

토끼에서 공핵수정란의 발달단계에 따른 복제수정란의 생산 효율

이효종¹ · 윤희준 · 강태영 · 조성근* · 박충생* · 최상용
경상대학교 수의학과, *축산학과

Efficiency of Production of Cloned Embryos by Nuclear Transplantation with Nuclear Donor Embryos of Different Cell-stages in Rabbits

Hyo-jong Lee¹, Xi-Jun Yin, Tae-young Kang, Seong-keun Cho*,

Choong-saeng Park* and Sang-yong Choe

Departments of Veterinary Medicine and *Animal Science,
Gyeongsang National University, Chinju, 660-701, Korea

ABSTRACT : This study was carried out to evaluate the efficiency of production of cloned embryos by nuclear transplantation (NT) when using 4-cell to compact morula stage embryos as nuclear donor. In micromanipulation and electrofusion of blastomeres from 4-cell to morula stage embryos, the successful injection rate was higher with late stage blastomeres, on the contrary the fusion rate was lower. The *in vitro* developmental rate of NT embryos was not significantly different between cell-stages of donor blastomeres. Although the overall rate of production of cloned embryos with 4-cell, 8-cell, early and late morula stage embryos was 14.0, 18.0, 15.3 and 14.1%, respectively, the mean number of blastocysts produced with a donor embryo was the most (4.51) with the compact morulae. Therefore, It can be suggested that the embryos at the late stage is more beneficial for the multiple production of cloned embryos, if the late stage blastomeres have maintained their totipotency to produce intact offspring.

Key words : nuclear transfer, cloning, electrofusion, rabbit embryo

서 론

포유류에서는 Illmensee와 Hoppe⁷가 처음으로 생쥐에서 핵이식기법을 활용하여 산자생산에 성공한 이래 가축에서는 Willadsen¹⁴이绵양에서, Stice 등¹²은 토끼에서, 그리고 Prather 등¹⁰은 소에서 핵이식에 의한 산자생산을 보고 하였다. 또한 Bondioli 등¹은 하나의 수정란으로 일란성 7쌍자의 숫송아지를 생산하였고, Kwon 과 Kono⁸는 일란성 6쌍자의 마우스를, Collas와 Robl⁶은 토끼에서 일란성 6쌍자를 생산하여 핵이식기술의 실용화에 가능성을 제시하고 있으나 낮은 효율성의 문제점으로 많은 개선이 필요한 실정이다.

복제산자의 생산효율을 높이기 위해서는 개개의 수정란으로 이식가능한 복제수정란을 최대한 많이 생산하는 것이 우선적으로 필요하며 이를 위하여 할구수가 많은 후기수정란이 공핵란으로 제시되며 실제로 stem cell 단계까지 핵을 사용하여 핵이식 산자 생산이 보고되고^{9,13} 있지만 전능성에 대해 아직 논란이 많다. 소¹, 양¹¹, 토끼^{15,5}에서는 32-세포기에서 64-세포기까지의 수정란을 사용하여 산자생산이 가능함이 입증되었지만 핵이식에 의한 복제수정란의 생산 효율성에 대해서는 정확한 비교조사가 미흡하여 많은 검토와 연구가 수반되어야 한다고 본다.

그러므로, 본 연구에서는 토끼를 모델 동물로 핵이식에 의한 복제수정란의 생산 효율을 조사하기 위하여 수정란의 발달 단계에 따른 할구주입율, 핵융합율 및 핵이식 수정란의 체외 발달 능력을 조사하여 핵이식 복제수정란 작출시 효율적인 공핵란을 검토하고자 실시하였다.

이 논문은 1992년도 한국과학재단에서 지원한 특정기초 연구 지원 사업비로 연구되었음(KOSEF:92-24-00-10).

¹Corresponding author.

재료 및 방법

공시동물 및 사양관리

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

수핵난자의 확보

핵을 수여받을 난자의 확보를 위한 과배란 유기는 성숙한 암토끼를 10 mg의 FSH (Folltropin-V[®], Vetrepharm, Australia)를 하루에 한번 3일 동안 피하주사하고, 마지막 투여 12시간 후 hCG (Puberogen[®], Sankyo Zoki Co, Japan) 100 IU를 정맥주사하였다. 수핵난자는 hCG 주사 후 13~15시간에 암토끼를 chlorpromazine HCl과 ketamine HCl로 전신마취한 다음 개복 수술하여 난관으로부터 성숙난자를 10% FCS가 함유된 D-PBS로 회수하였다. 회수된 난자는 300 IU/ml의 hyaluronidase (Sigma Chem Co, USA)에서 39°C, 5% CO₂ 조건에서 7분간 배양한 다음, 내경 150 µm fire-polished pipette으로 난구세포를 제거하여 제1극체가 명확하고 세포질이 충실한 것만을 사용하였다.

공핵수정란의 확보

핵을 수핵난자에 공급할 수정란을 제공할 토끼의 과배란유기는 전항과 같이 과배란을 유기한 다음 성숙된 숫토끼와 교미시켰다. 4-, 8-, 초기상실배(11-21 cell), 후기상실배(27-37 cell)세포기에 있는 수정란은 hCG 주사 후 30, 40, 44 및 60시간째에 채란하였다. 수정란은 0.5%의 pronase (Sigma Chem Co, USA)에서 8분간 배양한 다음 내경 150 µm 정도의 pipette으로 투명대를 제거하고 이들을 다시 내경 50 µm 정도의 pipette으로 Ca²⁺와 Mg²⁺가 없는 PBS에서 할구를 분리하여 미세조작에 사용하였다.

미세조작에 의한 탈핵과 핵주입

수핵란의 탈핵을 위한 미세조작은 Stice와 Robl¹² 그리고 Collas와 Robl³의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 수핵난자와 공핵수정란으로부터 분리된 할구세포를 7.5 µg/ml의 cytochalasin B (Sigma Chem Co, USA) 그리고 10% FCS가 함유된 Earl's balanced salt solution (EBSS, Sigma Chem Co, USA)에서 미세조작 15 분전에 전처리를 하였고, 미세조작을 위하여 micromanipulators (Narishige Co, Japan)를 DIC 도립현미경 (Nikon Co, Japan)위에 장치하였다. 미세조작 또한,

7.5 µg/ml의 cytochalasin B와 10% FCS가 함유된 EBSS에서 실시하였고, 탈핵은 non-distruptive 조작법에 의하여 실시하였다. 즉, 성숙된 난자로부터 핵을 제거하기 위하여 외경 30 µm의 연마된 미세 pipette을 투명대 내로 진입시키고 제1극체와 그 주위에 위치하는 핵을 원형질막에 싸여진 채로 흡입하여 제거하였다. 한편, 공핵수정란으로부터 분리된 할구세포 하나를 미세 pipette에 흡입하고 이를 미세조작으로 탈핵된 수핵난자의 원형질 바깥 위관막강에 주입하였다.

핵의 융합과 난자의 활성화

· 핵이 주입된 난자는 Collas 등³의 방법에 따라 핵융합을 실시하였다. 전기자극은 전압은 직류전압 3.6 kV/cm, 통전시간은 60 µsec 및 통전횟수는 3회 30분 간격으로 실시하였다. 융합과 난자의 활성화를 위한 용액은 100 µM CaCl₂ 및 MgCl₂가 함유된 0.30 M mannitol 용액으로, 30°C 에서 예열된 간격이 0.5 mm 인 chamber에 충분히 넣은 후 할구가 이식된 난자를 넣어 정렬시키고 Electro Cell Manipulator 200 (BTX Inc, USA)로 핵의 융합과 난자의 활성화를 유도하였다. 난자의 세포질과 핵의 융합이 확인된 난자는 7.5 µg/ml의 cytochalasin B와 10% FCS가 함유된 M-199 배양액(Earl's salt, Sigma Chem Co, USA)에서 1시간 동안 배양한 다음 10% FCS가 함유된 M-199 배양액으로 옮겨 체외배양하였다.

통계학적 분석

실험결과는 Chi-square test를 실시하여 평균간의 차이에 대한 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

공핵란의 발달단계에 따른 핵주입 및 핵융합효과

공핵란의 발달 단계에 따른 핵주입율 및 융합율을

Table 1. Efficiency of nuclear injection and fusion of blastomeres of different embryonic stages in rabbits

Cell stage of donor nucleus	No. of oocytes (%)		
	Used	Injected	Fused/injected
4-cell	57	44(77.2)	44(100)
8-cell	86	80(93.0)	76(95.0)
Early morula	93	90(96.8)	79(87.8)
Compact morula	82	77(93.9)	45(79.0)

*The values within the column are not significantly different(P>0.05).

조사한 결과는 Table 1 에 나타난 바와 같다. 4-, 8-, 초기 상실배 및 후기 상실배 세포기의 할구를 탈핵된 수핵난자에 성공적으로 주입한 효율은 각각 77.2, 93.0, 96.8 및 93.9% 로서, 8-세포기 이후의 할구에서 90% 이상의 높은 주입율을 보였다. 이들을 전기세포융합시켜 보았던 바, 융합율은 각각 100, 95.0, 87.8 및 79.0% 로서 발달된 할구일수록 융합율은 점차 낮아지는 경향을 보였으나 유의적 차이(P<0.05)는 인정되지 않았다.

Collas와 Robl⁴은 8- 및 32-세포기 할구를 탈핵된 수핵난자에 핵이식한 다음 BTX Electro Cell Manipulator 200으로 2.0 kv/cm, 60 μsec 의 직류전류로 30분 간격으로 6회 실시하여 100%의 융합율을 보였고, Yang 등¹⁶은 같은 기종의 융합기를 사용하여 8-, 16-, 32-세포기의 할구들을 이용하여 탈핵된 수핵난자에 주입하고 교류 전류로서 핵이식 난자를 정렬한 다음 2.4 kv/cm, 60 μsec의 직류전류로 융합 자극을 주어 63, 66 및 64%의 융합율을 보였다. 융합율은 전기자극의 크기, 난자 성숙도, 탈핵정도와 할구크기, 융합액 등 복잡한 요소에 의해 영향을 받으므로 연구자에 따라 큰 차이를 나타낸다고 사료된다.

공핵란의 발달단계에 따른 핵이식 난자의 체외발달 및 배반포 생산효율성

공핵란의 발달 단계에 따른 핵이식 난자의 체외발달율을 조사한 결과는 Table 2 에 나타난 바와 같다. 4-, 8-, 초기 상실배 및 후기 상실배 세포기의 할구들에서 배반포 형성율은 각각 18.1, 20.4, 18.0과 19.0%로 유의성있는 차이를 보이지 않았다. 또한 하나의 수정란으로 핵이식을 실시하여 배반포기의 복제수정란을 생산하는 효율은 4-, 8-, 초기 상실배 및 후기 상실배기의 수정란에서 각각 14.0, 18.0, 15.3 및 14.1%로

서 유의성있는 차이를 보이지 않았다. 그러나 수정란 한개당 복제수정란 생산수는 각각 0.56, 1.44, 2.45 및 4.51개로서 4-, 8-세포기보다는 후기상실배기 수정란을 핵공급원으로 사용하는 것이 더욱 효율적인 것으로 나타났다.

Yang 등¹⁶은 8-, 16- 및 32-세포기에서 핵이식후 상실배 및 배반포로의 발달율이 각각 22, 16 및 15%로 본 연구의 결과와 일치하나, Collas 등⁴ 이 보고한 8- 및 32-세포기에서 42와 33% 보다 낮은 결과를 나타내었다. Collas 등⁴은 MII의 난자에 G1 단계의 32-세포기 할구를 이식하여 71% 의 배반포의 발달율을 얻었으나 후기 S 단계의 할구사용시는 15%의 발달율을 보여 핵 세포주기의 중요성을 제시하고 있으며, Campbell 등²은 양에서 MII의 난자에 S 단계의 할구를 이식시 21.3%의 배반포 발달율을 보였으나 난자를 활성화하여 초기, 중기, 후기의 S단계로 추정되는 난자에 S 단계의 할구를 이식시 61.3, 45.7 및 57.7%의 발달율을 보여 난자의 세포주기도 제조조합발달에 큰 영향을 미침을 시사하고 있다. 이에 비해 본 연구에서의 낮은 배반포 발달율은 세포주기를 조절하지 않은데 기인한 것으로 사료되며, 앞으로 공핵수정란과 수핵난자의 세포주기 조절로 발달율을 높일 수 있으리라 기대한다.

Zakhartchenko 등¹⁷은 배반포의 Inner cell masses의 할구를 사용하여 핵이식시 1개의 배반포로 3.2±1.5개의 복제 배반포를 생산하였고, 68~78 세포수를 가진 후기 상실배 할구를 핵공급원으로 사용할 때 9.3±6.3개, 25-~64-세포기의 상실배를 사용할 때에는 6.3±4.4개의 핵이식 복제배반포를 생산하여 할구수가 많은 후기 상실배 단계를 donor로 사용할 때 핵이식 배반포생산에 더욱 효과적임을 나타냈다. 그러나 공핵란의 발달이 진행될수록 할구의 개수는 많아지므로

Table 2. Efficiency of production of cloned embryos using nuclei of different embryonic stages by nuclear transplantation and *in vitro* culture

Cell stage of donor nucleus	No. of embryos cultured	No. of embryos developed to blastocyst(%)	Mean no. of blastocysts/donor embryos	Overall rate (%)
4-cell	44	8(18.1) ^a	0.56	14.0 (77.2×100.0×18.1)
8-cell	49	10(20.4) ^a	1.44	18.0 (93.0×95.0×20.4)
Early morula	50	8(18.0) ^a	2.45	15.3 (96.8×87.8×18.0)
Compact morula	42	8(19.0) ^a	4.51	14.1 (93.9×79.0×19.0)

*The values with same superscripts(a) in the column are not significantly different (P>0.05).

더 많은 복제배반포를 생산할 수 있어 복제수정란 생산에는 효과적이나 실제 복제동물생산에도 유효할 지 즉, 전능성의 소실 여부에 대해 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

결 론

본 연구는 핵이식에 의한 복제수정란의 생산효율을 조사하기 위하여 초기수정란의 발달 단계에 따른 할구주입율, 핵융합율 및 핵이식 수정란의 체외 발달 능력을 조사하였다. 4-세포기, 8-세포기, 초기 상실배기 및 후기 상실배기 수정란의 할구주입율은 각각 77.2, 93.0, 96.8 및 93.9% 이며 이들의 핵융합율은 각각 100, 95.0, 87.8 및 79.0% 로서 유의적인 차이를 나타내지 아니하였다. 이들 융합된 핵이식 난자는 10% FCS가 함유된 M-199 배양액에서 토끼 난관 상피세포 층과 같이 공배양하였던 바, 이들의 배반포 형성율은 각각 18.1, 20.4, 18.0 및 19.0% 를 보여 세포기간에 유의적 차이는 없었으나 4-세포기, 8-세포기, 초기 상실배기 및 후기 상실배기 수정란의 할구를 모두 공핵란으로 사용할 때 1개의 수정란으로 각각 0.56, 1.44, 2.45 및 4.51개의 복제수정란을 생산할 수 있어 효율면에서 후기수정란을 공핵란으로 사용함이 더욱 유리하다고 사료된다.

참고문헌

- Bondioli KR, Westhusin ME, Loomey CR. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenology* 1990; 33: 165-174.
- Campbell KHS, Loi P, Cappai P, Wilmut. Improved development to blastocyst of ovine nuclear transfer embryos reconstructed during the presumptive S-phase of enucleated activated oocytes. *Biol Reprod* 1994; 50: 1385-1393.
- Collas P, Robl JM. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. *Biol Reprod* 1990; 43: 877-884.
- Collas P, Robl JM. Relation between nuclear remodeling and development in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod* 1991; 45: 455-465.
- Collas P, Balise JJ, Robl JM. Influence of cell stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod* 1992; 46: 492-500.
- Collas P, Robl JM. Development of rabbit nuclear transplant embryos from morula and blastocyst stage donor nuclei. *Theriogenology* 1991; 35: 190.
- Illmensee K, Hoppe PC. Nuclear transplantation in *Musculus* : Developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell* 1981; 23: 9-18.
- Kwon OY, Kono T. Development of mouse embryos reconstituted with 4-cell nuclei at metaphase with nocodazole. *Korean J Emb Trans* 1996; 11(2): 95-101.
- Keefer CL, Stice SL, Matthews DL. Bovine inner cell mass cells as donor nuclei in the production of nuclear transfer embryos and calves. *Biol Reprod* 1994; 50: 935-939.
- Prather RS, Barnes FL, Sims MM, Robl JM, Eye-stone WH, First NL. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol Reprod* 37: 859-866.
- Smith LC, Wilmut I. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the early development *in vivo* of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol Reprod* 1989; 40: 1027-1035.
- Stice SL, Robl JM. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod* 1988; 39: 657-664.
- Stice SL, Strelchenko NS, Keefer CL, Mathews L. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. *Biol Reprod* 1996; 54: 100-110.
- Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 1986; 320: 63-65.
- Yang X, Jiang S, Kovacs A, Foote RH. Nuclear totipotency of cultured rabbit morulae to support full-term development following nuclear transplant. *Biol Reprod* 1992; 47: 636-643.
- Yang X, Zhang L, Kovacs A, Tobback C, Foote RH. 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* 1990; 27: 118-129.
- Zakhartchenko V, Palma G, Wolf E, Brem G. Blastocysts as donors for nuclear transfer in cattle. *Theriogenology* 1986: 282.