

토끼 핵이식 수정란의 체외 발달에 미치는 공핵란 세포주기의 효과[†]

박충생 · 전병균 · 윤희준* · 이효종* · 최상용*

경상대학교 농과대학 축산학과

Effect of Cell Cycle of Donor Nucleus on *In Vitro* Development in Nuclear Transplant Rabbit Embryos

Park C. S., B. G. Jeon, X. J. Yoon, H. J. Lee* and S. Y. Choe*

Department of Animal Science, College of Agriculture, Gyeongsang National University

SUMMARY

To improve the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit, this study were evaluated the influence of cell cycle of donor nuclei on the *in vitro* developmental potential in the nuclear transplant embryos. The embryos of 16-cell stage were collected from the mated does at 48h post-hCG injection and they were synchronized to G₁ phase of 32-cell stage. Synchronization of the cell cycle of blastomeres were induced, first, using an microtubules polymerization inhibitor, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ colcemid for 10h to arrest blastomeres in metaphase, and secondly, using a DNA synthesis inhibitor, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aphidicolin for 1.5 to 2h to cleave to 32-cell stage and arrest them in G₁ phase. The separated G₁ phase blastomeres of 32-cell stage were injected into enucleated recipient cytoplasms by micromanipulation. After culture until 20h post-hCG injection, the nuclear transplant oocytes were electrofused and activated by electrical stimulation. The nuclear transplant embryos were co-cultured for 120h. In vitro cultured embryos were monitored every 24h to assess for development rate. After *in vitro* culture for 120h, the nuclear transplant embryos developed to blastocyst stage were stained with Hoechst 33342 dye for counting the number of blastomeres under a fluorescence microscopy.

The cleavage rate of blastomeres from 16-cell stage rabbit embryos treated with colcemid for 10h or aphidicolin for 6h following colcemid for 10h were not significantly different. The electrofusion rate was similar by high in S and G₁ phase donor nuclei as 80.6 and 79.1%, respectively. However, the nuclear transplant embryos using G₁ phase donor nuclei were developed to blastocyst at high rate(60.3%) than those using S phase donor nuclei(26.0%). Moreover, the mean blastomere counts and their daily cell cycles of nuclear transplant embryos developed to blastocyst stage were increased significantly($P < 0.05$) with the G₁ phase donor nuclei(176.6 cells and 1.50 cycles), as compared with the S phase donor nuclei(136.6 cells and 1.42 cycles). These results show that the blastomeres of G₁ phase were more successful as donor nuclei in the nuclear transplant procedure, compared with S phase.

[†] 본 연구는 교육부에서 1995년도에 지원한 유전공학 학술연구조성비로 수행되었음.

* 경상대학교 수의학과(Department of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University).

I. 서 론

핵이식에 의한 유전적으로 동일한 복제 동물의 생산은 1952년 Briggs와 King이 개구리에서 배 발생을 유도하는데 성공한 이후, 1981년 Illemense와 Hoppe에 의해 생쥐에서 산자를 생산함으로써 포유동물에서도 그 가능성을 보여주었다. 대동물에서는 1986년 Wil-ladsen이 면양에서 처음으로 산자의 생산을 보고한 이래, 포유동물에서 핵이식은 지난 10여년 동안 많은 발전을 거듭해 왔다. 그러나 핵이식에 의한 복제동물 생산 기술은 아직 그 성공율은 낮은 수준인데, 배반포기 단계의 발달을뿐만 아니라 핵이식 수정란을 이식하였을 때의 산자 생산 성적도 역시 낮은 실정으로서 산업적으로 응용할 수 있는 단계로는 미비한 실정에 있다. 이의 주원인으로는 비정상적인 핵형이나 염색체를 가지는 수정란이 발생하거나, 주입된 핵의 DNA에 많은 손상을 받고 있고, 미세조작에 의한 난자의 손상 그리고 부적당한 활성화의 자극과 난자의 성숙도 등을 들 수 있다. 또한 핵이식 수정란은 정상 수정란보다 발생된 할구수에서 현저히 떨어진다.

체세포뿐만 아니라 난자와 수정란에서도 간기와 분열기의 전이는 maturation promoting factor(MP-F)라 불리는 물질에 의해서 유도된다(Gerhart 등, 1984 ; Christmann 등, 1994). 제2감수분열의 중기에 정지하고 있는 성숙된 M II 난자 역시 높은 수준의 MPF로 유지되고 있다. 이러한 MPF에 의하여 성숙한 난자와 할구를 융합하였을 경우 할구의 핵은 핵막의 소실, 미성숙 염색체의 응축(prematurely chromosome condensation, PCC), 인(nucleoli)의 분산, 핵막의 재형성 및 전핵(pronucleus)의 형성, 핵의 팽화(nuclear swelling) 등이 순서적으로 일어난다. 성숙한 M II의 세포질과 융합된 핵은 세포질이 활성화된 후 일련의 핵 재구성 과정을 거쳐서 전핵 단계에 들어가게 된다(Murray와 Kirschner, 1989 ; Collas 등, 1992a ; Campbell 등, 1993). 수정된 난자는 2-세포기로 분열하기 전 양성 전핵의 단계에서 DNA가 복제되어야 한다. 만약 DNA 복제에 실패하거나 한번 더 복제를 하게 된다면 염색체의 배수성은 비정상적으로 될 것이다. 핵이식 수정란 역시 전핵 단계에서 DNA를 복제해야 한다. 이 때 만약 공핵란의 할구가 DNA를

복제하고 있는 단계인 S기이거나, DNA를 복제하고 난 다음 G₂기에 융합되었다면, 핵이식 수정란은 전핵 단계에서 다시 한번 더 DNA를 복제하게 될 것이고, 이러한 핵이식 수정란은 정상보다 더 많은 DNA 량 혹은 수를 가지게 될 것이다.

그러므로 성숙된 M II 난자에 융합하는 공핵란 할구세포의 세포주기는 핵이식 수정란의 핵형을 유지하게 하고 핵이식 수정란의 발달에 많은 영향을 미치게 되므로 공핵란 할구의 세포주기는 매우 중요한 요인이다(Collas 등, 1992a, 1992b ; Kono 등, 1992 ; Cheong 등, 1993). 토끼에서 Collas 등(1992a)은 탈핵된 제2감수분열 중기의 수핵란과 공핵란의 세포주기를 DNA를 복제하기 전인 G₁기(2n-2c)에 있는 할구를 융합하였을 경우 S기의 할구보다 높은 배반포로의 발달율을 얻었다. DNA를 복제하기 전인 G₁기의 할구세포는 융합되어 일련의 단계를 거치고 전핵 단계에서 2-세포기로 분열하기 전에 DNA를 복제함으로써 정상적인 핵형(2n-4c)을 가지는 핵이식 수정란을 만들 수 있다고 하였다. 또한, 이러한 핵이식 수정란에서 다른 세포주기의 공핵란과 비교하여 방추사의 구조, 염색체의 구성, 핵이식 수정란의 체외발달에 대해 세포학적인 증명도 보고되었다(Collas 등, 1992b ; Pinto-correia 등, 1993). 공핵란의 세포주기는 DNA뿐만 아니라 세포분열시 양극에서 방추사를 생성하는 세포의 중심립의 상태 유지에 중요한 요인이다. 세포내의 극성을 지배하는 중심립도 S기에 복제를 한다. 만약 S기에 융합된 할구가 중심립을 복제하고 있거나 복제를 완료하였다면 핵이식 후 핵이식 수정란이 세포내에 극성이 여러 개가 존재하는 다중극성(multiple pole)을 가지게 될 것이다(Pinto-correia 등, 1993). 이러한 원인으로 Collas 등(1992b)은 S기에 융합된 핵이식 수정란에서 세포분열시 여러 방향으로 염색체가 분열함으로써 염색체의 이상이 많다고 보고하고 있다. Barnes 등(1993b)도 역시 S기의 할구와 성숙된 M II 수핵란을 사용하여 핵이식 수정란을 생산하였을 때 핵막의 소실, 염색체의 응축 등의 핵 재구성 과정에서 염색체의 이상이 많다는 사실을 보고하였다. 그러나 소에서 Stice 등(1993)은 공핵란 할구의 세포주기를 동기화한 것이 더 높은 발달율을 얻었으나, G₁기에 가까운 초기 S기의 할구보다 중기 S기의 세포주기에 있는 할구를 공핵란으로 사용하였을 때 더 높은 발달율을 얻

었다.

본 연구진도 토끼에서 S기 할구와 G₁기 할구를 각각 M II기의 난자에 이식하여 핵이식 수정란을 이식한 바 있으나 공시 난자와 실험방법을 동일한 조건에서 비교하지 않아(박 등, 1994 ; 이 등, 1995), 이에 본 연구에서는 세포주기를 조절한 32-세포기의 G₁기와 S기 할구를 공핵란으로 사용하여 공핵란의 세포주기에 따른 핵이식 수정란의 체외 발달율을 조사하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시 동물

본 실험에 사용된 공시 동물은 New-Zealand White 종의 성숙된 토끼로서 연암원에측산전문대학으로부터 공급받았으며 사용 전에 분리 사육하였고 물과 사료는 자유로이 급식하였다.

2. 수핵란의 준비

토끼의 과배란 유기는 성숙한 암토끼를 30mg의 FSH(Foltropin[®], Australia)를 3일 동안 하루에 두 번씩 분할하여 근육주사하였고, 마지막 투여 12시간 후 hCG(Puberogen[®], Japan) 100 IU를 정맥주사하였다. hCG 주사 후 13~15시간에 암토끼를 chloropromazine HCl과 ketamine HCl로 전신마취한 다음 개복 수술하여 난관으로부터 배란되어진 성숙 난자를 10% fetal calf serum(FCS, Gibco Co., U.S.A.)이 함유된 Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS, Sigma Co., U.S.A.)으로 회수하였다. 회수된 난자는 300 IU/ml의 hyaluronidase(Sigma Co., U.S.A.)에서 39℃, 5% CO₂ 조건에서 7분간 배양한 다음, 150 μ m fire-polished pipette으로 반복 pipetting하여 난구 세포를 제거하고 제 1극체가 명확하고 세포질이 균일하며 충실한 것만 수핵란으로 사용하였다.

3. 공핵란의 준비

토끼의 과배란 유기는 전항 2)와 같이 과배란을 유기한 다음 성숙된 수토끼와 교미를 시켰다. 16-세포기에 있는 수정란은 hCG 주사 후 48시간에 채란하였고, 회수된 수정란의 일부는 체외배양하여 32-세포기로 발

달한 수정란 0.5%의 pronase(Sigma Co., U.S.A.)에서 8분간 배양하여 mucin coat를 제거하고, 150 μ m 정도의 pipette으로 투명대를 제거하여, 50 μ m 정도의 pipette으로 Ca²⁺ 및 Mg²⁺ 결여된 PBS에서 할구를 분리하여 사용하였다.

4. 공핵란의 세포주기 조절

채란된 16-세포기의 수정란 일부는 32-세포기의 G₁기로 세포주기를 조절하였다. 할구 세포를 32-세포기의 G₁기로 세포주기를 동기화 하는 방법은 Collas와 Robl(1992a)의 방법을 따랐다. 간단히 요약하면, 채란된 16-세포기의 수정란을 0.5 μ g/ml의 microtubules 중합 억제제인 colcemid(Gibco Co., U.S.A.) 및 10% FCS가 포함된 M-199(Earl's salt, Sigma Co., U.S.A.) 배양액에서 10시간 배양하여 16-세포기 단계에서 32-세포기 단계로 넘어가는 세포분열의 중기에 정지시킨 다음 전항 3)과 같이 할구를 분리하였고, 이를 세척 후 DNA 합성 억제제인 0.1 μ g/ml의 aphidicolin(Sigma Co., U.S.A.) 및 10% FCS를 포함한 M-199 배양액에서 1.5~2시간 동안 배양하여 세포분열 완성 후 32-세포기의 G₁기로 동기화된 할구를 공핵란으로 사용하였다. 또한, 미세조작도 0.1 μ g/ml의 aphidicolin이 포함된 배양액에서 실시하였고, 미세조작 후에도 역시 할구와 세포질의 융합 때까지 0.1 μ g/ml의 aphidicolin 및 10% FCS가 포함된 M-199 배양액에서 배양하여 할구핵의 DNA 합성을 정지시켜 공핵란의 세포주기를 G₁기로 유지시켰다.

5. 핵이식을 위한 미세조작

수핵란의 탈핵을 위한 미세조작은 Stice와 Robl(1988)과 Collas와 Robl(1990)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 수핵란과 공핵란으로부터 분리된 할구 세포를 7.5 μ g/ml의 세포골격 억제제인 cytochalasin B(Sigma Co., U.S.A.), 0.1 μ g/ml의 aphidicolin 그리고 10% FCS가 함유된 Earl's balanced salt solution(EBSS, Sigma Co., U.S.A.)에서 미세조작 15분전에 전처리를 하였고, 미세조작을 위하여 micromanipulators(Narishige Co., Japan)를 DIC 도립현미경(Nikon Co., Japan)위에 장치하였다. 미세조작 또한, 7.5 μ g/ml의 cytochalasin B, 0.1 μ g/ml의 aphidicolin 그리고 10% FCS가 함유된

EBSS에서 실시하였고, 탈핵은 McGrath와 Solter (1983)의 non-disruptive 조작법에 의하여 실시하였다. 즉, 성숙된 M II 난자를 150 μm 정도의 미세 pipette으로 고정시키고 핵을 제거하기 위하여 30 μm 의 연마된 미세 pipette를 투명대 내로 진입시켜 제 1극체와 그 주위에 위치하는 제 2감수분열 중기의 염색체를 원형질막에 싸여진 채로 흡입하여 제거하였다. 한편, 공핵란으로부터 분리된 할구 세포 하나를 탈핵에 사용한 미세 pipette에 흡입하고 이를 미세조작으로 탈핵된 수핵란의 원형질 바깥 위관강에 주입하였다.

6. 세포 융합 및 난자의 활성화

난자와 할구의 융합 및 난자의 활성화는 Robl 등 (1987)의 방법에 따라 실시하였고, hCG 주입 후 20 시간에 전기자극으로 유도하였다. 전기자극은 이 등 (1993)의 융합 조건에 따라 1.25 kV/cm의 전압과 60 μsec 의 통전시간으로 3회 통전하여 실시하였다. 세포 융합과 난자의 활성화를 위한 용액은 100 M CaCl_2 , 및 MgCl_2 가 함유된 비전해질의 0.28 M mannitol 용액으로 사용하기 2시간 전에 만들어 25°C의 실온에서 평형시킨 후 사용하였다. 그 후 할구가 이식된 난자들이 용액으로 세척한 다음 paraffin oil이 덮여 있는 소적에 옮기고 할구가 주입된 난자를 배열하여 electro cell fusion manipulator (Eyela Co., Japan)에 장치되어 있는 두 전극 사이에서 할구와 세포질의 융합 및 난자의 활성화를 유도하였다.

7. 핵이식 수정란의 체외배양

난자의 세포질과 할구의 융합이 확인된 난자는 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 의 aphidicolin을 포함한 0.28 M mannitol 용액에서 염색체의 응축이 일어나는 동안 DNA의 합성을 억제하기 위하여 대략 20분 동안 배양하였고, 이를 7.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 cytochalasin B와 10% FCS가 함유된 M-199 배양액에서 1시간 동안 배양한 다음, 노 등 (1994)의 기술에 따라 4-well dish에 10% FCS가 포함된 M-199 배양액 (Earle's salt, Sigma Co., U.S.A.)에 옮겨 monolayer가 형성된 토끼 난관상피세포와 같이 39°C의 5% CO_2 배양기내에서 120시간 공배양하였다. 배양액은 48시간마다 신선한 배양액으로 교환하였으며, 모든 기본 배양액은 배양하기 12시간에서

24시간 전에 배양기내에서 pH의 평형을 유도하여 사용하였고, 미세조작 및 세포주기 조절을 위한 배양액은 사전에 미리 평형된 기본 배양액에서 사용하기 바로 직전에 만들어 사용하였다.

배양기간 동안 24시간마다 핵이식 수정란의 발달 단계 및 배반포로의 발달율을 조사하였고, 세포 융합 후 120시간째에 배반포로 발달한 핵이식 수정란의 할구수를 세기 위하여 Pursel 등(1985)의 방법에 따라 형광 염색하였다.

8. 통계학적 분석

실험 결과의 통계학적 분석은 Microsta computer statistical program package를 사용하여 발달율은 Chi-square test를 실시하였고, 할구수는 Student T-test를 실시하여 처리군 간의 유의성을 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 할구세포의 세포주기 조절 후 생존율

채란된 16-세포기의 수정란 할구를 분리한 다음 이들을 10시간 동안 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 colcemid 처리 후 생존성과 10시간 동안 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 colcemid한 다음 세척 후 6시간 동안 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 의 aphidicolin 처리 후 생존성을 이들 할구의 분할에 의하여 조사한 결과는 Table 1과 같다.

이들 할구는 colcemid 처리 후 96.8%가 분할하였고, colcemid와 aphidicolin 처리 후 91.8%가 분할하여 두 처리구간에 유의적인 차이를 나타내지 않았지만

Table 1. Cleavage rate of blastomeres from 16-cell stage rabbit embryos treated with colcemid for 10h or aphidicolin for 6h following colcemid for 10h

Treatment	No. of blastomeres used	No. of blastomeres cleaved	Cleavage rate (%)
Colcemid	95	92	96.8 ^a
Colcemid+ aphidicolin	135	124	91.8 ^a

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

colcemid와 aphidicolin 처리를 하였을 때 조금 낮은 생존율을 보였다. Collas 등(1991)은 16-세포기 단계의 수정란을 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 colcemid로 10시간 동안 세포주기를 동기화하였을 때 100%가 세포분열의 중기에 정지하였고, colcemid가 포함된 배양액에서 수정란을 제거하여 배양하였을 때 1.5 시간 후 86%가 분할하였으며, 그 후 100%가 배반포로 발달하였다고 보고하고 있다. 또한 16-세포기의 수정란을 10시간 동안 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 colcemid 및 6시간 동안 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 aphidicolin 처리 후 생존성을 조사한 결과 95%가 배반포로 발달하였다고 한다. 그러나 본 실험에서는 수정란의 할구를 분리한 다음 colcemid 및 aphidicolin으로 처리한 반면 이들은 수정란의 할구를 분리하지 않고 세포주기를 동기화하여 더 좋은 결과를 나타내는 것으로 사료된다.

2. 핵이식 수정란의 세포융합율

32-세포기의 G₁ 및 S기 할구를 공핵란으로 사용하여 핵이식을 실시한 다음 이들의 세포융합율을 조사한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같다.

32-세포기의 S기 및 G₁ 기 할구를 공핵란으로 사용한 핵이식 수정란에서 각각 80.6 및 79.1%의 세포융합율을 보여 세포융합율에 있어서는 서로 유의적인 차

이는 나타내지 않았다.

Yang 등(1990)은 토끼에서 핵의 공급원으로 8에서 32-세포기까지의 할구들을 공핵란으로 이용하여 탈핵된 M II 난자에 주입하고 교류 전류로서 핵이식 난자를 정렬한 다음 2.4 kV/cm, 60 μsec 의 직류 전류로 융합자극을 주었던 바 그 효율은 63~66%의 범위를 보여 본 실험에서의 비하여 다소 낮은 성적이었다. 박 등(1994) 및 이 등(1995)은 32-세포기의 할구에서 80% 내외의 세포융합율을 보고하고 있어 본 실험과 비슷한 결과를 보고하고 있으나, Collas와 Robl(1991)은 32-세포기 할구를 탈핵된 M II 난자에 핵이식한 다음 2.0 kV/cm, 60 μsec 의 조건을 30분 간격으로 6회 전기자극을 주어 세포 융합을 시도하였는데 그 융합율이 모두 100%이었다. 이들은 본 실험에서의 1.25 kV/cm보다 높은 전압을 주었고, 통전회수도 3회보다 많은 회수를 응용하였다. 또한 할구와 세포질 사이의 접촉이 세포융합을 이룰 수 있는 가장 기본 요인이고, Prather 등(1987) 및 이 등(1994)은 보다 작은 할구일수록 융합율이 떨어진다고 보고하였다. 탈핵시에 수핵란 세포질을 가급적 적게 제거하면 융합율을 향상시킬 수 있을 것으로 본다. 여러 연구들에서 상이한 융합율이 보고되고 있고, 이는 실험 방법 및 융합 조건에 의한 차이에 의한 것으로 생각된다.

Table 2. Effect of cell cycle of donor nuclei on electrical fusion of nuclear transplant rabbit embryos

Cell cycle of donor nuclei	No. of embryos used	No. of embryos fused	Fusion rate (%)
S phase	62	50	80.6 ^a
G ₁ phase	86	68	79.1 ^a

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

3. 핵이식 수정란의 체외발달율

32-세포기의 S기 및 G₁ 기 할구를 공핵란으로 사용하여 핵이식을 실시한 다음 융합이 확인된 핵이식 수정란은 1시간 동안 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 cytochalasin B 및 10% FCS가 포함된 M-199 배양액에서 1시간 동안 배양한 다음 이들을 120시간 동안 10% FCS가 포함된 M-199 배양액에서 토끼 난관상피세포와 공배양한 후 배반포로의 발달율을 조사한 결과 조사한 결과는 Table 3에 나타난 바와 같다.

Table 3. Effect of cell cycle of donor nuclei on *in vitro* development of nuclear transplant rabbit embryos

Cell cycle of donor nuclei	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to			
		2-cell	8-cell	Morula	Blastocyst
S phase	50	35(70.0) ^a	24(48.0) ^a	22(44.0) ^a	13(26.0) ^a
G ₁ phase	68	63(92.7) ^b	56(82.4) ^b	55(80.9) ^b	41(60.3) ^b

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

S 및 G₁기 할구를 공핵란으로 사용한 핵이식 수정란에서 배반포로의 발달율은 각각 26.0 및 60.3%를 보여, S기 할구를 공핵란으로 사용한 핵이식 수정란보다 G₁기 할구를 공핵란으로 사용한 핵이식 수정란에서 유의적인(P<0.05) 발달율 증가를 나타내었다.

Collas와 Robl(1991)은 32-세포기 S기의 공핵란을 사용한 경우 30~40%의 발달율을 보였으며, Modlinski와 Smorag(1991)은 16-세포기의 S기 할구로써 핵이식 하였을 경우 9.5%의 배반포 발달율을 보였고, Yang 등(1990)은 32-세포기의 S기 할구로써 핵이식 하였을 경우 상실배 이상 발달하는 것이 15%이었고, 본 실험에서는 DNA를 복제하기 전의 간기인 G₁기 할구를 공핵란으로 사용한 경우 상실배 이상의 발달율이 76.2%, S기를 사용하였을 때 44%의 발달율을 보여 본 실험에서 좀 더 높은 발달율을 보이고 있다. 또한 공핵란의 세포분열 주기를 조절한 Collas 등(1992a)은 G₁기의 공핵란 및 M II 난자를 수핵란으로 사용하여 핵이식했을 경우 71%의 높은 배반포로의 발달율을 얻었다. 박 등(1993)은 8-세포기의 S기 할구를 공핵란으로 사용하였을 때 26%의 발달율을 보였으며, 역시 박 등(1994)은 32-세포기의 S기 할구를 공핵란으로 사용하여 이와 비슷한 발달율을 보였다. 또한, 이 등(1995)도 G₁기의 할구를 사용하여 60% 정도의 발달율을 얻고 있어서 G₁ 및 S기의 할구를 공핵란으로 사용하여 비교한 본 실험과 비슷한 결과를 보이고 있다.

4. 핵이식 수정란의 평균 할구수 및 세포분열 주기

32-세포기의 S 및 G₁기 할구를 공핵란으로 사용하여 핵이식을 실시한 다음 수핵란 세포질과 공핵란 할구의 융합 후 토끼 난관 상피세포와 같이 10% FCS가 포함된 M-199 배양액에서 120시간 동안 공배양하여 배반포기의 단계로 발달한 핵이식 수정란을 Hoechst 33342로서 핵을 형광 염색을 하여 형광현미경하에서 할구의 수를 측정하였고, 그들의 하루 평균 세포분열 주기를 비교 조사하여 수핵란 세포질의 상태에 따른 핵이식 수정란의 체외발달 능력을 비교 검토하였던 결과는 Table 4에 나타난 바와 같다.

핵이식 수정란을 120시간 동안 배양하였을 때 평균 할구수가 S기 할구를 공핵란으로 사용한 핵이식 수정란에서 136.6개, G₁기 할구를 공핵란으로 사용한 경

Table 4. Effect of cell cycle of donor nuclei on blastomere counts and daily cell cycle of nuclear transplant rabbit embryos *in vitro* developed to blastocyst stage at 120 hours post-fusion

Cell cycle of donor nuclei	No. of embryos stained	No. of blastomeres*	Mean no. of cell cycle / day
S	10	136.6±30.5 ^a	1.42±0.99 ^a
G ₁	10	179.6±19.0 ^b	1.50±0.85 ^b

* Mean±SEM.

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

우 179.6개로 할구의 수에서 현저하게 차이를 나타내었고, 1일 동안 핵이식 수정란의 평균 세포분열 주기는 각각 1.42회 및 1.50회를 나타내어 G₁기 할구를 공핵란으로 사용한 핵이식 수정란에서 체외발달 능력이 증가함을 알 수 있었다.

Stice와 Robl(1988)은 토끼의 8-세포기 수정란의 할구를 이용하여 핵이식한 다음 120시간 배양하였을 때 할구의 수는 91±10.2개 였다고 하였는데, 본 실험에서는 120시간 배양하여 평균 할구수는 179.6±19.0개로 보다 빠른 분할이 일어났다. 이 등(1995)은 핵이식 수정란을 120시간 동안 배양하였을 때 평균 할구수가 210개이었다고 한 바 있다. 또한 노 등(1994)은 hCG 주사와 교미 후 24시간에 회수된 1- 또는 2-세포기의 토끼 수정란을 토끼 난관 상피세포와 같이 M-199 배양액에서 72시간 배양하였던 바 할구의 수가 216.0±33.6개로 발달되었다고 한다. 본 실험에서는 핵이식 수정란을 120시간 공배양하였을 때 할구의 수는 정상 수정란보다 적었다. Yang 등(1990) 및 Modlinski와 Smorag(1991)도 이와 같은 결과를 보고한 바 있다. Northey 등(1991)은 소에서 수정 전에 난자 세포질의 제거는 할구수의 감소를 가져온다고 보고하였고, Bolton 등(1984)은 전핵 단계에서 세포질의 제거는 수정란 유래 유전물질의 활성화가 일어나지 않는다고 하였다. 그러나 Kato 등(1994)은 2-세포기의 생쥐 수정란을 미세조작으로 세포질을 감소시켰을 때 배반포로의 발달율은 유의적으로 감소하였으나 포배강 형성 시간, 할구수 및 산자의 생산율에는 영향을 미치지 않았다.

Von Beroldingen(1981)은 *Rana pipiens*에서 공핵란의 세포주기의 조절은 핵이식 효율을 향상시키며, Barnes 등(1987)은 생쥐에서 1-세포기나 2-세포기의 공핵란으로 핵이식했을 경우에 이러한 공핵란의 발달 단계가 중요한 것이 아니라 세포분열 주기가 가장 중요한 요소라고 보고하였다. 또한 Kato 등(1993)은 만약 공핵란이 G₁기의 세포주기에 있다면 핵이식 수정란은 정상적인 핵형을 가질 것이라고 보고하였다. 이러한 결과에서 S기의 할구를 공핵란으로 사용한다면 핵이식 수정란에서 염색체의 이상이 많이 생길 것이고 이러한 염색체의 손상은 정상 수정란에서도 발달에 지대한 영향을 미치게 되고 핵이식 수정란에서도 염색체의 손상이 많이 생겼다면 핵이식 수정란의 발달을 지연시키거나 지연될 것이고, 일정시간 동안 배양한 후 배반포를 형성할 때 할구수의 감소를 가져올 것이라고 사려된다. Takagi와 Sasaki(1976)는 생쥐의 수정란에서 세포분열 주기가 염색체의 배수성이 2배수성보다 3배수성에서 더 길어진다고 보고하였다. 또한, Modlinski와 Smorag(1991)은 핵분열없이 세포질분열이 일어나고 4-세포기 단계에서 premature compaction이 일어나며, 상실배에서 compaction이 일어나지 않는 핵이식 수정란의 발달 이상을 보고하고 있고, Diberardino와 Hoffer(1970)는 수정란의 발달에서 상실배 단계의 compaction의 부족은 염색체의 이상 때문이라고 보고하였다. 본 실험에서도 핵이식 수정란의 발달이 2-세포기와 치밀 상실배에서 발달이 지연되는 경우가 많았다. 이러한 이유는 비정상적인 핵형이나 DNA를 가지기 때문이라고 사려된다. 토끼에서 수정란의 유전자 활동을 하는 시기는 2-세포기부터 시작을 하고(Van Blerkom과 Marnes, 1974 ; Cotton 등, 1980), 비정상적인 염색체 혹은 DNA를 소유한 핵이식 수정란은 유전자 활성의 부족으로 인하여 2-세포기에서 발달이 정지되거나 상실배 단계에서 할구들이 응집하지 못하여 발달이 지연 혹은 정지될 것이다. 또한, Fischer 등(1990)은 발달 지연은 상실배에서 배반포기로 발달할 때 가장 현저하게 나타난다고 보고하였고, Bavister(1995)는 토끼의 수정란이 상실배 단계에서 난관에서 자궁으로 전이되는데 이 전이의 시기에 발달 정지 현상이 나타난다고 한다.

핵이식 수정란은 염색체의 손상뿐만 아니라 미세조작에 의한 물리적 손상과 미세조작 및 세포주기 조절

에 사용하는 cytochalasin B, colcemid 및 aphidicolin 등에 과다하게 노출됨으로써 세포의 구성물질에 화학적 손상을 입게 되고, 이러한 결과는 핵이식 수정란의 체외발달능력을 감소시키는 결과를 가져온 것이라고 사려된다. Kato와 Tsunoda(1992) 및 Pinto-Correa 등(1995)도 이러한 물질들은 발달에 장애가 될 수 있다고 보고하였다. Stice와 Keefer(1993)도 역시 핵이식 수정란의 화학적 손상과 미세조작에 의한 물리적 손상이 나타날 수 있다고 한다. 또한, Otaegui 등(1994)은 세포주기 조절을 위해 사용하는 nocodazole의 유해한 효과는 방추사를 형성하는 것을 방해할 뿐만 아니라 세포내 존재하는 다양한 종류의 microtubules의 파괴가 일어난다고 보고하고 있다. 이러한 microtubules에 유해한 효과는 상실배에서 세포의 극성화와 compaction에 영향을 미치고 순서적인 발달에 영향을 준다고 한다(Maro 등, 1980). 또한 Schumacher와 Fischer(1988) 및 Bedford와 Dobrenis(1989)는 토끼의 수정란이 가시광선이 노출되었을 때 DNA의 손상을 주고, 25℃의 실온에 노출되었을 때 세포내 기관의 이동과 세포골격에 손상을 주어 발달이 지연된다는 것을 보고하였다. Aman과 Parks(1994)도 역시 성숙된 소의 난자가 25℃의 실온에 노출되었을 때 제 2감수분열의 중기에 있는 방추사와 염색체가 비가역적인 변화를 일으켜 심각한 발달 장애를 일으킨다고 보고하며, Nakayama 등(1994)은 가시광선이 난자내 독성이 되는 과산화수소수(H₂O₂)를 생성한다고 한다. 또한 많은 체외배양 방법에서 fetal calf serum(FCS)을 첨가하고 이러한 FCS는 배양액 내의 유해물질을 제거하고 수정란이 발달하는데 단백질의 공급원이 된다고 하나 Dorland 등(1994)은 면양 수정란의 체외배양에서 이러한 FCS가 mitochondria의 퇴화를 일으켜 에너지 대사에 손상을 주어 발달에 장애를 준다고 한다.

IV. 적 요

본 연구는 토끼를 사용하여서 공핵란으로 32-세포기의 S 및 G₁기 할구를 공핵란으로 사용하여 공핵란의 세포주기에 따른 핵이식 수정란의 체외 발달율을 조사하고자 하였다.

과배란시킨 토끼의 난관으로부터 hCG 주사로부터

48시간째에 16-세포기의 수정란을 채란하고 16-세포기의 수정란은 할구의 세포주기를 32-세포기의 G₁기로 조절하였다. 공핵란의 세포주기 조절은 microtubules 생성 억제제인 0.5 µg/ml의 colcemid에서 10시간 동안 배양하여 세포분열의 증가에 정지시키고 이를 세척 후 DNA 합성 억제제인 0.1 µg/ml의 aphidicolin에서 1.5~2시간 배양하여 세포분열을 재개시킨 다음 32-세포기의 G₁기로 세포주기를 동기화시켰다. 분리된 32-세포기 G₁기의 할구 세포는 탈핵한 난자의 위란강에 미세조작으로 주입하여 hCG 주사로부터 20시간까지 0.1 µg/ml의 aphidicolin이 첨가된 M-199 배양액에서 배양한 다음 직류 전류로서 세포의 융합과 난자의 활성화를 유도하였다. 융합이 확인된 핵이식 수정란은 120시간 공배양하였고, 배반포기까지 발달한 것을 Hoechst 33342 staining dye로 핵염색을 실시하여 할구수를 비교 조사하였다.

세포주기를 동기화하기 위하여 10시간 동안 colcemid 처리 혹은 10시간 동안 colcemid 처리 후 6시간 동안 aphidicolin 처리를 하였을 때 할구의 생존율은 각각 96.8 및 91.8%를 나타내어 유의적인 차이를 나타내지 않았고, 높은 생존율을 보였다. 또한 S 및 G₁기 할구를 공핵란으로 사용한 핵이식 수정란에서 각각 80.6 및 79.1%의 세포융합율을 보여 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 이들 융합된 핵이식 수정란을 120시간 공배양하였던 바, 이들의 배반포로의 발달율은 S 및 G₁기 할구를 공핵란으로 사용한 핵이식 수정란에서 26.0 및 60.38%를 보여 G₁기 할구를 공핵란으로 사용한 유의적으로 ($P < 0.05$) 높은 핵이식 수정란의 발달율을 보였다. 역시 S 및 G₁기 할구를 공핵란으로 사용한 핵이식 수정란에서 평균 할구수는 각각 136.6 및 179.6개로서 유의적인 차이를 보였으며, 또한 1일간의 평균 세포분열 주기 회수는 각각 1.42 및 1.50회로 S기의 할구를 공핵란으로 사용한 핵이식 수정란에서 120시간의 체외배양 기간동안에 G₁기를 공핵란으로 사용한 핵이식 수정란보다 세포분열 주기가 지연되었다.

이러한 결과를 종합해 보면 핵이식 수정란의 발달율을 개선하기 위해서는 G₁기에 있는 할구를 공핵란으로 사용하여 융합한 다음 핵이식 수정란을 생산하는 것이 핵이식 수정란의 발달율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

V. 참고문헌

1. Aman, R. R. and J. E. Parks. 1994. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosome of *in vitro*-matured bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 50:103-110.
2. Barnes, F. L., J. M. Robl and N. L. First. 1987. Nuclear transplantation in mouse embryos : Assessment of nuclear function. *Biol. Reprod.* 36:1267-1274.
3. Barnes, F. L., P. Collas, R. Powell, W. A. King, M. Westhusin and D. Sheperd. 1993. Influence of recipient oocyte cell cycle stage on DNA synthesis, nuclear envelope breakdown, chromosome constitution and development in nuclear transplant bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 36:33-41.
4. Bavister, B. D. 1995. Culture of preimplantation embryos : Facts and artifacts. *Hum. Reprod.* update 1:91-148.
5. Bedford, J. M. and A. Dobrenis. 1989. Light exposure of oocytes and pregnancy rates after their transfer in the rabbit. *J. Reprod. Fert.* 85:477-481.
6. Bolton, V. N., P. J. Oades and M. H. Johnson. 1984. The relationship between cleavage, DNA replication and gene expression in the mouse 2-cell embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 79:139-169.
7. Briggs, R. and T. J. King. 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 38:455-463.
8. Campbell, K. H. S., W. A. Pitchie and I. Wilmut. 1993. Nuclear cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos : Implications for deoxyribonucleic acid replication and development. *Biol. Reprod.* 49: 933-942.

9. Cheong, H. T., Y. Takahashi and H. Kanagawa. 1993. Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into oocytes. *Biol. Reprod.* 48: 958-963.
10. Cheong, H. T., Y. Takahashi and H. Kanakawa. 1994. Relationship between nuclear remodeling and subsequent development of mouse embryonic nuclear transferred to enucleated oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 37:138-145.
11. Christmann, L., T. Jung and R. M. Moor. 1994. MPF components and meiotic competence in growing pig oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 38:85-90.
12. Collas, P., and J. M. Robl. 1991. Relationship between nuclear remodelling and development in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 45: 455-465.
13. Collas, P., C. Pinto-Correia, F. A. Ponce De Lean and J. M. Robl. 1992(b). Effect of donor cell stage on chromatin and spindle morphology in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 46:501-511.
14. Collas P., J. Balise, G. A. Hofmann and J. M. Robl. 1992(a). Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 46:492-500.
15. Cotton, R. W., C. Manes and b. A. Hamkalo. 1980. Electron microscopic analysis of RNA transcription preimplantation rabbit embryos. *Chromosoma* 79:169-178.
16. DiBerardino, M. A. and N. Hoffner. 1970. Origin of chromosomal abnormalities in nuclear transplant a reevaluation of nuclear differentiation and nuclear equivalence in amphibians. *Dev. Biol.* 23:185-209.
17. Dorland, M., D. K. Gardner and A. O. Trounson. 1994. Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in ovine embryos. *J. Reprod. Fertil. Abstract. Series* No. 13:25(abstract).
18. Fischer, B. T., C. Jung, C. Hegele-Hartung and H. M. Beier. 1990. Development of preimplantation rabbits embryos in uterine flushing-supplemented culture media. *Mol. Reprod. Dev.* 27:216-223.
19. Gerhart, J., M. Wu. and N. W. Kirschner. 1984. Cell cycle dynamics of an M-phase specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *J. Cell Biol.* 98:1247-1255.
20. Illmensee, K. and P. C. Hoppe. 1981. Nuclear transplantation in *Musculus* : Developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell* 23:9-18.
21. Kato, Y., T. Oguro and Y. Tsunoda. 1994. Effects of the reduction of cytoplasm of mouse 2-cell embryos on blastocoele formation timing and developmental ability *in vitro* and *in vivo*. *Theriogenology* 41:1483-1488.
22. Kato, Y. and Y. Tsunoda. 1993. Totipotency and pluripotency of embryonic nuclei in the mouse. *Mol. Reprod. Dev.* 36:276-278.
23. Kato, Y. and Y. Tsunoda. 1993. Totipotency and pluripotency of embryonic nuclei in the mouse. *Mol. Reprod. Dev.* 36:276-278.
24. Kono, T., O. Y. Kwon, T. Watanabe and T. Nakahara. 1992. Development of mouse enucleated oocytes receiving a nucleus from different stages of the second cell cycles. *J. Reprod. Fert.* 94:481-487.
25. Maro, B., S. K. Howlett and M. Webb. 1985. Non-spindle microtubule organizing centers in metaphase II-arrested mouse oocytes. *J. Cell Sci.* 101:1665-1672.
26. Modlinski, J. A. and Z. A. Smorag. 1991. Preimplantation development of rabbit embryos after transfer of embryonic nuclei into different cytoplasmic environment. *Mol. Reprod. Dev.* 28:361-372.
27. Murray, A. W. and M. W. Kirschner. 1989.

- Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* 339:275-280.
28. Nakatama, T., Y. Noda, Y. Goto and T. Mon. 1994. Effects of visible light and other environmental factors on the production of oxygen radicals by hamster embryos. *Theriogenology* 41:499-510.
 29. Northey, D. L., P. R. Nuttleman and C. F. Rosenkrans. 1991. Removal of bovine oocyte cytoplasm prior to fertilization reduces cell numbers in embryos. *Biol. Reprod.* 156(abstract).
 30. Otaegui, P. J., G. T. O'neill, K. H. S. Campbell and I. Wilmut. 1994. Transfer of nuclei from 8-cell stage mouse embryos following use of nocodazole to control the cell cycle. *Mol. Reprod. Dev.* 39:147-152.
 31. Pinto-Correia, C., C. R. Long, T. Chang and J. M. Robl. 1995. Factors involved in nuclear reprogramming during early development in the rabbit. *Mol. Reprod. Dev.* 40:292-304.
 32. Pinto-Correia, C., P. Collas, F. A. Ponce De Leon and J. M. Robl. 1993. Chromatin and microtubule organization in the first cell cycle in rabbit parthenotes and nuclear transplant embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 34:33-42.
 33. Pursel, V. G., R. J. Wall Jr, C. E. Rexroad, R. E. Hammer and R. L. Brinster. 1985. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenology* 24:687-691.
 34. Robl, J. M., R. Prather, F. L. Barnes, W. H. Eyestone, D. Northey, B. Gilligan and N. L. First. 1987. Nuclear transplantation in bovine embryos. *J. Anim. Sci.* 64:642-647.
 35. Schumacher, A. and B. Fischer. 1988. Influence of visible light and room temperature on cell proliferation in preimplantation rabbit embryos. *J. Reprod. Fert.* 84:197-204.
 36. Stice, S. L., C. L. Keefer, M. Maki-Laurila and L. Matthews. 1993. Donor blastomere cell cycle stage affects developmental competence of bovine nuclear transfer embryos. *Theriogenology* 39:318(abstract).
 37. Stice, S. L. and J. M. Robl. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 39:657-664.
 38. Takagi, N. and M. Sasaki. 1976. Digynic triploidy after superovulation in mice. *Nature* 264:278-281.
 39. Van Blerkom, J. and C. Manes. 1974. Development of preimplantation rabbits embryos *in vivo* and *in vitro* II : A comparison a quantitative aspects of protein synthesis. *Dev. Biol.* 40:40-51.
 40. Von Beroldingen, C. H. 1981. The developmental potential of synchronized amphibian cell nuclei. *Dev. Biol.* 81:115-126.
 41. Willadsen S. M. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 320:63-65.
 42. Yang, X, L. Zhang, A. Kov cs, C. Tobback and R. H. Foote. 1990. Potential of hypertonic medium treatment for embryos micro-manipulation II : Aassessment 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.
 43. 노규진, 이효종, 송상현, 윤희준, 박충생. 1994. 수정란의 체외발달에 미치는 배양액 및 소와 토끼의 난관상피세포들과의 공배양 효과. *한국가축번식학회지* 18(1): 39-46.
 44. 박충생, 전병균, 이효종, 최민철, 최상용. 1994. 토끼에서 공핵란의 발달단계가 할구주입, 전기융합 및 핵이식 수정란의 체외발달에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지* 9(2): 153-160.
 45. 박충생, 최상용, 이효종, 최민철, 정미경, 박준규. 1993. 제2세대 핵이식에 의한 복제배의 체외발달에 관한 연구. *한국수정란이식학회지.* 8(2): 159-

- 163.
46. 이효종, 전병균, 박충생, 최상용, 윤창현, 강대진.
1995. 반복핵이식에 의한 복제동물 생산에 관한 연구. II. 토끼에서 공핵배의 세포주기 조절에 의한 제2세대 복제배의 생산효율 개선. 한국수정란 이식학회지10(1): 73-82.
47. 이효종, 최민철, 최상용, 박충생, 윤창현, 강대진.
1993. 반복핵이식에 의한 복제동물 생산에 관한 연구. I. 토끼 수핵난자의 전기자극에 의한 활성화. 한국수정란이식학회지 8(2): 151-154.