

산양의 이종간 핵이식에 있어서 수핵난자에 따른 공여세포의 조건이 핵이식란의 체외발달에 미치는 영향

이명열·박희성[†]

진주산업대학교 동물생명과학과·동물생명산업지역협력연구센터

Effects of Recipient Oocytes and Donor Cells Condition on *In Vitro* Development of Cloned Embryos after Interspecies Nuclear Transfer with Caprine Somatic Cell

Lee, M. Y. and H. S. Park[†]

Department of Animal Science and Biotechnology & RAIRC, Jinju National University

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the developmental ability of caprine embryos after somatic cell interspecies nuclear transfer. Donor cells were obtained from an ear-skin biopsy of a caprine, digested with 0.25% trypsin-EDTA in PBS, and primary fibroblast cultures were established in TCM-199 with 10% FBS. After maturation, expanded cumulus cells were removed by vigorous pipetting in the presence of 0.3% hyaluronidase. The matured oocytes were dipped in D-PBS plus 10% FBS + 7.5 $\mu\text{g/ml}$ cytochalasin B and 0.05 M sucrose. The reconstructed oocytes were electrically fused with donor cells in 0.3 M mannitol fusion medium. After the electrofusion, embryos were activated by electric stimulation. Interspecies nuclear transfer embryos with bovine cytoplasts were cultured in TCM-199 medium supplemented with 10% FBS including bovine oviduct epithelial cells for 7~9 day. On the other hand, the NT embryos with porcine cytoplasts were cultured in NCSU-23 medium supplemented with 10% FBS for 6~8 day at 39°C, 5% CO₂ in air.

In caprine-bovine NT embryos, the cleavage(2-cell) rate was 36.8% in confluence and 43.8% in serum starvation. The developmental rate of morula- and blastocyst-stage embryos was 0.0% in confluence and 18.8% in serum starvation. In caprine-porcine NT embryos, the cleavage(2-cell) rate was 76.7% in confluence and 66.7% in serum starvation. The developmental rate of morula and blastocyst stage embryos was 3.3% in confluence and 3.0% in serum starvation, and no significant difference was observed in synchronization treatment between donor cells.

In caprine-bovine NT embryos, the cleavage(2-cell) rate of cultured donor cells was 30.8% and 17.6% in 5~9 and 10~14 passage($P<0.05$). The developmental rate of morula and blastocyst stage embryos were significantly higher($P<0.05$) in 5~9 passage(23.1%) than in 10~14 passage(0.0%) of cultured donor cells. In caprine-porcine NT embryos, the cleavage rate was significantly higher($P<0.05$) in 5~9 passage(86.7%) than in 10~14 passage(50.0%) of cultured donor cells. The developmental rate of morula and blastocyst stage embryos were 3.3 and 0.0% in 5~9 and 10~14 passage of cultured donor cells.

In caprine-bovine NT embryos, the developmental rate of morula and blastocyst stage embryos were 22.6% in interspecies nuclear transfer, 33.9% in *in vitro* fertilization and 28.1% in parthenotes, which was no significant differed. The developmental rate of morula and blastocyst stage embryos with caprine-porcine NT embryos were lower($P<0.05$) in interspecies nuclear transfer(5.1%) than *in vitro* fertilization(26.9%) and parthenotes(37.4%).

(Key words : Caprine somatic cell, Interspecies nuclear transfer, Fusion, Activation, Bovine, Porcine)

* 본 연구는 한국과학재단 지정 진주산업대학교 동물생명산업지역협력연구센터(과제번호: R12-2002-001-01004-0)의 연구비 지원에 의한 것.

[†] Corresponding author : Dept. of Animal Science & Biotechnology, Jinju National University, Jinju, 660-758, Korea. E-mail : hspark@jinju.ac.kr

I. 서 론

1997년 Wilmut 등이 체세포를 이용하여 복제면양(Dolly)을 생산한 이래 대부분의 기관 내지 조직이 공여세포로 사용가능 하게 됨으로써 기존의 할구를 이용한 핵이식기법에 비하여 공여핵의 확보가 용이해 졌을 뿐만 아니라 체세포 배양중에 유전자를 도입함으로써 형질전환 복제동물의 생산비용 절감 및 유전자의 낮은 발현율과 같은 기술적 어려움을 해결할 수가 있다. 또한 이종간 핵이식 기법은 의학적으로 치료가 어려운 환자의 체세포를 채취하여 다른 종의 탈핵된 난자와 융합하여 인간의 성체줄기세포를 생산하여 임상치료에 이용함으로써 배아복제에 필요한 인간 난자의 확보가 불필요함으로써 윤리적인 문제도 해결 가능하다. 뿐만 아니라, 자연환경의 파괴가 급속히 진행되면서 전세계적으로 180여종의 포유동물을 포함하여 5,485종의 동물이 이미 멸종되었거나 멸종위기 상태에 처해 있으며, 우리나라에서도 야생산양(*Naemorhedus caudatus*)을 비롯하여 194종이 멸종위기 또는 보호야생 동물로 지정되어 있다. 이러한 멸종위기 야생동물의 종 보존을 위한 개체증식은 개체수가 너무 적어 동종간의 교배법에 의한 번식은 불가능한 실정이다. 이종간 핵이식은 개체수가 많은 가축의 난자를 수핵란으로 활용함으로써 난자확보 문제의 해결과 수란우를 가축을 이용하면 멸종위기 야생동물의 증식 문제를 해결할 수 있는 대안이 될 수 있을 것이다.

핵이식은 1983년 McGrath와 Solter에 의하여 핵이식에 의한 복제 생쥐가 생산된 이래 소(Prather 등, 1987)를 비롯한 대부분의 포유동물에서 복제동물이 생산되었다. 그러나 Wilmut 등(1997)이 체세포를 이용한 복제면양을 탄생시킨 이후부터 핵이식 기술은 단순 복제동물의 생산에만 국한하지 않고 인간의 질병치료분야에 까지 응용범위가 확대되었다. 뿐만 아니라, Dominko 등(1999)은 소 난자에 영장류를 포함한 5종류의 체세포를 이용한 이종간 핵이식을 시도하여 이종간 핵이식란도 reprogramming이 가능함을 증명한 이래 Loi 등(2001)은 이종간 핵이식을 실시하여 면양에서 Mouflon(*Ovis ammon musimon*)의 산자를 생산하기에 까지 이르렀다.

그러나 핵이식에 의한 복제동물생산은 낮은 수태율, 거대산자, 조기노화 내지 사망, 기형산자 생산 등의 문제가 해결되지 않고 있으며, 뿐만 아니라, 미세조작기술, 공여핵과 수핵란의 세포주기조절, 공여핵의 종류, 공여핵의 분화정도, 핵이식란의 융합, 활성화, 배양조건, 핵이식란의 reprogramming 기전 등을 해결하기 위해서는 많은 연구가 진행되어

야 할 것이다. 본 연구는 인간의 질병치료 및 멸종위기동물의 종 보존 등에 활용할 수 있는 기초자료를 얻고자 재래산양(*Capra hircus*)을 공여세포로 이용하고 소와 돼지 난자를 수핵란으로 하여 이종간 핵이식을 실시하여 융합, 분할 및 체외발달을 등을 조사하여 최적의 수핵난자 및 공여세포의 조건을 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공여세포의 분리 및 배양

본 실험에 사용된 귀 유래 공여세포는 성숙한 재래산양(*Capra hircus*)으로부터 귀를 5×5mm 정도 크기로 절제하여 채취하였으며, D-PBS(Sigma, U.S.A)로 세정한 후 미세하게 세절하여 0.25% trypsin(Gibco, U.S.A)과 EDTA(Sigma, U.S.A)가 첨가된 D-PBS로 분리한 다음 10% FBS(Gibco, U.S.A)가 첨가된 TCM-199(Sigma, U.S.A) 배양액으로 중화 및 원심분리를 실시하여 세정하였다. 세정한 세포는 10% FBS가 첨가된 TCM-199로 25cm² flask(Falcon, U.S.A)에 분주하여 5% CO₂ 98~99% 습도, 39℃ 배양기 내에서 배양을 실시하였으며, 배양 후 바닥에 세포가 붙는 것을 확인 후 신선한 배양액으로 매 3일 간격으로 교체하면서 배양을 실시하였다. 계대배양은 공여세포가 flask에서 90% 이상 confluence 되었을 때 0.25% trypsin과 EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 1:2 비율로 나누어 반복해서 배양을 실시하였다.

공여세포의 동결은 10% DMSO(Sigma, U.S.A) 및 10% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 동결 보존해 두고, 핵이식에 사용할 때는 39℃ 온수에 용해하여 동결보호제를 제거한 다음 10% FBS가 첨가된 신선한 TCM-199 배양액을 첨가하여 4-well dish에 분주하여 배양기 내에서 배양을 실시하였다. 10% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 배양한 세포가 dish 바닥에 monolayer 형성이 충분히 되었을 때, 0.5% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 기아배양을 실시하였다. 기아배양은 3일 이상 실시하여 세포주기를 G0기 및 G1기로 유도한 다음 공여세포로 사용하였으며, confluence 방법은 세포를 장기 배양하여 높은 세포밀도를 만들어 주어 G0기 및 G1기로 유도한 후 핵이식에 사용하였다.

2. 수핵난자 준비

본 실험에 사용된 난포란은 도축장에서 도축되는 암소 및 모든 난소의 난포로부터 채취하였으며, 난포란은 난구세포층이 치밀하고 세포질이 양호한 난포란만을 선별하여 체외

성숙을 유도하였다.

난포란의 체외성숙은 소 난포란의 경우 25mM의 HEPES가 첨가된 TCM-199 체외성숙용 기본배양액에 10% FBS, 10 μ g/ml LH(luteinizing hormone), 1 μ g/ml estradiol 17- β 및 35 μ g/ml FSH(follicular stimulating hormone)을 첨가하였으며, 돼지 난포란은 NCSU-23에 10% FBS, 10% pFF(porcine follicular fluid), 10 μ g/ml LH(Sigma, U.S.A), 1 μ g/ml estradiol 17- β (Sigma, U.S.A), 2.5 μ g/ml FSH(Sigma, U.S.A) 및 2IU/ml hCG(human chorionic hormone)을 첨가하여 5% CO₂ 98~99% 습도, 39 $^{\circ}$ C 배양기 내에서 3시간 이상 전 배양을 시킨 다음 4 well-dish(NUNC, Denmark)에 well 당 30~40개의 미성숙 난포란을 적하하여 소 난포란은 24시간, 돼지 난포란은 46~48시간 동안 배양함으로써 체외성숙을 유도하였다.

3. 핵이식

핵이식에 사용된 피펫은 직경이 1mm인 capillary tube (Narishige, Japan)를 세척한 다음 Sigmacoat(Sigma U.S.A)로 실리콘 처리를 한 후 멸균시켜 보정용 피펫(holding pipette), 탈핵용 피펫(enucleation pipette) 및 주입용 피펫(injection pipette)을 각각 달리 제작하였으며, 피펫의 세공은 먼저 micropipette puller(Narishige, Japan)를 이용하여 피펫을 날카롭게 뽑은 다음 micropipette grinder(Narishige, Japan)로 끝부분을 경사지고 날카롭게 제작하였다. 보정용 피펫은 끝부분을 일직선이 되게 절단한 후 microforge(Narishige, Japan)로 무디게 하였으며, 이때 피펫의 외경은 160~180 μ m의 크기로 제작하였다. 탈핵과 주입용 피펫은 외경이 20~30 μ m가 되게 하였으며, 증류수 및 H₂SO₄로 세척한 다음 멸균시켜 사용하였다.

체외성숙이 이루어진 수핵난자는 0.3% hyaluronidase (Sigma, U.S.A)가 첨가된 D-PBS로 3~5분간 처리하여 난구세포를 제거하고, 0.05 M sucrose(Sigma, U.S.A) 및 10% FBS가 첨가된 D-PBS에서 세포질이 양호하고 극체가 뚜렷하게 보이는 난자만을 선별하여 사용하였다. 핵이식은 먼저 2개의 각기 다른 배양액 (60~80 μ l) 소적을 만들었으며, 첫 번째 소적에는 10% FBS가 첨가된 D-PBS 배양액에 7.5 μ g/ml의 cytochalasin B(Sigma, U.S.A)와 0.05M의 sucrose를 첨가하여 수핵난자를 넣었다. 두 번째 소적에는 기아배양을 실시한 공여세포를 필요한 양만큼 넣고 먼저 주입용 피펫에 다수의 공여세포를 흡입하여 loading한 후 수핵난자는 탈핵 및 주입용 피펫의 삽입을 용이하게 하기 위하여 zona drilling한 다음 탈핵용 피펫을 위관강내로 진입시켜 극체와 세포질을 흡입하여 제거하였다. 이때 세포질의 제거는 약 30~40% 정도의

세포질을 흡입함으로써 핵을 제거하였다. 탈핵한 난자는 곧바로 세포질이 제거된 공간에 공여세포를 세포질과 부착되게 주입함으로써 미세조작 과정을 완료하였다.

Laser system(MTM, Switzerland)을 이용한 zona drilling은 Park 등(2001)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, laser system이 부착된 도립현미경하에서 laser전용 렌즈(\times 400)로 drilling할 수핵난자의 투명대를 맞춘 다음 20~40 μ sec의 강도로 laser를 1~2회 투과시킴으로써 zona drilling을 실시하였다. 이때 drilling은 핵이식조작시 불필요한 배양액의 침투 등을 막기 위하여 zona 두께의 약 60~80% 정도의 부분적 drilling하였다. 공여세포가 주입된 수핵난자는 cytochalasin B의 충격으로부터 수핵난자를 예방하기 위하여 곧바로 조작용 배양액에서 10% FBS가 첨가된 D-PBS로 옮긴 다음 전기융합 전까지 10% FBS가 첨가된 TCM-199 및 NCSU-23 배양액에서 30분~1시간 동안 배양을 실시하였다.

4. 핵과 세포질의 융합 및 활성화

핵이식이 완료된 난자의 공여세포와 수핵난자의 세포질 융합은 전기세포융합장치(BTX, U.S.A)로 실시하였다. 이때 융합매지는 0.1mM CaCl₂ (Sigma, U.S.A) 및 0.1mM MgSO₄ (Sigma, U.S.A)가 첨가된 0.3M Mannitol(Sigma, U.S.A) 용액에 2~3분간 평형을 실시한 다음 핵이식란을 chamber로 옮겨 양전극사이에 일렬로 주입하여 핵은 전극의 "+" 극쪽으로 향하게 하고 세포질은 "-" 극쪽으로 향하게 하여 직류전류(DC)로 2.1 kv/cm, 30 μ sec, 1회 통전하여 세포융합을 유도하였다. 통전 후 핵이식란은 수핵란이 소 난자의 경우 10% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액으로, 돼지 난자는 10% FBS가 첨가된 NCSU-23 배양액으로 배양을 실시하였다. 융합여부는 배양 후 1시간 정도 경과 후에 판단하였다.

융합이 이루어진 핵이식 수정란의 활성화는 전기세포융합장치로 교류전류(AC) 5 v/mm, 5 sec, 1회와 직류전류(DC) 1.56 kv/cm, 30 μ sec, 1회 전기적 자극으로 융합란의 활성화를 유도하였다.

5. 체외수정 및 배양

소 난포란의 체외수정은 체외수정용 기본배양액인 세척용 BO(-) 용액과 수정용 BO(+) 용액을 dish에 소적을 만들어 파라핀 오일로 피복하여 CO₂ 배양기내에서 24시간 전 배양을 실시하였다. 체외수정용 정액은 도축장에서 도살되는 숫소의 정소상체 미부에서 채취한 정액을 사용하였으며, 채취한 정자는 정장내의 수정능억제물질을 제거하기 위하여 BO(-)로 2~4배 희석한 다음 2,500 rpm에서 5분간 2회 원심

분리하여 1시간동안 5% CO₂ 98~99% 습도, 39℃ 배양기 내에서 swim-up법으로 유도한 후 다시 상층액을 취하여 BO (-) 2회, BO(+) 1회 원심분리 후 배양기에서 10~15분간 정치하여 활력이 양호한 상층정자만을 채집하여 사용하였다. 이때 정자의 농도는 1~2×10⁶/ml이 되게 조정하였고 수정용 소적에 난자를 주입하여 체외수정을 유도하였으며, 수정이 완료된 수정란은 TCM-199 배양액으로 3~4회 세척하여 난구세포와 정자를 제거한 다음 10% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액과 난관상피세포의 monolayer가 형성된 24 well-dish (Corning, U.S.A)에 넣어 5% CO₂ 98~99% 습도, 39℃ 배양기 내에서 48시간마다 10% FBS가 첨가된 신선한 TCM-199 배양액으로 교환하면서 7~9일까지 체외배양을 실시하여 후기배로의 발달을 유도하였다.

돼지 난포란의 체외수정은 mTBM(tris buffer medium; Wang 등, 1997)에 2 mM caffeine(Sigma, U.S.A)을 첨가하여 dish에 소적을 만들어 파라핀 오일로 피복하여 CO₂ 배양기 내에서 24시간 전 배양을 실시하였다. 체외수정용 정액은 도축장에서 도살되는 성숙 웅돈의 정소상체 미부로부터 채취한 정액을 사용하였다. 채취한 정자는 기본배양액으로 2~4 배 희석한 다음 500 rpm에서 10분간 2회 원심분리하여 5% CO₂ 98~99% 습도, 39℃ 배양기에서 10~15분간 정치하여 활력이 양호한 상층정자만을 채집하여 사용하였다. 이때 정자의 농도는 1~2×10⁶/ml이 되게 조정하였고 수정용 소적에 난자를 주입하여 체외수정을 유도하였으며, 수정이 완료된 난자는 NCSU-23배양액으로 3~4회 세척하여 난구세포와 정자를 제거한 다음 24 well-dish(Corning, U.S.A)에 넣어 5% CO₂ 98~99% 습도, 39℃ 배양기 내에서 3일 동안은 NCSU-23 배양액으로 3일 이후부터는 10% FBS가 첨가된 신선한 NCSU-23 배양액으로 교환하면서 6~8일까지 체외배양을 실시하여 후기배로의 발달을 유도하였다.

6. 복제수정란의 체외배양

전기적 활성화를 유도한 이종간 핵이식란의 체외배양은 수핵란이 소 난자를 이용한 경우 소 난관상피세포의 monolayer가 형성된 10% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액에 넣어 5% CO₂, 98~99% 습도, 39℃ 배양기 내에서 48시간마다 10% FBS가 첨가된 신선한 TCM-199 배양액으로 교환하면서 7~9일 동안 체외배양을 실시하였으며, 수핵란이 돼지 난자를 이용한 경우는 10% FBS가 첨가된 NCSU-23 배양액에 넣어 5% CO₂, 98~99% 습도, 39℃ 배양기 내에서 48시간마다 10% FBS가 첨가된 신선한 NCSU-23 배양액으로 교환하면서 6~8일까지 체외배양을 실시하여 후기배로의 발달을

유도하였다. 염색체 분석은 본 학과 세포유전학실험실에서 실시하여 하였다.

7. 통계학적 분석

실험결과와 통계학적 분석은 SAS package를 이용하여 요인간의 유의차를 검정하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 공여세포의 세포주기 동기화 방법이 이종간 핵이식란의 체외발달에 미치는 영향

공여세포의 세포주기 동기화(G0, G1)를 유도하고자 과배양(confluence)에 의한 세포주기 동기화 및 0.5% serum을 첨가하여 혈청기아배양(serum starvation)을 실시하였을 때 이종간 핵이식란의 체외발달율은 Table 1에서 보는 바와 같다.

공여세포를 과배양과 혈청기아배양 방법으로 세포주기 동기화를 유도하여 핵이식을 실시하였을 때 수핵란이 소의 난자인 경우 과배양 방법은 53.1%가 2-세포기로 분할하였으며, 상실배와 배반포기로의 발달은 9.8%였다. 반면에 혈청기아 배양방법은 52.8%가 2-세포기로 분할하였으며, 이중 19.4%는 상실배와 배반포기로 발달하였다. 수핵란이 돼지 난자인 경우는 76.6%(과배양)와 75.6%(혈청기아배양)가 2-세포기로 분할하였으며, 상실배와 배반포기로의 발달율은 과배양과 혈청기아 배양방법이 6.5 및 6.7%로써 차이는 없었다.

체세포의 핵이식의 경우 일반적으로 혈청기아배양 처리를 이용하여 세포를 G0/G1기에 동조화 시켜 공여세포로 사용하고 있다. Lacham-Kaplan 등(1999)은 소 태아섬유아세포를 3~7일간 혈청기아배양 처리를 하였을 경우 G0/G1기로 60~70%로 동조되었다고 보고하였다. Boquest 등(1999)은 돼지 태아섬유아세포를 5일간 혈청기아배양 처리를 하였을 경우 G0/G1기로 87.5%가, confluency 세포의 경우도 85.1%(G0/G1기)가 동조 효과를 나타내어 혈청기아배양 때와 같은 수준의 G0/G1기의 세포를 얻을 수 있었다고 보고하였다. Prather 등(1999)은 돼지 유선세포를 5일간 혈청기아배양을 실시하였을 경우 G0/G1기로 85.8%가 유도되었으며, confluency 세포의 경우도 G0/G1기로 85.6%의 동조 효과를 나타내어 혈청기아처리 때와 같은 수준의 G0+G1의 세포를 얻을 수 있다고 보고하였다. Cibelli 등(1998)은 분열중의 세포도 56%가 G1기에 속해 있다고 하였으며, 이들 태아섬유아세포를 이용한 핵이식에서 12%의 배반포기 발달율을 얻었

Table 1. Effects of synchronization of the cell cycle of donor somatic cells on *in vitro* development of caprine interspecies nuclear transferred embryos

Recipient oocytes	Donor cells	No. of oocytes fused (%)	No. of oocytes developed to (%)		
			2-cell	8-cell	Morula and blastocyst
Bovine	Confluence	32/ 70(45.7)	17(53.1)	7(21.9)	3(9.8)
	Serum starvation	36/ 78(46.2)	19(52.8)	8(22.2)	7(19.4)
Porcine	Confluence	77/156(55.6)	59(76.6)	19(24.7)	5(6.5)
	Serum starvation	45/ 94(47.9)	34(75.6)	10(22.2)	3(6.7)

* No significant difference on the same column($P<0.05$).

으며, 이식후 형질전환 복제송아지를 생산하여 G1기의 세포에 의해 산자생산이 가능하다고 하였다. 뿐만 아니라, Wakayma 등(1998)은 생쥐 난구세포를 인위적으로 세포주기 동기화를 실시하지 않고 핵이식을 실시하여 복제생쥐를 생산하여 공여세포의 인위적 세포주기 동기화를 유도하지 않아도 체세포 핵의 초기화가 가능하다고 보고하였다. 홍 등(2001)도 돼지 귀세포 유래 공여세포를 돼지의 수핵난자에 핵이식을 실시하여 융합율과 분할율이 46.1 및 50.7%였으며, 융합율은 혈청기아배양방법과 차이가 없으나, 분할율은 confluence 방법이 혈청기아배양 방법보다 낮다고 보고하였다.

이상의 결과에서 보면 세포주기 동기화는 혈청기아 배양 방법이 널리 이용되는 방법이나, 아직까지 적정 배양기간, 생존성 등이 보완되어야 하며, confluence 방법은 보다 앞으로 세밀한 연구 검토가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

2. 공여세포의 계대배양이 핵이식란의 체외발달에 미치는 영향

공여세포를 10% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 계대배양을 실시하여 증식시켰으며, 계대배양에 따른 이종간

핵이식란의 체외발달율은 Table 2에서 보는 바와 같다.

공여세포를 5~9 및 10~14 passage를 사용하였을 때 수핵란이 소 난자의 경우 2-세포기로의 분할율은 48.8 및 40.9%로써 차이가 없었다. 상실배와 배반포기로의 발달율은 5~9 passage 공여세포가 24.4%였으나, 10~14 passage 공여세포는 4.5%였다($P<0.05$). 돼지 난자의 경우는 5~9 및 10~14 passage 공여세포를 사용하였을 때 2-세포기로의 분할율은 77.8% 및 59.4%로써 5~9 passage가 유의적($P<0.05$)으로 높게 나타났다. 상실배와 배반포기는 5~9 passage는 7.8%였으나, 10~14 passage는 전혀 발달이 되지 않았다.

Hill 등(2001)은 소 태아섬유아세포유래 공여세포를 2 및 18 passage 계대배양 세포를 이용한 핵이식란의 융합율은 60 및 55%로 었으며, 배반포기로의 발달율도 33 및 42%로써 차이가 없다고 하였다. 홍 등(2001)도 돼지 귀세포유래 공여세포를 1~14 passage 세포를 사용하였을 때 융합율과 분할율은 51.7~53.0% 및 42.7~46.8% 수준으로 차이가 없다고 하였다. Rho 등(2000)은 8~16 및 17~32 passage 배양한 소 태아섬유아세포유래 공여세포를 이용한 핵이식란의 융합율은 63.2

Table 2. Effects of the cell passages of donor somatic cells on *in vitro* development of caprine interspecies nuclear transferred embryos

Recipient oocytes	Passages of donor cell	No. of oocytes fused (%)	No. of oocytes developed to (%)		
			2-cell	8-cell	Morula and blastocyst
Bovine	5 ~ 9	41/ 90(45.6)	20(48.8) ^a	11(26.8)	10(24.4) ^a
	10 ~14	22/ 48(45.8)	9(40.9) ^a	3(13.6)	1(4.5) ^b
Porcine	5 ~ 9	90/178(50.6)	70(77.8) ^a	24(26.7)	7(4.5) ^a
	10 ~14	32/ 67(47.8)	19(59.4) ^b	7(21.9)	0(0.0) ^a

* Values with different superscripts were significantly different($P<0.05$).

및 70.4%로써 차이가 없었으나, 배반포기로의 발달율은 18.9 및 10.5%로 유의적($P < 0.05$)인 차이가 있다고 보고하였다. Dinnyes 등(2001)은 토끼에서 3~9 및 10~15 passage 계대배양한 공여세포를 이용한 핵이식란의 융합율은 58 및 64%로써 차이가 없었으나, 분할율은 53 및 63%로써 계대배양 횟수가 분할율에 영향을 미친다고 하였다.

본 연구결과와 상이한 성적은 동물종의 차이, 공여세포의 종류, 융합과 활성화 방법 등의 차이에 기인하는 것으로 생각된다. 이상의 결과를 볼 때 이종간 핵이식에서 공여세포의 계대배양에 관한 연구가 없어서 직접적으로 비교하기는 어려우나, 공여세포를 장기간 계대배양을 실시하면 배양조건에 따라서 세포의 노화, 염색체 이상 등의 유발로 인하여 융합, 분할 및 배반포기로의 발달율에 영향을 미칠 수 있을 것으로 생각된다.

3. 이종간 핵이식 수정란의 체외발달

이종간 핵이식란의 체외배양은 수핵란이 소의 경우 난관상피 세포의 monolayer가 형성된 10% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액에서, 돼지는 10% FBS가 첨가된 NCSU-23 배양액으로 7~9일간 체외배양을 실시하여 상실배 또는 배반포기로의 발달율은 Table 3에서 보는 바와 같다.

이종간 핵이식란의 체외발달에 있어서 수핵란이 소 난자의 경우 상실배와 배반포기로의 발달율이 22.6%로써 체외수정란(33.9%)과 차이가 없었으며, 돼지 난자의 경우는 이종간 핵이식란이 5.1%로써 체외수정란 26.9%보다 유의적($P < 0.05$)으로 낮게 나타났다.

Tao 등(1999)은 돼지의 태아섬유아세포를 이용한 핵이식란을 NCSU-23 배양액으로 배양을 실시하였을 때 상실배 및 배반포기로의 발달율은 44.4%였으며, 이것은 본 연구에서 소 난자를 이용한 이종간 핵이식란의 경우 상실배 및 배반

포기로 발달율 23.5% 및 돼지 난자를 이용한 이종간 핵이식란의 10.8% 보다는 높은 성적이다. Dominko 등(1999)은 소, 양, 돼지, 원숭이 및 흰쥐의 피부 섬유아세포를 이용하여 수핵란을 소로 핵이식을 실시하여 CR1aa 배양액으로 배양을 실시하였을 때 배반포기로의 발달율은 각각 17.3, 13.9, 14.3, 16.6 및 0.0%로 소, 양, 돼지, 원숭이에서는 차이가 없었으나, 흰쥐의 경우는 전혀 발달하지 않았다고 보고하였다. Saikhum 등(2002)은 Buffalo의 태아섬유아세포, 난구세포, 난관세포를 공여세포로 이용하여 소의 난자에 이종간 핵이식을 실시하여 체외배양을 실시하였을 때 배반포기로의 발달율은 각각 34, 20 및 14%로써 태아섬유아세포가 가장 높았다고 보고하였다. Chen 등(2002)은 panda-rabbit 와 cat-rabbit의 이종간 핵이식 후 배반포기로의 발달율은 18.5 및 5.2%로써 공여세포와 수핵난자로 사용한 동물종간에 차이가 있다고 하였다.

이상의 결과로 볼 때 이종간 핵이식란은 체외수정란에 비하여 상실배 및 배반포기로의 발달율이 낮게 나타났으며, 산양의 이종간 핵이식시 수핵란은 돼지보다는 소를 사용하는 게 좋을 것으로 생각된다. 이종간 핵이식에 있어서 수핵란, 공여세포, 융합, 활성화 및 배양조건 등 아직 초보 수준에 있으며, 앞으로 보다 많은 연구를 통하여 이러한 문제들이 해결되면 멸종위기 상태에 있는 동물들의 종 보존에도 활용이 가능할 것으로 생각된다.

IV. 요약

본 연구는 회귀·멸종위기 동물의 보존 및 인간의 질병치료기술 응용 등에 이용하기 위하여 이종간 핵이식란의 생장성 향상에 기여하기 위한 기초연구로서 수핵난자 및 공여세

Table 3. *In vitro* development of cloned embryos by interspecies nuclear transfer with caprine somatic cells

Recipient oocytes	Embryos	No. of cleaved oocytes (%)	No. of oocytes developed to (%)		
			4-cell	8-cell	Morula and blastocyst
Bovine	IVF	121	78(64.5)	61(50.4)	41(33.9) ^a
	INT**	51	32(62.7)	22(43.1)	12(23.5) ^a
Porcine	IVF	145	86(59.3)	72(49.7)	39(26.9) ^a
	INT**	74	58(78.4)	25(33.8)	10(10.8) ^b

* Values with different superscripts were significantly different($P < 0.05$).

** INT : Interspecies nuclear transfer.

포의 조건이 융합율, 분할율 및 체외발달에 미치는 영향을 밝히고자 각종 요인들을 조사하였다. 공여세포의 준비는 산양의 귀세포를 채취하여 0.25% Trypsin-EDTA의 처리로 세포를 분리, 배양하여 사용하였다. 핵이식은 성숙된 난자의 극체 및 전핵을 laser system으로 투명대를 drilling하여 제거하고 준비된 공여세포를 핵이 제거된 난자에 주입하여 전기적 자극으로 융합을 실시하여 융합된 난자는 전기적 자극으로 활성화를 유도하였다. 활성화가 이루어진 복제수정란은 수핵란이 소난자의 경우 monolayer가 형성된 10% FBS가 첨가된 TCM199 배양액에서 7~9일 동안 체외배양 하였으며, 수핵란이 돼지의 경우 10% FBS가 첨가된 NCSU-23 배양액으로 6~8일 동안 체외배양을 실시하여 배반포기로 유도하였다. 본 연구에서 얻은 결과를 요약하면 다음과 같다.

공여세포를 과배양과 혈청기아배양 방법으로 세포주기 동기화를 유도하여 핵이식을 실시하였을 때 수핵란이 소의 난자인 경우 과배양 방법은 36.8%가 2-세포기로 분할하였으나, 상실배와 배반포기로의 발달은 전혀 없었다. 반면에 혈청기아 배양방법은 43.8%가 2-세포기로 분할하였으며, 이중 18.8%는 상실배와 배반포기로 발달하였다. 수핵란이 돼지 난자인 경우는 76.7%(과배양)와 66.7%(혈청기아배양)가 2-세포기로 분할하였으며, 상실배와 배반포기로의 발달율은 과배양과 혈청기아 배양방법이 3.3 및 3.0%로써 차이는 없었다. 공여세포를 5~9 및 10~14 passage를 사용하였을 때 수핵란이 소 난자의 경우 2-세포기로의 분할율은 30.8 및 17.6%로써 차이가 없었다. 상실배와 배반포기로의 발달율은 5~9 passage 공여세포가 23.1%였으나, 10~14 passage 공여세포는 전혀 발달이 되지 않았다($P < 0.05$). 돼지 난자의 경우는 5~9 및 10~14 passage 공여세포를 사용하였을 때 2-세포기로의 분할율은 86.7% 및 50.0%로써 5~9 passage가 유의적($P < 0.05$)으로 높게 나타났으며, 상실배와 배반포기는 5~9 passage는 3.3%였으나, 10~14 passage는 전혀 발달이 되지 않았다. 이종간 핵이식란의 체외발달에 있어서 수핵란이 소 난자의 경우 상실배와 배반포기로의 발달율이 22.6%로써 체외 수정란(33.9%) 및 단위발생란(28.1%)과 차이가 없었으며, 돼지 난자의 경우는 이종간 핵이식란이 5.1%로써 체외수정란 및 단위발생란의 26.9 및 37.4% 보다 유의적($P < 0.05$)으로 낮게 나타났다.

이상의 실험결과로 보아 산양의 체세포를 이용한 이종간 핵이식 복제수정란의 생산을 위하여 수핵란으로 소와 돼지를 사용하여 복제수정란의 발달을 확인할 수 있었으며, 이종간 핵이식에 있어서 수핵란, 공여세포, 융합, 활성화 및 배양 조건 등 아직 초보 수준에 있으며, 앞으로 보다 많은 연구를

통하여 이러한 문제들이 해결되면 멸종위기 상태에 있는 동물들의 종 보존에도 활용이 가능할 것으로 생각된다.

V. 인용문헌

1. Boquest, A. C., Day, B. N. and Prather, R. S. 1999. Flow cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells. *Biol. Reprod.* 60 : 1013-1019.
2. Chen, D. Y., Wen, D. C., Zhang, Y. P., Sun, Q. Y., Han, Z. M., Liu, Z. H., Shi, P., Li, J. S., Xiangyu, J. G., Lian, L., Kou, Z. H., Wu, Y. Q., Chen, Y. C., Wang, P. Y. and Zhang, H. M. 2002. Interspecies implantation and mitochondria fate of panda-rabbit cloned embryos. *Biol. Reprod.* 67 : 637-642.
3. Cibelli, J. B., Stice, S. L., Golueke, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F. A. and Robl, J. M. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280 : 1256-1258.
4. Dinnyes, A., Dai, Y., Barber, M., Liu, L., Xu, J., Zhou, P. and Yang, X. 2001. Development of cloned embryos from adult rabbit fibroblasts: Effect of activation treatment and donor cell preparation. *Biol. Reprod.* 64 : 257-263.
5. Dominko, T., Mitalipova, M., Haley, B., Beyhan, Z., Memili, E., McKusick, B. and First, N. 1999. Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biol. Reprod.* 60 : 1496-1502.
6. Hill, J. R., Winger, Q. A., Burghardt, R. C. and Westhusin, M. E. 2001. Bovine nuclear transfer embryo development using cells derived from a cloned fetus. *Ani. Reprod. Sci.* 67 : 17-26.
7. 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(abstr).
8. Loi, P., Ptak, G., Barboni, B., Fulka, J. Jr., Cappai, P. and Clinton, M. 2001. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nature Biotechnology* 19 : 962-964.
9. McGrath, J. and Solter, D. 1983. Nuclear transplantation in the mouse embryo on micromanipulation and cell fusion.

- Science 220 : 1300-1302.
10. Park, H. S., Jin, J. I., Hong, S. P., Lee, J. S. and Jung, J. Y. 2001. Effect of laser drilling on blastocyst hatching and pregnancy rates from *in vitro* produced cattle embryos. *Theriogenology* 55 : 352(abstr).
 11. Prather, R. S., Boquest, A. C. and Day, B. N. 1999. Cell cycle analysis of cultured porcine mammary cells. *Cloning* 1 : 17-24.
 12. Rho, S. H., Shim, H. S., Hwang, W. S. and Yoon, J. T. 2000. *In vitro* development of green fluorescent protein (GFP) transgenic bovine embryos after nuclear transfer using different cell cycles and passages of fetal fibroblasts. *Reprod. Fertil. Dev.* 12 : 1-6.
 13. Saikhun, J., Pavasuthipaisit, K., Jaruanuwan, M. and Kitiyanant, Y. 2002. Xenonuclear transplantation of buffalo (*Bubalus bubalis*) fetal and adult somatic cell nuclei into bovine (*Bos indicus*) oocyte cytoplasm and their subsequent development. *Theriogenology* 57 : 1829-1837.
 14. Tao, T., Machaty, Z., Boquest, A. C., Day, B. N. and Prather, R. S. 1999. Development of pig embryos reconstructed by microinjection of cultured fetal fibroblast cells into *in vitro* matured oocytes. *Ani. Reprod. Sci.* 56 : 133-141.
 15. Wakayama, T., Perry, A. C. F., Zuccotti, M., Johnson, K. R. and Yanagimachi, R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394 : 369-373.
 16. 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.
 17. 홍승표, 박준규, 이명열, 이지삼, 정장용, 박희성, 2001. 돼지 공여세포의 조건이 핵이식 수정란의 체외발달에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지* 16 : 213-221. (접수일자: 2004. 2. 4. / 채택일자: 2004. 2. 28.)