

공핵 세포 및 발정 동기화가 복제 재래 산양 생산에 미치는 영향

박희성[†] · 김태숙 · 정수영 · 박준규¹ · 이지삼 · 정장용
진주산업대학교 동물생명과학과 · 동물생명산업지역협력연구센터

Effects of Donor Cells and Estrus Synchronization on the Production of Cloned Korean Native Goat

H. S. Park[†], T. S. Kim, S. Y. Jung, J. K. Park¹, J. S. Lee and J. Y. Jung
Department of Animal Science and Biotechnology & RAIRC, Jinju National University

SUMMARY

The objective of this study was to examine the effect of donor cell types, the source of recipient oocytes and estrous synchronization on pregnancy and delivery rates of somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos in Korean native goats. Recipient oocytes were surgically collected after superovulation. Ear cells and fetal fibroblasts were collected and cultured in serum-starvation condition (TCM-199 + 0.5% FBS) for cell confluence. The zonae pellucidae of *in vivo*- and *in vitro*-matured oocytes were partially drilled using a laser system. Single somatic cell was transferred into the enucleated oocyte. The reconstructed oocytes were electrically fused with 0.3 M mannitol. After the fusion, embryos were activated by Ionomycin + 6-DMAP. NT embryos were cultured in mSOF medium supplemented with 0.8% BSA at 39°C in an atmosphere of 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ for 12 to 20 hr.

One hundred and two SCNT embryos were transferred into 20 recipients and pregnancy rate at days 30 was 20.0%. Of them, one developed to term and delivered 1 kid. Ear cells showed significantly higher fusion (63.8 vs. 26.5%) and pregnancy rates (20.0 vs. 0.0%) than those of fetal fibroblast ($p < 0.05$). The recipients synchronized by CIDR showed significantly lower pregnancy rates compared to that of recipient in natural estrus (0.0~25.0% vs. 100%) ($p < 0.05$). Cloned kid was born from the recipient in natural estrus. For the synchronization of estrus between recipient and donor, there was no difference between treatments (± 0 vs. +12 hr) in pregnancy rate. The first healthy cloned kid (Jinsoonny) was produced by transfer of SCNT embryos derived from *in vivo* oocytes and ear cells into a recipient goat whose estrus was synchronized with the donor. These results imply that donor cells for nuclear transfer may affect the success rate, and the estrus synchronization between donor and recipient animals can also be important.

(Key words : somatic cell, nuclear transfer, fusion, activation, cleavage, *in vivo*, goat)

서 론

핵이식 기법은 유전적으로 능력이 우수한 개체

* 본 연구는 산업자원부/한국산업기술평가원 지정 진주산업대학교 동물생명산업지역협력연구센터(RAIRC)의 연구비 지원에 의한 것입니다.

¹ 경남첨단양돈연구소(Gyeongnam Swine Research Institute)

[†] Correspondence : E-mail : hspark@jinju.ac.kr

를 단기간 내 대량 생산이 가능케 함으로 가축의 개량 및 번식에 가장 유용한 수단 중의 하나이다. Wilmut 등(1997)이 체세포 복제 기법을 이용하여 복제 면양을 탄생시킨 이후, 핵이식 기술은 단순 복제 동물의 생산에만 국한되지 않고 회귀·멸종 위기 동물의 보존, 형질 전환 기법을 이용한 인간 대체 장기 이식용 동물 생산, 치료용 생체 물질 생산, 질환 모델 동물 생산 등 인간의 질병 치료 분야에까지 그 응용 범위가 확대되었다. 핵이식 기법이 개발되기 전까지는 암수 생식 세포간의 수정에 의해서만 정상적인 개체 발생이 가능한 것으로 알려져 있었으나, 최근 세포 융합 혹은 세포 직접 주입에 의한 체세포 핵이식 기술이 발전되면서 각종 동물에서 복제 동물 생산이 성공하고 있다.

산양에 있어서 최근에 형질 전환을 통한 물질 생산 및 체세포 핵이식에 의한 산양 복제에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있으나 아직까지 소수에 불과하다(Behboodi 등, 2004; Echelard 등, 2004; Melican 등, 2004; Zou 등, 2002; Keefer 등, 2002; Reggio 등, 2001). 복제 산양의 생산에 있어서 소나 면양의 경우는 임신 3개월 이내에 유산을 포함하여 50% 이상의 태아 손실이 일어난다(Hill 등, 2000; 1999; Zakhartchenko 등, 1999; Wells 등, 1997; wilmut 등, 1997; Campbell 등, 1996). 산양의 경우는 임신 초기보다는 분만 이후에 심장 이상 및 호흡 장애 등으로 폐사율이 높으며, 주로 신생아기에 50% 이상이 폐사한다(Keefer 등, 2001; Reggio 등, 2001). 이처럼 동물의 종에 따른 차이는 소나 면양은 복제 수정란을 배반포기까지 체외 배양을 유도한 다음 이식을 실시하지만 산양의 경우는 2~4 세포기 단계에서 이식을 실시하기 때문에 체외 배양시간이 매우 짧은 등 핵이식 프로그램의 차이에 기인한다(Young 등, 1998; Walker 등, 1996).

우리나라 재래 산양은 체구가 작고 온순하므로 다루기 쉽고 임신 기간이 짧기 때문에 생명 공학 분야의 모델 동물로서 번식·생리학적으로 매우 중요한 가치를 지니고 있을 뿐만 아니라 고유의 유전 자원 보존 측면에서도 산양 복제와 같은 다양한 연구를 통하여 개량 체계의 확립이 절실히 요구된다. 본 연구는 복제 산양 생산 효율을 높이기 위해 공핵 세포 및 수핵 난자의 조건과 발정 동

기화에 따른 수태율과 임신한 수란 산양의 제 요인을 분석하기 위하여 실시되었다.

재료 및 방법

1. 공핵 세포의 배양 및 보존

공핵 세포는 귀세포와 태아 세포 2종류를 분리 배양하여 사용하였다. 귀세포는 모색이 흰색인 재래 산양(*Capra hircus*)의 귀에서 채취하였다. 채취된 귀 조직을 세절하여 0.25% trypsin-EDTA(Sigma, USA)가 첨가된 D-PBS(Sigma, USA)로 분리한 다음 10% FBS 가 첨가된 TCM-199(Sigma, USA)로 25cm² flask(Falcon, USA)에 분주하여 5% CO₂ 98~99% 습도, 39℃ 배양기내에서 계대 배양을 실시하였다. 태아 세포는 임신 40일령의 태아로부터 세포를 분리 배양하여 귀세포와 동일한 방법으로 계대 배양을 실시하여 사용하였다. 배양된 체세포는 10% DMSO(Sigma, USA) 및 10% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액을 사용하여 동결하였다. 핵이식에 사용할 때는 39℃ 온수에 용해하여 동결 보호제를 제거한 다음 10% FBS가 첨가된 신선한 TCM-199 배양액을 첨가하여 4-well dish에 분주하여 배양기내에서 배양을 실시하였다. 혈청기아배양은 0.5% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 3~5일간 실시하였다.

2. 공시 동물

공시 동물은 체중 15~25 kg 전후의 성숙한 미경산 재래 산양으로서 진주 근교의 사육 농가로부터 임상적으로 건강하다고 인정되는 것을 구입하여 진주산업대학교 종합 농장에서 사육하면서 내·외부 기생충 구제와 일정 기간 동안 적용시킨 다음 본 연구에 사용하였다. 사양 관리는 일반 관행법을 사용하였다. 농후 사료를 추가 급여하였으며, 식염과 물은 자유 섭취토록 하였다.

3. 과배란 유도

과배란 유기는 먼저 발정 동기화 처리를 위해 progesterone 제제인 CIDR(Progesterone 0.3 g, Eazi Breed, InterAg, New Zealand)를 10일간 질내에 삽입한 후, FSH(Folltropin-V, Vetrepharm, Canada)를

CIDR 삽입 8, 9, 10일째에 12시간 간격으로 70 mg 을 감량법으로 투여하였으며, PMSG(Folligon, Intervet, Netherland)의 경우는 1,000 IU를 CIDR 삽입 제 8일째에 1회 투여하였다. PGF₂ α (Lutalyse, Upjohn, U.S.A.)는 8일째에 FSH 또는 PMSG와 함께 10 mg 투여하고 CIDR는 10일째에 제거하였으며, 제거와 동시에 hCG(Chorulon, Intervet, Netherland) 400 IU를 투여하여 과배란을 유도하였다.

4. 난자의 회수

난관으로부터 체내 성숙 난자(*in vivo*)의 회수는 의과적인 방법으로 난관 관류 방법으로 실시하였다. 먼저 과배란 처리한 산양을 약 24시간 절식시킨 다음 2% xylazine(Rompun, Bayer, Korea)을 0.2 mg/kg 근육 주사하여 진정 마취시키고, HCl ketamine(Ketamine, Yuhan, Korea)을 11 mg/kg 근육 주사하여 마취를 유도하였다. 마취 후 복정중선을 절개하여 난관과 난소를 체외로 노출시킨 다음 배란점을 확인한 후, catheter(Tom Cat, Kendall Co., U.S.A.)를 난관 누두부로 삽입하여 5~10 ml의 M2 (Sigma, U.S.A.) 배양액을 난관-자궁 접합부 쪽에서 주입하여 관류하였다.

배란이 되지 않은 난포란(*in vitro*)의 회수는 성숙 난자를 회수한 다음 난소의 난포로부터 22G needle 이 부착된 5 ml 주사기로 난포액과 난포란을 흡입하여 회수하였다. 회수액은 5% GS(goat serum, Sigma, USA)가 첨가된 신선한 M2 배양액으로 4~5회 세척한 후 난구 세포의 부착 정도와 세포질이 충실한 것만 선별하여 본 연구에 사용하였다.

5. 수핵 난자의 체외 성숙

회수한 난포란의 체외 성숙은 25 mM의 Hepes 가 첨가된 TCM-199 체외 성숙용 기본 배양액에 10% GS, 10 μg/ml LH(luteinizing hormone), 1 μg/ml estradiol 17-β 및 5 μg/ml FSH(follicle stimulating hormone)을 첨가하여 5% CO₂, 98~99% 습도, 39 °C 배양기 내에서 약 12시간 정도 전 배양을 시킨 다음 4 well-dish(NUNC, Denmark)에 well 당 15~20개의 미성숙 난포란을 적하하여 22~24시간 동안 배양함으로써 체외 성숙을 유도하였다.

6. 핵이식

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

수핵 난자는 0.3% hyluronidase(Sigma, U.S.A)가 첨가된 D-PBS로 3~5분간 처리하여 난구 세포를 제거한 다음 세포질이 양호하고 극체가 뚜렷하게 보이는 난자만을 선별하여 핵이식에 사용하였다. 핵이식 조작시 수핵난자는 M2 배양액에 7.5 μg/ml의 cytochalasin B(Sigma, U.S.A)를 첨가하여 탈핵을 실시하였으며, 공핵 세포는 먼저 주입용 피펫으로 흡입하였다. 수핵 난자는 탈핵 및 주입용 피펫의 삽입을 용이하게 하기 위하여 zona drilling 한 다음 탈핵용 피펫을 위관강내로 진입시켜 극체와 세포질을 흡입하여 제거하였다. 탈핵한 난자는 곧바로 세포질이 제거된 공간에 공핵 세포를 세포질과 부착되게 주입함으로써 미세 조작 과정을 완료하였다.

Laser system(MTM, Switzerland)을 이용한 zona drilling 은 Park 등(2001)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, laser system이 부착된 도립현미경하에서 laser 전용 렌즈(×400)로 drilling할 수핵 난자의 투명대에 초점을 맞춘 다음 40~60 μsec의 강도로 laser를 1~2회 투과시킴으로써 zona drilling을 실시하였으며, 이때 drilling은 핵이식 조작시 불필요한 배양액의 침투 등을 막기 위하여 zona 두께의 약 60~80% 정도의 부분적 drilling을 하였다.

7. 핵과 세포질의 융합 및 활성화 처리

핵이식이 완료된 난자의 공핵 세포와 수핵 난자의 세포질 융합은 전기 세포 융합 장치(BTX, U.S.A)로 실시하였다. 이때 융합 배지는 0.05 mM CaCl₂(Sigma, U.S.A), 0.1 mM MgSO₄(Sigma, U.S.A) 및 0.5 mM Hepes(Sigma, U.S.A.)가 첨가된 0.3 M Mannitol(Sigma, U.S.A) 용액을 사용하였으며, 핵이식란을 chamber로 옮겨 양 전극 사이에 일렬로 정렬하여 핵은 전극의 “+” 극쪽으로 향하게 하고 세포질은 “-” 극쪽으로 향하게 하여 직류 전류(DC)로 2.4 kV/cm, 15~30 μs, 1회 통전하여 융합을 유도

하였다. 두 번째 융합을 위한 전기 자극은 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 30분 후에 판단하였다.

융합이 이루어진 핵이식란의 활성화 처리는 핵이식 조작 후 약 3시간 동안 전배양을 실시한 다음 5 μ M의 ionomycin(Sigma, U.S.A.)용액에서 5분, 2 mM 6-DMAP(Sigma, U.S.A.)용액에서 4시간 동안 처리하여 활성화를 유도하였다.

8. 복제 수정란의 체외 배양

복제 수정란의 배양은 0.8% BSA가 첨가된 mSOF 배양액(5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂, 96~98% humidity, 39°C)에서 약 12~20시간 동안 배양을 실시하면서 2~4세포기로의 발달을 유도하였다.

9. 수란 산양의 발정 동기화, 이식 및 임신 진단

수란 산양의 발정 동기화는 공란 산양의 과배란 처리 방법과 동일한 방법으로 실시하였다. CIDR를 10일간 질에 삽입하고 먼저 1) PMSG 500 IU와 PGF₂ α 10 mg을 병용 투여하고 10일과 11일째에 hCG 400 IU를 투여하여 발정을 유도하거나, 2) hCG 만 400 IU 투여하는 방법, 3) 자연 발정이 온 개체를 수란 산양으로 이용하는 방법, 4) 발정 동기화 시간 조절은 hCG 투여를 12시간 늦게 투여하여 발정이 늦게 유기되도록 하였다.

복제 수정란의 이식은 외과적인 방법으로 실시하였는데 수란 산양의 절식, 마취, 복부 절개 및 봉합은 난자 회수 시와 동일한 방법으로 실시하였다. 마취된 산양은 복정중선을 절개하여 실험실에서 개

조하여 만든 catheter를 이용하여 2~4세포기 단계의 복제 수정란 2~16개를 난관 누두부로 주입함으로써 이식을 완료하였다. 임신 진단은 발정일로부터 제 30일과 60일째에 초음파 임신 진단기(6.5 MHz CONVEX Scanner; Medison, Co., 한국) 로 실시하였다.

10. 통계학적 분석

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

결과 및 고찰

1. 공핵 세포의 종류에 따른 수태율

핵이식에 있어서 공핵 세포로 귀세포와 태아 세포를 각각 사용하여 융합을 및 수태율을 조사한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다.

귀세포를 사용하여 생산한 복제 수정란 207개를 전기 융합을 실시하였을 때 이중 132개가 융합되어 63.8%의 융합율을 보였다. 102개의 복제 수정란을 20두의 수란 산양(두당 2~16개 이식)에 이식하였을 때, 30일에 4두(20.0%)가 임신하였으며 이중 1두의 수란 산양이 1두의 복제 산양(진순이)을 생산하였다(Fig. 1). 태아 세포를 공핵 세포로 사용하여 생산한 복제 수정란의 융합율은 25.6%로서 귀세포를 사용하였을 때보다 유의적으로 낮았으며($p < 0.05$), 이중 18개의 복제 수정란을 3두의 수란 산양에 이식하였으나 임신이 되지 않았다.

Butler 등(2004)은 산양의 성체 피부 세포를 공핵

Table 1. Effects of donor cell source on fusion and pregnancy rates by SCNT

Donor cells	No. of oocytes coupled	No. of oocytes fused	No. of embryos transferred	No. of recipients	No. of recipients pregnant (%) [*]	No. of offspring
Ear cell	207	132 (63.8) ^a	102	20	4 (20.0) ^a	1
Fetal fibroblast	82	21 (25.6) ^b	18	3	0 (0.0) ^b	0

^{*} Pregnancy was confirmed by ultrasonography on Day 30 and 60 after transfer.

^{ab} Values with different superscripts within a column are significantly ($p < 0.05$) different.



Fig. 1. Production of cloned goat by SCNT.

세포로 사용하였을 때 융합율은 85%였으며 수태율과 산자 생산 효율은 각각 17 및 2%라고 하였다. Keefer 등(2002)은 태아 세포를 공핵 세포로 사용하였을 때 임신율과 산자 생산 효율은 17 및 3.7%로 과립막 세포를 사용하였을 때의 50 및 7.7%보다 낮았으며, 뿐만 아니라 융합율에 있어서도 60 및 87%로서 과립막 세포를 이용하였을 때가 유의적으로 높게 나타났다고 보고하였다. Keefer 등(2001)은 성이 다른 태아 세포를 각각 공핵 세포로 사용하였을 때 수태율은 암·수 모두 50%였으며 산자 생산 효율도 7.1 및 7.7%로서 차이가 없었

다고 보고하였다. 박 등(2004)은 재래 산양에 있어서 수핵 난자로 체내 및 체외 성숙 난자를 이용하여 핵이식을 실시한 다음 3회까지 반복 융합을 실시한 후 체내 성숙 난자를 수핵란으로 사용하였을 때가 유의적으로 융합율이 높다고 보고하였다(66.1 vs. 52.8%).

이상의 결과들은 본 연구 결과보다 융합율 및 산자 생산율이 다소 높은 편이다. 본 연구에서는 귀 세포로 핵이식을 실시하여 1두의 복제 산자를 생산하였다. 체세포 복제 기술을 희귀·멸종 야생동물의 종 보존 등에 활용하기 위해서는 태아 유래 세포보다는 조직의 채취와 세포의 분리 배양이 쉽고, 체세포 공여 동물이 생존해 있는 상태의 귀 세포를 이용하는 것이 바람직한 것으로 생각된다.

2. 수란 산양의 발정 동기화에 따른 수태율

수란 산양의 발정 동기화와 발정 유기 방법에 따른 수태율은 Table 2 및 3에서 보는 바와 같다.

수란 산양과 공란 산양간의 발정 동기화를 ± 0 및 +12시간 간격으로 하였을 때 수란 산양의 수태율은 18.2 및 16.7%로서 유의적인 차이가 없었다. 수란 산양의 발정 유기 방법에 따른 수태율에 있어서 CIDR 제거 후 hCG 및 PMSG를 투여하였을 때는 25%가 수태하였으며, CIDR 제거시 hCG만 투여

Table 2. Effects of estrus synchronization between recipient and donor on pregnancy and delivery rates by SCNT

Estrous synchronization	No. of embryos transferred	No. of recipients	No. of recipients pregnant (%)	No. of offspring /recipient
Synchronous (± 0 h)	74	11	2 (18.2)	1/1
Asynchronous (+12 h)	72	12	2 (16.7)	0

Table 3. Effects of estrus synchronization method of recipients on pregnancy and delivery rates by SCNT

Synchronization method	No. of embryos transferred	No. of recipients	No. of recipients pregnant(%)	No. of offspring /recipient
Natural estrus	5	1	1 (100) ^a	1/1
hCG+PMSG	79	12	3 (25.0) ^b	0
hCG only	61	10	0 (0.0) ^b	0

^{ab} Values with different superscripts within column are significantly ($p < 0.05$) different.

한 수란 산양은 전혀 수태가 되지 않았다. 그러나 자연 발정이 온 개체를 수란 산양으로 이용하여 이식을 실시하였을 때 1두의 복제 산양을 생산하였다.

Melican 등(2004)은 공란 산양과 수란 산양의 동기화 시간을 ± 0 로 하였을 때 임신율은 10%였으며 복제 산자 생산 효율은 1.6%라고 하였다. 동기화 시간을 +12시간과 +18시간으로 하였을 때 임신율은 각각 25 및 14%였으며 복제 산자 생산율도 3.7 및 1.3%라고 하여 +12시간이 다소 높았다고 하였다. 수란 산양의 발정 주기 방법은 연구자들에 따라 차이가 많은데 재래 산양은 각 나라마다 고유의 산양이 서식하고 있으며 크기, 사양 방법 및 서식국가의 기후를 포함한 자연 환경 등이 상이하기 때문인 것으로 생각된다.

재래 산양은 계절 번식을 하기 때문에(이 등, 1985) 연간 실험할 수 있는 기간이 매우 짧고 다른 개량된 축종에 비하여 편차가 심하여 어려움이 매우 컸다. 수란 산양의 발정 동기화는 계절에 따라 많은 차이가 있었지만 평균 발정 주기율은 60% 수준이었다. PMSG를 투여했을 때 황체의 수, 크기, 모양 등이 투여하지 않거나 자연 발정군에 비하여 평균 5개 이상으로 많았고, 크기도 5 mm 이상으로 모양도 매우 양호하였다. 자연 발정 수란 산양의 황체 크기는 1~2 mm였으며 발정 증상의 강도는 개체에 따라서 다소 차이는 있었지만 자연 발정 산양이 강하고 분명하였다.

3. 임신 산양의 조건과 복제 산양 생산

복제 수정란을 수란 산양에 이식한 후, 30일과 60일째에 실시한 초음파 임신 진단 및 산자 생산

결과는 Table 4에서 보는 바와 같다.

55번 수란 산양의 경우, 체내 성숙 난자를 수핵란으로 사용하여 생산한 복제 수정란 5개를 이식하였으며, 수란 산양으로서의 조건은 자연 발정 상태였으며, 발정 동기화 차이는 ± 0 이었다. 또한 제 30일과 60일째에 임신 진단을 실시한 결과 두 번 모두 임신이 확인되었으며, 임신 제 149일만에 정상 분만함으로써 국내에서 처음으로(2005년 6월 6일) 복제 산양 생산에 성공하였다. Fig 1.에서 보는 바와 같이 복제 산양(진순이)은 생시 체중이 1.9 kg으로서 매우 건강하였고 또한 복제 여부 확인 결과 진순이, 체세포 및 체세포 공여 산양이 모두 정확하게 일치하였다(Fig. 2). 성장률은 4개월까지는 정상적인 산양에 비하여 2배 정도 빨랐으며, telomeric DNA 함량 분석 결과(1.52 ± 0.35 vs. 2.02 ± 0.44) 동일 연령의 정상적인 산양에 비하여 매우 짧았다(Reprod. Fertil. Dev. 투고중). 번식 능력은 5개월 26일만에 첫 발정이 있었고 두 번째 발정 때 정상적인 수컷과 자연 교배시켜 2006년 6월 6일, 임신 제 145일만에 암·수 쌍자를 분만하였으나 이중 1두(암컷)는 폐사하였는데 원인은 규명 중에 있다.

351번은 난포란을 수핵 난자로 이용하였으며, 5개의 복제 수정란을 이식하였다. 임신 진단은 제 30일째에 진단 결과 임신하였으나, 57일째에 발정 증상을 보였다. 234번도 7개의 복제 수정란을 이식하였는데 제 30일과 60일째에 초음파 임신 진단 결과 모두 임신으로 확인되었으나 96일 전후로 유산된 것으로 추정되었다. 368번 수란 산양도 8개의 복제 수정란을 이식하여 30일과 60일에 모두 임신으로 판정되었으나, 임신이 유지되지 않았다.

Table 4. Pregnancy after transfer of SCNT embryos derived from different sources of oocytes

Recipient ID	Source of oocytes	No. of embryos transferred	No. of pregnant*			No. of offspring
			D 30	D 60	Term	
55	<i>In vivo</i>	5	Y	Y	Y	1
351	<i>In vitro</i>	5	Y	N	N	abortion
234	<i>In vivo</i>	7	Y	Y	N	abortion
368	<i>In vivo</i>	8	Y	Y	N	abortion

* Pregnancy was confirmed by ultrasonography on Day 30 and 60 after transfer.

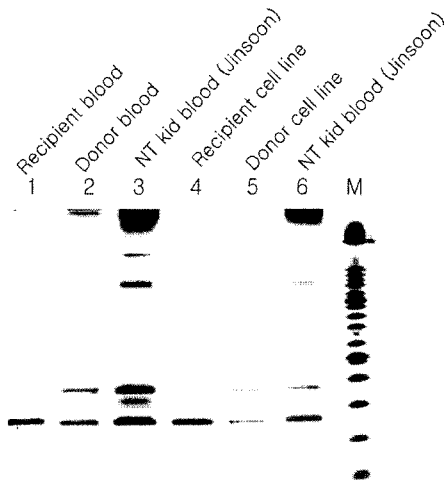


Fig. 2. PCR-SSCP analysis of the second exon of the MHC class II DRB gene.

Baguisi 등(1999)은 수핵 난자를 달리하여 25두의 수란 산양에 112개의 복제 수정란을 이식하였을 때 이식 후 제 30일째에는 55.5~78.6%가 초음파상으로 임신한 것으로 확인되었으나, 60일째에는 약 7%만이 임신을 유지하였다. 최종 2두의 수란산양이 3두의 복제 산양을 생산함으로써 이식되어진 복제 수정란이 산자로 태어난 효율은 2.1~5.2%라고 보고하였다. Keefe 등(2002)은 암컷 유래 공핵 세포를 이용한 핵이식란을 8두에 이식하였을 때 4두의 수란 산양이 수태하였으며, 4두로부터 모두 7두의 복제 산양을 생산하여 핵이식란의 복제 효율은 7.7%라고 하였다. 뿐만 아니라 수컷 유래 공핵 세포를 이용하였을 때도 2두의 복제 산양을 생산함으로써 3.7%의 복제 효율을 얻었다고 보고하였다. Apimeteetumrong 등(2004)은 2~4 세포기에 있는 복제 수정란을 수란 산양 10두에 이식하였을 때 제 30일째에는 4두, 60일째에는 3두의 수란 산양이 임신한 것으로 확인되었으나, 단 1두만 분만하였다고 보고하여 본 연구 결과와 유사한 경향을 나타내었다. Melican 등(2005)은 복제 수정란을 수란 산양에 이식하여 제 50일째는 7두가 임신한 것으로 확인되었으나, 임신 전 기간동안 5두가 유지되어 5두의 복제 산양을 생산하였으며, 3

두는 유산하였다고 보고하였다. 이러한 결과는 산양의 복제에 있어서 본 연구 결과와 다른 보고들에서 보는 바와 같이 임신확인 후에도 분만시까지의 상당수의 수란 산양이 유산되는 것으로 보인다.

Zou 등(2001)은 복제 수정란을 29두의 수란 산양에 이식하여 이중 수란 산양 2두가 임신하여 3두의 복제 산양을 생산하였다고 보고하였다. 이러한 결과는 본 연구 결과와 대체적으로 유사한 결과이다. 뿐만 아니라 이중 쌍자로 태어난 2두의 복제산양은 자연 분만 후 곧바로 호흡 곤란 증세로 폐사하였으며, 1두는 정상체중보다 37%(3.7 kg)나 크게 태어났으나, 분만 1년 후에도 매우 건강하다고 보고하였다.

Reggio 등(2001)은 과배란 처리에 의한 체내 성숙 난자와 도축장 유래 난포란을 수핵 난자로 각각 사용하였을 때 융합율은 63.0%와 57.0%로서 이들 간에 차이가 없다고 하였으며 수란 산양의 임신율은 각각 22 및 21%로서 차이가 없었으며 모두 5두의 복제 산양을 생산하였다고 하였다. 뿐만 아니라 수란 산양의 발정 동기화 시간이 수태율에 영향을 미친다고 하였다. Echelard 등(2004)은 수핵난자를 체내 성숙 난자와 도축장 유래 난포란을 사용하여 핵이식을 실시하였을 때 융합율은 68%와 63%로서 차이가 없었으며, 복제 수정란을 7두의 수란 산양에 이식하여 2두의 복제 산양을 생산하였다. 난포란의 경우에는 3두의 수란 산양에 이식하였으나, 복제 산양을 생산하지 못하였으며, 단지 복제 산양 2두가 사산하였다고 보고하였다. 재래 산양의 융합율은 다른 연구자들의 성적을 전체적으로 종합해 보면 소나 돼지에 비하여 대체적으로 낮은 경향을 나타내었다. 본 연구 결과도 전체적인 융합 성적은 대체로 유사한 경향이었고 난자의 유래에 따른 융합율과 임신율은 체내 성숙 난자가 유의적으로 높았다.

본 연구에서 보면 체내 성숙 난자의 적정 회수 시간을 규명하고자 hCG 투여 후 29시간부터 50시간까지 다양한 시간대에 회수를 실시하였는데 29~35시간에 회수하면 회수율이 매우 낮았다. 이러한 이유는 모든 난포로부터 난자가 충분히 배란되지 않은 것으로 보이며, 그러나 난자의 질은 양호하여 핵이식란의 융합율과 활성화율도 높게 나타

났다. 반대로 40시간 이후에 회수하면 회수율은 높게 나타났으나, 탈핵 또는 주입시 난자의 손상율이 높았으며, 융합율과 활성화율도 매우 낮은 경향을 나타내었다. 본 연구 결과 35시간 전·후에 회수하는 것이 융합율과 활성화를 뿐만 아니라 수태율에도 영향을 미치는 것으로 생각된다. 따라서 재래 산양의 핵이식은 과배란 처리 비용과 낮은 회수율 등이 다소 문제가 되나 체내 성숙 난자를 이용하는 것이 더 효율적이라고 판단된다(Park 등, 2004).

비록 본 연구진이 복제 산양의 생산에 성공하였으나, 낮은 체외 발달율과 수태율의 개선이 시급한 실정이다. 체외 발달율의 개선을 위해서는 질 좋은 다수의 난자 확보, 산양 수정란 체외 배양 체계 확립, 이식 과정 및 이식 후 수정란 및 태아의 손실을 최소화 하여야 한다. 또한 공란 및 수란 산양의 실험 동물로서의 세심한 배려와 관리의 임신의 성립과 유지에 중요한 요인이 될 것이라 생각된다.

적 요

본 연구는 공여 세포의 종류, 수핵 난자의 유래 및 수란 산양 발정 동기화 조건이 복제 산양 생산에 미치는 영향을 알아보고자 실시되었다.

공여세포는 귀 유래 섬유아세포를 분리 배양하여 사용하였으며, 체내 성숙 난자는 성숙한 미경산 재래 산양에 과배란을 유기하여 외과적인 방법으로 난관 관류를 통해 회수하였으며, 배란이 되지 않은 난포란은 난포로부터 흡입 채취한 후, 22시간 동안 체외 성숙을 실시하여 사용하였다. 핵이식은 zona drilling 후, 극체와 세포질 일부분 제거를 통해 제핵을 실시하고, 핵이 제거된 난자의 위관강 내로 공핵 세포를 도입하여 실시하였다. 핵이식란의 융합은 전기 자극 방법으로 실시되었으며, 융합이 완료된 핵이식란의 활성화처리는 핵이식 3시간 후에 Ionomycin과 6-DMAP를 병용 처리하여 실시하였다. 복제 수정란의 체외배양은 0.8% BSA가 첨가된 mSOF 배양액으로 2~4 세포기까지 체외 배양을 실시한 다음 수란 산양의 난관에 외과적으로 이식하였다. 임신 진단은 초음파 임신 진단기로 이식 후 제 30일과 60일에 실시하였다.

귀세포를 공핵 세포로 사용하였을 때 융합율이

(63.8 vs. 26.5%) 태아 세포를 사용했을 때보다 유의적으로 높았다($p < 0.05$). 총 102개의 복제 수정란을 20두에 이식하였으며, 30일에 4두(20.0%)가 임신하였으며 이중 1두가 1두의 복제 산양을 생산하였다. 수란 산양과 공란 산양간의 발정 동기화 간격(± 0 또는 +12시간)별 수태율은 각각 18.2 및 16.7%로서 유의적인 차이가 없었다. 수란 산양의 발정 유기 방법에 따른 수태율에 있어서 CIDR 제거 후 hCG 및 PMSG를 투여하였을 때는 25%가 수태하였으나, hCG만 투여한 수란 산양은 수태가 되지 않아 인위적으로 발정 동기화된 수란 산양을 이용하였을 때는 산자를 생산하지 못했다. 자연 발정 산양의 경우, 발정이 동기화된 (± 0) 수란 산양 1두에 체내 성숙 난자를 수핵란으로 사용하여 생산한 5개의 복제 수정란을 이식하여 149일만에 국내에서 처음으로 복제 산양(진순이) 생산에 성공하였다. 체외 성숙 난자를 수핵란으로 사용하여 생산된 복제 수정란 5개를 이식하였으나 수태가 이루어지지 않았다.

이상의 결과로 볼 때 재래 산양의 체세포 핵이식에 의한 복제 산자 생산에서 보다 효율성을 높이고 수태율을 향상시키기 위한 조건은 체내 성숙 난자를 수핵 난자로 이용하여 공란 산양과 발정이 동기화된(± 0) 자연 발정 수란 산양에 복제 수정란을 이식하는 것이 바람직한 것으로 생각된다.

참고문헌

- Apimeteetumrong M, Thuangsanthia A, Leingcharoen N, Yiengvisavakul V, Harintharanon A, Kunavongkrit A, Sumretprasong J, Vignon X and Techakumphu M. 2004. The effect of activation protocols on the development of cloned goat embryos. *Theriogenology*, 66:1529-1534.
- Baguisi A, Behboodi E, Melican D, Pollock J, Destrempe M, Cammuso C, Williams J, Nims S, Porter C, Midura P, Palacios M, Ayres S, Denniston R, Hayes M, Ziomek C, Meade H, Godke R, Gavin W, Overstrom E and Echelard Y. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Biotechnol.*, 17:456-461.

- Behboodi E, Ayres SL, Memili E, Coin MO, Chen LH, Meade HM and Echlard Y. 2004. Health and reproductive profiles of nuclear transfer goats producing the MSPi-42 malaria antigen. *Reprod. Fertil. Dev.*, 16:138.
- Butler RE, Meican 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. Fertil. Dev.*, 16:138.
- Campbell KHS, McWhir J, Ritchie WA and Wilmut I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a culture cell line. *Nature*, 380:64-66.
- Echelard Y, Memili E, Ayres SL, O'Coin M, Chen LH, Meade HM and Behboodi E. 2004. Comparison of the developmental potential of caprine nuclear transfer embryos derived from *in vitro* and *in vivo* matured oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.*, 16:140.
- Hill JR, Roussel AJ, Cibelli JB, Edwards JF, Hooper NL, Miller MW, Thompson JA, Looney CR, Westhusin ME, Robl JM and Stice SL. 1999. Clinical and pathological features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology*, 51:1451-1465.
- Hill JR, Winger OA, Long CR, Looney CR, Thompson JA and Westhusin ME. 2000. Development rates of male bovine nuclear transfer embryo derived from adult and fetal cell. *Biol. Reprod.*, 62:1135-1140.
- Keefer CL, Baldassarre H, Keyston R, Wang B, Bhatia B, Bilodeau AS, Zhou JF, Leduc M, Downey BR, Lazaris A and Karatzas CN. 2001. Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and nontransfected fetal fibroblasts and *in vitro*-matured oocytes. *Biol. Reprod.*, 64:849-856.
- Keefer CL, Keyston R, Lazaris A, Bhatia B, Begin I, Bilodeau AS, Zhou FJ, Kafidi N, Wang B, Baldassarre H and Karatzas CN. 2002. Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. *Biol. Reprod.*, 66:199-203.
- McGrath J and Solter D. 1983. Nuclear transplantation of rat embryos. *J. Exp. Zool.*, 248:303-305.
- Melican D, Butler R, Hawkins N, Chen LH, Hayden E, Destremes M, Williams J, Lewis T, Behboodi E, Ziomek C, Meade H, Echelard Y and Gavin W. 2005. Effect of serum concentration, method of trypsinization and fusion/activation utilizing transfected fetal cells to generate transgenic dairy goats by somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology*, 63:1549-1563.
- 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. Fertil. Dev.*, 16:151.
- Park HS, Jin JI, Hong SP, Lee JS and Jung JY. 2001. Effect of laser drilling on blastocyst hatching and pregnancy rates from *in vitro* produced cattle embryos. *Theriogenology*, 55:352.
- Park HS, Lee MY, Hong SP, Jin JI, Park JK, Lee JS, Sohn SH and Jung JY. 2004. Comparison of developmental potential of *in vivo* and *in vitro* recipient oocytes after nuclear transfer in goat. *Reprod. Fertil. Dev.*, 16:154.
- Reggio BC, James AN, Green HL, Gavin WG, Behboodi E, Echelard Y and Godke RA. 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.
- Walker SK, Hartwich KM and Seamark RF. 1996. The production of unusually large offspring following embryo manipulation: Concepts and challenges. *Theriogenology*, 45:111-120.
- Wells DN, Misica PM, Day AM and Tervit HR. 1997. Production of cloned lambs from an established embryonic cell line: A comparison between *in vivo*- and *in vitro*-matured cytoplasts. *Biol. Reprod.*, 57:385-393.

- Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ and Campbell KHS. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385:810-813.
- Young LE, Sinclair KD and Wilmot I. 1998. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev. Reprod.*, 3:155-163.
- Zakhartchenko V, Durcova-Hills G, Stojkovic M, Scherthaner W, Prella K, Steinborn R, Muller M, Brem G and Wolf E. 1999. Effects of serum starvation and re-cloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts. *J. Reprod. Fertil.*, 115:325-331.
- Zou XG, Chen Y, Wang Y, Luo JP, Zhang QB, Zhang XC, Yang Y, Ju HM, Shen Y, Lao W, Xu S and Du MA. 2001. Production of cloned goats from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei or fused with cumulus cells. *Cloning*, 3:31-37.
- Zou XG, Wang UG, Cheng Y, Yang YE, Ju HM, Tang HL, Shen Y, Mu ZY, Xu SF and Du MA. 2002. Generation of cloned goats (*Capra hircus*) from transfected foetal fibroblast cell, the effect of donor cell cycle. *Mol. Reprod. Dev.*, 61:164-172.
- 박희성, 김태숙, 이윤희, 정수영, 이명열, 홍승표, 박준규, 김충희, 정장용. 2004. 재래산양에 있어서 핵이식란의 융합조건이 융합 및 체외발달에 미치는 영향. *한국동물번식학회지*, 28:127-132.
- 이지삼, 광대오, 박충생. 1985. 재래산양의 계절적 무발정기의 혈중 progesterone의 변화에 관한 연구. *한국축산학회지*, 27:749-755.

(접수일: 2006. 6. 10 / 채택일: 2006. 6. 20)