

## 소 체세포 핵이식에 의한 핵-세포질 상호작용에 관한 연구

민동미 · 최종엽 · 박춘근 · 김정익 · 정희태<sup>†</sup>  
강원대학교 동물자원과학대학

### Study on Nucleo-Cytoplasmic Interaction by Somatic Cell Nuclear Transfer in Bovine

D. M. Min, J. Y. Choi, C. K. Park, C. J. Kim and H. T. Cheong<sup>†</sup>

College of Animal Resource Science, Kangwon National University  
Chunchon 200-701, Republic of Korea

#### SUMMARY

This study was conducted to investigate the effects of quiescent treatment of donor cells and activation treatment time of recipient cytoplasm on nuclear remodeling and *in vitro* development of somatic cell-cloned bovine embryos. Serum starved, confluent and nonquiescent cycling adult skin cells were transferred into enucleated oocytes. Nuclear transfer oocytes were activated at 30 min, 1 and 2 hrs after electrofusion. Some nuclear transfer embryos(23% to 35%) extruded a polar body, which was not affected by quiescent treatment of donor cells and activation time of recipient cytoplasm. About 68% of nuclear transfer embryos fused with a serum starved cells had a chromatin clump, but which was not different from embryos fused with confluent(51%) and nonquiescent(47%) cells. The proportion of embryos with a single chromatin clump was slightly increased when nuclear transfer embryos were activated within 30 min after fusion(69%) compared to those were activated at 1 and 2 hrs after fusion, but there was not significantly different. Development rates to the blastocyst stage were 8.6% and 15.9% when serum starved and confluent cells were transferred, which were higher than that of control group. Developmental rate to the blastocyst stage was higher in embryos were activated within 30 min after fusion(17.3%) compared to those of embryos were activated at 1 and 2 hrs after fusion ( $P < 0.05$ ). From the present result, it is suggested that quiescent treatment of donor cells and activation time of recipient cytoplasm can affect the *in vitro* development. Quiescent treatment by serum starvation or growth to confluency of donor cells and recipient cytoplasm activation within 30 min after fusion could increase the number of embryos with a normal chromatin structure, which results in increased *in vitro* development.

(Key words : nuclear transfer, adult skin cells, nucleo-cytoplasmic interaction, quiescent treatment, activation time)

---

<sup>†</sup> Correspondence

## 서론

1997년 영국의 Wilmut 등이 양의 유선세포에서 모체와 유전형질이 동일한 복제양 "Dolly"의 생산에 성공한 이래, 체세포 핵이식을 이용한 복제동물 생산이 면양(Wilmut 등, 1997; Schnieke 등, 1997), 소(Cibelli 등, 1998; Kato 등, 1998; Vignon 등, 1999; Wells 등, 1999) 및 생쥐(Wakayama 등, 1998) 등에서도 성공되었다. 특히 Wakayama 등(1998)은 기존의 전기자극을 통한 세포융합 방법이 아닌 난구세포를 수핵란의 세포질에 직접 주입하여 생쥐를 생산함으로써 전기융합에 의한 핵이식란의 stress와 비정상적인 염색질의 발생을 줄일 수 있다는 점에서 새로운 핵이식 방법을 제시해 주었다. 또 Schnieke 등(1997)과 Cibelli 등(1998)은 태아섬유아세포에 외래유전자를 주입한 후 핵이식하여 형질 전환된 복제양 및 복제소를 생산함으로써 체세포의 핵이식을 이용한 형질전환동물의 대량생산 가능성을 보여주었다.

핵이식에 의한 복제동물 생산 과정에서 핵과 세포질간의 복잡한 상호작용이 핵이식란의 발육에 많은 영향을 미치게 된다. 탈핵 미수정란 세포질에 이식된 세포의 핵은 다양한 형태적 변화를 거치는데, 그 중에서도 가장 특징적인 변화가 이식된 핵의 비정상 염색체 응축(premature chromosome condensation; PCC)이다(Collas 등, 1992b; Cheong 등, 1993, 1994). PCC의 형태는 이식된 분할구 핵의 세포주기단계(cell cycle stage)에 따라 다양하게 나타나, 핵이식란의 발육에 영향을 미치게 된다(Cheong 등, 1993). 세포주기단계는 G1, S, G2, M기 네 개로 나누어지는데 미수정란의 탈핵 세포질을 수핵란으로 이용할 경우는 이식할 세포의 세포주기단계를 G1기에 동조시키는 것이 핵이식란의 정상적인 발육을 위한(Collas 등, 1992a) 중요한 요인으로 인식되고 있으며(Collas 등, 1992a; Cheong 등, 1993), Wilmut 등(1997)은 이러한 결과에 기초하여 세포학의 세포주기를 G1기에서 휴면상태로 진입된 G0기에 동조시키는 방법에 의해 체세포 복제에 성공하였다. 대부분의 체세포 복제 연구는 태어나 성숙의 체세포를 채취하여 여러 번의 배양을

거친 후, 이들 세포의 세포주기를 휴면기(G0)로 유도한 다음, 수핵란 세포질에 이식함으로써 복제수정란을 생산하였다(Wilmut 등, 1997; Kato 등, 1998; Wells 등, 1999). Donor 세포의 G0기 유도는 세포배양액 중에 단백질원인 혈청을 최소화하여 혈청기아(serum starvation) 상태를 만들어 주거나(Campbell 등, 1996; Wilmut 등, 1997), 자연적으로 발육이 정지된 세포를 이용하는 방법이 있다(Wakayama 등, 1998). G0기 세포는 transcriptional activity가 감소하거나 염색질의 성질 변화가 수반되어 이들 핵이 미수정란 세포질에 노출되었을 때 핵의 초기화가 일어나 정상발육을 가능케 하는 것으로 여겨진다(Campbell 등, 1996; Wilmut 등, 1997). 또 다른 이유로는 G0기 세포가 G1기의 일정 시점에서 발육을 정지한 상태이므로 G1기 핵과 성질 및 기능적으로 유사하여 핵의 초기화에 적합한 것으로 판단된다. 한편, Cibelli 등(1998)은 휴면세포가 아닌 분열중의 태아세포를 사용하여도 복제송아지가 생산될 수 있음을 보고하였는데, 성장중인 세포의 50% 이상이 G1기에 속해 있어, G1기 핵을 이식 받은 복제란의 일부가 산자로까지 발생된 것으로 추정하고 있다.

체세포를 이용한 복제동물 생산이 보고되고 있는 하나, 아직까지 세포주기 등 핵-세포질의 상호작용과 관련된 핵의 초기화와 발육능에 관한 정보가 거의 없는 실정이다. 본 연구는 핵-세포질의 상호작용과 관련이 깊은 세포의 휴면처리와 수핵란의 활성화처리가 소 체세포 핵이식란의 핵형 변화와 핵의 발육에 미치는 영향을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 난포란의 채취 및 성숙배양

도축장에서 소의 난자를 회수하여 직경이 2~7 mm의 난포로부터 18 gauge 주사바늘이 부착된 주사기로 난포액을 흡입하여 미성숙 난자를 채취한 후, 실제 현미경하에서 난구세포가 균일하고 세포질이 균질한 것만을 선별하여 난자성숙용 배양액(TCM-199)으로 수회 세척 후 성숙배양에 이용하였다. 난포란의 성숙배양액은 TCM-199액(Gibco-BRL, Grand Island, NY)에 10% 소태아혈청(fet-

al bovine serum; FBS, Gibco-BRL), 0.2 mM Na-pyruvate, 0.02 U/ml FSH(Sigma, St. Louis, MO, USA), 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  17 $\beta$ -estradiol(Sigma) 및 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gentamycin(Gibco-BRL)이 함유된 성숙배양액을 50  $\mu\text{l}$ 의 소적으로 만들어 mineral oil로 피복하고 성숙배양 2~3시간 전에 5% CO<sub>2</sub>, 39°C의 조건하에서 평형시킨 후, 각 소적 당 10개의 난포란을 넣어 20~22시간 배양하였다.

### 2. 체세포의 분리, 배양 및 보존

체세포의 분리 및 배양은 Wilmut 등(1997)의 방법에 준하였다. 소에서 귀 조직을 절취하여 무균적으로 조직을 배양접시 내로 회수한 다음, 안과용 가위로 잘게 썰어 15 ml 원심관에 옮겨 넣고 0.05% trypsin-EDTA (Gibco-BRL) 10 ml를 혼합하여 37°C에서 30분간 진탕한 후 5분간 정치하여 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액은 200×g로 5분간 원심분리하여 세포를 회수하였다. 회수된 귀의 조직 세포는 10% FBS, 0.2 mM Na-pyruvate 및 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gentamycin이 함유된 TCM-199액 3 ml에 재 부유시켜 25 ml 배양병 내에 넣어 5% CO<sub>2</sub> 및 37°C의 조건에서 배양하였다. 배양액은 매 3일 간격으로 신선 배양액으로 교환하였으며, 세포가 약 90% 정도 confluence 되었을 때 1:2 비율로 passage를 반복하였다. 약 4회 정도 passage한 세포는 염색체분석에 의해 정상 염색체 수를 확인하였다. 세포는 4~6회 passage한 후 회수하여 10% glycerol 및 10% FBS를 함유한 TCM-199용액 중에 1×10<sup>5</sup>/ml 세포농도로 부유시켜 3 ml 냉동 vial에 1 ml씩 넣은 후 -70°C 냉동고에 넣어 동결한 후 LN<sub>2</sub> 용기 내에 보관하였다.

### 3. 체세포의 휴면처리

동결보존된 체세포는 사용 전에 용해하여 7 ml의 세포배양액으로 200×g의 조건에서 5분간 원심분리하여 세척한 다음 재 부유시켜 4-well dish에 0.5 ml씩 분주하여 5% CO<sub>2</sub> 및 37°C의 조건에서 배양하였다. 세포의 휴면처리는 두 가지 방법을 사용하였다. 하나는 혈청기아(serum starvation; SS) 방법(Campbell 등, 1996)으로, 세포를 세포배양액(위 2항 참조) 중에서 2~3일간 배양한 후, 0.5%

FBS의 TCM-199액으로 교체하여 5일간 추가 배양한 다음 핵이식에 이용하였고, 다른 하나는 생리적인 방법으로, 세포를 2~3주간 장기 배양하여 높은 세포밀도(confluency 상태)를 만들어 줌으로써 G0기에 동조시킨 후 핵이식에 이용하였다. 한편, 대조구로 사용하기 위하여 배양 후 2~3일경의 왕성하게 분열 중에 있는 세포(50~70% confluency)를 핵이식에 사용하였다.

### 4. 미수정란의 탈핵

체외에서 20~22시간 체외 성숙시킨 난포란을 1 ml의 TCM 199액이 들어있는 원심관에 옮겨 vortex mixer로 5분간 처리하여 난구세포를 제거한 후, 세포질의 색조가 균일하고 제1극체가 확인된 난자만을 수핵란용으로 사용하였다. 모든 미세조작은 실온에서 Narishige 미세조작기가 갖춰진 도립현미경을 이용하여 TCM-199 + BSA 배양소적 내에서 실시하였다. 미수정란의 탈핵은 제1극체와 주변의 세포질을 약 1/3 정도 흡인하여 제2유사분열 중기 염색체를 제거하는 방법으로 실시하였다. 탈핵 조작된 세포질은 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Hoechst 33342(Sigma)를 함유한 TCM-BSA액에 15분간 염색(Westhusin 등, 1992)하여 형광현미경으로 탈핵 여부를 검사하여 탈핵이 확인된 미수정란만을 수핵란으로 사용하였다.

### 5. 핵이식

핵이식 조작은 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  cytochalasin B(CB)가 함유된 수정 PBS(modified phosphate buffered saline; mPBS)액 내에서 김 등(1994) 및 Campbell 등(1996)의 방법에 준하여 실시하였다. Donor용 체세포는 위와 같은 방법으로 준비하여 0.05% trypsin-EDTA용액으로 3분간 처리하여 pipetting에 의하여 배양접시의 저면에서 분리한 후, 200×g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 3 mg/ml BSA를 함유한 TCM-199액의 drop에 보관하여 사용하였다. Donor세포는 직접 injection pipette으로 흡입하여 탈핵을 실시한 구멍을 통하여 탈핵란 세포질의 위관강 내로 주입하였다.

### 6. 핵이식배의 전기융합 및 활성화

핵이식란의 전기융합은 Cheong 등(1993) 및 김 등(1994)의 방법에 준하여 BTX 세포융합장치(BTX, San Diego, CA, USA) 및 0.5 mm 폭의 wire chamber를 사용하여 전기융합을 실시하였다. 핵이식란은 0.1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.05 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05 mg/ml BSA를 첨가한 0.3 M mannitol 용액을 넣은 wire chamber의 양 전극 사이로 옮겨, pipette를 이용하여 분할구와 세포질의 접촉면이 양 전극에 수평이 되도록 유도하고, 이어서 2.0 kV/cm의 직류(DC)전류를 20  $\mu$ sec 간 2회 통전하였다. 통전 후 즉시 TCM-199 + 3 mg/ml BSA액 내에서 수회 세척 후 배지 내에서 세포의 융합 여부를 관찰하였다. 핵이식란의 활성화를 유기하기 위하여 융합 확인 후 0.5~2시간 후에 10  $\mu$ M의 Ca<sup>2+</sup>-ionophore (A23187; Sigma Chem. Co., U.S.A.)로 5분간 처리 후 즉시 10  $\mu$ g/ml 농도의 cycloheximide(CHXM; Sigma Chem. Co., U.S.A.)를 함유한 체외 배양액의 drop 내로 옮겨 활성화를 유기시켰으며, 6시간 배양도중 2.5시간째 극체방출 유무를 확인하고 일부 실험에서는 whole-mount에 공시하였다.

#### 7. 핵이식란의 체외배양

활성화처리 후 핵이식란은 3 mg/ml BSA, Na-pyruvate, gentamycin을 함유한 TCM-199의 50  $\mu$ l drop으로 옮겨 5% CO<sub>2</sub> 및 39°C의 조건하에서 40~42시간 배양하며, 극체방출 유무 및 분할율을 검사하였다. 핵이식란의 분할 후 10% FBS를 함유한 CR1a내에서 BRL 세포의 단층세포와 5~7일간 공동 배양하여 배반포 형성을 검사하였으며, 배양액은 매 2일마다 신선배양액으로 교체하였다.

#### 8. Whole-mount 표본의 제작

핵이식란의 PCC 여부 및 핵상을 검사하기 위하여 일부 핵이식란은 전기융합 후 활성화처리 시간에 따라 CHXM처리 2.5시간 후에 고정하여 표본을 제작하였다. 핵이식란을 vaseline과 paraffin혼합물(9:1)로 사각에 소적을 배치한 slide glass 위에 소량의 배양액과 함께 옮겨놓고 cover glass로 가볍게 압착하였다. 그 후 acetic acid와 ethanol을 1:3로 혼합한 고정액으로 24~72시간 고정한 후 aceto-orcein으로 5분간 염색하고 25% aceto-glycerol로 세척하여 위상차 현미경( $\times$ 400)으로 핵의 형태를 관찰하였다.

#### 9. 통계 처리

실험의 결과는 LSD-test에 의하여 유의성을 검정하였다.

### 결 과

#### 1. 핵이식란의 휴면처리 효과가 극체방출에 미치는 영향

핵이식란의 휴면처리에 따른 극체방출 유무를 관찰한 결과, 극체 미방출란(NPB)과 극체 방출란(PB)은 혈청기아(SS)처리 시에 각각 74.5%(76/102)와 25.4%(26/102)로, confluency처리 시에 64.8%(70/108)와 35.2%(38/108)였으며, 무처리 시 72.6%(82/113)와 27.4%(31/113)로 나타나, 처리구간에 유의적 차이는 보이지 않았다(Table 1).

#### 2. 휴면처리 핵이식란의 염색질 구조

휴면처리(SS, confluency, NQ)에 따른 핵이식란의 융합 후 활성화 유기 2.5시간 뒤에 whole-mount

Table 1. Effect of quiescent treatment on morphology of nuclear transfer embryos\*

Treatment	No. (%) of embryos fused /manipulated	Morphology of embryos (%)	
		NPB	PB
SS	102 /193(52.8)	76(74.5)	26(25.4)
Confluency	108 /245(44.1)	70(64.8)	38(35.2)
NQ	113 /337(33.5)	82(72.6)	31(27.4)

\*Total five to eight replicates.

SS: serum starvation, NQ: non-quiescent, PB: polar body, NPB: non-polar body

를 실시하여 염색질의 구조를 관찰하였다. 휴면 처리한 SS와 confluency에서 염색체 응축결과 1개의 염색질과 각각 68.2%(30/44)와 51.1%(23/45)로 관찰된 데 비하여, 무처리구(NQ)에서는 47.2%(25/53)로 다소 낮게 나타났고, 염색체 응축이 일어나지 않아, 전핵 형태를 보인 난자는 SS, confluency 및 NQ구에서 각각 18.2%(8/44)와 13.3%(6/45), 20.8%(11/53)로 나타났으나 유의적 차이는 보이지 않았다(Table 2).

### 3. 휴면처리 핵이식란의 발육능

휴면 처리한 핵이식란의 체외 발육율을 관찰한 결과, SS와 confluency에서 배반포기 발육율이 각각 8.6%와 15.9%인데 무처리 시 0%로 유의적으로

( $P < 0.05$ )저조한 발육율을 보였다. SS와 confluency 사이에서는 유의적 차이는 인정되지 않았다(Table 3).

### 4. 수핵란 활성화 시간에 따른 핵이식란의 형태

융합 1시간 후 활성화 처리한 핵이식란의 융합율(40.0%)은 0.5시간과 2시간 후 활성화 처리한 핵이식란의 융합율(48.1%와 45.7%)보다 다소 낮게 나타났으며, 융합 1시간 후 활성화 처리 핵이식란의 극체 방출(31.4%)이 0.5시간과 2시간 후 극체 방출율(22.8%와 27.5%)보다 다소 높게 나타났으나 유의적 차이는 보이지 않았다(Table 4).

Table 2. Effect of quiescent treatment on chromatin structure of nuclear transfer embryos

Treatment*	No. of embryos fused	Chromatin clump(%)			PN(NPCC)**
		1	2	≥3	
SS	44	30(68.2)	2(4.5)	4(9.1)	8(18.2)
Confluency	45	23(51.1)	2(4.4)	14(31.1)	6(13.3)
NQ	53	25(47.2)	4(7.5)	14(26.4)	11(20.8)

\*SS: Serum starvation; NQ: Non-quiescent

\*\*PN(NPCC): Pronucleus(Non-premature chromosome condensation)

Table 3. Effect of quiescent treatment on the development of nuclear transfer embryos

Treatment*	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to		
		2-cell	8-cell	Blastocyst
SS	58	42(72.4)	20(34.5)	5(8.6) <sup>ab</sup>
Confluency	63	41(65.1)	30(47.6)	10(15.9) <sup>a</sup>
NQ	60	37(61.7)	19(31.7)	0(0.0) <sup>b</sup>

\*SS: Serum starvation; NQ: Non-quiescent

<sup>a,b</sup>Values with different superscripts differ ( $P < 0.05$ ).

Table 4. Effect of activation time on morphology of nuclear transfer embryos\*

Activation time	No. (%) of embryos fused /manipulated	Morphology of embryos(%)	
		NPB	PB
0.5 hpf	101/210(48.1)	78(77.2)	23(22.8)
1 hpf	102/255(40.0)	70(68.6)	32(31.4)
2 hpf	102/223(45.7)	74(72.5)	28(27.5)

\*Total five to six replicates.

hpf: hour post fusion, PB: polar body, NPB: non-polar body

5. 수핵란의 활성화 시간에 따른 핵이식란의 핵형 변화

융합 0.5~2시간 후에 활성화를 유기하여 2.5시간째 whole-mount를 실시하여 염색질괴를 관찰한 결과, 융합 0.5시간에 활성화를 실시한 경우는 염색체 응축 후 1개의 염색질괴를 보인 핵이식란이 69.4% (34/49)로, 1시간과 2시간 후 활성화처리의 핵이식란의 경우(48.0% 와 58.1%)에 비해 다소 높은 반면, 세포질 내 3개 이상의 비정상적인 염색질괴를 보유한 핵이식란의 비율이 10.2%(5/49)로 후자의 30.0%와 20.9%에 비해 낮게 나타났다. 그러나 0.5시간 후 활성화 처리 시 PCC가 일어나지 않는 현상(NPCC)이 20.4%(10/49)로 후자의 14.0%와 16.3%보다 다소 높게 나타났다(Table 5).

6. 수핵란의 활성화 시간에 따른 발육율

융합 후 0.5시간에 활성화 처리한 핵이식란의 2-세포기 분할율은 98%(51/52)로, 1시간과 2시간 후 활성화 처리의 분할율(61.5%와 81.4%)보다 유의적(P<0.05)으로 높게 나타났으며(Table 6), 배반포기로의 발육율도 17.3%(9/52)로, 후자의 경우(1.9%와 6.8%)보다 유의적으로 높게 나타났다(P<0.05).

본 연구는 세포의 휴면처리와 수핵란의 활성화처리시간이 소 체세포 복제란의 핵형 변화와 체외발육에 미치는 영향을 검토한 것으로, 핵이식 복제란의 극체 방출 유무, 염색체 응축 후 염색질 구조에 유의적인 영향을 미치지 않았으나, 분할을 및 배반포기로의 발육율에 영향을 미칠 수 있는 것으로 나타났다.

Donor 세포의 세포주기 단계는 핵이식의 효율에 영향을 미치는 중요한 인자로 여겨지고 있다. 세포주기 중 특히 G1기(Collas 등, 1992a; Cheong 등, 1993) 및 G0기(Wilmot 등, 1997)핵이 핵이식란의 초기화에 필수적인 것으로 여겨지고 있다. 체세포의 경우, 일반적으로 혈청기아(serum starvation) 처리나 confluency법(Boquest 등, 1999)에 의하여 세포주기를 G0/G1기에 동조할 수 있다(Campbell 등, 1996; Wilmot 등, 1997; Kato 등, 1998; Wells 등, 1999). Lacham-Kaplan 등(1999)은 소 태아섬유아세포를 3~7일간 혈청 기아 처리한 결과 60~70%가 G0/G1기에 동조되었다고 보고하였다. 돼지 태아섬유아세포의 경우도 5일간 혈청기아처리나 confluency 배양 후 세포의 약 85% 이상이

Table 5. Effect of activation time on chromatin structure of nuclear transfer embryos

Activation time	No. of treated embryos	Chromatin clump(%)			PN(NPCC)**
		1	2	≥3	
0.5 hpf*	49	34(69.4)	1(2.0)	5(10.2)	10(20.4)
1 hpf	50	24(48.0)	4(8.0)	15(30.0)	7(14.0)
2 hpf	43	25(58.1)	2(4.7)	9(20.9)	7(16.3)

\*hpf: hour post fusion

\*\*PN(NPCC): Pronuclear(non-premature chromosome condensation)

Table 6. Effect of activation time on the development of nuclear transfer embryos

Activation time	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to		
		2-cell	8-cell	Blastocyst
0.5 hpf*	52	51(98.1) <sup>a</sup>	26(50.0) <sup>a</sup>	9(17.3) <sup>a</sup>
1 hpf	52	32(61.5) <sup>b</sup>	17(32.7) <sup>b</sup>	1( 1.9) <sup>b</sup>
2 hpf	59	48(81.4) <sup>c</sup>	31(52.5) <sup>a</sup>	4( 6.8) <sup>ab</sup>

\*hpf: hour post fusion

<sup>a,b,c</sup>Values with different superscripts within the same column differ(P<0.05).

G0/G1기에 속해 있다고 보고되었다(Boquest 등, 1999). 한편, 혈청기아처리는 세포의 생존성을 저해하고 후속적인 세포주기 특성에 영향을 미칠 수 있는 것으로 여겨지고 있다(Johnson 등, 1993). 본 연구에서는 혈청기아처리 또는 confluency 방법에 따른 G0기 동조 여부를 확인하지는 않았으나, 혈청기아처리에 의한 물리적인 G0기 유도방법뿐 아니라, 세포 confluency에 의한 생리적인 방법도 체세포 핵이식에 효과적으로 이용될 수 있음이 시사되었다.

생쥐 수정란 세포의 핵이식의 경우 핵의 세포주기 단계가 G1기에 동조되지 않은 경우는 핵이식란의 활성화 후 극체상의 방출이 확인되었는데(Cheong 등, 1993), 생쥐를 제외한 동물에서는 극체상 방출이 보고되지 않았다. 그러나 소 수정란의 핵이식에서도 생쥐에서와 같은 극체상 방출이 확인되었다(Cheong 등, 1999). 본 연구에서도 핵이식란은 활성화 후 극체상의 방출이 세포의 혈청기아처리(serum starvation; SS), confluency, non-quiescence시 각각 25.4%, 35.2%, 27.2%로 다소 높게 나타났는데 이는 donor 세포의 세포주기 단계가 G0 또는 G1기가 아닌 DNA 합성기인 S기나 G2기 등에 속하여 나타나는 특징적인 현상으로 추정된다. 즉, G0기 또는 G1기 핵이 아닌, DNA 복제 중 또는 복제가 완료된 핵을 이식하므로 인해 이들 핵이 염색체 응축 후 분열되어 그 한편이 극체상으로 방출된 것으로 여겨진다(Cheong 등, 1993).

Donor 핵을 미수정란의 탈핵 세포질에 이식할 경우, 미성숙 염색체 응축(PCC)이 일어나고, PCC 이후 핵의 형태는 이식된 세포의 세포주기 단계에 따라 다양하게 나타나, 핵이식란의 발육에 영향을 미치게 된다(Cheong 등, 1993). 소 수정란 세포의 핵이식에서도 핵의 세포주기에 따라 비슷한 현상이 일어날 수 있음이 시사되었으며(Cheong 등, 1999), 본 연구에서도 체세포 핵이식 후 고정 표본을 제작한 결과, PCC 이후 염색질 구조가 다양하게 나타나는 것으로 확인되었다. 세포의 세포주기를 분석하지는 않았으나 이러한 염색질 구조의 다양한 형태는 세포의 세포주기에 기인된 것으로 사료된다. 본 실험에서는 비록 휴면처리세포와 대조구간에 극체 방출 및 PCC 이후 염색질 구조상에 유의적인 차이

는 보이지 않았지만, 대조구의 경우가 PCC 이후 1개의 염색질 구조를 나타내는 난자의 비율이 46.3%로 비교적 낮았고, 휴면처리에 의해 세포의 세포주기가 G1기나 G1기에 동조된 비율이 높아진 것으로 판단된다.

핵이식란의 활성화 시간도 핵이식란의 발육에 영향을 미칠 수 있는 것으로 보고되었다(Wakayama 등, 1998). Wakayama 등(1998)은 생쥐 체세포 핵이식에서 핵이식과 동시에, 핵이식 후 1~3시간 내 및 3~6시간에 각각 활성화 처리한 결과, 핵이식 후 일정 시간이 경과된 후 활성화하는 것이 핵이식 즉시 실시한 경우에 비하여 높은 상실배기 및 배반포기 발육율을 얻었다. Wells 등(1999)은 소 체세포 핵이식에서 핵이식 및 융합 후 4~6시간에 활성화 처리를 하므로서 비교적 높은 배반포율을 얻었으며, 산자를 생산하였다. 활성화 전에 이식된 핵을 일정시간 세포질 환경에 노출시킴으로써 핵의 remodeling 나 reprogramming을 도왔을 가능성이 시사되었다. 그러나 Kato 등(1998)은 소 체세포 핵이식에서 융합 후 활성화까지의 시간을 지연시키지 않고도 아주 높은 배반포 발육율과 산자 생산율을 보고하여 이들 보고와 차이가 있었다. 본 연구에서도 융합 후 30분 이내에 활성화 처리를 실시한 구가 1시간 또는 2시간에 실시한 경우에 비하여 다소 높은 발육율을 나타내었다. 이러한 결과는 융합과 활성화 사이의 시간을 지연시키는 것이 핵이식란의 발육에 좋은 영향을 미칠 수 있는지에 대한 보다 정확한 검토가 필요하다는 것을 시사한다.

Table 2와 5에서 공히 PCC가 일어나지 않고 1개의 전핵형태를 보이는 핵이식란의 비율이 비교적 높게 나타났는데 이는 세포 휴면처리나 세포질의 활성화 시간에 관계없이 핵과 세포질의 전기 융합 시 주어진 전기 자극이 상대적으로 높아, 융합이 진행되는 속도보다 먼저 활성화가 진행된 결과로서 나타나는 것으로 사료된다. 생쥐 핵이식의 경우, 1세포기 수정란의 탈핵 세포질에 이식한 경우는 PCC가 일어나지 않고 이식된 핵이 그대로 팽화된 상태의 전핵구조를 나타내며(Cheong 등 1992), 미수정란 세포질에 이식한 경우도 세포질 활성화가 먼저 진행된 핵이식란의 경우는 이와 동일한 현상이 확인되었다(Cheong 등, 1994).

## 적 요

본 연구는 세포의 휴면처리와 수핵란의 활성화 처리시간이 소 체세포 핵이식 복제란의 핵형 변화와 체외발육에 미치는 영향을 검토하였고, 본 연구의 결과를 요약하면 다음과 같다.

첫째, 핵이식란의 23~35%가 극체를 방출하였으며, 핵이식란의 극체 방출 유무는 핵의 휴면처리 및 활성화 처리 시간에 의해 영향을 받지 않았다.

둘째, 핵이식란의 염색질 구조는 혈청기아처리에 의해 68%가 하나의 염색질 구조를 나타낸 반면, confluency와 무처리에서는 각각 51%와 47%였고, 또한 융합 후 30분 이내에 활성화한 경우가 1시간(48%) 및 2시간(58%)에 활성화한 구에 비하여 1개의 염색질 구조를 가진 난자의 비율이 다소 증가하였다.

셋째, 핵이식란의 배반포기로의 발육율은 혈청기아처리가 8.6%, confluency구가 15.9%로 무처리구(0%)에 비하여 높았다. 또한 융합 후 30분 이내에 활성화한 핵이식란은 17.3%가 배반포기로 발육한 반면, 1시간 및 2시간에 활성화한 경우는 각각 1.9%와 6.8%로 낮았다.

본 연구의 결과 세포의 휴면처리 및 세포질의 활성화 처리시간은 소 체세포 핵이식란의 염색질 구조와 체외발육에 유의적인 영향을 미치지 않았으나, 혈청기아처리나, confluency에 의한 세포의 휴면처리와 융합 후 30분 이내에 활성화를 실시하므로써 정상적인 염색질 구조를 가진 핵이식란의 비율을 증가시켜, 결과적으로 체외발육을 증진할 수 있는 것으로 사료된다.

## 참고문헌

Boquest AC, Day BN and Prather RS. 1999. Flow cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells. *Biol. Reprod.*, 60:1013-1019.

Campbell KHS, McWhir J, Ritchie WA and Wilmut I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 380:

64-66.

Cheong HT, Park CK, Yang BK and Kim CI. 1999. Cytogenetic properties of bovine reconstituted embryos by cell cycle-controlled nuclear transfer. *Korean J. Anim. Reprod.*, 23(3):271-278.

Cheong HT, Takahashi Y and Kanagawa H. 1992. Development of mouse embryonic nuclei transferred to enucleated oocytes. *Jpn. J. Vet. Res.*, 40:149-159.

Cheong HT, Takahashi 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.

Cheong HT, Takahashi Y and Kanagawa H. 1994. Relationship between nuclear remodeling and subsequent development of mouse embryonic nuclei transferred to enucleated oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 37:138-145.

Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon A and Robl JM. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 280:1256-1258.

Collas P, Balise JJ and Robl JM. 1992a. Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 46:492-500.

Collas P, Pinto-Correia C, Ponce De Leon FA and Robl JM. 1992b. Effect of donor cell cycle stage on chromatin and spindle morphology in nuclear transplant rabbit embryo. *Biol. Reprod.*, 46:510-511.

Johnson RT, Downes CS and Meyn RE. 1993. The synchronization of mammalian cells. In *The cell cycle-A practical approach*. Eds. P Fantes and R Brooks. IRL Press, Oxford, pp. 1-24.

Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H and Tsunoda

- Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 282:2095-2098.
- Lacham-Kaplan O, Diamente M and Trounson A. 1999. Pregnancy following injection of mechanically isolated fetal fibroblast nuclei into enucleated bovine oocytes. *Theriogenology*. 51:206(Abst.).
- Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scoot AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A and Campbell KHS. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 278:2130-2133.
- Vignon X, LeBourhis D, Chesn P, Marchal J, Heyman Y and Renard JP. 1999. Development of bovine nuclear transfer embryos reconstituted with quiescent and proliferative skin fibroblasts. *Theriogenology*, 51:216 (Abst.).
- Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR and Yanagimachi R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394:369-374.
- 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.
- Westhusin ME, Levanduski MJ, Scarborough R, Looney CR and Bondioli KR. 1992. Viable embryos and normal calves after nuclear transfer into Hoechst stained enucleated demi-oocytes of cow. *J. Reprod. Fertil.*, 95:475-480.
- 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.
- 김정익, 정희태, 박춘근, 양부근. 1994. 소 체외수정란의 단일 분할구와 제핵 미수정란 융합배의 초기발생에 관한 연구. *한국가축번식학회지*, 18:121-126.

---

(접수일 : 2000. 3. 20 / 채택일자 : 2000. 4. 24)