

## 유산양 체세포를 이용한 돼지 난자의 이종간 핵이식 후 배발달에 관한 연구

장석민<sup>1</sup> · 나루세겐지<sup>1</sup> · 신영민<sup>1</sup> · 박창식<sup>1</sup> · 진동일<sup>1\*</sup>

### *In vitro* Development Potential Following Nuclear Transfer of Porcine Interspecies Clone Embryo by Goat Somatic Cells

Suk-Min Chang<sup>1</sup> · Kenji Naruse<sup>1</sup> · Young-Min Shin<sup>1</sup> · Chang-Sik Park<sup>1</sup> · Dong-il Jin<sup>1\*</sup>

#### ABSTRACT

This study was conducted to investigate the developmental ability of interspecies cloned embryos after nuclear transfer of goat fetal fibroblast cells into porcine oocytes. Recipient porcine and goat oocytes were obtained from slaughterhouse and matured *in vitro* according to established protocols. Enucleation was accomplished by aspirating the first polar body and cytoplasm and a single donor cell was individually microinjected into vitelline space of the enucleated oocyte. The reconstructed oocytes were electrically fused with 0.3M mannitol fusion medium. After electro-fusion, interspecies reconstituted embryos were cultured in PZM-3 for 7 days. In porcine interspecies nuclear transfer with goat fetal fibroblast cells, the cleavage rate of reconstituted embryos were 58.9% which was no significant different from that in porcine nuclear transfer embryos (67.4%). However, the developmental rate into blastocyst stage was 5.4% in interspecies nuclear transfer which was significantly lower than that in porcine intraspecies nuclear transfer (13.6%). When the developmental ability of porcine interspecies nuclear transfer with goat cells was compared

---

본 연구는 한국과학재단 우수연구센터(R11-2002-100-03001-0) 지원으로 수행되었음.

<sup>1</sup> 충남대학교 농업생명과학대학 동물자원학부(Division of Animal Science and Resources, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea), 형질전환복제돼지연구센터(Research Center for Transgenic Cloned Pigs)

\* 교신저자 : 진동일(E-mail: [dijin@cnu.ac.kr](mailto:dijin@cnu.ac.kr), Tel: 042-821-5876)

with goat intraspecies nuclear transfer, the cleavage rate of embryos were 59.2% and the developmental rate into morular and blastocyst stage was 13.6% in interspecies nuclear transfer which were significantly lower than those in intraspecies nuclear transfer embryos. This result indicated that porcine interspecies nuclear transfer with goat fetal fibroblast cells showed the developmental potential *in vitro* with lower cleavage and developmental rate compared with intraspecies nuclear transfer.

**Key words** : Interspecies, Nuclear transfer, Transgenic embryo, Developmental rate

## 1. 서 론

1997년 Wilmut 등이 체세포를 이용한 복제양 'Dolly'를 생산한 이래 여러 동물들에서도 복제효율을 증진시키기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다 (Loi 등, 1998; Yong과 Yuqiang, 1998; Polejaeva 등, 2000; Keefer 등, 2002). 또한 체세포 핵이식 기법은 형질전환 동물의 생산을 통한 경제형질의 개량, 유용물질의 생산과 장기이식용 동물의 생산 등 축산학적인 가치뿐만 아니라 의학 등에 의미 있는 개체를 복제 생산할 수 있어 많은 연구가 진행 중에 있다 (Schieke 등, 1997; Cibelli 등, 1998; Brett 등, 2001) 체세포 핵이식은 기존의 방법보다 공여핵의 확보가 용이하고 체세포의 배양 중에 특정 유전자를 도입할 수 있어 형질전환 동물의 생산함에 있어 생산비용의 절감과 유전자의 발현율을 높이는 등의 형질전환동물의 생산에 기술적 어려움을 해결 할 수 있는 방법이기도 하다. 그러나 특정 동물이나 사람의 난자의 확보가 충분하지 않을 뿐만 아니라 난자확보에 있어서 윤리적인 문제가 대두될 소지가 있어 난자확보가 용이한 종을 활용한 universal oocyte에 연구가 필요하다 (Mitalipova 등, 1998). 이종간 이식은

특종의 난자를 이용하여 다른 종의 체세포를 핵 이식하여 수정란을 생산하여 멸종 위기의 동물들을 다른 종의 난자를 사용하여 개체수를 늘리거나 윤리적인 문제를 피할 수 있는 등의 효과를 얻을 수 있다.

Dominko 등(1999)은 소 난자에 영장류를 포함한 5종류의 체세포를 이용 이종간 핵이식을 통해 이종간 핵이식란의 재프로그래밍이 가능함을 증명하였고, Illmensee 등(2006)은 사람의 체세포와 섬유아세포를 소의 난자에 이종간 핵이식을 실시하였다. 그러나 핵이식에 의한 복제 동물의 생산은 낮은 수태율, 거대산자, 조기 노화 내지 사망 등의 문제가 대두되고 있으며 이종간 핵이식의 경우에는 정상핵이식의 경우보다 더욱 낮은 수정란의 발달율을 보이거나 공여핵의 불완전한 재프로그래밍 등의 문제가 보고되었다. 또한 이종간 핵이식에 필요한 미세조작기술, 융합 및 활성화 그리고 체외배양의 조건 등의 많은 문제가 해결되지 않고 있다.

본 연구에서는 자아낸 유산양 태아섬유아세포를 돼지와 재래산양 난자에 각각 핵이식하여 이종간 핵이식란을 생산하여, 이종간 핵이식란의 분할율 및 발달율을 비교 관찰하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공여체세포의 준비

공여세포는 먼저 임신 35일째의 자아넨 유산양 태아의 조직으로부터 분리하였는데, 먼저 잘게 세절한 후 0.05% trypsin(Gibco, U.S.A)과 0.5 mM EDTA(Sigma, U.S.A)가 첨가된 PBS 용액으로 3번 세척한 후 원심분리하여 분리된 세포는 5% FBS와 5% FCS(Gibco, U.S.A)가 첨가된 DMEM(Gibco, U.S.A) 배양액에 넣어 38.5°C 배양기에 배양하였다. 유산양 태아섬유아세포는 핵치환 시 공여세포로 사용하기 위해서 충분히 배양된 태아섬유아세포를 PBS용액으로 세척한 후 0.25% trypsin and 0.5 mM EDTA가 첨가된 TCM199배양액에 넣어 38.5°C 배양기에 2-5분간 배양하여 single-cell로 만든 후 핵치환에 사용하였다.

### 2. 난자의 체외성숙

도축장에서 난소를 100 IU penicillin, 50 ug/ml streptomycin이 첨가된 0.9% NaCl 용액에 넣어 실험실로 가져온 후 18G 바늘이 부착된 주사기로 난포란을 채취하였다. 회수된 난포란 중 세포질이 치밀하고 난구세포가 적당한 난포란만을 선별하여 이용하였고 산양 난포란의 경우 10% FBS, 5 ug/ml FSH (Sigma, F2293), 10 ug/ml LH (Sigma, L5269-1vL) 그리고 1 ug/ml 17β-estadiol (Sigma, E8875) 이 첨가된 TCM199 성숙배양액을 사용하고, 돼지 난포란의 경우 0.57 mM L-cystein, 10% porcine follicular fluid, 2% Basal Mrdium Eagle amino acids (BEM amino acids solutions, Sigma), 0.5 ug/ml LH, 0.5 ug/ml FSH, 10 ng/ml rpidermal groeth factor (Sigma, E-4127)가 첨가된 NCSU-23 성숙배양

액을 사용하여 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 산양 난포란은 24시간, 돼지 난포란은 22시간 배양 후 호르몬을 제거한 성숙배지에서 다시 22시간 배양하여 각각의 난포란의 체외성숙을 유도하였다.

### 3. 핵치환 및 활성화

돼지 난자의 경우 체외성숙이 이루어진 난자를 0.1% PVA, 0.1% hyaluronidase가 첨가된 TL-Hepes 배양액에 넣어 난구세포를 제거한 후 극체가 있는 것만을 선별하여 0.3% BSA(Sigma, A-8022), 7.5 ug/ml cytochalasin B와 Hepes가 첨가된 TCM199 배양액소적에 넣어 미세조작기를 이용하여 극체 및 세포질 핵을 제거 한 후 공여세포를 주입하여 핵치환을 실시하였다. 산양 난자의 경우 체외성숙이 이루어진 난자를 0.1% hyaluronidase가 첨가된 TCM199 배양액에 넣어 난구세포를 제거한 후 극체가 있는 난자만을 선별하여 7.5 mg/ml cytochalasin B가 첨가된 TCM199 배양액에 넣어 미세조작기를 이용하여 극체 및 세포질 핵을 제거한 후 공여세포를 주입하여 핵치환 하였다. 핵치환 한 후의 제핵난자와 체세포의 융합을 실시하였다. 돼지의 경우 0.3 M mannitol, 1.0 mM CaCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O, 0.1 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.5 mM Hepes가 첨가된 융합 배양액에 넣어 BTX Elector-Cell Manipulator 2001(BTX, San Diego, CA)을 사용하여 DC pulses 1.2 Kv/cm, 30 μsec의 조건으로 2회 충격을 주어 융합과 활성화를 실시하였다. 산양의 경우는 0.3 M mannitol, 0.1 mM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM Hepes, and 4 mg/ml BSA이 첨가된 융합배양액에 넣어 BTX Elector-Cell Manipulator 2001를 사용하여 DC pulses 2.39 kV/cm, 15 μsec의 조건으로 2회 전기 충격을 주어 융합하였다. 또한 산양의 경우 화학적 활성화

를 실시하였는데 활성화는 먼저 5  $\mu$ M ionomycin 이 첨가된 TCM199 용액에 5분간 배양한 후, 10% FBS가 첨가된 TCM199용액으로 3번 세척한 후 2mM 6-DMAP이 첨가된 TCM199배양액에 넣어 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에 4시간 배양하여 핵이식난자의 활성화를 유도하였다.

#### 4. 체외 배양

핵치환 후 활성화를 유도한 복제배아의 체외배양은 돼지의 경우 0.3% BSA가 첨가된 PZM-3 배양액에 넣어 5% CO<sub>2</sub>, 38.5°C의 배양기에서 7일간 배양하면서 발달율을 관찰하였다. 산양의 경우에는 106 mM NaCl, 7.2 mM KCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6.6 mM Na-Lactate, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.3 mM Na-pyruvate, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 1.7 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 1.5 mM glucose, 1 mM glutamine, 2% MEM Amino acids solution, 1% MEM Non-essential Amino Acids solution, 0.5% Insulin Transferrin Selenium(ITS), 8 mg/ml BSA, 0.075 g/l Kanamycin, 0.1 g/l Phenol-Red(all chemicals used from Sigma)가 첨가된 mSOF 배양액에 넣어 5% CO<sub>2</sub>, 38.5°C의 배양기에서 7일간 배양하면서 발달율을 조사하였다.

### III. 결과 및 고찰

유산양 태아섬유아세포를 공여세포로 사용하여 돼지 난자에 이종간 이식을 수행한 후 배양하여 단위발생란 및 동종이식란과 발달율을 비교 조사하였다(Fig. 1). Table 1은 돼지의 단위발생란과 돼지 체세포를 이용한 동종간 핵이식란 그리고 유산양세포를 이용한 이종간 핵이식란을 체외배양하여 발달율을 비교한 것으로, 돼지 단위발생

란은 배아의 분열율은 88.0%, 배반포기까지의 배발달율은 19.3%를 보였고 돼지 체세포를 공여세포로 이용한 동종간 핵이식란의 경우에는 분열율은 67.4%, 배반포기까지의 배발달율은 13.6%를 보였으며 유산양 태아섬유아세포를 공여세포로 이용하여 이종간 핵이식을 수행한 경우 분열율은 58.9%, 배반포기까지의 배발달율은 5.4%를 나타냈다. 그리고 유산양 섬유아세포를 이용하여 유산양 난자에 핵이식한 동종간 및 이종간 핵이식을 실시하여 발달율을 비교하였는데 Table 2에서 보는바와 같이 유산양 동종간 핵이식란의 경우 분열율이 81.5%, 상실배와 배반포기까지의 배발달율은 54.7%를 보였으나, 이종간 핵이식란의 경우 분열율은 59.2%, 상실배와 배반포기까지의 배발달율은 13.6%를 나타내었다.

돼지의 동종간 핵이식란과 이종간 핵이식란 간의 비교에서는 단위발생란에 비해서는 분열율이 낮은 것을 확인할 수 있었고, 동종 핵이식란과 이종간 핵이식란의 분열율에서는 큰 차이를 보이지 않았으나 배반포기까지의 배발달율에는 유의적인 차이가 있음을 알 수 있었다. 또한 유산양 동종 핵이식과 돼지 이종간 핵이식의 발달율의 차이에서는 분열율과 배반포기 배발달율 모두에 있어 이종간 핵이식이 유의적으로 낮은 것이 확인되었다. Dominko 등(1999)은 소, 양, 돼지, 원숭이, 흰쥐의 피부섬유아세포를 이용하여 소의 난자를 수핵란으로 이용하였을 때 배반포기까지의 발달율이 각각 17.3%, 13.9%, 14.3%, 0.0%로 소, 양, 돼지, 원숭이에서는 차이가 없었으나 흰쥐의 경우는 발달하지 않았다고 보고하였다. 또한 Lu 등(2004)은 buffalo와 cattle간에 이종간 이식을 수행하였을 때 buffalo의 체세포를 cattle에 이종간 이식을 하였을 때 분열율과 배반포기 발달율은 각각 66.2%, 13.3%를 보였으며 반대로

Table 1. *In vitro* development of cloned embryos produced by interspecies nuclear transfer of porcine oocytes with goat fetal fibroblast cells, porcine nuclear transfer embryos and porcine parthenogenetic activation.

Treatment	No. of oocytes cultured	No. of oocytes cleaved (%)	No. blastocysts (%)
Parthenogenetic	150	132 (88.0) <sup>a</sup>	29 (19.3) <sup>a</sup>
Porcine NT	132	89 (67.4) <sup>b</sup>	18 (13.6) <sup>a</sup>
Porcine INT*	73	46 (58.9) <sup>b</sup>	4 (5.4) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Within a column, means with different superscripts are significantly different (P<0.05).

\* Porcine INT : Porcine interspecies nuclear transfer with goat fetal fibroblast cells.

Table 2. *In vitro* development of cloned embryos produced by interspecies nuclear transfer of porcine oocytes with goat fetal fibroblast cells and goat nuclear transfer embryos.

Treatment	No. of oocytes cultured	No. of oocytes cleaved (%)	No. morula & blastocyst (%)
Goat NT	157	128 (81.5) <sup>a</sup>	86 (54.7) <sup>a</sup>
Porcine INT*	103	61 (59.2) <sup>b</sup>	14 (13.6) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Within a column, means with different superscripts are significantly different (P<0.05).

\* Porcine INT : Porcine interspecies nuclear transfer.

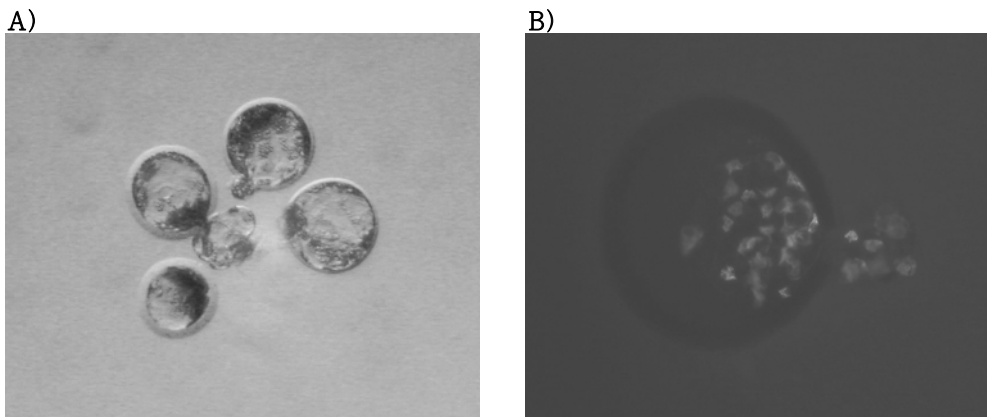


Fig. 1. *In vitro* development of porcine cloned embryo produced by interspecies nuclear transfer with goat fetal fibroblast cells. A) Blastocyst stage embryos. B) Hatching embryo with Hoechst staining.

cattle의 체세포를 사용 buffalo에 이종간 이식하였을 때 분열율과 배반포기 발달율은 각각 45.3%, 4.5%를 보였다고 보고하였다. 이들의 보고는 본 연구의 결과인 이종간 핵이식의 경우 동종간 핵이식에 비해 현저히 발달율이 낮아지는 결과와 일치하는 것으로 이종간 핵이식의 경우 아직 적절한 핵이식 조건과 체외배양의 조건이 규명되지 않은 것 때문인지 또는 이종간 핵이식에 의한 핵과 세포질의 차이에 의한 것인지에 대한 규명이 필요한 것으로 사료된다. 그러나 본 연구의 결과로 볼 때 유산양 태아섬유아세포와 돼지 난자를 수핵란으로 이용한 이종간 핵이식란을 체외에서 배양하였을 때 배발달이 정상적으로 이루어지는 것 확인할 수 있었다(Fig. 1). 그러나 이종간 이식에 있어서는 각각의 종과 핵이식 조건에 따라 매우 다른 발달율을 보이는 것을 확인하였으며 이종간 핵이식에 있어서 배양조건, 융합 및 활성화 그리고 공여세포에 따른 핵이식 조건 등에 대한 추가적인 연구와 실험이 필요한 것으로 사료된다.

#### IV. 적 요

이종간의 핵이식은 확보가 쉬운 난자를 이용함으로써 용이한 수핵란의 확보와 윤리적인 문제 등을 피할 수 있으므로 매우 유용한 방법이다. 본 연구에서는 이러한 이종간 핵이식의 조건을 규명하고자 유산양 태아섬유아세포를 이용하여 돼지의 난자에 이종간 핵이식을 시도하였다. 돼지와 산양의 난소에서 난포란을 채취하여 각각 NCSU-23, TCM-199에 호르몬을 첨가한 성숙배양액에 배양하여 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub> 의 배양기에서 48 시간 동안 체외성숙 시켜 수핵난자를 준비하였다.

공여세포는 유산양의 태아섬유아세포는 DMEM배양액에서 배양한 후 0.25% Trypsin-EDTA 용액으로 처리하여 single-cell로 분리하여 사용하였다. 돼지와 산양의 성숙란에 공여세포를 핵치환하여 0.3 M mannitol fusion medium에 넣어 각각 DC 1.2 kV/cm 30 μsec과 DC 2.39 kV/cm 15μsec의 조건으로 BTX를 이용 2회의 전기충격으로 융합·활성화하였다. 활성화된 돼지와 산양 핵이식란은 각각 PZM-3와 mSOF 배양액에 7일간 배양하면서 할구분열율과 배발달율을 관찰하여 동종간 핵이식란과 비교하였다. 비교결과 이종간 핵이식란의 경우 분열률이 58.9%, 배반포기로의 발달률이 5.4%로 돼지 동종간 핵이식란의 분열율이 67.4%, 배반포기로의 배발달율은 13.6%보다 낮게 나타났고, 또한 산양의 동종간 핵이식란배아의 분열율 81%, 상실배와 배반포기로의 발달률이 54.7% 보다 낮게 나타났다. 이러한 결과로 이종간의 이식은 많은 잇점에도 불구하고 아직은 낮은 배발달률을 보이고 있어 이에 대한 핵이식 조건 및 체외배양 조건 등 많은 부분에서의 추가적인 연구가 필요한 것으로 사료된다.

#### 인 용 문 헌

1. Brett C. R., A. N. James, H. L. Green, W. G. Gavin, E. Behboodi, Y. Echelard, and R. A. Godke. 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.
2. Cibelli, J. B., S. L. Stice, P. J. Golueke, J. J. Kane, J. Jerry, C. Blackwell, A. P. de Leon and J. M. Robl. 1998. Cloned Transgenic calves

- produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280:1256-1258.
3. Dominko, T., M. Mitalipova, B. Haley, Z. Beyhan, E. Memili, B. McKusick and N. First. 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.
  4. Illmensee, K., M. Levanduski and P. M. Zavos. 2006. Evaluation of the embryonic preimplantation potential of human adult somatic cells via an embryo interspecies bioassay using bovine oocytes. *Fertil. Steril.* 1:1248-1260.
  5. Keefer, C. L., R. Keyston, A. Lazaris, B. Bhatia, I. Begin, A. S. Bilodeau, F. J. Zhou, N. Kafidi, B. Wang, H. Baldassarre and C. N. Karatzas. 2002. Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. *Biol. Reprod.* 66:199-203.
  6. Mitalipova, M., T. Dominko, B. Haley, Z. Beyhan, E. Memili and N. First. 1998. Bovine oocyte cytoplasm reprograms somatic cell nuclei from various mammalian species. *Theriogenology* 49:389.
  7. Loi, P., S. Ledda, J. Fulka, P. Cappai and R. M. Moor. 1998. Development of parthenogenetic and cloned ovine embryo. Effect of activation protocols. *Biol. Reprod.* 58:1177-1187.
  8. Lu, F., D. Shi, J. Wei, S. Yang and Y. Wei. 2005. Development of embryos reconstructed by interspecies nuclear transfer of adult fibroblasts between buffalo (*Bubalus bubalis*) and cattle (*Bos indicus*). *Theriogenology* 64:1309-1319.
  9. Polejaeva, I. A., S. H. Chen, T. D. Vaught, R. L. Page, J. Mullins, S. Ball, Y. Dal, J. Boone, S. Walker, D. L. Ayares, A. Colman and K. H. S. Campbell. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407:86-90.
  10. Schieke, A. E., A. J. Kind, W. A. Ritchie, K. Mycock, A. R. Scott, M. Ritchie, I. Wilmut, A. Colman and K. H. S. Campbell. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblast. *Science* 278:2130-2133.
  11. Wilmut, I., A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind and K. H. Campbell. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813.
  12. Yong, Z. and L. Yuqiang. 1998. Nuclear-cytoplasmic interaction and development of goat embryos reconstructed by nuclear transplantation: production of goats by serially cloning embryos. *Biol. Reprod.* 58:266-269.