

## 재래산양에 있어서 핵이식란의 융합조건이 융합 및 체외발달에 미치는 영향

박희성<sup>†</sup> · 김태숙 · 이윤희 · 정수영 · 이명열 · 홍승표 · 박준규 · 김충희 · 정장용

진주산업대학교 동물생명과학과 · 동물생명산업지역협력연구센터

### 초 록

본 연구는 재래산양의 핵이식을 실시하여 공여세포의 조건, 전기적 세기 및 융합횟수 등이 융합율과 체외발달에 미치는 영향을 조사하여 최적의 융합조건을 확립하고자 실시하였다. 공여세포는 귀 유래 섬유아세포와 태아 유래 섬유아세포 2종류를 분리 배양하여 사용하였으며, 수핵란의 채취는 성숙한 미경산 재래산양에 과배란을 유도하여 hCG 투여 후 제 35시간째에 외과적인 방법으로 *in vivo* (체내성숙)난자는 난관을 관류하는 방법으로 회수하고 *in vitro* (체외성숙)난자는 난포로부터 흡입하여 난포란을 채취하여 약 22시간 체외성숙을 실시하였다. 수핵난자는 난구세포를 제거한 다음 0.05 M sucrose를 처리하여 세포질이 양호하고 극체가 뚜렷하게 보이는 난자만을 선별하여 핵이식을 실시하였다. 핵이식란의 융합은 전기자극방법으로 융합을 실시하였으며, 핵이식 조작 후 약 3시간 동안 전배양을 실시한 다음 활성화를 유도하였다. 복제수정란은 0.8% BSA가 첨가된 mSOF 배양액으로 6~7일 동안 체외 배양을 실시하였다. 귀 유래 섬유아세포를 공여세포로 사용하였을 때 융합율은 60.4%로서 태아 유래 섬유아세포의 40.3%보다는 높게 나타났다. 분할율에 있어서는 귀 유래 섬유아세포와 태아 유래 섬유아세포가 각각 47.6 및 48.2%로서 차이가 없었다. 2.40~2.46 kV/cm로 전기자극을 주었을 때 융합율은 43.8%로서 1.30~1.40 kV/cm(26.7%)와 2.30~2.39 kV/cm (34.8%)가 높게 나타났으며, 융합이 이루어진 핵이식란의 분할율은 82.9(1.30~1.40 kV/cm), 43.8(2.30~2.39 kV/cm) 및 51.8%(2.40~2.46 kV/cm)로서 전기자극의 세기에 따른 유의적( $p < 0.05$ )인 차이는 없었다. 전기융합을 1회 실시하였을 때 *in vivo* 난자는 43.5%로서 *in vitro* 난자의 23.6%보다 유의적으로 높게 나타났으며, 2회 실시하였을 때는 55.7(*in vivo*) 및 39.2%(*in vitro*)로 *in vivo*에서 높게 나타났다. 3회 자극을 주어 전체 융합율은 *in vivo*가 66.1%로서 *in vitro*의 52.8%보다는 유의적으로 높게 나타났다.

(주제어 : Somatic cell, Nuclear transfer, Fusion, Activation, Cleavage, *In vivo*, Caprine)

### 서 론

오늘날 생명공학기술의 눈부신 발달로 인하여 우리나라 재래산양은 그 모델동물로서 번식·생리학적으로 매우 중요한 가치를 지니고 있을 뿐만 아니라 고유의 유전자원 보존 측면에서도 산양복제와 같은 다양한 연구를 통하여 개량 체계의 확립이 절실히 요구된다.

핵이식 기법은 유전적으로 능력이 우수한 개체를 단기간 내 대량생산이 가능함으로 가축의 개량 및 번식에 가장 유용한 수단 중의 하나다. 뿐만 아니라 희귀·멸종위기 동물의 보존과 형질전환동물의 생산을 통한 인간 대체장기이식용 동물생산, 치료용 생체물질생산, 질환모델동물의 생산과 줄기세포의 이용으로 유전자 치료 등의 의학적 가치를 지닌 동일한 개체를 무한정 복제가 가능함으로 인간의 질병치료기술에 응용이 가능하다.

핵이식은 1983년 McGrath와 Solter에 의하여 핵이식에 의한 복제 생쥐가 생산된 이래 Wilmut 등(1997)이 체세포를 이용한 복제면양을 탄생시킨 이후부터 핵이식 기술은 단순 복제동물의 생산에만 국한하지 않고 인간의 질병치료

분야에 까지 응용범위가 확대되었다. 재래산양은 체구가 작고 온순하므로 다루기 쉽고 임신기간이 짧은 것 등 생명공학 연구에 매우 적합한 동물임에도 불구하고 이렇다할 연구결과가 없었다. 근년에 와서 산양의 형질전환을 통한 물질생산 및 체세포 핵이식에 의한 산양복제에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있으나 아직까지 그 예는 적은 편이다(Zou 등, 2002; Keefer 등, 2002; Reggio 등, 2001; Behboodi 등, 2004; Echelard 등, 2004; Melican 등, 2004).

핵이식란의 융합은 전기자극에 의한 융합법이 이용되어 왔는데 이 방법은 간편하면서도 융합율이 높기 때문에 일반적으로 널리 사용하고 있는 방법이다(Onishi 등, 2000). 그러나 전기융합방법은 공여세포와 수핵난자의 종류에 따라서 융합조건을 달리하여야 하며, 핵이식란의 분할을 유도하기 위해서는 융합된 난자의 인위적 활성화가 거의 동시에 이루어져야 한다(Wilmut 등, 1997; Shiga 등, 1999; Miyoshi 등, 2000). 우리나라 재래산양의 핵이식에 관한 연구는 거의 없으며, 수핵란의 확보, 핵이식란의 융합, 활성화, 배양조건 등의 확립이 시급한 실정이다.

본 연구는 우량가축의 증식, 인간의 질병치료 및 멸종위기동물의 종 보존 등에 활용할 수 있는 기초자료를 얻고자

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

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

재래산양의 핵이식을 실시하여 공여세포의 조건, 전기적 세기 및 융합횟수 등이 융합율과 체외발달율에 미치는 영향을 조사하여 최적의 융합조건을 확립하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 공여세포의 배양 및 보존

공여세포는 귀 유래 섬유아세포와 태아 유래 섬유아세포 2종류를 분리 배양하여 사용하였다. 귀 유래 섬유아세포는 성숙한 재래산양(*Capra hircus*)으로부터 귀를 5×5 mm 정도 크기로 절제하여 채취하였으며, 미세하게 세절하여 0.25% trypsin-EDTA(Sigma Chemical Co., U.S.A)가 첨가된 D-PBS 로 분리한 다음 10% FBS가 첨가된 TCM-199 로 25 cm<sup>2</sup> flask (Falcon, U.S.A)에 분주하여 5% CO<sub>2</sub> 98~99% 습도, 39℃ 배양기내에서 계대배양을 실시하였다. 태아 유래 섬유아세포는 임신 제 30일령의 태아로부터 세포를 분리배양하여 귀 유래 섬유아세포와 동일한 방법으로 계대배양을 실시 하여 사용하였다. 배양한 공여세포의 동결은 10% DMSO (Sigma) 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. 세포가 dish 바닥에 monolayer 형성이 충분히 되었을 때, 0.5% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 3~5일간 기아배양을 실시하였다.

### 공시동물

공시동물은 체중 15~25 Kg 전후의 성숙한 미경산 재래산양으로서 진주 근교의 사육농가로부터 임상적으로 건강하다고 인정되는 것을 구입하여 인근의 임대농장에서 사육하면서 내·외부 기생충 구제와 일정기간 동안 적응시킨 다음 본 연구에 사용하였다. 사양관리는 일반 관행법에 따라 사육되되 농후사료는 추가 급여하였으며, 식염과 물은 자유섭취토록 하였다.

### 과배란 유도

Oocyte의 회수를 위하여 과배란유기를 실시하였으며, 먼저 발정동기화를 위하여 progestagen 제제인 CIDR(Progesterone 0.3 g, Eazi Breed, InterAg, New Zealand)를 10일간 질내에 삽입하고 과배란 처리는 FSH(Follitropin-V, Vetrepharm, Canada)를 CIDR 삽입 8, 9, 10일째에 12시간 간격으로 70 mg을 감량법으로 투여하였으며, PMSG(Folligon, Intervet, Netherland)의 경우는 1,000 IU를 CIDR 삽입 제 8일째에 1회 투여하였다. PGF2α(Lutalyse, Upjohn, U.S.A.)는 8일째에 FSH 또는 PMSG와 함께 10 mg 투여하고 CIDR 제거는 10일째에 제거와 동시에 hCG(Chorulon, Intervet, Netherland) 400 IU를 투여하여 과배란을 유도하였다.

### Oocyte의 회수

난관으로부터 성숙난자(*In vivo*)의 회수는 외과적인 방법

으로 난관에서 관류방법으로 난자를 회수하였다. 먼저 과배란 처리한 산양을 약 24시간 절식시킨 다음 2% xylazine(Rompun, Bayer, Korea)을 체중 kg당 0.2 mg씩 근육주사하여 진정마취시키고, HCl ketamine(Ketamine, Yuhan, Korea)을 체중 kg당 11 mg씩 근육주사하여 마취를 유도하였다. 마취가 도입된 산양은 복정중선을 절개하여 난관과 난소를 체외로 노출시킨 다음 배란점을 확인한 후 난자의 회수를 위하여 catheter(Tom Cat, Kendall Co., U.S.A.)를 난관누두부로 삽입하여 5~10 ml의 M2(Sigma) 배양액을 난관 자궁접합부 쪽에서 주입하여 관류하였다.

난포란(*In vitro*)의 회수는 성숙난자를 회수한 다음 난소의 난포로부터 난포란을 회수하였다. 22G needle이 부착된 5 ml 주사기로 난포액과 난포란을 흡입하여 회수하였다.

### 회수란의 검사 및 분류

회수란은 5% GS(Sigma)가 첨가된 신선한 M2 배양액으로 4~5회 세척한 후 난구세포의 부착정도와 세포질의 충실도에 따라 박 등(2000)의 방법에 준하여 다음과 같이 4등급으로 분류하여 3등급 이상의 난자만 사용하였다.

Grade I. 난구세포가 2~3층 이상이고 세포질이 균일한 것  
Grade II. 난구세포가 1~2층이고 세포질이 균일한 것  
Grade III. 난구세포가 1층 또는 부분적으로 나화된 것  
Grade IV. 난구세포가 나화되고 세포질이 퇴화된 것

### 수핵난자의 체외성숙

회수한 난포란의 체외성숙은 25 mM의 HEPES가 첨가된 TCM-199 체외성숙용 기본배양액에 10% GS(goat serum), 10 μg/ml LH(luteinizing hormone), 1 μg/ml estradiol 17-β 및 5 μg/ml FSH(follicular stimulating hormone)을 첨가하여 5% CO<sub>2</sub> 98~99% 습도, 39℃ 배양기 내에서 약 12시간 정도 전 배양을 시킨 다음 4 well-dish(NUNC, Denmark)에 well 당 15~20개의 미성숙 난포란을 적하하여 22~24 시간동안 배양함으로써 체외성숙을 유도하였다.

### 핵이식

핵이식용 피펫의 제작은 직경이 1 mm인 capillary tube (Narishige, Japan)를 이용하여 보정용 피펫(holding pipette)은 외경이 160~180 μm, 주입용 피펫(injection pipette)은 외경이 20~30 μm가 되게 제작하여 멸균시켜 사용하였다.

체외성숙이 이루어진 수핵난자는 0.3% hyaluronidase (Sigma)가 첨가된 D-PBS로 3~5분간 처리하여 난구세포를 제거한 다음 0.05 M sucrose(Sigma)를 처리하여 세포질이 양호하고 극체가 뚜렷하게 보이는 난자만을 선별하여 핵이식에 사용하였다. 핵이식 조작시 수핵난자는 M2(Sigma)배양액에 7.5 μg/ml의 cytochalasin B(Sigma)와 0.05 M의 sucrose를 첨가하여 탈핵을 실시하였으며, 공여세포는 먼저 주입용 피펫에 흡입 loading 하였다. 수핵난자는 탈핵 및 주입용 피펫의 삽입을 용이하게 하기 위하여 zona drilling한 다음 탈핵용 피펫을 위관강내로 진입시켜 극체와 세포질(약 30~40% 정도)을 흡입하여 제거하였다. 탈핵한 난자는 곧바로 세포질이 제거된 공간에 공여세포를 세포질과 부착되게 주입함으로써 미세조작 과정을 완료하였다.

Laser system(MTM, Switzerland)을 이용한 zona drill-

ling은 Park 등(2001)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, laser system이 부착된 도립현미경하에서 laser 전용 렌즈( $\times 400$ )로 drilling할 수핵난자의 투명대를 맞춘 다음 20~40  $\mu$ sec의 강도로 laser를 1~2회 투과시킴으로써 zona drilling을 실시하였으며, 이때 drilling은 핵이식조작시 불필요한 배양액의 침투 등을 막기 위하여 zona 두께의 약 60~80% 정도의 부분적 drilling을 하였다.

**핵과 세포질의 융합 및 활성화 처리**

핵이식이 완료된 난자의 공여세포와 수핵난자의 세포질 융합은 전기세포융합장치(BTX, U.S.A)로 실시하였다. 이때 융합배지는 0.05mM CaCl<sub>2</sub>(Sigma), 0.1 mM MgSO<sub>4</sub>(Sigma) 및 0.5 mM Hepes(Sigma)가 첨가된 0.3M Mannitol(Sigma) 용액을 사용하였으며, 핵이식란을 chamber로 옮겨 양 전극 사이에 일렬로 주입하여 핵은 전극의 "+"극 쪽으로 향하게 하고 세포질은 "-"극 쪽으로 향하게 하여 직류전류(DC)로 1.30~2.46 kv/cm, 15~30  $\mu$ sec, 1 또는 2회 통전하여 세포융합을 유도하였다. 두 번째 융합을 위한 전기자극은 동일한 방법으로 1시간 후에 자극을 가하였고 세 번째도 같은 방법으로 30분 후에 통전하였다. 핵이식란은 10% GS가 첨가된 M16 배양액으로 배양을 실시하였으며, 융합 여부는 배양 후 1시간 정도 경과 후에 판단하였다.

융합이 이루어진 핵이식란의 활성화 처리는 핵이식 조작 후 약 3시간동안 전배양을 실시한 다음 전기자극법과 약물처리 방법을 사용하였는데, 전기자극방법은 DC 1.30~2.46 kv/cm, 15~30  $\mu$ sec 전압으로 1 또는 2회 전기자극을 가하여 활성화를 유도하였으며, 약물처리법은 5  $\mu$ M의 ionomycin 용액에서 5분, 2 mM 6-DMAP 용액에서 4시간 동안 처리하여 활성화를 유도하였다.

**복제수정란의 체외배양**

복제수정란의 체외배양은 0.8% BSA가 첨가된 mSOF 배양액(5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>, 96~98% humidity, 39°C)에서 6~7일동안 배양을 실시하면서 후기배로의 발달을 유도하였으며, 분할율은 활성화처리 후 12-15시간째에 조사하였다.

**통계학적 분석**

실험결과와 통계학적 분석은 SAS package를 이용하여 실시하였으며, GLM(General Linear Model) procedure를 적용하여 각 요인의 least square mean을 구하여 요인간의 유의차를 검정하였다.

**결과 및 고찰**

**공여세포의 조건에 따른 핵이식란의 융합율**

산양의 핵이식에 있어서 성숙한 산양의 귀 유래 섬유아세포와 태아 유래 섬유아세포를 공여세포로 사용하였을 때 융합율과 분할율을 조사한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다.

귀 유래 섬유아세포를 공여세포로 사용하였을 때 융합율은 60.4%로서 태아 유래 섬유아세포의 40.3%보다는 높

**Table 1. Effect of different somatic cell on *in vitro* development of caprine SCNT**

Donor cell	No. of oocytes	No. of oocytes fused(%)	No. of oocytes cleaved (12~15hr)(%)
Ear cell	139	84(60.4)	40(47.6)
Fetal fibroblast	139	56(40.3)	27(48.2)

\* Values in the same column are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

\*\* Cleavage development at 12~15h post fusion activation.

게 나타났다. 분할율에 있어서는 귀 유래 섬유아세포와 태아 유래 섬유아세포가 각각 47.6 및 48.2%로서 유의적인 차이가 없었다.

Keefe 등(2001)은 fetal cell 를 공여세포로 사용하였을 때 54%의 융합율을 얻었다고 보고하였다. Keefe 등(2002)은 granulosa cell(female)과 fetal fibroblast cell(male) 을 공여세포로 사용하였을 때 융합율은 각각 87%와 60%로서 공여세포의 종류에 따라서 융합율에 차이가 있다고 하였다. Zou 등(2001)은 cumulus cell 을 공여세포로 이용하였을 때 융합율은 53.1%라고 하였으며, 핵이식방법에 있어서 공여핵을 수핵란의 세포질에 직접주입하였을 때는 64.2%가 융합되었다고 하였다. 또한 공여세포가 somatic cell이 embryonic cell보다 세포의 크기가 작기 때문에 융합율이 낮다고 하였다. 공여세포의 종류와 연구자에 따라서 융합율의 차이가 많은 것을 볼 수 있는데 이것은 소, 돼지 등 다른 동물에서와 같은 차이가 있음을 알 수 있다. 본 연구에서 분할율이 낮은 것은 활성화처리 후 12~15시간째에 분할율을 조사하였기 때문이다.

**전기융합조건에 따른 핵이식란의 융합율**

핵이식란의 융합을 위하여 전기세기를 1.30~1.40, 2.30~2.39 및 2.40~2.46 kv/cm로 각각 달리하여 전기자극을 주어 융합율과 분할율을 조사한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다.

2.40~2.46 kv/cm로 전기자극을 주었을 때 융합율은 43.8%로서 1.30~1.40 kv/cm(26.7%)와 2.30~2.39 kv/cm(34.8%)보다 높게 나타났으며, 융합이 이루어진 핵이식란의 분할율은 82.9%(1.30~1.40 kv/cm), 43.8%(2.30~2.39 kv/cm) 및 51.8%(2.40~2.46 kv/cm)로서 전기자극의 세기

**Table 2. Effect of electrical field strength on fusion and cleavage rates of caprine SCNT**

Electric length(kv/cm)	No. of couplets	No. of oocytes fused (%)	No. of oocytes cleaved(12~15hr)(%)
1.30~1.40	131	35(26.7)	29(82.9)
2.30~2.39	138	48(34.8)	21(43.8)
2.40~2.46	251	110(43.8)	57(51.8)

\* Values in the same column are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

\*\* Cleavage development at 12~15h post fusion activation.

Table 3. Effects of different oocytes source on fusion and development of caprine SCNT oocytes

Oocyte source	No. of couplets	No. of fused embryos(%)			No. of oocytes cleaved (12~15hr)(%)
		1st pulse	1st+2nd pulse	1st+2nd+3rd pulse	
<i>In vivo</i>	115	50(43.5) <sup>a</sup>	64(55.7) <sup>a</sup>	76(66.1) <sup>a</sup>	40(52.6) <sup>a</sup>
<i>In vitro</i>	89	21(23.6) <sup>b</sup>	35(39.2) <sup>b</sup>	47(52.8) <sup>b</sup>	19(54.4) <sup>a</sup>

\* Values with same superscripts in the same column were not significantly ( $p < 0.05$ ) different.

\*\* Cleavage development at 12~15h post fusion activation.

에 따른 유의적( $p < 0.05$ )인 차이가 없었다.

Reggio 등(2001)은 전기자극을 1.30 kv/cm, 20  $\mu$ sec, 1회 주었을 때 융합율이 57~63%라고 하였다. Keefer 등(2001)은 2.39 kv/cm로 전기자극을 주었을 때 융합율은 54%라고 보고하였다. Zou 등(2001)은 1.25 kv/cm, 40  $\mu$ sec, 3회 자극을 주었을 때 53.1%의 융합율을 얻었다고 보고하였다. Butler 등(2004)은 2.6~3.0 kv/cm 자극을 주었을 때 85%의 융합율을 얻었다고 보고하였는데 전체적으로 볼 때 전기세기에 따른 융합율은 본 연구결과 보다 다소 높은 경향을 나타내었다. 본 연구에서는 복제수정란의 이식을 위하여 동기화 시간조절 때문에 활성화처리 후 12~16시간제에 분할율을 조사하였기 때문에 낮은 분할율을 나타내었다.

#### 수핵란과 전기융합 횟수에 따른 핵이식란의 융합율

수핵란을 *in vivo*(체내성숙난자)와 *in vitro*(체외성숙난자)를 각각 사용하였을 때와 융합을 위한 전기자극 횟수를 1, 2 및 3회 주었을 때 융합율과 분할율을 조사한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다.

전기융합을 1회 실시하였을 때 *in vivo*의 융합율은 43.5%로서 *in vitro*의 23.6%보다 유의적( $p < 0.05$ )으로 높게 나타났으며, 2회 실시하였을 때는 55.7%(*in vivo*) 및 39.2%(*in vitro*)로 *in vivo*에서 높게 나타났다고( $p > 0.05$ ). 3회 자극을 주어 전체 융합율은 *in vivo*가 66.1%로서 *in vitro*의 52.8%보다는 유의적( $p < 0.05$ )으로 높게 나타났다고 하였다. 분할율은 각각 52.6 및 54.4%로서 유의적인 차이가 없었다.

Begin 등(2004)은 융합을 위한 전기자극을 3회 주었을 때 융합율은 40.0%(1회), 64.0%(2회) 및 78.0%(3회)로 각각 나타나 본 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다. Butler 등(2004)은 전기융합횟수를 2회까지 주었을 때 융합율은 85%라고 보고하여 본 연구결과 보다는 매우 높은 성적을 나타내었다. Echelard 등(2004)은 *In vivo*와 *In vitro* 난자를 수핵란으로 사용하였을 때 융합율은 각각 68.0%와 63.0%로서 이들간에 유의적인 차이는 없었다고 하였으며, 이러한 융합성적은 본 연구결과와 유사하다. Reggio 등(2001)은 *in vivo*(FSH stimulated) 난자와 *in vitro*(Abattoir derived) 난자를 수핵난자로 각각 사용하였을 때 융합율은 63.0%와 57.0%로서 이들간에 차이가 없다고 하였으며, 본 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다. 재래산양의 융합성적은 전체적으로 볼 때 소나 돼지에 비하여 낮은 융합율을 보였다.

#### IV. 인용문헌

1. Begin, I., Bhatia, B., Rao, K., Keyston, R., Pierson, J.T., Neveu, N., Cote, F., Leduc, M., Bilodeau, A.S., Huang, Y.J., Lazaris, A., Baldassarre, H., Wang, B. and Karatzas, C.N. 2004. Pregnancies resulted from goat embryos produced by fusing couplets in the presence of lectin. *Reprod. Fert. and Dev.* 16:136 (abstr).
2. Behboodi, E., Ayres, S.L., Memili, E., Coin, M.O., Chen, L.H., Meade, H.M. and Echelard, Y. 2004. Health and reproductive profiles of nuclear transfer goats producing the MSP1-42 malaria antigen. *Reprod. Fert. and Dev.* 16:137(abstr).
3. Butler, R.E., Melican, D., Hawkins, N., Jellerette, T., Nims, S., Graslie, K. and Gavin, W. 2004. Effects of cycloheximide on caprine somatic cell nuclear transfer embryo and fetal development. *Reprod. Fert. and Dev.* 16:138(abstr).
4. Echelard, Y., Memili, E., Ayres, S.L., O'Coin, M., Chen, L.H., Meade, H.M. and Behboodi, E. 2004. Comparison of the developmental potential of caprine nuclear transfer embryos derived from *in vitro* and *in vivo* matured oocytes. *Reprod. Fert. and Dev.* 16:140 (abstr)
5. Keefer, C.L., Baldassarre, H., Keyston, R., Wang, B., Bhatia, B., Bilodeau, A.S., Zhou, J.F., Leduc, M., Downey, B.R., Lazaris, A. and Karatzas, C.N. 2001. Generation of dwarf goat(*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and non-transfected fetal fibroblasts and *in vitro*-matured oocytes. *Biol. Reprod.* 64:849-856.
6. Keefer, C.L., Keyston, R., Lazaris, A., Bhatia, B., Begin, I., Bilodeau, A.S., Zhou, F.J., Kafidi, N., Wang, B., Baldassarre, H. and Karatzas, C.N. 2002. Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. *Biol. Reprod.* 66:199-203.
7. McGrath, J. and Solter, D. 1983. Nuclear transplantation of rat embryos. *J. Exp. Zool.* 248 : 303-305.
8. Melican, D., Butler, R., Hawkins, N., Nims, S., Buzzel, N., Jellerette, T. and Gavin, W. 2004. Estrus synchronization of dairy goats utilized as recipients for caprine nuclear transfer embryos. *Reprod. Fert. and Dev.* 16:151(abstr).
9. Miyoshi, K., Taguchi, Y., Sendai, Y., Hoshi, H. and Sato, E. 2000. Establishment of a porcine cell line from *in vitro* produced blastocyst and nuclear transfer of the cells into enucleated oocytes. *Biol. Reprod.* 62: 1640-1646.
10. Onishi, A., Iwamoto, M., Akita, T., Mikawa, S.,

- Takeda, K., Awata, T., Hanada, H. and Perry, A.C.F. 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 298:1188-1190.
11. 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).
  12. Reggio, B.C., James, A.N., Green, H.L., Gavin, W.G., Behboodi, E., Echelard, Y. and Godke, R.A. 2001. Cloned transgenic offspring resulting from somatic cell nuclear transfer in the goat: oocytes derived from both follicle-stimulating hormone-stimulated and nonstimulated abattoir-derived ovaries. *Biol. Reprod.* 65:1528-1533.
  13. Shiga, K., Fujita, T., Hirose, K., Sasac, Y. and Nagai, T. 1999. Production of calves by transfer of nuclei from cultured somatic cells obtained from Japanese black bulls. *Theriogenology* 52:527-535.
  14. 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.
  15. Zou, X.G., Chen, Y., Wang, Y., Luo, J.P., Zhang, Q.B., Zhang, X.C., Yang, Y., Ju, H.M., Shen, Y., Lao, W., Xu, S. and Du, M.A. 2001. Production of cloned goats from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei or fused with cumulus cells. *Cloning* 3:31-37.
  16. Zou, X.G., Wang, U.G., Cheng, Y., Yang, Y.E., Ju, H.M., Tang, H.L., Shen, Y., Mu, Z.Y., Xu, S.F. and Du, M. 2002. Generation of cloned goats (*Capra hircus*) from transfected foetal fibroblast cells, the effect of donor cell cycle. *Mol. Reprod. Dev.* 61:164-172.
  17. 박희성, 이지삼, 정장용. 2000. 한국 재래산양의 난포란의 회수와 체외수정에 관한 연구. *한국수정란이식학회지*, 15:287-293.  
(접수일자: 2004. 5. 21. / 채택일자: 2004. 6. 18.)

## Effect of Fusion Condition on *In Vitro* Development of Caprine Cloned Oocytes with Nuclear Transfer

Park, H. S., T. S. Kim, Y. H. Lee, S. Y. Jung, M. Y. Lee, S. P. Hong, J. K. Park, C. H. Kim and J. Y. Jung

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

### ABSTRACT

This study was conducted to examine the effects of electric stimulation conditions on *in vitro* developmental ability of caprine embryos after somatic cell nuclear transfer. Recipient oocytes were surgically collected after superovulation by using CIDR and FSH, PMSG, hCG and estrous synchronization in Korean native goats. The caprine ear cells were cultured *in vitro* in serum-starvation condition (TCM-199 + 0.5% FBS) for 3 to 5 days of cell confluence. The zona pellucida of *in vivo* and *in vitro* matured oocytes were partially drilled using laser system. Single somatic cell was individually transferred into the enucleated oocyte. The reconstructed oocytes were electrically fused with 0.3M mannitol. After the electrofusion, embryos were activated by electric stimulation or Ionomycin + 6-DMAP. Nuclear transfer embryos were cultured in mSOF medium supplemented with 0.8% BSA 6~7 days at 39 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>. The fusion rate of donor cells was 60.4% and 40.3 % in ear cell and fetal fibroblast, and cleavage rate were 40.6% and 48.2%, respectively. No significant difference was found in the fusion and cleavage rate in different donor cells. Nuclear transferred oocytes were fused by electric pulses of 1.30~1.40, 2.30~2.39 and 2.40~2.46 kV/cm. There was no significant difference among different electric pulses in fusion rates (26.7, 34.8 and 43.8%). The cleavage rate was higher ( $p<0.05$ ) in 1.30~1.40 kV/cm (82.9%) than 2.30~2.39 kV/cm (43.8%) and 2.40~2.46 kV/cm (51.8%). The fusion rates of recipient oocyte source were 1st (43.5% and 23.6%), 2nd (55.7% and 39.2%) and 3rd (66.1% and 52.8%) in *in vivo* and *in vitro* oocytes. However, fusion rate were significantly higher ( $p<0.05$ ) in *in vivo* than *in vitro* oocyte. The cleavage rate of fused oocytes from *in vivo* and *in vitro* sources were 52.6% and 54.4%, respectively. No significant difference was found in the cleavage rate according to the recipient oocyte source. These results suggest that factors such as field pulse of electric stimulation and oocyte source could affect *in vitro* developmental ability of nuclear transplanted caprine oocytes.

(Key words : Somatic cell, Nuclear transfer, Fusion, Activation, Cleavage, *In vivo*, Caprine)