 인해 발육이 저하된 원인으로 있겠으나 체내배양에 비해 체외배양시 충분한 발육여건의 조성이 이루어지지 않은 점도 발육률 저하의 원인이 되었다고 추정하였다. 정상적인 수정란도 체외에서 배양시 체내발육에 비해 발육이 지연되고 배반포의 세포수가 정상보다 적다고 보고되었으며⁴⁰, 이는 수정란의 체외배양시에는 생색도관내에서 분비되는 성장인자를 받지 못했거나 또는 수정란에 의해 분비되는 어떤 성장인자가 배양액에 희석되어 발육이 저하된 것으로 판단된다고 하였다.⁴⁰ 이러한 개념은 몇 가지 성장인자가 수정란 또는 자궁에서 합성된다는 것에 의해서도 뒷받침된다.^{41,42} 만일 착상전 수정란에 의해 성장인자가 생산되고(autocrine), 이러한 성장인자가 수정란의 체외발육에 영향을 미친다면 최소부피의 배지에서 다수의 수정란을 배양하는 것보다 소수의 수정란을 배양하는 것이 배양성적이 감소하는 것은 당연하며 이는 분비되는 성장인자가 배지에 더 많이 희석되어 수정란의 발육에 충분히 이용되지 못한다는 것을 의미한다.⁴⁰ 이러한 저발

육은 몇가지 성장인자를 배지에 첨가함으로써 교정 가능성을 시사하였다.^{40,43} 여러가지 성장인자중 상피성장인자는 번식현상에 영향이 있는 것으로 보고되었다.⁴² 그러나 착상전 수정란에 대한 상피성장인자의 역할은 매우 불분명하다.^{44,45} 또한 Wiley et al⁴³은 모체 유래의 상피성장인자가 난관이나 자궁을 통해 이동됨을 근거로 해서 수정란에 상피성장인자 수용체가 존재할 가능성이 있다고 하였다. 한편 Paria와 Dey⁴⁰는 성장인자가 착상전 수정란 또는 생식도관에서 생성되거나 두 곳 모두에서 생성되는 것이며, 마우스 수정란의 8세포기, 상실배 그리고 배반포기에 상피성장인자 수용체가 나타나고, 이전 단계에서는 나타나지 않는다고 하였다. 또한 상피성장인자는 상실배를 배반포로 변형시키고 투명대 hatching에 영향을 미친다고 하였다. 그러나 최근에 Wiley et al⁴³은 상피성장인자 수용체가 착상전 마우스 수정란의 발육이 진행됨에 따라 증가하는 양상을 보인다고 하였다. 미세조작을 가하지 않은 2세포기 마우스 수정란을 상피성장인자가 첨가된 배지에서 배양시 후기배로의 발육이 높았다는 보고⁴⁰는 접할 수 있었으나, 핵이식 수정란의 체외배양시 발육효과에 대하여는 확실히 밝혀져 있지 않다.

본 연구에서는 투명대 절개후 핵이식을 실시하는 미세조작법에 의해 작성된 핵이식 수정란을 전기적 세포융합술을 이용하여 세포질과 이식된 핵을 융합시킴으로써 전기적 세포융합시 적당한 조건을 알아내고, 핵이식 수정란을 체외 및 체내배양하여 적당한 발육조건을 조사하여 보다 간편하고 재현성 있는 수정란의 복제방법을 확립하고, 산업동물에 응용할 수 있는 기초자료를 도출하고자 한다.

재료 및 방법

실험동물 : 본 실험에서는 표현형이 다른 수정란을 얻고자 albino인 ICR계의 성숙(8주령이상) 수컷마우스와 미성숙(4~6주령)암컷마우스, 비albino인 CBA계의 미성숙(4~6주령) 암컷마우스를 실험동물로 사용하였다 (Fig 12).

실험동물 사육실은 20°C 내외로 유지시켰으며, 오전 7시부터 오후 9시까지 14시간 점등하고 오후 9시부터 오전 7시까지 10시간동안 소등하여 명암을 인위적으로 조절하였다. 사료 및 물은 실험동물용 펠렛사료(삼양사)와 깨끗한 수도물을 자유급식시켰다.

과배란 유도 : 과배란 유기를 위하여 pregnant mare's serum gonadotrophin (Folligon[®], Intervet Lab., Holland, 이하 PMSG로 약함) 7.5IU를 복강내 주사하였으며, 47시간 후에 human chorionic gonadotrophin (Chorulon[®],

Intervet Lab., Holland, 이하 hCG로 약함) 7.5IU를 복강내 주사하였다. 공란마우스에 hCG투여 후 ICR계 수컷마우스와 동수로 하룻밤을 동거시키고 다음날 아침 질전의 형성유무를 관찰하여 교배여부를 판정하였다.

수정란의 준비 : 수정란회수를 위하여 HEPES buffer와 0.5%의 bovine serum albumin (Sigma, USA, 이하 B-SA로 약함)이 첨가된 Brinster's mouse ovum culture medium-3(이하 BMOC-3로 약함)⁴⁶를 사용하였다. 마우스는 경추탈구법으로 도살하고 난관채와 자궁난관접합부에 인접한 자궁선단부를 절단하여 난관을 분리하였다. 분리한 난관의 관류는 25배의 실체현미경(Wild, Germany) 하에서 60mm petridish (Costar, USA)에 난관을 넣고 3ml 주사기와 30 gauge 주사침을 이용하여 난관채에 주사침을 삽입하는 하향식으로 실시하였다.

실험에 사용된 각 단계의 수정란은 hCG 투여후 42±2시간에 난관을 관류하여 2세포기 수정란을 회수하였다 (Fig 1). 회수된 수정란은 실험에 필요한 발육단계까지 체외배양하였다. 실험에 이용된 2세포기 수정란은 채란후 즉시 사용하였으며, 4세포기 수정란은 2세포기에 회수된 수정란을 체외배양하여 4세포기로 발육시킨 후 실험에 사용시까지 4°C에서 보존하였다. 8세포기의 수정란을 얻기 위해서는 2세포기에 채란된 수정란을 체외배양하여 8세포기로 발육시킨 후 실험에 사용시까지 4°C에서 보존하였다.

마우스 수정란의 4°C 단기 보존은 Tsunoda et al⁴⁷과 권⁴⁸의 방법을 변형하여 실시하였다. 마우스 4 및 8세포기 수정란의 단기보존시 보존액으로 BMOC-3액을 사용하였으며, 수정란이 포함된 1~2ml의 보존액을 뚜껑이 달린 15ml 원심분리관 (Costar, USA)에 넣어 물이 담긴 250ml의 비어커에 위치시켜 4°C로 유지되는 냉장고에 보존하였다.

체외배양 : 마우스 2세포기 수정란 및 핵이식 수정란은 다음과 같은 배양조건에서 체외배양을 실시하였다. 수정란의 체외배양을 위하여 100 μM/ml의 EDTA (Sigma, USA)가 첨가⁴⁹된 BMOC-3액을 배양액으로 사용하였으며, 20 μl의 배양액으로 35mm petridish (Costar, USA)에 미소적을 만들고 light white oil (Mineral oil[®], Sigma, USA.)을 도포하여 준비하였다. 체외배양은 37°C, 5% CO₂, 95% 공기 및 습도가 포화상태인 CO₂ 배양기 (Napco, USA, 이하 CO₂ 배양기로 약함)내에서 실시하였다.

정상투명대를 지닌 2세포기 수정란 및 투명대 절개한 2세포기 수정란을 5 μg/ml의 cytochalasin B (Sigma, USA)와 0.1 μg/ml colcemide (Demecolcine[®], Sigma, USA)

가 첨가된 BMOC-3액에서 30분 및 60분간 배양 후 수회 세정하여 BMOC-3액으로 옮겨 체외배양을 실시하여 배반포기로의 발육을 관찰하였다.

상피성장인자(epidermal growth factor)가 핵이식 수정란의 체외배양시 발육에 미치는 영향을 알아보기로 BMOC-3액에 상피성장인자(Boehringer Mannheim GmbH, Germany)을 0, 5, 10 및 15ng/ml로 첨가한 배지에서 핵이식 수정란을 체외배양하여 후기배로의 발육을 관찰하였다.

핵이식 수정란을 96시간동안 체외배양하면서 발육단계 및 발육형태를 분류하였다(Fig 11).

미세 pipette의 제작 : 고정용 pipette(holding pipette)은 외경이 1mm의 미세유리관(Leitz, Germany)을 pipette puller(Narishige, Japan)로 가늘게 뽑은 다음 외경이 80~100 μ m되는 부분에서 microforge(Narishige, Japan)를 이용하여 절단하고, 절단한 부위를 매끄럽게 하기 위해 micro-grinder(Narishige, Japan)로 연마 후 이를 microforge에 장착하여 끝부분에 열을 가해 매끄럽게 안으로 말려들어가게 함으로써 수정란의 고정이 쉽도록 하였다. 투명대 절개용 pipette은 puller로 날카롭게 뽑아 사용하였고, 탈핵 및 주입용 pipette은 pipette puller로 가늘게 뽑은 후 외경이 15~20 μ m인 부위에서 절단하고, 잘린 끝에 열을 가해 일부를 녹여 매끄럽게 한 후 사용하였다.

제작에 앞서 외경 1mm의 미세유리관은 Sigmacote[®] (Sigma, USA)로 내경을 coating한 후 pipette을 제작하였다. 제작된 pipette은 증류수 및 황산으로 수회 세척한 후 NP-40(Tergitol[®], Sigma, USA)으로 다시 세척하고, 증류수로 수회 세척하여 실험에 이용하였다.

핵이식 수정란의 작성 : 수핵란의 준비, 공핵란의 준비 및 핵이식은 Tsunoda et al²⁰의 방법에 준해 실시하였으며 단일 핵을 지닌 2세포기 수정란의 작성은 Kono et al³⁴의 방법에 준해 실시하였다.

1) 수핵란의 준비 : 수핵란으로 2세포기 수정란을 이용하였으며, 수핵란은 60mm petridish에 BMOC-3액으로 미소적을 만들어 준비하였다. 탈핵을 용이하게 하기 위하여 수핵란은 미리 투명대를 절개하여 두었다. 투명대 절개를 위해 고정용 pipette으로 수정란을 할구의 방향과 수직으로 흡입 고정한 후 예리한 절개용 pipette을 세포질에 손상을 주지 않도록 주의하여 투명대와 할구사이에 찢어넣는 방법으로 5~7개의 수정란을 동시에 절개용 pipette에 끼워 준비하였다. 수정란을 절개용 pipette에 끼운 채 고정용 pipette과 접촉시킨 후 문질러 두 pipette의 마찰에 의해 투명대가 절개되도록 하였다(Figs. 2, 3), 이러한 방법에 의해 투명대의 약 1/10을 절개

할 수 있었다.

미세조작시 수정란의 손상을 최소화하기 위해 투명대 절개 후 5 μ g/ml의 cytochalasin B와 0.1 μ g/ml의 colcemide가 첨가된 BMOC-3액에 수정란을 옮겨 20분간 전배양하였다. 전배양한 수정란은 60mm petridish에 cytochalasin B와 colcemide를 첨가한 BMOC-3액으로 만든 미소적내에 넣어 현미경에 장착하여 micromanipulator(Lietz, Germany)를 이용하여 미세조작을 실시하였다.

탈핵은 투명대절개 반대부위를 고정용 pipette으로 잡고 탈핵용 pipette을 투명대 절개부위로 조심스럽게 삽입하여(Fig 4), 세포질에 손상을 입히지 않도록 주의하면서, 핵과 가까운 위치까지 pipette을 접근시켜 세포질을 포함한 핵을 흡인하였으며, 이때 흡인되는 세포질양을 최소화 되도록 하였다(Fig 5). 미세조작은 differential interference contrast(DIC) 장치를 갖추고 있는 도립현미경(Leitz, Germany), $\times 250$ 의 배율하에서 실시하였다.

2) 공핵란의 준비 및 핵이식 : 공핵란은 2, 4 및 8세포기의 수정란을 사용하였으며 2 및 4세포기 수정란에서의 핵채취는 수핵란의 탈핵시와 동일한 방법으로 실시하였고, 8세포기 수정란에서의 할구분리는 고정용 pipette으로 공핵란을 고정한 후 탈핵용 pipette으로 절개부위를 관통하여 할구를 분리하였다(Figs 6, 7).

핵이식은 공핵란으로부터 핵을 채취하여 탈핵용 pipette내에 간직한 채 수핵란으로 이동시켜, 수핵란의 탈핵시 만들어 두었던 투명대의 절개부위를 통해 pipette을 삽입한 후 조심스럽게 투명대와 세포질사이에 핵을 위치시켰다(Fig 8). 이러한 과정을 반복하여 핵이 주입된 5~10개 수정란을 작성하였고, 즉시 전기적 세포융합장치를 이용하여 이식된 핵과 세포질의 융합을 유도하였다.

3) 단일핵 2세포기 수정란의 작성 : 단일핵을 지닌 2세포기 수정란을 2가지 방법으로 작성하였다. 마우스 2세포기 수정란을 투명대 절개후 5 μ g/ml의 cytochalasin B와 0.1 μ g/ml의 colcemide가 포함된 BMOC-3액에서 20분간 전배양을 실시하였다. 탈핵을 위해 탈핵용 pipette을 삽입하여 한쪽 할구에서만 탈핵을 실시하여 두개의 할구중 하나의 할구만이 핵을 지닌 수정란을 작성하였다($\frac{1}{2}+C$). 또한 한쪽할구에서만 탈핵을 실시한 수정란을 전기적 세포융합시킨 수정란($\frac{1}{2}DC$)을 작성하였다. 두 가지로 작성된 단일핵을 지닌 2세포기 수정란을 체외배양하여 배반포기로의 발육률을 비교 조사하였다.

4) 전기적 세포융합 : 전기적 세포융합 장치(Eyela, Japan)를 이용하여 주입된 핵과 세포질의 융합을 유도하

었다. 세포융합 배지로 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 cytochalasin B와 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 colcemide가 포함된 BMO-C-3액을 사용하였으며, 세포융합은 실온에서 실시하였다. 세포융합배지로 petridish내에 미소적을 만들고 light white oil을 도포하여 도립현미경 하에 위치시켰다. 전기적 세포융합 장치의 두 전극(+, -)을 micromanipulator에 장착하여 핵이식 수정란의 양측에 전극을 위치시켰다. 수핵란의 할구 분할방향과 전류의 방향을 수직으로 되게 전극을 장착하였으며²⁾, 두 전극의 간격은 수정란의 크기와 동일하게 하였다(Fig 9). 전기적 세포융합은 각각 DC 1.0, 1.5 및 2.0kV/cm에서 100, 150 및 200 μsec 의 조건에서 실시하였으며, 1회 통전하여 세포융합을 유도하였다. 통전 1시간 후에 현미경하에서 검사하여 세포융합여부를 판정하였다(Fig 10). 세포융합이 완전히 이루어져 하나의 세포형태로 된 핵이식 수정란만을 선별하여 BMO-C-3액으로 수회 세정하고 CO₂ 배양기에서 배양하였다.

핵이식 수정란의 이식: 핵이식 수정란을 체내이식하기 위하여 ICR계 성숙(10~12주령) 암컷마우스를 과배란유기와 동일한 방법으로 PMSG와 hCG를 주사하여 수란마우스로 준비하였다. 수란마우스에 hCG 투여 직후 동계통의 정관절제마우스와 하룻밤을 동거시켜 다음 날 아침 질전 형성이 확인된 개체만을 수란마우스로 이용하였다.

핵이식 후 상실배 및 배반포까지 체외배양된 수정란은 3일전에 hCG를 처치하여 위임신된 수란마우스에 Rafferty³⁰⁾의 방법에 준해 경부를 절개하여 자궁을 노출시킨 후 끝이 예리한 침으로 혈관을 피해 자궁에 구멍을 만든 후 미세 pipette을 주입하여 자궁각당 3~10개의 수정란을 이식하였다. 이식 후 일부 수란마우스는 19일째에 경추탈구법으로도살하여 산자수 및 안구 주위색으로 표현형을 확인하였고, 일부는 산자를 생산하여 모색 및 안구검사에 의해 핵이식 후 표현형을 조사하였다(Fig 13).

통계학적 분석: 실험결과와 통계학적 유의성검정은 χ^2 -test를 이용하여 실시하였다.

결 과

마우스 2, 4 그리고 8세포기의 핵을 탈핵된 2세포기의 수핵란에 이식하여 핵이식 수정란을 작성시 cytochalasin B 및 colcemide의 전처리가 후기배로의 발육에 미치는 영향, 2세포기 단일핵 수정란의 배반포기로의 발육능, 다양한 조건에서의 전기적 세포융합 및 배반포로의 발육률, 공핵란의 발육단계에 따른 핵이식 수정란의 배반포기 도달시간 및 핵이식 수정란을 수란마우스에 이식하여 얻은 결과는 다음과 같다.

마우스 수정란의 cytochalasin B 및 colcemide 처리가 발육에 미치는 영향: 핵이식시 수정란의 세포질손상을 최소화하고 핵분열을 일시적으로 중지시키기 위해 사용되는 cytochalasin B(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 colcemide(0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)가 수정란의 체외발육에 미치는 영향을 알아본 결과 정상 투명대를 지닌 2세포기 수정란과 투명대를 절개한 2세포기 수정란을 cytochalasin B와 colcemide가 첨가된 배지에서 30분 및 60분간 전배양한 후의 배반포기로의 발육률은 각각 91.9와 90.6%로 나타나 대조군의 발육률(92.4%)와 유의차가 없었으며, 전배양시간에 따른 발육률의 차이도 발견할 수 없었다(Table 1).

투명대를 절개한 2세포기 마우스 수정란의 배반포로의 발육률은 90.8%로 관찰되어 정상 투명대를 지닌 수정란의 발육률 92.4%와 유사한 결과였다. 또한 투명대를 절개한 2세포기 수정란을 cytochalasin B와 colcemide가 첨가된 배지에서 30분 및 60분간 전배양한 결과는 각각 88.1과 90.0%의 발육률을 보여 대조군의 배반포기까지 발육률인 90.8%와 유사한 결과였으며, 배양시간에 따른 유의차는 인정되지 않았다. 정상 투명대를 지닌 수정란 및 투명대를 절개한 수정란을 cytochalasin B와 colcemide가 첨가된 배지에서 30 및 60분간 처리한 후 배반포기로의 발육률은 처리군간에 유의적인 차이가 없었다.

단일핵 2세포기 수정란의 발육능: 핵이식시 미세 조작에 의한 손상의 영향을 간접적으로 알아보고, 단일핵 2세포기 수정란의 발육능력을 알아보고자 2가지로 작성된 단일핵 2세포기 수정란을 체외배양한 결과는 다음과 같다(Table 2). 이들의 2세포기까지의 발육률은 각각 91.0 및 88.7%로 두 처리군간에 유의차는 인정되지 않았고, 상실배로의 발육률은 대조군에서 94.4%로 다른 두 처리군(79.1 및 77.5%)보다 유의적으로 높았으며($p < 0.01$) 배반포로의 발육률은 각각 91.1, 74.6 및 73.2%로 두 처리군에서 대조군보다 유의적으로 낮은 발육률을 보였다($p < 0.01$).

핵이식 수정란의 세포융합률 및 배반포로의 발육률:

1) 핵이식 수정란의 세포융합률: 탈핵된 2세포기 수정란을 수핵란으로 사용하여 2, 4 및 8세포기 수정란의 핵을 이식 후 100, 150 및 200 μsec 동안 DC 1.0, 1.5 및 2.0kV/cm를 통전하였을때의 세포융합률은 Table 3과 같다.

공핵란의 발육단계가 2세포기인 군에서 세포융합률은 DC 1.5kV/cm에서 100 및 150 μsec 처리군(93.9 및 95.2%)과 DC 2.0 kV/cm에서 100, 150 및 200 μsec 처리군(95.7, 95.3 및 95.0%)에서 DC 1.0kV/cm에서 100 및 150 μsec 통전군의 세포융합률인 83.0 및 85.0%보다

Table 1. Developmental potency of intact zona 2-cell embryos and zona cut 2-cell embryos in BMOC-3 solution supplemented with cytochalasin B and colcemide

Treated groups	Treated time (min)	Two cell embryos used	No. (%) of embryos developed to		
			4-cell	Morula	Blastocyst
Embryos with intact zona		170	164(96.5)	161(94.7)	157(92.4)
Cyto+Col	30*	160	153(95.6)	149(93.1)	147(91.9)
Cyto+Col	60**	160	155(96.9)	147(91.9)	145(90.6)
Embryos with cut zona		141	135(95.7)	131(92.9)	128(90.8)
Cyto+Col	30*	126	118(93.7)	113(89.7)	111(88.1)
Cyto+Col	60**	120	114(95.0)	110(91.7)	108(90.0)

* Cultured in medium supplemented with cytochalasin B(Cyto ; 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and colcemide(Col ; 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 30min.

** Cultured in medium supplemented with cytochalasin B(Cyto ; 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and colcemide(Col ; 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 60min.

There are no significant difference($p>0.05$) between the treated groups.

Table 2. *In vitro* development of mouse half embryos

Groups	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to		
		2-cell	Morula	Blastocyst
Control*	90	90(100)	85(94.4) ^a	82(91.1) ^a
1/2+C**	67	61(91.0)	53(79.1) ^b	50(74.6) ^b
1/2+DC***	71	63(88.7)	55(77.5) ^b	52(73.2) ^b

* Control : Intact 2-cell embryos.

** 1/2+C : A nucleus from a 2-cell embryo was removed.

*** 1/2 DC : The two nucleated and enucleated blastomeres of 2-cell embryos were induced to fuse by electric stimuli at DC 2.0 kV/cm and 100 μs ec field strength.

$p<0.01$ for a vs b.

Table 3. The fusion rate of nuclear transplanted mouse embryos received 2-cell to 8-cell stage nuclei with various DC voltage and duration of pulse

Voltage (kV/cm)	Duration of DC pulse(μsec)	No. of embryos fused/No. of embryos injected(%)		
		2-cell	stage of donor nuclei 4-cell	8-cell
1.0	100	83/100(83.0) ^{aA}	81/94 (86.2) ^{aA}	104/105(99.0) ^{adB}
	150	102/120(85.0) ^a	94/107(87.9) ^a	97/103(94.2) ^{ac}
	200	97/108(89.8)	101/110(91.8) ^a	87/97(89.7) ^c
1.5	100	124/132(93.9) ^b	109/116(94.0)	106/107(99.1) ^{ad}
	150	140/147(95.2) ^b	114/121(94.2)	98/101(97.0)
	200	121/130(93.1)	94/102(92.2)	112/119(94.1) ^{ac}
2.0	100	110/115(95.7) ^b	114/115(99.1) ^b	119/120(99.2) ^{ab}
	150	121/127(95.3) ^b	109/110(99.1) ^b	135/136(99.3) ^{bd}
	200	114/120(95.0) ^b	105/110(95.5)	119/121(98.3) ^{ad}

^{abcd} : Different superscripts denote significant difference within column($p<0.01$).

^{A,B} : Different superscripts denote significant difference between rows($p<0.01$).

유의적으로 높게 나타났다($p<0.01$).

공핵란의 발육단계가 4세포기인 군에서 세포융합률은 DC 2.0에서 100 및 150 μsec 처리군에서 두군 모두 99.1%를 보여 DC 1.0kV/cm에서 100, 150 및 200 μsec 통전시(86.2, 87.9 및 91.8%)보다 유의적으로 높았다($p<0.01$).

공핵란의 발육단계가 8세포기인 군에서 세포융합률은 DC 1.0kV/cm에서 100 μsec 통전시 99.0%를 보여

DC 1.0kV/cm에서 200 μsec 통전시 89.7%보다 유의적으로 높았으며($p<0.01$), DC 1.0에서 150 μsec 의 통전시에는 94.2%를 보여 DC 2.0 μsec 에서 150kV/cm 통전시의 99.3%보다 유의적으로 낮았다($p<0.01$). 한편 DC 1.0kV/cm에서 200 μsec 통전시에 세포융합률은 DC 1.0kV/cm에서 100 μsec 통전군, DC 1.5kV/cm에서 100 μsec 통전군, DC 2.0kV/cm에서 100, 150 및 200 μsec 통전군의 98.3~99.4%보다 유의적으로 낮은 89.7%

Table 4. *In vitro* development of fused embryos after stimuli of various DC voltage and duration with different stage of donor nuclei

DC voltage (kV/cm)	Duration of DC pulse(μ sec)	No. of embryos developed to blastocyst/ No. of fused embryos(%)		
		2-cell	4-cell	8-cell
1.0	100	41/ 83(49.4) ^{aA}	31/ 81(38.3) ^{aC}	27/104(26.0) ^{abdB}
	150	56/102(54.9) ^{aA}	37/ 94(39.4) ^{aC}	28/ 97(28.9) ^{abB}
	200	55/ 97(56.7) ^{aA}	44/101(43.6) ^a	33/ 87(37.9) ^{bcB}
1.5	100	59/124(47.6) ^{aA}	52/109(47.7) ^{aA}	33/106(31.1) ^{abB}
	150	69/140(49.3) ^a	50/114(43.9) ^a	39/ 98(39.8) ^{bc}
	200	61/121(50.4) ^{aA}	40/ 94(42.6) ^{aC}	36/112(32.1) ^{abcB}
2.0	100	69/110(62.7) ^{aA}	60/114(52.6) ^a	49/119(41.2) ^{cb}
	150	39/121(32.2) ^b	30/109(27.5) ^{bc}	29/135(21.5) ^{ad}
	200	30/114(26.3) ^b	23/105(21.9) ^{bd}	31/199(15.6) ^d

abc,d : Different superscripts denote significant difference within column(p<0.01).

A,B : Different superscripts denote significant difference between rows(p<0.01).

Table 5. The rate of enucleation and injection and the average number of used nuclei in the procedure of nuclear transplantation

Recipient cytoplasm	Donor nuclei	Average No. * of used nuclei	No. of enucleated embryos /used(%)	No. of injected embryos /enucleated(%)
Enucleated	2-cell	1.8	1156/1223(94.5)	1099/1156(95.1) ^a
2-cell	4-cell	3.4	1172/1245(94.1)	985/1172(84.0) ^b
	8-cell	6.5	1188/1266(93.8)	1009/1188(84.9) ^b

* : The average number of nucleus used from a donor embryo of 2-, 4- and 8-cell stages.
p<0.01 for a vs b.

Table 6. The rate of embryos developed to blastocyst and various intervals after nuclear transplantation

Recipient cytoplasm	Donor nuclei	No. of blastocysts at various intervals after nuclear transplantation(%)*			
		24hrs	48hrs	72hrs	96hrs
Enucleated	2-cell	0(0)	4(1.6)	215(87.4) ^a	246(100)
2-cell	4-cell	0(0)	2(1.0)	178(84.8)	210(100)
	8-cell	0(0)	2(1.2)	134(77.9) ^b	172(100)

* Blastocysts at various intervals of *in vitro* cultures per total number of blastocysts at the end of culture.
p<0.01 for a vs b.

Table 7. *In vitro* development of nuclear transplanted mouse embryos cultured in medium supplemented with epidermal growth factor(EGF)

Recipient cytoplasm	Donor nuclei	No. of embryos developed to blastocyst/No. of fused embryos(%)			
		Concentration of EGF in culture medium(ng/ml)			
		0	5	10	15
Enucleated	2-cell	69/110(62.7) ^a	52/85(61.2) ^a	57/90(63.3) ^a	60/ 94(63.8) ^a
2-cell	4-cell	60/115(52.2)	49/92(53.3)	49/89(55.1)	58/110(52.7)
	8-cell	49/120(40.8) ^b	45/108(41.7) ^b	38/84(45.2) ^b	45/102(44.1) ^b

* Electric fusion was performed at DC 2.0 kV/cm and duration of 100 μ sec.
p<0.01 for a vs b.

를 보였다(p<0.01). 또한 DC 1.5kV/cm에서 200 μ sec 통전시에 세포융합률은 94.1%를 나타내어 DC 2.0kV/cm에서 150 μ sec 통전시의 99.3%보다 유의적으로 낮았다(p<0.01).

동일한 전기적세포융합 조건에서 공핵란의 발육단계에 따른 세포융합률은 DC 1.0 kV/cm에서 100 μ sec 통전시에 공핵란의 발육단계가 8세포기인 경우에는 99.0%를 나타내어 2 및 4세포기(83.0 및 86.2%)보다 유의

Table 8. Production of offsprings after transfer of nuclear transplanted embryos in mouse

Recipient cytoplasm	Donor nuclei(%)	No. of pregnant/ No. of recipients	No. of offsprings/ No. of transferred blastocysts(%)
2-cell	2-cell	12/23(52.2) ^a	34/120(28.3) ^a
	4-cell	6/18(33.3)	18/80(22.5)
	8-cell	2/18(11.1) ^b	5/54(9.3) ^b

p<0.01 for a vs b.

적으로 높았다(p<0.01).

2) 핵이식 수정란의 배반포로의 발육률 : 핵이식 수정란의 세포융합시 직류전압, 통전시간 및 공핵수정란의 발육단계에 따른 배반포로의 발육률은 Table 4와 같다.

공핵란의 발육단계가 2세포기일 때 배반포기로의 발육률은 DC 1.0 및 1.5kV/cm의 모든 통전시간군과 DC 2.0kV/cm에서 100 μsec 통전군은 47.6~62.7%로 DC 2.0kV/cm에서 150 μsec 통전군의 32.2%와 DC 2.0kV/cm에서 200 μsec 통전군의 26.3%보다 유의적으로 높았다(p<0.01).

공핵란의 발육단계가 4세포기인 경우에 통전량 및 통전시간에 따른 배반포기로의 발육률의 차이는 공핵란의 발육단계가 2세포기인 경우의 성적과 유사한 경향을 나타내었다.

공핵란의 발육단계가 8세포기인 군에서의 배반포기로의 발육률은 DC 2.0kV/cm에서 200 μsec 통전군에서는 15.6%를 나타내어 DC 2.0 kV/cm에서 150 μsec 통전군을 제외한 다른 모든 군의 26.0~41.2%에 비해 유의적으로 낮았다(p<0.01). 또한 DC 2.0kV/cm에서 150 μsec 통전군은 21.5%의 배반포기로의 발육률을 나타내어 DC 1.0kV/cm에서 200 μsec 통전군, DC 1.5 kV/cm에서 150 μsec 및 DC 2.0 kV/cm에서 100 μsec 통전군의 각각 37.9, 39.8 및 41.2%보다 유의적으로 낮게 나타났다(p<0.01).

전기적 세포융합 조건이 DC 2.0 kV/cm에서 100 μsec 통전군과 DC 1.0 kV/cm에서 100 μsec 통전군의 배반포기로의 발육률은 각각 41.2와 26.0%로 나타나 DC 2.0 kV/cm에서 200 μsec 통전군에서의 15.6%보다 유의적으로 높은 결과였다(p<0.01).

동일한 전기적세포융합 조건에서 공핵란의 발육단계에 따른 세포융합 후 배반포기로의 발육률은 DC 1.0 kV/cm인 모든 통전군에서 8세포기의 핵을 이식한 군(26.0~37.9%)보다 2세포기의 핵을 이식한 군(49.4~56.7%)에서 유의적으로 높게 나타났으며(p<0.01), DC 1.5 kV/cm에서 200 μsec 통전군과 2.0에서 100 μsec 통전군에서도 8세포기의 핵을 이식한 경우(32.1 및

41.2%)보다 2세포기의 핵을 이식했을 경우(50.4 및 62.7%)에서 유의적으로 높았다(p<0.01). 전기적 세포융합 조건이 1.5에서 100인 경우에는 2 및 4세포기의 핵을 이식시에 배반포기로의 발육률은 47.6 및 47.7%로 나타나 8세포기의 핵을 이식시에 31.1%보다 유의적으로 높았다(p<0.01).

수핵란의 탈핵률, 핵이식률 및 공핵의 평균이용도 : 미리 투명대를 절개한 2세포기 수정란의 탈핵률은 93.8에서 94.5%를 나타내었다. 탈핵된 2세포기 수핵란으로의 핵이식률은 공핵란의 발육단계가 2, 4 및 8세포기에서 각각 95.1, 84.0 및 84.9%의 비율을 나타내어 탈핵된 2세포기 수핵란에 4 또는 8세포기의 핵을 이식하는 것보다 2세포기의 핵을 이식하는 것이 유의적으로 높은 성적을 나타내었다(p<0.01). 각 공핵란의 발육단계별 핵의 평균 이용도는 2세포기에서는 2개의 핵중 1.8개의 핵을, 4세포기에서는 4개의 핵중 3.4개의 핵을 그리고 8세포기에서는 8개중 6.5개의 핵을 이용할 수 있었다(Table 5).

핵이식 후 배반포기 도달시간 : 공핵란의 발육단계가 2, 4 그리고 8세포기인 핵을 탈핵된 2세포기의 수핵란에 이식하여 96시간동안 체외배양을 실시한 후 배반포강을 형성한 것을 기준으로 하였을 때 2, 4 및 8세포기의 핵을 이식하여 작성한 핵이식 수정란의 48시간 후 배반포로의 발육률은 각각 1.6, 1.0 및 1.2%로 나타나 체외배양 후 48시간까지의 공핵란의 발육단계에 따른 배반포기로의 발육시간에 차이는 없었다. 핵이식한 수정란을 72시간동안 체외배양 후 배반포기로의 발육률을 판정한 결과 2, 4 및 8세포기핵을 이식한 경우 각각 87.4, 84.8 및 77.9%가 배반포기로 발육하여 8세포기의 핵을 이식한 수정란에서 2세포기의 핵을 이식한 수정란보다 배반포기로의 발육률이 유의적으로 감소하였다(p<0.01), (Table 6).

상피성장인자 첨가가 핵이식수정란의 체외발육에 미치는 영향 : 핵이식 수정란의 체외배양시 배양액에 0, 5, 10 및 15 ng/ml의 상피성장인자를 첨가하여 체외발육에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다(Table 7). 공핵란의 발육단계가 2세포기인 핵이식 수정란은

체외배양시 배지에 0, 5, 10 그리고 15ng/ml의 상피성장 인자를 첨가하였을 때 배반포기로의 발육률은 각각 62.7, 61.2, 63.3 그리고 63.8%로 처리군에 따른 차이가 없었다. 마우스 4세포기의 핵을 이식한 핵이식 수정란의 배반포기로의 발육률은 각각 52.2, 53.3, 55.1 그리고 52.7%로 유의차는 인정할 수 없었다. 공핵란의 발육 단계가 8세포기인 핵이식 수정란의 배반포기로의 발육률은 각각 40.8, 41.7, 45.2 그리고 44.1%로 상피성장 인자 첨가농도에 따른 유의차가 인정되지 않았다. 또한 상피성장인자 첨가농도에 관계없이 공핵란의 발육 단계가 2세포기인 군보다 8세포기인 군에서 유의적으로 낮은 배반포기로의 발육률을 나타내었다($p < 0.01$).

핵이식 수정란의 이식에 의한 산자생산 : 체외에서 상실배 및 배반포기로 발육된 핵이식 수정란을 위임시킨 수란마우스에 이식하여 얻은 결과는 다음과 같다(Table 8). 마우스 2세포기 수정란 유래의 핵을 이식한 수정란을 수란마우스에 이식하였을 때 수란마우스중 52.2%가 수태되었고 이식된 수정란의 28.3%가 산자로 태어났다. 공핵란의 발육단계가 4세포기인 핵이식 수정란의 이식시 33.3%의 수란마우스가 수태하였고, 산자생산율은 22.5%였다. 마우스 8세포기 유래의 핵이식 수정란을 이식하여 11.1%의 수란마우스가 수태되었으며, 이식된 란중 9.3%가 산자로 태어났다. 수란마우스의 수태율은 8세포기 유래의 핵이식란(11.1%)보다 2세포기 유래의 핵이식란(52.2%)을 이식한 군에서 유의적으로 높았으며($p < 0.01$), 수란마우스에 이식한 핵이식 수정란에 대한 산자생산율은 2세포기유래 핵이식란(28.3%)에서 8세포기유래 핵이식란(9.3%)보다 유의적으로 높았다($p < 0.01$).

고 찰

마우스 수정란의 cytochalasin B 및 colcemide 처리가 발육에 미치는 영향 : 핵이식을 실시할 때 수정란에 가해지는 물리적 손상을 최소화하기 위해 cytochalasin B (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 colcemide (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)가 첨가된 배양액을 사용하는데 이들은 세포의 분열, 운동, 분비 그리고 형태의 변형을 억제하고, 세포질 골격을 이루는 세포체질계(cytoskeletal system)의 구성요소인 미세관다발(microtubules)의 모음(assembly)을 차단하여 미세주입시 세포질의 물리적 손상을 감소시키는 것으로 알려져 있다.⁵¹⁻⁵⁴ 본 실험에서 정상 투명대를 지닌 2세포기 수정란 및 투명대가 절개된 2세포기 수정란을 cytochalasin B와 colcemide가 첨가된 배지에서 30분 및 60분간 배양시 배반포기로의 발육률을 조사한 결과 대조군과 유의적인

차이가 없었다. 이는 배지에 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Cytochalasin B를 첨가하여 6시간 배양 후 배반포기로의 발육률은 대조군과 차이가 없었다는 보고^{52,55}와 일치하는 결과로서 cytochalasin B는 세포질 분열을 일시적으로 차단하며, 배지에서 제거되면 수정란은 1시간 후에 빠른 속도로 가역적인 효과가 나타난다는 주장⁵²과도 일치한다. 또한 colcemide는 tubulin에 결합하여 tubulin의 중합에 의한 microtubulin의 형성을 막아 세포분열을 차단하며, 배지에 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가하여 6시간⁵² 또는 12.5~14.5시간⁵⁶ 배양시 배반포기로의 발육률이 대조군에 비해 감소하였다고 보고되었다. 그러나 본 실험에서의 cytochalasin B와 colcemide의 일시적인 처리는 후기배로의 발육에 영향을 미치지 않았는데 이는 30~60분의 비교적 짧은 시간동안 처리했기 때문인 것으로 추정된다.

단일핵 2세포기 수정란의 발육능 : 마우스 단일핵 2세포기 수정란의 발육능과 미세조작의 영향을 알아보고자 2세포기의 일측할구에서 탈핵한 수정란과 일측할구를 탈핵후 전기적 세포융합을 실시한 수정란을 체외배양하여 배반포기로의 발육률을 관찰한 결과 두 처치군간의 차이는 없었으나 대조군에 비해 이들의 발육률은 감소하였다($p < 0.01$). 이는 Kono et al³⁴이 일측할구를 탈핵한 군과 이를 전기적으로 세포융합시킨 군에서 배반포기로의 발육률이 정상적인 2세포기 수정란과 차이가 없었다는 보고와는 상이한 결과를 나타내었다. 단일핵 2세포기 수정란의 발육능에 대해 Kono et al⁵⁷은 일측할구에서 탈핵을 실시하여 2세포기 수정란의 체외배양 후 전자현미경적 관찰에서 탈핵된 일측할구와 정상할구가 밀접하게 결합되어 있어 영양배양을 형성할 때까지도 그 결합이 존재함으로써 탈핵된 일측할구가 정상할구의 생존에 좋은 환경을 조성한다고 하였다. 그러나 이에 연관된 다른 연구결과는 접할 수 없었으며, 탈핵된 일측할구의 구체적인 기능에 관해서는 잘 알려져 있지 않다. 본 실험에서 두 처치군간에는 후기배로의 발육률이 유사한 결과를 보여 발육률에는 직접적인 영향을 미치지 않은 것으로 판단되나 이 두군에서는 발육률이 정상수정란보다 낮은 이유는 탈핵시 기계적인 조작에 의한 수정란의 손상에 기인되는 것으로 추정된다.

핵이식 수정란의 세포융합률 및 배반포로의 발육률 :

1) 핵이식 수정란의 세포융합률 : 세포융합 배지는 성숙난자를 수핵란으로 이용한 핵이식에서 배지에 첨가된 CaCl_2 와 MgSO_4 가 난자의 활성화에 도움을 준다는 장점이 있으며⁵⁸⁻⁶⁰, DC 전압의 통전에 앞서 융합하려는 세포의 배열을 위해서 교류(AC)전압이 이용될 때 열발생을 막기 위해 비전해질 세포융합배지의 사용은

필수적인 것으로 보고되어 왔다.⁶¹ 본 실험에 앞서 세포 융합 배지로 전해질(BMOC-3) 및 비전해질(0.3M mannitol)을 사용하여 핵이식 수정란의 세포융합률을 조사 하였으나 차이점은 인정되지 않았다. 이는 Kato와 Tsunoda⁶²의 마우스 2세포기란 할구의 전기적 세포융합시 융합배지로 전해질(PBS)과 비전해질(0.3 M mannitol)의 사용에 따른 세포융합률의 차이가 없었다는 연구와도 일치한다. 또한 기존의 전기적 세포융합장치가 두 전극을 일정한 간격으로 배치하고 그 사이에 수정란을 위치시키는데 비해 본 실험에 사용한 전기적 세포융합 장치는 두 전극을 융합하려는 핵이식 수정란의 투명대에 직접 접촉시켜 통전을 실시하는 장치이며, 직류전압만을 사용했기 때문에 융합배지에 따른 영향이 없었던 것으로 판단된다. 세포융합시 수정란의 할구와 전극의 방향에 따라 세포융합률의 차이가 있는 것으로 보고되어 Zimmermann과 Vienken⁶¹은 수정란을 전류방향에 대해 수정란의 분할방향이 수직이 되게 위치시키는 것이 전기자극에 의한 세포융합 개시에 유리하기 때문에 사각이나 평행으로 위치시키는 것보다 세포융합률 및 체외발육률이 증가한다고 하였으며 Kubiak와 Tarkowski²⁴는 전류방향과 수정란의 분할 방향이 평행 및 사각에서는 전혀 융합이 일어나지 않았다고 하였다. 따라서 본 실험에서는 수정란의 할구방향을 전류방향에 대해 수직으로 위치시켜 전기적 세포융합을 실시하였다. 본 실험에서는 전기적 세포융합배지로 전해질인 BMOC-3을 사용하였는데 미세조작 후 별도로 준비된 세포융합배지로 핵이식 수정란을 옮기지 않고 미세조작시와 동일한 배지에서 전기적 세포융합을 실시함으로써 실험과정을 간소화할 수 있었다.

본 실험에서는 전기적 세포융합장치를 이용하여 핵이식 후 83.0~99.3%의 높은 세포융합률을 얻었다. 이는 불활화한 HVJ를 이용하여 얻은 마우스 핵이식 후 세포융합률인 McGrath와 Solter¹⁸의 99%, Tsunoda et al⁶³의 84~97%, Kono et al⁶⁴의 91~93% 그리고 Park et al³⁸의 84.7~88.6%와 유사한 결과로 마우스 핵이식시에 전기적 세포융합술의 유용성이 입증되었다고 하겠다.

공핵란의 발육단계가 2 및 4세포기란의 경우에 100, 150 그리고 200 μ sec 동안 통전시 DC 1.0 kV/cm 보다 2.0 kV/cm의 군에서 유의적으로 높은 세포융합률을 나타내어 직류전압의 강도가 증가할수록 세포융합률이 증가하는 경향을 보였다. 이는 2세포기 할구를 전기적 세포융합시 1.0~2.0 kV/cm 및 100~200 μ sec의 전기자극을 주었을 때 세포융합률의 유의적인 차이가 없었으나, 1.0kV/cm와 100 μ sec의 처리군에서는 낮은 세포융합률

을 보였다는 Kato와 Tsunoda⁶²의 연구와 유사하였다. 또한 Ushijima와 Tsunoda³⁶는 탈핵된 접합체에 2 또는 8 세포기란의 핵을 이식 후 2.5~7.5V의 교류전압으로 할구를 융합에 적절한 위치로 유도하고 1.25 kV/cm의 직류전압을 100 μ sec 동안 2회 통전하여 76 및 51%의 세포융합률을 얻었다고 하였는데 이는 본 실험보다는 낮은 성적이었다. 이러한 결과는 수핵란의 발육단계 및 전기적 세포융합 조건이 본 실험과 상이했기 때문으로 추정되며, 탈핵된 마우스 2세포기란을 수핵란으로 사용하여 핵이식 후 전기적 세포융합을 실시한 보고를 집할 수 없어 직접 비교할 수는 없었다.

핵이식 후 전기적 세포융합시에 8세포기란을 공핵으로 사용한 군이 2세포기란의 핵을 공핵으로 사용한 군보다 높은 세포융합률을 나타내었다. 이는 핵이식시에 2세포기 공핵란 유래의 karyoplast보다 8세포기 공핵란 유래의 할구가 더 크기 때문에 전기자극시 핵과 세포질의 접촉면적이 넓어 세포융합이 용이하게 이루어진 것으로 사료된다.

2) 핵이식 수정란의 배반포로의 발육률 : 다양한 조건의 전기적 자극에 의한 세포융합 후 핵이식 수정란의 배반포로의 발육률은 공핵란의 발육단계가 2세포기인 경우에는 26.3~62.7% 범위였으며, 4세포기인 경우에는 21.9~52.6% 그리고 공핵란의 발육단계가 8세포기인 경우에는 15.6~41.2%의 범위로 나타나 각각의 전기자극조건에 따라 직접적으로 후기배로의 발육률에 영향을 미치는 것이 확인되었다. 또한 150 및 200 μ sec 처리군에서는 DC 1.0, 1.5 kV/cm보다 2.0 kV/cm군에서 유의적으로 낮은 배반포기로의 발육률을 보여 전압의 증가가 발육률에 직접적인 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이는 세포융합시 필요이상의 높은 전압이 가해져 비가역적인 세포질 변화가 일어났음을 의미하는 것으로 전기자극이 강하면 세포융합시 형성된 세공이 수복되지 않아 세포가 사멸한다는 보고⁶²와 일치하는 결과였다. 이에 비해 100 μ sec 처리군에서는 오히려 DC 1.0, 1.5 kV/cm보다 2.0 kV/cm의 군에서 높은 배반포기로의 발육률을 보여 100 μ sec 처리시 DC 1.0 및 1.5 kV/cm는 불충분한 세포융합이 이루어진 것으로 판명된다. 이상의 결과로 볼 때 전압이 증가하면 세포융합률은 높아졌으나 150 및 200 μ sec 처리시에는 전압이 증가함에 따라 DC 1.0 및 1.5 kV/cm 보다는 2.0 kV/cm에서 배반포로의 발육률이 현저히 감소하였으며, 공핵란의 발육단계가 2 및 4세포기인 경우에는 100 μ sec에서 2.0 kV/cm 처리시 가장 높은 배반포기로의 발육률을 나타내었고, 8세포기인 경우에는 100 μ sec 동안 2.0 kV/cm, 150 μ sec 동안 1.5 kV/cm 및 200 μ sec에서 1.0 kV/cm인 처리군

에서 배반포기로의 높은 발육률을 보여 이들 조건이 핵 이식시 적당한 전기자극 조건인 것으로 나타났다. 수핵란으로 탈핵된 접합체를 사용하고 HVJ를 매개로 세포 융합을 실시한 핵이식 수정란을 체외배양하였을 때 Tsunoda et al⁶³은 2, 4 그리고 8세포기의 핵을 이식시 2세포기의 핵을 이식한 수정란만이 7%의 배반포기로의 발육하였고, Ushijima와 Tsunoda³⁶는 2 또는 8세포기의 핵을 이식하여 각각 7 및 0%, Kono et al⁶⁴은 2, 4세포기의 핵 및 내세포기의 핵을 이식하여 각각 23.4 및 10%의 배반포기로의 발육률을 얻었다고 하였으며, Kono et al⁶⁵은 2세포기 후기의 핵을 이식하였을 때만 26%가 배반포기로 발육하였다고 보고하여 본 실험에서의 성적보다 낮게 나타났다. 이는 수핵란으로 접합체를 사용하여 공핵란과의 세포주기가 달랐기 때문인 것으로 추측된다. 탈핵된 2세포기란을 수핵란으로 이용하여 HVJ를 매개로 세포융합을 실시한 보고로서 Tsunoda et al⁴⁷은 4, 8세포기 그리고 내세포기의 핵을 이식시 72, 35 및 0%의 배반포기로의 발육률을 보고하여 본 실험과 유사한 수준이었으며, Robl et al⁶⁶은 2 및 8세포기의 핵을 이식하여 93 및 43%가 배반포기로 발육하였다고 하였고, Kono et al⁶⁷은 2 및 4세포기의 핵을 이식시 98 및 71%의 높은 발육률을 보고하였다. Robl et al⁶⁷은 B6D2 수정란의 세포질에 2세포기의 ICR 수정란의 핵을 이식시 63%, ICR 수정란의 세포질에 ICR×B6D2 2세포기 수정란의 핵을 이식시 100%가 배반포기로 발육하였다고 하였다. 이러한 결과는 공핵란의 발육단계가 2세포기인 군에서는 본 실험의 결과보다 높은 배반포기로의 발육률이었으나, 4 및 8세포기에서는 유사하였는데 이는 세포융합조건 및 미세조작의 차이에 의한 것으로 사료된다. 핵이식시 공핵란과 수핵란의 발육단계의 차이가 클 경우 핵이식후 후기배로의 발육률이 저하되었는데 그 이유는 이식된 핵의 발육단계가 진행될수록 수핵란의 세포질과 일치된 발육양상을 완벽하게 나타내지 못하기 때문인 것으로 사료된다.

수핵란의 탈핵률, 이식률 및 공핵의 평균이용도 : 본 실험에서는 2세포기 수정란을 수핵란으로 사용하기 위해 탈핵을 실시한 결과 93.8~94.5%의 수핵란을 준비할 수 있었으며, 이는 Park et al³⁸의 90.9~92.1%와 유사한 결과였다. 또한 공핵란의 발육단계가 2, 4 및 8세포기에서 각각 1.8, 3.4 그리고 6.5개의 핵을 이용할 수 있었는데 이러한 결과는 미리 투명대를 절개한 후 탈핵 및 핵주입을 실시했기 때문에 비교적 높은 효율을 얻을 수 있었던 것으로 생각된다. 공핵란의 이식률은 발육단계가 2세포기인 군에서는 95.1%를 보여 Park et al³⁸의 95.7% 및 박 등³⁷의 94.8%와 유사하였다. 그러나 4 및

8세포기의 핵을 이식시는 84.0 및 84.9%를 보여 Park et al³⁸의 93.6 및 92.3%보다 낮았는데 미세조작시 2세포기의 karyoplast 보다는 4세포기의 karyoplast 및 8세포기의 할구가 상대적으로 크기 때문에 탈핵된 2세포기에 주입시 그 성공률이 감소하였던 것으로 추측된다.

핵이식 후 배반포로의 도달시간 : 핵이식 수정란을 96시간동안 체외배양하여 배반포기로 도달한 것을 기준으로 하였을 때 핵이식 후 48시간에 배반포기로의 발육률은 공핵란의 발육단계에 관계없이 매우 낮았으며, 핵이식 실시후 72시간에 배반포로의 발육률은 공핵란의 발육단계가 2 및 4세포기인 군에서 유의적인 차이는 보이지 않았으나 8세포기의 핵을 이식한 군에서는 2세포기의 핵을 이식한 군보다 배반포로의 발육시간이 지연됨을 보였다($p < 0.01$). 이는 Barnes et al⁶⁸의 2 및 8세포기의 핵을 이식시 66시간후에 98 및 96%의 배반포기로의 발육률을 보였다는 보고와는 차이가 있었으나 2, 4 및 8세포기의 핵을 이식 후 72시간에 93.3, 91.9 및 88.0%의 발육률을 나타내어 8세포기의 핵을 이식시 발육률의 지연을 나타냈다는 박 등³⁷의 보고와 유사한 결과였다. 공핵란의 발육단계가 2 및 4세포기인 군에서는 발육률의 차이가 인정되지 않았지만 8세포기인 군에서 다소의 발육지연이 인정된 것은 수핵란과의 발육단계의 차이에 의한 것으로 추측되며, 이러한 결과로 볼 때 이식된 핵 보다는 세포질의 schedule에 의하여 배반포가 형성되는 것으로 생각된다.

상피성장인자 첨가가 핵이식수정란의 체외발육에 미치는 영향 : 핵이식 수정란을 상피성장인자가 첨가된 배지에서 배양시에 공핵란의 발육단계 및 첨가농도에 따른 유의차는 인정되지 않았다. 그러나 마우스 수정란내 상피성장인자 수용체의 분포에 있어 4세포기 이전까지는 모체 합성 유래로 미소하게 분포하며 4세포기 이후에는 수정란 합성 유래로의 상피성장인자 수용체로서 나타나 8세포기 이후 상당한 증가를 보이며, 이러한 상피성장인자 수용체는 paracrine 또는 autocrine 자극에 의해 발현되며^{43, 44}, 마우스 난구세포의 팽윤에 도움을 준다고 한다.⁴⁴ Paria와 Dey⁴⁰는 미소적에 1개의 2세포기 마우스 수정란을 배양하는 것보다 5~10개의 수정란을 군으로 배양시에 배반포기로의 발육이 현저히 높았다고 하였으며, 1개의 수정란을 상피성장인자 무첨가 배지에서 배양했을 때보다 1개 또는 다수의 수정란을 상피성장인자가 첨가된 배지에서 배양했을 때가 수정란의 hatching에 좋은 영향을 미쳤다고 하였다. 본 실험에서는 다수의 핵이식 수정란을 동일한 미소적내에서 배양했기 때문에 상피성장인자의 첨가가 발육률에 유의적인 영향은 미치지 않은 것으로 생각된다.

핵이식 수정란의 이식에 의한 산자생산: 핵이식 후 상실배 및 배반포기로 발육한 수정란을 위임된 수란 마우스에 이식할 때 공핵란의 발육단계가 2 및 4세포기에서는 각각 52.2 및 33.4%의 수태율을 보였으나 8세포기의 핵을 이식한 경우에는 11.1%로 매우 낮았다. 또한 산자생산율은 공핵란의 발육단계가 2, 4 및 8세포기일 때 28.3, 22.5 및 9.3%로 공핵란의 발육단계가 진행될수록 낮은 산자생산율을 보였다. Kono et al⁶⁴은 탈핵된 접합체에 2세포기의 핵을 이식하여 15%의 산자를 얻었으며, Tsunoda et al³⁹은 탈핵된 2세포기란에 4 및 8세포기란의 핵을 이식하여 각각 70 및 29%의 수태율을 그리고 22 및 8%의 산자를 생산하여 본 실험의 결과와 유사하였다. Kono et al⁵⁷은 탈핵된 2세포기란에 2세포기 및 4세포기의 핵을 이식하여 70 및 30%의 산자를 생산하여 본 실험보다 높은 성적이었다. 이처럼 공핵란의 발육단계가 진행될수록 산자생산이 저하되는 원인에 대하여 Robl et al⁵⁶은 탈핵된 2세포기 수핵란에 8세포기 수정란의 핵을 이식시 이식된 핵이 정상 2세포기 수정란에 존재하는 핵과 같은 기능의 핵으로 완벽한 변화를 이루지 못한다고 하였고, 8세포기의 핵을 이식한 핵이식 수정란을 체외배양시 2세포기의 핵을 이식한 핵이식 수정란보다 핵의 크기 및 할구수가 감소하였기 때문이라고 하였다. 본 실험에서 공핵란의 발육단계가 진행됨에 따른 산자생산율이 감소한 이유도 선인들의 보고와 일치하는 것으로서 미세조작 및 공핵과 수핵란과의 발육단계의 차이에 의해 핵이식후 개체발생에 충분한 후기배로의 발육이 이루어지지 않았기 때문인 것으로 추정된다.

결 론

마우스 수정란의 핵이식시에 보다 간편하고 우수한 수정란의 복제방법을 설정하고, 산업동물에 적용하여 핵이식 효율을 높일 수 있는 조건을 알아내고자 탈핵된 2세포기 수핵란에 2, 4 그리고 8세포기의 핵을 주입 후 다양한 전기적 세포융합에 의해 핵이식 수정란을 작성하였다. 핵이식 수정란의 세포질과 핵의 적당한 융합조건 및, 핵이식 수정란을 체외배양시에 발육률을 증진시킬 수 있는 조건을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 마우스 2세포기 수정란을 cytochalasin B(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 colcemide(0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)가 첨가된 배지에서 30 및 60분

간 처리는 후기배로의 발육에 영향을 미치지 않았으며 투명대 절개 후 동일한 처리시에도 영향은 없었다.

2. 마우스 2세포기 수정란에서 일측 할구를 탈핵한 군과 이를 전기적으로 세포융합한 군의 체외 배양시 이들의 배반포기로의 발육률은 각각 74.6 및 73.2%로 대조군(91.1%)에 비해 유의적으로 낮았다($p < 0.01$).

3. 핵이식 수정란의 전기적 세포융합시에 공핵란의 발육단계가 2세포기인 경우에는 DC 1.5 kV/cm에서 100 및 150 μsec 통전군, DC 2.0 kV/cm의 모든 통전군에서 DC 1.0 kV/cm에서 100 및 150 μsec 통전군보다 유의적으로 높은 세포융합률을 나타내었고($p < 0.01$), 4세포기인 경우에는 DC 2.0 kV/cm의 100 및 150 μsec 처리군에서 DC 1.0 kV/cm의 모든 통전군보다 유의적으로 높은 세포융합률을 나타내었으며($p < 0.01$), 공핵란의 발육단계가 8세포기인 경우에는 89.7~99.3%의 세포융합률을 보였다.

4. 핵이식 수정란의 배반포기로의 발육률은 공핵란의 발육단계가 2 및 4세포기인 경우에는 DC 1.0 및 1.5 kV/cm의 모든 통전군과 DC 2.0 kV/cm, 100 μsec 통전군에서 DC 2.0 kV/cm의 150 및 200 μsec 통전군보다 유의적으로 높았으며($p < 0.01$), 8세포기인 경우에는 DC 2.0 kV/cm, 100 μsec 통전군이 DC 1.0 kV/cm, 100 μsec 통전군과 DC 2.0 kV/cm, 150 및 200 μsec 통전군보다 유의적으로 높았다($p < 0.01$).

5. 핵이식후 배반포기로의 발육률은 공핵란의 발육단계가 8세포기보다는 2세포기일 때 더 높았다($p < 0.01$).

6. 탈핵된 2세포기 수핵란에 대한 핵 주입성공률은 공핵란의 발육단계가 4세포기(84.0%) 또는 8세포기(84.9%)보다는 2세포기(95.1%)일 때 더 높았다($p < 0.01$).

7. 핵이식 수정란의 배반포로의 도달시간은 8세포기의 핵을 이식했을 때가 2세포기의 핵을 이식했을 때보다 유의적으로 지연되었다($p < 0.01$).

8. 핵이식 수정란을 상피성장인자가 첨가된 배지에서 체외배양했을 때 첨가농도에 따른 발육률의 차이는 없었다.

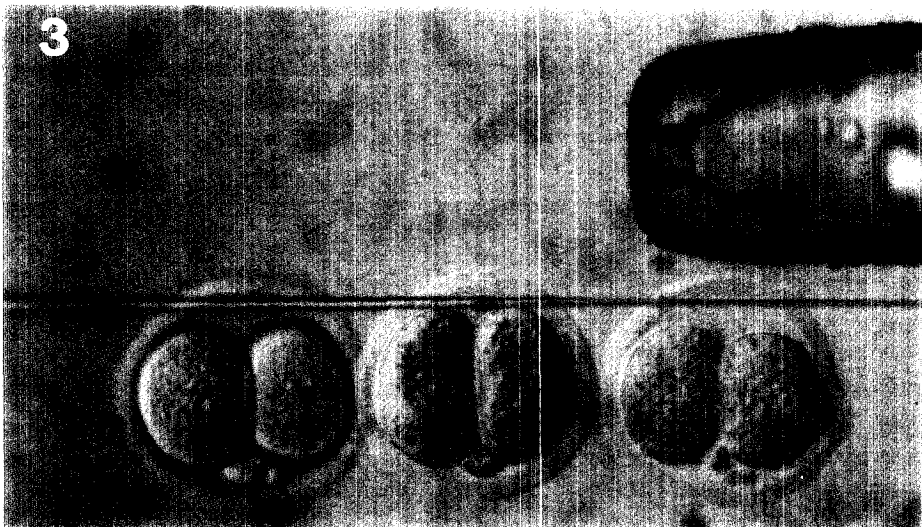
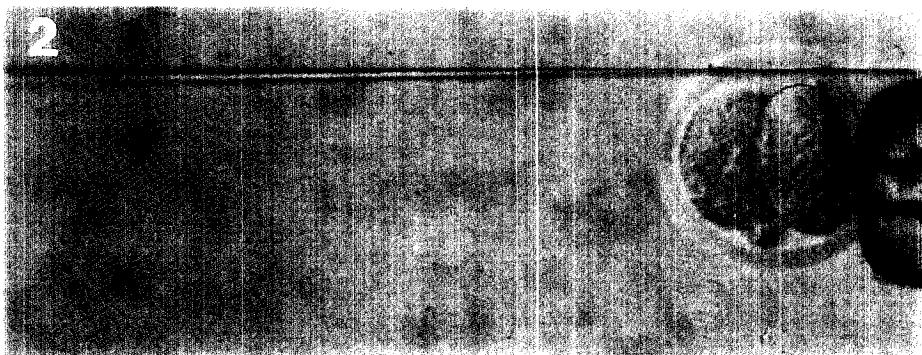
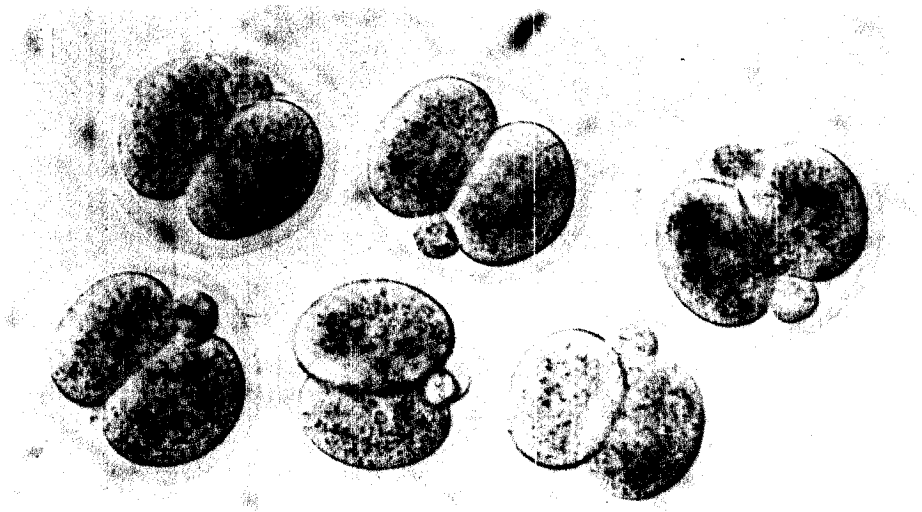
9. 핵이식 수정란을 이식시 산자생산율은 공핵란의 발육단계가 8세포기인 군보다는 2세포기인 군에서 유의적으로 높았다($p < 0.01$).

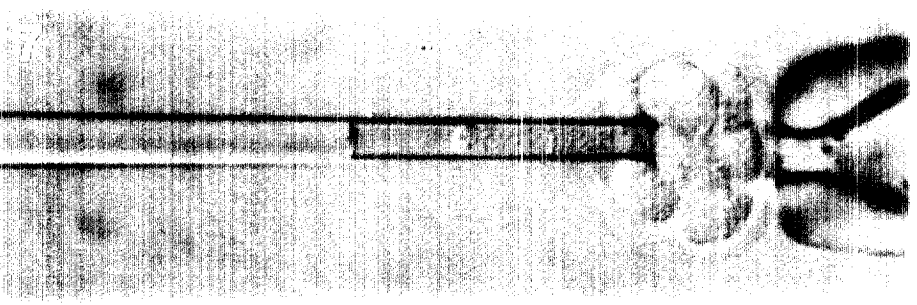
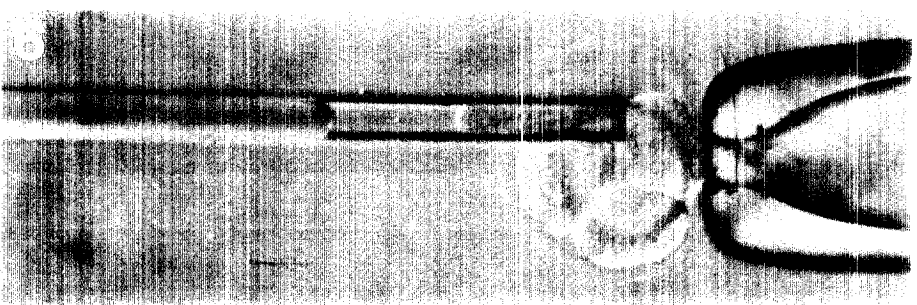
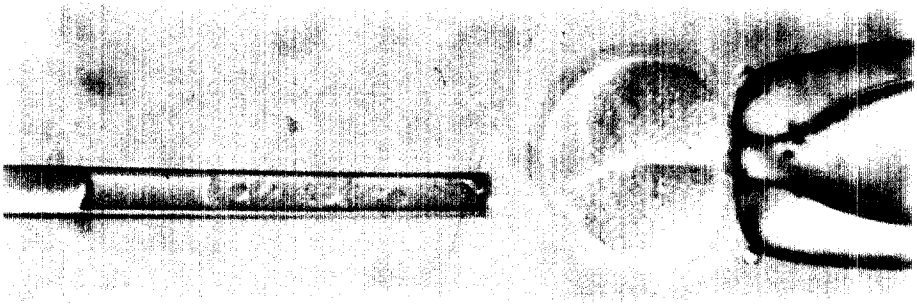
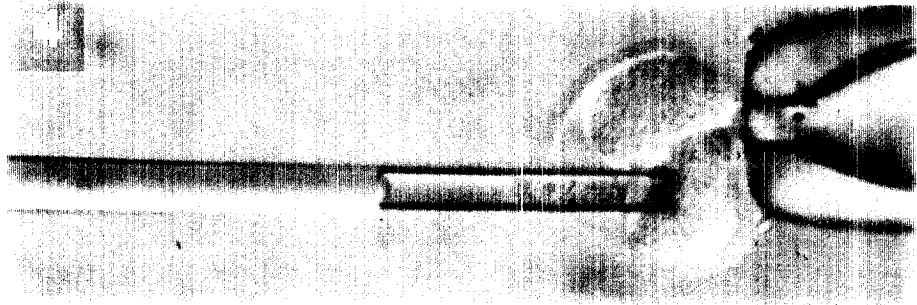
Legends for figures

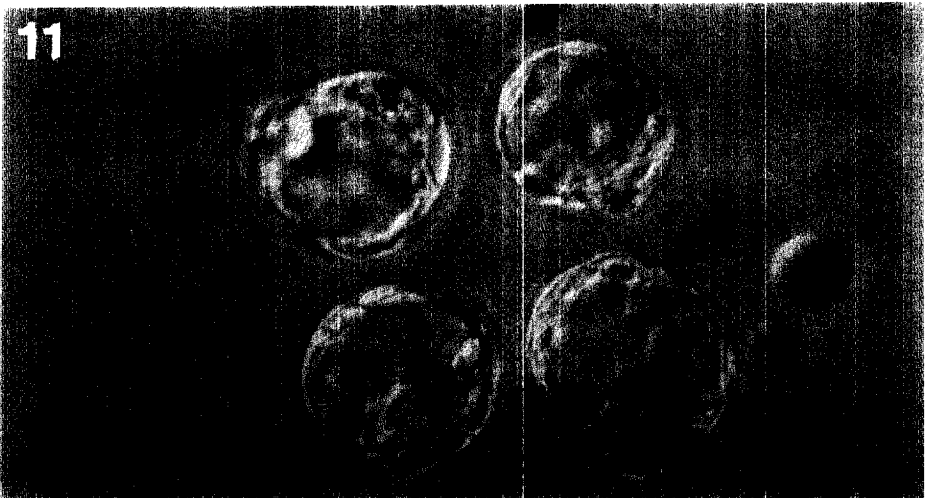
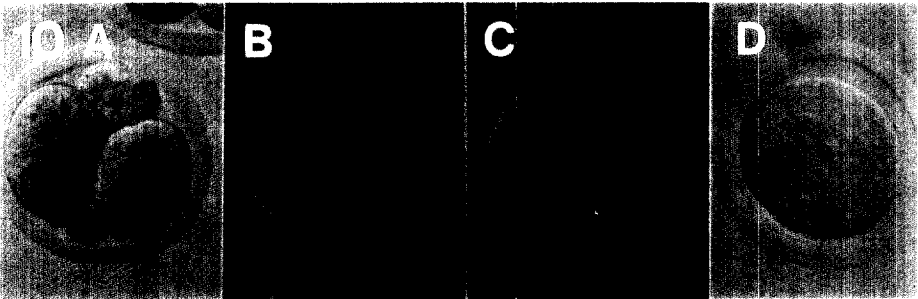
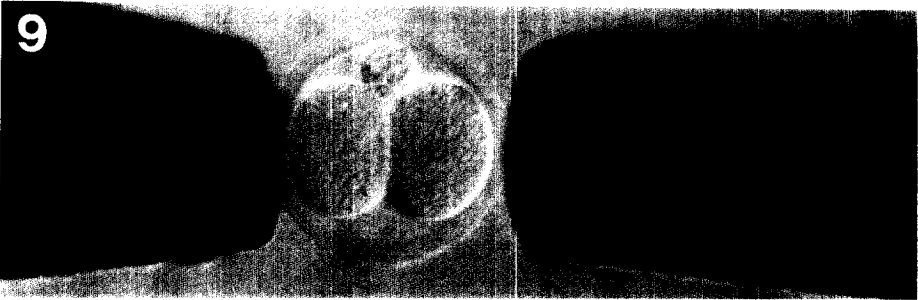
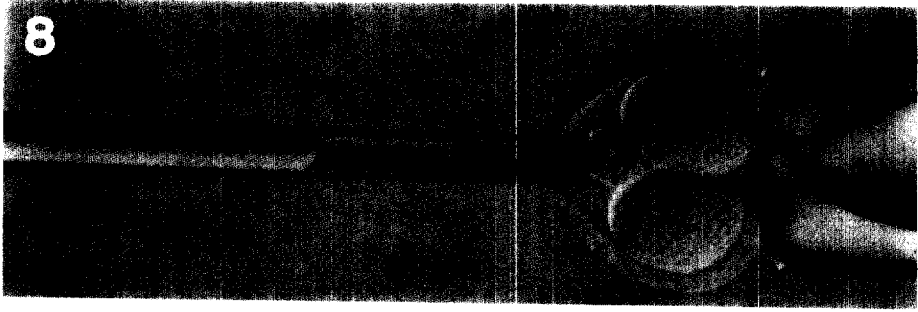
- Fig 1. CBA♀×ICR♂ 2-cell embryos were obtained after 42 hours of hCG injection. The cytoplasm is cloudy. ×250.
- Fig 2. A fine cutting pipette is inserted into the perivitelline space. ×250.
- Fig 3. A fine cutting pipette is rubbed against the wall of the holding pipette to tear the zona. ×250.
- Fig 4. Enucleation of a 2-cell embryo. The nucleus with a small volume of cytoplasm are drawn into the enucleation pipette. ×250.
- Fig 5. Enucleation of a 2-cell embryo. The nucleus with a small volume of cytoplasm is removed. ×250.
- Fig 6. Enucleation of a 4-cell embryo. The nucleus with a small volume of cytoplasm is drawn into the enucleation pipette. ×250.
- Fig 7. Enucleation of a 8-cell embryo. A blastomere drawn into the enucleation pipette from the embryo. ×250.
- Fig 8. Karyoplast injection into an enucleated 2-cell embryo.
The karyoplast was introduced into the perivitelline space. ×250.
- Fig 9. The nuclear transferred embryo for electrofusion is placed between the electrodes with the cleavage plane perpendicular to the direction of the electric field vector. ×250.
- Fig 10. An electro-fused nuclear transplanted embryo 0(A), 5(B), 15(C), and 60(D) minute after electric stimuli DC 2.0 kV/cm and 100 μsec field strength. ×250.
- Fig 11. Blastocysts developed from nuclear transplanted embryos. ×250.
- Fig 12. Donor mice : female CBA(left), female ICR(middle) and male ICR(right).
- Fig 13. Three offsprings(C & I) were obtained from a foster mother(M) after transfer of nuclear transplanted embryos.
C : nuclear donor embryo ; ICR♂×CBA♀, nuclear recipient embryo ; ICR
I : nuclear donor and recipient embryos ; ICR

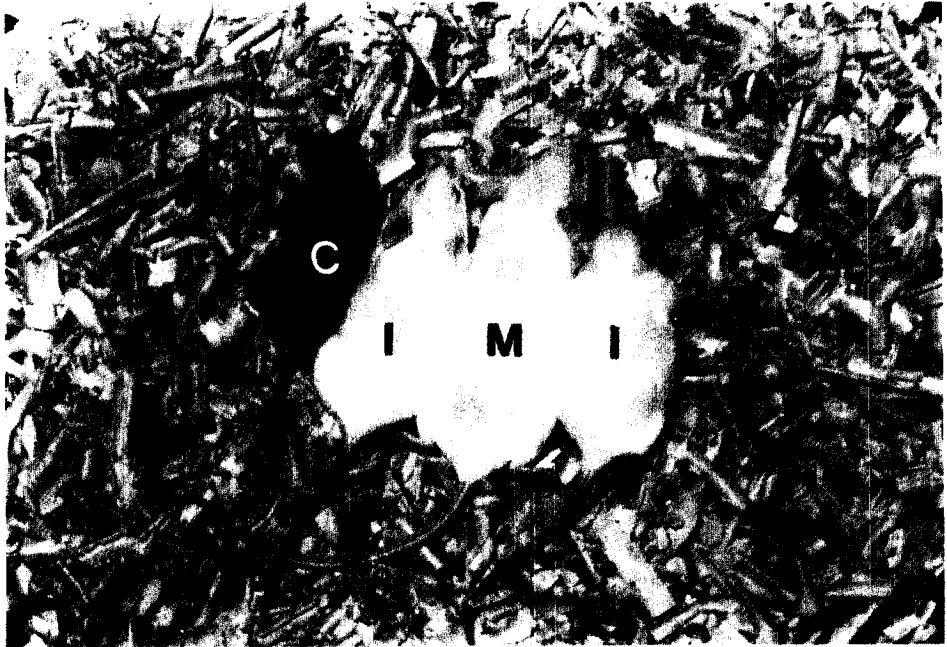
참 고 문 헌

- McLaren A. Methods and success of nuclear transplantation in mammals. *Nature* 1984 ; 21 : 671~672.
- Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE, et al. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 1985 ; 315 : 680~683.
- Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE, et al. Genetic engineering of mammalian embryos. *J Anim Sci* 1986 ; 63 : 269~278.
- Herr CM, Reed KC. Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. *Theriogenology* 1991 ; 35 : 45~54.
- Wilmot I, Hoopper ML, Simons JP. Genetic manipulation of mammals and its application in reproductive biology. *J Reprod Fert* 1991 ; 92 : 245~279.
- Yang X, Anderson GB. Micromanipulation of mammalian embryos : Principles, progress and future possibilities. *Theriogenology* 1992 ; 38 : 315~335.
- Nakamura K, Tsunoda Y. An analysis of *in vitro* 2-cell block by using pronuclear transplantation technique. *Jpn J Anim Reprod* 1987 ; 33 : 15~18.
- Nakamura K, Tsunoda Y. Chimaeras obtained by the nuclear transplantation technique in the mouse. *Jpn J Anim Reprod* 1987 ; 33 : 82~87.
- Robl JM, Prather R, Barnes F, et al. Nuclear transplantation in bovine embryos. *J Anim Sci* 1987 ; 64 : 642~647.
- Mann JR. Full term development of mouse eggs fertilized by a spermatozoon microinjected under the zona pellucida. *Biol Reprod* 1988 ; 38 : 1077~1083.
- Murray JD, Nancarrow CD, Marshall JT, et al. Production of transgenic merino sheep by microinjection of ovine metallothionein-ovine growth hormone fusion genes. *Reprod Fertil Dev* 1989 ; 1 : 147~155.
- Tokunaga T, Tsunoda Y. Establishment of the mouse embryonic stem cell lines from whole blastocysts and isolated inner cell masses. *Jpn J Anim Reprod* 1989 ; 35 : 173~178.
- Gordon JW, Gang I. Use of zona drilling for safe and effective biopsy of murine oocyte and embryos. *Biol Reprod* 1990 ; 42 : 869~876.
- Naar EM, Bartke A, Majumdar SS, et al. Fertility of transgenic female mice expressing bovine growth hormone or human growth hormone variant genes. *Biol Reprod* 1991 ; 45 : 178~187.
- Takeuchi K, Kaufmann RA, Sandow BA, et al. Pre-clinical models for human pre-embryo biopsy and









- genetic diagnosis. I. Efficiency and normalcy of mouse pre-embryo development after different biopsy techniques. *Fertil Steril* 1992 ; 57 : 425~430.
16. Walton JR, Murry JD, Marshall JT, et al. Zygote Viability in the Gene Transfer Experiments. *Biol Reprod* 1987 ; 37 : 957~967.
 17. Illmensee K, Hoppe PC. Nuclear transplantation in *Mus musculus* : Developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell* 1981 ; 23 : 9~18.
 18. McGrath J, Solter D. Nuclear transplantation in mouse embryos. *J Exp Zool* 1983 ; 228 : 355~362.
 19. McGrath J, Solter D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science* 1983 ; 220 : 1300~1302.
 20. Tsunoda Y, Yasui T, Nakamura K, et al. Effect of cutting the zona pellucida on the pronuclear transplantation in the mouse. *J Exp Zool* 1986 ; 240 : 119~125.
 21. Eglitis MA. Formation of tetraploid mouse blastocysts following blastomere fusion with polyethylene glycol. *J Exp Zool* 1980 ; 213 : 309~313.
 22. Spindle A. Polyethylene glycol-induced fusion of two-cell mouse embryo blastomeres. *Exp Cell Res* 1981 ; 131 : 465~470.
 23. Kono T, Tsunoda Y. Effects of induction current and other factors on large-scale electrofusion for pronuclear transplantation of mouse eggs. *Gamete Res* 1988 ; 19 : 349~357.
 24. Kubiak JZ, Tarkowski AK. Electrofusion of mouse blastomeres. *Exp Cell Res* 1985 ; 157 : 561~566.
 25. Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 1986 ; 320 : 63~65.
 26. Smith LC, Wilmot I. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vivo of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol Reprod* 1989 ; 40 : 1027~1035.
 27. Stice SL, Robl JM. Nuclear reprogramming in nuclear transplantation rabbit embryos. *Biol Reprod* 1988 ; 39 : 657~664.
 28. Prather RS, Barnes FL, Sims MM, et al. Nuclear Transplantation in the Bovine Embryo : Assessment of donor Nuclei and Recipient Oocyte. *Biol Reprod* 1987 ; 37 : 859~866.
 29. Prather RS, Sims MM, First NL. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol Reprod* 1989 ; 41 : 414~418.
 30. Nagashima H, Saito S, Yamakawa H. Development of porcine nuclear transplant embryos from 8~16 cell stage donor nuclei. *Theriogenology* 1992 ; 37 : 263 (Abst).
 31. Nagashima H, Yamakawa H, Saito S. Transplantation of porcine blastomere nuclei into oocytes collected from prepubertal gilts. *J Reprod Dev* 1992 ; 38 : 73~78.
 32. Prather RS, Sims MM, First NL. Nuclear Transplantation in the Pig Embryo : Nuclear Swelling. *J Exp Zool* 1990 ; 255 : 355~358.
 34. Kono T, Ogawa M, Ichinoe K, et al. Development of mouse half embryos produced by micromanipulation at two-cell stage. *Jpn J Anim Reprod* 1990 ; 36 : 164~170.
 35. Barra J, Renard JP. Diploid mouse embryos constructed at the late 2-cell stage from haploid parthenotes and androgenotes can develop to term. *Development* 1988 ; 102 : 773~779.
 36. Ushijima H, Tsunoda Y. Nuclear transplantation of 2- and 8-cell mouse embryos by electrofusion. *Jpn J Anim Reprod* 1989 ; 35 : 165~168.
 37. 박희성, 이효종, 최상용 등. 생쥐 수정란의 핵이식 후 체외발달에 관한 연구. 한국가축번식학회지 1990 ; 14 : 205~211.
 38. Park CS, Choe SY, Lee HJ, et al. Studies on nuclear transplantation in mouse embryos. II. Developmental potential of nuclei from embryos of different development stages. *Proc Mol Biol & Genet* 1990 ; 5 : 325~330.
 39. Tsunoda Y, Yasui T, Shioda Y, et al. Full-term development of mouse blastomere nuclei transplanted into enucleated two-cell embryos. *J Exp Zool* 1987 ; 242 : 147~151.
 40. Paria BC, Dey SK. Preimplantation embryo development *in vitro* : Cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 4756~4760.
 41. Rappolee D, Brenner CA, Schultz R, et al. Development expression of PDGF, TGF α and TGF β genes in preimplantation mouse embryos. *Science* 1988 ; 241 : 1823~1825.
 42. 황광남, 조충호. 랫트에서 상피성장인자에 관한 연구 - 특히 몇가지 생식현상과의 연관성에 대하여-. 서울대학교 수의대논문집 1991 ; 16 : 29~73.

43. Wiley LM, Wu JX, Harai I, et al. Epidermal growth factor receptor mRNA and protein increase after the four-cell preimplantation stage in murine development. *Dev Bio* 1992 ; 149 : 247~260.
44. Das K, Phipps WR, Hensleigh HC, et al. Epidermal growth factor in human follicular fluid stimulates mouse oocyte maturation in vitro. *Fertil Steril* 1992 ; 57 : 895~901.
45. Downs SM. Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and cumulus oophorus *in vitro*. *Biol Reprod* 1989 ; 41 : 371~379.
46. Brinster RL. Measuring embryonic enzyme activity. In : Daniel, J.C.Jr. *Methods in mammalian embryology* W.H. Freeman and Company, San Francisco, USA, 1971 ; 215~227.
47. Tsunoda Y, Tokunaga T, Ojubo Y, et al. Beneficial effect of agar for frozen storage of bisected embryos. *Theriogenology* 1987 ; 28 : 317~322.
48. 권오경. 생쥐 및 소초기배의 체외보존에 관한 연구. 한국임상수의학회지 1991 ; 8 : 103~108.
49. Abramczuk J, Solter D, Koprowski H. The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. *Dev Biol* 1977 ; 61 : 378~383.
50. Rafferty KA Jr. *Methods in experimental embryology of the mouse*. The Johns Hopkins Press, Baltimore and London, 1970 ; 42~50.
51. Carter SB. Effects of cytochalasins on mammalian cells. *Nature* 1967 ; 21 : 261~264.
52. Siracusa G, Whittingham DG, Defelici M. The effect of microtubule- and microfilament-disrupting drugs on preimplantation mouse embryos. *J Embryol exp Morph* 1980 ; 60 : 71~82.
53. Hume DA, Hansen K, Weidemann MJ, et al. Cytochalasin B inhibits lymphocyte transformation through its effects on glucose transport. *Nature* 1978 ; 272 : 359.
54. Yahara I, Harada F, Sekita S, et al. Correlation between effects of 24 different cytochalasins on cellular structures and cellular events and those on actin *in vitro*. *J Cell Biol* 1982 ; 92 : 69~78.
55. Modlinski JA. Preimplantation development of micro surgically obtained haploid and homozygous diploid mouse embryos and effects of pretreatment with cytochalasin B on enucleated eggs. *J Embryol exp Morph* 1980 ; 60 : 153~161.
56. Kato Y, Tsunoda Y. Synchronous division of mouse 2-cell embryos with nocodazole *in vitro*. *Theriogenology* 1992 ; 37 : 235(Abst).
57. Kono T, Tsunoda Y, Nakahara T. Production of identical twin and triplet mice by nuclear transplantation. *J Exp Zool* 1991 ; 257 : 214~219.
58. Collas P, Robl JM. Development of rabbit nuclear transplant embryos from morula and blastocyst stage donor nuclei. *Theriogenology* 1991 ; 35 : 190(Abst).
59. Collas P, Balise JJ, Robl JM. Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod* 1992 ; 46 : 492~500.
60. Collas P, Pinto-Correia C, Ponce De Leon FA, et al. Effect of donor cell cycle stage on chromatin and spindle morphology in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod* 1992 ; 46 : 501~511.
61. Zimmermann U, Vienken J. Electric field-induced cell-to-cell fusion. *J Membr Biol* 1982 ; 67 : 165~182.
62. Kato Y, Tsunoda Y. Blastomere fusion of mouse 2-cell embryos by electric stimulus. *Jpn J Anim Reprod* 1987 ; 33 : 19~26.
63. Tsunoda Y, Kato Y, Shioda Y. Electrofusion for the pronuclear transplantation of mouse eggs. *Gamete Res* 1987 ; 17 : 15~20.
64. Kono T, Kwon OY, Nakahara T. Development of enucleated mouse oocytes reconstituted with embryonic nuclei. *J Reprod Fert* 1991 ; 93 : 165~172.
65. Kono T, Kwon OY, Watanabe T, et al. Development of mouse enucleated oocytes receiving a nucleus from different stage of the second cell cycle. *Theriogenology* 1992 ; 37 : 239(Abst).
66. Robl JM, Gilligan B, Critser ES, et al. Nuclear transplantation in mouse embryos : Assessment of recipient cell stage. *Biol Reprod* 1986 ; 34 : 733~739.
67. Robl JM, Lohse-Heideman JK, First NL. Strain differences in early mouse embryo development *in vitro* : Role of the nucleus. *J Exp Zool* 1988 ; 247 : 251~256.
68. Barnes FL, Robl JM, First NL. Nuclear transplantation in mouse embryos : Assessment of nuclear function. *Biol Reprod* 1987 ; 36 : 1267~1274.