

토끼에서 卵胞卵을 이용한 核移植胚 생산에 관한 연구†

김창근 · 정영채 · 신언익* · 임홍순* · 김홍률* · 정영호** ·
윤종택*** · 이종완**** · 권처진 · 황성수
중앙대학교 산업대학

Production of Nuclear Transplant Embryos Using Follicular Oocytes in Rabbits†

C. K. Kim, Y. C. Chung, E. Y. Shin*, H. S. Yim*, H. R. Kim*, Y. H. Chung**,
J. T. Yoon***, J. W. Lee****, C. J. Kwon and S. S. Hwang
College of Industrial Studies, Chung-Ang University

SUMMARY

This study was conducted to examine the efficiency of enucleation and blastomere isolation from recipient oocytes and donor embryos, respectively and to determine the effect of oocyte age and electric voltage on the fusion rate and *in vitro* development of the fused oocytes in rabbit nuclear transplantation. Immature oocytes collected from ovarian follicles were matured *in vivo* for 12 h in TCM-199 containing FCS and hormones and *in vivo* matured oocytes were collected 17 to 18 h post-HCG. The fresh and frozen donor embryos of 8- to 16-cell stage were collected from the oviduct of superovulated does. The proportion of successfully enucleated oocytes was greatly lower in *in vitro* matured oocytes (42.3%) than that (62.7%) in *in vivo* matured oocytes. The level of cytochalasin B for *in vivo* matured oocytes did not affect the efficiency of enucleation, but 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cytochalasin B for *in vitro* matured oocytes showed a high enucleation rate significantly. The isolation efficiency of a single blastomere nucleus did not differ between 8- and 16-cell stage embryos. The percentage of single blastomeres isolated from 16-cell stage fresh embryos after 0.5% pronase treatment was greatly higher at 16-min treatment (94.4%) than at 8-min(78.1%) and the blastomeres(61.5%) isolated from frozen-thawed embryos after 16-min pronase were significantly fewer than those of fresh embryos. The age of recipient oocytes affected nuclear fusion rate. The reconstituted oocytes fused at 24-h age showed slightly higher fusion rate (77.8%) than those (65.0%) fused at 18-h age. The fusion rate of *in vitro* and *in vivo* matured oocytes inserted with fresh blastomere did not differ among electric voltages, but the cleavage rate and development to morula-blastocysts of *in vitro* matured oocytes was more higher under 0.6 kV/cm than under 0.8 to 1.2 kV/cm, while the cleavage rate and development of *in vivo* matured oocytes was higher under 0.8 to 1.0

* 축협중앙회 한우개량사업소 (Korean Native Cattle Improvement Center, NLCF)

** 중부대학교 (Joogbu University)

*** 안성산업대학교 (An Seong National University)

**** 공주대학교 (Kong Ju National University)

† 이 논문은 1993년도 학술진흥재단의 공모과제연구비에 의하여 연구되었음.

kV/cm than under 1.2 kV/cm. The fusion and cleavage rate following insertion with frozen-thawed blastomere was not different between the *in vitro* and *in vivo* matured oocytes and was similar to those from fresh blastomere insertion.

(Key words : cleavage, electrofusion, *in vitro* development nuclear transplantation, rabbit oocyte)

서 론

동일한 성과 유전형질을 가진 다수의 복제배와 복제자축을 생산할 수 있는 핵이식기술은 가축의 번식효율 증대와 능력개량의 효과를 종래의 선발법, 교배법 및 인공수정법보다 훨씬 높일 수 있을 뿐만 아니라 수정란이식기술의 산업화를 더욱 촉진시킬 수 있기 때문에 그동안 많은 연구가 수행되어 왔다. 특히 새로운 핵이식방법(McGrath와 Solter, 1993)과 전기적 융합법(Prather 등, 1987)의 효과가 보고된 이후로 핵이식기술의 개발이 가속화되었으며 특히 소에서 체외성숙 난자를 이용한 수정란의 체외생산기술이 산업화(Brackett와 Zuelke, 1993)됨에 따라 핵이식기술에 대한 산업화 요구도 한층 증대되고 있다. 그러나 아직도 핵이식배의 생산효율과 자축의 분만율이 낮기 때문에 많은 연구가 요구되고 있다 (Prather 등, 1987; Robl과 Stice, 1989; Bondioli 등, 1990). 핵이식기술개발의 초기에는 수핵난자로서 체내성숙난자가 주로 이용되었으나 (Stice와 Robl, 1988; Smith와 Wilmut, 1989; Prather 등, 1987, 1989), 최근에는 소를 중심으로 난자의 다량확보가 가능한 체외성숙난자를 이용한 연구에서 송아지가 분만되고 있다(Ushizima와 Eto, 1992; Clement-Sengewald 등, 1992; Barnes 등, 1993). 그러나 체외성숙난자의 이용에 따른 여러가지 문제점들이 제기되고 있다. 특히 난자의 성숙도와 제핵방법(Prather 등, 1987; Stice와 Robl, 1988; Collas와 Robl, 1990; Sims 등, 1991; Barnes 등, 1993; 이 등, 1994), 난자의 활성화(Sims 등, 1991; First 등, 1992; Barnes 등, 1993), 전기 융합방법 (Collas와 Robl, 1989; Long 등, 1991; Cheong 등, 1992), 수핵난자와 공핵할구의 조건 (Clement-Sengewald 등, 1992; Ushizima와 Eto, 1992; Yang 등, 1993) 및 핵이식배 생산의 변이 (Prather 등, 1987; Westhusin 등, 1991) 등이 주

요 고려사항이 되고 있으며 이들 요인에 대한 최적 조건이 제시되고 있지 못할 뿐만 아니라 핵이식효율이 보고자간에도 차이가 많다.

따라서 본 연구에서는 토끼를 모델로 하여 수핵난자의 제핵과 공핵할구의 분리효율을 높일 수 있는 조건 및 핵융합율과 배발생율을 향상시킬 수 있는 난자의 성숙도와 전압조건을 알고자 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물 및 사양관리

본 실험에 사용된 공시토끼는 New Zealand White종의 성숙토끼였으며 공시전에 위임신을 방지하기 위하여 개체별로 사육하였고 사료회사의 성토용 펠렛 토끼사료와 물을 자유급식하였다.

2. 수핵난자의 채란과 체외성숙

체외성숙난자의 채란을 위해서 건강한 성숙 암토끼를 도살하여 난소를 떼어낸 다음 분리된 난소를 mPBS로 2~3회 씻은 후 mPBS액이 담긴 watch glass에서 23게이지 주사침으로 난포를 터트려 채란하였다. 채란된 미성숙 난포란 중에서 난구세포층이 충실하게 부착되고 세포질이 양호한 난자만을 선별하여 체외성숙에 이용하였다. 난자의 체외성숙은 TCM-199 (Sigma, USA)에 FCS (13%), HCG (10 IU/mL), FSH (5 µg/mL), estradiol-17β (1 µg/mL) 및 항생제를 첨가한 성숙배양액에서 5% CO₂, 95%공기, 100%습도, 37℃의 항온기 조건에서 성숙시켰으며 12시간 성숙시킨 후 수핵난자로 공시하였다. 체내성숙난자는 성숙토끼를 과배란 처리후에 회복하여 난관을 관류하여 채란하였다. 과배란 처리는 PMSG 40 IU씩을 5일간 연속주사하고 6일에 estradiol 0.1 mg, 7일에 HCG 100~150 IU를 주사하거나 또는 PMSG 100 IU주사후 3일에 HCG 100~150 IU를 주사하였으며 HCG주사후 17~18

시간에 채란하였다. 체외성숙과 체내성숙된 난자는 0.5% hyaluronidase (Sigma, USA)가 들어 있는 시험관에 넣고 4분간 vortexing한 후 micropipette로 반복흡입에 의해 난구세포를 완전히 제거한 다음 제1극체가 보이고 세포질이 충실한 난자를 수핵난자로 공시하였다.

3. 공핵수정란의 채란

공핵수정란의 채란을 위해서는 성숙 암토끼에 PMSG 100 IU를 근육주사한 뒤 3일후에 수토끼와 2~3회 교미시키고 이어서 HCG 150 IU를 이정맥에 주사하여 과배란을 유기시켰으며 HCG주사후 44시간과 50시간에 0.6mL의 Zoetil 50 (Virbac, France)으로 전신마취시킨 다음 개복하고 난관을 관류하여 8세포기와 16세포기의 수정란을 채란하였다.

4. 공핵수정란과 수핵난자의 미세조작

1) 공핵수정란의 할구분리

8~16세포기 수정란의 할구분리는 먼저 난구세포와 투명대를 제거하기 위하여 0.5%의 pronase (Sigma, USA)로 8분 또는 16분간 처리한 다음 Ca^{2+} - Mg^{2+} -free PBS액에서 micropipette를 이용하여 반복흡입하면서 할구를 분리하였다. 분리된 할구는 0.4% BSA를 함유한 mPBS액으로 2~3회 세정한 다음 핵이식에 사용하였다.

2) 수핵난자의 제핵과 할구주입

12시간 체외성숙시킨 난자 또는 채란직후의 체내성숙 수핵난자와 공핵수정란의 할구세포를 5.0, 7.5 또는 10.0 μ g/mL의 cytochalasin B (Sigma, USA)가 함유된 TCM-199 (체외성숙배양액과 동일한 조성)에서 15분간 전처리한 다음 미세조작을 실시하였다. 미세조작기는 Narishige micromanipulator system (Narishige, Japan)이 장치된 도립현미경 (Diaphot TMD, Nikon, Japan)을 이용하였으며 제핵과 할구이식은 McGrath와 Solter (1983) 및 Collas와 Robl (1990)의 방법에 따라 실시하였다. 미세조작 pipette는 외경 180~190 μ m와 내경 30 μ m의 holding pipette와 내경 30 μ m의 aspir-

ation pipette를 사용하였다. 제핵은 투명대를 통과시킨 흡입 pipette 내로 제1극체와 그 주위의 세포질 약 1/3을 원형질막에 싸여진 채로 투명대 밖으로 흡입하면서 핵을 제거하였다. 분리된 할구의 이식은 동일한 흡입 pipette에 할구를 흡입한 다음 제핵 과정에서 만들어진 투명대 구멍을 통해서 할구를 수핵난자의 위관강내로 주입하였다.

5. 재구축난자의 전기융합과 체외배양

주입된 할구와 수핵난자의 세포질과의 전기융합은 Electro cell manipulator (ECM 200, BTX, USA)를 이용하여 Collas와 Robl (1990)의 방법에 따라 핵융합을 실시하였다. 할구를 주입한 재구축난자는 먼저 100 μ M $CaCl_2$ 와 $MgCl_2$ 가 함유된 0.3 M mannitol액으로 3~4회 세정한 다음 융합액에 들어 있는 wire electrode chamber의 양전극 사이에 옮기고 교류전류를 통전하여 할구와 세포질의 접촉면이 양전극에 수평이 되도록 유도하였으며 그후 직류전류 (direct current, DC)로 통전하여 핵융합을 실시하였다. 재구축난자의 전기융합은 핵이식후 6시간 또는 12시간 뒤에 실시하였으며 DC의 전압과 통전시간은 0.6~1.2 kV/cm와 70 μ sec이었고 통전회수는 2~3회였다. 핵융합이 확인된 난자는 petri dish내에 paraffin oil로 피복된 0.2 mL의 TCM-199 (체외성숙 배양액과 동일조성)에서 체외 발생시켰으며 배양기의 조건은 수핵난자의 체외성숙 조건과 같았다(5% CO_2 , 95% 공기, 100% 습도, 37°C).

결과 및 고찰

1. 제핵 및 할구분리 효율

체외성숙 및 체내성숙 수핵난자의 제핵효율은 Table 1과 같다. 체외성숙난자의 경우 cytochalasin B의 수준이 7.5 μ g/mL일 때 제핵효율이 48.8%로서 다른 수준에서보다 현저히 높았으며 전체 평균 제핵율을 42.3%였다. 체내성숙난자에서는 cytochalasin의 수준간에 차이가 없었으며 평균제핵율은 62.7%로서 체외성숙 난자보다 월등히 높았다.

Pronase (0.5%)의 처리시간과 수정란의 조건에 따른 할구분리 효율은 Table 2와 3에서 보는 바와

Table 1. Effect of cytochalasin B on efficiency of enucleation

| Recipient oocyte | Cytochalasin B ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | No. of oocytes(%) | |
|-------------------------|--|-------------------|------------------------|
| | | Manipulated | Enucleated |
| <i>In vitro</i> matured | 5.0 | 66 | 21(31.8) ^a |
| | 7.5 | 172 | 84(48.8) ^b |
| | 10.0 | 60 | 21(35.0) ^{ab} |
| | Total | 298 | 126(42.3) ^A |
| <i>In vivo</i> matured | 5.0 | 68 | 47(69.1) |
| | 10.0 | 101 | 59(58.4) |
| | Total | 169 | 106(62.7) ^B |

^{a,b,A,B} Different superscript within column is significant difference ($p < 0.05$).

같다. Table 2에서 8세포기와 16세포기의 할구분리율이 각각 88.3%와 83.2%로서 세포기간에 차이가 없었다. 한편 Table 3의 신선수정란의 경우는 pronase의 처리시간이 8분보다는 16분에서 분리율이 높았으며, 또한 16분의 처리조건에서 동결수정란의 할구분리율이 신선수정란보다 현저히 낮았다 (94.4% : 61.5%).

본 실험에서의 제핵효율 (42~63%)은 체내성숙난자로 보고된 토끼(Yang 등, 1991)와 돼지(Nagashima 등, 1992)의 성적보다는 낮았으나 면양(Smith와 Wilmut, 1989)과는 유사한 결과였다. 또한 소의 체외성숙난자로 얻어진 Prather 등 (1987)의 결과와는 유사했으나 Ushijima 등 (1991)과 First 등 (1992)의 결과보다는 현저히 낮은 효율이었다. 제핵효율은 보고자간에 차이가 많으며 특히 세

포질의 제거량(Prather 등, 1987)과 핵위치 선정의 정확성 (Stice와 Robl, 1988)에 따라 크게 좌우되는 것으로 보고되어 있다. 본 실험에서 체외성숙난자의 제핵효율이 체내성숙난자보다 낮았던 것에 대해서는 그 원인이 분명치 않으나 앞으로 체외성숙난자의 제핵효율을 높이는데 있어서 중요한 요인의 하나로 사료되었다. 세포골격 억제제인 cytochalasin B의 첨가수준을 달리한 조건에서 제핵효율이 체외성숙난자에서는 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 수준에서 더욱 높았던 것은 안정된 제핵과 cytochalasin 자체의 유해성이 고려된 최적첨가수준의 결정이 필요함을 보여 주는 결과라 하겠다. 현재 cytochalasin의 첨가수준이 동물종과 난자의 시기 등에 따라 다소 다르게 첨가되고 있는데 토끼, 면양, 돼지에서는 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Smith와 Wilmut, 1989; Collas 등, 1992; Nagashima 등, 1992; Yang 등, 1992), 생쥐는 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Cheong 등, 1992; Kono 등, 1992), 그리고 소에서는 5~7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Prather 등, 1987; Ushijima 등, 1991; Clement-Sengewald 등, 1992; Yang 등, 1993)이 첨가되고 있다. 한편 핵융합후 cytochalasin B 내에서 일정시간 배양할 경우 핵의 이상과 초기발생능의 저하가 방지되며 (Czolowska 등, 1986; Smith와 Wilmut, 1989), 또한 배발달의 향상이 보고된 바 있다(Kono 등, 1989; Collas와 Robl, 1990). 할구분리 효율이 공핵배의 세포기간에 차이가 없었던 결과는 Robl과 Stice (1989), Yang 등 (1990)의 결과와 같았으며 16분간의 pronase 처리에서 할구분리율이 더욱 높았고 동결수정

Table 2. Effect of cell stage on blastomere isolation from donor embryos under 8-min pronase treatment

| Cell stage | No. of embryos manipulated | No. of blastomeres isolated | |
|------------|----------------------------|-----------------------------|-------------|
| | | Total(%) | Mean/embryo |
| 8 | 33 | 233(88.3) | 7.1 |
| 16 | 22 | 293(83.2) | 13.3 |

Table 3. Effect of time of pronase treatment on blastomere isolation from 16-cell stage donor embryos

| Donor embryos | Pronase treatment (min) | No. of embryos manipulated | No. of blastomeres isolated | |
|---------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------|
| | | | Total(%) | Mean/embryo |
| Fresh | 8 | 16 | 200(78.1) | 12.5 |
| | 16 | 20 | 302(94.4) | 15.1 |
| Frozen | 16 | 18 | 177(61.5) | 11.1 |

란이 신선수정란보다 할구 분리율이 낮았던 것은 Yang 등 (1993)과 유사한 결과였다. 그러나 다른 보고에서 할구분리를 위한 pronase의 처리수준과 처리시간이 0.5~2.0%와 1~30분으로서 공시된 난자와 보고자에 따라 차이가 많다 (Iwasaki 등, 1989; Yang 등, 1990; Taniguchi 등, 1991; Ushijima 등, 1991). 따라서 본 실험 결과에서 적절한 pronase의 수준과 처리시간도 난자의 미세조작기술 자체와 연관된 매우 중요한 요인임을 알 수 있었다.

2. 수핵난자의 성숙도와 핵융합율

12시간 체외성숙후 제핵한 다음 6시간과 12시간의 추가배양후 전기융합시킨 재구축난자의 핵융합율은 Table 4와 같이 핵이식난자의 65.0%와 77.8%가 융합되어 제핵후 12시간 뒤에 전기융합할 때가 융합율이 높았다.

제핵난자를 할구이식후 추가로 성숙배양시간을

Table 4. Effect of age of oocytes on electrofusion of reconstituted oocytes

| Oocyte age at fusion(h)* | No. of oocytes | | |
|--------------------------|----------------|---------------|----------|
| | Manipulated | Reconstituted | Fused(%) |
| 18 | 54 | 20 | 13(65.0) |
| 24 | 64 | 27 | 21(77.8) |

Eight-cell stage embryos were used as nuclear donor and fusion was done under 0.8 kV/cm (70 μ sec, 3 \times).

*Time after start of *in vitro* maturation.

Table 5. Effect of electric voltage on fusion rate and *in vitro* development of oocytes reconstituted with fresh donor nuclei

| Recipient oocytes | Electric voltage (kV/cm) | No. of oocytes | | No. of embryos developed to | | | | |
|-------------------------|------------------------------|----------------|----------|-----------------------------|--------|---------|-----|----------|
| | | Reconstituted | Fused(%) | 2~4-cell | 8-cell | 16-cell | M+B | Total(%) |
| <i>In vitro</i> matured | 0.6(70 μ s, 3 \times) | 22 | 18(81.8) | 8 | 2 | 1 | 3 | 14(77.8) |
| | 0.8(") | 24 | 19(79.2) | 4 | 1 | 1 | 2 | 8(42.1) |
| | 1.0(") | 40 | 31(77.5) | 10 | 2 | 2 | - | 14(45.2) |
| | 1.2(70 μ s, 2 \times) | 13 | 10(76.9) | 2 | - | 1 | 1 | 4(44.4) |
| | 1.5(") | 31 | 24(77.4) | 3 | 2 | 1 | - | 6(25.0) |
| <i>In vivo</i> matured | 0.8(70 μ s, 3 \times) | 25 | 19(76.9) | 5 | 4 | 1 | 3 | 12(63.2) |
| | 1.0(") | 23 | 18(78.3) | 8 | 3 | - | 2 | 13(72.2) |
| | 1.2(70 μ s, 2 \times) | 10 | 6(60.0) | 1 | - | - | 1 | 2(33.3) |

Donor nuclei were isolated from embryos of 8- to 16-cell stage. Fusion time was 10~12 h after enucleation (22~24 h after start of *in vitro* maturation for IVM oocytes)

연장하여 융합시킬 때 핵융합율이 높았던 결과는 Sims 등(1991)과 이 등(1994) 결과와 같은 경향이 있었다. 특히 Leibfried-Rutledge 등 (1992)은 난자의 성숙도가 높을 경우 융합이 더 빠르다고 하였으며, 또한 Ware 등(1989)과 Barnes 등(1993)은 난자의 활성율도 향상됨을 보고한 바 있다. 그러나 Stice와 Robl (1988), First 등 (1992), 김 등(1993)은 난자의 성숙정도간에 핵융합율의 차이가 없다고 하였다. 한편 Collas와 Robl (1990)은 이 등 (1994)의 결과와는 다르게 배란 직후의 난자에서 융합율이 더 높은 것으로 보고하였다. 본 실험에서의 핵융합율은 Sims 등 (1991)과 Yang 등 (1993)과는 같은 수준이었으나 First 등 (1992), 김 등 (1993), 이 등 (1994)보다는 낮은 결과였다.

3. 전압에 따른 핵융합과 체외 배발달

체외성숙과 체내성숙된 수핵난자에 신선 또는 동결수정란의 할구이식에서 전기융합시 전압조건에 따른 핵융합율과 체외 배발달율을 보면 Table 5 및 6과 같다.

체외성숙 난자에 신선할구의 이식에서 전압간에 융합율의 차이는 없었으나 난할율은 0.6 kV/cm, 70 μ sec, 3회 조건에서 가장 높았으며 1.5 kV/cm, 70 μ sec, 2회 조건에서 가장 낮았고 0.8~1.2 kV/cm에서는 거의 유사한 결과였다. 한편 상실배와 배반포기로의 발달은 0.6~0.8 kV/cm조건에서 높았다. 체내성숙 수핵난자의 경우에서도 전압간에 핵융합율의 차이가 없었으나 난할율에서는 0.8~1.0

Table 6. Fusion rate and *in vitro* development of oocytes reconstituted with frozen-thawed donor nuclei

| Recipient oocyte | No. of oocytes | | No. of embryos developed to | | | | |
|-------------------------|----------------|----------|-----------------------------|--------|---------|-----|----------|
| | Reconstituted | Fused(%) | 2~4-cell | 8-cell | 16-cell | M+B | Total(%) |
| <i>In vitro</i> matured | 14 | 11(78.6) | 1 | 2 | 1 | 1 | 5(45.5) |
| <i>In vivo</i> matured | 20 | 16(80.0) | 3 | 2 | - | 2 | 7(43.8) |

Cell stage of donor embryos and fusion time : see in Table 5.

Electric stimulation was 0.8 kV/cm, 70 μ sec and 3 times.

kV/cm에서 높았고 1.2 kV/cm에서 현저히 낮았다. 역시 상실배와 배반포의 발생이 0.8~1.0 kV/cm에서 높았다. 동결수정란의 할구이식에서는 0.8 kV/cm, 70 μ sec, 3회의 전압조건에서 신선수정란의 할구이식과 유사한 결과를 얻을 수 있었다.

본 실험에서 제핵된 체외성숙난자와 체내성숙난자에 신선 수정란의 할구를 이식할 경우 모두 핵융합율이 전압간에 차이가 없었던 결과는 Cheong 등 (1992), Clement-Sengewald 등 (1992) 및 김 등 (1993)의 결과와 같았다. 그러나 Long 등 (1991)은 0.2와 0.3 kV/cm의 전압차이에서도 융합율에 차이가 있음을 보고하였으며 Robl 등 (1992)은 전압이 높을 때 원형질막의 불안정으로 융합율이 낮아짐을 보고한 바 있다. 한편 체외성숙난자와 체내성숙난자간에 융합율에 차이가 없었던 것은 Pugh 등 (1992)이 면양에서 보고한 결과와 같았다. 본 실험에서의 융합율은 보고자간에 사용한 전압의 차이는 있었으나 Sims 등 (1991), Clement-Sengewald 등 (1992)과는 같았으나 Collas와 Robl (1990), Ushijima 등 (1991), Cheong 등 (1992), 김 등 (1993), Tatham 등 (1995)보다는 낮았고 Pugh 등 (1992)과 Kato 등 (1993)보다는 높았다. 전압에 따른 난할율은 체외성숙난자는 0.6 kV/cm에서 난할율이 더욱 높았으나 체내성숙난자에서는 0.8~1.0 kV/cm에서 난할율에 차이가 없었다. 이와 같이 체내와 체외성숙난자간에 전압반응에 차이가 나타난 결과는 본 실험실에서 이미 소난자(미발표)에서도 확인된 바 있다. 체외성숙난자의 경우 0.8~1.2 kV/cm에서의 난할율 (42~45%)은 Chung 등 (1994)보다는 다소 낮았으나 Tatham 등 (1995)의 결과와는 유사하였으며 또한 체내성숙난자의 결과는 Clement-Sengewald 등 (1992)과도 같았다. 이러한 결과로

보아 본 실험실의 조건에서는 소와 토끼의 전기융합조건이 거의 유사한 것으로 사료되었다. 융합된 난자로부터 상실배~배반포까지의 발달율은 체외 (0.6~1.0 kV/cm 조건) 및 체내 (0.8~1.0 kV/cm 조건) 성숙난자에서 각각 7%와 14%로서 체내성숙 난자에서 다소 높았는데 Pugh 등(1992)도 면양에서 체내성숙난자에서 상실배 발달이 더욱 많음을 보고한바 있다.

본 실험의 전압조건에서 상실배~배반포의 발달율은 소에서 보고된 Ushijima와 Eto (1992), Kato 등 (1993)과는 유사하였으나 Sims 등 (1991)과 Clement-Sengewald 등 (1992) 보다는 낮았고 토끼에서 보고된 Collas와 Robl (1990)과 이 등 (1994)의 결과보다 현저히 낮았다. 동결융해한 할구의 이식에서 체외성숙과 체내성숙 난자간에 융합율과 난할율은 모두 차이가 없을 뿐만 아니라 신선할구의 이식 결과와도 유사하였는데 Westhusin 등(1991), Yang 등 (1993)에서도 신선과 동결할구의 이식간에 융합율과 발생율에 차이가 없었다. Ushijima와 Eto (1992)는 상실배~배반포 발생이 신선과 동결할구 이식에서 11.6와 17.6%가 됨을 보고하였다.

적 요

본 연구는 토끼의 핵이식에서 수핵난자의 제핵효율과 공핵수정란의 할구 분리효율을 조사함과 동시에 전기융합 방법에 따른 핵융합율과 체외 배발달율의 차이를 비교하기 위하여 실시되었다. 공시된 수핵난자는 FCS와 호르몬이 첨가된 TCM-199에서 12시간 성숙시킨 체외성숙난자와 과배란 처리에서 HCG주사후 17~18시간에 채란된 체내성숙난자였다. 신선 또는 동결융해한 공핵수정란은 과배란 토

끼로부터 채란된 8세포기와 16세포기의 수정란이었다. 체외성숙난자의 제핵효율(42.3%)은 체내성숙난자보다(62.7%) 현저히 낮았다. 제핵시 cytochalasin B의 첨가수준이 체내성숙난자에서는 영향이 없었으나 체외성숙난자에서는 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 제핵효율이 높았다. 공핵수정란의 할구분리 효율은 8세포기와 16세포기간에 차이가 없었으며 16세포기 수정란에서 pronase 처리시간이 8분(78.1%)보다 16분(94.4%)에서 할구분리 효율이 더욱 높았다. 동결수정란의 할구분리 효율(61.5%)은 신선수정란보다 현저히 낮았다. 핵융합율은 수핵난자의 성숙도에 따라 다소 차이가 있었으며 18시간 성숙(65.0%)보다 24시간 성숙(77.8%)에서 융합율이 높았다. 신선수정란의 할구이식에서 체외성숙 수핵난자의 핵융합율은 전압간에 차이가 없었으나 난할율과 상실배-배반포의 발달율이 0.8~1.2 kV/cm보다 0.6 kV/cm에서 현저히 높았으며 체내성숙 수핵난자에서는 핵융합율과 난할율이 1.2 kV/cm보다 0.8~0.1 kV/cm에서 더욱 높았다. 동결수정란의 할구이식에서는 핵융합율과 난할율이 체외성숙과 체내성숙 수핵난자간에 차이가 없었으며 신선수정란의 할구이식과 동일한 결과였다.

참고문헌

- Barnes F, Endebrock M, Looney C, Powell R, Westhusin M and Bondioli K. 1993. Embryo cloning in cattle : The use of *in vitro* matured oocytes. J. Reprod. Fert., 97:317-320.
- Bondioli KR, Westhusin ME and Looney CR. 1990. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. Theriogenology, 33:165-174.
- Brackett BG and Zuelke KA. 1993. Analysis of factors improved in the *in vitro* production of bovine embryos. Theriogenology, 39:43-64.
- Cheong HT, Takahashi Y and Kangawa H. 1992. Developmental capacity of reconstituted mouse embryos : Influence of nucleus and cytoplasm sources. J. Vet. Med. Sci., 54:1099-1103.
- Chung YC, Kim CK, Song XX, Yoon JT and Choi SH. 1994. Nuclear transplantation and electrofusion for cloning in bovine follicular oocytes. II. Effects of electric stimulation and recipient oocyte age on fusion and *in vitro* development of fused embryos. Proc. Mol. Biol. & Genet., 9:367-368.
- Clement-Sengewald A, Palma GA, Berg U and Brem G. 1992. Comparison between *in vitro* produced and *in vivo* flushed donor embryos for cloning experiments in cattle. Theriogenology, 37:196.
- Collas P and Robl JM. 1990. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. Biol. Reprod., 43:877-884.
- Collas P, Balise J, and Robl JM. 1992. Development of nuclear transplant rabbit embryos : Influence of the cell cycle stage of the donor nucleus. Biol. Reprod., 46:492-500.
- Czolowska R, Waksmundzka M, Kubiak JZ and Tarkowski AK. 1986. Chromosome condensation activity in ovulated metaphase II mouse oocytes assayed by fusion with interphase blastomeres. J. Cell Sci., 84:129-138.
- First NL, Leibfried-Rutledge ML, Northey DL and Nuttleman PR. 1992. Use of *in vitro* matured oocytes 24hr of age in bovine nuclear transfer. Theriogenology, 38:211.
- Iwasaki S, Kono T and Nakahara T. 1989. Sexing rate and developmental ability of bovine two-to eight cell stage embryos split by treatment with pronase. Jap. J. Anim. Reprod., 35:147-153.
- Kato Y, Nitta R, Takano H, and Tsunoda Y. 1993. Effects of timing of fusion and culture medium on the development of bovine eggs receiving blastomeres from 8 to 32-cell embryos *in vitro*. Anim. Sci. Technol., (Jap.)

- 64:484-490.
- Kono T, Iwasaki S and Nakahara T. 1989. Parthenogenetic activation by electric stimulus of bovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*, 32:569-576.
- Kono T, Kwon OY, Watanabe T and Nakahara T. 1992. Development of mouse enucleated oocytes receiving a nucleus from different stage of the second cell cycle. *Theriogenology*, 37:239.
- Leibfried-Rutledge ML, Northey DL, Nuttlem-an PR, and First NL. 1992. Processing of donated nucleus and timing of post-activation events differ between recipient oocytes 24 or 42 hr of age. *Theriogenology*, 37:244.
- Collas P, Pinto-Correia C, Abel Ponce de Leon F and Robl JM. 1992. Effect of donor cell cycle stage on chromatin and spindle morphology in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 46:501-511.
- Long C, Levanduski M, Duplantis S and Wwsthusin M. 1991. Nuclear transfer in the bovine embryo : The effect of DC voltage and duration on electrofusion and cell lysis. *Theriogenology*, 35:232.
- McGrath J and Solter D. 1983. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science*, 220:1300-1302.
- Nagashima H, Yamakawa H and Saito S. 1992. Transplantation of porcine blastomere nuclei into oocytes collected from prepubertal gilts. *J. Reprod. Dev.*, 38:73-78.
- Prather RS, Barnes RL, 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 early pig embryos. *Biol. Reprod.*, 41:414-418.
- Pugh PA, Tervit HR and Thompson JG. 1992. *In vitro* developmental ability of sheep nuclear transplant embryos. *Theriogenology*, 37:277.
- Robl JM and Stice SL. 1989. Prospects for the commercial cloning of animals by nuclear transplantation. *Theriogenology*, 31:758-4.
- Robl JM, Fissore R, Collas P and Duby RT. 1992. Cell fusion and oocyte activation. *Proc. Symp. Cloning Mammalian Embryos*. Jan. 1992. Fort Collins, pp. 24-25
- Sims MM, Rosenkrans CF Jr. and First NL. 1991. Development *in vitro* of bovine embryos derived from nuclear transfer., *Theriogenology*, 35:272.
- Smith LC and Wilmut I. 1989. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development *in vivo* of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol. Reprod.*, 40:1027-1035.
- Stice SL and Robl JM. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 39:657-664.
- Taniguchi T, Cheong HT and Kanagawa H. 1991. Fusion and development rates of single blastomere pairs of mouse two- and four-cell embryos using the electrofusion method. *Theriogenology*, 36:645-654.
- Tatham BG, Gillian KJ, Pushett DA, Dowsing AT and Trounson AO. 1995. Electrofusion of blastomeres isolated from different ages of *in vitro* produced embryos for bovine nuclear transfer. *Theriogenology*, 43:335.
- Ushijima H and Eto T. 1992. Production of a calf from a nuclear transfer embryo using *in vitro* matured oocytes. *J. Reprod. Dev.*, 38:61-65.
- Ushijima H, Tsunoda Y, Eto T and Imai H. 1991. *In vitro* development of bovine rec-

- onstituted eggs after fusion with a blastomere from 8-cell to blastocyst stage embryos. *Jap. J. Anim. Reprod.*, 37:15-19.
- Ware CB, Barnes FL, Maiki-Laurila M and First NL. 1989. Age dependence of bovine oocyte activation. *Gamete Res.*, 22:265-275.
- 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.
- Yang X, Jiang S, Farrell P, Foote RH and McGrath AN. 1993. Nuclear transfer in cattle : Effect of nuclear donor cells, cytoplasm age, co-culture, and embryo transfer. *Mol. Reprod. Devel.*, 35:29-36.
- Yang X, Jiang S and Foote RH. 1991. Nuclear transfer in rabbits and cattle by electric pulse-induced fusion of blastomeres to enucleated oocytes. *Theriogenology*, 35:298.
- Yang X, Jiang S, Kovacs A and Foote RH. 1992. Nuclear totipotency of cultured rabbit morulae to support full-term development following nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 47:636-64.
- Yang X, Zhang L, Kovacs A, Tobback C and Foote RH. 1990. Potential of hypertonic medium treatment for embryo micromanipulation : III. Assessment of nuclear transplantation methodology, isolation, subzona insertion, and electrofusion of blastomeres to intact or functionally enucleated oocytes in rabbits. *Mol. Reprod. Dev.*, 27:118-129.
- 김정익, 양부근, 정희태. 1993. 핵이식에 의한 소 난자 및 초기배의 핵-세포질의 상호작용에 관한 연구. *한국가축번식학회지*, 17:287-294
- 이효중, 정미경, 전병균, 최민철, 최상용, 박충생. 1994. 토끼에서 난자의 성숙도가 전기융합 및 핵이식 수정란의 체외발달에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지*, 9:23-29.