韓國受精卵移植學會誌(1997) 第 12 卷 第 2 號
Korean J. Emb. Trans. (1997) Vol. 12, No. 2 pp. 171~179

핵이식을 이용한 복제송아지 생산에 관한 연구†
Ⅰ. 세포주기, 융합배지 및 산소분압이 체외발육능에 미치는 영향

황우석 · 신태영 · 노상호 · 이병천
서울대학교 수의과대학

Studies on the Cloning of Calves by Nuclear Transplantation
Ⅰ. Effects of Cell Cycle, Fusion Media and Oxygen Concentration on the Developmental Competence

W. S. Hwang, T. Y. Shin, S. Roh and B. C. Lee
College of Veterinary Medicine, Seoul National University

SUMMARY

The objectives of the present study were improvements in the efficiency of developmental rates to morula and blastocyst stages to produce a large number of genetically identical nuclear transplant embryos.

The oocytes collected from slaughterhouse ovaries were matured for 24 h and then enucleated and cultured to allow cytoplasmic maturation and gain activation competence. And then the donor embryos were treated for 12 h with 10 μg/ml nocodazole and 7.5 μg/ml cytochalasin B to synchronize the cell cycle stage at 26 h after the onset of culture. The blastomeres were transferred into the perivitelline space of the enucleated oocytes and blastomeres and oocytes were fused by electrofusion. The cloned embryos were then cultured in various conditions to allow further development.

The age of the recipient(30 vs 40 h) had no significant effect on the fusion rates(82.4 vs 82.1%) and the developmental rates to morula/blastocyst(9.8 vs 11.0%). Effect of Nocodazole treatment on the donor cell cyle synchronization to improve the developmental rates of bovine nuclear transplant embryos was significantly higher than control group(21.4 vs 10.1%, $p<0.05$). Significant differences were in the percentage of fusion rates(72.9, 77.1 vs 61.9%) in three types of fusion medium(PBS(+), mannitol and sucrose, $p<0.01$). The developmental rates of bovine nuclear transplant embryos appeared to be highest in mSOF medium under 5% O_2 condition, but no significant differences were found when compared with TCM199-BOEC and mSOF under two different oxygen ratio(5 and 20%).

(Key words : bovine embryo, nuclear transplantation, oocyte aging, cell cycle)

서 론

핵이식은 우수한 유전형질을 지닌 동일한 다수의 개체를 생산 가능하게 함으로써 경제성을 극대화시

† 본 논문은 1994년도 교육부 학술연구조성비(유전공학)에 의하여 연구되었음.

키고, 번식효률을 크게 향상시킬 수 있는 분야로 Briggs와 King(1952)에 의해 양서류에서 처음으로 시도되었으며, 마우스(Illmensee와 Hope, 1981), 토끼(Stice와 Robl, 1988), 면양(Willadsen, 1986), 돼지(Prather 등, 1988) 및 소(Prather 등, 1987) 등의 포유류에서도 산자 생산에 성공하였다. 특히, 산업동물인 소에 있어 핵이식은 경제적 가치가 매우 높아 최근 산업화에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Barnes 등, 1993).

소 핵이식 수정란은 정상적인 수정과정이 생략된 채, 이식된 핵에 의해 발육이 지속되므로 수핵난자의 경우, 세포질의 활성화 처리가 요구된다(Robl과 Stice, 1989). 핵이식란의 작성에 있어 전기적 자극을 통한 성숙난자의 활성화시 1회 전기자극만으로는 충분한 세포질 활성화를 이룰 수 없다고 하여 체외성숙시간을 연장시키는 방안이 제시되었고(Ware, 1989) 체외성숙 30~40시간의 aged cytoplast를 수핵난자로 사용할 경우 더 높은 분할률을 나타내는 것으로 보고되어 있다(Yang 등, 1993).

한편 Collas 등(1992)의 연구결과에 따르면 작성된 핵이식 수정란의 G1기 공핵란과 S기 공핵란이 각기 다른 분할률을 보여 공핵란의 세포주기가 핵이식 수정란의 발육에 영향을 미칠 수 있음을 보고하였다. 이에 관한 정확한 기전은 아직 밝혀지지 않고 있으나 DNA 재복제에 의한 핵형이상 때문인 것으로 알려져 있다(Collas 등, 1992). 공여핵의 세포주기 조절에 관한 연구에 있어서는 세포를 특정주기에 정지시킬 수 있는 효과가 있는 nocodazole 혹은 colcemide와 같은 세포골격 억제물질이 매우 유용하게 사용되고 있다(Johnson 등, 1989).

이식된 핵을 수핵란과 융합시키기 위해서는 세포융합과정이 필수적으로 요구되며 이를 위해 전기적 세포융합법이 널리 이용되고 있다. 이때 융합배지로는 sucrose가 주성분인 Zimmermann fusion medium이 소에서 가장 일반적으로 이용되고 있으며(Westhusin 등, 1991), 토끼(Collas와 Robl, 1991), 돼지(Prather 등, 1988), 양(Smith와 Wilmut, 1988)의 경우에는 mannitol이 좋은 결과를 나타내는 것으로 보고되었다.

전기적 세포융합 후 작성된 핵이식란을 수란우에 이식가능한 후기배로 발육시키기 위해서는 핵이식 수정란의 적절한 배양과정이 요구된다. 이를 위해 배지내에 난관 상피세포(Ellington 등, 1990), 과립막세포(Fukui와 Ono, 1989) 및 Buffalo rat liver cell(BRL, Voelkel과 Hu, 1992) 등을 첨가하여 배양하는 공배양법과 각종 성장인자 및 필수아미노산 등이 첨가된 단순합성배지(Pinyopummintr와 Bavister, 1991)에 대한 연구도 보고된 바 있다. 또한 Nakao와 Nakatsuji(1990)는 배양조건 중 가스분압내 산소농도의 변화가 소 수정란의 발육에 미치는 영향에 관하여 보고하였다. 최근 이러한 *in vitro* 배양체계의 진전으로 *in vivo*에서의 배양성적과 유사한 수준의 후기배로의 발육률을 얻고 있으며 수란우에 이식 후 산자생산률도 향상되고 있다(Heyman 등, 1994).

본 실험에서는 안정적인 핵이식 수정란 생산체계의 확립을 목적으로 세포질 성숙시간과 융합배지에 따른 세포융합률 및 체외발육률을 비교하고 nocodazole을 이용한 세포주기 동기화가 핵이식란의 발육률에 미치는 영향 및 핵이식란의 체외배양 최적조건 등을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 체외성숙

도축장에서 난소를 채취한 후 100 IU/ml의 penicillin과 100 μg/ml의 streptomycin이 첨가된 38℃의 생리식염수가 들어 있는 보온병에 넣어 2시간 내에 실험실로 운반하였다. 주사침(18 gauge)이 연결된 10 ml의 주사기로 5% fetal bovine serum (Gibco BRL, USA; 이하 FBS로 약함)이 첨가된 tissue culture medium 199(Gibco BRL, USA; 이하 TCM199으로 약함)을 2 ml 정도 흡인한 다음 직경 3~5 mm의 小난포로부터 난자를 채취하였다. 회수된 난포란은 Wiemer 등(1991)의 기준에 준해 난구세포가 치밀하게 부착되고 세포질이 균질한 것만을 선별하여 사용하였다. 배양액은 10% FBS첨가 TCM199이 분주되어 있는 4-well dish(Nunc, Denmark)의 각각의 well내에 10 ng/ml의 epidermal growth factor(Boehringer Mannheim, Germany; 이하 EGF로 약함)와 성숙난포로부터 채취된 과립막세포를 세정하여 5.0×10^6개/ml의 농도

로 첨가하여 사용하였다. 이후 각 well당 15개씩의 난자를 넣어 공기 및 습도가 포화상태인 39℃, CO_2 배양기내에서 20~24시간 배양하였다.

2. 체외수정

정액은 straw당 4×10^7개의 정자가 들어있는 동결정액을 사용하였으며 기본배양액은 modified Tyrode-medium(Parrish 등, 1988; 이하 TALP로 약함)을 사용하였다. 난자의 성숙배양개시 22시간 후에 체외수정을 위해 동결정액을 38℃ 수조에 30초간 침지하여 진탕융해시킨 후 현미경하에서 운동성을 확인하였다. 준비된 10개의 round bottom plastic tube(Falcon, USA; 11×55 mm)에 1 ml의 정자수정능 획득용 배지(sp-TALP)를 넣고 0.2 ml씩의 정자를 첨가하여 CO_2 배양기내에서 1시간 정치하였다(swim-up 과정). 그 후 정자의 상층액 0.8 ml를 pasteur pipette으로 흡입하여 하나의 원심관에 모으고 세정을 위해 2회 원심분리(700×g, 5분)하여 동결보호제 및 희석액을 제거하고 생존성있는 활력정자를 선별하였다. 수정능획득은 원심관에 들어있는 정자를 농도가 1×10^8개/ml 되도록 조정한 후 heparin(Gibco BRL, USA; 200 μg/ml)을 포함한 sp-TALP를 동량 첨가하여 CO_2 배양기에 15분간 배양함으로써 유도하였다. 한편 정자를 swim-up시키는 동안 성숙난자는 세정과정을 통하여 팽대된 난구세포 1/3 정도를 벗겨낸 후 light white oil (mineral oil; Sigma, USA)이 도포된 35 mm petridish(Costar, USA)내의 수정용-TALP 43μl drop에 3 μl의 배지와 함께 각각 5개씩 주입하였다. 체외수정은 준비된 난자의 drop에 heparin처리 후 동량의 sp-TALP를 혼합한 다음 4 μl의 배지로 정자를 최종농도가 2×10^6개/ml가 되도록 첨가하여 CO_2 배양기내에서 18시간 동안 배양하여 실시하였다.

3. 분할란의 체외배양

초기 황체기 소 난관의 여분 결제직을 제거한 후 5% FBS첨가 TCM199으로 관류시켜 난관 상피세포를 채취하였다. 난관 상피세포는 5% FBS첨가 TCM199으로 3회 원심분리(1,000×g, 5분)하여 세정한 후 10% FBS첨가 TCM199 0.5 ml씩이 분주된 4-well dish에 3일간 배양하여 난관 상피세포의 monolayer를 작성하였다. 형성된 monolayer는 수정란과 함께 배양하기 3시간 이전에 배양액을 교환하여 부유하고 있는 잔존과 사세포들을 제거하고 평형시켰다. 초기배(2~4세포기 이상)는 monolayer가 형성된 dish에 각 well당 12~15개씩을 넣어 공배양을 실시하였다.

4. 수핵난자의 준비 및 미세조작

수핵난자로 준비된 metaphase Ⅱ단계의 체외성숙난자(성숙 22시간 후)는 0.1% hyaluronidase(Sigma, USA)가 첨가된 PBS(+)(Gibco BRL, USA) 2 ml가 분주된 35 mm petridish에서 mouth pipetting을 실시하여 난구세포를 완전히 벗겨낸 후 제 1극체가 보이는 것만을 선별하여 실험에 사용하였다. 미세조작은 differential interference contrast(DIC)가 장착된 도립현미경(Leitz, Germany; ×250)하에서 실시하였다. 수핵란은 탈핵을 용이하게 하기 위하여 미리 투명대의 10~20% 정도를 절개하고 미세조작시의 손상을 최소화하기 위해 절개 후 7.5 μg/ml의 cytochalasin B(Sigma, USA)가 함유된 PBS(−) 20 μl의 미소적내에서 20분간 전배양시켰다. 전배양 후 외경 20 μm의 탈핵용 pipette을 사용하여 수핵란의 절개되어진 투명대를 관통하여 제 1극체와 metaphase chromosome을 한꺼번에 karyoplast 형태로 흡입, 제거하였다. 수핵란은 탈핵을 마친 후 세정과정을 거쳐 10% FBS첨가 TCM199이 분주된 4 well dish에 옮기고 체외성숙시간에 따른 난자의 활성화율을 조사하기 위하여 성숙 30 및 40시간군으로 분류하였다.

5. 공핵수정란에의 nocodazole 처리 및 미세조작

난자의 체외성숙 22시간째에 수핵란의 탈핵을 실시하고 체외성숙 26시간째에 16~32세포기의 체외수정유래 공핵란을 10 μg/ml 농도의 nocodazole로 12시간 정도 처리한 다음 0.5%의 pronase (Sigma, USA)가 첨가된 PBS(−)내에서 1분 동안 처리하여 할구를 분리하였다. 이로부터 3~5시간 동안 nocodazole이 포함되지 않은 PBS(−)에서 배양하여(7.5 μg/ml cytochalasin B 함유) 32~64세포기로 발육이 이루어진 수정란만을 선별하여 핵이식에 이용하였다.

핵이식은 공핵수정란의 할구를 외경 30 μm의 주입용 pipette내로 흡입하여 탈핵된 수정란의 절개된 투명대를 관통한 다음 주란강에 주입함으로 실시하였다.

6. 전기융합

핵이식란은 light white oil이 도포된 60 mm petridish의 PBS(+), 0.28 M mannitol, 그리고 0.28 M sucrose 20 μl의 융합 미소적내로 옮겨 10분간 평형시간을 가진 후 agglutination plane과 전류통전 방향이 수직이 되도록 alignment를 형성시켰다. 전기적 세포융합은 1.5 kV/cm에서 70 μs의 조건으로 실시하였으며, 1회 통전하여 세포융합을 유도하였다. 통전 1시간 후에 현미경하에서 검사하여 세포융합 여부를 판정하였다.

7. 핵이식 수정란의 배양

핵이식 수정란은 5 및 20%로써 각기 다른 O_2 농도 조건하에서 난관 상피세포와의 공배양 및 단순합성배지(mSOF)를 이용, 배양을 실시하여 후기배로의 발육을 유도하였다. 난관 상피세포와의 공배양은 난자의 체외성숙 및 분할란의 체외배양시와 동일하게 실시하였으며 SOF에서의 배양은 수정란을 세정용 SOF에서 3회 세정한 후 배양용 SOF가 0.5 ml씩 분주된 4-well dish에서 oil 도포 후 실시하였다.

각각의 실험군은 수정란을 공히 well당 10~15개씩 첨가하였으며 수정 후 7일째에 후기배로의 발육률을 조사하였다.

8. 통계학적 분석

실험결과의 통계학적 유의성 검정은 χ^2-test를 이용하여 실시하였다.

결 과

1. 체외성숙시간이 소 핵이식 수정란의 융합률과 분할률에 미치는 영향

체외성숙 30 및 40시간 후 탈핵시킨 체외성숙난자를 수핵란으로 이용하고 체외수정 유래 수정란의 할구를 이식하여 전기적 세포융합을 실시한 후 세포융합률과 체외발육률을 검토한 결과는 Table 1과 같다.

체외배양 유래의 수정란을 공핵란으로 이용하였을 경우 핵이식 수정란의 전기적 세포융합 후 세포융합률과 체외발육률은 30시간 군과 40시간 군에서 각각 82.3 및 82.1, 그리고 58.9 및 67.7%를 나타내어 유의적인 차이가 인정되지 않았다.

2. 공핵란의 세포주기 동기화가 소 핵이식 수정란의 체외발육률에 미치는 영향

체외수정유래 16~32세포기의 공핵란을 10 μg/ml 농도의 nocodazole로 처리하여 세포주기가 G1기로 고정된 것만을 선별하여 핵이식에 이용하였을 경우 핵이식수정란의 세포융합률 및 체외발육률을 검토한 결과는 Table 2와 같다.

공핵란의 세포주기 동기화가 핵이식란의 전기적 세포융합률에 미치는 영향은 nocodazole처리에 따라 통계적인 유의차를 보이지 않았으나 후기배로의 발육률에 있어 nocodazole처리군과 비처리군이 각각 21.4 및 10.1%로 나타나 nocodazole처리군이 대조군에 비해서 높은 후기배로의 발육률을 보였다.

3. 융합배지에 따른 소 핵이식 수정란의 전기적 융합률

소 핵이식수정란을 PBS(+), 0.28 M sucrose 그리고 0.28 M mannitol이 20 μl씩 분주된 융합 미소적내로 옮겨 70 μs 동안 DC 1.5 kV/cm로 통전하였을 때의 세포융합률과 분할률을 검토한 결과는 Table 3과 같다.

Table 1. The fusion rates and *in vitro* development of nuclear transplant embryos with recipient cytoplast of different ages

Maturation time(h)	No. of embryos fused/used(%)	No.(%) of embryos cleaved	No. of embryos developed to	
			≤16 cell	morulae≤/cleaved(%)
30	173/210(82.4)	102(59.0)	92	10(9.8)
40	174/212(82.1)	118(67.8)	105	13(11.0)

· Prior to fusion, oocytes were mechanically aligned. Immediately, a single DC pulse of 1.5 kV/cm for 70 μs followed.

Table 2. Effect of donor cell cycle stages on the developmental competence of bovine nuclear transplant embryos

Nocodazole treatment	No. of embryos fused / used(%)	No.(%) of embryos cleaved	No. of embryos developed to	
			≤16 cell	morulae≤ /cleaved(%)
−	148 / 181(81.8)	99(66.9)	89	10(10.1)[a]
+	152 / 172(88.4)	112(73.7)	88	24(21.4)[b]

· *In vitro* derived Donor embryos were treated for 12 h with 10 μg / ml nocodazole and 7.5 μg / ml cytochalasin B at 26 h after the onset of oocyte culture.

a,b : Different superscripts denote significant difference($p<0.05$).

Table 3. The fusion rates & *in vitro* development of bovine nuclear tranasplant embryos in different fusion media

Fusion media*	No. of embryos used	No.(%) of embryos		No.(%) of embryos cleaved
		Fused	Lysed	
PBS(+)	240	175(72.9)[a]	26(10.8)[a]	119(68.0)
0.28 M mannitol	235	183(77.1)[a]	28(11.9)[a]	128(69.9)
0.28 M sucrose	247	153(61.9)[b]	12(4.9)[b]	93(60.9)

· Membrane fusion was induced by a single DC pulse of 1.5 kV / cm for 70 μs.

* All fusion media were supplemented with 0.05 mM $CaCl_2$ and 0.10 mM $MgSO_4$.

a,b : Different superscripts denote significant difference($p<0.01$).

소 핵이식 수정란을 70 μs 동안 1.5 kV / cm로 1회 통전하였을 경우 PBS(+)(72.9%)와 0.28 M mannitol(77.1%)이 0.28 M sucrose(61.9%)와 비교해 보았을 때 유의적으로 높은 융합률을 보였으며($p<0.01$) 융합 후 분할율은 0.28 M mannitol에서 가장 높게 나타났으나 세 군간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

4. 체외배양시 산소농도가 소 핵이식수정란의 후기배로의 발육에 미치는 영향

소 핵이식 수정란을 70 μs 동안 1.5 kV / cm로 1회 통전하여 세포융합을 실시한 후 5 및 20%로써

Table 4. *In vitro* development of bovine nuclear transplant embryos in TCM199-BOEC and mSOF under different oxygen concentration

Culture condition		No. of embryos fused	No.(%) of embryos cleaved	No. of embryos developed to	
				≤16 cell	morulae≤ /cleaved(%)
TCM199-BOEC*	5% O_2***	175	104(59.4)	93	11(10.6)
	20% O_2***	183	126(68.9)	107	19(15.1)
mSOF**	5% O_2***	181	126(69.9)	106	20(15.9)
	20% O_2***	178	109(61.2)	99	10(9.2)

* TCM199-BOEC : TCM199 co-cultured with bovine oviductal epithelial cell.

** mSOF : Modified synthetic oviduct fluid.

*** 5% O_2 : Gas atmosphere of 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2.

20% O_2 : Gas atmosphere of 5% CO_2 in air.

각기 다른 산소농도하에서 소 난관상피세포와의 공배양 및 mSOF에서의 체외배양을 실시하여 얻은 결과는 Table 4와 같다.

mSOF 체외배양군과 소 난관상피세포와의 공배양군을 5% O_2와 20% O_2 조건하에서 각각 나누어 실험한 결과, mSOF에서 배양하였을 경우, 5% O_2 배양군(15.9%)이 20% O_2 배양군(9.2%)에 비해서 높은 후기배로의 발육률을 보였으며, 소 난관상피세포와의 공배양을 실시하였을 경우 5% O_2와 20% O_2 배양군의 후기배 발육률이 각각 10.6 및 15.1%로 나타나 20% 조건하에서의 소 난관상피세포 공배양군이 후기배 발육에 유효한 것으로 나타났으나 모든 실험군에서 유의적 차이는 볼 수 없었다.

고 찰

1983년 McGrath와 Solter가 미세조작법을 개선, 개발한 이래 각종 포유동물 수정란에서의 탈핵, 이식, 세포융합법에 관한 연구가 이루어져 왔으며, 면양(Willadsen, 1986), 소(Prather 등, 1987), 토끼(Stice와 Robl, 1988) 및 돼지(Prather, 1988)에서도 핵이식에 의한 산자 생산이 보고되었다.

성숙난자는 세포내에서 합성되는 성숙촉진인자(Maturation Promoting Factor; MPF)로 인해 배란시 metaphase Ⅱ 단계에서 활성이 정지되어 있으므로, 이 인자의 불활성화를 유도하여야 난세포질의 활성화를 기할 수 있다.

이와 같은 난자의 활성화 유도를 위하여 ethanol 처리(Nagai, 1987), 삼투압조절(Rickords와 White, 1992), Ca Ionophore A23187(Ware 등, 1989) 및 전기적 자극(Collas 등, 1989) 등이 연구되어 왔으며 그중에서도 반복재현성과 효율성이 높은 전기적 자극에 의한 활성화 및 난자의 성숙시간을 연장시킨 가령난자(aged oocytes)에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 수핵난자의 활성화 정도는 세포융합 후 분할률에 많은 영향을 미치며(Yang 등, 1992) 체외배양시간이 증가할수록 활성화 정도가 증가한다고 보고하였다(Barnes 등, 1993). 세포질의 전기적 활성화를 유도한 후 세포융합을 실시한 결과 30시간 군과 40시간 군에서 세포융합률은 각각 82.4 및 82.1%, 그리고 체외발육률은 각각 58.9 및 67.7%로써 유의차는 인정되지 않았으나 40시간 군이 30시간 군보다 높은 체외발육률을 보여 효과적인 난자의 활성을 유도하기 위해서는 체외성숙 30시간 이상이 필요하다고 한 Ware 등(1989)의 성적과도 유사한 결과를 보였다.

공핵란의 세포주기가 핵이식에 의해 작성된 수핵란의 발달에 영향을 미친다는 연구결과가 계속 보고되고 있으며 이는 특정 세포주기에서의 핵형 이상으로 설명하고 있으나 정확한 기전은 밝혀져 있지 않다(Collas 등, 1992). 이들의 연구결과에 따르면 G1 phase단계의 공핵란과 S phase단계의 공핵란이 각기 다른 분할율을 보여 세포주기가 핵이식에 있어 영향을 미칠 수 있음을 보고하였다. 세포주기의 조절을 위해 사용되는 nocodazole은 tubulin monomer에 결합함으로 방추사의 형성을 억제하여 난세포로 하여금 염색체의 극이동이 일어나기 직전에 세포주기를 멈추게 한다(Johnson 등, 1989). 이러한 세포골격 억제물질은 난세포로 하여금 세포주기를 멈추게 하는 효과를 가지고 있어 공핵란의 세포주기가 핵이식란에 미치는 영향을 연구하는데 매우 유용하게 쓰이고 있다.

본 실험에서는 Nocodazole처리군과 대조군에 있어 세포융합률은 각각 88.4 및 81.8%로써 유의차를 보이지 않았으나 후기배 발육률에 있어서는 21.4 및 10.1%로써 유의적인 차이를 보여 수핵란의 세포주기가 작성된 핵이식 수정란의 발육에 크게 영향을 미칠 수 있음이 밝혀졌다.

세포에 전기자극을 가하면 세포막 2중구조에 순간적인 미세열공을 형성시킴으로 일시적인 통로가 형성되어 상호간의 세포질 교류와 함입이 일어나 세포융합이 완료된다고 알려져 있으며, 전기적 세포융합시 세포융합배지로서는 비전해질인 mannitol, sorbitol, sucrose, glucose 및 histidine 등을 이용하며 전해질로는 PBS를 이용하고 있다(Prather 등, 1987). 본 실험에서는 전해질 배지인 PBS(+)와 비전해질 배지인 0.28 M sucrose, 0.28 M mannitol에서 핵이식수정란을 70 μs 동안 1.5 kV/cm로 1회 통전한 후 세포융합률을 비교한 결과 PBS(+)(72.9%)와 0.28 M mannitol(77.1%)이 0.28 M sucrose(61.9%)에 비해 유의적으로 높은 세포융합률을 보였다.

또한 전기적 세포융합후 작성된 핵이식란의 적절한 체외배양조건 설정을 위해 본 실험에서 체외수정 후의 초기배를 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2의 혼합가스와 5% CO_2 in air의 가스분압 조건하에서 각각 TCM199과 mSOF를 이용하여 실험한 결과 mSOF에서 배양하였을 경우, 5% O_2 배양군(15.9%)이 20% O_2 배양군(9.2%)에 비해서 높은 후기배로의 발육률을 보였으며, 소 난관상피세포와의 공배양을 실시하였을 경우 후기배로의 발육률이 각각 10.6와 15.1%로 나타나 단순합성배양액내에서는 5% O_2가, 공배양시에는 20% O_2가 수정란의 발육에 좋은 것으로 나타났다.

가스분압 중의 산소농도는 착상전 소 수정란의 발육과 관련된 중요 요인으로 Tervit 등(1972)은 5~10%의 산소농도가 소 수정란의 체외발육에 적절하다고 하였다. 서로 다른 가스분압하에서의 배양결과가 상반되는 이유를 정확히 설명할 수는 없으나, 산소농도가 높을 경우 발생하는 oxygen radical의 작용 등 배양환경의 차이가 한 요인인 것으로 생각된다.

적 요

소의 체외수정 유래의 16~32세포기의 할구를 탈핵된 체외성숙난자에 이식하여 핵이식란의 작성시 전기적 세포융합률과 후기배로의 발육률, 세포질의 성숙시간과 배양조건에 따른 융합률 및 체외발육률 등을 조사하여 얻은 결과는 다음과 같다.

1. 체외배양 유래의 16세포기의 수정란을 공핵란으로 이용하였을 경우 핵이식 수정란의 전기적 세포융합 후 세포융합률과 체외발육률은 30시간 군과 40시간 군에서 각각 82.3과 82.1% 그리고 58.9와 67.7%로써 유의차는 인정되지 않았다.
2. 세포주기 동기화가 핵이식란의 전기적 세포융합률에 미치는 영향은 Nocodazole처리군이 88.4%, 대조군이 81.8%로 나타나 통계적인 유의차를 보이지 않았으나 후기배로의 발육률은 각각 21.4와 10.1%로써 Nocodazole 처리군이 대조군에 비해서 높은 후기배로의 발육률을 보였다($P<0.05$).
3. 소 핵이식 수정란의 전기적 세포융합률과 분할율은 70 μs 동안 1.5 kV/cm로 1회 통전하였을 경우 PBS(+)(72.9%)와 0.28 M mannitol(77.1%)이 0.28 M sucrose(61.9%)와 비교하여 유의적으로 높은 융합률을 보였으며($P<0.01$) 융합 후 분할율은 0.28 M mannitol에서 가장 높게 나타났으나 세 군간의 유의성은 인정되지 않았다.
4. 배양기내 서로 다른 산소분압조건(5% O_2와 20% O_2)하에서 mSOF 체외배양군과 소 난관상피세포와의 공배양군으로 나누어 실험한 결과, mSOF에서 배양하였을 경우, 5% O_2 배양군(15.9%)이 20% O_2 배양군(9.2%)에 비해 높은 후기배로의 발육률을 보였으며, 소 난관상피세포와의 공배양을 실시하였을 경우 후기배로의 발육률이 각각 10.6과 15.1%로 나타나 단순합성배양액내에서는 5% O_2가, 공배양시에는 20% O_2가 수정란의 발육에 좋은 것으로 나타났다.

참고문헌

Barnes FL, Endebrock M, Looney CR, Powell R, Westhusin M and Bondioli K. 1993. Embryo cloning in cattle: the use of *in vitro* matured oocytes. J. Reprod. Fert., 97:317-320

Briggs R and King TJ. 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cell into enucleated frog eggs. Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A., 38:455.

Collas P, Balise JJ 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 Robl JM. 1991. Development of rabbit nuclear transplant embryos from morula and blastocyst stade donor nuclei. Theriogenology, 35:190(abst).

Collas P, Balise JJ, Hofmann GA and Robl JM. 1989. Electrical activation of mouse ooc-

ytes. Theriogenology, 32:835-844.

Ellington JE, Carney EW, Farrell PB, Simkin ME and Foote RH. 1990. Bovine 1-2-cell embryo development of nuclear transplant embryos. Biol. Reprod., 43:97-104.

Fukui Y and Ono H. 1989. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. J. Reprod. Fert., 86:501-506.

Heyman Y, Chesne P, Lebourhis D, Peynot N and Renard JP. 1994. Developmental ability of bovine embryos after nuclear transfer based on the nuclear source: *in vivo* versus *in vitro*. Theriogenology, 42:695-702.

Illmense K and Hoppe PC. 1981. Nuclear transplantation in *Mus muscuius*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. Cell, 23:9-18.

Johnson LA, O'Brien SJ and Wildt DE. 1989. *In vitro* maturation and fertilization of domestic cat follicular oocytes. Gamete Res., 24:343-356.

Nagai T. 1987. Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes *in vitro* with ethanol. Gamete Res., 16:243-249.

Nakao H and Nakatsuhi N. 1990. Effects of co-culture, medium components and gas phase on *in vitro* culture of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos. Theriogenology, 33:591-600.

Pinyopummintr T and Bavister BD. *In vitro*-matured/*in vitro*-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/balstocysts in chemically defined, protein-free culture media. Biol. Reprod., 45:736-742, 1991.

Prather RS, Barners FL, Sims MM, Robl JM, Eyestone WH and First NL. 1987. Nuclear trasplantation in the bovine embryo. Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. Biol. Reprod., 37:859-866.

Prather RS, Sims MM and First FL. 1988. Nuclear transplantation in early pig embryos. BIol. Reprod., 41:414-418.

Rickords LF and White KL. 1992. Electrofusion-induced intracellular Ca^{2+} flux and its effect on murine oocyte activation. Mol. Reprod. Dev., 31:152-159.

Robl JM and Stice SL. 1989. Prospects for the commercial cloning of animals by nuclear transplantation. Theriogenology, 31:75-84.

Smith LC and Wilmut I. 1988. Infuence of nuclear and cytoplasmic activity on the development *in vivo* of sheep embryos after nuclear transplantation. Biol. Reprod., 40:1027-1035.

Stice SL and Robl JM. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. Biol. Reprod., 39:657-664.

Tervit HR and Rowson LEA. 1972. Viability of ova from slaughtered cattle. 1972, Proc. 7th Int. Cong. Anim. Reprod. A., 1:489-494.

Voelkel SA and Hu YX. 1992. Effect of gas atmosphere on the development of one-cell vbovine embryos in two culture systems. Theriogenology, 1117-1131.

Ware CB, Barnes FL Meike-Laurila M and First NL. 1989. Age dependence of bovine oocyte activation. Gamete Res., 22:265-275.

Westhusin ME, Pryor JH and Bondioli KR. 1991. Nuclear transfer in the bovine embryo: Acomparison of 5-day, 6-day, frozen-thawed, and nuclear trasfer donor embryos. Mol. Reprod. Dev., 28:119-133.

Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, McKenna AI, Fick GH and Shultz GA. 1991. Effect of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. Mo. Reprod. Dev., 30:330-338.

Willadsen SM. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. Nature, 321:63-65.

Yang X, Jiang S and Foote RH. 1993. Bovine

oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. Mol. Reprod. Dev., 34:94-100.

Yang X, Jiang S, Kovacs A and Foote RH. 1992. Age dependent activation, enucleation and nuclear transfer of bovine oocytes matured *in vitro* and *in vivo*. Biol. Reprod., 47:636-643.

(접수일자 : 1997. 7. 28 / 채택일자 : 1997. 8. 20)