韓國家畜繁殖學會誌 21(3) : 293~302(1997)
Korean J. Animal Reprod.

미세조작조건이 소 핵이식배의 발달에 미치는 영향†

최상용 · 노규진 · 공일근* · 송상현* · 조성근* · 박준규* · 이효종 · 박충생*
경상대학교 수의과대학 수의학과

Effects of Manipulation Conditions on Development of Nuclear Transplant Bovine Embryos Derived from *In Vitro* Matured Oocytes

Choe, S. Y., K. J. Rho, I. K. Kong*, S. H. Song*, S. K. Cho*, J. K. Park*, H. J. Lee and C. S. Park*
Dept. of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

SUMMARY

Follicular oocytes of Grade Ⅰ and Ⅱ were collected from 2~6 mm ovarian follicles and matured *in vitro* (IVM) for 24 hrs in TCM-199 supplemented with 35 μg/ml FSH, 10 μg/ml LH, and 1 μg/ml estradiol-17β at 39℃ under 5% CO_2 in air. They were fertilized *in vitro* (IVF) by epididymal spermatozoa capacitated with heparin for 12 hrs. The zygotes were then co-cultured *in vitro* with bovine oviductal epithelial cells (BOEC) for 7 to 9 days.

The optimal time for IVM, the successful enucleation of IVM oocytes by micromanipulation at different oocyte ages after IVM, and the ideal culture system for IVM for effective IVF and *in vitro* development of IVM-IVF embryos was examined for *in vitro* production of nuclear recipient oocytes and nuclear donor embryos. To improve the efficiency of nuclear transplantation (NT) of IVF embryo into IVM follicular oocytes, this study evaluated the optimal electric condition and oocytes age for activation of IVM oocytes and *in vitro* development of NT embryos. *In vitro* development of NT embryos with preactivation or non-preactivation in enucleation oocytes, cell number of IVN-IVF embryos, and NT embryos were also examined.

The results obtained were as follows;

1. The most suitable enucleation time was at 24 hpm (83.3%) rather than that of 28 hpm (69.6%) and 32 hpm (50.0%).
2. There was no difference among the fusion rates of NT embryos at the voltages of 0.75, 1.0 and 1.5 kV/cm, but the *in vitro* development rates to morule and blastocyst were significantly ($P<0.05$) higher at the voltage of 0.75 (12.5%) and 1.0 kV/cm (12.6%) compared to 1.5 kV/cm (0%).
3. No significant difference in activation rates were seen in NT embryos stimulated for 30, 60 and 120 μsec (71.7, 85.2 and 71.9%, respectively), but the *in vitro* development rates to morulae and blastocyst were significantly ($P<0.05$) higher in the oocytes stimulated for 30 μsec (11.6%) and 60 μsec (10.7%) than 120 μsec (0.0%).

† 본 연구는 1996~1997년도 학술진흥재단에서 지원한 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.
* 경상대학교 축산학과(Dept of Animal Science, Gyeongsang National University)

4. The fusion rates (71.0 and 87.3%) and the *in vitro* development rates (9.1 and 12.7%) to morula and blastocyst were seen in the NT embryos stimulated at 28 and 32 hpm under the condition of 1.0 kV/ml, 60 μsec. However, at 24 hpm the fusion rates were 64.8% and the *in vitro* development to morula and blastocyst were not seen.
5. The fusion rates between the 8~12, 13~17 and 18~22-cell stage of IVM-IVF embryos were not significantly different. The *in vitro* development rates of the fused embryos to morula and blastocyst which were received from a blastomere of 8~12, 13~17 and 18~22-cell stages of IVM-IVF embryos were 14.9, 8.3 and 6.5%, respectively.
6. The *in vitro* development rate of the enucleated recipient oocytes with preactivation (24.2%) to morula and blastocyst was significantly ($P<0.05$) higher than that of non-preactivation (12.8%).
7. The cell numbers of NT blastocyst and IVM-IVF blastocyst cultured during 7~9 days were 63±11 and 119±23, and then their the mean cell cycle number were 5.98 and 6.89, respectively.

(Key words : Bovine oocyte, Activation, Nuclear transplantation)

I. 서 론

핵이식기술을 응용하면 동일한 성과 동일한 유전형질을 가진 복제동물을 대량 생산할 수 있으며, 또한 수컷과 암컷의 선발 강도를 동시에 극대화시켜 당대에 전 우군을 개량할 수 있고, 가축의 증식율과 생산성을 향상시키며, 특정유전자주입에 의한 형질전환 동물의 작출도 가능할 것이다(Ebert 등, 1984; Robl과 Stice, 1989).

McGrath와 Solter(1983)가 포유류인 생쥐에서 핵이식을 성공시킨 이래, rat(Kono 등, 1988), 토끼(Stice와 Robl, 1988; Collas와 Robl, 1990), 돼지(Prather 등, 1989), 양(Smith와 Wilmut, 1989) 및 소(Prather 등, 1987; Robl 등, 1987; Willadson, 1989; Bondioli 등, 1990) 등에서도 핵이식에 의한 산자를 생산하는데 성공하였고, 국내에서도 생쥐(Choe 등, 1992), 토끼(Lee 등, 1994), 소(Hwang 등, 1995)에서 산자 생산을 함에 따라 핵이식 기술의 응용으로 복제동물의 생상 가능성이 입증되었다.

난자는 일반 체세포와는 달리 세포주기가 짧으며 특히 G I 과 G II기는 아주 짧다. 세포분열동안 대부분 내부의 조절인자에 의해서 세포주기가 조절되며, MPF 활성화는 휴지기에 상승해 있다가 휴지기 말기에 감소됨으로써 비로소 세포분열이 진행된다. 특히, 난자는 전기자극에 의해서 1.5~2시간 후에 제 2극체가 방출되며, 4시간 후에 전핵형성이 보인다(Powell과 Barnes, 1992). 이는 MPF가 전기자극 후 2시간에 비활성화되고 DNA 합성은 4시간 후에 시작된다는 것을 의미한다. 따라서 제 2감수분열 중기에서 발달정지되어 있는 탈핵된 수핵난자를 공핵과 핵융합을 실시하기 전에 활성화 자극을 가하면 핵이식 수정란의 융합율과 발달율이 개선된다고 보고하였다(Barnes 등, 1993; Stice와 Keefer, 1993).

성숙된 난자는 이식된 핵을 reprogram하여 새로운 수정란으로 발달될 수 있으나(Prather 등, 1987; Robl과 Stice, 1989), 핵이식된 난자는 활성화 후 핵 swelling, 핵막붕괴 및 미성숙 염색체농축 등을 포함한 remodel을 하기 위해서 수핵란과 공핵할구의 세포주기 동기화가 핵이식수정란의 발달에 큰 영향을 미친다고 보고하였다(Smith 등, 1988; Stice와 Robl, 1988; Prathr와 First, 1990). 특히 난자의 활성화 및 공핵할구와 수핵란의 융합과 발달율에 대한 적정 전기자극과 수핵난자의 성숙도 역시 중요한 요인으로 작용하고 있다. 이와 같이 핵이식의 생산성 효율을 향상시키기 위해서 여러 측면에서 연구가 진행되고 있지만, 산자효율면에서 토끼 3.7%(Collas와 Ropbl, 1990), 양 4%(Smith와 Wilmut, 19879), 돼지 1%(Prather 등, 1989), 소 1%(Prather 등, 1987)와 4%(Bondioli 등, 1990)로 아직까지 만족할 만한 성적

은 기대하지 못하고 있는 실정이다.

따라서 핵이식수정란의 융합과 발달율에 따른 전기자극조건 및 수핵난자의 성숙도와 preactivation의 효과 및 공핵할구의 세포발달단계의 효과를 조사하여 핵이식기술의 적정 체계를 확립하고자 본 실험을 실시하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 수핵난자와 공핵할구의 준비

본 실험에서는 Grade Ⅰ과 Ⅱ의 난포란을 선별하여 10% FBS (Gibco, U.S.A.)가 첨가된 TCM-199 (Sigma, U.S.A.)에 sodium pyruvate(56 μg/ml), $NaHCO_3$(2.2 mg/ml), streptomycin(100 μg/ml), penicillin G(100 unit/ml), LH(10 μg/ml), estradiol-17β(1 μg/ml)와 FSH(35 μg/ml)가 첨가된 체외성숙 배양액에 24 시간 체외배양후 제 1극체가 방출되고 세포질이 충만한 난자만을 수핵난자로, 8~32-세포기로 발달한 체외수정란을 공핵할구로 공시하였다. 공핵수정란의 할구분리는 300 IU/ml pronase에 3분간 처리하여 투명대를 연화시킨 다음, Ca^{2+}, Mg^{2+} free 액에서 pipetting으로 응집된 할구를 분리하고 분리된 할구를 TCM-199 액으로 세정하였다.

2. 난포란의 체외배양시간에 따른 탈핵율 조사

체외배양시간에 따른 성공적인 탈핵율을 조사하기 위해서 24, 28 및 32 시간에 McGrath와 Solter (1983)의 방법에 준하여 탈핵하여 제거된 난자를 Pursel 등(1985)의 방법에 따라 형광염색액인 Hoechst 33342 (Sigma, U.S.A.)로 핵염색을 실시하여 형광현미경하에서 탈핵성공의 유무를 조사하였다.

3. 전기자극조건, 수핵난자의 성숙도 및 공핵할구의 발달단계에 따른 핵이식배의 발달율

핵이식수정란을 100 μM $CaCl_2$ 및 $MgCl_2$, 0.05 mg/ml BSA 가 함유된 0.28 M mannitol 용액으로 (+)극에 공핵할구를 (−)극에 수핵난자를 일직선상에 놓이도록 배열하고 두 전극을 Embryonic Cell Fusion Equipment(EYELA, Japan)에 장치하여 DC 0.75, 1.0 및 1.5 kV/cm, 30, 60 및 120μsec, 1회의 통전횟수로 전기자극을 가하여 핵과 세포질의 융합과 발달율의 최적조건을 조사하고, 24, 28 및 32 시간째의 수핵난자와 8~12, 13~17 및 18~22-세포기의 공핵할구를 사용하여 DC 0.75~1.0 kV/cm, 통전기간은 60μsec 그리고 1 회의 통전으로 고정하여 전기자극을 가하여 그에 따른 융합율 및 발달율을 비교·조사하였다.

4. Preactivation에 따른 핵이식수정란의 융합율 및 발달율

핵이식수정란의 융합율과 발달율에 대한 preactivation의 효과를 조사하기 위해서 탈핵된 수핵난자를 TCM-199 배양액에서 4 시간 배양하고, 0.28 M mannitol 용액에서 DC 1.5 kV/cm, 60μsec, 1회의 통전횟수로 전기자극을 가하여 활성화를 유도하고, 2 시간 후에 핵이식한 후 DC 0.75~1.0 kV/cm, 60μsec, 1회의 통전횟수로 전기자극을 가하여 융합율과 발달율을 비교·조사하였다.

5. 핵이식수정란의 체외배양

융합이 확인된 핵이식수정란은 TCM-199 배양액으로 3~4회 세정하여 CO_2 배양기에서 TCM-199액에 단층을 형성하고 있는 난관상피세포와 공배양하여 7~9일간 배양하면서 발달율을 조사하였으며, 배양액은 48 시간 간격으로 교환하였다. 7~9일간 배양된 배반포기의 체외성숙·수정된 수정란과 핵이식된 수정란을 Hoechst 33342로 핵염색하여 형광현미경하에서 할구수를 조사하였다.

6. 통계학적 분석

실험결과의 통계학적 분석은 χ^2-test 및 Student's t-test를 이용하여 분산분석과 유의차를 검정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 체외배양시간에 따른 난포란의 탈핵율

난포란의 체외배양시간에 따른 성공적인 탈핵율을 조사하기 위해서 24, 28 및 32 시간에 제 1극체와 그 주변의 난세포질 약 1/4~1/5을 제거하고 제거된 난자를 Hoechst 33342 로 핵염색을 실시하여 형광현미경하에서 탈핵의 유무를 조사한 결과는 Table 1과 같

Table 1. Successful enucleation of bovine follicular oocytes by micromanipulation in different age of *in vitro* matured oocytes

Age of oocytes (hours post maturation)	No. of oocytes used	No. (%) of oocytes manipulated	No. (%) of oocytes enucleated successfully /manipulated
24	36	30(85.7)[a]	25(83.3)[b]
28	27	23(85.2)[a]	16(69.6)[ab]
32	24	20(83.3)[a]	10(50.0)[a]

* Values with different superscripts were significantly different($P<0.05$).

다. 체외배양 24시간(83.3%), 28시간(69.6%), 그리고 32시간(50%)로, 24시간에 비해서 28과 32 시간의 탈핵율은 유의적인($P<0.05$) 감소를 보였다.

2. 통전전압 및 기간에 따른 핵이식배의 배발달율

핵이식수정란을 0.28 M mannitol 용액에 5 분간 평형시킨 후 60 ㎲ec의 통전기간과 1회의 통전횟수를 고정하여 DC 0.75, 1.0 및 1.5 kV/cm로 전기자극을 가하여 통전전압에 따른 핵이식수정란의 융합율과 발달율을 비교·조사한 결과 Table 2와 같다. DC 0.75 및 1.0 kV/cm를 가했을 때 융합율은 82.7 및 86.9%, 그리고 상실배기나 배반포기로의 발달율은 12.5 및 12.6%로 나타났으나, 1.5 kV/cm에서는 융합율은 72.2%로 다소 저하되었으며, 상실배기나 배반포기로 발달한 핵이식수정란은 없었다. 핵이식수정란을 DC 1.0 kV/cm, 1회의 통전자극에서 30, 60 및 120 sec 의 통전기간으로 전기자극을 가하여 통전기간에 따른 핵이식배의 융합율과 발달율을 조사한 결과 Table 3과 같다. 30, 60 및 120 ㎲ec 의 통전시간에 따른 융합율은 71.7, 85.2 및 71.9%로 60 ㎲ec 에서 다소 높았으나 유의적인 차이는 없었고, 상실배기와 배반포기로의 발달율에 있어서 30 및 60 ㎲ec의 통전시간에서는 11.6 과 10.7%의 성적을 보였으나 120 ㎲ec의 통전시간에서는 상실배기와 배반포기로의 발달을 볼 수 없었다. 그러므로 소 핵이식수정란의 적합한 전기자극조건은 DC 0.75~1.0 kV/cm, 30~60 ㎲ec의

Table 2. Effect of electric voltage on *in vitro* development of bovine NT embryos

Electric voltage (kV/cm)	No. of eggs used	No. (%) of embryos fused	No. (%) of embryos developed to /fused		
			2-cell	8-cell	Mor. & blast.
0.75	87	72(82.7)[a]	53(73.6)	22(30.5)	9(12.5)[b]
1.0	137	119(86.9)[a]	87(73.1)	33(27.7)	15(12.6)[b]
1.5	42	26(72.2)[a]	10(38.5)	2(7.8)	0(0.0)[a]

* Values with different superscripts were significantly different($P<0.05$).

Table 3. Effect of pulse duration on *in vitro* development of bovine NT embryos

Pulse duration (㎲ec)	No. of eggs used	No. (%) of embryos fused	No. (%) of embryos developed to /fused		
			2-cell	8-cell	Mor. & blast.
30	60	43(71.7)[a]	27(62.8)	14(32.6)	5(11.6)[b]
60	88	75(85.2)[a]	60(80.0)	21(28.0)	8(10.7)[b]
120	32	23(71.9)[a]	11(47.8)	2(8.7)	0(0.0)[a]

* Values with different superscripts were significantly different($P<0.05$).

전기자극을 가하는 것이 융합율과 발달율에 적합함을 알 수 있었다.

3. 수핵난자의 성숙도와 공핵할구의 발달단계에 따른 핵이식수정란의 발달율

DC 1.0 kV/cm, 60μsec 및 1회의 통전자극조건으로 수핵난자의 성숙도에 따른 융합율 및 발달율을 조사한 결과 Table 4와 같다. 체외배양 24, 28 및 32시간으로 진행된 핵이식수정란의 융합율은 64.8, 71.0 및 87.3%로써 체외배양 32시간의 수핵난자에서 높게 나타났고, 상실배기와 배반포기까지의 발달율은 32시간(12.7%)이 가장 높았고, 28시간(9.1%)이었다. 반면 24 시간의 난자는 상실배기와 배반포기로의 발달이 전혀 없었다. 8~22세포기 할구를 공핵할구로 이용하여 DC 1.0 kV/cm, 60μsec 및 1회의 통전자극조건으로 전기자극을 가해, 공핵할구의 세포발달단계에 따른 융합율과 발달율을 조사한 결과 Table 5와 같다. 공히 75% 이상의 융합율을 보였으나, 상실배기나 배반포기로의 발달율에 있어서는 8~12-세포기(14.9%)로서 13~17-세포기(8.3%)와 18~22-세포기(6.5%)보다 높았다. 따라서 핵이식수정란의 융합과 발달율을 향상시키기 위해서 체외배양시간 32시간의 난자를 수핵난자로 공핵할구는 8~12-세포기를 이용하는 것이 적합할 것으로 기대된다.

4. 수핵난자의 preactivation에 따른 핵이식수정란의 융합율 및 발달율

24 시간 체외배양된 수핵난자를 탈핵하고 체외성숙 28 시간에 DC 1.5 kV/cm, 60μsec 및 1 회의 통전자극조건으로 전기자극을 가해 preactivation을 유도한 후 체외배양 32 시간에 공핵할구를 이식하고 DC 1.0 kV/cm, 60μsec 및 1 회의 통전자극조건으로 전기자극을 가한 preactivation과 non-preactivation에 따른 핵이식수정란의 융합율과 발달율을 조사한 결과는 Table 6과 같다. 융합율에 있어서 preactivation이 85.8%로 non-preactivation (71.7%) 보다 좋은 성적이었고, 상실배기와 배반포기로의 발달율에 있어서도 preactivation이 24.2%로 non-preactivation의 12.8% 보다 유의적($P<0.05$) 차이가 인정되었다. 따라서 핵이식수정란의 융합과 발달율을 상승시키기 위해서 탈핵 후 활성화 자극을 가하고 핵이식과 전기융합을 실시하는 것이 효과적임을 알 수 있었다.

5. 핵이식수정란과 체외성숙-수정된 수정란의 평균 할구수

7~9일간 배양된 체외수정란과 핵이식수정란의 배

Table 4. Effect of age of recipient oocytes on *in vitro* development of bovine NT embryos

Oocyte age (hpm)	No. of eggs used	No. (%) of embryos fused	No. (%) of embryos developed to /fused		
			2-cell	8-cell	Mor. & blast.
24	88	57(64.8)[a]	18(31.5)	3(5.3)	0(0.0)[a]
28	62	44(71.0)[a]	20(45.5)	9(20.5)	4(9.1)[b]
32	63	55(87.3)[b]	42(76.4)	16(29.1)	7(12.7)[b]

* Values with different superscripts were significantly different($P<0.05$).

Table 5. Effect of cell stage of donor nuclei on *in vitro* development of bovine NT embryos

Cell stage of donor nuclei	No. of eggs used	No. (%) of embryos fused	No. (%) of embryos developed to /fused		
			2-cell	8-cell	Mor. & blast.
8~12	61	47(77.0)[a]	30(63.8)	16(34.0)	7(14.9)[b]
13~17	123	96(78.0)[a]	59(61.5)	28(29.2)	8(8.3)[ab]
18~22	41	31(75.6)[a]	19(61.3)	4(12.9)	2(6.5)[a]

* Values with different superscripts were significantly different($P<0.05$).

Table 6. Effect of preactivation and non-preactivation on *in vitro* development of bovine NT embryos

Recipient oocyte	No. of eggs used	No. (%) of embryos fused	No. (%) of embryos developed to /fused		
			2-cell	8-cell	Mor. & blast.
Non-preactivation	152	109(71.7)[a]	70(64.2)	32(29.4)	14(12.8)[a]
Preactivation	183	157(85.8)[b]	119(75.8)	66(42.0)	38(24.2)[b]

* Values with different superscripts were significantly different ($P<0.05$).

Table 7. Comparision of cell numbers of IVF blastocysts and NT blastocysts at day 8 after *in vitro* culture

Type of embryos	No. of embryos used	No. of cells /blastocyst	Mean cell cycle number
IVF	18	119±23[a]	6.89
NT	12	63±11[b]	5.98

* Values with different superscripts were significantly different ($P<0.05$).

반포기배를 Hoechst 33342로 핵염색을 실시하여 할구수를 헤아리고, 그에 따른 평균세포주기횟수를 계산하여 비교·조사한 결과는 Table 7과 같다. 체외수정란의 평균할구수는 119±23개 였으며, 핵이식수정란의 평균할구수는 63±11개 였다. 평균세포주기횟수는 체외수정란이 6.89회, 핵이식수정란은 5.98회 였다. 따라서 핵이식수정란의 발달율이 체외수정란의 발달율보다 저조함을 알 수 있었다.

Ⅳ. 고 찰

핵이식시 공핵과 수핵란의 정확한 remodelling이 수행되기 위해서는 완전한 탈핵이 선행되어져야 한다. 본 실험에서 제2감수분열 중기의 염색체와 제1극체를 제거하기 위하여 체외배양시간에 따라 미세조작으로 제 1극체와 그 주위의 세포질 1/4~1/5을 제거하여 Hoechst 33342 염색으로 탈핵율을 조사한 바, 체외배양 24시간에는 83.3%로 가장 높은 성적을 보인 반면, 28, 32시간으로 경과할수록 탈핵율은 저하되었다. 이는 24시간 성숙시킨 난자의 핵은 제 1극체 주변의 세포질에 존재하지만, 배양시간이 경과되면 세포질의 중앙으로 이동하기 때문에 탈핵의 어려움이 따르는 것으로 사료되며, 이러한 성적은 소(Prather 등, 1987)에서는 60%, 양(Smith와 Wilmut, 1989) 68%, 돼지(Prather 등, 1989) 74% 보다 높은 성적이었다.

핵이식수정란을 0.28 M mannitol 용액에 5 분간 평형시킨 후 DC 0.75, 1.0 및 1.5 kV/cm, 통전기간 30, 60 및 120μsec로 1회 전기자극을 가하여 0.75~1.0 kV/cm, 60μsec가 좋은 결과를 보였다. 반면 1.5 kV/cm에서는 상실배기나 배반포기로의 발달은 전혀 없었다. 이는 핵융합에 대한 적정통전자극은 토끼(Collas와 Robl, 1990)에서 3.6 kV/cm, 소(Robl 등, 1987; Bondioli 등, 1990; Westhusin 등, 1991)에서는 1.5 kV/cm 및 2.0 kV/cm라고 한 보고와는 상이한 결과였다.

체외배양 24 시간에 탈핵된 수핵난자의 성숙도에 따른 융합율 및 발달율은 다소 aging이 된 체외성숙 32 시간의 수핵난자에서 높게 나타났고, 반면 24시간은 상실배기나 배반포기로의 발달이 전혀 없었다. 핵이식시 수핵난자의 성숙도에 따라 융합율의 차이가 인정되므로 aging된 난자를 수핵란으로 이용하는 방안을 제시하였다(Nagai 등, 1987; Ware 등, 1989; Westhusin, 1989; Barnes와 Eyeston, 1990; Bondioli 등, 1990; Westhusin 등, 1991; Yang 등, 1991). Bondioli 등(1990)의 보고에 의하면 상실배기나 배반포기로의 발달율은 체외성숙 24 시간의 난자(10~16%)에 비해 다소 aging된 난자에서 24%로 높게 나타났다고 보고하여 본 실험의 결과와 일치하였다. 공핵할구의 세포발달단계 별에 따른 융합율은 공히 75% 이상의 융합율을 보여 유의할 만한 차이는 인지할 수 없었으나, 상실배기나 배반포기로의 발달에 있어서는 8~12-세포기의 공핵할구를 이용하는 것이 13~17과 18~22-세포기의 공핵할구를 이용하는 것보다 다소 나

은 결과를 보였다. 이러한 결과로써 핵이식수정란의 발달 효율을 향상시키기 위한 공핵할구의 세포발달단계는 8~12-세포기를 이용함이 적합할 것으로 사료되며, 소의 경우 8-세포기 이하의 할구세포는 전부 비극성을 띄고 있기 때문에 전능성이 없으며(Koyama 등, 1994), 32-세포기와 64-세포기(Robl과 Stice, 1990; Bondioli 등, 1990) 그리고 내부세포괴(Keefer 등, 1993)에서 전능성이 있다고 보고한 바와 같이 본 실험의 결과도 8~22-세포기배의 할구는 전능성이 있다고 사료된다.

24 시간 체외배양된 수핵난자를 탈핵하고 체외배양 28 시간에 DC 1.5 kV/cm, 60μsec 및 1회의 통전자극조건으로 preactivation을 유도한 후 체외배양 30 시간에 공핵할구를 이식하고 32시간에 DC 1.0 kV/cm, 60μsec 및 1회의 통전자극조건으로 전기자극을 가해 preactivation과 non-preactivation에 따른 핵이식수정란의 융합율과 발달율을 조사한 바, 융합율에 있어서 preactivation이 85.8% 로 non-preactivation(71.7%) 보다 좋은 성적이었고, 상실배기 및 배반포기로의 발달율에 있어서도 preactivation이 24.2%로 non-preactivation의 12.8% 보다 유의적($P<0.05$) 차이가 인정되었다. Stice와 Keeper (1993)는 활성화된 난자를 핵이식시 수핵난자로 이용할 경우 발달율이 향상된다고 하였다. 특히 전기자극을 가한 난자는 1.5~2 시간 후에 제 2극체의 방출이 일어나고, 4 시간 후에 전핵형성을 나타낸다(Powell과 Barnes, 1992). 이는 제 2감수분열 중기에 있는 활성화된 MPF가 전기자극 2시간후 부터 비활성화되기 시작하고, DNA 합성은 4시간 후에 시작된다는 것을 시사한다. 따라서 핵이식수정란의 융합과 발달율을 상승시키기 위해서 탈핵 4시간 후에 전기자극으로 활성화 자극을 가하고 활성화자극 4시간 후에 핵이식과 전기융합을 실시하는 것이 효과적일 것으로 사료된다.

7~9일간 배양된 체외수정란과 핵이식수정란의 배반포기를 Hoechst 33342로 핵염색을 실시하여 형광현미경하에서 할구수를 헤아리고, 그에 따른 평균세포주기횟수를 계산하여 비교·조사한 바, 체외수정란의 평균할구수는 119±23개 였으며, 핵이식수정란의 평균할구수는 63±11개 였다. 평균세포주기횟수는 체외수정란이 6.89회, 핵이식수정란은 5.98회 였다. Yang과 Foote(1990)는 미세조작에 의한 손상으로, Collas 등(1992)은 공핵의 세포발달주기(cell cycle)의 불확실, Yang(1993)은 활성화자극의 조건에 의해 핵이식된 배반포기수정란의 발달율과 평균할구수가 감소된다고 하였다.

따라서 핵이식수정란의 발달율을 향상시키기 위한 향후의 대책은 핵이식시 공핵할구의 세포주기동기화가 요구되며, 배양체계의 개선도 향후의 문제점으로 제시된다.

V. 적 요

핵이식 기술의 응용으로 체외성숙 난자를 수핵난자로 체외수정된 수정란을 공핵할구로 이용하여 복제수정란 및 복제동물을 효율적으로 생산하기 위해서 전기자극조건과 공핵할구의 세포발달단계별 및 수핵난자의 preactivation에 따른 핵이식수정란의 융합율과 발달율을 조사하여 핵이식효율을 상승시키고자 본 실험을 실시한 바, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 체외배양시간 24, 28 및 32시간째의 탈핵성공의 유무를 조사한 바, 24시간(83.3%)이 28시간(69.6%) 및 32시간(50%) 보다 유의적인($P<0.05$)으로 높은 탈핵성공율을 보였다.
2. 60 μsec, 1회의 통전횟수로 DC 0.75, 1.0 및 1.5 kV/cm를 가했을 때 핵이식수정란의 융합율은 82.7 및 86.9%, 상실배기 및 배반포기로의 발달율은 12.5 및 12.6%로 나타났으나, 1.5 kV/cm에서 융합율은 72.2%로 다소 저하되었으며, 상실배기 및 배반포기로의 발달은 전혀 없었다. 이러한 결과로써 핵이식수정란의 융합과 발달율 상승을 위해서 통전전압의 적정범위는 DC 0.75~1.0 kV/cm가 적합할 것으로 기대된다.
3. DC 0.75~1.0 kV/cm, 1회의 통전자극에서 30, 60 및 120μsec의 통전기간으로 전기자극을 가하여 통전기간에 따른 핵이식수정란의 융합율과 발달율은 30, 60 및 120 μsec의 통전시간에 따른 융합율은 71.7, 85.2 및 71.95로 유의적인 차이는 없었고, 상실배기 및 배반포기로의 발달율에 있어서 30 및 60 μsec에서는 11.6과 10.7%였으나 120 μsec에서는 상실배 및 배반포기로의 발달을 볼 수 없었다.
4. DC 0.75~1.0 kV/cm, 60 μsec 및 1회의 조건

으로 체외배양 24시간에 탈핵된 수핵난자의 성숙도에 따른 융합율 및 발달율을 조사한 바, 24, 28 및 32시간의 융합율은 64.8, 71.0 및 87.3%로써 체외배양 32시간의 수핵난자에서 높게 나타났고, 상실배기와 배반포기까지의 발달율에 있어서도 체외배양 32시간의 난자에서 12.7%로 가장 높았고, 28 시간은 9.1%였다. 반면 24 시간은 상실배기 및 배반포기로의 발달이 전혀 없었다.

5. 핵이식배의 융합율은 preactivation(85.8%)이 non-preactivation(71.7%) 보다 좋은 성적이었고, 상실배기 및 배반포기로의 발달율은 preactivation(24.2%)과 non-preactivation (12.8%)에서 유의적($P<0.05$) 차이가 인정되었다. 따라서 핵이식수정란의 융합과 발달율을 상승시키기 위해서 탈핵 후 활성화 자극을 가하고 핵이식과 전기융합을 실시하는 것이 효과적임을 알 수 있었다.
6. 체외수정란의 평균할구수는 119±23개, 핵이식배의 평균할구수는 63±11개 였으며, 평균세포주기횟수는 체외수정란이 6.89회, 핵이식수정란은 5.98회 였다. 따라서 핵이식수정란의 발달율이 체외수정란의 발달율보다 저조함을 알 수 있었다.

이상의 결과로 보아, 복제수정란 및 복제동물을 효율적으로 생산하기 위해서 전기자극조건은 DC 0.75~1.0 kV/cm, 60 μsec 및 1회였으며, 체외배양 후 32시간의 aging이 다소 진행된 난자를 수핵난자로 이용하고 8~12-세포기의 할구를 공핵란으로 이용하는 것이 바람직하며, 특히 수핵난자를 preactivation시키는 것이 더욱 좋은 결과를 볼 수 있었다. 그러나 배반포기로 발달한 핵이식수정란의 평균할구수는 체외수정란에 비해 1/2 정도의 수준이었다. 이러한 원인의 대책으로 완전한 탈핵과 공핵할구와 수핵난자의 세포주기동기화가 요구되며 배양체계 개선도 향후의 문제점으로 제시된다.

V. 인용문헌

1. Barnes, F. L. and W. H. Eyestone. 1990. Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos. Theriogenology, 33:141-152.
2. Barnes, F., M. Endebrock, C. Looney, R. Powell, M. Westhusinm and K. Bondioli. 1993. Embryo cloning in cattle: The use of *in vitro* matured oocytes. J. Reprod. Fertil., 97:317-320.
3. Bondioli, K. R., M. E. Westhusin and C. R. Looney. 1990. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. Theriogenology, 33(1):165-174.
4. Choe, S. Y., H. S. Park, H. J. Lee and C. S. Park. 1992. Production of cloned mice by transplantation of nucleus from eight-cell embryos. Korean J. Anim. Sci, 34(2):89-96.
5. Collas, P. and J. M. Robl. 1990. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. Biol. Reprod., 43:877-884.
6. Ebert, K. M., B. V. Paynton, G. S. MacKnight and R. L. Brinster. 1984. Translation and stability of ovalbumin messenger RNA injected into growing oocytes and fertilized ova of mice. J. Embryol. Exp. Morph., 84: 91-103.
7. Hwang, W. S., C. H. Jo, J. Y. Han, B. C. Lee, T. Y. Shin, W. Y. Lee, K. T. Song, S. K. Min, Y. C. Kim, C. H. Koo, Y. S. Lee, J. S. Min, K. Y. Kim, J. S. Kim, J. M. Jang, H. S. Yim, K. W. Lee, S. H. Lee, Y. K. Kim and H. S. Lee. 1995. Systems for production of calves after embryo transfer of nuclear transplant embryos. Korean J. Emb. Trans., 10:83-90.
8. Keefer, C. L., R. Koppang, A. M. Paporocki, P. Golueke, S. L. Stice, M. Maki-Laurola and L. Matthews. 1993. Bovine inner cell mass (ICM) cells as donor nuclei in the production of nuclear transfer embryos. Theriogenoloy, 39:242(Abstr.).
9. Kono, T., Y. Shioda and Y. Tsunoda. 1988. Nuclear transplantation of rat embryos. J. Exp. Zool., 248:303-305.

10. Koyama H, H. Suzuki, X. Yang, S. Jiang and R. Foote. 1994. Analysis of polarity of bovine and rabbit embryos by scanning electron microscopy. Biol. Reprod. , 50:163-170.
11. Lee, H. J., B. G. Jeon, H. J. Yun, K. M. Lee, S. H. Song, I. K. Kong, G. J. Rho, M. C. Choi, S. Y. Choe and C. S. Park. 1994. Production of cloned rabbits by nuclear transplantation. Korean J. Emb. Trans., 9(2) :161-165.
12. McGrath, J. and D. Solter. 1983. Nuclear transplantation in mouse embryos by microsurgery and cell fusion. Science, 220:1300-1302.
13. Nagai, T. 1987. Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes *in vitro* with ethanol. Gamete Res., 16:243-249.
14. Powell, R and F. L. Barnes. 1992. The kinetic of oocyte activation and polar body formation in bovine embryo clones. Mol. Reprod. & Dev., 33:53-58.
15. Prather, R. S., F. L. Barnes, M. M. Sims, J. M. Robl, W. H. Eyestone and N. L. First. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryo: Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. Biol. Reprod., 37:859-866.
16. Prather, R. S., M. M. Sims and N. L. First. 1989. Nuclear transplantation in early pig embryos. Biol. Reprod., 41:414-418.
17. Prather, R. S. and N. L. First. 1990. Cloning embryos by nuclear transfer. J. Reprod. (suppl), 41:125-134.
18. Pursel, V. G., R. J. Wall, C. F. Rexroad, R. E. Hammer and R. L. Brinster. 1985. A rapid whole-mount staning procedure for nuclei of mammalian embryos. J. Reprod. Fertil., 84:619-624.
19. Robl, J. M., R. Prather, F. L. Barnes, W. H. Eyestone, D. Dorthey, B. Gilligan and N. L. First. 1987. Nuclear transplantation in bovine embryos. J. Anim. Sci., 64:642-647.
20. Robl, J. M. and S. L. Stice. 1989. Prospects for the commercial cloning of animals by nuclear transplantation. Theriogenology. 31: 75-84.
21. Smith, L. C., I. Wilmut and R. H. F. Hunter. 1988. Influence of cell cycle stage at nuclear transplantation on the development *in vitro* of mouse embryos. J. Reprod. Fertil., 84:619-624.
22. Smith, L. C. and I. Wilmut. 1989. Infuence of nuclear and cytoplasmic activity on the development *in vivo* of sheep embryos after nuclear transplantation. Biol. Reprod., 40: 1027-1035.
23. Stice, S. L. and J. M. Robl. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. Biol. Reprod., 39:657-664.
24. Stice, S. L. and C. L. Keefer. 1993. Multiple generational bovine embryo cloning. Biol. Reprod., 48:715-719.
25. Ware, C. B., F. L. Barnes, M. Meike-Laurila and N. L. First. 1989. Age dependence of bovine oocyte activation. Gamete Res., 22:265-275.
26. Westhusin, M. E., J. H. Pryor and K. R. Bondioli. 1991. Nuclear transfer in the bovine embryo: A comparison of 5-day, 6-day, frozen-thawed, and nuclear transfer donor embryos. Mol. Reprod. & Dev., 28:119-133.
27. Westhusin, M. E., M. J. Levandusky, R. Scarborough, C. R. Looney and K. R. Bondioli. 1992. Viable embryos and normal calves after nuclear transfer into Hoechst stained enucleated demi-oocytes of cows. J. Reprod. Fertil., 95:475-480.
28. Willadsen, S. M. 1989. Cloning of sheep and cow embryos. Genome, 31:956-962.
29. Yang, X and R. H. Foote. 1990. Survival of bisected rabbit morulae transferred to synchronous and asynchronous recipients. Mol. Reprod. & Dev., 26:6-11.

30. Yang, X., S. Jiang, P. Farrell, R. H. Foote and A. McGrath. 1993. Nuclear transfer in cattle: Effect of nuclear donor cells, cytoplast age, co-culture and embryos transfer. Mol. Reprod. & Dev., 35:29-36.
(접수일자 : 1997. 9. 8. / 채택일자 : 1997. 9. 22.)