韓國受精卵移植學會誌(1995) 第 10 卷 第 3 號
Korean J. Emb. Trans. (1995) Vol. 10, No. 3 pp. 209~217

2- 및 8-세포기 생쥐 수정란의 핵이식 및 전기융합법에 의한 복제산자의 생산

박준규 · 조성근 · 박희성* · 박충생
경상대학교 농과대학 축산학과

Production of Cloned Mice by Nuclear Transplantation and Electrofusion Using 2- or 8-Cell Stage Mouse Embryo as Nuclear Donor

J. K. Park, S. K. Cho, H. S. Park* and C. S. Park
Department of Animal Science, College of Agriculture, Gyeongsang National University

SUMMARY

The present study was carried out to develop a cloning technology of mouse embryos by nuclear transplantation with electrofusion and to produce cloned offsprings by transfer of reconstituted embryos. A single nucleus from two- and eight-cell embryos was transplanted into the enucleated two-cell embryos by micromanipulation. The fusion of nucleus with recipient cytoplasm and the subsequent development of reconstituted embryos *in vitro* as well as *in vivo* to term were examined to determine the optimal electrofusion parameters for nuclear transplantation in mouse embryos.

The successful enucleation of donor embryos was 84.9 and 83.3% in two- and eight-cell stage, respectively, and the successful injection of nucleus from two- and eight-cell donor embryos into the perivitelline space of enucleated two-cell embryos were 85.1 and 84.7%, respectively. No significant differences were found in enucleation or injection rate between the cell stages of donor embryos.

When the blastomeres of intact two-cell mouse embryos were electrofused in 0.3 M mannitol medium(100 μsec., 3 pulses), the fusion rate was similarly 93.2, 92.2 and 92.0% in 1.0, 1.5 and 2.0 kV/cm, respectively, but *in vitro* development to blastocyst of the fused two-cell embryos was significantly($P<0.05$) lower in 2.0 kV/cm (63.4%) than in 1.0 kV/cm (91.7%) or 1.5 kV/cm (82.4%).

The development *in vitro* to eight-cell stage of the reconstituted embryos with nucleus from two-cell stage(45.5%) was significantly($P<0.05$) higher than that from eight-cell stage blastomeres(16.7%).

The number of blastomeres of the intact embryos at blastocyst stage was 50±0.6 and 55±2.4 in *in vitro* and *in vivo* cultured mouse embryos, respectively, but significantly($P<0.05$) decreased to 35±0.7 in nuclear transplanted blastocyst embryos.

* 진주산업대학교 농학부 축산학과(Department of Animal Science, Chinju National University)

The conception rate of mice following embryo transfer was 32.1% in the reconstituted two-cell embryos using two-cell donor nuclei, which was comparable to the fresh two-cell embryos(40.6%). However, the rate of development *in vivo* to term following embryo transfer of the reconstituted two-cell embryos using two-cell donor nuclei (23.5%) was significantly($P<0.05$) lower compared with the percentage of two-cell fresh embryos(31.5%).

서 론

핵이식 기술은 전능한(totipotent) 시기에 있는 수정란의 핵을 다수의 할구세포로부터 채취하여 이를 탈핵된 다른 난자, 접합체 또는 초기 수정란에 직접 이식하는 기술로써 하나의 수정란으로부터 동일한 성과 유전형질을 가진 복제 수정란을 작출할 하여 우량 유전자로 조성된 개체를 다량 복제할 수 있으므로 우수한 수정란의 확대 보급 및 유전적으로 동일한 동물을 다량 생산할 수가 있다.

McGrath와 Solter(1983)가 미세조작기법과 virus 유기융합법을 이용하여 생쥐 수정란에서 산자를 생산하는데 성공함으로써 핵이식 기술의 응용으로 복제동물의 생산 가능성이 입증되었다. 핵이식 수정란의 핵과 세포질의 융합은 1981년 Spindle이 투명대가 제거된 4-세포기 수정란의 할구를 분리한 후 polyethylene glycol(PEG)액에서 20~30분간 처리하여 분리된 할구의 융합을 유도하여, 체외배양으로 배반포로의 발달에 성공하였다.

Sendai virus를 융합매개체로 이용하여 생쥐의 탈핵한 2-세포기의 수핵란에 2- 및 8-세포기의 공핵란의 핵을 이식하여 88.6 및 84.7%의 높은 융합성적을 얻었으나(Park 등, 1990), 이러한 융합방법은 융합매개체에 노출되는 시간이 많고, 외부요인이 융합성적에 많은 영향을 줄 수 있을 뿐만 아니라 복잡한 조작과정이 요구되며, 핵이식된 수정란을 다시 핵이식에 이용할 수 없다는 단점이 있다(Kono와 Tsunoda, 1988).

한편, Kubiak과 Tarkowski(1985)는 생쥐에서 융합하려는 세포에 영향을 최소화할 수 있고, 물리적 수치를 정확하게 제어하여 동일한 조건을 완벽하게 재현할 수 있을 뿐만 아니라 조작이 간편하고 융합매개체에 매우 짧은 시간에 노출된다는 장점이 있는 전기융합법을 시도하였다.

본 연구는 핵이식 수정란의 융합기법을 개선하고자 2- 및 8-세포기에 있는 생쥐 수정란의 핵과 할구를 채취하여 이를 탈핵된 2-세포기의 수정란에 미세조작기법으로 핵이식을 실시하고, 전기융합법을 이용하여 이들 핵과 세포질의 융합 및 핵이식된 수정란의 체외발달 능력 및 할구수를 조사하고, 이들 복제수정란을 수란생쥐에 이식하여 산자를 생산하고자 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물

본 실험에 사용한 공시동물로인 공란생쥐는 ICR 계통의 4~6주령의 미성숙한 암컷과 표현형이 다른 수정란을 얻고자 F_1(CBA×C_{57}BL/6J)의 10~12주령의 수컷생쥐를 사용하였다. 핵이식된 수정란의 체내 이식을 위한 수란생쥐는 ICR 계통의 10~12주령의 성숙한 암컷을 사용하였다. 또한 위임신 유기를 위하여 ICR 계통의 10~12주령의 정관결찰시술을 받은 성숙한 수컷을 실험에 공시하였다.

2. 과배란의 유기 및 수정

과배란의 유기는 4~6주령의 미성숙한 암컷생쥐에 PMSG (ZOKI, Japan) 5 IU를 복강주사하고 48시간 후에 hCG (ZOKI, Japan) 5 IU를 동일한 방법으로 주사하여 과배란을 유기하였다. 수정을 위하여 hCG를 주사함과 동시에 수컷과 1:1의 비율로 하룻밤 동안 합사시켜 자연교미를 유도하였으며, 다음날 아침 질전 유무를 확인하여 질전이 형성되어 있는 개체만 골라 실험에 사용하였으며 질전이 확인된 날을 수정 제1일로 정하였다. 수란생쥐의 위임신 유기는 상기와 같이 동일한 방법으로 배란을 유기하여 정관결찰시술을 받은 수컷과 1:1의 비율로 합사시켜 위임신을 유기하였다.

3. 배양액의 제조 및 수정란의 회수

배양액의 조성은 0.5% bovine serum albumin (BSA, Sigma, U.S.A.)이 함유된 BMOC-3(Brinster medium) 배양액을 기본 배양액으로 하였으며, 미세조작용 배양액은 $NaHCO_3$가 함유되지 않은 기본 배양액에 HEPES (Gibco, U.S.A.)와 5 μg/ml의 cytochalasin B(Sigma, U.S.A.) 및 0.1 μg/ml의 colcemid(Gibco, U.S.A.)가 첨가된 것을 사용하였고, 핵이식된 수정란의 배양을 위해서는 기본 배양액에 100 μM의 EDTA(Gibco, U.S.A.)가 함유된 것을 사용하였다.

배양액의 pH는 7.3±0.1로 조정하였으며, 사용직전에 0.2 μm의 millipore filter로 여과시킴으로써 제균하였다. 한편, 배양소적은 세포배양용 dish (Nunc, Denmark)에 150 μl의 미세조작용 배양액을 적하시킨 다음 paraffin oil (Junsei, Japan)로 피복시켜서 37℃의 5% CO_2 및 95% air 조건의 배양기내에서 실험전 2시간 동안 평형을 시켰다. 핵이식된 수정란의 배양소적의 준비는 세포배양용 dish에 100 μl의 배양액을 적하시킨 후 paraffin oil로 피복하여 상기와 같은 조건의 배양기에서 평형을 실시하였다.

2-세포기 수정란은 수정 후 44~46시간 및 8-세포기 수정란은 65~66시간에 생쥐를 경추탈구법으로 도살한 후 난관을 적출하여 stereozoom microscope(SWIFT, U.S.A.) 하에서 30½ gauge blunt needle을 이용하여 난관관류를 실시하여 회수하였으며, 관류액은 Hepes-BMOC-3에 0.5% BSA를 첨가하여 사용하였다. 회수한 수정란은 Hepes-BMOC-3 배양액으로 3~4회 세척한 다음 정상적인 수정란만 실험에 사용하였다.

4. 수정란의 핵이식

핵이식 조작은 inverted microscope (Olympus, Japan)에 micromanipulator (Goodfellow, England)를 장치하여 실시하였다. 핵이식용 피펫의 제작은 수정란을 보정시키기 위한 holding 피펫의 크기는 80~100 μm(외경)의 크기로 제작하였고, 탈핵 및 핵주입용 피펫은 15~20 μm(외경)의 크기로 제작하여 사용하였다.

탈핵에 의한 2-세포기의 수핵란의 준비는 Park (1991)의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 정상적으로 발달한 2-세포기의 수정란을 골라 cytochalasin B와 colcemid가 함유된 Hepes-BMOC-3 소적 배양액 내에서 15분간 배양시킨 다음 inverted microscope로 옮겨 micromanipulator에 장치된 holding 피펫으로 음압에 의하여 수정란을 고정시키고, 또 다른 한쪽 micromanipulator에 장치된 탈핵 및 주입 피펫을 미세조작하면서 수정란의 투명대를 관통시켰다. 피펫의 끝부분이 위란강에 도달하면 더욱 전진시켜서 핵쪽 가까이로 이동시킨 다음 음압을 이용하여 피펫안으로 원형질막과 함께 핵을 흡입하였으며, 그런 다음 서서이 피펫의 끝부분을 후퇴시켜 핵을 약간의 세포질과 함께 원형질막에 쌓인 채로 제거시켰다. 공핵란의 준비는 전술한 바와 같이 탈핵기법을 응용하여, 2-세포기의 경우는 핵을, 8-세포기의 경우는 투명대를 절개하여 할구를 분리하여 공핵을 채취하였다. 핵의 주입은 2- 및 8-세포기의 공핵란의 핵과 할구를 채취하여 탈핵시에 관통된 수핵란의 투명대를 관통하여 위란강내에 주입하였다. 따라서 모든 핵이식 조작은 1시간내에 완료하였다.

5. 핵이식 수정란의 융합 및 체외배양

핵이식이 후 주입된 핵과 세포질의 융합을 유도하기 위하여 0.30 M mannitol 용액을 사용하였다. 융합용 medium은 사용직전에 0.2 μm의 millipore filter로 여과시킴으로써 제균하였다. 한편, 융합 medium은 세포배양용 dish에 150 μl의 융합용 소적을 적하시킨 다음 liquid paraffin oil로 피복시켜서 37℃의 5% CO_2 및 95% air 조건의 배양기내에서 실험전 2시간 동안 평형을 시켜 실험에 사용하였다.

핵의 주입이 완료된 수정란은 cytoskeletal inhibitor가 없는 Hepes-BMOC-3 배양액으로 4~5회 세척한 다음 Zimmermann과 Vienken(1982)의 세포 융합기전의 원리와 전기적 세포융합 장치(Eyela, Japan)를 이용하여 0.30 M mannitol용액에서 주입된 핵과 세포질의 융합을 유도하였으며, 세포융합은 실온에서 실시하였다. 이때 전기적 세포융합 장치의 두 전극을 micromanipulator에 장착하여

핵이식 수정란의 양측에 전극을 위치시켰다. 주입한 핵과 세포질의 방향을 전극과 수평으로 되게 장착하였으며, 두 전극의 간격은 수정란의 크기와 동일하게 하였다. 전기적 세포융합은 1.0 kV/cm의 직류전압에서, 100 μsec의 자극시간과 3회의 자극을 실시하여 세포융합을 유도하였다. 자극후 1시간 이내에 현미경하에서 검경하여 세포융합 여부를 판정하였다. 세포융합이 완전히 이루어져 정상적으로 핵이 융합된 수정란만을 선별하여 Hepes-BMOC-3 배양액으로 수회 세척하고 $NaHCO_3$-BMOC-3 배양액으로 배양을 실시하였다.

6. 핵이식 수정란의 발달에 따른 할구수 조사

수정란의 발달에 따른 형태학적 조사로서 수정란의 핵염색은 배반포 단계까지 정상적으로 발달한 수정란만을 골라 fluorescent dye인 Hoechst 33342(Sigma, U.S.A.)를 이용하여 Pusel 등(1991)의 방법에 따라 실시하였다. 즉 2.3% sodium citrate dihydrate 0.75 ml과 ethanol 0.25 ml 및 1 mg/ml Hoechst 15 μl를 혼합하여 제조한 염색액을 매 실험시마다 제조하여 사용하였다. 실리콘(Sigmacote; Sigma, U.S.A.) 처리를 한 slide glass에 trypan blue 15 μl를 떨어뜨려 소적액을 만들어 수정란을 30~60초간 소적액 내에 두었다가 내경이 수정란보다 적은 피펫으로 trypan blue 만 완전히 제거한 다음 Hoechst 염색액을 15 μl 가하여 3~5분간 배양시킨 후에 다시 Hoechst 염색액만을 제거하여 곧바로 Polymount(Polyscience, U.S.A.)를 15 μl 떨어뜨린 후 cover glass를 덮은후 200~400배의 형광현미경(Nikon, Japan)하에서 핵의 수를 조사하였다.

7. 수정란의 이식

수정란의 이식을 위하여 마취는 위임신이 유기된 수란생쥐에 Xylazine(바이엘, 한국)과 Ketamin(유한양행, 한국)을 1:1의 비율로 희석하여 개체당 0.1~0.12 ml씩 근육주사하여 마취를 유도하였다. 이식은 Choe 등(1990)의 방법에 따라 위임신 제 0.5~1.0일된 수란생쥐의 배정중선을 절개하고, 양쪽 겸부를 절개하여 난소를 노출시킨 다음 끝을 무디게 한 이식용 피펫에 핵이식된 2-세포기의 5~6개의 수정란과 배양액을 장착하여 해부 현미경하에서 난소 아랫쪽에 위치한 난관누두부를 찾아서 주입하였다. 이때 이식용 피펫은 내경이 120~180 μm의 크기로 제작하여 수정란과 배양액의 양이 1~2 μl로 되게 조작하였다.

8. 통계학적 분석

실험결과의 통계학적 분석은 MICROSTAT statistical program package(Ecosoft, Inc., 1984)를 사용하여 χ^2-test 및 t-test를 이용하여 분산분석과 유의차를 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 수정란의 핵이식

2- 및 8-세포기의 수정란으로 부터 하나의 핵 또는 할구를 취하고 이를 탈핵한 2-세포기의 수핵란에 핵이식을 실시하였을 때 탈핵 및 핵의 이식 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다.

2- 및 8-세포기 공핵수정란의 탈핵 성공률은 84.9 및 83.3%로서 공핵란의 발달단계에 따른 유의적인 ($P<0.05$) 차이는 없었으며, 2- 및 8-세포기부터 채취된 핵과 할구의 이식 성공률은 2-세포기의 85.1 및 8-세포기의 84.7%로서 유의적인($P<0.05$) 차이는 없었다.

이러한 결과는 Park(1991)이 2-, 4- 및 8-세포기 수정란의 탈핵률이 각각 93.1, 91.7 및 89.1%의 성적과 탈핵된 2-세포기의 수핵란에 2-, 4- 및 8-세포기의 공핵란으로부터 채취한 핵의 이식 성공률이 각각 94.6, 93.3 및 90.4%의 성적과 Lee 등(1993)의 2-세포기의 수정란을 수핵란으로 사용하기 위해 탈핵을 실시하여 93.8~94.5%의 탈핵률과 공핵란의 이식률은 발육단계가 2-세포기에서는 95.1%, 4-세포기 및 8-세포기인 경우 각각 84.0% 및 84.9%의 성적보다는 다소 낮았다.

2. 수정란의 적정 융합조건 비교

핵이식 수정란의 전기적 적정전압을 조사하고자 정상적인 2-세포기 생쥐 수정란에 전기융합을 실시한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다.

직류전압 1.0, 1.5 및 2.0 kV/cm 간의 세포융합

Table 1. Successful rate of enucleation and injection of two-cell embryo in the procedure of nuclear transplantation

Stage of nuclear donor	Recipient embryos	No. of embryos enucleated /used(%)	No. of embryos injected /enucleated(%)
2-cell	Enucleated 2-cell	215 /253(84.9)	183 /215(85.1)
8-ceil	Enucleated 2-cell	85 /102(83.3)	72 / 85(84.7)

* There are no significant($P<0.05$) differences in successful nuclear enucleation and injection between the donor cell stages.

Table 2. Effects of electric voltage on fusion of intact 2-cell mouse embryos and subsequent development *in vitro* for 84 hours

Voltage (kV/cm)	No. of embryos used	No. of embryos fused(%)	No. of embryos developed to(%)	
			Morula	Blastocyst
1.0	118	110(93.2)[a]	100(92.6)[b]	99(91.7)[c]
1.5	116	107(92.2)[a]	92(90.2)[b]	84(82.4)[b]
2.0	113	104(92.0)[a]	59(83.1)[a]	45(63.4)[a]

* Values with different superscripts in the same column were significantly ($P<0.05$) different.

** Pulse duration: 100 μsec., pulse time: 3X, fusion medium: 0.3 M mannitol.

률은 각각 93.2, 92.2 및 92.0%로서 유의적인 차이는 없었다. 융합후의 상실배까지의 체외발달률은 1.0 및 1.5 kV/cm의 전압에서는 92.6 및 90.2%로서 유의적인($P<0.05$) 차이는 없었으나, 2.0 kV/cm에서는 83.1%로서 유의적($P<0.05$)으로 낮았다. 또한 배반포까지의 발달률은 1.0 및 1.5 kV/cm 경우 91.7 및 82.4%로서 2.0 kV/cm의 63.4%보다 유의적($P<0.05$)으로 높았다.

Willadsen(1986) 및 Smith와 Wilmut(1989)는 면양의 8- 및 16-세포기 수정란의 핵을 미수정란에 이식하여 1,000 HAU의 Sendai virus를 이용하여 50%의 융합률을 얻었고, 전기융합의 경우는 90%가 융합되었으며, Sendai virus 융합의 경우 33.3%, 전기융합의 경우는 42%가 배반포로 발달되어 이를 수란면양에 이식하여 3마리의 산자를 생산하였다고 보고하였다. 가축의 경우에는 Sendai virus 유기융합법보다는 전기융합법이 보다 양호한 성적을 얻었으며, 융합방법이 체외발달에 영향을 미친다고 하였다.

Funahashi와 Niwa(1990)는 흰쥐에서 2-세포기에 있는 수정란의 할구를 이식한 다음 전기융합을 실시하여 1.0 kV/cm의 직류전압에서 50, 100, 150 및 200 μsec의 자극시간을 주었을 경우 7, 47, 80 및 73% 의 융합률을 보였고, 1.5 kV/cm의 전압에서 53, 80, 87 및 80%의 융합률을 보였으며, 2.0 kV/cm의 전압에서는 80, 100, 93 및 100%의 융합률을 보고하였다. 1.0, 1.5 및 2.0 kV/cm의 전압에 150 μsec의 자극시간에 1회의 자극을 주었을 경우 83, 80 및 64%가 상실배 및 배반포기로의 발달률을 보였다. 또한 같은 전압과 자극의 경우 전기자극시간이 짧을수록 융합률이 증가된다고 하였고, 자극횟수에 있어서도 1회보다 2회의 자극이 더 효과적이라고 보고하였다. 흰쥐의 경우 생쥐와는 달리 Sendai virus 유기융합법보다는 전기융합법이 효과적이라고 하였다.

이러한 결과는 Park(1993)이 융합시 chamber를 사용하여 0.8 kV/cm에서의 95.0%와 1.2 kV/cm에서의 93.0%의 융합성적과 체외발달 성적 83.6 및 64.3%와 대체로 일치한다. 본 연구에서는 1.0 kV/cm가 가장 적합한 것으로 판단되어 이후 핵이

식 수정란의 융합은 모두 1.0 kV/cm 조건하에서 실시하였다.

3. 핵이식 수정란의 융합 및 체외발달

2- 및 8-세포기 공핵란의 핵과 할구를 탈핵한 2-세포기의 수핵란에 핵이식을 실시였을 때 이들의 전기적 자극에 의한 융합률과 체외 발달 성적은 Table 3에서 보는 바와 같다.

탈핵된 2-세포기 수핵란에 2-세포기 공핵란의 핵을 이식하였을 때는 77.5%의 융합률을 보였으나 8-세포기의 할구를 이식하였을 때는 72.5%로서 이들 간의 유의적($P<0.05$)인 차이는 없었다. 또한 분할률은 각각 52.9 및 40.5%로서 유의적인 차이는 없었으며, 8-세포기 이상으로의 발달률은 각각 45.5 및 16.7%로서 2-세포기의 공핵란을 이식하였을 때가 유의적($P<0.05$)으로 높았다.

이러한 결과는 Ushijima와 Tsunoda(1989)의 탈핵된 전핵기에 2- 및 8-세포기의 핵을 이식하여 2.5~7.5 V의 교류전압으로 할구를 융합에 적절하게 배열하여 1.25 kV/cm 의 직류전압을 100 μsec. 동안 2회 자극을 하여 76 및 51%의 융합성적 보다는 다소 높은 결과이다. Tsunoda 등(1987a)은 2-세포기 수정란의 핵을 이식하여 전기융합을 실시한 경우 78%가 융합되었으나, Sendai virus를 융합매개체로 하여 융합을 실시하였을 경우에는 94%가 정상적으로 융합되어 생쥐의 경우에는 전기융합법보다는 Sendai virus 유기융합법이 더 효과적인 융합방법이라고 하였다.

핵이식 수정란의 체외발달에 있어서 Kono와 Tsunoda(1989)는 탈핵된 2-세포기 수핵란에 4- 및 8-세포기의 핵을 이식하여 74 및 31%가 배반포로 발달하였다고 보고하였고, Park(1991)은 탈핵한 2-세포기의 수핵란에 2-, 4- 및 8-세포기의 공핵란의 핵을 이식하여 배반포로의 발달률이 각각 75.5, 68.3 및 47.8% 였다고 하였다. Lee 등(1993)은 전기융합법을 이용하여 탈핵된 2-세포기의 수핵란에 2-, 4- 및 8-세포기의 공핵란을 핵이식하여 2-세포기의 경우 26.3~62.7%, 4-세포기의 경우 21.9~52.6% 및 8-세포기인 경우 15.6~41.2%의 배반포로 발달하였으며, 각각 전기자극의 조건에 따라 직접적으로 후기배로의 발달에 영향이 미친다고 보고하였다. 본 실험에서는 8-세포기 단계까지 체외 발달률을 조사하였다.

한편 Tsunoda 등(1987)은 생쥐에 있어서 융합매개체를 Sendai virus를 사용할 경우 94%의 배반포 발달률을 보고하였으며, 전기융합의 경우는 67%의 배반포 발달률을 얻었고, 핵이식후의 융합방법이 배발달률에도 영향을 미친다고 하였다.

4. 핵이식 수정란의 할구수

2- 및 8-세포기에 있는 공핵란의 핵과 할구를 이용하여 핵이식한 수정란의 체외발달 능력을 알아보고자 체외에서 배반포기로 발달한 수정란의 할구수를 조사한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같다.

2-세포기 수정란의 핵을 탈핵한 수핵란에 이식하여 융합된 수정란을 배반포기 단계까지 체외배양시킨 수정란의 할구수는 35±0.7개로서 정상적인 수정란을 배반포 단계까지 체외발달시킨 수정란의 할구수 (50±0.6) 및 체내에서 배반포 단계까지 발달된 수정란의 할구수 (55±2.4)보다는 유의적($P<$

Table 3. Successful electrofusion of nuclei with cytoplasts in nuclear transplantation from different developmental stages mouse embryos

Stage of nuclear donor	Recipient embryos	No. of embryos fused/used(%)	No. of embryos cultured/fused(%)	No. of embryos developed to/cultured(%)	
				2 to 4-cell	over 8-cell
2-cell	Enucleated 2-cell	403/520(77.5)[a]	213/403(52.9)[a]	163/213(76.5)[a]	97/213(45.5)[a]
8-cell	Enucleated 2-cell	74/102(72.5)[a]	30/ 74(40.5)[a]	21/ 30(70.0)[a]	5/ 30(16.7)[b]

* Values with different superscripts in the same column were significantly($P<0.05$) different.

Table 4. Comparision of the number of blastomeres of mouse embryos between intact and cloned embryos following development for blastocyst

Type of embryos	No. of embryos stained	No. of blastomeres***
Nuclear transplant	10	35±0.7[a]
In vitro developed**	10	50±0.6[b]
In vivo developed	10	55±2.4[c]

* Values with different superscripts in the same column were significantly ($P<0.05$) different

** *In vitro* developed : collection at 2-cell stage embryos to blastocyst developed

*** Means±S.E.M.

0.05)으로 적었다.

이러한 결과는 Robl 등(1986)이 생쥐의 탈핵한 2-세포기의 수핵란에 2- 및 8-세포기 수정란의 핵을 이식하여 66시간 동안 체외배양을 실시하여 배반포로 발달한 수정란의 할구수는 39±4 및 25±4개였다는 보고와, Kono와 Tsunoda(1989)의 탈핵된 2-세포기의 수핵란에 4- 및 8-세포기의 공핵란을 핵이식하여 체외배양시켜 배반포까지 발달된 할구수는 각각 30±2.4 및 22±1.3개였다는 보고보다는 다소 높은 성적이다. 또한 Park(1991)이 2-, 4- 및 8-세포기의 공핵란을 채취하여 탈핵한 2-세포기의 수핵란에 이식한 다음 체외배양을 실시하여 배반포까지 발달된 할구수는 각각 33.1±1.2, 27.5±1.8 및 24.0±1.3개로서 2-세포기의 핵이식 수정란에 비해 4- 및 8-세포기의 핵이식 수정란이 유의적($P<0.05$)으로 낮았다고 한 성적과도 대체로 일치한다.

본 실험의 결과로 미루어 보아 할구수의 감소는 미세조작시의 부분적인 손상, 융합조건, 체외배양조건 및 핵이식된 핵과 세포질간의 비동기화 등이 할구수를 감소시키는 요인으로 생각된다.

5. 핵이식에 의한 생쥐의 생산

핵이식된 수정란을 체외에서 2-세포기까지 발달시켜 위임신된 수란생쥐의 난관에 체내이식을 실시하여 개체 발생능력을 조사한 결과는 Table 5에서 보는 바와 같다.

Table 5. Production of cloned live youngs following oviduct transplantation of 2-cell stage nuclear transplant embryos

Type of embryos	No. of pregnants / No. of recipients transferred(%)	No. of youngs / No. of embryos transferred(%)
Nuclear transplant	9/28(32.1)[a]	31/132(23.5)[b]
Fresh 2-cell	13/32(40.6)[a]	62/197(31.5)[a]

* Values with different superscripts in the same column were significantly ($P<0.05$) different.

핵이식한 수정란 및 정상적인(intact) 2-세포기 수정란의 수태율은 각각 32.1과 40.6%로서 유의적인 차이는 없었으나, 산자 생산율에 있어서는 23.5 및 31.5%로서 핵이식한 수란을 이식한 경우가 유의적($P<0.05$)으로 낮았다.

이러한 결과는 Choe 등(1990)이 정상적인 2-세포기 수정란을 수란생쥐의 난관에 이식하여 임신율 및 산자생산율은 각각 44.4 및 36.9%와는 대체로 비슷한 성적이다.

본 연구와는 달리 배반포로 발달시킨 핵이식 수정란을 수란생쥐의 자궁에 이식하여 수태율 및 산자생산율을 조사한 결과는 Tsunoda 등(1987)이 탈핵된 2-세포기의 수핵란에 4- 및 8-세포기의 핵을 이식하여 배반포로 발달시킨 후 수란생쥐에 이식하여 각각 70 및 29%의 수태율을 그리고 22 및 8%의 산자를 생산하였으며, Kono 등(1991)도 탈핵된 2-세포기 수정란에 2- 및 4-세포기의 핵을 이식하여 70 및 30%의 산자를 생산하였다. Lee 등(1993)은 탈핵된 2-세포기의 수정란에 공핵란의 발육단계가 2-, 4- 및 8-세포기를 핵이식한 경우의 각각 52.2, 33.4 및 11.1%의 수태율을 보였고, 이를 이식하여 28.3, 22.5 및 9.3%의 산자생산율을 보였다.

적 요

본 연구는 효율적인 핵이식 및 융합기법을 확립하고 우량유전자로 조성된 복제동물을 생산하고자 2- 및 8-세포기에 있는 생쥐 수정란의 핵을 채취하여, 이를 탈핵된 2-세포기의 수핵란에 미세조작기법과 전기융합법을 사용하여 복제 수정란을 작출하고 이

들의 핵과 세포질의 융합, 체외발달 능력 및 핵이식된 수정란의 할구수를 조사하고 이를 위임신이 유기된 수란생쥐의 난관에 체내이식하여 개체 발생 여부 등을 조사하였다. 본 실험에서 얻은 결과는 다음과 같다.

1. 2- 및 8-세포기에 있는 공핵란의 핵을 탈핵한 2-세포기의 수핵란에 핵이식하여 탈핵률과 핵이식률을 조사하였던 바 탈핵률은 각각 84.9 및 83.3%로서 유의적($P<0.05$)인 차이가 없었으며, 핵이식률 또한 85.1 및 84.7%로서 발달단계간에 유의적($P<0.05$)인 차이가 없었다.
2. 직류전압 1.0, 1.5 및 2.0 kV/cm 간의 세포융합률은 각각 93.2, 92.2 및 92.0%로서 유의적인 차이는 없었다. 융합후의 상실배까지의 체외발달률은 1.0 및 1.5 kV/cm의 전압에서는 92.6 및 90.2%로서 유의적인($P<0.05$) 차이는 없었으나, 2.0 kV/cm에서는 83.1%로서 유의적($P<0.05$)으로 낮았다. 또한 배반포까지의 발달률은 1.0 및 1.5 kV/cm 경우 91.7 및 82.4%로서 2.0 kV/cm의 경우 63.4%보다 유의적($P<0.05$)으로 높았다.
3. 탈핵된 2-세포기 수핵란에 2-세포기 공핵란의 핵을 이식하였을 때는 77.5%의 융합률을 보였으나 8-세포기의 할구를 이식하였을 때는 72.5%로서 이들간의 유의적($P<0.05$)인 차이는 없었다. 또한 분할률은 각각 52.9 및 40.5%로서 유의적인 차이는 없었으며, 8-세포기 이상으로의 발달률은 각각 45.5 및 16.7%로서 2-세포기의 공핵란을 이식하였을 때가 유의적($P<0.05$)으로 높았다.
4. 2-세포기 수정란의 핵을 탈핵한 수핵란에 이식하여 융합된 수정란을 배반포기 단계까지 체외배양시킨 수정란의 할구수는 35±0.7개로서 배반포 단계까지 체외발달시킨 수정란의 할구수(50±0.6개) 및 체내에서 배반포 단계까지 발달된 수정란의 할구수 (55±2.4개) 보다는 유의적($P<0.05$)으로 적었다.
5. 핵이식한 수정란 및 정상적인(intact) 2-세포기 수정란의 수태율은 각각 32.1과 40.6%로서 유의적인 차이는 없었으나, 산자생산율에 있어서는 23.5 및 31.5%로서 핵이식한 수정란을 이식한 경우가 유의적($P<0.05$)으로 낮았다.

참고문헌

Choe SY, Park CS, Lee HJ and Park HS. 1990. Studies on nuclear transplantation in mouse embryos. I. Functional differences between maternal and paternal genomes. Korean J. Vet. Res., 30:123-127.

Funahashi H and Niwa K. 1990. Electric fusion of 2-cell rat embryo blastomeres. Jpn. J. Anim. Reprod., 36: 114-119.

Kono T and Tsunoda Y. 1988. Effects of induction current and other factors on large-scale electrofusion for pronuclear transplantation of mouse eggs. Gamete Res., 19:349-357.

Kono T and Tsunoda Y. 1989. Development of single blastomeres from four- and eight-cell mouse embryos fused into the enucleated half of a two-cell embryo. Gamete Res., 22:427-434.

Kono T, Kwon OY, Ogawa M and Nakahara T. 1991. Development of mouse oocytes receiving embryonic nuclei and thymocytes. Theriogenology, 35:227(Abstr.).

Kubiak JZ and Tarkowski AK. 1985. Electrofusion of mouse blastomeres. Exp. Cell Res., 157:561-566.

Lee BC, Jo CH and Hwang WS. 1993. Studies on production of nuclear transplanted mouse embryos. Korean J. Vet. Res., 33:151-169.

McGrath J and Solter D. 1983. Nuclear transplantation in the mouse embryo. J. Exp. Zool., 228:355-362.

Park CS, Choe SY, Lee HJ and Park HS. 1990. Studies on nuclear transplantation in mouse embryos II. Developmental potential of nuclei from embryos of different developmental stages. Korean J. Vet. Sci., 30:355-360.

Park HS. 1991. Production of Cloned mice by nuclear transplantation from embryos at

early developmental stages. Gyeongsang Natl. Univ. Ph. D. Thesis.

Park SJ. 1993. Factors on recloning of mouse embryos by nuclear transfer with electrofusion. Gyeongsang Natl. Univ. M. S. Thesis.

Robl JM, Prather R, Barnes FL, Eyestone WH, Northey D, Gilligan B and First NL. 1987. A rapid whole-mount staining ptocedure for nuclei of mammalian embryos. Theriogenology, 24:687-691.

Robl JM, Gilligan B, Crister ES and First NL. 1986. Nuclear transplantation in mouse embryos: Assessment of recipient cell stage. Biol. Reprod., 34:733-739.

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

Tsunoda Y, Yasui T, Okubo Y, Nakamura K and Sugie T. 1987a. Development of one or two blastomeres from eight-cell mouse embryos to term in the presence of parthenogenetic eggs. Theriogenology, 28:615-623.

Tsunoda Y, Kato Y and Shioda Y. 1987b. Electrofusion for the pronuclear transplantation of mouse eggs. Gamete Res., 17:15-20.

Tsunoda Y, Yasui R and Shioda Y. 1987c. Full-term development of mouse blastomere nuclei transplanted into enucleated two-cell embryos. J. Exp. Zool., 242:147-151.

Ushijima H and Tsunoda Y. 1989. Nuclear transplantation of 2- and 8-cell mouse embryos by electrofusion. Jpn. J. Anim. Reprod., 35: 165-168.

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

Zimmermann U and Vienken J. 1982. Elecric field-induced cell-to-cell fusion. J. Membr. Biol., 67:165-182.