

한우의 귀세포와 태아섬유아세포의 융합 방법과 Passage 배양이 복제수정란의 발달에 미치는 영향

양병철 · 임기순 · 이상기 · 김세웅 · 김동훈 · 성환후 · 양보석[†]

농촌진흥청 축산연구소

Effect of Fusion Method and Passage Culture of Hanwoo (Korean Cattle) Ear Skin and Fetal Fibroblasts on the Development of Nuclear Transfer Embryos

Byoung-Chul Yang, Gi-Sun Im, Sang-Ki Lee, Se-Woong Kim, Dong-Hoon Kim,
Hwan-Hoo Seong and Boh-Suk Yang[†]

National Livestock Research Institute, RDA, Suwon 441-706, Korea

ABSTRACT

The study was conducted to evaluate the effects of culture period and fusion method on the development of somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos reconstituted with Korean bovine fetal fibroblast cells (KbFF) and Korean bovine adult ear skin fibroblast cells (KbESF). KbFF were isolated from a day 51 Korean cattle (Hanwoo) fetus, and KbESF were isolated from a 28 month old Hanwoo calf. The cells were cultured up to 15 weeks (passage 15) *in vitro* for SCNT. Chamber and electrode needles were used for comparing fusion of reconstituted eggs. The doubling times of KbFF and KbESF were 17.3 hr and 24.3 hr, respectively. The fusion and cleavage rates were significantly higher in needle group (76.1 and 81.2%, respectively, $P<0.05$) than those in chamber group. However, the blastocyst development rate was not different between both groups. Fusion and cleavage rates of NT eggs reconstituted with KbESF did not affected by passage number, however, blastocyst rates were lower in passage 1~4 group (21.3%) than passage 5~8 (39.4%) and 13~15 groups (40.4%, $P<0.05$). Whereas, fusion rate was lower in passage 1~4 group (61.5%) than those of passage 5~8(75.0%) and 13~15 (76.8%) groups, but cleavage and blastocyst rates were similar regardless of passage number in the KbFF. The results suggest that fusion method can affect the development of SCNT embryos, whereas the long term culture up to 15 passages may not affect the development of SCNT embryos.

(Key words : Korean bovine ear skin fibroblast(KbESF), Korean bovine fetal fibroblast(KbFF), Nuclear transfer, Fusion, Passage number)

요 약

본 연구는 한우 성체 유래 귀세포(Korean bovine ear skin fibroblasts, KbESF)와 태아 섬유아세포(Korean bovine fetal fibroblasts, KbFF)를 이용한 체세포 복제(SCNT) 시 세포종류, 배양기간 그리고 융합방법이 핵이식 수정란의 발달에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실시하였다. 태아 섬유아세포는 임신 51일령의 한우태아에서 분리하였고, 귀세포는 28개월령의 성우의 귀에서 채취하였다. 세포는 15주 동안 체외에서 배양하며 체세포 핵이식(SCNT)에 공시하였다. 융합방법을 비교하기 위해 챔버방법과 전극 바늘을 이용한 방법으로 핵과 세포질을 융합하였다. 세포의 doubling time은 KbFF에서 17.3시간, KbESF에서 24.3시간으로 나타났다. 핵이식 후 융합과 분할율은 needle 방법에서 보다 유의적으로 높았으나(각각 76.1과 81.2%, $P<0.05$), 배반포 발달율은 차이가 없었다. KbESF의 경우, 배반포 발달율은 passage 5~9(39.4%)와 13~15(40.4%)에서 passage 1~4에 비하여 유의적으로 높았다($P<0.05$). KbFF의 경우, 융합율은 passage 5~8과 13~15에서 각각 75.0 및 76.8%로 passage 1~4(61.5%)보다 높았으나, 난분할율과 배반포 발달율은 차이가 없었다. 결론적으로, SCNT 수정란의 발달은 융합 방법에 의해 영향을 받을 수 있으나, 계대배양 15회까지 장기배양을 한 경우는 복제수정란의 발육에 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

서 론

복제 소는 1998년에 Kato 등(1998)이 성우(adult)의 난

[†] Corresponding author : Phone: +82-31-290-1621, E-mail: yangbs@rda.go.kr

구세포와 난관 상피세포를 이용하여 처음으로 복제 소를 생산하였고, Cibelli 등(1998)은 소의 태아 섬유아세포를 이용하여 형질전환 소의 생산을 보고하였다. 이후 많은 연구자들에 의해 체세포 핵이식(somatic cell nuclear transfer, SCNT)과 복제 수정란의 발달에 대하여 다양한 연구들이 계속되어 왔다(Kato 등, 1998; Wells 등, 1999; Kubota 등, 2000). 특히 핵이식에 이용하는 공여세포의 종류(손 등, 2004; Lee 등, 2005)와 장기간 체외 계대배양 세포(Kubota 등, 2000; 손 등, 2004), 탈핵 방법과 융합 방법(최 등, 2003), 활성화 방법(양 등, 2003)과 다양한 배양 방법(Powell 등, 2004) 등이 그것이다. 하지만 아직도 SCNT를 통하여 동물을 생산하는 것은 다른 번식 방법에 비하여 여전히 효율이 낮다.

일반적으로 체세포는 태아 섬유아세포에 비해 수명이 짧은 것으로 알려져 있으며 장기간 체외배양 과정에서 부적절한 배양 시스템 및 세포가 가지고 있는 수명으로 인해 오랫동안 유지하기는 좀처럼 쉽지 않다. 또한 연구자마다 배양조건과 실험실에서 세포를 다루는 조건 등이 각각 다르므로 아직까지 성체유래세포와 태아유래의 세포 중 어느 것이 체세포 핵이식에 더 좋은 것인지 확실한 결정이 되어 있진 않았다.

Im 등(2001)은 성우의 체세포에서 계대배양 1번째부터 6번째까지의 세포를 이용하였을 때 융합율과 난분할율 및 배반포 발달율에서 계대배양간 차이를 보이지 않았다고 보고하였으며, 손 등(2004)도 역시 성우의 체세포를 이용하였을 때 15번째 계대배양까지는 2세포기 발달율과 배반포 발달율에서 차이가 없었다고 하였다. 하지만 30번째의 계대배양에서는 2세포기 발달율에 있어서 15번째 또는 5번째 계대배양 세포와 비교하여 차이가 없었음에도 불구하고 낮은 배반포 발달율을 보고하였다. 일반적으로 세포의 계대배양은 3일, 4일 또는 6일(Kubota 등, 2000) 정도로 연구자마다 약간씩 다른 것으로 보고되고 있으나 대부분 계대배양 회수에 대해서만 이야기하고 있으며, 세포의 증식을 또는 증식 속도를 측정해 볼 수 있는 doubling time (DT 또는 population doubling)에 대해서는 언급하지 않고 있어 세포의 분열회수 또는 계대배양 기간에 있어서 불명확한 점이 있다. 따라서 본 논문에서는 정확한 계대배양 회수와 doubling time을 기준으로 하여 이들의 핵이식과 발달 등에 대하여 알아보고자 하였다. 그리고 핵이식 후 공여세포와 난자간의 융합 방법 중 많이 사용하는 방법 두 가지를 비교하였다. 1 mm 간격의 전극선을 이용하여 융합하는 방법인 챔버(chamber) 방법은 여러 연구자들이 이용하였으나(Kubota 등, 2000; Im 등, 2001; Kasinathan 등, 2001; 최 등, 2003; 손 등, 2004), 스테인리스 바늘로 된 전극을 이용하여 직접 한 개씩의 세포-난자를 일일이 융합하는 전극바늘(electrode needle) 방법을 이용한 연구자는 거의 없다.

따라서 본 연구의 목적은 핵이식 과정에서 난자와 공여세포를 융합할 때 전기적 융합방법으로서 챔버(chamber) 방법과 전극 바늘(needle) 방법을 이용한 융합 방법 중 어떤 방법이 복제수정란의 발달에 유용한 것인가를 알아보고, 체외에서 배양한 성체 유래 귀세포와 태아 섬유아세포를 공여세포로 이용하여 이들의 체외 계대배양 기간에 따라 복제수정란의 발달에 미치는 영향에 대하여 알아보기 위하여 수행하였다.

재료 및 방법

수핵난자의 준비

본 시험에 공시된 소의 난자는 도축장에서 도살된 소의 난소를 적출하여 35°C 생리식염수로 실험실까지 운반한 후, 10 ml 주사기에 18G 주사침을 이용하여 직경 2~7 mm 난포로부터 난자를 채취하였다. 채취된 난자는 실험현미경(Olympus, Japan) 하에서 양질의 난구세포가 부착된 난자만을 선별하여 체외성숙에 공시하였다. 미성숙 난자의 체외성숙은 10%의 FBS(fetal bovine serum, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)가 함유된 TCM199(Gibco-BRL)를 사용하였다. 즉, 선별된 난자는 배양액 500 μ l에 40개의 난자를 넣어 mineral oil로 피복하여 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 18~20시간 동안 성숙배양하였다. 배양 후 성숙난자는 0.1% hyaluronidase으로 난구세포를 제거하고 실험현미경하에서 세포질이 균일하고 극체가 뚜렷하게 보이는 것만을 선별하여 핵이식에 이용하였다.

귀세포의 준비

핵이식용 donor 세포로서 한우의 귀세포(Korean bovine ear skin fibroblast, KbESF)는 28개월령의 한우 암소로부터 채취하여 이용하였다. 귀세포는 털과 이물질을 제거하고 70% 알콜로 표면을 소독한 후 직경 6 mm의 귀로부터 조직을 채취하여 PBS로 3회 세척한 후 세절하여 38°C, 5% CO₂ 조건으로 12.5 cm²의 tissue culture flask(Falcon, Becton Dickinson Lab.)에서 배양하였다. 배양 3~4일 후 조직으로부터 분리되어 나온 세포들은 0.05% trypsin-EDTA를 이용하여 회수하였다(Passage-0). 또한 핵이식에 이용하기 위하여 배양액은 48시간마다 50% 씩 교환하였으며, 각 passage 주기는 7일이다. 이들 세포는 passage-15인 112일까지 연속적으로 배양하며 핵이식에 공시하였다.

태아 섬유아세포의 준비

한우 태아 섬유아세포(Korean bovine fetal fibroblast, KbFF)는 한우 태아로부터 세포를 채취하여 핵이식에 이용하였다. 자연발정 및 인공수정 후 51일령의 한우로부터 채취된 태아는 0.05% trypsin-EDTA를 이용하여 태아 섬유아세포(KbFF)를 분리하여 10% FBS가 첨가된 DMEM(Gibco-BRL)으로 배양하였다(Passage-0). 배양 조건은 39°C, 5% CO₂ 조건으로 12.5 cm²의 tissue culture flask(Falcon)에서 배양하였다. 배양액은 48시간마다 50% 씩 교환하였으며, 각 passage 주기는 7일이며 112일까지 연속적으로 배양하며 각 passage마다 핵이식을 실시하였다.

Doubling Time 계산

배양중인 귀세포와 태아 섬유아세포는 doubling time (DT)을 측정하기 위해 계대배양 5~7에서 세포 농도 1×10^5 cells/ml로 조정하여 6-well plate(\varnothing 35 mm)에 배양하였다. 3일 배양 후 0.05% trypsin-EDTA로 cell을 회수하여 총 세포수와 doubling time을 계산하였다. 각 세포를 이용한 실험은 3반복하였다.

핵이식, 배양 및 수정란 이식

난자의 제핵은 20% FBS와 50 µg/ml phytohemagglutinin(PHA)이 포함된 TCM199 30 µl의 drop에서 극체와 주변의 karyoplast를 제거하였다. 핵이 제거된 난자는 Hoechst 33342 (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 염색, 형광현미경을 통하여 제핵을 확인하였다. 이어서 준비된 태아 섬유아세포(KbFF)와 귀세포(ESF)를 제핵된 난자의 위란강으로 각각 미세 주입하였다. 미세 주입된 난자는 chamber 방법과 needle 방법을 이용하여 융합하였으며, 난자와 세포질의 융합이 확인된 세포는 10 µM Ca²⁺ ionophore에서 5분, 이어서 2 mM DMAP에서 3시간 동안 활성화 처리를 하였다. 융합이 확인된 수정란은 3일 동안 FBS가 첨가된 CR2aa에서, 이어서 3일 이후부터 FBS와 BSA가 첨가된 CR2aa에서 배양하였다. 배양조건은 CR2aa 배양액으로 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂, 38.5°C의 조건에서 7~8일 배양하였다. 배양 1일령(24 h)에 2세포기로 분할된 것을 확인하였고, 7일령에 배반포로 발달된 것을 확인하였다. 또한 발달된 배반포 수정란의 질을 확인하기 위해 Hoechst 33342로 핵을 염색하여 형광현미경 하에서 할구수를 계산하였다.

세포융합

세포 미세주입후 세포와 난자의 융합 방법 비교를 위해 두 가지 방법을 이용하였다. 첫 번째는 챔버방법은 1 mm 폭의 전극이 놓여진 100 mm electrofusion chamber (PN450-1)위에 마찬가지로 Zimmerman cell fusion medium에서 전극 사이에 난자와 주입된 세포를 양쪽 전극과 일직선상으로 맞춘 후 Electro cell manipulator ECM[®] 200 (BTX Inc, USA)을 이용하여 융합하였다. 융합조건은 180 V/cm로 15 µsec 동안 1회 통전하였다. 한편, 스테인리스 바늘(needle)을 이용한 방법으로서 난자는 Zimmerman cell fusion medium이 놓여진 100 mm plastic dish 위에서 양쪽 전극이 연결된 가는 스테인리스 needle을 이용하여 난자부분과 주입된 세포를 일직선상으로 맞춘 후 ET-3 GO KU(FHK, Japan)를 이용하여 융합하였으며, 조건은 25 V로 10 µsec 동안 1회의 pulse를 가하여 융합하였다. 이어서 난자는 20% FBS가 포함된 TCM199에 옮겨 30분 동안 배양하였다. 융합이 확인된 난자는 Ca²⁺ ionophore와 DMAP으로 활성화 처리를 하였다.

통계학적 분석

본 연구의 결과 얻어진 자료는 SAS package를 이용하여 처리간의 Duncan 및 LSD 방법을 이용하여 유의차를

검정하였다.

결 과

세포의 Doubling Time

본 실험에서 성체로부터 유래한 귀섬유아세포(KbESF)와 태아로부터 유래한 태아 섬유아세포(KbFF)는 각각 세포의 doubling time을 계산하였다. KbESF는 24.3±2.7시간으로 KbFF의 17.3±2.1시간에 비해 세포의 doubling time에서 차이가 있는 것을 확인하였다. 따라서 본 실험에서 세포의 체외배양은 1주일마다 passage를 넘겼으므로 passage 1~4인 경우 최대 28일 동안 배양하였으며, 이때 KbESF는 672시간 동안 배양하였으므로 추정된 doubling time은 최대 27.7회로 계산되며, passage 5~8에서는 55.4회, passage 9~12는 83.0회, passage 13~15는 110.7회가 된다. 또한 KbFF는 passage 1~4에서 38.9회 분열을 한 것으로 passage 5~8에서 77.8회, passage 9~12에서 116.7회, passage 13~15에서는 최대 155.6회로 계산되었으며, 이것으로 두 가지 세포가 같은 passage에서도 다른 doubling time을 보이는 것을 알 수 있었다.

융합방법에 따른 융합율과 발육율

이 실험에서 사용한 두 가지 융합 방법, 즉 스테인리스 바늘(needle)을 이용한 방법과 챔버(chamber) 방법을 이용하였을 때 융합율과 배 발달율을 비교하기 위하여 계대배양 5~7의 태아 섬유아세포를 이용하여 핵이식을 하였다. 그 결과는 Table 1에 나타낸 바와 같다. 융합율은 chamber 방법에서 51.8%이었고, needle을 이용한 방법에서 76.0%가 융합되어 needle 방법이 보다 효과적인 것으로 나타났다(P<0.05). 또한 이들의 발달율에 있어서도 chamber 방법은 61.2%인 반면, needle 방법에서는 81.2%가 난분할이 되어 needle 방법이 유의적으로 높은 것으로 나타났다. 그러나 배반포 발달율에 있어서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 따라서 이후의 실험에서는 모두 needle 방법을 이용하여 융합하였다.

귀세포의 핵이식과 발달율

한우 성우로부터 채취한 귀를 이용하여 KbESF를 구축하여 장기간 배양하며 핵이식에 공여하였다. 이들은 passage 1부터 4까지(1~4), 5부터 8까지(5~8), 9부터 12까지(9~12), 그리고 13부터 15까지(13~15) 각각 구분하여 핵이식을 실시하였다. 이들의 성적은 Table 2에서 나타

Table 1. Development of cloned embryos produced by different fusion methods of KbFF*

Fusion method	No.(%) of oocytes manipulated	No.(%) of oocyte fused	No.(%) of embryos developed to	
			Cleavage	Blastocyst
Chamber	199	103(51.8) ^b	63(61.2) ^b	16(15.5)
Needle	217	165(76.0) ^a	134(81.2) ^a	29(17.6)

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

* KbFF, Korean bovine fetal fibroblast.

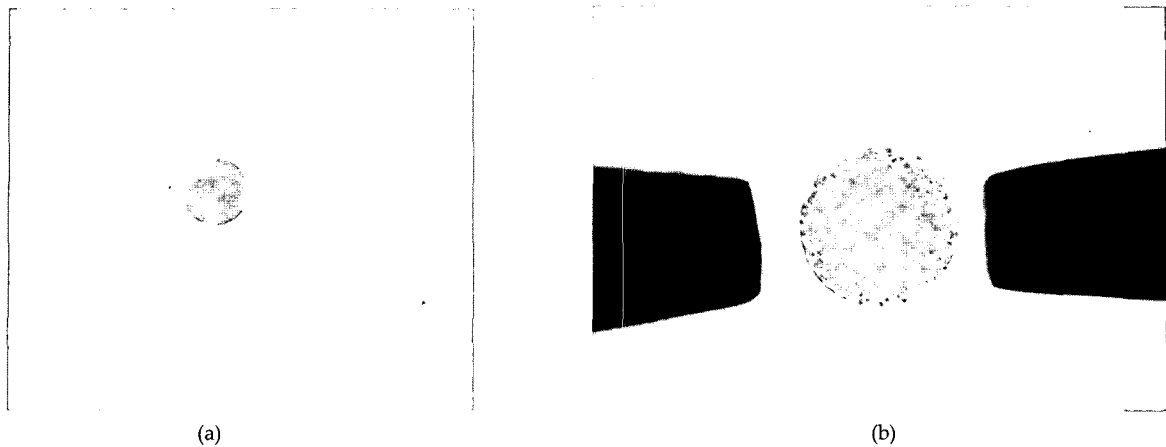


Fig. 1. Fusion methods of reconstituted oocytes (cytoplasm-karyoplast). (A) Chamber method. Oocyte is placed between 1 mm gap of plus and minus wires. (B) Electrode needle method. Oocyte adjoins directly between plus and minus electrode needles.

Table 2. Development of nuclear transfer embryos derived from adult ear fibroblast cells at different passages

Passage number	Doubling times*	No.(%) of oocytes manipulated	No.(%) of oocytes fused	No.(%) of embryos developed to	
				Cleavage	Blastocyst
1~ 4	27.7	156	105(67.3)	89(84.8)	18(21.3) ^b
5~ 8	55.4	259	188(72.6)	170(90.4)	74(39.4) ^a
9~12	83.0	262	166(63.4)	122(73.5)	55(33.1) ^{ab}
13~15	110.7	332	213(64.2)	191(89.8)	86(40.4) ^a

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

* Estimated doubling time was 24.3 ± 2.7 .

난 바와 같다. 각 passage 구에서 융합율은 63.4~72.6%로, 난분할율은 73.5~90.4%로 유의적인 차이가 없었다. 그러나 배반포 발달율에 있어서는 계대배양 초기인 1~4에서 21.3%로 이보다 늦은 계대배양 세포를 사용했을 때의 39.4%(5~8)와 40.4%(13.15)에 비하여 유의적으로 낮은 결과를 나타내었다($P < 0.05$). 하지만 passage 9~12에서는 33.1%로 차이가 없었다.

태아 섬유아세포의 핵이식과 발달율

KbFF를 이용하여 장기간 체외배양하며 핵이식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 passage 15까지 약 112일 동안 배양하며 각 passage 단계마다 핵이식을 실시하였다. 그 결과는 Table 3에서 나타난 바와 같다. 각각의 계대배양 세포를 이용하여 핵이식을 한 결과 융합율은 초기 계대배양(1~4)에서 61.5%로 9~12의 73.2%와는 유의적

Table 3. Development of nuclear transfer embryos derived from fetal fibroblast cells at different passages

Passage number	Doubling times*	No.(%) of oocytes manipulated	No.(%) of oocytes fused	No.(%) of embryos developed to	
				Cleavage	Blastocyst
1~ 4	38.9	109	67(61.5) ^b	47(70.2)	12(20.3)
5~ 8	77.8	172	129(75.0) ^a	71(55.0)	25(26.6)
9~12	116.7	149	109(73.2) ^{ab}	76(69.7)	22(29.0)
13~15	155.6	95	73(76.8) ^a	55(75.3)	9(16.4)

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

* Estimated doubling time was 17.3 ± 2.1 .

Table 4. Number of cells in blastocyst following passage number

Donor cell type	Passage number	Cell no. (mean±SD)
KbESF	1~10	64.67±18.33
	11~15	80.60±32.32
KbFF	1~10	74.64±25.91
	11~15	87.25±30.93

인 차이가 없었으나, passage 5~8과 13~15 (75.0과 76.8%)에서는 유의적인 차이를 나타냈다. 분할율에 있어서는 55.0~75.3%로 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그리고 배반포 발달율에 있어서도 초기 passage(20.3~26.6%)와 후기 passage(16.4~29.0%)에서 모두 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

배반포 세포수

소에서 KbESF와 KbFF를 이용하여 장기간 체외배양과 핵이식을 하여 생산된 수정란은 세포의 계대배양이 수정란의 품질에 미치는 영향을 알아보기 위하여 각각의 배반포는 핵염색을 하여 형광현미경으로 세포수를 계산하였다. 그 결과는 Table 4에 나타난 바와 같다. KbESF는 초기 계대배양 단계인 passage 1에서 10 사이의 배반포가 평균 64.7개의 세포로 확인되었으며, 후기 계대배양인 passage 11~15에서는 평균 80.6개의 세포가 배반포에서 확인되어 통계적으로 유의적인 차이를 보이고 있지는 않았으나 후기단계에서 수정란의 질이 좋은 경향을 나타내었다. 또한 KbFF에서도 계대배양 초기인 passage 1~10의 세포를 이용한 핵이식 배반포에서 평균 74.6개의 세포가 확인되었으며, 후기 계대배양인 passage 11~15에서 평균 87.3개의 세포가 배반포에서 확인되어 유의적인 차이가 없었다. 그러나 KbESF와 KbFF에서 모두 후기단계의 세포를 이용하여 핵이식을 하였을 때 배반포로 발달한 수정란의 질이 좋은 경향을 나타내었다.

고 찰

본 연구에서는 한우 성체에서 채취한 귀세포와 임신 51일령의 태아 섬유아세포를 이용하여 체외에서 장기간 배양하며 핵이식을 하였을 때 복제수정란의 생산에 영향을 미치는 요인을 알아보기 위하여 실시하였다. 귀세포에서 초기 계대배양 단계인 passage 1~4는 이보다 늦은 계대배양 세포에 비해 유의적으로 낮은 배반포 발달율을 보이고 있다. 그러나 passage 9~12와는 12% 이상의 발달 차이를 보여 비록 통계적인 차이는 없으나 의미 있는 성적으로 생각된다(Table 2 참조). 또한 태아 섬유아세포에서 융합율은 초기 계대배양 세포(passage 1~4)를 이용하였을 때가 후기 배양세포(passage 5~8, 13~15)를 이용했을 때에 비해 유의적으로 낮은 것으로 나타났다. 그러나 또한 passage 9~12에서의 융합율과는 11% 이상의 차이를 보이고 있다(Table 3 참조). 하지만 귀세포에

서 110 doubling time(DT)까지의 배반포 발달 결과는 계속 성적이 상승하는 경향을 보였으나, 태아 섬유아세포에서는 117 DT이 넘어가면서 배반포 발달율이 떨어지는 경향을 보이고 있다. 그렇다면 성체세포에서도 117 DT 이상 진행된 세포를 이용하여 SCNT를 하였을 때도 같은 결과가 나올 가능성이 있다는 것을 시사해준다고 하겠다.

Im 등(2001)은 소의 귀세포를 6번째 계대까지 배양하여 37.8%의 배반포 발달율을 보고하였으며, 손 등(2004)도 역시 소의 귀세포를 이용하였을 때 15번째 계대배양에서 85.3%의 2세포기 발달율과 23.5%의 배반포 발달율을 얻었으나 30번째의 계대배양에서는 81.2%의 2세포기 발달에도 불구하고 5.8%의 배반포 발달율을 얻는 것에 그쳤다. Kubota 등 (2000)은 17년 된 소에서 피부세포를 채취하여 SCNT에 이용하였을 때 계대배양 초기(passage-5)와 후기(passage-10)에서 융합율과 분할율에서 차이가 없음에도 불구하고 passage 10과 15에서 배반포 발달율이 유의적으로 높았다고 보고하였다. 이 보고에 의하면 계대배양은 약 6일마다 하였다고 하였으므로 passage 10의 추정 doubling time은 약 59회가 되나, 배양액내 혈청을 0.5%로 줄여 사용했으므로 실제로는 이보다 낮았을 것으로 생각된다. 따라서 손 등(2004)의 결과에서처럼 본 연구에서도 좀 더 진행된 passage와 doubling time 세포를 이용하여 SCNT를 했더라면 귀세포에서도 어느 시점에서 수정란의 발달율이 떨어지는지에 대해 알 수 있었으리라 생각된다.

귀세포와 태아 섬유아세포간에는 doubling time이 다르므로 직접적으로 passage를 기준으로 비교하기엔 어려울 것으로 생각된다. 따라서 본 실험의 결과에서 두 가지 세포의 doubling time을 계산하여 세포의 배양기간과 SCNT 발달율을 계산해 보았다. Doubling time이 50~100회 사이에서 난할율은 KbFF에서 59.2%인 반면 KbESF에서 85.5%로 유의적으로 높은 성적을 나타냈으며, 배반포 발달율에서도 KbFF에서 16.7%이고 KbESF가 34.0%로 나타나 성체에서 유래된 귀세포가 유의적으로 높은 것으로 나타났다(미기제). 이것은 Table 2와 3을 비교했을 때 KbESF가 KbFF와 같은 passage에서도 높은 수정란 발달율을 유지하고 있는 것은 낮은 doubling time이 하나의 요인일 수 있다는 것을 시사해준다고 하겠다.

세포 종류에 따른 발달율을 비교하기 위한 보고들은 이외에도 말에서 체세포와 태아 섬유아세포를 이용하여 SCNT를 한 결과 passage 3~15까지 융합율과 난분할율에서 유의차가 없었다고 하였으며(Li 등, 2003), You 등 (2004)도 또한 소에서 태아 섬유아세포와 성체세포에서 SCNT후 융합율과 발달율은 차이가 없었다고 보고하고 있다. 그리고 Kasinathan 등(2001)에 의하면 태아 섬유아세포와 4년 및 15년 된 소의 체세포를 이용 SCNT를 통해 생산된 배반포의 세포수는 각각의 cell line 별로 유의적인 차이는 나타났지만 태아 섬유아세포와 체세포간에는 차이가 없는 것으로 나타났다. 이와 같은 것으로 볼 때 세포 종류보다는 다른 요인이 SCNT 수정란의 질에 영향을 비교적 많이 준다는 것을 나타내준다고 할 수 있다. 이러한 것을 설명하기 위해 더 많은 연구가 이루어지고 있으며, methylation 또는 histone acetylation 등으로 이것을 설명해 줄 수 있을지도 모른다. Enright 등 (2003)은 공여세포의 종류에 따라 histone acetylation 수

준이 다르다고 하였으며, 또한 난구세포와 태아 섬유아 세포에서 passage 15에서는 passage 5에서 보다 histone H4와 H3이 높았다고 보고하였다. 이것은 passage 초기 또는 후기의 세포를 이용하여 SCNT를 하였을 때 난구 세포가 태아 섬유아세포보다 높은 발달율을 보여주는 단서의 하나가 될 수 있을 것이라고 하였다. 따라서 본 연구실에서는 추가적으로 이를 규명하기 위한 실험을 하고 있다.

난자와 세포질의 융합 방법은 chamber 방법과 needle 방법을 사용했다. 두 방법의 차이점은 전기를 발생시키는 기계가 우선 다르므로 직접적으로 비교하기가 어려울 수 있다. 그러나 대표적으로 사용하는 전기 융합기의 종류이므로 본 실험에서 비교하였다. 난자와 전극이 직접 접촉하는 needle 방법과 간접적으로 접촉하는 chamber 방법은 두 전극선 사이에 놓여진 난자의 융합을 위해서 전기의 세기도 달라진다. 즉, 1 mm의 폭을 가지고 있는 chamber 방법에서는 두 전극과 난자가 서로 떨어져 있으므로 단위면적당 전기의 세기(180 V/cm)는 직접 접촉하는 needle 방법(25 V)에 비하여 좀 더 증가되었다. 하지만 본 실험에서 설정한 조건은 예비실험을 통하여 각각의 기계의 특성에 맞춘 최적의 융합조건을 이용하였다. 또 다른 차이점은 공여세포가 위란강 내에서 난자와 세포질이 접촉하지 않은 상태에서는 chamber 방법을 이용하여 융합할 때 융합이 되지 않는 단점이 있다. 그러나 needle 방법에서는 전극 바늘을 이용하여 서로 떨어져 있는 세포와 난자를 밀어서 세포막이 서로 접촉할 수 있도록 만드는 것이 가능하므로 융합율이 향상 될 수 있는 요인이 된 것으로 생각된다.

결론적으로 SCNT에서 높은 발달율을 이끌어내기 위한 융합방법은 전극바늘을 이용한 방법이 좀 더 효과적이며, 성체 유래의 체세포나 태아 섬유아세포는 일정한 doubling time, 즉 KbESF는 110 DT, KbFF는 116 DT 까지는 복제 수정란의 발달율에 영향을 주지 않을 것으로 생각된다.

인용문헌

- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA, Robl JM (1998): Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280:1256-1258.
- Enright BP, Jeong BS, Yang X, Tian XC (2003): Epigenetic characteristics of bovine donor cells for nuclear transfer: levels of histone acetylation. *Biol Reprod* 69:1525-1530.
- Kasinathan P, Knott JG, Moreira PN, Burnside AS, Jerry DJ, Robl JM (2001): Effect of fibroblast donor cell age and cell cycle on development of bovine nuclear transfer embryos *in vitro*. *Biol Reprod* 64: 1487-1493.
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y (1998): Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282:2095-2098.
- Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, Mizoshita K, Tabara N, Barber M, Yang X (2000): Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc Natl Acad Sci* 97(3):990-5.
- Lee SL, Ock SA, Yoo JG, Kumar BM, Choe SY, Rho GJ (2005): Efficiency of gene transfection into donor cells for nuclear transfer of bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 72:191-200.
- Li X, Tremoleda JL, Allen WR (2003): Effect of the number of passages of fetal and adult fibroblasts on nuclear remodelling and first embryonic division in reconstructed horse oocytes after nuclear transfer. *Reproduction* 125:535-542.
- Lim GS, Yang BS, Yang BC, Chang WK, Yi YJ, Park CS (2001): Effect of cell cycle stage on the development of embryos produced by cumulus cell nuclear transfer in Hanwoo (Korean Cattle). *Asian-Aust J Anim Sci* 14(6):759-764.
- Wells DN, Misica PM, Tervit HR (1999): Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod* 60:996-1005.
- You SG, Heo MH, Moon JH, Kim SC, Kwak SW, Yoon DH, Jin DG, Hong KC, Foster DN, Choi YJ, Kim HG (2004): Establishment of life-span extended bovine fibroblast cells carrying the characterization of primary cells. *Mol Cells* 18:261-268.
- 손준규, 박정준, 박춘근, 양부근, 김정익, 정희태 (2004): Donor 세포의 종류 및 세포처리에 따른 소 체세포 핵이식란의 체외발육. *Reprod Dev Biol* 28:1-6.
- 양윤희, 최종엽, 이상영, 박춘근, 양부근, 김정익, 정희태 (2003): 소 체세포 핵이식기술의 효율 증진에 관한 연구. *한국가축번식학회지* 27:233-240.
- 최은주, 이호준, 민관식, 김창근, 정영채, 윤종택 (2003): 최소의 귀세포를 이용한 핵이식에서 전기융합조건이 융합 및 배발달에 미치는 영향. *한국가축번식학회지* 27:87-93.

(접수일자: 2006. 2. 13 / 채택일자: 2006. 3. 10)