韓國受精卵移植學會誌(1994) 第 9 券 第 2 號
Korean J. Emb. Trans. (1994) Vol. 9, No. 2 pp. 161~165

핵이식에 의한 복제토끼 생산***

이효종 · 전병균* · 윤희준** · 이경미* · 송상현* · 공일근*
노규진 · 최민철 · 최상용 · 박충생*
경상대학교 수의학과

Production of Cloned Rabbits by Nuclear Transplantation

H. J. Lee, B. G. Jeon*, H. J. Yun, K. M. Lee*, S. H. Song*, I. K. Kong*, G. J. Rho, M. C. Choi, S. Y. Choe and C. S. Park***
Department of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

SUMMARY

This experiment was carried out to produce cloned animals by nuclear transplantation in rabbits. The ovulated oocytes were collected from the oviducts between 14 and 15 hours after hCG injection. The denuded oocytes were used as nuclear recipient cytoplasm following enucleation by micromanipulation. The blastomeres separated from the 8-cell embryos were used as nuclear donor. The enucleated oocytes receiving a blastomere in the perivitelline space were electrically fused in the 0.28 M mannitol solution at 1.5 kV/cm, 60 μsec for three times. The nuclear transplant embryos which were fused and developed to 2- to 4-cell stage in vitro were transferred into the oviducts of synchronized recipient does. A total of 64 nuclear transplant embryos were transferred to 7 recipient does and produced three offspring(4.7%) from a foster mother 31 days after embryo transfer.

Key words: cloning animal, nuclear transplantation, embryo transfer, rabbit

서 론

유전적으로 동일한 복제동물을 대량 생산하기 위한 기술의 개발은 경제적으로 유익한 가축을 위시한 각종 동물의 우량 유전자를 복제하고 선발하는데 매우 유리하며, 수정란 이식기술과 복제동물 생산기법을 병용하여 유전적 소질이 극히 우수한 수정란을 다량 확대 보급할 수 있다면 가축의 번식에 있어서 종래에 사용되어 오던 교배법이나 인공수정법에서 탈피하여 번식효율을 증진시키는데 새로운 전기를 마련할 수 있을 것이다. 특히 우리나라와 같이 우량 종축의 자원이 부족한 실정에서는 외국에서 값비싼 종축을 다량 수입하지 않고서도 짧은 기간에 종축을 증식 및 확보하는데 매우 효과적인 방법이다. 또한 복제동물은 정교한 동물실험에서 개체간의 차이를 줄일 수 있어서 정확한 결과를 얻는데 매우 유익하게 사용될 수 있을 뿐만 아니라 실험에 사용될 동물의 수도 줄일 수 있어서 적은 반복수로 정확한 정보를 얻는데 유익하며, 복제동물은 서로 간에 거부반응이 적으므로 장기이식 연구 등에도 이용될 수 있는 등 이용가치가 매우 높다.

* 경상대학교 축산학과(Department of Animal Science, Gyeongsang National University)
** 경상대학교 축산진흥연구소(Institute for Development of Livestock Production, Gyeongsang National University)
*** 이 연구는 1992년도 한국과학재단에서 지원한 특정기초연구 사업비로 연구되었음(KOSEF :92-24-00-10).

핵이식 기술에 의한 수정란의 cloning의 가능성은 1952년 Briggs와 King에 의하여 양서류에서 처음으로 시사되었다. 포유류에서는 Illmensee와 Hoppe(1981)가 처음으로 생쥐 수정란에 핵이식을 시도하여 산자생산에 성공함으로써 핵이식기법을 통한 복제동물생산에 관심이 집중되기 시작하였다.

가축에서는 Willadsen(1986)이 면양에서, Stice 등(1988)은 토끼에서 그리고 Prather 등(1987)은 소에서 그리고 Prather 등(1989)은 돼지에서 핵이식에 의한 산자생산에 성공하였다는 보고가 있다. 또한 최근 Willadsen 등(1991)은 소의 8- 내지 64-세포기의 핵을 이식하여 33.1%의 복제산자를 생산함으로써 핵이식기법에 의한 복제산자 생산효율이 향상되고 있다.

국내에서는 이 등(1989)이 처음으로 핵이식에 의한 생쥐 생산에 성공하였다는 보고가 있었고, 본 연구진도 1989년 이 기법으로 28마리의 핵치환된 신생자를 작출한 바가 있다(Choe et al., 1989). 그러나 토끼에 있어서는 아직도 국내에서 핵이식기법으로 복제동물을 생산하였다는 보고가 없다. 그리하여 본 연구는 토끼를 대상으로 핵이식을 실시하고 이들 핵이식된 수정란을 발정동기화된 수란토끼의 난관에 이식하여 복제토끼를 생산하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

본 실험은 Fig. 1에 나타난 바와 같은 과정으로 실시하였다. 각 단계별 세부과정을 상술하면 다음과 같다.

1. 공시동물 및 사양관리

본 실험에 사용된 공시동물은 New Zealand White 및 California종의 성숙된 토끼로서 연암축산원예전문대학으로 부터 공급받았으며 사용전에 분리 사육하였고 물과 사료는 자유로이 급식하였다.

2. 수핵난자의 확보

핵을 수여받을 난자는 이 등(1994)의 기술에 따라 과배란 처리한 다음 hCG 주사후 14~15시간에

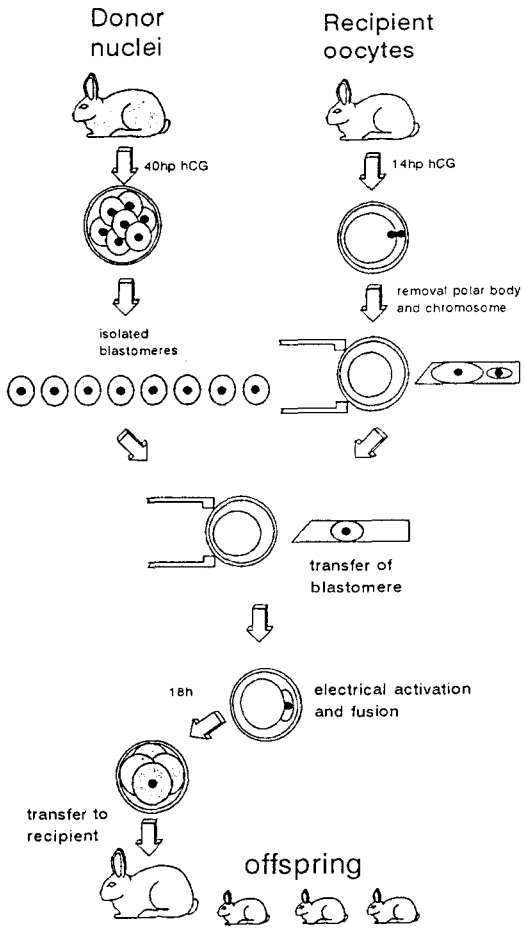

Fig. 1. Schematic procedure for the production of cloned rabbits by nuclear transplantation.

난관으로 부터 난자를 회수하고 난구세포를 제거하여 사용하였다.

3. 공핵수정란의 확보

핵을 공급할 수정란은 이 등(1994)의 기술에 따라 토끼를 과배란 처리하고 교미시킨 다음 hCG 주사로 부터 40시간후에 난관으로 부터 수정란을 회수하고 투명대를 제거시킨 다음 할구를 분리하여 사용하였다.

4. 미세조작에 의한 탈핵과 핵주입

수핵란의 탈핵을 위한 미세조작은 Stice와 Ro-

Table 1. Production of rabbit pups following transfer of nuclear transplant embryos

Trial no.	No. of embryos transferred*	Stage of NT embryos at transfer		Pregnant diagnosis	No. of offsprings (%, total)
		2-cell	4-cell		
1	9	9	0	−	0(0)
2	10	7	3	−	0(0)
3	7	5	2	−	0(0)
4	10	9	1	−	0(0)
5	6	6	0	−	0(0)
6	12	10	2	+	3(25.0)
7	10	10	0	−	0(0)
Total	64	54	10		3(4.7)

* All of the NT embryos developed to 2~4 cell stage at 18 hours following fusion were transferred into the oviduct of recipient rabbits.

bl(1988)의 방법에 준하여 실시하였다, 즉, 수핵난자와 공핵 수정란으로 부터 분리된 할구세포를 7.5 μg/ml의 cytochalasin B (Sigma Co., U. S. A.)와 10% FCS가 함유된 D-PBS에서 미세조작 15 분전에 전처리를 하였다. 미세조작을 위하여 micromanipulators (Narishige Co., Japan)를 Diaphot (DIC) 도립현미경(Nikon Co., Japan)위에 장치하였다. 탈핵은 McGrath와 Solter(1983)의 Non-distruptive 조작법에 의하여 실시하였다. 즉, 성숙된 난자로 부터 핵을 제거하기 위하여 30~35 μm의 연마된 미세 pipette을 투명대 내로 진입시키고 제 1 극체와 그 주위에 위치하는 핵을 원형질막에 싸여진 채로 흡입하여 제거하였다. 한편, 공핵수정란으로 부터 분리된 할구세포 하나를 미세 pipette에 흡입하고 이를 미세조작으로 탈핵된 수핵난자의 원형질 바깥 위란막강에 주입하였다.

5. 핵융합

핵이 주입된 난자는 Robl 등(1987)의 방법에 따라 핵융합을 실시하였다. 전기자극은 이 등(1993)의 융합조건에 따라 전압, 통전시간 및 통전횟수를 정하였다. 즉, 이들 난자를 100 μM $CaCl_2$ 및 $MgCl_2$가 함유된 0.28 M mannitol 용액으로 세척한 다음 paraffin oil이 덮여 있는 소적에 옮기고 electro cell manipulator(Eyela Co., Japan)에 장치되어 있는 두 전극 사이에서 hCG 투여 후 20시간째에 핵의 융합과 난자의 활성화를 유도하였다. 융합조건은 직류전류로서 전압을 1.5 kV/cm, 통전시간은 60 μsec로 3 반복 통전하였다.

6. 핵이식 수정란의 체외배양과 체내이식

융합이 확인된 수정란은 4-well dish에 10% FCS가 포함된 M-199 배양액에 옮겨 monolayer가 형성된 토끼난관상피세포와 같이 39℃의 5% CO_2 배양기내에서 공배양하였다.

핵이식 수정란의 체내이식은 핵의 융합후 18시간이 지난 다음 2-~4-세포기로 분열한 수정란을 발정동기화된 토끼의 난관으로 이식을 하였다. 수란토의 발정동기화는 이식 24시간 전에 자연발정이 온 토끼를 골라 정관결찰이 된 수토끼와 교미자극을 주었고 100 IU의 hCG를 주사하였다.

Fig. 2. Three rabbit pups produced from a foster mother after transfer of nuclear transplant embryos. One of them was lost due to cannibalism within a day after parturition.

결 과

미세조작된 핵이식 수정란을 핵융합 후 18시간 체외배양하여 2- 또는 4-세포기로 자란 것 64개를 7마리의 수란토에 체내이식을 한 결과 Table 1에 나타난 바와 같이 이식 후 31일에 1마리의 수란토에서 3마리(4.7%)의 복제산자를 생산하였다(Fig. 2 참조).

고 찰

토끼에서 핵이식된 수정란을 이식하여 산자생산에 성공한 예는 Stice 등(1988)에 의하여 최초로 보고되었다. 이들은 164개의 핵이식 수정란을 수란토끼에 이식하여 6마리(3.7%)의 산자를 생산하였다. Yang 등(1992)도 핵이식 후 2- ~ 4-세포기로 자란 수정란 243개를 15마리의 수란토끼에 이식하여 8마리(3%)의 산자를 생산하였다. 다른 동물종에 있어서는 Prather 등(1987)이 소에서 핵이식 기법으로 산자생산에 성공한 이래 Willadsen 등(1991)은 33.1%의 산자 생산 성공율을 얻었다. 돼지에서는 Prather 등(1989)이 12.6%의 산자생산율을, 양에서는 Smith 등(1989)이 4%의 산자 생산율을 얻고 있다.

아직도 핵이식 수정란으로 복제동물을 생산하는 성공율은 낮은 수준이며, 이는 체외에서의 탈핵과 핵주입 등 미세조작에 의한 수핵난자의 손상, 전기자극, 체외배양에서의 발달지연 및 체내이식시 수란축과의 동기화의 부적합 등 많은 기술적 어려움이 있기 때문이다.

DiBerardino (1980)은 양서류의 핵이식 수정란에서 핵이식 수정란의 초기 퇴화는 공핵란과 수핵란의 세포주기의 불일치때문이며 이러한 것은 핵물질의 비정상에 의한 것이라고 보고하였다. Collas 등(1991)은 토끼의 핵이식에서 성숙된 미수정란을 수핵란으로 사용할 때 난자는 공핵란을 재프로그램을 한다고 보고하였고, 이러한 재프로그램이 일어나면서 공핵란의 핵을 재조합한다고 하며, Collas 등(1992)은 공핵란의 세포분열 주기를 조절하여 분열이 완성된 다음 단일사슬의 DNA를 가지고 있는 상태인 G1의 세포주기에 공핵란의 할구를 핵이식했을 경우 71%의 높은 배반포로의 발달율을 얻었다. Barnes 등(1987)은 생쥐에서 1-세포기나 2-세포기의 공핵란으로 핵이식했을 경우에 이러한 공핵란의 발달단계가 중요한 것이 아니라 세포분열주기가 가장 중요한 요소라고 보고하였다. 또한 Kato 등(1993)은 만약 공핵란이 G1의 세포주기에 있다면 핵이식후 핵물질은 정상적인 핵형을 가질 것이라고 보고하였다.

앞으로 핵이식 수정란을 이식하여 산자의 생산율을 높이기 위해서는 핵이식 수정란에 물리적인 손상을 줄이고 정상적인 핵형을 가지는 수정란을 생산하는 방법 등 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

결 론

본 연구는 토끼에서 핵이식 기법으로 복제산자를 생산하기 위하여 실시되었다.

수핵란은 hCG 투여 후 13~15시간에 채란을 하였고, 공핵란은 hCG 투여 후 40시간에 채란을 하여 탈핵과 할구주입을 하고 난 다음 핵의 융합은 hCG 투여 후 20시간에 전기적 방법으로 실시하였다. 핵융합후 체외배양을 18시간 실시한 다음 2~4세포기로 자란 핵이식 수정란을 위임신된 토끼의 난관으로 이식을 하였다. 7마리의 수란토끼에 64개의 핵이식 수정란을 이식하여 1마리의 수란토끼에서 3마리의 복제산자를 생산하였다.

사 사

본 연구를 수행하는데 있어서 좋은 토끼를 착오없이 공급하여 준 연암원예축산전문대학과 토끼 사육에 협조하여준 본 대학교 부속동물사육장과 샛별농장에 감사드리며 아울러 micromanipulator system 이용에 도움을 준 공동실험실습관에 심심한 감사를 드립니다.

참고문헌

DiBerardino MA. 1980. Genetic stability and modulation of metazoan nuclei transplanted into eggs and oocytes. Differentiation 17:

17-30.

Barnes F, Collas P, Powell R, King WA, Westhusin M and Shepherd D. 1993. Influence of recipient oocyte cell cycle stage on DNA synthesis, Nuclear envelop breakdown, chromosome constitution and development in nuclear transplant bovine embryos. Mol. Reprod. Dev. 36:33-41.

Briggs R. and King TJ. 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog eggs. Proc Natl Acad Sci USA 38:455-463.

Choe SY, Park CS, Lee HJ and Park HS. 1989. Studies on nuclear transplantation in mouse embros. I. Functional differences between maternal and paternal genomes. Korean J. Vet. Res. 30:12-127.

Collas P and Robl JM. 1991. Relation between nuclear remodeling and development in nuclear transplant rabbit embryos. Biol. Reprod. 45:455-465.

Collas P, Balise JJ and Robl JM. 1992. Influence of cell stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. Biol. Reprod. 46:492-500.

Illmensee K, Hoppe PC. 1981. Nuclear transplantation in Musculus :Developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. Cell 23:9-18.

Kato Y and Tsunoda Y. 1993. Totipotency and pluripotency of embryonic nuclei in the mouse. Mol. Reprod. Dev. 36:276-278.

McGrath J. and Solter D. 1982. Nuclear transplantation of rat embryos. J. Exp. Zool. 248:303-305.

Prather RS, Barnes FL, Sims MM, Robl JM, Eyestone WH and First NL. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. Biol. Reprod. 37:859-866.

Prather RS, Sims MM and First NL. 1989. Nuclear transplantation in the early porcine embryo. Theriogenology 29:290(Abstr.).

Robl JM, Prather R, Eyestone W, Barners F, Northey D, Gilligan B, First NL. 1987. Nuclear transplantation in bovine embryos. Theriogenology 25:189(Abstr.).

Smith LC, and Wilmut I. 1989. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the early development in vivo of sheep embryos after nuclear transplantation. Bioi. Reprod. 40:1027-1035.

Stice SL. and Robl JM. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. Biol. Reprod. 39:657-664.

Willadsen SM, Janzen RE, McAlister RJ, Shea BF, Hamilton G, McDermand D. 1991. The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. Theriogenology 35:161(Abstr.).

Willadsen SM. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. Nature 320:63-65.

Yang X, Jiang S , Kov cs A and Foote RH. 1992. Nuclear totipotency of cultured rabbit morulae to support full-term development following nuclear transfer. Biol. Reprod. 47:636-643.

이철상, 박흠대, 정길생, 이경광. 1989. 핵치환 생쥐의 생산. 한축지 31:69-74.

이효종, 정미경, 전병균, 최민철, 최상용, 박충생. 1994. 토끼에서 난자의 성숙도가 전기융합 및 핵이식 수정란의 체외발달에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지 9:23-30.

이효종, 최민철, 최상용, 박충생, 윤창현, 강대진. 1993. 반복핵이식에 의한 복제동물 생산에 관한 연구. I. 토끼 수핵난자의 전기자극에 의한 활성화. 한국수정란이식학회지 8:151-154.