

복제 산양(진순이)의 체세포 핵이식에 의한 Re-Cloning에 관한 연구

정수영·박희성*

진주산업대학교 동물생명과학과·동물생명산업연구센터

Re-Cloning by Somatic Cell Nuclear Transfer from a Cloned Korean Native Goat

S. Y. Jung and H. S. Park*

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

SUMMARY

The present study was conducted to examine some factors affecting *in vitro* development and fecundity of embryos re-cloned with somatic cell nuclear transfer (SCNT). Fibroblast cells retrieved from the ear of a 3-week-old, cloned Korean goat (Jinsoonny) were used as karyoplast donors and serum-starvation was conducted in tissue culture medium (TCM)-199 supplemented with 0.5% FBS. Recipient oocytes were surgically collected by flushing the oviducts 35 h after hCG injection following FSH priming. The zona pellucidae of the oocytes were partially perforated with a laser drill and a donor cell was transferred into an enucleated oocyte. The couplets were electrically fused and activated by ionomycin (5 min) and 6-DMAP (4 h). The reconstructed embryos were cultured in mSOF medium containing 0.8% BSA at 39°C in an atmosphere of 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ for 12 to 15 h. Re-cloned embryos (2- to 4-cell stages) were surgically transferred into the oviducts of the recipients and pregnancy was subsequently diagnosed by progesterone assay and ultrasound on Days 21 and 63 of pregnancy. The fusion rate following 1st fusion pulse was higher ($p<0.05$) in 2nd cloning (65.9%) compared to 1st cloning (51.0%), but it was not different in the other groups. The rate of cleavage after fusion was significantly higher ($p<0.05$) in 1st (77.7%) than in 2nd cloning (56.0%). A total of 175 re-cloned embryos were transferred into 28 recipients. On day 21 and 60 after transfer, 11 (39.3%) and 4 recipients (17.4%) were pregnancy, respectively. In comparison of pregnancy rate by estrous synchronization, a total of 66 and 109 re-cloned embryos were transferred into 11 recipients in natural estrus and 17 recipients in induced estrus, respectively. Five (45.4%) and 2 recipients (18.2%) in natural estrus were pregnant on days 21 and 63 while 6 (35.3%) and 2 (11.8%) recipients in induced estrus were pregnant, respectively. These results show that re-cloning of goat can be achieved by SCNT and estrous synchronization between donor and recipient animals may be one of the major factors affecting success rate.

(Key words : re-cloning, fibroblast cell, nuclear transfer, fusion, mSOF, pregnant)

서론

핵이식 기법은 유전적으로 능력이 우수한 개체를 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 희귀·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 기

법이 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.

우리나라 재래 산양은 체구가 작고 온순하므로 다루기 쉽고 임신 기간이 짧기 때문에 생명공학 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 요구됨에도 불구하고 기대할 만한 연구 결과가 없었다. 1999년 Baguisi

* 본 연구는 산업자원부 지정 진주산업대학교 동물생명산업연구센터(RAIRC)와 (주) 이지바이오시스템의 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

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

등이 처음으로 복제 산양 생산에 성공한 후, Reggio 등(2001), Keefer 등(2002), Zou 등(2002), Melican 등(2004), 박 등(2006) 및 Shen 등(2006)이 복제 산양 생산에 성공한 바 있다. 복제동물의 재복제 기법은 특정 단백질 생산을 위한 형질 전환 복제동물의 생산 관련 연구에 있어서 생산한 형질 전환 복제동물로부터 특정 물질의 분비가 확인된 경우, 형질 전환 복제동물을 재복제를 통하여 다수를 확보할 수 있는 매우 유용한 기술이다. 그러나 우리나라 재래 산양은 재복제를 포함한 핵이식에 관한 연구는 전무하며, 복제 동물로부터 재복제에 관한 연구는 돼지를 포함한 극소수를 제외하고는 거의 없는 실정이다.

본 연구는 체세포 핵이식에 의한 산양 복제 수정란의 생산 효율을 높이기 위한 기초 자료를 얻고자 재래 산양의 체세포 핵이식에 의하여 생산한 복제 산양(진순이)의 조직으로부터 공여핵을 배양한 다음 다시 핵이식을 실시하여 재복제에 따른 융합율과 분할율, 이식후의 수태율 등을 조사하여 재복제 가능성 여부를 검토하였다.

재료 및 방법

1. 공핵 세포의 배양 및 보존

공핵 세포(1st)는 모색이 흰색인 성숙한 암컷 재래 산양(*Capra hircus*)으로 부터 귀조직을 5×5 mm 정도 크기로 절제하여 채취하였으며, 미세하게 세절하여 0.25% trypsin-EDTA (Sigma, U.S.A)가 첨가된 D-PBS로 분리한 다음 10% FBS가 첨가된 TCM-199로 25 cm² flask(Falcon, U.S.A)에 분주하여 5% CO₂, 98~99% 습도, 39℃ 배양기내에서 계대 배양을 실시하였다. 재복제(re-cloning)를 위한 공핵 세포는 체세포 핵이식에 의해 태어난 복제 산양(진순이)의 귀조직으로부터 1st 공핵 세포의 분리 방법과 동일한 방법으로 분리, 계대 배양을 실시하여 사용하였다. 배양한 공핵 세포의 동결은 10% DMSO(Sigma, U.S.A) 및 10% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 동결 보존해 두고, 핵이식에 사용할 때는 39℃ 온수에 용해하여 동결 보호제를 제거한 다음 10% FBS가 첨가된 신선한 TCM-199 배양액을 첨가하고 4-well dish에 분주하여 배양기 내에서 배양을 실시하였다. 세포가 dish 바닥에 monolayer 형성이 충분히 되었을 때 0.5% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 3~5 일간 기아 배양을 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 적응시킨 다음 본 연구에 사용하였다. 사양 관리는 일반 관행법에 따라 사육하되 농후 사료는 추가 급여하였으며, 식염과 물은 자

유 섭취토록 하였다.

3. 과배란 유도

수핵 난자의 회수를 위하여 다음과 같은 방법으로 과배란 유기를 실시하였다. Progesterone 제제인 CIDR(Progesterone 0.3 g, Eazi Breed, InterAg, New Zealand)를 10일간 재래 산양의 질내에 삽입하고 과배란 처리는 CIDR 삽입 후 8, 9, 10일째에 1일 2회 12시간 간격으로 총 70 mg의 FSH(Follitropin-V, Vetrepharm, Canada)를 감량법으로 근육 주사하였으며, PMSG (Folligon, Intervet, Netherland)의 경우는 CIDR 삽입 제 8일째에 PMSG 1,000 IU를 1회 근육 주사하였다. PGF_{2α}(Lutalyse, Upjohn, U.S.A.)는 8일째에 FSH 또는 PMSG 투여와 함께 10 mg을 근육 주사하고 CIDR는 10일째에 제거와 동시에 hCG (Chorulon, Intervet, Netherland) 400 IU를 근육주사하여 과배란을 유도하였다.

4. 수핵 난자의 회수

성숙 난자(*In vivo*)의 회수는 외과적인 방법으로 난관에서 관류 방법으로 난자를 회수하였다. 먼저 과배란 처리한 산양을 약 24시간 절식시킨 다음 2% xylazine(립폰, 바이엘, 한국)을 0.2 mg/kg 근육 주사하여 진정 마취시키고, HCl ketamine(케타민, 유한양행, 한국)을 11 mg/kg 근육 주사하여 마취를 유도하였다. 마취가 도입된 산양은 복정증상을 절개하여 난관과 난소를 체외로 노출시킨 다음 배란점을 확인한 후 난자의 회수를 위하여 catheter(Tom Cat, Kendall Co., U.S.A.)를 난관 누두부로 삽입하여 5~10 ml의 D-PBS(Sigma Co., U.S.A.) 배양액을 난관-자궁 접합부 쪽에서 주입하여 관류하였다.

5. 핵이식

핵이식을 위한 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.

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 수핵 난자는 M2(Sigma, U.S.A.) 배양액에 7.5 μg/ml의 cytochalasin B(Sigma, U.S.A)를 첨가하여 탈핵을 실시하였으며, 공핵 세포는 먼저 주입용 피펫에 흡입 loading하였다. 수핵 난자는 탈핵 및 주입용 피펫의 삽입을 용이하게 하기 위하여 zona drilling한 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 drilling은 Park 등(2001)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, laser system이 부착된 도립현미경하에서 laser 전용 렌즈($\times 400$)로 drilling할 수핵 난자의 투명대를 맞춘 다음 20~40 μsec 의 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.

6. 핵과 세포질의 융합 및 활성화 처리

핵이식이 완료된 난자의 공핵 세포와 수핵 난자의 세포질 융합은 전기세포 융합장치(BTX, U.S.A)로 실시하였다. 이때 융합 배지는 0.05 mM CaCl_2 (Sigma, U.S.A), 0.1 mM MgSO_4 (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 주입하여 핵은 전극의 “+” 극쪽으로 향하게 하고, 세포질은 “-” 극쪽으로 향하게 하여 직류 전류(DC)로 2.40 kv/cm, 15~30 μsec , 1회 통전하여 세포 융합을 유도하고 1시간 후에 융합 여부를 판단하여 융합이 되지 않은 핵이식란은 동일 방법으로 두 번째 융합을 실시하였다. 세 번째도 같은 방법으로 1시간 후에 통전하고 10% GS가 첨가된 M16 배양액으로 배양을 실시하였다. 융합이 이루어진 핵이식란의 활성화 처리는 핵이식 조작 후 약 3시간 동안 전 배양을 실시한 다음 5 μM 의 ionomycin 용액에서 5분, 2 mM 6-DMAP 용액에서 4시간 동안 처리하여 활성화를 유도하였다.

7. 복제 수정란의 체외 배양

복제 수정란의 배양은 0.8% BSA가 첨가된 mSOF 배양액(5% CO_2 , 5% O_2 , 90% N_2 , 96~98% humidity, 39 $^\circ\text{C}$)에서 약 12~20시간동안 배양을 실시하면서 2~4세포기로의 발달을 유도하였다.

8. 수란 산양의 발정 동기화, 이식 및 임신 진단

수란 산양의 발정 동기화는 공란 산양의 과배란 처리 방법

과 동일한 방법으로 실시하되 CIDR 삽입 후 8일째에 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 10 mg을 병용 투여하고 11일째에 hCG 400 IU를 투여하여 발정을 유도하거나 자연 발정이 온 개체를 수란 산양으로 이용하였다. 복제 수정란의 이식은 외과적인 방법으로 실시하였는데 절식, 마취, 복부 절개 및 봉합은 난자의 회수시의 방법과 동일한 방법으로 실시하였다. 마취가 도입된 산양은 복정중선을 절개하여 실험실에서 개조하여 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 임신 진단을 실시하고, Progesterone 농도는 이식 후 21일째와 63일째의 혈액을 채취하여 RIA 방법으로 분석(네오딘 수의검사센터, 서울)을 검사하였다.

9. 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. 재복제란의 융합율과 분할율

체세포 핵이식에 의한 재복제란(2nd)을 반복 융합을 실시하였을 때 융합율과 분할율은 Table 1에서 보는 바와 같다. 재복제란을 전기 자극에 의한 융합을 1회 실시하였을 때 융합율은 65.9%로서 복제란(1st)의 융합율 51.0%보다 유의적($p < 0.05$)으로 높았으며, 2회 전기 자극을 실시하였을 때는 각각 77.4 및 63.9%로서 차이가 없었으나, 3회 재복제란의 융합율도 87.5%로서 복제란의 70.1%와 유의적인 차이는 없었다. 재복제 융합란의 분할율은 56.0%로서 복제 융합란의 77.7%보다 낮았다.

Begin 등(2004)은 핵이식란의 융합을 위하여 전기 자극을 3회 주었을 때 융합율은 40.0%(1회), 64.0%(2회) 및 78.0%(3회)로 각각 나타나 본 연구 결과와 유사한 경향을 나타내었다. Butler 등(2004)은 2회까지 전기 자극을 주었을 때 융합율은

Table 1. Effects of re-cloning on fusion and development of caprine SCNT oocytes

Cloning	No. of couplets	No. of fused embryos (%)			No. of oocytes cleaved (%)
		1st pulse	1st+2nd pulse	1st+2nd+3rd pulse	
1st	147	75 (51.0) ^a	94 (63.9) ^a	103 (70.1) ^a	80 (77.7) ^a
2nd	208	137 (65.9) ^b	161 (77.4) ^a	182 (87.5) ^a	102 (56.0) ^b

* Values with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

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

85%라고 보고하여 본 연구 결과보다는 다소 높은 성적을 나타내었다. Echelard 등(2004)은 체내 성숙 난자를 수핵란으로 이용하였을 때 융합율은 68%로서 도축장 유래 난포란의 63%와 차이가 없다고 하였다. 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%). Melican 등(2005) 1회 융합 실시 후 융합이 이루어지지 않은 핵이식란을 2회 융합을 실시하였을 때 융합율과 분할율은 각각 43 및 67%로서 1회 융합을 실시하였을 때보다 높았다고 보고하였다. Shen 등(2006)은 체내 성숙 난자 수핵란으로 사용하여 융합과 활성화를 2.33 kv/cm, 15 usec 1회 전기 자극을 동일한 방법으로 실시하였을 때 64.8%의 융합율과 65.6%의 분할율을 보여 본 연구 결과와 유사한 성적이었다.

재래 산양의 재복제에 관한 연구 결과는 국내·외적으로 전무하여 비교하기는 곤란하지만 융합율에 차이는 없는 것으로 사료되며 분할율의 경우도 본 연구에서는 배양 후 약 12시간에 판단을 하였기 때문에 다소 차이가 있을 수 있다. 이러한 이유는 2 및 4-세포기 단계에서 난관에 이식을 실시하였기 때문이다. 본 연구에서 융합을 위한 전기 자극을 3회까지 실시한 것은 재래 산양의 경우 소나 돼지에 비하여 수핵란의 확보가 어렵고 융합을 또한 매우 낮은 편이다. 따라서 보다 효율을 높이기 위하여 실시하였으나 3회의 경우는 비정상적인 분할란이 많았다. 또한, 재래 산양의 경우는 전기 융합시 전기 자극의 세기가 연구자에 따라서 많은 차이가 있으며, 융합율이나 분할율도 이에 따라서 차이를 보이고 있다. 이러한 이유는 재래 산양의 경우는 사육되는 종류도 다양하고 서식국의 기후를 포함한 사육 환경이 다르기 때문인 것으로 생각된다(박 등, 2006).

2. 재복제란의 이식에 의한 수태율

재복제란을 수란 산양에 이식을 실시하여 임신 제21일과 63일째 임신 진단을 실시하였을 때 수태율과 수란 산양의 발정 주기 방법에 따른 수태율은 Table 2 및 3에서 보는 바와 같다.

재복제란의 21일째 수태율은 39.3%로서 복제란의 17.4%보다 유의적($p < 0.05$)으로 높았으며, 63일째는 각각 14.3 및 13.0%로서 복제회수에 따른 수태율의 차이는 없었다. 수란 산양의 발정 주기 방법에 있어서 제 21일째에 자연 발정이 발현된 수란 산양의 수태율은 45.4%로서 인위적으로 발정 동기화를 유도한 수란 산양의 35.3%보다 높았다. 제 63일째는 각각 18.2 및 11.8%로서 차이가 없었다.

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

Table 2. Effect of re-cloning on pregnancy rate by caprine SCNT

Cloning	No. of embryos transferred	No. of recipients	No. of pregnant goats (%)	
			D21	D63
1st	154	23	4 (17.4) ^a	3 (13.0) ^a
2nd	175	28	11 (39.3) ^b	4 (14.3) ^a

* Values with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

Table 3. Effect of recipient estrous synchronization on pregnancy rate by caprine SCNT

Recipient estrus	No. of embryos transferred	No. of recipients	No. of pregnant goats (%)	
			D21	D63
Natural	66	11	5 (45.4) ^a	2 (18.2) ^a
Induced	109	17	6 (35.3) ^b	2 (11.8) ^a

* Values with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

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, 3두는 유산하였다고 보고하였다. 이러한 결과는 산양의 복제에 있어서 본 연구 결과와 다른 보고들에서 보는 바와 같이 임신 확인 후에도 분만시까지의 상당수의 수란 산양이 유산되는 것으로 보인다.

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 수란 산양이 3두의 복제 산양을 생산함으로써 이식되어진 복제 수정란이 산자로 태어난 효율은 2.1~5.2%라고 보고하였다.

Shen 등(2006)은 핵이식란의 활성화 처리를 6-DMP(2 mM)과 전기 자극(2.33 Kv/cm, 15 usec 1회)에 의한 방법으로 실시하였을 때 7두의 수란 산양중 2두가 임신하였으나, 1.67 kv/cm, 15 usec 1회의 자극에서는 전혀 임신이 되지 않았다고 하였다.

Keefe 등(2002)은 공핵 세포를 달리하였을 때 융합율은 60~87%였으며 임신율은 17~50%, 산자 생산 효율은 3.7~7.7%라고 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 없다

고 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. Melican 등(2004)은 공란 산양과 수란 산양의 동기화 시간을 ± 0 로 하였을 때 12두(10%)가 수태하였으나, 이중 10두(83%)만 산자 생산에까지 이르렀으며, 복제 산자 생산 효율은 1.6%라고 하였다. Melican 등(2005) 1회 융합실시 후 융합이 이루어지지 않은 핵이식란을 2회 융합을 실시하였을 때 융합율과 분할율은 각각 43 및 67%로서 1회 융합을 실시하였을 때보다 높았으며, 수태율도 제 50일째에는 6두가 수태하였으나 4두의 수란 산양만 분만에까지 이르렀다고 하였다. Echelard 등(2004)은 수핵 난자를 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.

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(Kecfer 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 배양 시간이 매우 짧은 등 핵이식 프로그램의 차이에 기인한다(Young 등, 1998; Walker 등, 1996).

우리나라 재래 산양은 계절 번식을 하기 때문에(이 등, 1985) 연간 실험할 수 있는 기간이 매우 짧고 다른 개량된 축종에 비하여 편차가 심하며 수란 산양의 발정 동기화는 계절에 따라 많은 차이를 보였다. 본 연구에서 볼 때 복제(1st)나 재복제(2nd)의 방법의 차이라든지 방법 간에 유의할만한 결과의 차이는 없었다. 산양의 복제는 다른 종에 비하여 생산 효율이 매우 낮은 실정이다. 그러나 유용 가치가 높은 형질 전환 복제 동물의 특정 개체수를 늘리기 위한 연구에는 매우 유용한 기술임에는 분명하다. 따라서 앞으로 생산 효율의 개선을 위해서는 무엇보다도 질이 좋은 난자의 다량 확보, 산양 수정란 체외 배양 체계 확립, 이식 기법의 개발 및 이식 후 수정란 및 태아의 손실을 최소화 하여야 할 것으로 생각된다.

적 요

본 연구는 재래 산양의 체세포 핵이식에 의하여 생산한 복

제 산양(진순이)의 조직으로부터 공여 핵을 배양하여 다시 핵이식을 실시하여 재복제에 따른 융합율과 분할율, 이식 후의 수태율 등을 조사하여 재복제 가능성 여부를 검토하기 위하여 실시하였다.

공여 세포는 귀 유래 섬유아세포를 분리 배양하여 사용하였으며, 체내 성숙 난자는 성숙한 미경산 재래 산양에 과배란을 유기하여 외과적인 방법으로 난관 관류를 통해 회수하여 핵이식을 실시하였다. 핵이식란의 융합은 전기 자극 방법으로 실시되었으며, 융합이 완료된 핵이식란의 활성화 처리는 핵이식 3시간 후에 Ionomycin과 6-DMAP를 병용 처리하여 실시하였다. 복제 수정란의 체외 배양은 0.8% BSA가 첨가된 mSOF 배양액으로 2~4 세포기까지 체외 배양을 실시한 다음 수란 산양의 난관에 외과적으로 이식하였다. 임신 진단은 발정일로부터 제 30일과 60일째에 초음파 임신 진단기로 임신 진단을 실시하고, Progesterone 농도는 이식 후 21일째와 63일째의 혈액을 채취하여 RIA 방법으로 검사하였다.

체세포 핵이식에 의한 재복제란(2nd)을 전기 자극에 의한 융합을 1회 실시하였을 때 융합율은 65.9%로서 복제란(1st)의 융합율 51.0%보다 유의적($p < 0.05$)으로 높았으며, 2회 전기자극을 실시하였을 때는 각각 77.4 및 63.9%로서 차이가 없었으나, 3회 재복제란의 융합율도 87.5%로서 복제란의 70.1%와 유의적인 차이는 없었다. 재복제 융합란의 분할율은 56.0%로서 복제 융합란의 77.7%보다 낮았다.

재복제란을 수란 산양에 이식을 실시하여 임신 제21일과 63일째 임신 진단을 실시하였을 때 수태율과 수란 산양의 발정 유기 방법에 따른 수태율에 있어서 재복제란의 21일째 수태율은 39.3%로서 복제란의 17.4%보다 높았으며, 63일째는 각각 14.3 및 13.0%로서 복제 회수에 따른 수태율의 차이는 없었다. 수란 산양의 발정 유기 방법에 있어서 제 21일째에 자연 발정이 발현된 수란 산양의 수태율은 45.4%로서 인위적으로 발정 동기화를 유도한 수란 산양의 35.3%보다 높았다. 제 63일째는 각각 18.2 및 11.8%로서 차이가 없었다.

이상의 결과로 볼 때 재래 산양의 체세포 핵이식에 의한 복제효율에 있어서는 복제와 재복제간에 차이가 없었으며, 수란 산양의 발정 동기화 방법에 따른 수태율에 있어서도 차이가 없었다. 그러나 앞으로 재래 산양의 복제 효율 개선을 위해서는 양질 난자의 다량 확보, 산양 수정란의 체외 배양 체계 확립, 이식 기법의 개발 등에 관한 후속 연구가 이루어져야 할 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. *Nature Biotechnology*, 17:456-461.
- Begin I, Bhatia B, Rao K, Keyston R, Pierson JT, Neveu N, Cote F, Leduc M, Bilodeau AS, Huang YJ, Lazaris A, Baldassarre H, Wang B and Karatzas CN. 2004. Pregnancies resulted from goat embryos produced by couplets in the presence of lectin. *Reprod. Fert. Dev.*, 16:136 (abstr).
- Butler RE, Melican D, Hawkins N, Jellerette T, Nims S, Graslise K and Gavin W. 2004. Effects of cycloheximide on caprine somatic cell nuclear transfer embryo and fetal development. *Reprod. Fert. 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. Fert. 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.
- Melican D, Butler R, Hawkins N, Chen LH, Hayden E, Destrempe 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. Fert. 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.
- 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.
- Shen PC, Lee SN, Wu JS, Huang JC, Chu FH, Chang CC, Kung JC, Lin HH, Chen LR, Shiao JW, Yen NT and Cheng WTK. 2006. The effect of electrical field strength on activation and development of cloned caprine embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, 92:310-320.
- 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.
- Wilmut 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 Wilmut I. 1998. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev. Reprod.*, 3:155-163.
- Zakhartchenko V, Durcova-Hills G, Stojkovic M, Schernthaner W, Prelle 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. Fert.*, 115:325-331.
- 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 융합 조건이 융합 및 체외발달에 미치는 영향. *한국동물번식학회지*, 28:127-132.
- 박희성, 김태숙, 정수영, 박준규, 이지삼, 정장용. 2006. 공핵 세포 및 발정동기화가 복제 재래 산양 생산에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지*, 21:137-146.
- 이지삼, 곽대오, 박충생. 1985. 재래산양의 계절적 무발정기의 혈중 progesterone의 변화에 관한 연구. *한국축산학회지*, 27:749-755.
-

(접수일: 2007. 6. 11 / 채택일: 2007. 6. 21)