

반복핵이식에 의한 복제동물 생산에 관한 연구

II. 토끼에서 공핵배의 세포주기 조절에 의한

제2세대 복제배의 생산효율 개선[†]

이효종 · 전병균 · 박충생 · 최상용 · 윤창현 · 강대진

경상대학교 축산진흥연구소

Study on Production of Cloned Animals by Recycling Nuclear Transplantation

II. Improved Second Generation Cloning of Rabbit Embryos Using Donor Nuclei with Synchronized Cell Cycles*

H. J. Lee, B. G. Jeon, C. S. Park, S. Y. Choe, C. H. Yun and D. J. Kang

Institute for Development of Livestock Production, Gyeongsang National University

SUMMARY

Large scale production of cloned embryos requires the technology of multiple generation nuclear transplantation(NT) using NT embryos as the subsequent donor nuclei. The purposes of this study were producing the second generation cloned rabbit embryos, and also to determine the electrofusion rate and *in vitro* developmental potential comparatively in the cloned embryos of the first and second NT generation.

The embryos of 16-cell stage were collected from the mated does by flushing oviducts with Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS) containing 10% fetal calf serum(FCS) at 47 hours after hCG injection. In the first generation NT, the nuclear donor embryos were synchronized in the phase of G1/S transition of 32-cell stage. The first generation NT embryos which were developed to 8-cell were synchronized in G1/S transition phase of the following 16-cell stage and used as donor nuclei for second generation. Synchronization of the cell cycle of blastomeres was induced, first, using an inhibitor of microtubule polymerization, colcemid for 10 hours to arrest blastomeres in M phase, and secondly, using a DNA synthesis inhibitor, aphidicolin for 1.5 to 2 hours to arrest them in G1/S transition boundary. The recipient cytoplasm was obtained by removing the nucleus and the first polar body from the oocytes collected at 14 hours after hCG injection.

The separated donor blastomeres were injected into the enucleated recipient oocytes by micromanipulation and were electrofused by electrical stimulation of three pulses for 60 μ sec at 1.25 kV/cm in 0.28 M mannitol solution. The fused oocytes were co-cultured with a monolayer of rabbit oviductal epithelial cells in M-199 solution containing 10% FCS for 120 hours at 39°C in a 5% CO₂ incubator. Following *in vitro* culture of the first and second generation cloned embryos to blastocyst stage, they were stained with Hoechst 33342 dye for

[†] 이 논문은 1991년도 교육부 지원 한국학술진흥재단의 대학부설연구소 지원 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

counting the number of blastomeres by fluorescence microscopy. The results obtained were summarized as follows:

1. The electrofusion rate was found to be similar as 79.4 and 91.5% in the first and second generation NT rabbit embryos, respectively.
2. The *in vitro* developmental potential to blastocyst stage of the second generation NT embryos(23.3%) was found significantly($p < 0.05$) lower, compared with that of the first generation NT embryos(56.8%).
3. The mean blastomeres counts of embryos developed to blastocyst stage following *in vitro* culture for 120 hours and also their daily cell cycles during the culture period were decreased significantly($p < 0.05$) to 104.3 cells and 1.33 cycles in the second NT generation, compared with 210.4 cells and 1.54 cycles in the first NT generation, respectively.

Key word : nuclear transfer, second generation cloning, electrofusion, rabbit embryo

서 론

유전적으로 동일한 동물을 생산하기 위한 하나의 수단으로서 수정란의 양분(embryo bisection)에 의한 일란성 쌍태 생산이 연구되어 왔으나, 이러한 기법으로는 하나의 수정란으로 부터 복제할 수 있는 산자의 수는 2 내지 4마리를 벗어날 수 없는 한계가 있다. 반면, 핵이식 기술은 전능성이 있는 수정란의 할구세포 또는 이들의 핵을 탈핵된 다른 난자 또는 초기의 수정란에 이식하는 기술으로서 수십 내지 수백개의 복제수정란을 작출할 수 있으므로 수정란의 양분법의 한계를 벗어날 수 있다. 나아가서 우량 유전자를 가진 가축의 수정란을 공핵란으로 사용하여 핵이식을 실시하고 발생시킨 다음 이를 공핵배로 재사용하는 반복핵이식 기법을 응용하면 종축의 선발강도의 극대화, 동일한 성 및 유전자 조성을 가진 복제동물의 대량생산 등을 가능케 하여 가축의 육종에 있어서 새로운 전기를 마련하게 될 것이다.

가축에서 Willadsen(1986)이 면양에서 산자를 보고한 이래 포유동물에서 핵이식은 지난 10여년 동안 눈부신 발전을 이루어 왔다. 그러나 핵이식 기술은 아직 효율이 낮은 상태이고, 후기배 즉 배반포로의 발달을뿐만 아니라 핵이식 배의 이식 후 산자의 생산 성공률도 낮은 실정이라서 산업적으로 응용할 수 있는 단계에는 도달하지 못하고 있다. 최근에 핵

이식을 실시하는데 있어서 핵막붕괴, 염색체의 조기 농축, 핵막의 팽창 등 핵의 remodeling에 영향을 줄 뿐만 아니라, DNA합성, 염색체과 미세관 형성 등에 매우 많은 영향을 줌으로써 정상적인 핵형의 유지에 핵을 공급하는 공핵배의 세포주기와 핵을 수여받는 수핵난자의 세포주기 조절이 중요하다고 한다(Collas 등, 1992 ; Barnes, 1993 ; Pinto-correia 등, 1993). 나아가서 핵의 세포주기를 조절함으로써 핵이식 수정란의 체외발달 성적도 향상될 수 있다고 한다(Collas 등, 1992).

반복핵이식은 1990년 Bondioli 등이 소의 성숙된 난자에 16- 및 64-세포기의 핵을 이식하고 체내에서 발달시킨 다음 이를 다시 반복핵이식으로 92마리의 신생자를 생산하였으며 이중 7마리가 유전적으로 동일한 복제산자였다고 보고하였다. 또한 Stice 등(1991)도 소의 32-에서 64-세포기의 핵을 3세대까지 반복이식하는데 성공하였다는 보고가 있었고, Westhusin 등(1991)도 반복핵이식을 한 바 있다. 더군다나 Stice와 Keefer(1993)는 소에서 제3세대 핵이식 수정란을 이식하여 산자의 생산에 성공하였다고 보고하였다. 앞으로 핵이식 수정란을 핵의 공급원으로 재사용하는 반복핵이식기법을 응용하면 우량 유전자를 가지는 수정란을 기하급수적으로 증가시킬 수 있을 것이다. 국내에서는 박 등(1993)이 생쥐에서 제2세대 핵이식에 의한 25마리의 복제산자를 보고하고 있다. 토끼에서도 박 등(1993)은 제2세대 핵이식에 의한 복제배를 생산한 바 있으나 배반포

로의 발달율이 매우 낮았다.

이러한 견지에서 본 실험에서는 토끼를 모델로 하여 복제동물 생산효율의 향상을 위한 복제수정란의 정상발생에 최적하도록 공핵배의 세포주기를 조절하고, 제2세대 복제수정란의 생산 기법을 개발하며, 반복핵이식에서 얻는 복제수정란의 핵융합율과 체외발달능력을 비교 규명하고자 한다.

재료 및 방법

1. 공시동물 및 사양관리

본 실험에 사용된 공시동물은 New Zealand White 종의 성숙된 토끼로서 연암원예축산전문대학으로부터 공급받았으며 사용전에 분리 사육하였고 물과 사료는 자유로이 급식하였다.

2. 수핵난자의 확보

핵을 수여받을 난자의 확보를 위한 과배란 유기는 성숙한 암토끼를 10 mg의 FSH(Folltropin, Australia)를 하루에 한번 3일 동안 피하주사하고, 마지막 투여 12시간 후 hCG(Peamax, Japan)를 100 IU를 정맥주사하였다. 수핵난자는 hCG 주사 후 13~15시간에 암토끼를 chlorpromazine HCl과 ketamine HCl로 전신마취한 다음 개복수술하여 난관으로 부터 성숙난자를 10% FCS가 함유된 D-PBS로 회수하였다. 회수된 난자는 300 IU/ml의 hyaluronidase(Sigma)에서 39°C, 5% CO₂조건에서 7분간 배양한 다음, 150 μ m fire-polished pipette으로 난구세포를 제거하여 제1극체가 명확하고 세포질이 충실한 것만을 사용하였다.

3. 공핵수정란의 확보

핵을 수핵난자에 공급할 수정란의 과배란 유기는 전항 2항과 같이 과배란을 유기한 다음 성숙된 수토끼와 교미시켰다. 16-세포기에 있는 수정란은 hCG 주사 후 47시간째에 채란하였다. 수정란은 0.5%의 pronase(Sigma)에서 8분간 배양한 다음 150 μ m 정도의 pipette으로 투명대를 제거하고 이들을 다시 50 μ m 정도의 pipette으로 Ca²⁺와 Mg²⁺가 없는 PBS에서 할구를 분리하였다. 또한 제2세대 핵이식을 위한 공핵란은 제1세대 핵이식으로 발생한 8-세

포기의 핵이식 수정란을 사용하였다. 제1세대 핵이식 수정란은 0.5%의 pronase에 2 분간 처리한 다음 앞의 기술과 같이 할구를 분리하여 미세조작에 사용하였다.

4. 공핵수정란 할구의 세포주기 조절

할구의 G1/S 세포주기를 동기화하는 방법은 Collas 등(1992)의 방법을 따랐다. 즉, 0.5 μ g/ml의 microtubule 중합 저해제인 colcemid(Gibco, U.S. A.)가 포함된 vitreous humor(VH)에서 10시간 배양으로 분열의 중기에 정지시킨 다음 DNA 합성 저해제인 0.1 μ g/ml의 aphidicolin(Sigma)을 포함한 VH에서 1.5~2시간 동안 배양하여, 다음 세포기로 발달한 G1/S기의 할구를 사용하였다. 또한, 미세조작도 aphidicolin이 함유된 배양액에서 실시하였고, 미세조작 후 핵의 융합때까지 aphidicolin이 함유된 배양액에서 배양하였다. Colcemid와 aphidicolin은 2 mg/ml이 되게 PBS와 DMSO에 각각 녹인 후 -10°C에 저장하여 사용하였다.

5. 미세조작에 의한 탈핵과 핵주입

수핵란의 탈핵을 위한 미세조작은 Stice와 Robl(1988), 그리고 Collas와 Robl(1990)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 수핵난자와 공핵수정란으로 부터 분리된 할구세포를 7.5 μ g/ml의 cytochalasin B (Sigma), 0.1 μ g/ml의 aphidicolin 그리고 10% FCS가 함유된 Earl's balanced salt solution(EBS-S, Sigma)에서 미세조작 15 분전에 전처리를 하였고, 미세조작을 위하여 미세조작기(Narishige Co., Japan)를 DIC 도립현미경 (Nikon Co., Japan)위에 장치하였다. 미세조작 또한, 7.5 μ g/ml의 cytochalasin B (Sigma), 0.1 μ g/ml의 aphidicolin 그리고 10% FCS가 함유된 EBSS에서 실시하였고, 탈핵은 McGrath와 Solter(1983)의 비파괴적 조작법에 의하여 실시하였다. 즉, 성숙된 난자로 부터 핵을 제거하기 위하여 외경 30 μ m의 연마된 미세 pipette을 투명대 내로 진입시키고 제1극체와 그 주위에 위치하는 핵을 원형질막에 싸여진 채로 흡입하여 제거하였다. 한편, 공핵수정란으로 부터 분리된 할구세포 하나를 미세 pipette에 흡입하고 이를 미세조작으로 탈핵된 수핵난자의 원형질 바깥 위관막

막강에 주입하였다. G1/S기에 있는 핵이 주입된 난자는 aphidicolin이 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 포함된 VH에서 미세조작 후 핵의 융합때까지 배양하였다. 미세조작 및 세포주기 조절을 위한 배양액은 사전에 미리 평형된 기본배양액에서 사용하기 바로 직전에 만들어 사용하였다.

6. 핵의 융합과 난자의 활성화

핵이 주입된 난자는 이 등(1993)의 방법에 따라 핵융합을 실시하였다. 전기자극은 전압은 1.25 kV/cm, 통전시간은 60 μsec 및 통전횟수는 3회로 정하였다. 융합과 난자의 활성화를 위한 용액은 100 μM CaCl₂ 및 MgCl₂가 함유된 0.28 M mannitol 용액으로, 할구가 이식된 난자를 이 용액으로 세척한 다음 paraffin oil이 덮여 있는 소적에 옮기고 electro cell manipulator (Eyela Co., Japan)에 장치되어 있는 두 전극 사이에서 핵의 융합과 난자의 활성화를 유도하였다. 그리고 난자와 할구의 융합 및 난자의 활성화는 hCG 주입 후 20시간에 전기자극으로 유도하였다. 이를 aphidicolin이 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 포함한 0.28 M mannitol에서 premature chromosome condensation(PCC)가 일어나는 동안 DNA의 합성을 막기 위하여 20분 동안 배양하였고, 난자의 세포질과 핵의 융합이 확인된 난자는 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 cytochalasin B와 10% FCS가 함유된 M-199 (Earl's salt, Sigma)에서 1시간 동안 배양한 다음 10% FCS가 함유된 M-199에서 체외배양을 하였다.

7. 핵이식 수정란 체외배양, 염색 및 할구수 조사

노 등(1994)의 기술에 따라 융합이 확인된 수정란은 4-well dish에 10% FCS가 포함된 M-199 배양액에 옮겨 monolayer가 형성된 토끼난관상피세포와 같이 39°C의 5% CO₂ 배양기내에서 120 시간 공배양하였다. 모든 기본 배양액은 배양하기 12시간에서 24시간 전에 incubator에서 배양을 하여 pH의 균형을 유도하였다.

배양기간 동안 이들 핵이식 수정란의 배반포 형성율을 조사하였고, 핵융합 후 120 시간째에 Pursel 등(1985)의 방법에 따라 Hoechst 33342로서 핵염색을 실시하여 할구수를 조사하였다.

8. 통계학적 분석

실험결과는 Chi-square test 및 Student t-test를 실시하여 평균간에 차이에 대한 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 제1세대 및 제2세대 핵이식 수정란의 핵융합 효과

제1세대 및 제2세대 핵이식 수정란의 핵융합율을 조사한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다.

제1세대 및 제2세대 핵이식 수정란에서 각각 79.4 및 91.5%의 핵융합율을 보였다. 핵융합율에 있어서는 세대간 서로 유의적인 차이는 나타내지 않았지만, 제1세대에서 제2세대의 핵이식 수정란보다 다소 낮은 융합율을 보이고 있는데 이러한 차이는 제1세대 핵이식에서는 공핵란을 32-세포기의 할구를 사용한 반면 제2세대 핵이식에서는 공핵란의 할구는 16-세포기의 할구를 사용한데서 기인하였다고 사료된다. 박 등(1994)은 32-세포기의 할구에서 79%의 융합율을 보였고, 16-세포기의 할구에서 89.3%의 융합율을 보고하였는데 본 실험도 비슷한 융합율을 나타내고 있다.

Yang 등(1990)은 토끼에서 핵의 공급원으로 8-에서 32-세포기까지의 할구들을 이용하여 탈핵된 수핵난자에 주입하고 교류전류로서 핵이식 난자를 정렬한 다음 2.4 kV/cm, 60 μsec 의 직류전류로 융합 자극을 주었던 바 그 효율은 63~66%의 범위를 보였다. 이는 본 실험에서의 79.4, 및 91.5%에 비하여 다소 낮은 성적이었다. Collas 와 Robl(1991)은

Table 1. Electrofusion rate of the first and second generation NT rabbit embryos

Generation of NT embryos	No. of embryos used	No. of embryos fused	Fusion rate(%)
1st	45	37	79.4 ^a
2nd	47	43	91.5 ^a

* The values with same superscripts in the column are not significantly different ($p < 0.05$).

Table 2. Development *in vitro* of the first and second generation NT rabbit embryos

Generation of NT embryos	No. of embryos cultured	No. & (%) of embryos developed to			
		2-cell	4-cell	Morula	Blastocyst
1st	37	31(83.8)	28(80.8)	27(72.9)	21(56.8) ^a
2nd	43	32(76.2)	23(53.5)	21(48.8)	10(23.3) ^b

* The values with different superscripts in the column are significantly different ($p < 0.05$).

8- 및 32-세포기 할구를 탈핵된 수핵난자에 핵이식한 다음 2.0 kV/cm 전압에서 60 μ sec 간 30분 간격으로 6회 전기자극으로 핵융합을 일으켰던 바 그 융합율이 모두 100%이었다. 이들은 본 실험에서의 1.25 kV/cm보다 높은 전압을 주었고, 통전횟수도 3회보다 많은 회수를 응용하였다.

반복핵이식에서 Stice와 Keefer(1993)은 제1세대, 제2세대 및 제3세대 소 핵이식 수정란의 융합율은 각각 66, 60 및 52%로 세대간에 융합율의 차이를 보인다고 보고하였으나 Westhusin 등(1991) 및 박 등(1993)은 유의적인 차이를 나타내지 않았다고 한다.

이와 같이 각 연구보고마다 융합율의 차이를 보고하고 있으나, 위의 결과에서 제1세대 및 제2세대 핵이식에 따른 핵융합율의 비교에 있어서는 유의할 만한 차이를 인지할 수 없었다.

2. 제1세대 및 제2세대 핵이식 수정란의 체외발달 능력

공핵란으로서 체내발달된 수정란과 제1세대 핵이식 수정란을 이용하여 제1세대 및 제2세대 핵이식 수정란을 작출하고 이들의 체외발달율을 조사한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같다.

제1세대 및 제2세대 핵이식 수정란의 배반포 형성율은 각각 56.8 및 23.3%로 유의적인($P < 0.05$) 차이를 나타내었다.

제1세대 핵이식 수정란의 발달율에서 Collas 등(1992)는 공핵란의 세포분열 주기를 조절하여 DNA를 복제하기 전의 기간인 G1의 세포주기에 공핵란의 할구를 핵이식했을 경우 71%의 높은 배반포로의 발달율을 얻었으나 본 실험에서는 다소 낮은 발달율을 보이고 있다. Barnes 등(1987)은 생쥐에서 1-세포기나 2-세포기의 공핵란으로 핵이식했을 경우에 이러한 공핵란의 발달단계가 중요한 것

이 아니라 세포분열주기가 가장 중요한 요소라고 보고하였다. 또한 Kato 등(1993)은 만약 공핵란이 G1의 세포주기에 있다면 핵이식후 핵물질은 정상적인 핵형을 가질 것이라고 보고하였다. 또한 박 등(1993)이 토끼에서 제2세대 핵이식 수정란의 발달율에서 9.7%를 보고하였으나 본 실험에서 공핵란의 세포주기 조절에 의하여 핵이식 수정란의 발달율이 증진됨을 관찰하였다.

본 실험에서는 핵이식 수정란의 발달이 2-세포기와 상실배에서 발달이 지연되는 경우가 많았다. 이러한 이유는 비정상적인 핵형이나 DNA를 가지기 때문이라고 생각되므로 이에 관한 연구가 더 필요하다고 본다. 토끼에서 수정란의 유전자가 활동을 하는 시기는 2-세포기 부터 시작을 한다고 한다(Cotton 등, 1980). 이러한 이유에서 비정상적인 핵형이나 DNA를 소유한 핵이식 수정란은 이 발달단계에서 발달이 지연될 것이다. 또한, Fischer 등(1990)은 발달지연은 상실배보다 상실배에서 배반포기로 발달할 때 더 현저하다고 보고하였다.

소의 반복 핵이식에서 Bondioli 등(1990), Westhusin 등(1991) 및 Stice와 Keefer(1993)은 세대간 핵이식 수정란의 체외발달에서 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, Stice와 Keefer(1993)은 산자의 생산율에서 제1세대, 제2세대 및 제3세대간에 10, 2, 3%로 각 세대간에 차이를 보이고 있다.

제1세대 핵이식 수정란에서 핵형 및 DNA가 비정상상이 일어났다면 이들에게서 분리한 할구세포들을 핵의 공급원으로 재사용한 제2세대 핵이식 수정란에서는 전부가 핵형 및 DNA가 비정상상이 될 수 있으며, 제2세대 공핵란으로 사용하는 제1세대 핵이식 수정란은 미세조작에 의한 물리적 손상과 세포주기 조절에 사용하는 cytochalasin B, colcemid 및 aphidicolin 등에 과도하게 노출됨으로써 화학적 손상을 입게 된다. 이러한 결과는 제2세대 핵이식 수

Table 3. Blastomere counts and daily cell cycles of blastocysts following *in vitro* culture for 120 hours of the first and second generation NT rabbit embryos*

Generation of NT embryos	No. of embryos stained	No. of blastomeres	No. of cell cycles /day
1st	10	210.4 ± 9.6 ^a	1.54 ± 0.01 ^a
2nd	8	104.3 ± 10.3 ^b	1.33 ± 0.03 ^b

* Mean ± SEM. The values with different superscripts in the column are significantly different ($p < 0.05$).

정란의 체외발달율을 감소시키는 결과를 가져온 것이라고 사료된다. Pinto-correia 등(1995)도 이러한 물질들은 발달에 장애가 될 수 있다고 보고하였다.

3. 제1세대 및 제2세대 핵이식 수정란의 체외배양 기간 할구수와 세포분열주기 비교

핵의 융합후 120시간에 배반포기의 제1세대 및 제2세대 핵이식 수정란을 Hoechst 33342로서 핵염색을 하여 핵의 수를 조사함으로써 핵이식 배의 체외발달 능력을 비교검토하였던 결과는 Table 3에 나타난 바와 같다.

위의 결과에서 제1세대 및 제2세대 핵이식 수정란을 120 시간동안 배양으로 할구들의 수가 210개 및 104개로 제2세대 핵이식 수정란에서 1회의 세포주기가 지연되어 할구의 수에서 유의적인 차이를 나타내었으며 1일 동안 핵이식 수정란의 평균 세포분열주기는 1.54회 및 1.34회이었다. Stice와 Ro-

bl(1988)은 토끼의 8-세포기 수정란의 할구를 이용하여 핵이식 한 다음 120시간 배양하였을 때 세포의 수는 91 ± 10.2 개 였다고 하였는데 본 실험에서는 120시간 배양하여서 평균 세포수는 210.4 ± 30.4 로 본 실험에서 보다 빠른 분할이 일어났다. 노 등(1994)은 hCG 주사와 교미후 24시간에 회수된 1-또는 2-세포기의 토끼 수정란을 토끼난관상피세포와 같이 M-199 배양액에서 72시간 배양하였던 배핵의 수가 216.0 ± 33.6 개로 발달되었다고 한다. 본 실험에서는 제1세대 핵이식 수정란을 120시간 공배양하였더니 핵의 수는 210개로 다소 정상 수정란보다 지연되었고 더군다나 제2세대 핵이식 수정란의 체외발달 능력은 제1세대 및 정상 수정란보다 더욱 늦어짐을 관찰하였다. Yang 등(1992)이 체외배양하지 않은 수정란과 20시간 동안 체외배양한 수정란 그리고 핵이식 수정란의 산자로의 생산율은 41, 20 그리고 8%를 보고한 것처럼 이러한 것은 체내의

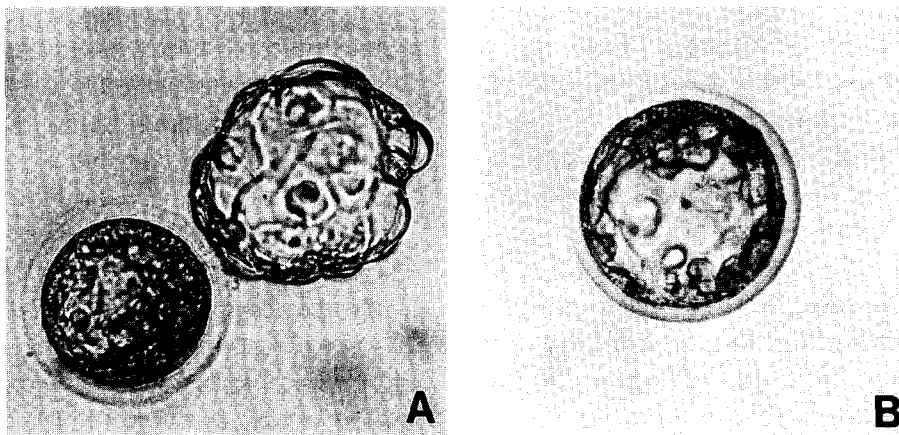


Fig. 1. Blastocyst stage NT rabbit embryos from the first(A) and second(B) generation cloning ($\times 100$). A shows a hatching-like extrusion of partial cell mass through the zona pellucida aperture for micromanipulation.

조건과 부적당한 체외배양의 조건 때문에 발달지연이 나타나는 것을 알 수 있다. 또한 핵이식시 난자와 할구에게 물리적 손상을 주는 것으로 사려되며, Northey 등(1991)은 소에서 수정 전에 난자 세포질의 제거는 할구수의 감소를 가져온다고 보고하였다. Fisher(1987)는 체외배양한 수정란의 단백질 합성량의 측정으로 발달능력을 조사한 결과 체내에서 자란 수정란보다 발달이 지연되는 것을 알아 내었고, Schumacher 등(1988)과 Bedford 등(1989)은 토끼의 수정란에서 가시광선은 DNA의 손상을 주고 25℃의 실온에 노출되었을 때 세포내 기관의 이동과 세포골격에 손상을 주어 발달이 지연된다는 것을 보고하였다. 그러나 소에서는 Stice와 Keef-er(1991)는 세대가 진행될수록 핵이식 수정란의 할구수에 있어서 차이를 나타내지 않았다고 한다.

또한, Fig. 1에서 보는 바와 같이 토끼는 다른 동물보다 짧은 세포주기를 가지므로 120시간 동안의 배양으로 할구수가 더 많이 증가된다. 본 실험에서 제1세대 핵이식 수정란은 120 시간동안 체외배양으로 핵이식시 손상된 투명대 부분으로 부화하는 경우가 많았으나 제2세대 핵이식 수정란은 부화되는 경우는 드물었다.

적 요

본 연구는 반복핵이식에 의한 복제배의 생산효율을 조사하기 위하여 제1세대 및 제2세대 복제배의 핵융합 및 체외발달 능력을 조사하였다. 과배란 시킨 토끼의 난관으로 부터 16-세포기의 수정란을 채란하여 colcemid와 aphidicolin으로 할구의 세포주기를 G1/S 기로 조절한 32-세포기의 할구세포를 분리하여 제1세대의 공핵란으로 사용하였다. 제1세대 핵이식 후 8-세포기로 자란 수정란을 역시 colcemid와 aphidicolin으로 세포주기를 G1/S기로 조절한 16-세포기의 할구세포를 분리하여 제2세대 핵이식의 공핵란으로 사용하였다. 이들 분리된 할구세포를 제1극체와 핵을 제거한 난자의 위란막강에 미세조작으로 주입하였다. 할구세포가 주입된 난자는 hCG 주사로 부터 20시간에 직류전류로서 1.25 kV/cm, 60 μ sec를 3회 반복 통전하였던 바, 제1세대 및 제2세대 할구세포는 각각 79.4 및 91.

5%의 융합율을 보여 유의적인 차이를 나타내지 아니하였다. 이들 융합된 핵이식 난자는 10% FCS가 함유된 M-199 배양액에서 토끼 난관 상피세포층과 같이 5% CO₂, 39℃ 배양기에서 120시간 공배양하였던 바, 이들의 배반포 형성율은 제1세대 및 제2세대 핵이식 수정란에서 56.8 및 23.3%를 보였다. 그리고 이들 배반포를 Hoechst 33342로서 핵염색을 실시하여 보았던 바 제2세대 및 제2세대 핵이식 수정란의 할구수는 210.4개 및 104.3개로서 유의적인 차이를 보였으며, 또한 24시간의 평균 분열주기 회수는 제1세대 및 제2세대 핵이식 수정란에서 각각 1.54 및 1.33회로 제2세대 핵이식 수정란에서 120시간의 체외배양기간 동안에 1회 정도의 세포분열주기가 지연되었으며 유의적으로 할구수의 차이를 나타내었다. 이상의 결과로 부터 토끼에서도 반복핵이식 기법의 활용으로 다세대 핵이식 수정란의 작출이 가능함을 확인하였다. 그러나 토끼에서는 제1세대 및 제2세대 핵이식 수정란에서 체외발달 능력면에서는 차이가 있음이 확인되었다.

참고문헌

- Barnes FL, Robl JM and First NL. 1987. Nuclear transplantation in mouse embryos : Assessment of nuclear function. Biol Reprod. 36:1267-1274.
- Barnes F, Cilas 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.
- Bedford JM and Dobrenis A. 1989. Light exposure of oocytes and pregnancy rates after their transfer in the rabbit. J. Reprod. Fert. 85:477-481.
- Bondioli KR, Westhusin ME and Loomey CR. 1990. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. Theriogenology 33:165-174.

bryos but requires the utilization of pluripotent embryonic stem cells or ES cells. ES cells can be cultured for prolonged periods of time without loss of pluripotentiality and as a result it is possible to genetically transform the cells in culture, identify the cell containing the desired modification, and reintroduce them into a host blastocyst. Due to its pluripotentiality, the ES cells are capable of interacting with the inner cells mass cells of the host blastocyst to form a chimera containing tissues derived from the transgenic ES cell. The problem with this technique is that to date, the isolation of ES cells from cattle has not been possible. While some progress has been made, and cell lines derived from the inner cell mass of bovine embryos have been established (Stice *et al.*, 1994; Strelchenko and Stice, 1994; Evans *et al.*, 1990), no chimeric animals have been produced by combining these cells with those from a normal embryo, and no transgenic livestock have been produced using this technology. The use of inner cell mass-derived cell lines to produce live calves following nuclear transfer as discussed above is an exciting breakthrough, however these experiments have yet to be repeated.

References

- First NL. 1990. New animal breeding techniques and their application. J. Reprod. Fert. Suppl. 41:3-14.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF and Dressell MA. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. Biol. Reprod. 27:147-158.
- Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL and Johnson DC. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization for embryo production in problem cows. Therio. 41:67-72.
- Whitesell TH, Hill KG, Miller DR, Jones AL and Wilson JM. 1992. *In vitro* embryo production from oocytes recovered from excised ovaries of terminally ill cows. Therio 37:332.
- Matthew L. 1992. Specialty genetics consulting meeting. A.B.S.
- Kajihara Y, Blakewood EG, Myers MW, Kometani N, Goto K and Godke RA. 1991. *In vitro* maturation and fertilization of follicular oocytes obtained from calves. Therio. 35: 220.
- Armstrong DT, Holm P, Irvine B, Petersen BA, Stubbings RB, McLean D, Stevens GF and Seamark RF. 1991. Laparoscopic aspiration and *in vitro* maturation of oocytes from calves. Therio. 35:182.
- Armstrong, DT, Holm P, Irvine B, Petersen BA, Stubbings RB, McLean D, Stevens GF and Seamark RF. 1992. Pregnancies and live birth from *in vitro* fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. Therio. 38:667-678.
- Irvine B, Armstrong DT, Earl C, Holm P, McLean D and Seamark RF. 1993. Follicle development and oocyte recovery from calves with repeated gonadotropin stimulation and follicular aspiration. Therio. 39:237.
- Bavister BD, Rose-Hellekart TA and Pinyopummintr T. 1992. Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocyst in defined culture media. Therio. 37:127-146.
- Voelkel SA and Hu TX. 1992. Effect of gas atmosphere on the development of one-cell bovine embryos in two culture systems. Therio. 37:1117-1131.
- Aoyagi Y, Fukui Y, Iwazumi Y, Urakawa M and Ono H. 1990. Effects of culture systems on development of *in vitro* fertilized bovine ova into blastocysts. Therio. 34:749-759.

- Collas P and Robl JM. 1990. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. *Biol. Reprod.* 43:877-884.
- 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.
- Cotton RW, Manes C., and Hamkalo BA. 1980. Electron microscopic analysis of RNA transcription preimplantation rabbit embryos. *Chromosoma.* 79:169-178.
- Daniel JC Jr. 1964. Early growth of rabbit trophoblast. *American Naturalist* 98:85-97.
- Fischer B. 1987. Development retardation in cultured preimplantation rabbit embryos. *J. Reprod. Fert.* 79:115-123.
- Fischer B, Jung T, Helgele-Hartung, C and Beier HM. 1990. Development of preimplantation rabbit embryos in uterine flushing - supplemented culture media. *Mol. Reprod. Dev.* 27:216-223.
- 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. 1983. Nuclear transplantation of rat embryos. *J. Exp. Zool.* 248:303-305.
- Pinto-correia C, Collas P, Ponce De Leon FA and Robl JM. 1993. Chromatin and microtubule organization in the first cell cycle in rabbit parthootes and nuclear transplant embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 34:33-42.
- Pinto-correia C, Long CR, Chang T, and Robl JM. 1995. Factors involved in nuclear reprogramming during early development in the rabbit. *Mol. Reprod. Dev.* 40:292-304.
- Pursel VG, Wall RJ, Rexroad Jr. CE, Hammer RE and Brinster RL. 1985. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenology* 24:687-691.
- Robl JM, Prather R, Barnes FL, Eyestone WH, Northey D, Gilligan B, and First NL. 1987. Nuclear transplantation in bovine embryos. *J. Anim. Sci.* 64:642-647.
- Schumacher A and Fischer B. 1988. Influence of visible light and room temperature on cell proliferation in preimplantation rabbit embryos. *J. Reprod. Fert.* 84:197-204.
- Stice SL, and Robl JM. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 39:657-664.
- Stice SL, Keefer CL, Maki-Laurila M and Phillips PE. 1991. Producing multiple generations of bovine nuclear transplant embryos. *Theriogenology* 35:273.
- Stice SL and Keefer CL. 1993. Multiple generational bovine embryo cloning. *Biol. Reprod.* 48:715-719.
- Westhusin ME, Pryor JH and Bondioli KR. 1991. Nuclear transfer in the bovine embryo: A comparison of 5-day, 6-day, frozen-thawed, and nuclear transfer donor embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 28:119-123.
- Willadsen SM. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 320:63-65.
- Yang X, Jiang S, Kovacs A and Foote RH. 1992. Nuclear totipotency of cultured rabbit morulae to support full-term development following nuclear transplant. *Biol. Reprod.* 47:636-643.
- Yang X, Zhang L, Kovacs A, Tobback C and Foote RH. 1990. Potential of hypertonic medium treatment for embryos micromanipulation II. Assessment of nuclear transplantation methodology, isolation, subzona insertion, and electrofusion of blastomeres to intact of functionally enucleated oocytes in

- rabbit. Mol. Reprod. Dev. 27:118-129.
- 노규진, 이효종, 송상현, 윤희준, 박충생. 1994. 수정란의 체외발달에 미치는 배양액 및 소와 토끼의 난관상피세포들과의 공배양 효과. 한국가축번식학회지 18:39-46.
- 박충생, 전병균, 이효종, 최민철, 최상용. 1994. 토끼에서 공핵란의 발달단계가 할구주입, 전기융합 및 핵이식 수정란의 체외발달에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지 9:153-160.
- 박충생, 최상용, 이효종, 박희성, 박성재. 1993. 생쥐 수정란의 핵이식에 관한 연구 III. 제2세대 핵이식에 의한 복제생쥐의 생산. 한국수정란이식학회지 8:9-12.
- 이효종, 최민철, 최상용, 박충생, 윤창현, 강대진. 1993. 반복핵이식에 의한 복제동물 생산에 관한 연구. I. 토끼 수핵난자의 전기자극에 의한 활성화. 한국수정란이식학회지 8:151-154.