

토끼에서 핵이식 수정란의 초기 발달 속도와 난자 활성화가 후기배로의 발달에 미치는 영향[†]

전병균 · 윤희준* · 공일근 · 이효종* · 최상용* · 박충생
경상대학교 축산학과

Effect of Early Stage of Reconstituted Embryos with or without Oocyte Preactivation on Subsequent *In Vitro* Development of Nuclear Transplant Rabbit Embryos

B. G. Jeon, X. J. Jin*, I. K. Kong, H. J. Lee*, S. Y. Choe* and C. S. Park

Department of Animal Science, Gyeongsang National University

SUMMARY

The present study was conducted to investigate the influence of embryo cell stage at 18h post-fusion and oocyte preactivation on subsequent *in vitro* developmental potential in the nuclear transplant rabbit embryos. The embryos of 16-cell stage were collected and synchronized to G₁ phase of 32-cell stage. The recipient cytoplasms were obtained by removing the first polar body and chromosome mass from the oocytes collected by non-disruptive microsurgery procedure. The separated G₁ phase blastomeres of 32-cell stage were injected into non-preactivated recipient cytoplasms. Otherwise, the enucleated recipient cytoplasms were preactivated by electrical stimulation at 18h post-hCG injection and the separated G₁ phase blastomeres of 32-cell stage were injected. After culture until 20h post-hCG injection, the nuclear transplant oocytes were electrofused by electrical stimulation. The fused nuclear transplant embryos were classified into 3~4-cell, 2-cell and 1-cell stage at 18 hrs post-fusion and cultured until the embryos reached blastocyst stage.

The developmental rate to blastocyst stage was significantly ($P < 0.05$) higher in all the reconstituted embryos of 3~4-cell stage(58.0%) than in 2 and 1-cell stage. The developmental rate to blastocyst stage in the embryos of 3~4-cell stage at 18 hrs post-fusion was significantly ($P < 0.05$) higher in the reconstituted without oocyte preactivation(77.8%) than in the oocyte-preactivated embryos(33.3%).

These results indicated that the higher rate of in the *in vitro* development to blastocyst stage might be obtained from the embryos which were reconstituted with nuclear donor of G₁ phase and non-preactivated oocyte, and developed more rapidly for 18 hrs post-fusion.

(Key words : rabbit, oocyte preactivation, *in vitro* development, nuclear transplant, embryo)

[†] 본 연구는 한국과학재단에서 1992~1995년도에 지원한 특정기초 연구사업비로 수행되었음(KOSEF: 92-24-00-10).

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

서 론

핵이식 수정란으로 복제동물을 생산하는 성공율은 아직 매우 낮은 수준이며, 그 이유로서 핵이식 수정란의 발달에 유해한 영향을 미치는 많은 요인들이 있다. 이는 체외에서의 탈핵과 핵주입 등 미세 조작에 의한 수핵난자의 손상, 전기자극, 체외배양에서의 발달 지연 및 체내이식시 수란축과의 동기화의 부적합 등 많은 기술적 어려움이 있기 때문이다. 그러나 무엇보다도 비정상적인 핵형이나 DNA를 소유하는 핵이식 수정란은 배반포로의 발달율이 낮을 뿐만 아니라 성공적으로 산자로 생산될 수 없다 (Magnuson 등, 1982; Baranov, 1983; Magnuson 등, 1985). 역시 사람에서 체외 수정란이 착상되지 않는 주된 이유중의 하나는 염색체의 비정상 때문이며, 염색체의 이상은 수정란의 형태와 발달율에 관련된다고 하였다 (Murrne 등, 1995). DiBerardino (1980)은 양서류의 핵이식 수정란에서 핵이식 수정란의 초기 퇴화는 공핵란과 수핵란의 세포주기의 불일치에 의한 DNA의 비정상에 의한 것이라고 보고하였고, 핵의 공급원이 되는 할구의 세포주기를 조절하여 높은 체외발달율을 보이고 있다 (Collas 등, 1992; 박 등, 1996). 또한, 핵이식 수정란이 정상적인 핵형을 가지게 하는데 공핵란의 세포주기 뿐만 아니라 수핵란의 상태도 중요한 요인이다 (Campbell 등, 1993, 1994; Aoyagi 등, 1994; Stice 등, 1994).

그러나 이러한 문제들 뿐만 아니라 핵이식 수정란의 발달에 미치는 중요한 요인 중의 하나는 수핵란에 주입된 핵이 새로운 순서적인 발달의 순서를 위하여 reprogramming되어야 한다. M II 난자내로 주입된 공핵란의 핵은 maturation promoting factor (MPF)에 의하여 nuclear envelope breakdown(NEBD), prematurely chromosome condensation(PCC), nucleoli의 분산 그리고 핵막을 재형성하여 전핵을 형성하고 핵이 팽화된다(Murray와 Kirschner, 1989; Collas 등, 1992a; Campbell 등, 1993). 이러한 일련의 과정은 핵이식 수정란의 발달 능력을 증가시킬 수 있는 주입된 핵의 재구성(nuclear remodeling)이라고 보고하였으며 (Stice와

Robl, 1988; Collas와 Robl, 1991), 핵의 재구성은 핵이식된 수정란이 새로운 발달의 순서를 위한 주입된 핵의 reprogramming 이라고 하였다 (Stice와 Robl, 1988; Collas와 Robl, 1991; Collas 등, 1992a). DiBerardino (1987) 및 Modlinski와 Smorag (1991) 및 Barnes 등 (1987)는 개구리의 핵이식 수정란에서 공핵란이 분화된 핵의 비가역적인 변화와 부적당한 reprogramming은 발달에 장애를 준다고 한다. 또한, 수핵란의 측면에서 성숙한 M II 난자내로 융합된 핵은 전핵 단계의 수핵란보다 핵의 재구성에 의하여 좀 더 기능적인 전핵으로 염색질을 변화시킨다고 하며 (DiBerardino, 1992), 전핵 단계의 수정란보다 성숙된 M II 난자가 reprogramming 능력이 우수하다고 보고하였다 (Smith와 Wilmut, 1989).

이에 본 연구는 토끼를 사용하여서 세포주기를 조절한 32-세포기의 G₁기 할구를 공핵란으로 사용하여 탈핵된 난자를 전기적 방법으로 활성화를 유도한 후 수핵란 세포질 상태에 따라 초기 핵이식 수정란의 발달 단계가 후기배로의 발달에 미치는 영향을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 공시 동물

본 실험에 사용된 공시 동물은 New-Zealand White 종의 성숙된 토끼로서 연암원에축산전문대학으로부터 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 주사 12시간 후 hCG (PUBEROGEN®, Japan) 100IU를 정맥주사하였다. hCG 주사 후 13~15시간에 암토끼를 chlorpromazine 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 300IU / ml hyaluronidase (SIGMA Co., U.S.A.)에서 39℃, 5% CO₂ 조건에서 7분간 배양한 다음, 150μm fire-polished pipette으로 반복 pipetting하여 난구 세포를 제거하고 제1극체가 명확하고 세포질이 균일하며 충실한 것만 수핵란으로 사용하였다.

3. 공핵란의 준비 및 세포주기의 조절

토끼의 과배란 유기는 전항 2와 같이 과배란을 유기한 다음 성숙된 수토끼와 교미를 시켰다. 16-세포기에 있는 수정란은 hCG 주사 후 48시간에 채란하였고, 32-세포기의 G₁기로 세포주기를 조절하였다. 할구 세포를 32-세포기의 G₁기로 세포주기를 동기화하는 방법은 Collas와 Robl (1992a)의 방법을 따랐다. 간단히 요약하면, 채란된 16-세포기의 수정란을 0.5μg/ml 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 할구를 0.5% pronase (SIGMA Co., U.S.A.)에서 8분간 배양하여 mucin coat 및 투명대를 제거한 다음, 50μm 정도의 pipette으로 Ca²⁺ 및 Mg²⁺ 결여된 PBS에서 할구를 분리하였다. 이를 세척 후 DNA 합성 억제제인 0.1μg/ml 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.

4. 핵이식을 위한 미세조작

수핵란의 탈핵을 위한 미세조작은 Stice와 Robl (1988)과 Collas 등 (1989)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 수핵란과 공핵란으로부터 분리된 할구 세포를 7.5μg/ml 세포골격 억제제인 cytochalasin B (SIGMA Co., U.S.A.), 0.1μg/ml aphidicolin 그리고 10% FCS가 함유된 Earl's balanced salt solution (EBSS, SIGMA Co., U.S.A.)에서 미세조작 15분전에 전처리하였고, 미세조작을 위하여 micromanipulators (Narishige Co., Japan)를 DIC 도립현미경 (Nikon Co., Japan)위에 장치하였다.

미세조작 또한, 7.5μg/ml cytochalasin B, 0.1μg/ml aphidicolin 그리고 10% FCS가 함유된 EBSS에서 실시하였고, 탈핵은 McGrath와 Solter (1983)의 non-disruptive 조작법에 의하여 실시하였다. 즉, 성숙된 M II 난자를 150μm 정도의 미세 pipette으로 고정시키고 핵을 제거하기 위하여 30μm의 연마된 미세 pipette을 투명대 내로 진입시켜 제 1극체와 그 주위에 위치하는 제 2감수분열 중기의 염색체를 원형질막에 싸여진 채로 흡입하여 제거하였고, G₁기에 있는 32-세포기의 공핵란 할구를 분리하여 각각 수핵란의 위란강에 주입하였다. 한편, 난자는 우선 Webb 등 (1986)의 의견에 따라 제 2감수분열 중기의 염색체가 세포 중심으로 이동하기 전에 탈핵하기 위하여 hCG 주입 후 13~15시간에 채란하여 미세조작으로 탈핵을 하였다. 탈핵된 난자는 hCG 주입 후 18시간까지 배양을 한 다음 세포 융합과 같은 조건의 전기자극으로 난자의 활성화를 유도하였고, Campbell 등 (1993)의 의견에 따라 MPF를 소실을 유도하였다. 이러한 난자를 Ozil (1990)의 방법에 따라 난자 세포질의 형태에 의하여 난자의 활성화 여부를 판단하여 난자가 활성화된 것을 골라 수핵란으로 사용하고, 공핵란의 세포주기를 조절한 G₁기의 할구를 주입하였다. 할구가 주입된 핵이식 난자는 0.1μg/ml aphidicolin 및 10% FCS가 포함된 M-199 배양액에서 미세조작 후 난자의 세포질과 할구의 융합 때까지 배양하였다.

5. 세포 융합 및 난자의 활성화

난자와 할구의 융합 및 난자의 활성화는 hCG 주입 후 20시간에 전기자극으로 유도하였으며, 전기자의 조건은 이 등 (1993)의 융합 조건에 따라 1.25kV/cm의 전압과 60μsec의 통전시간으로 3회 통전하여 실시하였다. 세포 융합과 난자의 활성화를 위한 용액은 100μM CaCl₂ 및 MgCl₂가 함유된 비 전해질의 0.28 M mannitol 용액으로 사용하기 2시간 전에 만들어 25℃의 실온에서 평형시킨 후 사용하였다. 그 후 할구가 이식된 난자를 이 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 난

자의 활성화를 유도하였다.

6. 핵이식 수정란의 체외배양

난자의 세포질과 할구의 융합이 확인된 난자는 0.1 μ g/ml aphidicolin을 포함한 0.28M mannitol 용액에서 염색체의 응축이 일어나는 동안 DNA의 합성을 억제하기 위하여 대략 20분 동안 배양하였고, 이를 7.5 μ g/ml cytochalasin B와 10% FCS가 함유된 M-199 배양액에서 1시간 동안 배양한 다음 체외배양을 실시하였다. 체외배양은 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 $^{\circ}$ C의 5% CO₂ 배양기내에서 120시간 공배양하여 세포 융합 후 18시간에 이들의 발달 단계 즉, 3~4-세포기, 2-세포기 및 1-세포기 단계로 분류하여 이들을 각각 배양하여 초기 핵이식 수정란의 발달 단계에 따라서 후기 수정란으로의 발달에 미치는 영향을 조사하였다.

7. 통계학적 분석

실험 결과의 통계학적 분석은 Microsta computer statistical program package를 사용하여 Chi-square test로서 처리군 간의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 초기 핵이식 수정란의 발달 속도에 따른 후기 배로의 발달율

32-세포기의 G₁기 할구를 공핵란으로 사용하고 non-preactivated 및 preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 핵이식 수정란을 세포 융합 후 18시간대에 그들의 발달 단계에 의하여 각각 3~4-세포기, 2-세포기 및 1-세포기로 분류하였고 (Fig. 1), 이들을 각각 체외배양하여 초기 핵이식 수정란의 발달 속도에 따른 후기배로의 체외 발달율을 조사한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다.

세포 융합 후 18시간대에 135개의 핵이식 수정란 중에서 60%(81/135개)가 3~4-세포기 단계로, 25.2%(34/135개)가 2-세포기 단계로 발달하였으나 발달이 지연된 1-세포기 단계는 14.8%(20/135)이

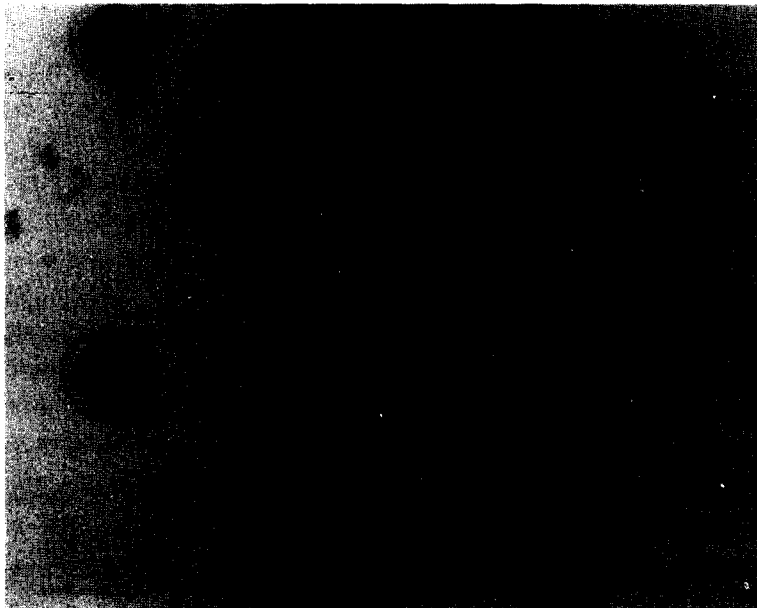


Fig. 1. Nuclear transplant embryos *in vitro* developed to 1~4-cell stage at 18 hrs post-fusion($\times 40$).

Table 1. Effect of cell stage at 18 hrs post-fusion on their subsequent *in vitro* development of nuclear transplant rabbit embryos

Cell stage at 18 hrs post fusion	No. of embryos cultured(%)	No. (%) of embryos developed to		
		8-cell	Morula	Blastocyst
3~4 cell	81(60.0)	96(85.2)	67(82.7)	47(58.0) ^a
2-cell	34(25.2)	21(61.8)	17(50.0)	4(11.8) ^b
1-cell	20(14.8)	1(5.0)	0(0.0)	0(0.0) ^c
Total	135(100%)	91(67.4)	84(62.2)	51(37.8)

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

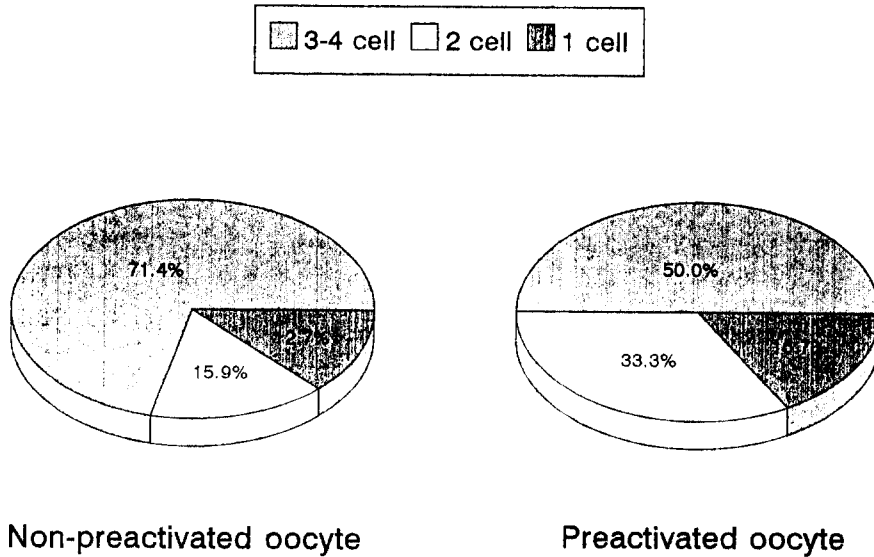


Fig. 2. Proportion of cell stage at 18 hrs post-fusion of rabbit embryos reconstituted with or without oocyte preactivation.

었다. 그러나 이들을 각각 체외배양을 실시하였을 때 3~4세포기 및 2세포기 단계로 발달한 핵이식 수정란은 각각 58.0%(47/81) 및 11.8%(4/34)가 배반포로 발달하였지만 1세포기에 머물러 있는 핵이식 수정란은 초기 단계에서 발달이 정지되거나 지연되었고, 세포 융합 후 18시간대에 3~4세포기 단계로 발달한 핵이식 수정란이 2세포기 및 1세포기 단계의 핵이식 수정란보다 배반포로의 발달율이 유의적으로 높게 나타났으며, 초기배의 발달 속도에 따라 후기배, 즉 배반포로의 발달에 현저하게 차이를 나타내어 초기배의 발달 속도는 후기배로의 발달에 결정적인 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

또한 non-activated 및 preactivated 난자를

수핵란으로 사용한 핵이식 수정란을 그들의 발달 단계에 의하여 분류하였고 (Fig. 2), 이들의 각각 체외배양하여 수핵란 세포질의 상태에 따라 배반포로의 발달율을 비교 조사하였다. Non-activated 난자를 수핵란으로 사용한 경우 세포 융합 후 18시간대에는 3~4세포기가 71.4%(45/63개), 2세포기가 15.9%(10/63개), 아직 분할하지 못한 1세포기가 12.7%(8/63개)로 발달하여 3~4세포기가 유의적($P < 0.05$)으로 더 많이 발달하였다. 역시 preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 경우에도 120시간 배양한 결과 83.3%(60/72)가 2세포기 이상 발달하였지만, 세포 융합 후 18시간대에는 3~4세포기가 50%(36/72개), 2세포기가 33.3%(24

/72), 1-세포기가 16.7% (12/72개)로 3~4-세포기가 유의적($P < 0.05$)으로 더 많이 발달하였다.

2. Non-preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 핵이식 수정란에서 후기배로의 발달율

32-세포기 G₁기의 할구를 공핵란으로 사용하고 탈핵한 non-preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 핵이식 수정란을 세포 융합 후 18시간대에 발달 단계의 의하여 3~4-세포기, 2-세포기 및 1-세포기로 분류하여 이들을 각각 체외배양하여 배반포로의 발달율을 조사한 결과는 Fig. 3에 나타난 바와 같다. 이중 3~4-세포기의 핵이식 수정란은 77.8% (35/45개), 2-세포기는 10% (1/10개)가 배반포로 발달하였지만, 1-세포기에서 발달이 지연된 핵이식 수정란은 상실배 단계 이상 발달하는 것이 없었다. 이러한 결과에서 세포 융합 후 18시간대에 3~4-세포기로 발달한 핵이식 수정란이 유의적으로 높은 배반포로의 발달율을 보였다.

3. Preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 핵이식 수정란에서 후기배로의 발달율

32-세포기 G₁기의 할구를 공핵란으로 사용하고

성숙된 난자를 탈핵을 한 다음 전기적 방법으로 인위적인 활성화의 자극을 가한 preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 핵이식 수정란을 세포 융합 후 18시간대에 핵이식 수정란을 발달 단계의 의하여 3~4-세포기, 2-세포기 그리고 1-세포기로 분류하여 각각 후기배로의 발달율을 조사한 결과는 Fig. 4에 나타난 바와 같다. 이중 3~4-세포기의 핵이식 수정란은 33.3% (12/36개), 2-세포기는 12.5% (3/24개)가 배반포로 발달하였지만, 1-세포기에서 발달이 지연된 핵이식 수정란은 8-세포기 단계 이상 발달하는 것이 없었다.

그러나 Fig. 2, 3, 4의 결과의 결과를 분석하면 non-preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 Fig. 2, 3의 결과에서는 세포 융합 후 18시간대에 3~4-세포기로 발달하는 것이 71.4% 이었고, 이것을 체외 배양하였을 때 배반포로 77.8%가 발달한 것에 반해, preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 Fig. 2, 4의 결과에서는 50.0%가 3~4-세포기로 발달하였고, 이중 33.3%가 배반포로의 발달율을 보여 수핵란으로 non-preactivated 난자 즉, M II 난자를 사용하는 것이 난자에 인위적인 활성화 자극을 주고 MPF를 소실시킨 preactivated 난자를 수핵란

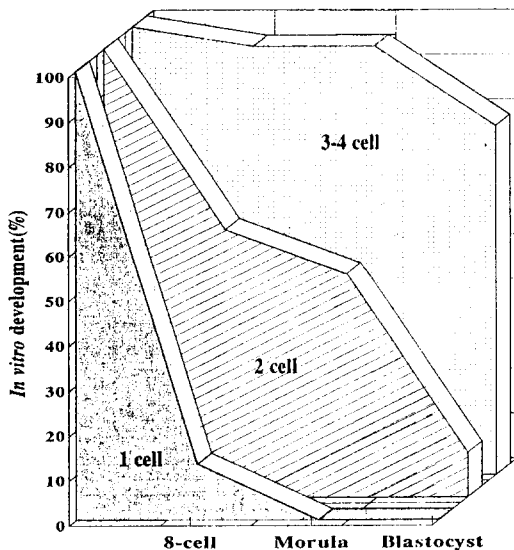


Fig. 3. Effect of cell stage at 18 hrs post-fusion of embryos reconstituted with non-preactivated oocyte on subsequent *in vitro* development of nuclear transplant rabbit embryos.

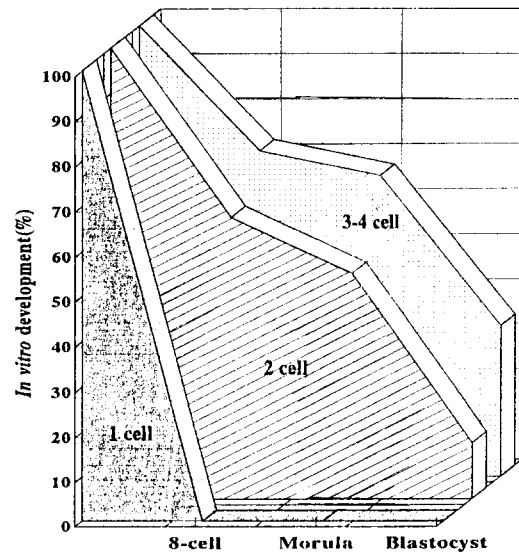


Fig. 4. Effect of cell stage at 18 hrs post-fusion of embryos reconstituted with preactivated oocyte on subsequent *in vitro* development of nuclear transplant rabbit embryos.

으로 사용한 경우보다 세포 융합 18시간대에 3~4-세포기 단계로 발달하는 것이 더 많았으며, 또한 이들의 체외배양하였을 때 더 높은 발달율을 보여 토끼에서 핵이식에 사용되는 수핵란은 활성화 자극을 가하지 않은 탈핵된 M II 난자를 사용하는 것이 배반포로의 발달율을 높일 수 있을 것이라고 사려된다.

Bavister (1995)는 발달 단계에 따른 수정란의 발달 시간은 수정란의 발달 능력을 결정하는 가장 중요한 요인이라고 하였다. McKiernan 등 (1991)는 생쥐에서 발달 단계가 느린 수정란과 빠른 수정란을 배양하여 생존성을 조사한 결과 각각 26%와 51%의 생존성을 보여 발달 단계가 빠를수록 난자의 생존성에 많은 영향을 주고 있다고 보고하였다. Van Soom 등 (1992)은 소 난자의 체외수정 후 24, 30, 36, 42 및 48시간대에 2-세포기 단계로 발달한 수정란을 체외배양한 결과 각각 46, 49, 37, 15 및 0%가 상실배까지 발달함을 보고하였다. 또한 Pollard 등 (1991), Vergos 등 (1989), Plante와 King (1992) 및 Plante 등 (1994)도 소의 체외수정란이 24~28시간대에 대부분 분할하는데 30시간대에 분할하는 것이 48~62시간대에 분할하는 것보다 유의적으로 수정란의 발달율이 높았으며, Vergos 등 (1989), Pollard 등 (1991), 공 등(1993)은 수정 후 44~48시간대에 4-세포기 이상 발달된 것은 0~3-세포기보다 후기배로의 발달율이 각각 66.3과 43.7%로서 유의적으로 높은 발달율을 보였는데 이와 같이 초기 수정란의 발달 속도가 빠를수록 후기배로의 발달에 결정적인 영향을 미친다고 보고하고 있고, 본 실험에서도 비슷한 결과를 나타내었다.

본 실험 결과에서 높은 MPF의 활성을 가지고 있는 non-preactivated 난자 즉, M II 난자는 주입된 핵을 재구성할 수 있고 공핵란의 할구 핵의 reprogramming은 발달율을 향상시킬 수 있다고 사려된다. 본 실험에서도 핵이식 수정란의 발달이 2-세포기와 치밀 상실배에서 발달이 지연되는 경우가 많았다. 이러한 이유는 비정상적인 핵형이나 DNA를 가지기 때문이라고 사려된다. 토끼에서 수정란의 유전자가 활동을 하는 시기는 2-세포기부터 시작을 하고 (Van Blerkom과 Marnes, 1974; Cotton 등, 1980), 비정상적인 염색체 혹은 DNA를 소유한 핵

이식 수정란은 유전자 활성의 부족으로 인하여 2-세포기에서 발달이 정지되거나 상실배 단계에서 할구들이 응집하지 못하여 발달이 지연 혹은 정지될 것이다.

적 요

본 연구는 토끼를 사용하여서 공핵란의 세포주기를 조절한 32-세포기의 G₁기 할구를 공핵란으로 사용하고 수핵란 세포질 상태에 따른 핵이식 수정란의 초기 발달 속도에 따른 후기 배로의 발달율을 조사하여 핵의 재구성에 의한 핵이식 수정란의 reprogramming이 발달율에 미치는 영향을 조사하였다.

과배란시킨 토끼의 난관으로부터 hCG 주사로부터 16-세포기의 수정란을 채란하고 16-세포기의 수정란은 할구의 세포주기를 32-세포기의 G₁기로 조절한 다음 분리하여 공핵란으로 사용하였다. 수핵란은 과배란시킨 토끼로부터 hCG 주사로부터 13~15시간에 채란하여 미세조작으로 제 1극체와 인접한 세포질을 제거하여 제 2감수분열 중기의 염색체를 탈핵한 후 수핵란으로 사용하였다. 한편, 채란된 수핵란을 탈핵을 한 다음 hCG 주입 18시간까지 배양한 다음 전기자극으로 난자의 활성화를 유도하였고, 분리된 32-세포기 G₁기의 할구 세포를 탈핵한 non-preactivated 및 preactivated 난자의 위관강에 각각 미세조작으로 주입하였다. 할구세포가 주입된 난자는 hCG 주사로부터 20시간 직후 전류로서 세포의 융합 및 /혹은 난자의 활성화를 유도하였고, 융합이 확인된 핵이식 수정란은 체외배양을 실시하였다.

이러한 핵이식 수정란을 세포 융합 후 18시간대에 3~4-세포기, 2-세포기 및 1-세포기로 분류하였을 때 3~4-세포기, 2-세포기 및 1-세포기는 각각 60.0, 25.2 및 14.8%이었으며, 이들이 배반포로의 발달율은 각각 50.0, 11.8 및 0%이어서 3~4-세포기의 핵이식 수정란이 유의적으로 높은 발달율을 보였다. 또한, non-preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 핵이식 수정란에서 3~4-세포기로 발달한 것은 77.8%, 2-세포기는 10.0%가 배반포로 발달하였고, 1-세포기는 상실배 이상 발달하는 것이 없었

으며 preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 경우에 3~4-세포기는 33.3%, 2-세포기는 12.5%가 배반포로 발달하였으며 1-세포기는 8-세포기 이상 발달하는 것이 없었고, 이러한 결과로서 초기 핵이식 수정란의 발달 속도가 후기 핵이식 수정란의 발달에 지대한 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 특히, non-preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 핵이식 수정란이 preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 핵이식 수정란보다 융합 후 18시간대에 3~4-세포기로 발달하는 것이 많았고, 이를 체외배양하였을 때 배반포로의 발달율도 유의적으로($P < 0.05$) 높았다.

이러한 결과를 종합해 보면 초기 핵이식 수정란의 발달 속도는 후기 배로의 발달에 지대한 영향을 미치며, 핵의 reprogramming에 의한 핵이식 수정란의 reprogramming은 핵이식 수정란이 발달하는데 유익하다고 사료된다.

참고문헌

- Ayogi Y, Konishi M, Wada T and Takedomi T. 1994. Unaged bovine oocytes successfully develop to blastocysts after parthenogenetic activation of nuclear transfer. *Theriogenol.*, 41:157(Abstr.).
- Baranov VS. 1983. Chromosomal control of early embryonic development in mice. I. Experiments on embryos with autosomal monosomy. *Genetica*, 61:165-177.
- Barnes FL, Robl JM and First NL. 1987. Nuclear transplantation in mouse embryos: Assessment of nuclear function. *Biol. Reprod.*, 36:1267-1274.
- Bavister BD. 1995. Culture of preimplantation embryos : Facts and artifacts. *Hum. Reprod. Update*, 1:91-148.
- Campbell KHS, Loi P, Cappai P and Wilmut I. 1994. Improved development to blastocyst of ovine nuclear transfer embryos reconstituted during the presumptive S-phase of enucleated activated oocytes. *Biol. Reprod.*, 50:1385-1393.
- Campbell KHS, Pitchie WA and Wilmut I. 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.
- Collas P, and Robl JM. 1991. Relationship between nuclear remodelling and development in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 45:455-465.
- Collas P, Balise JJ, Hofmann GA and Robl JM. 1992. Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 46:492-500.
- Collas P and Barnes FL. 1994. Nuclear transplantation by microinjection of inner cell mass and granulosa cell nuclei. *Mol. Reprod. Dev.*, 38:264-267.
- Cotton RW, Manes C and Hamkalo BA. 1980. Electron microscopic analysis of RNA transcription preimplantation rabbit embryos. *Chromosoma*, 79:169-178.
- DiBerardino MA. 1980. Genetic stability and modulation of metazoan nuclei transplanted into eggs and oocytes. *Differentiation*, 17:17-30.
- DiBerardino MA. 1987. Genetic potential of differentiated cells analyzed by nuclear transplantation. *Am. Zool.*, 27:623-644.
- DiBerardino MA. 1992. Nuclear reprogramming of amphibian differentiated cell. *Symposium on cloning mammals by nuclear transplant (Fort Collins)*, pp 5-7.
- Latham KE, Slotter D and Schultz RM. 1991. Activation of a two-cell stage-specific gene following transfer of heterologous nuclei in enucleated mouse embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 30:182-186.
- Latham KE, Garrels JI and Solter D. 1994. Alt-

- eration in protein synthesis following transplantation of mouse 8-cell stage nuclei to enucleated 1-cell embryos. *Dev. Biol.*, 163: 341-350.
- Magnuson T, Debrot S, Dimpfl J, Zweig A, Zamora T and Epstein CJ. 1985. The early lethality of autosomal monosomy in the mouse. *J. Exp. Zool.*, 236:353-360.
- Magnuson T, Smith S and Epstein CJ. 1982. The development of monosomy 10 mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 69: 223-236.
- McGrath J and Solter D. 1983. Nuclear transplantation in mouse embryos. *J. Exp. Zool.*, 228:355-362.
- McKiernan SH, Bavister BD and Tasca RJ 1991. Energy substrate requirements for *in vitro* development of hamster 1-and 2-cell embryos the blastocyst stage. *Hum. Reprod.*, 6:64:75.
- Modlinski JA and Smorag ZA. 1991. Preimplantation development of rabbit embryos after transfer of embryonic nuclei into different cytoplasmic environment. *Mol. Reprod. Dev.*, 28:361-372.
- Murray AW and Kirschner MW. 1989. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature*, 339:275-280.
- Murne S, Grifo J, Mo AiKani, Cohen J and Tomkin G. 1995. Embryo morphology, development rate, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities, fertility and sterility. *Mol. Reprod. Dev.* 64: 382-391.
- Ozil J. 1990. The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation. *Development*, 109: 117-127.
- Plante L, Plante C, Sherperd DL and King WA. 1994. Cleavage and ³H-uridine incorporation in bovine embryos of high *in vitro* developmental potential. *Mol. Reprod. Dev.*, 39:375-383.
- Plante LC and King WA. 1992. Effect of time to first cleavage on hatching rate of bovine embryos *in vitro*. *Theriogenol.*, 37:274(Abstr.).
- Pollard VG, Scodras JM, Plante L, King WA and Bettridge KJ. 1991. Definition of the cleavage stages at which oviductal epithelial cells enable bovine embryos to pass through the *in vitro* 8-16 cell block. *Theriogenol.*, 35:256(Abstr.).
- 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, Keefer CL and Matthews L. 1994. Bovine nuclear transfer embryos :Oocyte activation prior to blastomere fusion. *Mol. Reprod. Dev.*, 38:61-68.
- Stice SL and Robl JM. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 39:657-664.
- Szollosi D, Czolowska R, Szollosi MS and Tarkowski AK. 1988. Remodelling of mouse thymocyte nuclei depends on the time of their transfer into activated, homologous oocytes. *J. Cell Sci.*, 91:603-613.
- Van Blerkom J and Manes C. 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.
- Van Soom A, Van Vlaenderen I, Mohmoudzadeh AR, Deuyker H and de Kruif A. 1992. Compaction rate of *in vitro* fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenol.*, 38: 905-919.
- Van Stekelenberg-Hamers AEP, Rebel HG, Van

- Inzen WG, De Loos FAM, Drost M, Murray CL, Weima SM and Trounson AO. 1994. Stage-specific appearance of the mouse antigen TEC-3 in normal and nuclear transfer bovine embryos :Re-expression after nuclear transfer. *Mol Reprod. Dev.*, 37:27-33.
- Vergos E, Kinis A, Gallagher M and Gordon A. 1989. Development of bovine embryos on an oviductal monolayer in relation to cell stage reached at 48 hours after *in vitro* fertilization. *J. Reprod. Fert.*, 4(Suppl.):37(Abstr.).
- Webb M, Howlett SK and Marot B. 1986. Parthenogenesis and cytoskeletal organization in aging mouse eggs. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 95:131-145.
- Yang Z, Goff AK and Smith LC. 1995. Protein synthesis patterns in nuclear transfer parthenogenetically activated and IVF embryos during early development. *Theriogenol.*, 43:361(Abstr.).
- 노규진, 이효종, 송상현, 윤희준, 박충생. 1994. 수정란의 체외발달에 미치는 배양액 및 소와 토끼의 난관상피세포들과의 공배양 효과. *한국가축번식학회지* 18:39-46.
- 공일근, 주영국, 이효종, 광대오, 박충생. 1994. 초기배의 발달속도에 따른 후기배로의 발달율. *한국정란이식학회지* 9:15-21.
- 박충생, 전병균, 이효종, 최상용. 1996. 토끼 핵이식 수정란의 체발달에 미치는 공핵란 세포주기의 효과. *한국가축번식학회지* 20(2):143-153.
- 이효종, 최민철, 최상용, 박충생, 윤창현, 강대진. 1993. 반복핵이식에 의한 복제동물 생산에 관한 연구. I. 토끼 수핵난자의 전기자극에 의한 활성화. *한국수정란이식학회지* 8(2):151-154.