韓國家畜繁殖學會誌 22(2) : 153~161(1998)
Korean J. Animal Reprod.

소 핵이식란의 이식 후 생존성에 관한 연구

정희태 · 임석기* · 박춘근 · 양부근 · 김정익
강원대학교 축산대학

Viability of Nuclear Transfer Bovine Embryos after Embryo Transfer

Cheong, H. T., S. K. Im*, C. K. Park, B. K. Yang and C. I. Kim
College of Animal Agriculture, Kangwon National University

SUMMARY

This study was conducted to examine the viability of nuclear transfer bovine embryos following embryo transfer. Donor embryos were treated with nocodazole to arrest their cell-cycle-stage at mitotic(M) phase. After releasing from nocodazole blastomeres were separated and transferred into the enucleated oocytes(BC), or cultured in medium with aphidicolin. Freshly cleaved blastomeres within 1.5h after cleavage(AC) and non-cleaved ones up to 3h after releasing from nocodazole(NC) were transferred into the enucleated oocytes. Blastocysts derived from nuclear transfer were transferred to Day 7~8 recipient cows. Some blastocysts were vitrified and thawed before embryo transfer. Developmental rates to the blastocyst stage were higher in AC(18.1%, $P<0.05$) than BC(8.6%) and NC(5.1%). Blastocyst development slightly enhanced with aphidicolin((1~2 μg/ml) treatment(16.9~22.6%) compared to non treated control(11.1%). Survival rate of vitrified nuclear transfer embryos after thawing was 75%(24/32). Twenty-three vitrified nuclear transfer embryos and 3 fresh ones were transferred to 23 recipients, 6 heads were pregnant and 1 male calf(24 kg) was born from a recipient cow received one vitrifiedthawed nuclear transfer embryo at 277 days after embryo transfer. This result suggests that the nuclear transfer embryos can developed to term after vitrification and embryo transfer.

(Key words : Nuclear transfer, Cell-cycle control, Embryo transfer, Vitrification, Bovine)

I. 서 론

가축에 있어서 동일한 유전형질을 가진 세포를 탈핵 세포질에 이식하여 복제동물을 생산하고자 하는 연구는 1986년 Willadsen이 면양에서 최초로 산자생산에 성공함으로써 시작되어, 최근 10여년간은 대가축인 소에서 매우 활발한 연구가 이루어져 왔다(Prather 등, 1987; Bondioli 등, 1990; Sims와 First, 1994). 핵이식에 의한 복제동물생산에 관한 연구는 주로 핵의 전능성에 관한 연구(Sims와 First, 1994)를 비롯하여, 핵과 세포질의 융합시 핵-세포질 상호관계 규명(Cheong 등, 1993; Campbell 등, 1994), 핵이식에 사용되는 미수정란 세포질의 활성화에 관한 연구(Pr-

본 연구는 1996년도 교육부 학술연구조성비(유전공학 GE96-3)에 의하여 연구되었음.

* 축산기술연구소 대관령지소(Daekwanryong Branch Institute, Korean National Livestock Research Institute)

esicce와 Yang, 1994), 반복핵이식(Stice와 Keefer, 1993; Takano 등, 1997) 등 수정란 세포핵을 이용한 핵이식 연구가 진행되어 왔다. 이러한 연구의 결과, 소 초기 수정란의 분할구 핵을 이식한 핵이식 배의 약 10~30% 정도가 체외배양에 의하여 배반포로 발육될 수 있게 되었고(Bondioli 등, 1990; Kono 등, 1994; Takano 등, 1996), 3세대 반복 핵이식에 의해 30개 이상의 복제 배반포가 생산되기에 이르렀다(Takano 등, 1996). 최근에 면양에서 배양된 ICM 세포(Campbell 등, 1996; Wells 등, 1997) 및 태아섬유아세포(Campbell 등, 1996; Wilmut 등, 1997; Cibelli 등, 1998) 유래의 복제동물을 생산하여, 초기 수정란의 세포핵뿐 아니라, ES 세포 및 태아 세포를 이용한 복제동물 생산 가능성이 확인되었고, 더 나아가 6년 생 암양의 유선상피세포를 이용한 핵이식에 의하여 1 두의 복제개체 생산에 성공함으로써(Wilmut 등, 1997) 체세포를 이용한 복제생산 가능성이 시사되어 복제동물 생산에 관한 연구에 새로운 전기가 마련되었다.

최근의 획기적인 연구성과에도 불구하고 복제동물 생산 효율은 아직 매우 낮다. 핵이식에 의한 복제동물 생산효율을 높이기 위하여 최근에는 핵과 세포질의 세포주기 단계에 주목하여 핵과 세포질의 세포주기단계를 일정한 단계에 동조시켜 핵이식을 실시하고자 하는 연구가 진행되었다(Barnes와 Eyestone, 1990; Kono 등, 1994; Cheong 등, 1996; Liu 등, 1997). 생쥐의 경우 수정란의 핵을 탈핵 미수정란에 이식할 때, 핵의 세포주기를 G1기나 분열기인 M기에 동조시켜 이식함으로써 핵이식란의 발육율을 향상시킬 수 있음이 확인되었으나(Cheong 등, 1993; Kwon 등, 1996), 소에서는 수정란 세포의 핵을 G1기에 동조시키기 어렵다는 결과(Barnes와 Eyestone, 1990)에 따라, 핵의 세포질을 G1기에 동조하는 대신 미수정란 세포질을 S기에 동조시키는 방법이 사용되어져 왔다(Barnes 등, 1993; Kono 등, 1994; Aoyagi 등, 1994). 그러나, 소에서도 G1기 동조 핵이식의 가능성이 시사되었고(Cheong 등, 1996; Takano 등, 1996), 양에서는 M기 동조 핵이식의 가능성도 보고되었다(Liu 등, 1997).

한편, 핵이식 복제란의 이식에 의한 복제동물생산 효율은 수란우의 임신율 저조, 태아의 조기사망, 비정상 거대 산자의 출산 등의 문제로 인하여 저조한 수준에 머물러 있다(Seidel, Jr., 1992). 또한, 대부분의 핵이식 복제수정란의 이식이 아직은 신선란 상태로 이식되고 있어, 핵이식란의 발육 시간에 맞추어 수란우를 준비해야 하는 문제가 있다. 최근에 핵이식 복제란을 동결, 융해 후 이식하여 산자의 생산에 성공함으로써(Takano 등, 1997) 수정란이식 시에 핵이식란의 발육에 맞추어 수란우를 준비해야 하는 난점을 해소하고 수정란이식의 효율성의 높이는 방안이 제시되었다. 본 연구는 가축에 있어서의 우수한 동일 유전능력을 가진 동물의 대량생산, 즉, 복제동물 생산기술의 효율성의 향상을 위하여, 세포주기 동조 핵이식의 효율성을 검토하고, 핵이식란의 동결, 융해 후 생존성 및 수정란 이식 후 핵이식란의 생존성을 검토하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 난자 및 배의 준비

도축장에서 회수한 난소로부터 난포액을 흡입하는 방법으로 미성숙 난자를 채취한 후, 실체 현미경하에서 난자 주위의 난구세포가 균일하고 세포질이 균질한 것만을 선별하였다. 난포란의 체외성숙은 TCM-199 배양액에 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS, Gibco, NY, USA)과 FSH(Sigma, St. Louis, MO, USA) 0.02 U/ml, LH(Sigma) 5 μg/ml, 17β-estradiol(Sigma) 1 μg/ml 및 gentamycin(Sigma) 50 μg/ml이 함유된 배양액 50 μl의 소적 중에 10여개씩의 난포란을 넣고 paraffin oil로 피복하여 5% CO_2, 95% 공기 및 39℃의 온도조건에서 22~24시간 배양하였다.

성숙된 난포란은 5 mM caffeine, 10 μg/ml heparin, 3 mg/ml BSA와 2.5×10^6정자/ml이 함유된 BO액(Brackett와 Oliphant, 1975) 50 μl의 소적 중에 10여개씩 옮겨 넣고, 5% CO_2, 95% 공기 및 39℃의 온도조건에서 12~20시간 체외수정하였다. 수정 후 난자는 체외배양액(TCM-199에 3 mg/ml BSA 첨가)으로 세척하고 난구세포가 붙어 있는 채로 체외배양액 내에서 36~40시간 배양 후 2~8세포기로 발육한 수정란은 동일한 배양액 내에서 추가로 2~3일간 소 난구세포와 공동 배양하여 16~32 세포기로 발육된 수정란을 공핵란으로 공시하였다. 한편, 수핵란은 20~22시간 체외 성숙된 난포란을 150 IU/ml의

hyaluronidase를 함유한 1 ml의 배양액이 들어있는 원심관에 옮겨, vortex mixer로 3분간 처리하여 난구세포를 제거한 후, 세포질의 색조가 균일하고 제1극체가 확인된 난자만을 실험에 공시하였다.

2. 수정란의 세포주기단계 조절

체외수정 후 4일째에 16 세포기로 발육한 수정란을 1.0 ㎍/ml의 nocodazole(Aldrich Chem. Co., Milw. WI. USA)이 함유된 TCM-199에 3 mg/ml BSA가 첨가된 액의 소적배양액 내로 옮겨 16시간 배양하여 분할구의 세포주기단계가 유사분열중기(mitotic phase; M기)에 정지하도록 유도하였다. Nocodazole 처리 후 수정란을 TCM-199 배양액으로 세척한 후, 0.25% pronase로 2~3분 처리하여 투명대를 제거하였다. 투명대가 제거된 수정란은 Ca^{2+}, Mg^{2+}-free Dulbecco's phosphate-buffered saline(PBS) 액 내에서 pipetting에 의해 분할구를 분리하였다. 분리된 분할구는 즉시 핵이식의 donor로 이용하거나, 또는 각각의 분할구를 1~2 ㎍/ml aphidicolin(Sigma)이 첨가된 Ca^{2+}, Mg^{2+}-free PBS가 들어있는 72-well plate(Nunc, Roskilde, Denmark)로 옮겨 3시간 동안 매 30분 간격으로 분할재개 여부를 관찰하며, 분할이 진행되는 분할구는 pipetting에 의해 분할을 촉진하고, 분할된 분할구는 즉시 donor 핵으로 공시하였다.

3. 핵이식

미수정란의 염색체 제거 및 분할구의 주입은 5 ㎍/ml cytochalasin B(CB)와 20% FBS가 함유된 수정 PBS액 내에서 Prather 등(1987)의 방법에 준하여 실시하였다. 미수정란의 염색체 제거는 제1극체와 주변의 세포질을 약 1/3정도 흡입한 후, 나머지 부분을 1 ㎍/ml 농도의 Hoechst 33342로 20분간 처리하여 형광현미경 하에서 염색체의 유무를 확인하고, 탈핵이 확인된 난자만을 수핵란 세포질로 사용하였다.

Donor란의 단일할구는 분열 전(추정M기) 또는 분열 후 1.5시간 이내(추정 G1기)에 injection pipette 내로 흡인하여 탈핵을 실시한 구멍을 통하여 탈핵란 세포질의 위란강 내로 주입하였다. 핵이식란은 3 mg/ml BSA를 함유한 TCM-199액 중에서 전기융합 전까지 10~30분간 배양하였다. 분열 후 1.5시간 이내의 분할구를 이용한 핵이식의 경우는 융합 전까지 핵의 DNA 합성을 억제하기 위하여 미세조작용 용액 및 융합 전 배양액 중에 1~2 ㎍/ml aphidicolin을 첨가하였다. Nocodazole 처리완료 후 3시간 이내에 분열되지 아니한 분할구의 경우도 동일한 방법으로 핵이식 하여 분열 전 또는 분열 직후 분할구의 핵이식과 비교하였다.

4. 전기융합 및 활성화처리

핵이식란의 전기융합은 세포융합장치(BTX-200; BTX, San Diego, CA, USA) 및 1.0 mm 폭의 wire chamber를 사용하여 Cheong 등(1996)의 방법에 준하여 실시하였다. 핵이식란은 0.1 mM $MgSO_4$, 0.05 mM $CaCl_2$, 0.05 mg/ml BSA가 첨가된 0.3 M mannitol 용액을 넣은 wire chamber의 양 전극사이로 옮겨, 1 MHz, 12 V/mm의 교류(AC)전류를 통전하여 분할구와 세포질의 접촉면이 양 전극에 수평이 되도록 유도하고, 이어서 1.25 kV/cm의 직류(DC) 전류를 70 ㎲sec간 2회 통전하여 세포융합을 유도하였다. 통전 후 핵이식란은 즉시 TCM-199에 3 mg/ml BSA가 첨가된 액 내에서 수회 세척 후 동일 배양액 내에서 융합 여부를 관찰하였다.

핵이식란의 세포질 활성화를 유기하기 위하여 융합 직후 핵이식란을 10 ㎛M의 Ca^{2+}-ionophore (A23187 ; Sigma)로 5분간 처리한 후 곧바로 10 ㎍/ml 농도의 cycloheximide(Sigma)를 함유한 TCM-199에 3 mg/ml BSA가 첨가된 용액의 소적(50 ㎕)내로 옮겨 6시간 동안 배양하였다. 분열 직후 분할구 핵이식의 경우는 분열할구의 분리 후 1.5시간 이내에 전기융합 및 A23187 처리를 완료하였다.

5. 핵이식란의 체외배양

활성화처리 후 핵이식란은 TCM-199에 3 mg/ml BSA가 첨가된 배양액 내에서 5% CO_2, 95% 공기 및 39℃의 온도조건으로 소 난관상피세포(BOEC)와 7~9일간 공동배양하거나, 10% FBS를 함유한 CR1aa 배양액 중에서 BRLC(buffalo rat liver cells)와 7~9일간 공동 배양하였다.

6. 핵이식란의 초자화 동결(Vitrification) 및 융해

배반포로 발육한 핵이식란의 대부분은 이식시까지

초자화동결 방법에 의하여 보존하였다. 핵이식란의 초자화 동결법은 Saito 등(1994)의 방법을 수정하여 사용하였다. 즉, Dulbecco's PBS(D-PBS)에 20% glycerol, 20% ethylene glycol, 3/8M sucrose, 3/8M dextrose, 20% FBS를 혼합하여 Vitrification 용액(VS 3)으로 하고 VS 3을 20% FBS를 함유한 D-PBS로 1/2 및 1/4로 희석하여 VS 2, VS 1로 하였다. 수정란의 동결 전 평형은 VS 1, VS 2 및 VS 3에 수정란을 각각 5, 5 및 1분간 노출시키고, VS 3 에 노출시키는 1분 동안에 수정란을 straw내에 옮겨 넣고 선단을 가열 봉입 후 LN_2 내로 침적하였다. 수정란의 straw내 봉입은 흡인하는 순서대로 10 mm S-PBS(0.5 M sucrose 첨가 D-PBS), 60 mm S-PBS, 2 mm VS3, 10 mm VS3와 핵이식란, 2 mm VS3, 20 mm S-PBS 순으로 주입하고 각각의 용액층 사이에는 5 mm길이의 공기층을 두도록 하였다. 모든 동결과정은 실온에서 실시하였다.

동결란의 융해는 동결된 straw를 20℃ 수조에서 약 10초간 융해 후, straw 내의 내용물을 배양접시에 불어내고 수정란을 회수하였다. 수정란은 즉시 0.5 M S-PBS 내에서 5분, 0.25 M S-PBS에서 5분간 유지한 다음 10% FBS가 첨가된 CR1aa 액으로 옮겨 CO_2 배양기내에서 이식 전까지 12~24시간 배양하였다.

7. 핵이식란의 이식

핵이식 배반포는 신선란 또는 동결, 융해 후 수정란 이식에 공시하였다. 수정란은 37℃의 배양액(D-PBS +20% FBS)과 함께 straw내에 봉입하여 수정란이식 장소까지 이동하였다. 수정란이식은 자궁경관 경유법을 이용하여 자연발정 후 7~8일째의 한우 수란우의 자궁 각에 1~2개씩 이식하였다. 수란우는 이식 후 발정재귀 여부를 관찰하고, 임신으로 판단된 경우는 이식 60일 이후에 직장검사 및 초음파검사에 의하여 임신 여부를 확인하였다.

8. 통계처리

실험결과는 Chi-square 검정에 의하여 유의성을 검정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 세포핵의 상태에 따른 체외발육능

Nocodazole 처리된 수정란의 분할구를 분리하여 분열 전(BC), 분열 후 1.5 시간이내(AC), 미분열 분할구(NC)로 나누어 핵이식을 실시한 결과, AC구에서는 18.1%(19/105)가 배반포기로 발육된 반면, BC 및 NC구에서는 각각 8.6%(9/106) 및 5.1%(3/59)로 AC수에 비하여 유의적으로($P<0.05$) 낮은 발육율을 나타내었다(Table 1).

2. Aphidicolin 처리의 영향

분열 후 1.5시간 이내의 분할구를 이용한 핵이식의 경우, DNA 합성 억제제인 aphidicolin 처리농도가 핵이식 배의 발육에 미치는 영향을 검토한 결과, aphidicolin 무처리구(11.1%; 5/45)에 비하여 1~2 μg/ml aphidicolin으로 처리한 경우가 다소 높은 배반포 형성율(16.9~22.4%)을 보였으며, 1 μg/ml 농도로 처리한 경우에 비하여 2 μg/ml 농도로 처리한

Table 1. Effect of donor cell state on the development of nuclear transfer(NT) embryos

Donor cell state*	No. (%) of eggs fused / manipulated	No. (%) of embryos developed to		
		2-Cell	Morula	Blastocyst
BC	106/121(87.6)	75(70.8)	13(12.3)	9(8.6)[a]
AC	105/130(80.8)	77(73.3)	24(22.9)	19(18.1)[b]
NC	59/ 66(89.4)	40(67.8)	6(10.2)	3(5.1)[a]

* Donor embryos were treated with nocodazole for 16 hr to arrest their cell-cycle-stage at mitotic phase, and their blastomeres were separated after releasing from nocodazole treatment.

BC: before cleavage, AC: after cleavage(within 1.5 hr post-cleavage), NC: non-cleavage

[a,b] Values with different superscript are differ($P<0.05$).

경우가 다소 높게 나타났으나, 유의적인 증가는 인정되지 않았다(Table 2).

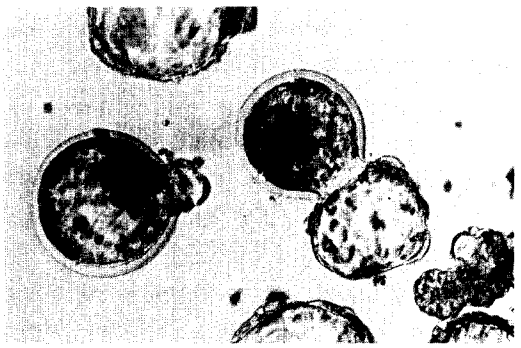

Fig. 1. Two hatching blastocysts derived from nuclear transfer embryos

3. 동결융해 후 핵이식란의 생존성

배반포로 발육된 핵이식란을 초자화 동결하였다가 융해하여 12~24시간 배양하면서 생존성을 검토한 결과, 융해 후 회수된 32개의 핵이식란 중 24개(75.0%)가 이식 가능한 생존란으로 판명되었으며, 대조구에 IVF란의 융해 후 생존율(73.7%)과 차이가 없었다(Table 3).

4. 핵이식배의 이식 후 수태율

배반포기로 발육된 핵이식란을 동결, 융해 후 또는 신선란 상태로 수란우에 이식한 성적을 Table 4 에 나타내었다. 총 23개의 동결융해란과 4개의 신선란을 각각 20두 및 3두의 한우 수란우에 이식한 결과, 동결융해란을 이식한 6두(26.1%)에서 임신이 확인되었으

Table 2. Effect of aphidicolin treatment on the development of NT embryos*

Concentration of aphidicolin (μg)	No. (%) of eggs fused / manipulated	No. (%) of embryos developed to		
		2-Cell	Morula	Blastocyst
0	45/53(84.9)	33(73.3)	7(15.6)	5(11.1)
1	59/72(81.9)	43(72.9)	11(18.6)	10(16.9)
2	62/74(83.8)	49(79.0)	18(29.0)	14(22.6)

* Donor embryos were treated with nocodazole for 16 hr, and their blastomeres within 1.5 hr after cleavage following releasing from nocodazole treatment were used as donor cells.

Table 3. Viability of NT embryos after vitrification and thawing

Embryo state	No. of embryos vitrified	No. of embryos thawed	No. (%) of embryos		
			Recovered	Survived	Degenerated
NT	35	35	32	24(75.0)	8(25.0)
IVF	110	58	57	42(73.7)	15(26.3)

Table 4. Results of embryo transfer of blastocyst NT embryos

Groups	No. of transferred embryos	No. of recipients	No. (%) of pregnant	No. (%) of live births
Fresh	4	3	0	–
Vitrified	23	20	6(30.0)	1(16.7)
Total	27	23	6(26.1)	1(16.7)

Fig. 2. A Korean native calf produced by nuclear transfer

나, 이 중 1두만이 이식 후 277일에 정상 한우 수송아지(생시체중 24.0 kg)를 출산하였다(Table 4).

Ⅳ. 고 찰

핵이식에 의한 복제동물 생산연구에서 가장 문제가 되고 있는 것은 무엇보다도 핵이식란의 배반포 발육율이 저조하다는 것을 들 수 있다. 이러한 저조한 발육율을 높이기 위한 연구로서 핵과 세포질의 세포주기를 조절하여 핵이식하는 세포주기동조 핵이식에 관한 연구가 이루어져 왔다(Barnes와 Eyestone, 1990; Kono 등, 1994; Cheong 등, 1996; Takano 등, 1996; Liu 등, 1997). 생쥐(Cheong 등, 1993)나 토끼(Collas 등, 1992)에서와는 달리, 소에서는 수정란 세포의 핵을 G1기에 동조시키기 어렵다하여(Barnes와 Eyestone, 1990) 핵의 세포질을 G1기에 동조하는 대신 미수정란 세포질을 S기에 동조시키는 방법으로 산자를 생산하기도 하였다(Barnes 등, 1993; Kono 등, 1994; Aoyagi 등, 1994). 그러나, 소에서도 분열직후의 G1기로 추정되는 분할구 핵을 미수정란의 탈핵 세포질(MⅡ기)에 이식함으로써 핵이식란의 체외발육율이 다소 향상되었다(Cheong 등, 1996; Takano 등, 1996). 한편, 생쥐에서는 분열기(M기)에 있는 분할구의 핵을 미수정란 세포질에 이식한 다음, 세포분열을 억제하여 두 개의 전핵이 형성된 핵이식란의 핵을 각각 1세포기의 탈핵 세포질에 재이식하는 방법으로 높은 배반포 발육율과 산자를 얻는데 성공한 바 있다(Kwon 등, 1996). 이와는 달리, 양에서는 M기의 핵을 미수정란 세포질(MⅡ기)에 이식하는 방법만으로 높은 발육율과 함께 산자를 얻는데 성공하여, 전핵기에 핵을 1세포기 수정란의 탈핵 세포질에 재이식하지 않아도 핵의 초기화(reprogramming)가 가능함을 보여 주었다(Liu 등, 1997). G2기(Cheong 등, 1993)나 M기(Kono, 1997, 총론)의 핵을 미수정란 세포질에 이식할 경우 핵의 염색체응축(PCC) 이후 극체상의 방출이 일어나게 되는데, 그 결과 핵이식란은 정상적인 배수체의 염색체구성을 가지게 되며, 특히 M기 핵을 이식하는 경우는 융합과 동시에 염색체가 직접 세포질에 노출됨으로써 보다 확실한 초기화가 일어날 가능성을 시사한다(Liu 등, 1997). 본 연구에서도 이러한 가정 하에 nocodazole 처리 후 핵이 M기로 추정되는 시기에 핵이식을 하여 발육율을 검토하였으나, 배반포로의 발육율은 매우 저조하였다. 소의 경우 nocodazole로 16시간 이상 처리하여도 M기에의 동조율은 60% 정도에 그치는 것으로 보고되었는데(Cheong 등, 1996), 이러한 현상과 함께 nocodazole 처리에 의한 방추사의 기능이상 등이 원인으로 사료된다.

수정란 세포의 G1기 동조를 위해서는 유사분열 억제제로 세포를 처리하여 세포의 세포주기단계를 M기에 동조시킨 후, 분할구의 분열 후 최대한 빠른 시간에 핵이식을 실시하거나(Cheong 등, 1996), DNA 합성억제제인 aphidicolin 등으로 분열 전후의 세포를 처리하여 분열된 세포가 DNA 합성기인 S기로 들어가는 것을 억제하는 방법이 사용되고 있다(Collas 등, 1992). 전자의 경우는 소 수정란 세포의 G1기가 매우 짧거나 결여되어 있다는 점과, 더구나 nocodazole처리에 의하여 인위적으로 M기에 동조된 핵은 비록 염색체가 응축된 상태라 할지라도 세포주기단계가 어느 정도 진행되거나, 혹은 분열과 동시에 세포주기단계가 정상보다 빠르게 진행되어 G1기 동조가 어려운 것으로 판단되고 있다(Cheong, 미발표). 한편, 후자의 경우도 토끼에서는 1.0 ㎍/ml 농도의 aphidicolin으로 처리한 분할구의 약 90% 정도가 G1기에 동조되는 것으로 보고되었으나(Collas 등, 1992) 소에서는 무처리한 경우와 비교하여 유의적인 변화가 관찰되지 않았으며, 생쥐의 G2기나 S기 핵을 이식한 경우와 동일하게 염색체의 분열 또는 극체상의 방출이 관찰되었다(Ch-

eong 등, 1996). Aphidicolin의 농도에 따른 발육율에서도 큰 차이가 없었는데, 토끼의 경우는 2.0 μg/ml 농도로 처리한 수정란이 G1기 동조율은 매우 높았으나 수정란의 발육에 치명적인 영향을 준 것으로 보고되고 있다. 그러나 소의 경우는 2.0 μg/ml의 aphidicolin으로 처리하여도 발육율이 저하되지 않고, 오히려 다소 나아지는 결과를 얻었는데, 이는 소 수정란에서는 aphidicolin이 핵의 DNA합성을 억제하는 기능이 매우 회박하여 발육율에 지장을 초래하지 않으며, 반대로 G1기 동조율을 다소 증가시키는 효과를 가져온 것으로 사료된다.

핵이식란의 동결보존은 핵이식 난자의 발육율저조와 이식 후 수태율저하 등의 이유로 실용화되지 않고 있다. 최근에 핵이식란의 경우도 성공적으로 동결시킬 수 있으며, 수란우에 이식 후 임신율 및 산자 생산율에 있어서도 신선란의 경우와 차이가 없었다고 보고되었다(Takano 등, 1997). 본 연구에서는 핵이식란을 초자화 동결한 후 융해하여 체외수정란과 비교하였으나, 70% 이상의 생존율을 얻어, 전혀 차이가 없었으며, 동결 융해된 핵이식란의 이식에 의해 임신 및 산자생산이 확인됨으로써 핵이식란의 동결보존에 의한 복제동물생산 가능성을 확증하였다. 본 연구에서 신선란의 이식에 의한 임신이 확인되지 않았으나 이식두수가 적어 직접적인 비교가 어렵다. 한편, 핵이식 복제란의 이식에 의한 복제동물생산 효율은 저조한 임신율 외에도 태아의 조기사망, 비정상 거대 산자의 출산 등의 문제가 제기되고 있어(Seidel, Jr., 1992), 핵이식란의 동결보존 실용성 및 복제동물생산 효율성을 높이기 위해서는 아직도 많은 연구가 필요하다.

V. 적 요

본 연구는 소 핵이식란의 수정란 이식 후 난자의 생존성을 검토하고자 실시하였다. 본 연구의 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 핵이식란의 배반포 발육율은 분열 후 1.5 시간 내에 핵이식한 경우가 분열 전 또는 미분열 분할구의 핵이식인 경우에 비하여 유의적으로 높았다.
2. DNA 합성억제제인 aphidicolin 농도에 따른 핵이식란의 발육율은 무처리시에 비하여 1 또는 2 μg/ml 농도로 처리한 경우에 다소 증가하였다.
3. 초자화 보존 핵이식란의 융해 후 생존율은 회수란의 75%로 나타났다.
4. 27개의 신선 또는 동결 융해된 핵이식 배반포를 1~2개씩 23두의 수란우에 이식한 결과, 6두에서 임신이 확인되었으며, 이 중 1두가 이식 후 277일에 핵이식 송아지 1두(수컷)를 분만하였다.

이상의 결과는 핵이식란의 동결보존 가능성을 확증하며, 동결융해된 핵이식란의 이식 후, 임신 및 산자생산이 가능함을 확증한다.

VI. 인용문헌

1. Aoyagi, Y., M. Konishi, T. Wada and T. Takedomi. 1994. Unaged bovine oocytes successfully develop to blastocysts after parthenogenetic activation or nuclear transfer. Theriogenology, 41:157(abstr.).
2. Barnes, F. L., P. Collas, R. Powell, W. A. King, M. Westhusin and D. Shepherd. 1993. Influence of recipient oocyte cell cycle on DNA synthesis, nuclear envelope breakdown, chromosome constitution, and development in nuclear transplant bovine embryos. Mol. Reprod. Dev., 36:33-41.
3. Barnes, F. L. and W. H. Eyestone 1990. Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos. Theriogenology, 33:141-152.
4. Bondioli, K. R., M. E. Westhusin and C. R. Looney. 1990. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. Theriogenology, 33:165-174.
5. Brackett, B. G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod., 12:260-274.
6. Campbell, K. H. S., P. Loi, P. Cappai and I. Wilmut. 1994. Improved development to blastocyst of ovine nuclear transfer embryos reconstructed during the presumptive S-phase of enucleated activated oocytes. Biol. Reprod., 50:1385-1393.

7. Campbell, K. H. S., J. McWhir, W. A. Ritchie and I. Wilmut. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. Nature, 380:64-66.
8. Cheong, H. T., S. K. Im, J. H. Lee, C. K. Park, B. K. Yang and C. I. Kim. 1996. Nuclear transplantation of bovine embryos by cell cycle stage synchronization. Korean J. Anim. Sci. 38:561-570(Korean).
9. Cheong, H. T., Y. Takahashi and H. Kanagawa. 1993. Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. Biol. Reprod., 48:958-963.
10. Cibelli, J. B., S. L. Stice, P. J. Golueke, J. J. Kane, J. Jerry, C. Blackwell, F. A. Ponce de Leon and J. M. Robl. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. Science 280:1256-1258.
11. Collas, P., J. J. Balise and J. M. Robl. 1992. Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. Biol. Reprod., 46:492-500.
12. Kono, T. 1997. Nuclear transfer and reprogramming. Rev. Reprod., 2:74-80.
13. Kono, T., Y. Sotomaru, F. Aono, T. Takahashi, I. Ogiwara, F. Sekizawa, T. Arai and T. Nakahara. 1994. Effect of ooplast activation on the development of oocytes following nucleus transfer in cattle. Theriogenology, 41:1463-1471.
14. Kwon, O. Y. and T. Kono. 1996. Production of identical sextuplet mice by transferring metaphase nuclei from 4-cell embryo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:13010-13013.
15. Liu, L., Y. Dai and R. M. Moor. 1997. Nuclear transfer in sheep embryos: The effect of cell-cycle coordination between nucleus and cytoplasm and the use of *in vitro* matured oocytes. Mol. Reprod. Dev., 47:255-264.
16. 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.
17. Presicce, G. A. and X. Yang. 1994. Parthenogenetic development of bovine oocytes matured *in vitro* for 24hr and activated by ethanol and cycloheximide. Mol. Reprod. Dev., 38:380-385.
18. Saito, N., K. Imai and M. Tomizawa. 1994. Effect of sugars-addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced *in vitro*. Theriogenology, 41:1053-1060.
19. Seidel, G. E. 1992. Overview of cloning mammals by nuclear transplantation. In: G. E. Seidel, (Ed), Symposium on cloning mammals by nuclear transplantation. Proc., 1-4.
20. Sims, M. M. and N. L. First. 1994. Production of calves by transfer of nuclei from cultured inner cell mass cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:6143-6147.
21. Stice, S. L. and C. L. Keefer. 1993. Multiple generational bovine embryo cloning. Biol. Reprod., 48:715-719.
22. Takano, H., K. Koyama, C. Kozai, S. Shimizu, Y. Kato and Y. Tsunoda. 1996. Effects of cell cycle stage of donor nuclei on the development of bovine nuclear transferred embryos. J. Reprod. Dev., 42:61-65.
23. Takano, H., C. Kozai, S. Shimizu, Y. Kato and Y. Tsunoda. 1997. Cloning of bovine embryos by multiple nuclear transfer. Theriogenology, 47:1365-1373.
24. Wells, D. N., P. M. Misica, A. M. Day and H. R. Tervit. 1997. Production of cloned lambs from an established embryonic cell line: A comparison between in vivo- and in vitro-matured cytoplasts. Biol. Reprod., 57:385-393.
25. Willadsen, S. M. 1986. Nuclear transplan-

tation in sheep embryos. Nature, 320:63-65.
26. Willadsen, S. M., R. E. Janzen, R. J. MaAlister, B. F. Shea, G. Hamilton and D. McDermand. 1991. The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. Theriogenology, 35:1661-170.
27. Wilmut, I., A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind and K. H. S. Campbell. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature, 385:810-813.
(접수일자 : 1998. 5. 10. / 채택일자 : 1998. 6. 10.)