

효율적인 돼지 복제수정란 생산에 관한 연구
I. Ethanol, Ca²⁺ Ionophore, 6-DMAP, Cycloheximide의 농도와
노출시간이 돼지난자의 활성화와 발달에 미치는 영향

위갑인 · 김광현 · 강만종 · 문승주†

전남대학교 농업생명과학대학 동물자원학부, 농업과학기술연구소

Study of Efficient Production of Cloned Embryos in Porcine
I. Effect of Ethanol, Ca²⁺ Ionophore, 6-DMAP, and Cycloheximide
Concentration and Exposure Time on Activation, Cleavage,
and *In Vitro* Development of Porcine Oocytes

Wee, G., K. H. Kim, M. J. Kang and S. J. Moon†

Department of Animal Science, Insti. of Ag. Sci. and Tech., College of Agriculture & Life Science,
Chonnam National University

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the optimal condition for produce of large quantity recipient oocytes on porcine cloned embryos. In order to determined the optimum concentration and exposure time of ethanol, Ca²⁺-ionophore, 6-DMAP and cycloheximide, *in vitro* matured oocytes were activated in TCM-199 containing various chemicals and 15% FBS. The activated oocytes were cultured in Whitten's medium containing 10% FBS at 5% CO₂.

1. When the porcine oocytes were activated with the ethanol, the best pronucleus formation, cleavage, and *in vitro* development rate were obtained in the 10% for 10 minutes, which was significantly higher than all of the other treatment(53.4%, 51.6% and 39.9%, respectively).
2. When the porcine oocytes were activated with the Ca²⁺-ionophore, the pronucleus formation, cleavage, and *in vitro* development rate were found significantly higher in the 25μM for 2min. treatment than those of other concentration and exposure time(59.7%, 62.2% and 43.9%, respectively).
3. When the porcine oocytes were activated with the 6-DMAP, the best pronucleus formation, cleavage, and *in vitro* development rate were obtained in the 2mM for 2hr~4.5hr(57.3%, 58.4% and 29.0%, respectively).
4. When the porcine oocytes were activated with the cycloheximide, result showed that pronucleus

* 이 논문은 2001년도 전남대학교 학술연구비지원에 의하여 연구되었음.

† Corresponding author : E-mail: sjmoon@chonnam.ac.kr.

formation, cleavage, and *in vitro* development rate were 52.1%, 47.7% and 31.8%, respectively, in the 5µg/ml for 4hr~6hr treatment, which was significantly higher than all of the other treatment. These results suggested that the active condition of porcine oocytes was established by optimum concentration and exposure time among different chemicals for produce of large quantity recipient oocytes.

(Key words: Ethanol, Ca²⁺-ionophore, 6-DMAP, Cycloheximide, Activation)

I. 서 론

복제 기법은 외래 유전자가 도입된 수정란 및 체세포의 핵이식을 통한 형질 전환동물의 생산, 그리고 줄기 세포의 이용 및 체세포를 통한 복제동물의 생산을 가능케 함으로써 그 산업적 이용가치가 매우 크다고 할 수 있다. 핵이식 기법에 의한 산자 생산은 1952년 Briggs와 King에 의해 양서류에서 처음으로 핵이식 산자가 보고되어 수정란의 복제 가능성이 시사되었고, 포유류에서 1981년 Illmensee와 Hoppe가 생쥐수정란을 핵이식에 이용 산자 생산에 성공 후 McGrath와 solter(1983)에 의해 고안된 원형질막 보전 조작법은 이 기술의 발전을 한층 발전시켜 이를 이용하여 면양(Willadsen, 1986), 소(Robl 등, 1987), 토끼(Stice와 Robl, 1988), 돼지(Prather 등, 1989), 산양(Yong 등, 1991) 등의 가축에서도 산자 생산이 보고되었으며 최근에는 계대배양된 줄기 세포나(Campbell 등, 1996) 체세포를 이용한 복제동물의 생산(Willmut 등, 1997; Kato 등, 1998; Wells 등, 1999)에 까지 이르게 되었다. 그러나 복제 기법에 의한 산자 생산은 임신시 또는 출산시 조기 폐사율이 높고 거대 증후군과 관절이상 등의 기형 산자의 생산이 문제시 되고 있다. 그러므로 이러한 문제점의 원인 규명과 대책수립을 통한 복제 산자의 생산효율 향상과 또한 산업적인 실용화를 위해서는 수핵란의 대량 확보, 탈핵기법의 개발, 공핵란과 수핵란의 세포주기 동기화 및 세포융합과 난할재개조건의 확립이 필요하다.

수핵란의 확보에 있어 초기에는 전핵단계의 수정란이 수핵란으로 이용되었으나 핵 이식후 분화된 핵의 비역가적 변화와 부적합한 Reprogramming으로 인한 배발달의 장애가 발생한다고 보고

되었다(DiBerardino, 1987; Modlinski와 Smorag, 1991), 따라서 DiBerardino(1992) 및 Smith와 Wilmut(1989)는 전핵 단계의 수핵란보다 핵의 재구성(nuclear remodeling)과 핵의 reprogramming이 우수한 MII 난자를 수핵란으로 이용할 수 있는 가능성을 보고하였다. 최근 보고에서는 탈핵된 MII기 난자에 인위적으로 활성화 자극을 준 다음 수핵란으로 사용할 때 활성화된 난자는 간기로 전이되어 간기에 머물러 있는 상실배기 할구와 일치되어 핵 이식시 핵막의 소실이나 염색체 응축과 같은 핵에 유해한 작용을 피함으로써(Barnes 등, 1993a; Campbell 등, 1993) 성숙된 MII기 난자를 사용할 때보다 높은 배반포 발달률을 얻었다는 보고가 있었고(Aoyagi 등, 1994; Kono 등, 1994; Stice 등, 1994, 1996) 실제 이와 같은 방법으로 면양(Cambell 등, 1993)과 소(Stice 등, 1994)에서의 산자 생산이 보고된 이후 활성화된 난자를 수핵란으로 널리 이용하고 있다. 그러나 성숙직후 난자의 에탄올 처리(Nagai, 1987), Ca²⁺-ionophore 처리(Ware 등, 1989) 및 전기자극(Ware 등, 1989; First 등, 1992) 등의 단위발생유기시 활성화를 극히 저조하기 때문에 탈핵 후 과성숙시킨 활성화 난자가 수핵란으로 이용되었으나(Bondioli 등, 1990; Sims 등, 1991; Barnes 등, 1993b; Stice 등, 1993), 난세포질의 과성숙은 세포질의 기능이상을 유발(Webb 등, 1989; Takano 등, 1993)할 수 있기 때문에 성숙 직후의 난자를 수핵란으로 이용할 수 있는 효율적인 활성화 조건의 확립이 요구되어지고 있다.

따라서 본 연구에서는 성숙 직후 돼지 난포란의 활성화를 통한 수핵란의 확보에 있어 가장 적합한 ethanol, Ca²⁺-ionophore, 6-DMAP 및 cycloheximide의 처리농도와 처리 시간을 규명하고자 실시 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난포란의 회수

본 실험에 공시된 난소는 도축장에서 도살된 돼지 중 정상생식기를 가진 암돼지로부터 난소를 적출, 35℃, 0.9%의 생리식염수에 보존하여 실험실로 운반한 후, 18-gauge 주사기를 이용 직경 3~6mm 난포로부터 난포액을 흡입하여 난포란을 채취하였다. 채취된 난포란은 실체현미경(Nikon, Japan)하에서 난구세포의 치밀도에 따라 다음과 같이 판정하였다. A등급은 난구세포로 난자의 대부분이 둘러싸여 있으며 난세포질이 균일한 것, B등급은 난세포질이 균일하나 일부분이 적게 보이는 것, 난구세포질이 거의 벗겨져 있고 전체적으로 난세포질이 어두워 보이는 것은 C등급, 난구세포층이 사방으로 퍼져 있고 난세포질이 균일하지 않은 것은 D등급으로 분류하여 A와 B등급에 해당하는 난포란만을 선별하여 체외성숙에 공시하였다.

2. 난포란의 체외 성숙

난포란의 체외성숙은 15%의 FBS(fetal bovine serum)가 함유된 Whitten's 배양액을 사용하였다. 선별된 난포란을 PMSG 10 IU/ml와 HCG 10 IU/ml의 호르몬이 첨가된 배양액을 pH 7.2로 조절, 0.2µm syringe filter로 여과한 후 4well dish에 500 µl씩 분주, mineral oil(Sigma)로 피복한 다음 각 well당 난포란 50개씩을 옮겨 39℃, 5% CO₂ 배양기에서 22시간동안 배양하였고 이후 호르몬이 첨가되지 않은 15% FBS가 함유된 Whitten's 배양액하에서 22시간 배양함으로써 총 44시간 배양시켜 체외 성숙을 유도하였다.

3. 난자의 활성화

44시간 동안 체외 성숙이 유기된 성숙 난자를 0.1% hyaluronidase에 넣어 피펫을 사용하여 난구세포를 제거하였다. 실체 현미경하에서 난세포질이 검고 균일하며, 제1극체가 뚜렷이 방출된 것만을 골라 15%의 FBS가 함유된 TCM-199 medium하에서 단위 발생을 유기하였다. Ethanol, Ca²⁺-ionophore, 6-DMAP 및 cycloheximide의 처리 농도

및 처리 시간은 각 Table에 나타내었으며, 먼저 농도를 선정한 후 농도에 따른 처리시간을 결정하였다.

4. 활성화 여부 평가

활성화 유기후 6시간 동안 체외 배양시킨 단위 발생란을 10µg/ml 농도의 hoechst 33342 (Sigma)로 20분간 염색한 후(Westhusin 등, 1992) 형광현미경하에서 진행 형성을 등을 조사하였다.

5. 단위 발생란의 체외배양

Ethanol, Ca²⁺-ionophore, 6-DMAP 및 cycloheximide에 의해 활성화된 단위 발생란은 10% FBS가 첨가된 Whitten's medium에 3회 세척한 후, 50µl씩 분주된 60mm petri dish에 각 소적당 20개씩의 난포란을 옮겨 39℃, 5%, CO₂ 배양기에서 120시간 동안 배양하여 시간의 경과에 따라 체외 발달 성적을 조사하였으며, 48시간마다 신선 배양액으로 교체하였다.

6. 통계분석

본 연구결과 얻어진 자료는 SAS package를 이용하여 분산분석을 실시하였으며, 처리구간의 유의성은 Duncan 및 LSD 방법으로 검정하였다.

III. 결 과

핵이식에 있어서 수핵란은 핵의 재구성과정이 필요한 MII기 난자보다는 활성화를 유기하여 세포내 MPF 활성을 낮게 함으로써 G0나 G1기 세포의 도입시 난할이 그대로 진행될 수 있는 난자를 수핵란으로 사용하는 것이 보다 효율적인 것으로 보고되고 있다. 따라서 본 연구는 이러한 수핵란의 대량확보를 위해 체외 성숙시킨 난포란을 ethanol, Ca²⁺-ionophore, 6-dimethylaminopurine (DMAP) 및 cycloheximide의 처리 농도와 노출시간을 달리하여 성숙직후 난포란의 활성화를 조사하였다.

Ethanol을 5%, 10%, 15%의 농도로 15% FBS가 함유된 TCM-199 배양액하에서 성숙직후 10분간 처리하여 난자의 활성화를 유기하였을 때 10%를

Table 1. Effect of ethanol, Ca²⁺-ionophore, 6-DMAP, and cycloheximide concentration on activation of porcine oocytes matured *in vitro*

Treatment	Con.	No. of treated oocytes	Number 6-h postactivation		
			1 Pronucleus	2 Pronuclei	Total activated
Ethanol (%)	5	92	32(34.8) ^b	7(7.6) ^a	39(42.4) ^b
	10	80	36(45.0) ^a	7(8.8) ^a	43(53.4) ^a
	15	71	20(28.2) ^b	1(1.4) ^a	21(29.6) ^c
CaA ¹ (μM)	5	69	26(37.7) ^b	3(4.3) ^a	29(42.0) ^b
	15	68	21(30.0) ^b	5(7.4) ^a	26(38.2) ^b
	25	67	36(53.7) ^a	4(6.0) ^a	40(59.7) ^a
6-DMAP (mM)	2	75	39(52.0) ^a	4(5.3) ^a	43(57.3) ^a
	3.5	89	37(41.6) ^b	3(3.4) ^a	40(44.9) ^b
	4.5	94	32(34.0) ^b	4(4.3) ^a	36(38.3) ^b
CHX ² (μg/ml)	5	71	33(46.5) ^a	4(5.6) ^a	37(52.1) ^a
	10	71	28(36.6) ^b	5(7.0) ^a	31(43.7) ^b
	20	76	12(15.8) ^c	4(5.3) ^a	16(21.1) ^c

¹ CaA : Ca²⁺-ionophore. ² CHX: cycloheximide.

^{a,b,c} Different superscripts denote significant differences (P<0.05).

Table 2. Effect of ethanol, Ca²⁺-ionophore, 6-DMAP, and cycloheximide concentration on cleavage and *in vitro* development of activated porcine oocytes

Treatment	Con.	No. of treated		No(%) of oocytes developed to		
		Treated	Cleaved	48hr		120hr
				2cell	4cell	Morula
Ethanol (%)	5	146	72(49.3) ^a	60(41.1) ^a	12(8.2) ^a	39(27.7) ^b
	10	139	80(57.6) ^a	69(49.6) ^a	11(7.9) ^a	53(39.9) ^a
	15	145	23(15.9) ^b	20(13.8) ^b	3(2.1) ^a	0(0.0) ^c
CaA ¹ (μM)	5	95	42(44.2) ^b	37(38.9) ^b	5(5.2) ^b	31(32.6) ^b
	15	80	39(48.8) ^b	34(42.5) ^b	5(6.3) ^b	24(30.0) ^b
	25	82	51(62.2) ^a	44(53.7) ^a	7(8.5) ^a	36(43.9) ^a
6-DMAP (mM)	2	173	101(58.4) ^a	82(47.4) ^a	19(11.0) ^a	50(29.0) ^a
	3.5	146	69(47.2) ^b	58(39.7) ^{ab}	11(7.5) ^a	35(24.2) ^{ab}
	4.5	160	63(39.4) ^b	53(33.1) ^b	10(6.3) ^a	28(17.4) ^b
CHX ² (μg/ml)	5	107	51(47.7) ^a	45(42.1) ^a	6(5.6) ^a	34(31.8) ^a
	10	108	39(36.1) ^b	35(32.4) ^b	4 (3.7) ^a	27(25.0) ^{ab}
	20	89	18(20.2) ^c	16(18.0) ^c	2(2.2) ^a	5(6.0) ^b

¹ CaA : Ca²⁺-ionophore. ² CHX: cycloheximide.

^{a,b,c} Different superscripts denote significant differences (P<0.05).

Table 3. Effect of ethanol, Ca²⁺-ionophore, 6-DMAP, and cycloheximide exposure time on activation of porcine oocytes matured *in vitro*

Treatment	Exposure time	No. of treated oocytes	Number 6-h postactivation		
			1 Pronucleus	2 Pronuclei	Total activated
Ethanol (min)	5	66	14(21.2) ^b	1(1.5) ^a	15(22.7) ^c
	10	83	39(47.0) ^a	3(3.6) ^a	42(50.6) ^c
	20	63	19(30.2) ^b	3(4.8) ^a	22(34.9) ^b
CaA ¹ (min)	2	79	37(46.8) ^a	9(11.4) ^a	46(58.2) ^a
	7	63	25(39.7) ^{ab}	3(4.8) ^a	28(44.4) ^b
	15	70	22(31.4) ^b	2 (2.9) ^a	24(34.3) ^c
6-DMAP (hr)	2	63	25(39.7) ^a	5(7.9) ^a	30(47.6) ^a
	3.5	66	27(40.9) ^a	3(4.5) ^a	30(45.5) ^a
	4.5	72	30(41.7) ^a	2(2.8) ^a	32(44.4) ^a
CHX ² (hr)	4	76	42(55.3) ^a	4(5.3) ^a	46(60.5) ^a
	6	79	48(60.8) ^a	4(5.1) ^a	52(65.8) ^a
	8	82	32(39.0) ^b	3(3.7) ^a	35(42.7) ^b

¹ CaA : Ca²⁺-ionophore. ² CHX: cycloheximide.

^{a,b,c} Different superscripts denote significant differences (P<0.05).

Table 4. Effect of ethanol, Ca²⁺-ionophore, DMAP, and cycloheximide exposure time on cleavage and *in vitro* development of activated porcine oocytes

Treatment	Exposure time	No. of treated		No(%) of oocytes developed to		
		Treated	Cleaved	48hr		120hr
				2cell	4cell	Morula
Ethanol (min)	5	66	18(27.3) ^c	14(21.2) ^c	4(6.1) ^a	5(7.7) ^b
	10	83	43(51.6) ^a	35(42.2) ^a	8(9.6) ^a	16(19.5) ^a
	20	110	41(37.2) ^b	36(32.7) ^b	5(4.5) ^a	18(16.3) ^a
CaA ¹ (min)	2	334	210(63.7) ^a	181(54.2) ^a	29(13.8) ^a	110(38.2) ^a
	7	198	101(51.0) ^b	80(40.4) ^b	18(9.1) ^a	46(26.9) ^b
	15	229	105(45.9) ^b	88(38.4) ^b	17(7.4) ^a	64(19.0) ^b
6-DMA P (hr)	2	214	125(58.4) ^a	99(46.3) ^a	26(12.1) ^a	53(24.8) ^a
	3.5	134	75(56.0) ^a	57(42.5) ^a	18(13.4) ^a	37(27.6) ^a
	4.5	139	82(59.0) ^a	59(42.4) ^a	23(16.5) ^a	30(21.5) ^a
CHX ² (hr)	4	156	101(63.6) ^a	86(55.1) ^a	15(9.6) ^a	61(39.0) ^a
	6	144	96(66.7) ^a	79(54.9) ^a	17(11.8) ^a	56(39.5) ^a
	8	127	60(47.2) ^b	55(43.3) ^b	5(3.9) ^a	25(15.1) ^b

¹ CaA : Ca²⁺-ionophore. ² CHX: cycloheximide.

^{a,b,c} Different superscripts denote significant differences (P<0.05).

첨가한 처리구가 53.4%로 5%의 42.4%와 15%의 29.6%보다 유의적으로 높은 전핵형성율을 보였고 (Table 1; $P < 0.05$) 체외배양 48시간 후 난할율 및 배발달에서도 10% 처리구가 각각 57.6%, 39.9%로 5%의 49.3%, 27.7%와 15%의 15.9%, 0.0%보다 유의적으로 높았다 (Table 2; $P < 0.05$). 10%의 농도 하에서 5분, 10분 및 20분 노출 시간에 따른 난자의 활성화와 체외 배발달을 조사한 결과, 10분간 노출한 처리구가 전핵형성율에서 50.6%로 다른 처리구 22.7%와 34.9%보다 유의적으로 높았고 (Table 3; $P < 0.05$), 난할율에서도 10분 처리구에서 높은 유의성을 나타냈으며 (51.6% vs 27.3%, 37.2%; Table 4; $P < 0.05$), 상실배까지의 체외 배발달에서는 10분과 20분 처리구가 5분 처리구보다 유의적으로 높았다 (19.5%, 16.3% vs 7.7%; Table 4; $P < 0.05$).

성숙 난자를 Ca^{2+} -ionophore 5 μ M, 15 μ M, 25 μ M 농도에서 7분간 처리하여 단위 발생 유기체 전핵형성율은 25 μ M에서 59.7%로 5 μ M과 15 μ M의 42.0%, 38.2%에 비해 유의적으로 높았고 (Table 1; $P < 0.05$), 난할율과 체외 배발달에서도 62.2%와 43.9%로 5 μ M의 58.0%, 42.0%와 15 μ M의 61.8%, 38.2%보다 유의적으로 높은 경향을 나타내었다 (Table 2; $P < 0.05$). 25 μ M의 농도로 노출 시간을 2분, 7분, 15분으로 달리하였을 경우 전핵형성율은 2분 처리구가 58.2%로 7분과 15분의 44.4%, 34.3%와 높은 유의적 차이를 보였고 (Table 3; $P < 0.05$), 난할율과 Morula까지의 체외 발달에서는 2분 처리구가 63.7%와 38.2%로 7분 처리구의 51.0%, 26.9%와 15분 처리구의 45.9%, 19.0%보다 유의적으로 높았다 (Table 4; $P < 0.05$).

6-DMAP의 농도에 따라 2시간 동안 처리하였을 때 활성화율에 있어서 2mM이 57.3%로 3.5mM의 44.9%와 4.5mM의 38.3%보다 유의적으로 높은 전핵형성율을 나타냈으며 (Table 1; $P < 0.05$), 난할율에서도 58.4%로 다른 처리구의 47.2%와 39.4%보다 높은 유의성을 보였다 (Table 2; $P < 0.05$). Morula까지의 발달에서도 2mM이 29.0%로 유의적으로 가장 높은 배발달을 보였다 (Table 2; $P < 0.05$). 2mM의 농도를 기준으로 전핵형성율과 처리 시간 별 체외 배발달을 조사하였다. 활성화율은 44.4%

~47.6% (Table 3)를 보였고 난할율은 56.0%~59%, 체외 배발달은 21.5%~27.6%를 보였으나 처리구간에는 유의성을 나타내지 못했다 (Table 4).

Cycloheximide를 5 μ g/ml, 10 μ g/ml, 20 μ g/ml 첨가하여 6시간동안 처리한 난자의 활성화율은 5 μ g/ml이 52.1%로 다른 처리구 43.7%, 21.1%보다 유의적으로 높았고 (Table 1; $P < 0.05$), 난할율과 체외 배발달에 있어서도 5 μ g/ml이 47.7%, 31.8%로 10 μ g/ml과 20 μ g/ml를 첨가했을 때 36.1%, 25.0%와 20.2%, 6.0%보다 유의적으로 높은 경향을 나타내었다 (Table 2; $P < 0.05$). 5 μ g/ml 농도에서 4시간, 6시간 및 8시간 처리시 4시간과 6시간이 각각 60.5%, 65.8%로 8시간의 42.7%보다 유의적인 높은 활성화를 보였고 (Table 3; $P < 0.05$), 난할율 및 체외 배발달도 각각 63.6%, 66.7%, 39.0%, 39.5%로 8시간 처리구의 47.2%, 15.1%보다 높은 유의성을 보였다 (Table 4; $P < 0.05$).

IV. 고 찰

미성숙 난포란의 제 1 감수분열 전기에 정지된 상태에서 호르몬의 자극이 주어지면 감수분열을 재개하여 제 2 감수분열 중기에 다시 머무르게 되며, 이는 MPF (maturation promoting factor)를 활성화시키는 결과를 가져온다. MPF는 p34^{cdc2}와 Cyclin B로 구성되어 있으며, 이들의 세포내 활성화는 c-mos 단백질 또는 CSF (cytostatic factor)의 인산화 반응에 일정 수준으로 유지되며 핵막 붕괴, 염색체 응축 및 방추사 형성 등을 통한 난자의 성숙과 제 2 감수분열중기로부터 감수분열의 진행을 막는다 (Cambell 등, 1993; Collas 등, 1993a) 이후 정자에 의한 수정이나 활성화 자극에 의한 세포질내 Ca^{2+} 의 유입 (Kline와 Kline, 1992)은 MPF의 활성화와 역의 관계를 가지며 (McDougall과 Sardet, 1995; Russo 등, 1996), 이는 곧 CaM kinase II 활성화로 인해 p34cdc2로부터 Mos와 Cyclin B가 제거 (Russo 등, 1998)됨으로써 감수분열의 재개를 의미한다. 이러한 지속적인 난자의 발달은 제 2 감수분열을 완료시키고 난할을 가능케 한다.

본 연구에서 ethanol을 이용하여 돼지 난자를 활

성화시 10%에서 10분간 처리하는 것이 가장 높았다. 이러한 결과는 소에 있어 7%에서 5분간 처리하여 활성화를 유기하였다(Nagai, 1987, 1992; Fukui 등, 1992)는 보고와는 조금 다른 차이를 보였으며 이는 종간의 차이에서 기인한 것 같다. 또한 면양에서 ethanol로 활성화처리시 94.4%의 활성화를 보인 반면(Liu 등, 1998; Loi 등, 1998), 본 실험에서는 활성율이 50%~53%로 다소 낮은 경향을 보였는데, 이는 성숙 시간의 차이인 것으로 보이며, 소에 있어 성숙직후 난자를 공시하였을 경우 50% 정도 활성화율이 낮았다(Nagai, 1987; Ware 등, 1989; Shi 등, 1993; Yang 등, 1994)는 보고와 같은 경향을 보였다. 그러나 돼지 난자의 42시간 체외 성숙후 유기된 77% 활성화율을 보인 김 등(1994)의 결과보다는 낮았다. 그리고 Ca^{2+} -ionophore는 25 μ M에서 2분간 처리가 돼지 성숙 난자의 활성화에 적합하였다. 이는 소에 있어 일반적으로 5 μ M에서 5분간 처리하고 있으나(Ware 등, 1989; Aoyagi와 Konishi, 1994; Liu 등, 1998), 본 실험에서는 25 μ M에서 2분간 처리가 더 적합한 것으로 나타났고 이는 같은 농도와 처리시간에서 80%~96%의 활성화를 유기한 Funahashi 등(1994)의 실험 방법과 유사한 결과를 보였으며 활성화를 위해서는 약 60%로 다소 낮았다. 또한 6-DMAP를 이용 난자의 활성화 유기시 2mM이 적합한 농도이며 처리시간은 2시간에서 4.5시간까지 시간에 구애받지 않았다. 이러한 결과는 농도에 있어 소(Rho 등, 1996), 면양(Loi 등, 1997), 토끼(하 등, 1998) 및 생쥐(Liu 등, 1997)의 1.9mM, 2.0mM, 3.5mM 및 4.5mM와 비슷한 경향을 나타내었으나 처리 시간에 있어서는 1시간에서 3시간까지의 위의 보고들과 다소 차이를 나타내었다. 이는 종간에 있어 전핵형성까지의 MAPK 활성의 차이에서 기인한 것으로 보인다. Cycloheximide에서는 돼지 수핵 난자의 활성화를 위해 5 μ g/ml 농도에서 4시간에서 6시간 처리가 가장 적합하였다. 이는 소 난자의 활성화에 있어 10 μ g/ml에서 6시간 처리한 결과(First 등, 1992; Presicce와 Yang, 1994b; Yang 등, 1994)와는 농도에서 차이를 보였다. 소에 있어 cycloheximide의 단독 처리시 활성화율이 20% 미만으

로 다소 낮은 것으로 보고되었으나(Liu 등, 1998), 본 실험에서는 약 60~65%로 높은 수치를 나타내었다. 이 또한 종간의 차이로 생각되며, 돼지 난자는 약한 자극에도 쉽게 활성화됨을 알 수 있었다.

본 연구에서 수행된 결과를 종합하여 보면 성숙 직후 난자의 활성화에 있어 각 화학물질들의 처리 농도 및 노출 시간은 ethanol 10%에서 10분, Ca^{2+} -ionophore 25 μ M에서 2분, 6-DMAP 2mM에서 2시간~4.5시간, 그리고 cycloheximide 5 μ g/ml에서 4시간~6시간이 적합하였다. 또한 이들 화학물질들의 처리는 44.8%~65.8%로 약 50%대의 낮은 활성화를 보였다. 이처럼 낮은 활성화를 보인 이유는 ethanol 및 calcium ionophore로 난자의 활성화를 유도하였을 경우 단순한 세포내 칼슘 증가로 Histone H1 kinase가 불활성화 되어 감수 분열이 재개되지만 일정 시간 후에는 kinase가 재활성되기 때문인 것으로 사료된다(Soloy 등, 1997; Swann과 Lai, 1997; Presicce와 Yang, 1994a,b; Collas 등, 1993a,b). 6-DMAP와 cycloheximide는 각각 단백질 합성 및 인산화 억제자로서 난자에 있어서 활성화 자극을 유도하지만 단독 처리보다는 ethanol과 calcium ionophore등과 병용처리하였을 경우 좀더 효율적인 것으로 보고되었다(Presicce와 Yang, 1994a; Lui 등, 1998). 따라서 위의 결과들을 바탕으로 난세포질내 칼슘의 지속적인 증가, CSF와 MPF의 불활성화 및 MAPK의 불활성화를 위한 칼슘증가제들의 중복처리 그리고 칼슘증가제와 단백질 합성 및 인산화 억제제들간의 병용처리를 통해 보다 효과적인 난활성화 요건의 확립이 필요하다.

V. 요약

활성화를 통한 수핵란의 대량확보를 위해 44시간동안 체외 성숙된 돼지 난자를 ethanol, Ca^{2+} -ionophore, 6-DMAP 및 cycloheximide의 화학물질들을 사용하여 단위발생을 유기한 후 그들의 가장 적합한 처리농도 및 노출 시간을 규명하였다.

1. Ethanol은 10%, 10분 처리가 전핵형성을, 난할을 및 배발달에 있어 각각 약 53.4%, 51.6%, 그리고 39.9%로 가장 적합한 조건으로 판명되

었다.

2. Ca^{2+} -ionophore 가장 적합한 난활성화 조건은 25 μM 에서 2분간 처리한 것이며, 전핵형성율, 난활율 및 배발달율은 각각 약 59.7%, 62.2%, 그리고 43.9%를 보였다.
3. 6-DMAP를 처리하여 돼지 난자의 활성화를 유기하였을 경우 2mM의 농도에서 각각 약 57.3%, 58.4% 및 29.0%의 전핵형성율, 난활율, 그리고 배발달율을 보여 가장 적합한 조건을 보였으며 2시간~4.5시간 사이의 노출에는 영향을 받지 않았다.
4. Cycloheximide는 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도가 전핵형성율 52.1%, 난활율 47.7%, 배발달율 31.8%로 가장 높은 효율을 보였고, 노출시간에서는 4시간~6시간 동안 처리하였을 때 60.5~65.8%, 63.6~66.7% 및 39.0~39.5%로 가장 적합한 조건으로 판명되었다.

이상의 결과들은 돼지 체외 성숙 난자의 활성화에 있어 각 화학물질들의 적합한 조건을 바탕으로 한 중복처리 및 병용처리 조건 확립 및 효율적인 수핵란의 확보에 기여할 수 있을 것이다.

VI. 인용문헌

1. Ayogi, 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).
2. Barnes, F. L., Collase, P., Powell, R., King, W. A., Westhusin, M., Sheperd, D. 1993a,b. Influence of recipient oocyte cell cycle stage on DNA synthesis, nuclear envelope break down, chromosome constitution, and development in nuclear transplant bovine embryos. *Mol. Prod. ReDev.* 36:33-41.
3. Barnes, F. L., Emdebrock, M., Looney, C., Powell, R., Westhusin, M. and Bondioli, K. R. 1993b. Embryo cloning in cattle: the use of *in vitro* matured oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 97: 317-320.
4. Bondioli, K. R., Westhusin, M. E. and Looney, C. R. 1990. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenology*. 33: 165-174.
5. Briggs, R. and King, T. J. 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog's eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 38:455-463.
6. Campbell, K. H. S., Ritchie, W. A. and Wilmut, I. 1993. Nuclear cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: Implication for deoxyribonucleic acid replication and development. *Biol. Reprod.* 49:933-942.
7. Campbell, K. H. S., Loi, P., Otaegui, P. J. and Wilmut, I. 1993. Cell cycle coordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 49:40-46.
8. Campbell, K. H. S., Loi, P., Cappai, P. and Wilmut, I. 1994. Improved development to blastocyst of ovine nuclear transfer embryos reconstituted during the presumptive S-phase of enucleated oocytes. *Biol. Reprod.* 50:13 85-1393.
9. Campbell, K. H. S., Mcwhir, J., Ritchie, W.A. and Wilmut, I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*. 380: 64-66.
10. Collas, P., Balise, J. J., Hofmann, G. A. and Robl, J. M. 1992a. Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 46:492-500.
11. Collas, P., Sullivian, E. J. and Barnes, F. L. 1993a. Histone H1 kinase activity in bovine oocytes following calcium stimulation. *Mol. Reprod. Dev.* 34:224-231.
12. Collas, P., Fissore, R., Robl, J. M., Sullivan, E. J. and Barnes, F. L. 1993b. Electrically induced

- calcium elevation, activation and parthenogenetic development of bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 34:212-223.
13. DiBerardino, M. A. 1980. Genetic stability modulation of metazoan nuclei transplanted into eggs and oocytes., *Differentiation*, 17:17-30.
 14. DiBerardino, M. A. 1987. Genetic potential of differentiated cells analyzed by nuclear transplantation. *Ami. Zool.* 27:623-644.
 15. DiBerardino, M. A. 1992. Nuclear reprogramming of amphibian differentiated cell. Symposium on cloning mammals by nuclear transplant (Fort Collins), pp.5-7.
 16. First, N. L., Leibfried-Rutledge, M. L., Northey, D. L. and Nuttleman, P. R. 1992. Use of *in vitro* matured oocytes 24hr of age in bovine nuclear transfer. *Theriogenology.* 37:211 (Abstract).
 17. Fukui, Y., Sawai, K., Furudate, M., Sato, N., Iwazumi, Y. and Ohsaki, K. 1992. Parthenogenic development of bovine oocytes treated with ethanol and cytochalasin B after *in vitro* maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 33: 357-362.
 18. Funahashi, H., Cantley, T. C., Stumpf, T. T., Terlouw, S. S. and Day, B. N. 1994. *In vitro* Development of *in vitro*-matured porcine oocytes following chemical activation or *in vitro* fertilization. *Biol. Reprod.* 50:1072-1077.
 19. Illmensee, K. and Hoppe, P. C. 1981. Nuclear transplantation in *Mus musculus* : Developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell.* 23:9-18.
 20. Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Koguche, H., Yasue, H., Tsunoda, Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science.* 282:2095-2098.
 21. Kline, D. and Kline, J. T. 1992. Repetitive calcium transients and the role of calcium exocytosis and cycle activation in the mouse egg. *Dev. Biol.* 149:80-89.
 22. Kono, T., Sotomaru, Y., Apno, F., Takahashi, T., Ogiwara, I., Sekizawa, F., Arai, T. and Nakahara, T. 1994. Effect of ooplast activation on the development of oocytes following nucleus transfer in cattle. *Theriogenology.* 47: 23-45.
 23. Liu, H., Fan, B. and Wang, H. 1997. Parthenogenetic activation of mouse oocytes by 6-dimethylaminopurine. *Theriogenology.* 7:208 (Abstract).
 24. Liu, L., Ju, J. C. and Yang, X. 1998a. Parthenogenetic development and protein patterns of newly matured bovine oocytes after chemical activation. *Mol. Reprod. Dev.* 49: 298-307.
 25. Loi, P., Ledda, S. and Cappai, P. 1997. Unclear dynamics and developmental potential of sheep nuclear transfer embryos treated with protein kinase inhibitor 6-dimethylaminopurine. *Theriogenology.* 47:232 (Abstract).
 26. Loi, P., Ledda, S., Fulka, Jr., Caoai, P. and Moor, R. M. 1998. Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: Effect of activation protocols. *Biol. Reprod.* 58:1177-1187.
 27. Magnuson, T., Smith, S. and Epstein, C. J. 1982. The development of monosomy 10 mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 69: 223- 236.
 28. Mannuson, T., Debrot, Sm., Dimpfl, J., Zwief, A., Zamora, T. and Epstein, C. J. 1985. The early lethality of autosomal monosomy in the mouse. *J. Exp. Morphol.* 236: 353-360.
 29. McDougall, A. and Sardet, C. 1995. Function and characteristics of repetitive calcium waves associated with meiosis. *Curr. Biol.* 5:318-328.
 30. McGrath, J. and Solter, D. 1983. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science.* 220: 1300-1302.
 31. Modlinski, J. A. and Smorag, Z. A. 1991. Preimplantation development of rabbit em-

- bryos after transfer of embryonic nuclei into different cytoplasmic environment. *Mol. Reprod Dev.* 28:361-372.
32. Nagai, T. 1987. Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes *in vitro* with ethanol. *Gamete Res.* 16:243-249.
 33. Nagai, T. 1992. Development of bovine *in vitro*-matured follicular oocytes activated with ethanol. *Theriogenology.* 37:869-875.
 34. Presicce, G. A. and Yang, X. 1994a. Nuclear dynamics of parthenogenesis of bovine oocytes matured for 20 and 40 hours and activated with combined ethanol and cycloheximide treatment. *Mol. Reprod. Dev.* 37:61-68.
 35. Presicce, G. A. and Yang, X. 1994b. Parthenogenetic development of bovine oocytes matured for 24h and activated by ethanol and cycloheximide. *Mol. Reprod. Dev.*, 38:380-385.
 36. Rho, G. J. Wu, B., Leibo, S. P. and Betteridge, K. J. 1996. Bovine parthenogenesis following various oocyte activation regimens. *Biol. Reprod.* 54(Suppl.1).
 37. Russo, G. L., Kyozuka, K., Antonazzo, L., Tosti, E. and Dale, B. 1996. Maturation Promoting Factor in ascidian oocytes is regulated by different intracellular signals between meiosis I and II. *Development.* 122:1995-2003.
 38. Russo, G. L., Wilding, M., Marino, M. and Dale, B. 1998. Ins and outs of meiosis in ascidians. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9:559-567.
 39. Shi, Z., Jiang, S. and Yang, X. 1993. synergistic effect of A23187 and cycloheximide allows effective activation of freshly matured bovine oocytes. *Theriogenology.* 38:309 (Abstract).
 40. Sims, M. M., Rosenkrans, C. F. Jr. and First, N. L. 1991. Development *in vitro* of bovine embryos derived from nuclear transfer. *Theriogenology.* 35:272(Abstract).
 41. Smith, L. C. and Wilmut, I. 1989. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development *in vitro* of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol. Reprod.* 40:1027-1035.
 42. Soloy, E., Kauka, J., Viuff, D., Smith, S. D., Calleson, S. D. and Greve, T. 1997. Time course of pronuclear deoxyribonucleic acid synthesis in parthenogenetically activated bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 57:27-35.
 43. Stice, S. L. and Keefer, C. L. 1993. Multiple generational bovine embryo cloning. *Biol. Reprod.* 48:715-719.
 44. Stice, S. L., Keefer, C. L. and Matthews, L. 1994. Bovine nuclear transfer embryos: oocyte activation prior to blastomere fusion. *Mol. Reprod. Dev.* 38:61-68.
 45. Stice, S. L., Strelchenko, N. S., Keefer, C. L. and Matthews, L. 1996. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic following nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 54:1000-110.
 46. Stice, S. L. and Robl, J. M. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 39:657-664.
 47. Swann, K. and Lai, F. A. 1997. A novel signaling mechanism for generatin Ca^{2+} oscillations at fertilization in mammals. *Bioassays.* 19:371-378.
 48. Robl, J. M., Prather, R. S., Barnes, F. L., Eyestone, W. H., Northey, B. D., Gilligan, B. and First, N. L. 1987. Nuclear transplantation in bovine embryos. *J. Anim. Sci.* 64:642-647.
 49. Ware, C. B., Barnes, F. L., Maiki-Laurila, M. and First, N. L. 1989. Age dependence of bovine oocytes activation. *Gamete Res.* 22:265-275.
 50. Wells, D. N., Misica, P. M., and Tervit, H. R. 1999. Production of clone calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol. Reprod.* 60:666-1005.
 51. Willadsen, S. M. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature.* 32:63-65.

52. Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. and Campbell, K. H. S. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 385:810-813.
53. Yang, X., Presicce, A., Morghan, L., Jiang, S. and Foote, R. H. 1994. Synergistic effect of ethanol and cycloheximide on activation of freshly matured oocyte. *Therionology*. 41: 395-403.
54. Yong, Z., Janchen, W., Jufen, Q. and Zhiming, H. 1991. Nuclear transplantation in goats. *Therionology*. 35:299(Abstract).
55. 박충생, 전병균, 이효종, 최상용. 1996. 토끼 핵이식 수정란의 체외 발달에 미치는 공핵란 세포 주기의 효과. *한국가축번식학회지*. 20(2): 143-153.
56. 하란조, 강다원, 최창용, 윤희준, 강태영, 최상용, 이효종, 박충생. 1998. Ionomycin과 6-Dimethylaminopurine이 토끼의 난자 활성화와 핵이식배 생산 효율에 미치는 효과. *한국수정란이식학회지*. 13(1):11-19.
- (접수일자: 2003. 4. 14. / 채택일자: 2003. 5. 7.)