

토끼 핵이식에 의한 복제산자의 생산효율 향상에 관한 연구*

윤희준* · 조성근** · 노규진*** · 이효종*** · 최상용*** · 박충생†
경상대학교 유전공학연구소

Production of Identical Rabbit Offspring by Nuclear Transplantation*

X. J. Yin*, S. K. Cho**, G. J. Rho***, H. J. Lee***, S. Y. Choi*** and C. S. Park†

Genetic Engineering Institute, Gyeongsang National University

SUMMARY

This study was carried out to improve a technique of cloned animal production by preactivation of nuclear recipient oocytes with ionomycin and 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) in rabbits.

The oocytes were collected from the oviduct of superovulated rabbit at 19~20 hours post hCG injection. The collected oocytes were preactivated and self-enucleated by treating 5 μ M ionomycin for 5 min. and 2.0 mM 6-DMAP for two hours. Microsurgical removal of the chromatin complex in the second polar bodies was effectively performed and single blastomere separated from 32-cell stage rabbit embryos was injected into the perivitelline space of the enucleated recipient oocytes. Following electrofusion and *in vitro* culture for 18 hours, the nuclear transplant(NT) embryos were transferred into the uterine horns of naturally mated or synchronized recipient does. When 32 NT embryos reconstituted with preactivated oocytes were transferred to 2 recipient does, one foster doe delivered two offspring(6.3%), while not a offspring was delivered from three foster does which received 17 NT embryos reconstituted with non-preactivated oocytes. A total of 68 NT embryos reconstituted with preactivated oocytes were transferred into the uterine horns of 7 synchronized recipient does. Among them, two recipients were pregnant and delivered three offspring(5.9%).

With these results, It may be concluded that the production efficiency of cloned rabbits can be improved by transfer of NT embryos reconstituted with preactivated oocytes.

(Key words : cloning, nuclear transplantation, preactivation, rabbit)

* 본 연구는 1997~1998년도 교육부 유전공학 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

* College of Agriculture, Kinki University

** 경상대학교 축산과학부(Department of Animal Science, Gyeongsang National University)

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

† 교신저자

서론

핵이식 기술에 의한 수정란의 cloning의 가능성은 1952년 Briggs와 King에 의하여 양서류에서 처음으로 시도되었다. 포유류에서는 Illmensee와 Hoppe(1981)가 처음으로 생쥐 수정란에 핵이식을 시도하여 산자생산에 성공함으로써 핵이식기법을 통한 복제동물생산에 관심이 집중되기 시작하였다. 가축에서는 Willadsen(1986)이 면양에서, Stice 등(1988)은 토끼에서 그리고 Prather 등(1987)은 소에서 그리고 Prather 등(1989)은 돼지에서 핵이식에 의한 산자생산에 성공한 이래 생산효율 제고를 위한 노력이 많이 이루어져 왔다. 핵이식 산자 생산에는 많은 요소가 관련되고 있지만 수핵난자와 공핵수정란의 세포주기 관계에 관한 연구가 많이 이루어져 왔다. 면양에서는 Campbell 등(1994)이 maturation promoting factor(MPF)가 떨어진 활성화된 난자를 사용하여 높은 배반포 발달율을 얻었으며, 산자생산에도 성공하였다. 소에서는 Aoyagi 등(1994), Koto 등(1994) 및 Stice 등(1994, 1996)도 탈핵된 M II 난자를 인위적으로 활성화 자극을 준 다음, 이것을 수핵란으로 사용할 때 성숙된 M II 기의 난자를 사용할 때보다 높은 배반포로의 발달율을 얻었으며, Stice 등(1994)도 역시 같은 방법으로 산자생산에 성공하였다. 그러나 토끼(Collas 등, 1992)와 생쥐(Cheong 등, 1993)의 경우, G1 기의 핵을 MPF 농도가 높은 M II 기 난자의 탈핵 세포질에 이식할 경우 배반포까지의 발달이 크게 향상되었다고 보고하고 있으나, Pinto-correia 등(1993)은 토끼에서 G1 기의 핵을 이식시 높은 핵이식배의 발달에도 불구하고 극히 일부만이 임신중기에 이르렀다고 지적하고 있다. 그리고 토끼 수정란에서는 다른 동물과는 달리 특이하게 난관에서 분비되는 당단백질 성분인 mucin coat가 존재하며 이는 착상에 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Murakami와 Imai, 1996; Li 등, 1997)

국내에서는 이 등(1989)이 처음으로 핵이식에 의한 생쥐 생산에 성공하였다는 보고가 있었고, Choe 등(1989)도 이 기법으로 28마리의 핵치환된 생쥐 신생자를 작출한 바가 있다. 토끼에 있어서는 국내

에서 이 등(1994) 및 박 등(1995)이 체내성숙 및 체외성숙된 난자를 이용하여 핵이식 산자를 생산한 바 있으나 핵이식 방법에 따른 산자생산 효율에 대한 검토는 아직 보고된 바 없다.

본 실험에서는 토끼를 대상으로 ionomycin과 6-dimethylaminopurine(6-DMAP)으로 활성화된 난자를 사용하여 핵이식을 실시하고 이들 핵이식된 수정란을 수란토끼의 난관에 이식하여 복제토끼 생산효율을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용된 공시동물은 New-Zealand White 종의 체중이 3kg 전후의 성숙된 토끼로서 연암원예축산전문대학에서 공급 받았으며 빛(light: 14시간, dark: 10시간)을 조절하여 분리 사육하였고 물과 사료(토끼용 펠렛사료, 퓨리나사, 한국)는 자유로이 급식하였다.

2. 수핵난자와 공핵수정란의 준비

난자의 확보를 위한 과배란 유기는 성숙한 암토끼를 10 mg의 FSH(Folltropin®, Vetrepharm Co., Australia)를 1일 2회 3일간 근육주사하였고, 마지막 투여 12시간 후 hCG(PEAMAX®, Japan)를 100 IU를 정맥주사하였다. 난자는 hCG 주사 후 13~15시간 사이에 암토끼를 chlorpromazine HCl 과 ketamine HCl로 전신마취한 다음 개복수술하여 난관으로 부터 성숙난자를 10% FCS가 함유된 D-PBS로 회수하였다. 회수된 난자는 300 IU/ml의 hyaluronidase(Sigma Chemical Co., U.S.A.)에서 39°C, 5% CO₂조건에서 7분간 배양한 다음, 150 μm fire-polished pipette으로 난구세포를 제거하여 제 1극체가 명확하고 세포질이 충실한 것을 공시난자로 사용하였다. 핵을 수핵난자에 공급할 수정란은 상기방법으로 과배란을 유기한 다음 토끼를 성숙된 수토끼와 교미 후 32-세포기에 있는 수정란을 회수하고 이들로부터 할구를 분리하여 실험에 사용하였다.

3. 수핵란의 탈핵 및 활성화

수핵난자와 공핵수정란으로부터 분리된 할구세포를 7.5 $\mu\text{g/ml}$ cytochalasin B(Sigma Chem. Co., U.S.A.)와 10% FCS가 함유된 Earl's balanced salt solution(EBSS, Sigma Chem. Co., U.S.A.)에서 미세조작 15분 전에 전처리를 하였고, 미세조작을 위하여 micromanipulators (Narishige Co., Japan)를 DIC 도립현미경 (Nikon Co., Japan)위에 장치하였다. 미세조작은 위의 용액에서 실시하였고, 탈핵은 McGrath와 Solter(1983)의 non-destructive 조작법에 의하여 실시하였다. 즉, 성숙된 난자로부터 핵을 제거하기 위하여 외경 30 μm 의 연마된 미세 pipette을 투명대 내로 진입시키고 제 1극체와 그 주위에 위치하는 핵을 원형질막에 싸여진 채로 흡입하여 제거하였다. 탈핵된 난자는 직접 할구를 주입하거나(Non-preactivation group), hCG 19시간 후에 5 μM 의 ionomycin (Sigma Chem. Co., U.S.A.)에서 5분간 배양한 후 2.0 mM의 6-DMAP에서 2시간 활성화 처리하였다(Preactivation group). 활성화 처리 후 제 2극체를 방출하지 않은 미수정란을 탈핵된 것으로 판단하여 수핵란 세포질로 공시하였다.

4. 핵 주입 및 융합

공핵수정란으로부터 분리된 할구세포 하나를 미세 pipette에 흡입하고 이를 미세조작으로 탈핵된 수핵난자의 원형질 바깥 위란막강에 주입하였다. 핵이 주입된 난자는 M-199액에서 미세조작 후 핵의 융합 때까지 배양하였다.

핵이 주입된 난자는 이 등(1993)의 방법에 따라 핵융합을 실시하였다. 전기자극은 전압은 1.25kV/cm, 통전시간은 60 μsec 및 통전횟수는 3회로 정하였다. 융합과 난자의 활성화를 위한 용액은 Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 이 함유되지 않은 0.28 M mannitol 용액으로 할구가 이식된 난자를 이 용액으로 세척한 electrode chamber에 융합용액을 넣고 핵이식란을 옮겨 정렬시킨 후 Electro Cell Manipulator 200 (BTX, Inc., U.S.A.)로 핵의 융합을 유도하였다. Preactivation group의 난자는 전과 같은 전기자극으로 1회만 실시하였다. 세포질과 핵의 융합이 확인된 난자는 7.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 cytochalasin B와 10% FCS가 함유된 M-199배양액(Earl's salt, Sigma

Chem. Co., U.S.A.)에서 1시간 동안 배양한 다음 공배양하였다.

5. 핵이식 수정란의 체외배양

융합이 확인된 수정란은 4-well dish에 10% FCS가 포함된 M-199 배양액에 옮겨 monolayer가 형성된 토끼 난관상피세포와 같이 39 $^{\circ}\text{C}$ 의 5% CO_2 배양기내에서 공배양하였다.

6. 핵이식 수정란의 체내이식과 산자 생산

핵이식 수정란의 체내이식은 핵융합 후 18시간이 지난 다음 2~4-세포기로 분열한 수정란을 발정동기화된 토끼의 난관으로 이식을 하였다. 수란토의 발정동기화는 이식 24시간 전에 자연발정이 온 토끼를 골라 정상수컷과 교미하여 임신시킨 후 사용하였거나 정관결찰이 된 수토끼로서 교미자극을 주었고 100 IU의 hCG를 주사하였다. 착상의 확인은 이식 25일자에 마취 후 개복수술하여 확인하였고 일부는 산자 생산을 유도하였다.

결 과

1. 수핵난자의 활성화 처리가 핵이식 수정란의 체내이식 후 산자생산효율에 미치는 영향

수컷과 교미하여 임신시킨 대리모에 M II기의 난자 또는 ionomycin과 6-DMAP로 활성화된 난자를 사용하여 핵이식한 수정란을 이식하여 산자를 생산한 결과는 Table 1과 같다. 활성화 난자군에서는 2마리의 대리모에서 2마리가 임신하였고 그 중 한 마리에서 2마리의 핵이식 산자를 얻었다. 대조구에서는 3마리의 대리모에서 1마리만 임신하여 8마리의 정상적인 산자를 생산하였으나 핵이식 유래 산자를 생산하지 못하였다.

정관결찰한 수컷과 교미자극으로 위임신시킨 대리모에 정상적인 수정란과 핵이식한 수정란을 이식하여 임신율, 체내발달 및 산자생산율을 조사한 결과는 Table 2와 같다.

정상적인 수정란은 84개를 8마리의 대리모에 이식하였던 바, 그 중 4마리(50%)가 임신하였으며, 11마리(13.1%)의 산자(10마리)와 태아(2마리, Fig. 1)를 생산 및 관찰하였으며, 핵이식한 수정란 68개

Table 1. Production of offspring by transfer of NT embryos reconstituted with preactivated or non-preactivated oocytes into naturally mated recipient rabbits

Cytoplasm	No. of recipients	No. of NT embryos transferred	No. of recipient Pregnant	No. of fetuses or offspring	
				Natural	NT
Preactivation	2	32	2	2	2(6.3%)
Non-preactivation	3	17	1	8	0

Table 2. *In vivo* development and production of offspring following transfer of fresh or NT rabbit embryos

Type of embryos	No. of embryos transferred	No. of recipients		No. of fetuses or offspring(%)
		Used	Pregnant(%)	
Fresh	84	8	4(50.0)	11(13.1) ^a
NT	68	7	2(28.6)	4(5.9) ^b

* The values with different superscripts in the same column were significantly different ($P < 0.1$).



Fig. 1. The rabbit conceptus developed after transfer of fresh embryos and retrieved at Day 25 of gestation.



Fig. 3. Two rabbit pups delivered from a foster mother after transfer of NT embryos.

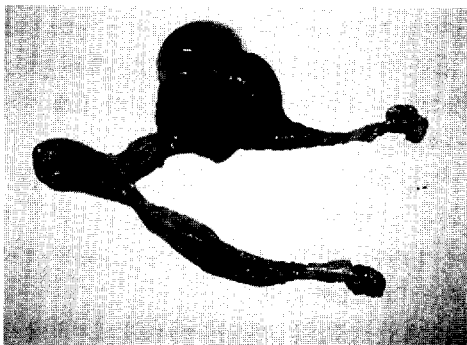


Fig. 2. A rabbit conceptus developed after transfer of NT embryos and retrieved at Day 25 of gestation.

를 7마리의 위임신된 대리모에 이식한 결과, 2마리 (28.6%)에서 임신이 확인되었고 이들이 4마리(5.9%)의 산자(3마리)와 태아(1마리, Fig. 2)를 생산하여 정상수정란 이식에 비해 유의적으로($P < 0.1$) 낮은 산자생산율을 보였다.

고 찰

자연교미한 대리모에 수핵란을 전활성화시켜 작출한 32개의 핵이식 수정란을 2마리의 대리모에 이식하여 그 중 한마리에서 2마리(6.3%)의 핵이식 산자를 얻었으나 수핵란을 전활성화 시키지 않고 작출한 핵이식 수정란 17개를 이식하여서는 한 마리의 산자도 얻지 못하였다. 토끼에서 핵이식된 수정란

을 대리모에 이식하여 산자생산에 성공한 예는 Stice 등(1988)에 의하여 최초로 보고되었다. 이들은 164개의 핵이식 수정란을 수란토끼에 이식하여 6마리(3.7%)의 산자를 생산하였다. Yang 등(1992)도 핵이식 후 2~4-세포기로 자란 수정란 243개를 15마리의 수란토끼에 이식하여 8마리(3%)의 산자를 생산하였으며, Heyman 등(1990)은 207개의 핵이식 수정란을 이식하여 8마리(4%)의 산자를 생산하여 본 실험의 6.3%와 유사한 결과를 나타냈다. 다른 동물종에 있어서는 Prather 등(1987)이 소에서 핵이식 기법으로 산자생산에 성공한 이래 Willadsen 등(1991)은 33.1%의 산자 생산 성공률을 얻었다. 돼지에서는 Prather 등(1989)이 12.6%의 산자 생산율을, 양에서는 Smith 등(1989)이 4%의 산자 생산율을 얻고 있어 토끼보다 보편적으로 좋은 결과를 보이고 있으나 아직도 핵이식 수정란으로 복제동물을 생산하는 성공률은 낮은 수준이며, 이는 체외에서의 탈핵과 핵주입 등 미세조작에 의한 수핵난자의 손상, 전기자극, 체외배양에서의 발달 지연 및 체내이식시 수란측과의 동기화의 부적합 등 많은 기술적 어려움이 있기 때문이다.

Campbell 등(1993; 1994)은 난자내의 MPF 수준을 떨어뜨려 핵이식후 높은 배반포 발달율을 얻었으며, Aoyagi 등(1994)와 Koto 등(1994)도 소의 난자를 탈핵한 다음 이들을 인위적으로 활성화 자극을 준 다음, 이것을 수핵란으로 사용할 때 높은 배반포로의 발달율을 얻었다고 하며, Stice 등(1994)도 역시 같은 방법으로 산자 생산에 성공하였다고 한다. 이와 같이 여러 연구자의 보고에 따라 본 연구에서도 토끼 난자를 전활성화시키지 않고 핵이식후 대리모에 이식하였던 바 한 마리의 산자도 생산하지 못 하였으나, 난자를 ionomycin과 6-DMAP를 사용하여 전활성화시킨 다음 수핵난자로 사용하였던 바, 산자생산에 성공하였다. 이러한 결과로 보아, 난자의 전활성화가 핵이식을 통한 복제동물의 생산효율 증진에 활용될 수 있을 것으로 본다.

적 요

본 연구는 토끼에서 핵이식기법에 의한 복제산자

의 생산효율을 증진시키기 위하여 수행되었다. 특히, ionomycin과 6-DMAP에 의한 수핵난자의 전활성화가 복제산자 생산효율 증진에 영향을 미치는지 알아보려고 하였다. 이들 전활성화된 난자를 사용하여 핵이식으로 복제수정란을 작출한 다음 이를 대리모에 이식하여 수태율과 산자생산율을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 수핵난자를 전활성화시켜 작출한 32개의 핵이식 수정란을 이식하였던 바, 자연교미한 1마리의 대리모에서 2마리(6.3%)의 핵이식 산자를 얻었으나 수핵란을 전활성화시키지 않고 작출한 핵이식 수정란 17개를 3마리의 대리모에 이식하여서는 한 마리의 산자도 얻지 못하였다.
2. 핵이식 수정란 68개를 위임시킨 7마리의 대리모에 이식하였던 바, 2마리가 임신하여 28.6%의 수태율을 보였으며 4마리(13.1%)의 태아(1마리) 및 산자(3마리)를 얻었다.
3. 위의 결과로 보아, 토끼에서 핵이식기법으로 복제산자를 생산할 경우, 수핵란은 전활성화시킨 것을 사용함이 유리하며, 대리모는 정관 결찰한 수컷으로부터 교미자극을 받은 토끼를 사용하는 것이 유리하다고 사료된다.

참고문헌

- Aoyagi Y, Konishi M, Wada T and Takedomi, T. 1994. Unaged bovine oocytes successfully develop to blastocysts after parthenogenetic activation of nuclear transfer. *Theriogenology* 41:157(abstract).
- Briggs R. and King TJ. 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 38:455-463.
- Campbell KHS, Loi P, Cappai P and Wilmut I. 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.
- Cheong HT, Takahash Y and Kanagawa H,

1993. Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. *Biol. Reprod.* 48:958-963.
- Choe SY, Park CS, Lee HJ and Park HS. 1989. Studies on nuclear transplantation in mouse embryos. I. Functional differences between maternal and paternal genomes. *Korean J. Vet. Res.* 30:12-127.
- Collas P, Balise JJ and Robl JM. 1992. Influence of cell stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 46:492-500.
- Heyman, Y, Patrick Chesne et Jean-paul Renard. 1990. Full-term reprogramming of frozen embryonic nuclei after nuclear transfer in the rabbit species. *C.R.Acad. Sci. Paris, T.* 331, 321-326.
- Illmensee K and Hoppe PC. 1981. Nuclear transplantation in *Musculus*: Developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell* 23:9-18.
- Koto 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*. *Theriogenology* 41:1483-1488.
- Li J, Foote RH, Liu Z and Giles JR. 1997. Development of rabbit zygotes into blastocysts in defined protein-free medium and offspring born following culture and embryo transfer. *Theriogenology* 47:1103-1113.
- McGrath J and Solter D. 1983. Nuclear transplantation in mouse embryos by microsurgery and cell fusion. *Science* 220:1300-1302.
- Murakami H and Ishibashi T. 1996. Successful implantation of *in vitro* culture rabbit embryos after transfer: A role for mucin. *Mol. Reprod. Develop.* 43:167-170.
- 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.
- Prather RS, Barnes FL, Sims MM, Robl JM, Eyestone WH and First NL. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryo. Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.* 37:859-866.
- Prather RS, Sims MM and First NL. 1989. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol. Reprod.* 41:414-418.
- Prather RS, Sims MM and First NL. 1989. Nuclear transplantation in the early porcine embryo. *Theriogenology* 29:290(abstract).
- Smith LC, and Wilmut I. 1989. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the early 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, Strechenko NS, Keefer CL and Matthews L. 1996. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 54: 100-110
- Willadsen SM. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 320:63-65.
- Wilmut I, Schnieke AE., McWhir J., Kind A J and Campbell KH. 1997 Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813.
- Yang X, Jiang S, Kovács A and Foote RH. 1992. Nuclear totipotency of cultured rabbit morulae to support full-term development following nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 47: 636-643.
- 이철상, 박흠대, 정길생, 이경광. 1989. 핵치환 생쥐의 생산. *한국축산학회지* 31:69-74.

이효종, 최민철, 최상용, 박충생, 윤창현, 강대진.
1993. 반복핵이식에 의한 복제동물 생산에 관한 연구. I. 토끼수해난자의 전기자극에 의한 활성화. 한국수정란이식학회지 8(2):151-157.

이효종, 전병균, 윤희준, 이경미, 송상현, 공일근, 노규진, 최민철, 최상용, 박충생. 1994. 핵이식에 의한 복제토끼 생산. 한국수정란이식학회지 9(2):161-165.

박충생, 전병균, 이경미, 윤희준, 이효종, 곽대오, 최상용. 1995. 토끼의 체외배양 난자를 이용한 핵이식으로 복제수정란 및 복제산자의 생산. 한국수정란이식학회지 10(1):35-42.

(접수일 : 1999. 10. 30 / 채택일자 : 1999. 12. 13)