

동결 수정란을 공핵란으로 사용한 토끼 핵이식 수정란의 체외 발달에 관한 연구[†]

박충생 · 전병균 · 조성근 · 강태영 · 공일근 · 이효종* · 최상용*
경상대학교 축산학과

Influence on *In Vitro* Development in Nuclear Transplant Rabbit Embryos using Cryopreserved Donor Embryos

C. S. Park, B. G. Jeon, S. K. Cho, T. Y. Kang, I. K. Kong*, H. J. Lee* and S. Y. Choe*

Department of Animal Science, Gyeongsang National University

SUMMARY

The influence of cryopreservation of donor embryos on the *in vitro* developmental potential in the nuclear transplant rabbit embryos was evaluated. The embryos of 16-cell stage were collected and cryopreserved with EFS solution by vitrification method. The frozen embryos were thawed and synchronized to S and 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 S and G₁ phase blastomeres of 32-cell stage were injected into enucleated recipient cytoplasms by micromanipulation. After culture until 20 hrs post-hCG injection, the nuclear transplant oocytes were electrofused and activated by electrical stimulation. The fused nuclear transplant embryos were co-cultured with rabbit oviduct epithelial cells. After *in vitro* culture for 120 hrs, the nuclear transplant embryos developed to blastocyst stage were stained with Hoechst 33342 dye and their blastomeres were counted.

The electrofusion rate was significantly ($P < 0.05$) reduced in the frozen nuclear donor, compared with fresh donor nuclei as 80.0 vs 62.8% in S phase and 81.7 vs 64.8% in G₁ phase, respectively. The *in vitro* developmental rate to blastocyst stage with the S and G₁ phase of fresh embryos (26.3 and 61.1%, respectively) was found significantly ($P < 0.05$) higher, compared to the S and G₁ phase of frozen embryos (11.9 and 34.6%, respectively). When frozen as well as fresh donor embryos were synchronized to G₁ phase, the *in vitro* developmental rate to blastocyst stage was significantly ($P < 0.05$) higher, compared with S phase donor nuclei. The cell counts of nuclear transplant embryos developed to blastocyst stage were significantly ($P < 0.05$) more in G₁ phase of fresh or frozen embryos (180.1 and 125.7 cells, respectively), compared with S phase nuclear donor (145.1 and 103.7 cells, respectively). From the above results it was concluded that the rabbit embryos cryo-

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

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

preserved by vitrification might be available as nuclear donor, though the developmental potential and cell counts of nuclear transplant rabbit embryos were decreased significantly.

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

서 론

핵이식에 의한 복제수정란의 대량 생산을 위해서는 수핵란 및 공핵란의 준비에 어려움이나 차질이 없어야 한다. 수핵란은 체외성숙 기법에 의한 방법으로 다량의 수핵난자를 용이하게 확보할 수 있다. 그러므로 공핵란을 동결보존하여 언제든지 필요시에 이용할 수 있다면 복제 수정란의 대량 생산이 용이해질 수 있다. 복제 수정란을 산업적으로 이용하기 위해서는 이러한 동결보존된 수정란을 핵의 공급원으로 사용하는 기술이 확립되어야 한다. 토끼에서 박 등 (1995)은 체외성숙된 난자를 수핵란으로 사용하고 공핵란으로 동결보존한 수정란을 이용하여 핵이식 수정란을 생산하여 핵의 공급원이 되는 공핵란을 동결보존하여 사용할 수 있다는 가능성을 보여 주었다. 소에서도 공핵란으로 동결보존한 수정란을 이용하여 핵이식 수정란을 작출한 바 있다(Westhusin 등, 1991; Ushijima와 Eyo, 1992). 수정란을 동결하는 방법으로는 완만동결법과 급속동결법이 있는데 완만동결법은 절차상의 번거로움 등의 문제점으로 근래에는 동결과정이 아주 간편한 vitrification 방법이 개발되었다. Vitrification 방법은 수정란을 고농도의 동결보호제에 부유시켜 세포내외의 수분을 빙정화시키지 않고 과냉각 상태로 유지하여 투명한 유리와 같이 변하게 한다. 이 방법은 Rall과 Fahy (1985)에 의하여 처음으로 응용되었다.

최근에는 핵이식을 실시하는데 있어 핵의 공급원이 되는 할구의 세포주기를 조절하여 높은 체외발달율을 보이고 있다 (Collas 등, 1992a; 박 등, 1996). 성숙된 MII 난자에 융합하는 공핵란 할구 세포의 세포주기는 핵이식 수정란의 정상 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). 또한 이러한 핵이식

수정란에서 방추사의 구조, 염색체의 구성, 핵이식 수정란의 체외 발달에 대해 공핵란의 세포주기에 따른 차이를 세포학적으로 연구한 보고도 있다 (Collas 등, 1992b; Pinto-correia 등, 1993, 1995).

이에 본 연구는 토끼를 사용하여서 동결, 융해된 수정란을 세포주기를 조절하여 32-세포기 단계의 G₁기 할구를 공핵란으로 사용하며 배란된 난자를 탈핵을 한 후 공핵란의 할구를 주입하고 융합한 다음 핵이식 수정란을 생산하여, 동결, 융해된 수정란의 할구가 핵이식 수정란의 체외 발달율에 미치는 영향을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 난자와 수정란의 준비

1) 공시 동물

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

2) 수핵란의 준비

핵을 수여 받을 난자의 과배란 유기는 성숙한 암토끼를 30 mg FSH (FOLTROPIN®, Australia)를 3일 동안 하루에 두 번씩 분할하여 근육주사하였고, 마지막 투여 12시간 후 hCG (PUBEROGEN®, Japan) 100 IU를 정맥주사하였다. 수핵란은 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 300 IU/ml hyaluronidase (SIGMA Co., U.S.A.)에서 39℃, 5% CO₂ 조건에서 7분간 배양한 다음, 150 μm fire-polished pipette으로

반복 pipetting하여 난구 세포를 제거하고 제 1극체가 명확하고 세포질이 균일하고 충실한 것만 수핵란으로 사용하였다.

3) 공핵란의 준비 및 세포주기 조절

토끼의 과배란 유기는 전항 2)와 같이 과배란을 유기한 다음 성숙된 수토끼와 교미를 시켰다. 16-세포기에 있는 수정란은 hCG 주사 후 48시간에 채란하여 일부는 동결하여 융해하였다. 정상 및 동결, 융해된 수정란은 32-세포기의 S 및 G₁기로 세포주기를 조절하였다. 할구 세포를 32-세포기의 G₁기로 세포주기를 동기화하는 방법은 Collas와 Robl (1992a)의 방법을 따랐다. 간단히 요약하면, 채란된 16-세포기의 수정란을 0.5 µg/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, 50 µm 정도의 pipette으로 Ca₂⁺ 및 Mg²⁺ 결여된 PBS에서 할구를 분리하였다. 이를 세척 후 DNA 합성 억제제인 0.1 µg/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) 수정란의 동결보존

회수된 수정란의 일부는 세포주기의 조절을 실시하여 핵이식의 공핵란으로 사용하였고, 수정란의 일부는 이 (1994)의 방법에 따라 vitrification 방법으로 동결하였다. 즉, 수정란을 EFS (40% ethylene glycol, 18% Ficoll, 0.3 M sucrose) 용액에서 2분동안 평형을 실시한 후 0.25 ml plastic straw에 수정란을 주입하여 30초 이내에 -196℃의 액체질소에 침지하였다. 수정란의 융해는 straw를 액체질소에서 꺼낸 즉시 20℃의 물에 침지하여 10~20초간 흔들면서 융해하였고, 0.5 M sucrose 용액에서 5분간 정지시켜 EFS 용액을 제거한 후 M-199 배양액으로 세척한 다음 수정란을 배양하였으며 세포주

기를 조절한 후 공핵란으로 사용하였다.

2. 핵이식을 위한 미세조작

수핵란의 탈핵을 위한 미세조작은 Stice와 Robl (1988)과 Collas 등 (1989)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 수핵란과 공핵란으로부터 분리된 할구 세포를 7.5 µg/ml 세포골격 억제제인 cytochalasin B (SIGMA Co., U.S.A.), 0.1 µg/ml 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 µg/ml cytochalasin B, 0.1 µg/ml 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 µm의 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. 할구가 주입된 핵이식 난자는 0.1 µg/ml aphidicolin 및 10% FCS가 포함된 M-199 배양액에서 미세조작 후 난자의 세포질과 할구의 융합 때까지 배양하였다.

3. 세포융합 및 난자의 활성화

난자와 할구의 융합 및 난자의 활성화는 hCG 주입 후 20시간에 전기자극으로 유도하였으며, 전기자의 조건은 이 등 (1993)의 융합 조건에 따라 1.25 kv/cm의 전압과 60 sec의 통전시간으로 3회 통전하여 실시하였다. 세포 융합과 난자의 활성화를 위한 용액은 100µM CaCl₂ 및 MgCl₂가 함유된 비전해질의 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 난자의 활성화를 유도하였다.

4. 핵이식 수정란의 체외배양

난자의 세포질과 할구의 융합이 확인된 난자는 0.1 $\mu\text{g/ml}$ aphidicolin을 포함한 0.28 M mannitol 용액에서 염색체의 응축이 일어나는 동안 DNA의 합성을 억제하기 위하여 대략 20분 동안 배양하였고, 이를 7.5 $\mu\text{g/ml}$ 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 토끼 난관상피세포의 monolayer와 같이 39°C의 5% CO₂ 배양기내에서 120시간 공배양하였다. 배양기간 동안 24시간마다 핵이식 수정란의 발달 단계 및 배반포로의 발달율을 조사하였고, 세포 융합 후 120시간제에 배반포로 발달한 핵이식 수정란의 할구수를 세기 위하여 Pursel 등 (1985)의 방법에 따라 형광 염색하였다.

5. 통계학적 분석

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

결과 및 고찰

1. 핵이식 수정란의 세포 융합률

동결 혹은 신선 수정란 할구의 세포주기를 조절한 S 및 G₁기 할구를 공핵란으로 사용하여 핵이식을 실시한 다음 이들의 세포 융합률을 조사한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다.

신선 32-세포기 단계의 S 및 G₁기 할구를 공핵란으로 사용한 핵이식 수정란에서 각각 80.9 및 82.6%의 세포 융합률을 보였으며, 동결된 수정란을 융해하여 32-단계의 S 및 G₁기 할구를 공핵란으로 사용한 핵이식 수정란에서 62.8 및 66.3%의 세포 융합률을 보여 동결, 융해된 수정란을 공핵란으로 사용하였을 때 세포융합률이 유의적으로 낮게 나타났다. 신선 수정란에서 Yang 등 (1990)은 63~66%, 박 등(1994) 및 이 등 (1995)은 80% 내외의 세포 융합률을 보고하고 있어 본 실험과 비슷한 결과를 보고하고 있으며, Collas와 Robl (1991)은 32-세포기 할구의 할구에서 그 융합률이 모두 100%이었다. 또한 Hitoshi와 Eto (1992)가 소의 체외배양된 난자에 16-세포기의 신선수정란과 동결 수정란의 할구를 주입한 후 융합률이 각각 87%와 68%로서 신선수정란이 동결 수정란보다 유의적(P<0.05)으로 높았다는 보고와 본 실험의 결과는 일치하는 경향을 보였다. 그러나 Westhusin 등 (1991)은 소의 체내배란된 난자의 핵을 탈핵하지 않고 양분한 후 위관강내에 신선 수정란 및 동결수정란의 융합률에 유의적인 차이를 보이지 않는다고 보고하였다. Bondioli (1993)는 소에서 체내성숙 및 체외성숙 난자와 주입된 할구의 융합률에서 유의적인 차이를 보이지 않는다고 보고하였다. 또한 동결 수정란을 융해할 때 원형질막의 파괴로 할구의 융해현상이 나타난다. Westhusin 등 (1991)은 융해 후 10~15%

Table 1. Electrofusion rate of nuclear transplant rabbit embryos using fresh and frozen donor nuclei at synchronized S or G₁ phase

Type of embryos	Cell cycle of donor nuclei	No. of embryos used	No. of embryos fused	Fusion rate(%)
Fresh	S phase	92	76	82.6 ^a
	G ₁ phase	105	85	80.9 ^a
Frozen	S phase	89	59	67.8 ^b
	G ₁ phase	78	49	66.3 ^b

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

Table 2. Development *in vitro* of nuclear trnasplant rabbit embryos using fresh and frozen donor nuclei at synchronized S or G₁ phase

Type of embryos	Cell cycle of donor nuclei	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to			
			2-cell	8-cell	Morula	Blastocyst
Fresh	S phase	76	54(71.1)	37(48.7)	32(42.1)	20(26.3) ^a
	G ₁ phase	85	82(96.5)	72(84.7)	69(81.2)	52(61.1) ^b
Frozen	S phase	59	59(64.4)	24(40.7)	20(33.9)	7(11.9) ^c
	G ₁ phase	59	38(77.6)	26(53.6)	24(48.9)	17(34.6) ^a

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

의 할구가 용해된다고 보고하였는데 이러한 결과가 동결, 융해된 수정란을 공핵배로 사용할 때 융합률의 저하를 가져온다고 사려된다.

2. 핵이식 수정란의 세포 융합율 및 체외 발달률

동결 혹은 신선 수정란 할구의 세포주기를 조절한 G₁ 및 S기 할구를 공핵란으로 사용하여 핵이식을 실시한 다음 융합이 확인된 핵이식 수정란은 1시간 동안 7.5 µg/ml 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 발달률을 조사한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같다.

신선 수정란을 세포 주기를 조절하여 공핵란으로 사용하였을 때 S 및 G₁기에서 핵이식 수정란이 배반포로의 발달률은 각각 26.3 및 61.1%를 보였고, 동결 수정란을 융해한 다음 S 및 G₁기로 조절한 공핵란을 사용하였을 때 핵이식 수정란이 배반포로의 체외발달률은 각각 11.9 및 34.6%를 보여 동결 수정란을 공핵란으로 사용한 경우 신선 수정란보다 배반포로의 체외 발달률이 유의적으로 감소하였다. 또한, 신선 및 동결 수정란의 할구의 세포주기를 G₁기로 조절하여 공핵란으로 사용한 경우 핵이식 수정란의 체외발달률을 향상시킬 수 있었다. Collas와 Robl(1991)은 32-세포기 S기의 공핵란을 사용하여 30~40%, 박 등 (1994)은 25% 내외, Yang 등 (1990)은 상실배 이상 발달하는 것이 15%, Modlinski와 Smorag (1991)는 16-세포기의 S기 할구를 사용하여 핵이식하였을 경우 9.5% 이었다고 한다. 또한 공핵란의 세포분열 주기를 조절하여 Collas 등

(1992a)은 G₁기의 공핵란을 사용하여 71%의 높은 배반포로의 발달률을 얻었으나, 이 등(1995) 및 박 등 (1996)은 G₁기의 할구를 사용하여 60% 정도의 발달률을 보여 본 실험과 비슷한 결과를 보이고 있다. 역시 박 등 (1995)은 체외 성숙된 수핵란에 동결 수정란을 사용하여 세포 주기를 조절한 다음 이들을 공핵란으로 사용하였을 때 15.7%가 배반포로 발달하였다고 한다. 그러나 Hitoshi와 Eto (1992)는 소에서 신선수정란과 동결수정란의 할구들의 핵이식 후 배반포로의 발달률은 2.2%와 4.7%라고 보고하여 유의적인 차이가 없었다고 하며, Westhusin 등 (1991)은 배란 5일과 6일째 수정란의 할구들의 핵이식 후 상실배 및 배반포로의 발달률이 각각 20.7%와 23.5%, 배란 5일째의 동결 수정란의 할구를 핵이식 후 상실배 및 배반포발달률은 25.2%라고 보고하여 체내배양된 성숙난자를 수핵란으로 사용할 경우에는 동결수정란의 할구를 핵이식하여도 신선 수정란의 할구와 비교하여 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 그러나 토끼에서 동결 수정란을 이용한 핵이식 수정란에서 배반포로의 발달률은 발달능력 면에서 차이가 나는 것을 알 수 있었다.

3. 핵이식 수정란의 평균 할구수 및 세포분열 주기

동결 혹은 신선 수정란 할구의 세포주기를 조절한 G₁ 및 S기 할구를 공핵란으로 사용하여 핵이식을 실시한 다음 이들을 120시간 동안 배양한 후 배반포로 발달한 핵이식 수정란을 Hoechst 33342로서 핵을 형광 염색을 하여 형광현미경하에서 할구의 수를 세었고, 그들의 하루 평균 세포분열 주기를 비교 조사하여 수핵란 세포질의 상태에 따른 핵이식 수

Table 3. Blastomere counts and daily cell cycles of blastocysts following *in vitro* culture for 120 hrs in nuclear transplant rabbit embryos using fresh and frozen donor nuclei synchronized at S or G₁ phase*

Type of embryos	Cell cycle of donor nuclei	No. of embryos stained	No. of blastomeres	No. of cell cycles /day
Fresh	S phase	10	145.1±25.0 ^a	1.44±0.93 ^a
	G ₁ phase	10	180.1±19.0 ^b	1.50±0.85 ^a
Frozen	S phase	7	103.7±12.3 ^c	1.34±0.72 ^a
	G ₁ phase	10	125.7±22.4 ^a	1.39±0.90 ^a

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

정란의 체외발달 능력을 비교 검토하였던 결과는 Table 3에 나타난 바와 같다.

핵이식 수정란을 120시간 동안 배양으로 할구들의 수가 신선 수정란의 S기에서 145.1개, G₁기에서 180.1개를 보였고 그들의 1일 동안 핵이식 수정란의 평균 세포분열 주기는 각각 1.44 및 1.50회 이었으나 동결 수정란의 S기에서 103.7개, G₁기에서 125.7개를 보였고, 1일 동안 핵이식 수정란의 평균 세포분열 주기는 각각 1.43 및 1.39회를 나타내어, 동결 수정란을 공핵란으로 사용하였을 때 120시간 배양 동안 체외배양하였을 때 세포분열이 지연되었고, 노 등 (1994)은 hCG 투여와 교미 후 24시간에 회수된 1 또는 2-세포기의 토끼 수정란을 토끼 난관상피 세포와 함께 72시간 배양하여 할구 수가 216.0개였다고 보고하였으며, Dainel (1964)은 교미 후 7일째 착상시의 토끼 수정란의 할구 수가 255,000개라고 보고하여, 핵이식 수정란은 발달이 지연되었음을 알 수 있었다. 수정란을 체외배양하면 부적당한 체외배양조건 (Fisher, 1987; Kane, 1987; Yang 등, 1990; Modlinski와 Smorag, 1991; Yang 등, 1992), 가시광선과 실온에 노출 (Schumacher와 Fischer, 1988; Bedford와 Dobrenis, 1989; Aman과 Parks, 1994; Nakayama 등, 1994), FCS의 유해한 효과(Dorland 등, 1994) 등이 발달지연을 일으킬 수 있다고 하며, 또한 난자의 세포질을 제거하면 할구수가 감소한다고 한다 (Bolton 등, 1984; Northey 등, 1991; Kato 등, 1994)

또한 수정란의 급속 동결시 수정란 및 세포 사멸의 주원인은 세포 내부의 빙정 형성에 있으며, 빙정은 세포에 물리적 압력을 가함으로써 세포질의 파괴를 일으킨다 (Rall 등, 1984; Rall, 1987; Troun-

son 등, 1987). 이 (1994)는 상실배 단계의 수정란을 동결, 융해 후 미소적에서 24시간 배양한 결과 배반포에서 할구수가 125개이었다고 보고하여 동결 수정란이 정상 수정란보다 할구수에서 유의적으로 차이를 나타내었고, 동결 수정란을 공핵란으로 사용한 핵이식 수정란 역시 정상 수정란과 정상수정란을 공핵란으로 사용한 핵이식 수정란보다 물리적, 화학적 손상에 더욱 민감하여 역시 생존율에 영향을 미친다고 사려된다.

본 실험의 결과에서 토끼에서는 동결수정란을 공핵란으로 사용한 경우 정상 수정란을 공핵란으로 사용한 경우보다 발달율은 감소하였지만, 공핵란으로 동결 수정란의 이용 가능성을 보여주었고, 이들 공핵란의 세포주기를 G₁기로 조절하여 사용하는 것이 염색체의 손상을 줄임으로서 핵이식 수정란의 발달률을 높일 수 있을 것으로 사려된다.

적 요

본 연구는 토끼의 동결 수정란을 융해하여 세포주기를 32-세포기의 G₁기 및 S기로 조절하여 재구성된 핵이식 수정란의 체외 발달능력을 조사하고자 하였다.

과배란시킨 토끼의 난관으로부터 16-세포기의 수정란을 채란하고, 일부는 vitrification 방법에 의한 급속동결방법으로 동결한 다음 융해하였다. 정상 및 동결, 융해된 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 2감수분

열 중기의 염색체를 탈핵한 후 수핵란으로 사용하였으며, 분리된 32-세포기 G₁기의 할구 세포를 탈핵한 난자의 위란강에 미세조작으로 주입하였다. 할구세포가 주입된 난자는 hCG 주사로부터 20시간에 직류 전류로서 세포의 융합과 난자의 활성화를 유도하였다. 융합이 확인된 핵이식 수정란은 120시간 동안 체외배양을 실시하였다.

이러한 실험에서 정상 및 동결 수정란의 S, G₁기를 공핵란으로 사용한 경우 각각 82.6 및 80.9, 67.8 및 66.3%의 융합률을 보여 동결 수정란을 공핵란으로 사용한 경우 유의적으로 융합률의 차이를 나타내었다. 이들 융합된 핵이식 난자를 120시간 공배양하였던 바, 이들의 배반포로의 발달률은 정상 및 동결 수정란의 S, G₁기를 공핵란으로 사용한 경우 각각 26.3 및 61.1, 11.9 및 34.6%를 보여 동결 수정란을 공핵란으로 사용한 경우 유의적으로 체외발달율의 차이를 나타내었으며, 정상 및 동결 수정란의 세포주기를 G₁기로 조절한 경우 유의적으로 높은 체외발달율을 보였다. 그리고 이들 배반포를 Hoechst 33342로서 핵염색을 실시하였던 바 정상 및 동결 수정란의 S, G₁기를 공핵란으로 사용한 핵이식 수정란에서 평균 할구수는 각각 145.1 및 180.1, 103.7 및 125.7개로서 유의적인 차이를 보였으며, 또한 1 일간의 평균 세포분열 주기 회수는 각각 1.44 및 1.50, 1.34 및 1.39회로 동결 수정란을 공핵란으로 사용한 경우 체외발달 능력이 지연됨을 알 수 있었고, 역시 공핵란의 세포주기를 G₁기를 사용한 경우 체외발달 능력이 향상됨을 알 수 있었다.

이러한 결과에서 동결수정란을 공핵란으로 사용한 경우 정상 수정란을 공핵란으로 사용한 경우보다 발달율은 감소하였지만, 공핵란으로 동결 수정란의 이용 가능성을 보여주었고, 이들 공핵란의 세포주기를 G₁기로 조절하여 사용하는 것이 핵이식 수정란의 체외발달능력을 향상시킬 수 있다고 사료된다.

참고문헌

Aman RR and Parks JE. 1994. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosome of *in vitro*-matured bovine ooc-

ytes. Biol. Reprod., 50:103-110.

Barnes FL, Collas P, Powell R, King WA, Westhusin M and Sheperd D. 1993b. 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.

Bedford JM and Dobrenis A. 1989. Light exposure of oocytes and pregnancy rates after their transfer in the rabbit. J. Reprod. Fert., 85:477-481.

Bolton VN, Oades PJ and Johnson MH. 1984. The relationship between cleavage, DNA replication and gene expression in the mouse 2-cell embryos. J. Embryol. Exp. Morphol., 79:139-169.

Bondioli KR. 1993. Nuclear transfer in cattle. Mol. Reprod. Dev., 36:274-275.

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.

Cheong HT, Takahashi Y and Kanagawa H. 1993. Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into oocytes. Biol. Reprod., 48:958-963.

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. 1989. Electrical activation of mouse oocytes. Theriogenol., 32:835-844.

Collas P, Pinto-Correia C, Ponce De Lean FA and Robl JM. 1992(b). Effect of donor cell stage on chromatin and spindle morphology in nuclear transplant rabbit embryos. Biol. Reprod., 46:501-511.

- Collas P, Balise J, Hofmann GA and Robl JM. 1992(a). Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 46:492-500.
- Daniel JC Jr. 1964. Early growth of rabbit trophoblast. *American Naturalist*, 98:85-97.
- Dorland M, Gardner DK and Trounson AO. 1994. Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in ovine embryos. *J. Reprod. Fertil., Abstract. Series No.* 13:25(Abstr.).
- Fischer B. 1987. Development retardation in cultured preimplantation rabbit embryos. *J. Reprod. Fert.*, 79:115-123.
- Hitoshi U and Eto T. 1992. Production of calf from nuclear transfer embryo using *in vitro* matured oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 38:61-65.
- Kane MT. 1987. *In vitro* growth of preimplantation rabbit embryos.:In *The mammalian preimplantation embryos :Regulation of growth and differentiation in vitro.* (Ed. by B. D. Bavister), Plenum Press, New York, pp. 193-213.
- Kato Y, Oguro T and Tsunoda Y. 1994. Effects of the reduction of cytoplasm of mouse 2-cell embryos on blastocoele formation timing and developmental ability *in vitro* and *in vivo*. *Theriogenol.*, 41:1483-1488.
- Kono T, Kwon OY, Watanabe T and Nakahara T. 1992. Development of mouse enucleated oocytes receiving a nucleus from different stages of the second cell cycles. *J. Reprod. Fert.*, 94:481-487.
- McGrath J and Solter D. 1983. Nuclear transplantation in mouse embryos. *J. Exp. Zool.*, 228:355-362.
- 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.
- Nakayama T, Noda Y, Goto Y and Mon T. 1994. Effects of visible light and other environmental factors on the production of oxygen radicals by hamster embryos. *Theriogenol.*, 41:499-510.
- Northey DL, Nuttleman PR and Rosenkrans CF. 1991. Removal of bovine oocyte cytoplasm prior to fertilization reduces cell numbers in embryos. *Biol. Reprod.*, 156(Abstr.).
- Pinto-correia C, Long CR, Chang T and Robl JM. 1995. Factors involved in nuclear reprogramming during early development in the rabbit. *Mol. Reprod. Dev.*, 40:292-304.
- Pinto-correia C, Collas P, Ponce De Leon FA and Robl JM. 1993. Chromatin and microtubule organization in the first cell cycle in rabbit parthenotes and nuclear transplant embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 34:33-42.
- Pursel VG, Wall RJ, Rexroad Jr CE, Hammer RE and Brinster RL. 1985. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenol.*, 24:687-691.
- Rall WF. 1987. Factor affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiol.*, 24:387-402.
- Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 313:573-575.
- Schumacher A and Fischer B. 1988. Influence of visible light and room temperature on cell proliferation in preimplantation rabbit embryos. *J. Reprod. Fert.*, 84:197-204.
- Stice SL and Robl JM. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 39: 657-664.
- Trounson AO, Peura A and Kirby C. 1987. Ultra-rapidly freezing :A new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil. Steril.*, 48:843-850.

- Ushijima H and Eyo T. 1992. Production of a calf from a nuclear transfer embryos using *in vitro* matured oocytes. J. Reprod. Dev., 38:61-65.
- Westhusin ME, Pryor JH and Bondioli KR 1991. Nuclear transfer in the bovine embryo: A comparison of 5-day, 6-day, frozen-thawed and nuclear transfer donor embryos. Mol. Reprod. Dev., 28:119-123.
- Yang X, Jiang S and Shi Z. 1992. Improved activation by combined cycloheximide and electric pulse treatment of bovine follicular oocytes matured *in vitro* for 23-24 hours. Biol. Reprod., 46(Suppl.):117(Abstr.).
- Yang X, Zhang L, Kovács A, Tobback C and Foote RH. 1990. Potential of hypertonic medium treatment for embryos micromanipulation II.: Assesment 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.
- 노규진, 이효종, 송상현, 윤희준, 박충생. 1994. 수정란의 체외발달에 미치는 배양액 및 소와 토끼의 난관상피세포들과의 공배양 효과. 한국가축번식학회지 18:39-46.
- 박충생, 전병균, 윤희준, 이효종, 최상용. 1996. 토끼 핵이식 수정란의 체외발달에 미치는 공핵란 세포주기의 효과. 한국가축번식학회지. 20: 143-153.
- 박충생, 전병균, 이경미, 윤희준, 이효종, 최상용. 1995. 토끼의 체외배양 난자를 이용한 핵이식으로 복제수정란 및 복제산자의 생산. 한국수정란이식학회지 10:65-72.
- 박충생, 전병균, 이효종, 최민철, 최상용. 1994. 토끼에서 공핵란의 발달단계가 할구주입, 전기융합 및 핵이식 수정란의 체외발달에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지 9:153-160.
- 이영락. 1994. Vitrification 방법에 의한 토끼 수정란의 동결보존시 발달단계와 평형시간이 생존성에 미치는 영향. 경상대학교 석사학위논문.
- 이효종, 전병균, 박충생, 최상용, 윤창현, 강대진. 1995. 반복핵이식에 의한 복제동물 생산에 관한 연구. II. 토끼에서 공핵배의 세포주기 조절에 의한 제2세대 복제배의 생산효율 개선. 한국수정란이식학회지 10:73-82.
- 이효종, 최민철, 최상용, 박충생, 윤창현, 강대진. 1993. 반복핵이식에 의한 복제동물 생산에 관한 연구. I. 토끼 수핵난자의 전기자극에 의한 활성화. 한국수정란이식학회지 8:151-154.