

Bovine Fetal Fibroblasts를 이용한 핵이식 및 세포융합에 관한 연구

이병천[†] · 박종임 · 조종기 · 김기연 · 신수정 · 용환율 · 황우석

서울대학교 수의과대학

Production of Cloned Embryos by Nuclei Transfer and Electronic Cell Fusion from Bovine Fetal Fibroblasts

B.C. Lee[†], J.I. Park, J.K. Cho, K.Y. Kim, S.J. Shin, H.Y. Yong and W.S. Hwang

College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742

SUMMARY

The present study was performed to evaluate the best electric fusion condition in nuclear transfer, Korean Native Cattle fetal fibroblasts were used as nucleic donors. Oocytes from slaughterhouse were matured *in vitro* for 22 h and enucleated. Each individual cells were transferred into enucleated oocytes and reconstructed embryos were placed into the fusion chamber. In experiment 1, pulse were performed by altering pulse duration at 1.75kv/cm, 1 time. When pulse duration is 30 μ s, fusion and development rates is higher than other conditions. In experiment 2, the effect of different pulse number were studied at the pulse duration 30 μ s and the same pulse intensity. When pulse number was one, fusion rates were higher than other conditions. The fused embryos were moved to culture medium and assessed their development to blastocyst. These results showed that best fusion condition was 30 μ s and one time. And the fibroblasts derived from HanWoo can be reprogrammed by nuclear transplantation and develop subsequently *in vitro*.

(Key words : electric fusion, bovine fetal fibroblast, nuclear transfer, pulse duration)

서 론

핵이식의 다단계 과정 중 탈핵된 수핵 세포질과 유전정보를 지닌 공여핵의 융합은 한 개체로 발생하기 위해 반드시 필요한 과정이다. 따라서 융합을 위해 여러 방법들이 고안되었다. 불활화 Sendai 바이러스(Giles와 Ruddle, 1973)와 polyethylene glycol 등을 이용한 방법이 있었지만 그 독성과 감염 위험성 및 실험실 조건에 따른 융합률의 차이를 보였고, 또한 유효성이 낮아 새로운 방법이 모색되었

다. 이러한 단점을 보완하기 위해 전기적 융합방법이 연구되었다(Zimmermann과 Vienken, 1982).

세포막의 일시적 붕괴와 pore 형성으로 세포질과 이식한 세포의 융합이 이루어지며(Zimmermann과 Vienken, 1982) 다른 융합방법에 비하여 수행이 쉽고 그 효율이 높은 전기적 융합방법은 식물세포(Sale과 Hamilton, 1968)와 적혈구 융합(Kinosita와 Tsong, 1977)에 적용된 이래, 마우스(Tsunoda 등, 1993), 양(Wilmot 등, 1997), 토끼(Collas 등, 1991), 돼지(Tao 등, 1999) 핵이식 융합과정에 보편적으로 적용되어 왔으며, 특히 소 핵이식 연구에 있

*본 연구는 1998년도 한국학술진흥재단 유전공학 연구비(과제번호1998-019-G00021)에 의해 수행되었음.

[†] 교신저자

어서 여러 가지 조건으로 폭넓게 응용되고 있다. (Wells 등, 1999; Alan Trounson 등, 1998; Lavoie 등, 1997; Zakgartchenko 등, 1995; Robl 등, 1987; Prather 등, 1987)

이상과 같이 일정한 전기 자극을 이용한 핵이식 실험에 대한 보문을 근거로 하여 본 연구는 한우 체세포 복제시 전압의 강도와 통전시간, 통전횟수에 있어 융합의 최적 조건 및 이후의 수정란의 분할율, 이후 발육률에 미치는 영향을 조사하여 전기융합의 최적조건을 조사하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공여핵의 준비

태아섬유아세포는 Zakhartchenko 등(1999b)의 방법을 이용하여 배양하였으며 먼저 5세 한우의 50 일령 태자로부터 분리되었다. 얻은 태자를 PBS하에서 3회 세정한 후 두부와 내장부위를 제거하고 동체와 사지부위에서 연결 조직을 포함하지 않는 부위의 조직을 채취, 멸균 가위와 blade로 세절한다. 0.25% trypsin, 1mM EDTA 용액과 0.8% collagenase type II(GIBCO BRL, Life Technologies, USA) 용액의 혼합액을 첨가하여 39℃, 5% CO₂, 포화습도 배양기내에 30분~1시간 정치한다. 효소 처리로 얻은 세포는 PBS로 원심세정한다. 최종 원심 세정 후, 침전 세포와 조직편을 10% FCS, 1% non-essential amino acids solution, P/S 첨가 DMEM(Dulbeccos Modified Eagles Medium, GIBCO BRL, Life Technologies, USA)에 부유하여 세포 배양용 petridish로 옮겨 39℃, 5% CO₂, 포화습도 배양기내에서 배양한다.

핵이식을 위한 공여핵은 혈청기아배양후 제공되었다. 핵이식 직전 배양접시 저면의 세포는 효소 처리하여 0.5% PBS에 부유, 핵이식에 이용된다.

2. 수핵세포질의 준비

공시된 수핵난자는 도축된 한우 유래로 도체로부터 난소를 적출하여 난소 표면에 부착되어 있는 혈액 및 결재조직을 제거한 후 25℃~30℃의 생리식염수(0.9% NaCl)의 보온상태에서 2시간 이내에 실험실로 운반하였으며, 신선한 생리식염수로 세정한

다. 미성숙난자는 18 gauge 주사침을 장착한 10 ml 주사기로 난소의 소난포(직경 2~7 mm)로부터 난포액과 함께 흡인, 채취하였다. 미성숙난자는 Kastroop 등(1990)의 분류기준에 준하여 난구세포가 치밀하며 2층 이상 부착되어 있고 세포질이 균일한 난자를 선별하였다.

선별한 미성숙난자는 W-TCM199으로 3회, 성숙배양용 TCM199으로 1회 세정하여 4well에 각 30~50개를 넣어 39℃, 5% CO₂, 95% 공기 및 포화습도 상태의 배양기(이하 5% CO₂ 배양기)내에서 20~22 시간 성숙배양하였다(Abeydeera 등, 1998).

3. 핵이식, 배양

성숙난자는 0.5% hyaluronidase 효소가 첨가된 Hepes buffered TCM하에서 mouth pipetting하여 난구세포를 제거하였다. 난자의 탈핵은 piezo가 장착된 미세조작기로 행하였다. 이후 혈청기아배양으로 G0로 유도된 섬유아세포를 핵이식 15분전 trypsin 처리하여 single cell을 준비하였다.

탈핵 후 각 섬유아세포를 세포질과 투명대 사이에 넣어 주어 핵이식란은 작성한다. 작성한 핵이식란의 융합은 3.2 mm 간격으로 마주한 2개의 전극 막대로 이루어져 있는 electric chamber(3.2 mm)에 융합배지를 채운 후, 전류방향과 직각이 되도록 수핵란과 공여핵의 위치를 조정하고, Electro Cell manipulation BTX 2001을 사용하여 수행하였다. 실험 1에서는 통전압은 1.75kV/cm로 고정한 후 각 융합군에 10, 20, 30, 40 및 60 μ s로 통전시간에 차이를 두어 1회 통전으로 융합을 실시하였다. 실험 2에서는 1.75kV/cm, 30 μ s으로 전기강도와 통전시간을 고정한 후 통전횟수에 차이를 두었다.(1, 2 및 3회) 융합란은 4시간 동안 CR1aa 배지에서 배양하였으며 이후 활성화를 실시하였다. 활성화는 5 μ M ionomycin에서 4분간, 이후 4시간동안 2mM 6-dimethylaminopurine에서 배양함으로 유도하였다. 활성화 이후 수정란은 39℃, 5% CO₂, 포화습도 배양기내 CR1aa drop배지에서 이후 7~8일간 배양후 각 실험군 핵이식란의 융합률, 분할율과 이후 발육률을 비교하였다.

4. 통계학적 분석

각 실험 군간의 융합률 및 분할율의 유의성 검정은 chi-squared analysis를 이용하였다. 각 군의 배반포까지의 발육률은 logistic regression analysis를 이용하여 검정하였다.

결 과

1. 통전시간이 융합률 및 발육률에 미치는 영향

전기 강도를 1.75kv/cm, 통전시간을 1회로 고정하고 통전시간을 달리한 5개 핵이식란 군에서 그 발달을 조사한 결과는 Table 1에 나타났다.

통전시간이 30 μ s일 때 융합률이 65.2%로 다른 군에 비해 유의적으로 높았으며, 분할율은 10, 20, 30, 40, 60 μ s에서 89.3, 63.8, 88.4, 46.2, 100%를 나타냈으며, 다른 4개의 군에 비해 40 μ s는 유의적으로 낮았다. 배반포로의 발육율은 10 μ s에서 4.0%, 20 μ s에서 36.7%, 30 μ s에서 26.3%, 40 μ s에서 25%, 60 μ s에서 28.6%를 나타내었으며 다른 4개 군에 비해 10 μ s

는 유의적으로 낮았다.

2. 통전횟수가 융합률 및 발육률에 미치는 영향

통전강도를 1.75kv/cm, 통전시간을 30 μ s로 고정하고 통전횟수를 1, 2, 3회 주었을 때 핵이식란의 융합률 분할율 발육률은 Table 2와 같다. 통전횟수를 1회로 하여 실험한 경우 융합률, 분할율, 상실배/배반포로 발달한 비율은 65.2, 88.4 26.3%로 나타났다. 통전횟수를 2회로 하였을 때는 각각 43.2, 62.9 및 36.4%였고, 통전횟수를 3회로 한 경우 각각 36.5, 13.0 및 0.0%로 조사되었다. 배반포로의 발육률은 통전시간 1, 2회에서 유의차가 없었다. 융합률 및 분할율은 통전시간 1회에서 다른 군에서 보다 유의적으로 높았다.

고 찰

소 할구를 이용한 전기 융합시 다양한 조건의 전

Table 1. The effect of duration of DC* on development rates of nuclear transfer embryos

Duration (μ s)	No. of embryos			No. of blastocyst (%)
	Reconstructed	Fused(%)	Cleaved(%)	
10	71	28(39.4) ^a	25(89.3) ^b	1(4.0) ^a
20	96	47(49.0) ^a	30(63.8) ^b	11(36.7) ^b
30	66	43(65.2) ^b	38(88.4) ^b	10(26.3) ^b
40	74	26(35.1) ^a	12(46.2) ^a	3(25.0) ^b
60	76	14(18.4) ^a	14(100) ^b	4(28.6) ^b

^{ab}: Values within columns with different superscripts differ (P<0.05)

* DC: Direct current

** Pulse intensity: 1.75kv/cm

*** Pulse times: 1 time

Table 2. The effect of times of DC on development

Number of pulse	No. of embryos			No. of blastocyst (%)
	Reconstructed	Fused(%)	Cleaved(%)	
1	66	43(65.2) ^a	38(88.4) ^a	10(26.3) ^a
2	81	35(43.2) ^b	22(62.9) ^b	8(36.4) ^a
3	63	23(36.5) ^b	3(13.0) ^b	0(0) ^b

^{ab} Values within columns with different superscripts differ (P<0.05)

* DC: Direct current

** Pulse intensity: 1.75kv/cm

*** Pulse times: 1 time

기강도, 통전시간 및 통전횟수에 대한 융합률은 79%(Robl 등, 1987), 90%(Zakgartchenko 등, 1995), 79%(Prather 등, 1987)로서 전기강도 및 통전횟수를 1.75 kv/cm, 1회로 고정한 본 실험에서 얻은 최고 65.2%(30 μ s)의 융합률과 비교할 때 할구 핵이식이 높은 융합율을 나타내었다. 또한 분할율 및 배반포로의 발육률도 할구 핵이식이 높게 나타났다. 이것은 할구의 세포막이 체세포 세포막에 비해 수핵 난자 세포막 구조와 더 유사하여 pore 형성 및 물질의 이동이 더 용이하였기 때문이라 사료된다. 그리고 체세포를 이용한 경우 본 실험에서와 같은 fibroblasts를 이용한 Alan Trounson 등(1998)에서 보고된 융합률 23~43%, 분할율 및 배반포로의 발육률이 각각 16~43%, 2%로써 1.75 kv/cm, 30 μ s, 1~2회로 통전한 본 실험의 결과보다 낮았다. 하지만 동일한 fibroblasts를 이용한 Zakhartchenko 등(1992)에서는 2.1 kv/cm, 2회에서 72~76%의 융합률, 66~77%의 분할율 및 20~39%의 발육률로써 본 실험보다 효능이 높았다. 따라서 다수의 통전횟수에 전기자극의 강도와 통전시간을 적절히 증감하는 경우 융합률 및 배반포로의 발육률을 높일 수 있을 것이라 사료된다.

전기강도 및 통전시간을 1.75 kv/cm와 30 μ s로 고정하고 전기자극을 반복한 실험에서 2회의 통전횟수가 1회 통전보다 낮은 융합율을 나타냈지만, 발육률에서 1회와 유의적 차가 없는 것은, 다수의 통전이 세포막의 손상없이 세포막뿐만 아니라 세포질 내의 미토콘드리아나 골지체 등의 막성 구조물의 pore형성률을 높여서(Ozil, 1990) 세포 사이의 물질 교환률을 높이는, 특히 Ca²⁺을 이동(Song 등, 1996; Collas 등, 1989; Zimmermann과 Vienken, 1982)시킴으로써 활성화에 영향을 미친다고 생각된다. 세포에 비가역적 손상을 주지 않는 범위에서 형태적, 기능적으로 다른 특징을 가질 수 있는 각종 류별 세포에 대한 전기 융합의 최적조건을 찾는 실험 및 핵이식란의 활성화에 어떤 조건의 전기강도, 통전시간 그리고 통전횟수가 더 효과적인가에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다.

적 요

한우 섬유아세포 핵이식에서 전기 융합 방법을 이용한 통전 시간 및 통전 횟수를 조절하여 최적의 핵이식 전기 융합조건을 찾아보고자 일련의 실험을 실시한 결과는 다음과 같다

1. 핵이식란에 통전강도를 1.75 kv/cm로 고정하고 통전시간을 10 μ s, 20 μ s, 30 μ s, 40 μ s, 60 μ s를 사용한 후 배양한 결과 통전시간이 30 μ s일 때 융합률은 다른 군에 비하여 유의적으로 높았으며, (p<0.05) 분할율 및 배반포로의 발육률도 높은 경향을 나타내었다.

2. 실험 1에서 나온 결과를 이용하여 30 μ s로 통전시간을 고정한 다음 통전횟수를 1, 2, 3회 적용한 결과 1회 통전한 군에서 융합률 및 분할율 그리고 발육률이 유의적으로 높았다.

참고문헌

- Abeydeera LR, Wang, WH, Prather RS and Day BN. 1998. Maturation *in vitro* of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. Biol. Reprod., 58:1316-1320.
- Briggs R, King TL. 1952. Transplantation of living cell nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 38:455-463.
- Collas P, Balise JJ, Hofmann GA and Robl JM. 1989. Electrical activation of mouse oocytes. Theriogenology, 32:835-844.
- Collas P and Robl JM. 1990. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. Biol. Reprod., 43:877-884.
- Giles RE and Ruddle RH. 1973. Production of Sendai virus for cell fusion, *In Vitro*. 2:103-107.
- Illmensee K and Hoppe PC. 1981. Nuclear transplantation in *Mus musculus*: developmental potential of nuclei from preimplantation em-

- bryos. *Cell*, 23:9.
- Kastrop PM, Bevers MM, Destree OH and Kruip TA. 1990. Analysis of protein synthesis in morphologically classified bovine follicular oocytes before and after maturation *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 26:222-226.
- Kinosita K and Tsong TY. 1977. Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membranes. *Nature(Lond.)*, 268:438-441.
- Lavoir MC, Kelt D, Rumph N, Barnes F, Betteridge KJ and King WA. 1997. Transcription and Translation in Bovine Nuclear Transfer Embryos. *Biol. Reprod.*, 57:204-213.
- Ozil JP. 1990. The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation. *Development*, 109:117-127.
- Prather RS, Barnes FL, Sims MM, Robl JM, Eyestone WH and First NL. 1987. Nuclei transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.*, 37:859-866.
- Robl JM, Prather R, Barnes F, Eyestone W, Northey D, Gilligan B and First NL. 1987. Nuclear transplantation in bovine embryos. *J. Anim. Sci.*, 64:642-647.
- Sale AJH and Hamilton WA. 1968. Effects of high electric fields on microorganisms. III. Lysis of erythrocytes and protoplasts. *Biochim. Biophys. Acta.*, 163:37-43.
- Song KY, Lee ES, Lee BC and Hwang WS. 1996. Effect of Ca^{2+} Concentration on Electric Activation of *In Vitro* Matured Oocytes of Korean Native Cattle. *Korean J. Emb. Trans.*, 11:259-269.
- Tao T, Boquest AC, Machaty Z, Petersen AL, Day BN and Prather RS. 1999. Development of pig embryos from enucleated oocytes infected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394:369-371.
- Trounson A, Lacham-Kaplan O, Diamente M and Gougoulidis T. 1998. Reprogramming cattle somatic cells by isolated nuclear injection. *Reprod. Fertil. Dev.*, 10:645-650.
- Tsunoda Y and Kato Y. 1998. Not only inner cell mass cell nuclei but also trophectoderm nuclei of mouse blastocysts have a developmental totipotency. *J. Reprod. Fertil.*, 113:181-184.
- Wells DN, Misica PM and Tervit HR. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol. Reprod.* 60:996-1005.
- Willadsen SM. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, 320:63-65.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ and Campbell KHS. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385:810-813
- Zakhartchenko V, Durcova-Hills G, Stojkovic M, Scherenthaner W, Prella K, Steinborn R, Muller M, Brem G and Wolf E. Effects of serum starvation and recloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts. 1999b. *J. Reprod. Fertil.*, 115:325.
- Zakhartchenko V, Wolf E, Palma GA and Brem G. 1995. Effect of donor embryo cell number and cell size on the efficiency of bovine embryo cloning *Mol. Reprod. Dev.* 42:53-57.

(접수일: 1999. 5. 31 / 채택일자 1999. 8. 14)