韓國家畜繁殖學會誌 18(3) : 217~228(1994)
Korean J. Animal Reprod.

핵치환에 의한 Clone Animal의 생산에 관한 연구

Ⅰ. 생쥐 수정란의 세포막 융합과 난모세포의 활성화에 미치는 전기자극의 효과

이상진 · 구덕본 · 이상민 · 박흠대* · 정순영** · 이훈택 · 정길생
건국대학교 동물자원연구센터

Production of Clone Animals by Nuclear Transplantation

Ⅰ. Effects of Electrostimulation on Membrane Fusion of Embryos and Activation of Oocytes in Mouse

Lee, S.J., D.B. Koo, S.M. Lee, H.D. Park*, S.Y. Chung, H.T. Lee and K.S. Chung**
Animal Resources Research Center, College of Animal Husbandary, Kon-Kuk University

SUMMARY

These experiments were carried out to establish the optimal condition of electrostimulation inducing cell fusion and oocyte activation for nuclear transplantation in mouse embryos. Eggs selected for cell fusion or activation by electrostimulation were equilibrated for 5~10 min. in 0.3M sucrose solution and electrostimulated for 60μsec using 1 pulse of 60, 70, 80, 90 or 100 volts DC with electrodes 0.2 mm apart. Then they were cultured in 20μl drops of Tyrode's solution. The results of these experiments are as follows :

1. When one pulse of 60, 70, 80, 90 or 100 volts DC for 60μsec were applied to 2-cell embryos for fusion of blastomeres, fusion rates were 50.0, 81.7, 91.7, 100 and 100%, respectively; and developmental rates of fused embryos to blastocyst were 76.7 to 81.5%. Higher fusion rates were observed in 90V and 100V.
2. The average cell number in fused embryos developed to blastocyst was about half of the cell number in diploid controls; and the cell number decreased with increasing of voltages.
3. When pulse numbers were increased, fusion rates improved, but developmental rates were not significantly different from the group for which the number of pulse was not increased. And the cell number of blastocyst decreased even more.
4. Oocytes aged for 6hrs after ovulation were electrostimulated for oocyte activation by the same method used for cell fusion. Rates of oocyte activated by electrostimulation were 45.3 to 60.4%, and fragmentation rates were 7.5~15.1%. The lysis rates were 17.0~34.0%.

The results of these experiments indicate that the optimal condition for achieving cell fusion and activation is 1 pulse, duration 60μsec in 90 Volt. The results also show that this condition is suitable for nuclear transplantation using mouse eggs.

*대구대학교 공과대학 생물공학과 (College of Engineering, Tae-Gu University)
**삼육대학교 낙농자원과 (Department of Dairy Farming Resources, Korean Sahmyook University)

I. 서 론

핵치환 과정에 있어서, 수용란으로 성숙한 제 2 난모세포를 사용할 경우, 공여핵과 수용란의 세포막 융합과 융합된 핵치환 배의 활성화 과정은 성공적인 clone animal을 생산하는데 필수적인 과정이다. 이러한 세포융합과 난모세포의 활성화 과정은 수용란의 세포질 속으로 공여핵을 도입하는 과정일 뿐만 아니라, 수용란의 세포질속에 존재하는 maturation promoting factor(MPF)와 같은 생물학적 활성을 가진 여러가지 세포질 인자들을 활성화시켜 수정된 난자의 배발생을 유도하는 과정이다. 따라서 이들 방법은 핵치환에 의한 개체발생에 관한 연구는 물론, 이에 관련된 핵의 동일성, 핵과 세포질의 상호작용 및 핵의 전능성(nuclear totipotent)등과 같은 기초적인 난자의 생물학적 기능에 관한 연구 수단을 제공해 준다.

먼저 세포융합의 경우, 생쥐를 중심으로 한 핵치환 연구의 초기에는 공여핵과 수용란의 상호 융합을 유도하기 위하여 불활성 sendai virus(McGrath와 Solter, 1983a, b, 1984; Robl 등, 1986), 혹은 polyethylene glycol(PEG)등(Spindle, 1981)과 같은 생물학적, 화학적인 세포융합법이 성공적으로 사용되어 왔지만, 이러한 세포융합 물질은 생쥐 이외의 포유동물(Robl 등, 1987)의 세포융합에 사용하였을 때, 그 융합효율은 극히 저조하며, 또한 세포의 생존성도 저하된다. 따라서 최근에는 생쥐를 비롯한 모든 포유동물의 핵치환 배를 융합시키는 데에는 전기자극에 의한 세포융합법이 주로 사용되고 있다(Kubiak 등, 1985; Ozil 등, 1986; Willadsen, 1986; Kato 등, 1987; Robl 등, 1987, 1992; Taniguchi 등, 1991). 전기자극에 의한 세포융합의 기본 원리는 전기자극이 세포에 가해지는 동안, 공여핵의 막과 수용란의 세포질 막은 일시적으로 불안정한 상태하에 놓이게 됨으로써 두 세포막은 융합이 이루어지게 된다(Zimmerman과 Vienken, 1982; Sowers, 1989). 이 방법은 기존의 생물학적, 화학적인 세포융합법과는 달리 전기자극에 관련된 전장, 통전회수, 통전시간등과 같은 여러가지 물리적인 요소들을 정확하게 측정할 수 있고, 아주 짧은 시간 동안 세포융합 물질에 세포를 노출시킴으로써, 일관된 세포의 융합효율 및 생존성을 얻을 수 있는 장점이 있다(Tsunoda 등, 1987, Annelies 등, 1993, Mitani 등, 1993).

한편 수정된 난자가 개체로 발생하기 위해서는 난자의 세포질 속으로 침입한 정자가 웅성전핵을 형성하여 개체의 발생을 완료하는데 필요한 여러가지 세포질 인자들이 활성화되어야만 한다(Uehara 등, 1976). 이러한 난모세포의 활성화는 정자의 침입과 같은 자연적인 상태에서는 물론 alcohol, hyaluronidase, Ca^{2+} 이온 주입, Ca-ionophore, Ca^{2+} 이온이 제거된 배양액, 마취제, 단백질합성 억제인자, 온도충격 및 전기자극등과 같은 여러가지 화학적 물리적 처리에 의해 인위적으로 유도할 수 있다(Whittingham, 1980 ; Cutherbertson과 Cobbold, 1985). 그 중에서도 전기자극에 의한 난자의 활성화 방법은 안정되고, 조작하기도 용이하며, 반복적이어서, 최근 세포의 융합실험과 함께 난자의 활성화 실험에도 가장 유용하게 널리 사용되고 있는 방법이다.

Hamster(Igusa와 Hyasaki, 1986)와 생쥐(kline와 Kline, 1991)의 경우, 난모세포는 수정시에 세포내 Ca^{2+} 이온의 반복적이고, 일시적인 상승이 일어나는데, 이러한 세포내 Ca^{2+} 이온의 상승이 난모세포의 활성화를 유도하는 주된 요인이다. 따라서 전기융합법도 자연적인 수정시에 난자의 활성화가 유도되는 것과 같이, 토끼 난모세포의 세포내 Ca^{2+} 이온의 일시적인 상승을 인위적으로 유도함으로써, 난모세포의 활성화를 유도시킬 수 있다.

따라서 핵치환의 경우, 전기자극으로 난모세포의 활성화를 유도하면, 핵적출된 제 2 난모세포의 위란강 속으로 주입된 공여핵이 세포질과 융합된 후, 세포질 속으로 도입된 공여핵은 세포융합 바로 직후에 일어나는 nuclear envelope breakdown, premature chromosome condensation(PCC), chromatin decondensation 및 nuclear swelling으로 이어지는 핵의 형태학적, 기능적인 변화 즉 핵의 remodelling 과정과 핵의 reprogramming 과정을 경험함으로써, 핵치환 배는 1-세포기 수정란의 핵과 같은 정상적인 핵으로서, 개체로의 발생능을 가지게 된다(Stice와 Robl, 1988; Collas 등, 1991, 1992a, b). 따라서 치환된 핵이 정상적인 개체로 발생하기 위해서는 상술한 바와 같이, 공여핵이 수용란의 세포질과 융합됨과 동시에 MPF의 활성화를 위한 핵치환 배의 활성화가 유도되

어야만 한다. 그러나 활성화가 일어나지 않는다면, 배의 발생은 지속되지 않고, 발생을 정지하게 된다(Uehara 등, 1976; Komar, 1982; Stice 등, 1988; Prather와 First, 1990; Henery와 Kaufman, 1993). 그러므로 자연적인 체내 및 체외수정에서 정자가 난자에 침입하는 것과 같은 정도의 난자 활성화를 유도하는 것이 필수적인데, 이것은 인위적으로 적절하게 전기자극의 강도, 지속시간 및 통전회수를 조절하면 가능하게 된다(Witkowska, 1973; Kaufman 등, 1975; Collas 등, 1989)

이와 같이 전기융합법은 두 세포질막의 융합과 난모세포의 활성화를 동시에 유도시킬 수 있는 유용한 방법이지만, 세포융합시 공여핵과 수용란의 세포질간의 접촉정도(cell contact), 배열상태(alignment), 전장의 강도(field strength), 통전지속시간(pulse duration) 및 통전회수(pulse number)등과 같은 여러가지 세포융합의 측면과 난모세포의 노화 및 수정의 상태에 따른 난자의 활성화 비율, 그리고 사용하는 연구자와 연구실에 따라서 상당한 차이가 있다(Robl 등, 1992).

이에 본 연구에서는 핵치환을 위한 기초연구로서, 생쥐의 2-세포기 수정란과 난모세포를 이용하여 핵치환 배의 세포융합과 활성화에 필요한 최적의 전기융합 조건 즉 전장의 강도, 통전지속시간 및 통전회수 등을 구명하기 위하여 실시하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

본 연구에 사용된 재료와 방법을 요약하면 다음과 같다.

1. 공시동물

공시동물은 ICR계통의 생쥐로써, 자성생쥐는 4~6주령, 체중은 15~20 g, 웅성생쥐는 10~14주령, 체중은 30~45 g의 성숙이 완료된 생쥐를 사용하였다. 이들 생쥐의 사육조건은 일조시간을 14시간으로 조절하고, 고형사료와 식수는 무제한 공급하였다.

2. 배양액

본 연구에 사용된 기초 배양액은 NaCl : 5.7190 g/L, KCl : 0.1060 g/L, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$: 0.0960 g/L, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$: 0.1290g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$: 0.2620g /L, $NaHCO_3$: 2.1010g/L, Na-lactate : 4.6510g/L, Glucose : 1.0000g/L, Na-pyruvate : 0.0520g/L에 Penicillin-G(75mg/ml)와 Streptomycin(5mg/ml)및 3mg/ml의 BSA(bovine serum albumin ; Sigma, U. S. A.)를 함유한 수정 Tyrode's 용액이었고, 전기자극에 의한 수정란의 할구융합과 난모세포의 활성화를 위한 세포융합용 배양액은 0.05M $CaCl_2$와 0.1mM $MgSO_4$가 첨가된 0.3M Sucrose 용액을 사용하였다.

먼저 난자의 회수와 전기자극 처리된 난자의 배양을 위한 배양액은 상술한 기초배양액을 사용하였고, 회수된 난모세포의 난구세포를 제거하는 데에는 기초배양액에 300 μg/ml의 hyaluronidase를 첨가하여 사용하였다.

이들 모든 배양액의 pH는 7.2~7.4, 삼투압은 280~290mOsM. 로 조정하였고, 사용직전에 0.22 혹은 0.45μm의 milliphore filter(German Science Inc., U. S. A.)를 사용하여 여과, 제균한 다음, 소량으로 분주하여 4℃의 냉장고에서 보관하면서 사용하였다.

한편 배양조건은 37℃, 5% CO_2, 95% 공기조건하의 CO_2 배양기에서 수정란의 경우 72시간, 난모세포의 활성화 경우에는 24시간 동안 배양하면서 배의 발달상태를 24시간 간격으로 관찰하였다.

3. 다배란 처리와 난자회수

자성생쥐의 복강내에 5IU의 pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG ; Intervet, Holland)을 주사한 다음, 48시간 후에 동일한 방법으로 5IU의 human Chorionic Gonadotropin(hCG ; Sigma, U. S. A.)를 주사하여 다배란을 유도하였고, 수정란을 회수하기 위하여, 다배란 유도 후, 즉시 자성생쥐와 웅성생쥐를 1:1의 비율로 합사시켜 자연교미를 유도하였다.

전기자극에 의한 세포융합에 공시할 2-세포기 수정란은 hCG 주사후 48~50시간째에 경추탈골법으로 생쥐를 도살하여, 해부침을 부착한 1ml 주사기로써 난관팽대부에서 2-세포기 수정란을 회수하였고, 난모세포는 hCG 주사후 16~18시간째에 난관팽대부에서 난구세포에 둘러싸인 난자를 회수한 다음, 6시간 동안 추

가 배양을 하여 난모세포의 활성화를 위한 실험에 사용하였다.

4. 전기자극에 의한 수정란의 융합및 난모세포의 활성화

회수된 2-세포기 수정란의 두개의 할구를 서로 융합시키기 위하여 먼저 2-세포기 수정란을 petri dish속에 미리 준비된 비전해질로 구성된 세포융합용 배양액에서 3~5분간 평형을 실시한 다음, 실체 현미경하에 고정된 fusion chamber속에 세포융합용 배양액을 채운다. 그리고 평형이 완료된 2-세포기 수정란은 fusion chamber 속에 설치된 200μm거리의 두 전극 사이에 mouth pipette을 이용하여 옮기고, 2-세포기 수정란의 두개의 할구가 서로 두 전극에 평행이 되도록 mouth pipette으로 배열한 다음, 실험목적에 따라 통전지속시간은 60μsec로 고정하고, 60, 70, 80, 90, 및 100V의 직류전압을 1회 각각 전기자극 처리를 실시하였다.

한편 난모세포의 활성화를 위한 전기자극 처리도 상술한 수정란의 막융합과 동일한 방법으로 실시하였다.

이때, 사용된 세포융합기기는 Model 611 Square Wave Stimulator (Phipps & Bird, U. S. A.)를 사용하였으며, fusion chamber는 실험실에서 자체제작한 것을 사용하였고, 한번의 세포융합에 공시되는 난자의 수는 3~5개로 제한하였다. 전기자극 처리가 완료된 수정란과 난모세포는 fusion chamber의 융합용 배양액에서 신선한 기초배양액으로 옮긴 다음, 3회 세척하고, 20μl 의 배양용 배양액속으로 옮겨서 실험목적에 따라 적절한 시간동안 배양하였다.

5. 세포융합의 판정

신선한 배양용 배양액으로 옮겨져서 배양되는 전기자극 처리된 2-세포기 수정란의 세포융합 판정은 두개의 할구가 1-세포기와 같이 하나의 할구로 관찰될 때를 세포융합의 판정기준으로 삼았으며, 배양후 매 5분 간격으로 30분 동안 융합의 여부를 관찰하였다.

6. 전기자극 처리된 수정란 및 난모세포의 배양

융합이 완료된 수정란은 배양용 배양액 소적(10~20μl)에서 72시간 동안 37℃, 5% CO_2, 95% 공기조건하의 CO_2 배양기에서 배양하면서 24시간 간격으로 배의 발생율을 조사하였다. 그리고 전기자극 처리된 난모세포의 경우도 신선한 배양액으로 3회 세척한 다음, 배양용 배양액 소적(10~20μl)에서 24시간 동안 배양하여 난자의 활성화 여부를 염색을 통하여 핵상을 관찰하거나 배의 난할율로 조사하였다.

7. 배양된 난자의 염색과 결과의 판정

융합된 2-세포기 수정란을 72시간 동안 배양한 다음, 배반포 단계까지 발달한 난자의 정상성 여부를 확인할 목적으로 20μg /ml의 Hoechst 33342로 5~10분간 37℃에 염색한 다음, 형광현미경하에서 배반포의 핵의 수를 조사하였다.

전기자극 처리된 난모세포는 24시간 동안 배양한 다음, 배의 난할율을 위상차 현미경하에서 관찰하고, 활성화의 여부는 20μg /ml의 Hoechst 33342와 Lacmoid 염색을 두가지를 실시하여 조사하였다.

염색방법은 먼저 배양된 난모세포를 신선한 배양액으로 세척한 다음, 2.5% Glutaraldehyde 용액으로 난자의 투명대를 고정하고, 4℃ 냉장고에서 10% 중성 Formalin 용액으로 6~12시간 동안 난자의 세포질을 고정한 후, 0.25% Lacmoid 염색액으로 5~10분간 염색을 실시한다.

핵상의 상태에 따라 Meta. Ⅱ, Ana. Ⅱ, Telo. Ⅱ, 및 Pronucleus로 구분하였으며, Meta. Ⅱ의 핵상을 가진 난자는 활성화가 유도되지 않은 난자로 판정하고, Ana. Ⅱ, Telo. Ⅱ 및 Pronucleus의 핵상을 가진 난자는 활성화가 유도된 난자로 판정하였다.

8. 통계분석

수정란의 세포융합율과 배발생율 및 난모세포의 활성화 비율은 모두 χ^2 검정으로 통계처리를 실시하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 2-세포기 수정란의 전기융합

2-세포기 생쥐 수정란의 최적 융합효율의 조건을 설정하기 위하여, 세포융합에 제공할 모든 2-세포기 수정란은 세포융합용 배양액(0.3M sucrose)에서 10~15분간 평형을 실시한 다음, 세포융합용 배양액이 들어있는 융합 chamber에서 60, 70, 80, 90 및 100V의

Table 1. Effect of various voltages on the fusion of mouse 2-cell embryos

Voltages used	No. of embryos examined	No. (%) of embryos fused
100	60	60 (100.0)[a]
90	60	60 (100.0)[a]
80	60	55 (91.7)[b]
70	60	49 (81.7)[b]
60	60	30 (50.0)[c]

* Results were pooled from 6 replicates.

* Pulse duration and number were 60 μsec and 1 pulse for each voltage.

[a,b] Values with different superscripts in the same column are different($P<0.05$).

[c] Values with different superscripts in the same column are significantly different($P<0.01$).

직류전압으로 각각 60 μsec동안 1회 통전 처리한 후, 매 5분 간격으로 30분간 관찰하여 얻은 세포융합의 결과를 표 1에 제시하였다.

Table 1에서 보는 바와 같이, 실험에 사용된 60, 70, 80, 90 및 100V의 직류전압에서 각각 100%, 100%, 91.7%, 81.7%, 및 50.0%로 사용된 모든 전압에서 할구융합이 이루어졌다. 그 중에서도 90V와 100V에서는 처리한 모든 2-세포기 할구가 융합되어 가장 높은 성적을 나타내었으며, 그 다음이 80V와 70V로 처리한 구였고, 60V로 처리한 구의 융합 성적이 가장 낮았다. 따라서 90V와 100V 두 구간에는 유의차가 인정되지 않았고, 80V와 70V 사이에도 유의차가 인정되지 않았지만, 90~100V와 70~80V 사이에는 유의한 차가 인정되었고($P<0.05$), 90~100V와 60V, 70~80V와 60V 사이에는 각각 고도의 유의한 차가 인정되었다($P<0.01$). 또한 모든 처리구에서 전기자극을 가한 후, 15분 이내에 할구의 융합이 완료되었다(Fig. 1). 본 연구의 60~70V에서 얻은 성적은 Kubiak과 Tarkowski(1985)의 67%, Kono와 Tsunoda(1988)의 80.0%와는 일치하는 성적이었으나, 80V~100V의 전압을 사용하여 얻은 성적(91.7~100%)보다는 낮은 성적이였고, 또한 본 연구에서 80V~100V의 전압을 사용하여 얻은 성적은 Kato와 Tsunoda(1987)의 67~100%, Taniguchi 등(1991)의 84.6~100% 및 Cheong 등(1991)의 93~98%와는 거의 일치하는 성적이였다. 이러한 결과에서 나타나는 차이는 연구를 수행할 때 사용하는 fusion chamber내의 전극의 거리, 전압, 통전시간, 통전회수, 배양액, 기구 등의 차이에 기인한다. 따라서 연구자는 자기 실험실 고유의 최적 세포융합 조건을 확립할 필요가 있다. 특히 세포융합을 위한 배양액으로 본 연구에서 사용된 0.3M sucrose 용액이 세포융합을 위한 배양액으로 기존의 Zimmerman의 용액(1982)을 대신해도 융합성적에는 아무런 영향도 미치지 않았으며, 일부는 Zimmerman의 용액보다 양호한 결과를 얻었다. 따라서 본 연구의 결과, 세포융합에 사용되는 직류전압은 90V혹은 100V, 세포융합용 배양액은 0.3M sucrose 용액을 사용하는 것이 양호한 세포융합 성적을 얻는데 효과적이라고 생각된다.

2. 융합된 2-세포기 수정란의 배발달

융합이 완료된 수정란은 전술한 신선한 배양액으로 세척하여 20~30μl의 세포배양용 배양액으로 옮긴 다음, 5% CO_2 배양기에서 72시간 동안 배양하면서 매 24시간 간격으로 배발생의 정도를 관찰하고(Fig. 1), 배반포기까지 발달한 배는 Hoechst 33342로 염색하여 형광현미경하에서 그 핵의 수를 조사하였다(Table 2, Fig. 2).

Table 2에서는 융합된 2-세포기 수정란의 배발생율을 조사하였던 바, 대조구의 수정란은 공시된 60개의 수정란 중에서 51개가 배반포로 발달하여 85%의 성적을 얻었고, 100, 90, 80, 70 및 60V의 전압으로 처리된 처리구의 성적은 각각 76.7, 76.7, 81.5, 77.6 및 76.7%로 처리구들 사이에는 유사한 배발생율을 얻었고, 그 중에서 80V의 전압으로 처리한 구의 성적이 가장 양호하였다. 그러나 대조구와 처리구 그리고 처리구들 사이의 각각의 배발생의 정도를 비교할 때, 이들 상호간에는 유의한 차가 인정되지 않았다. 이러한 성적은

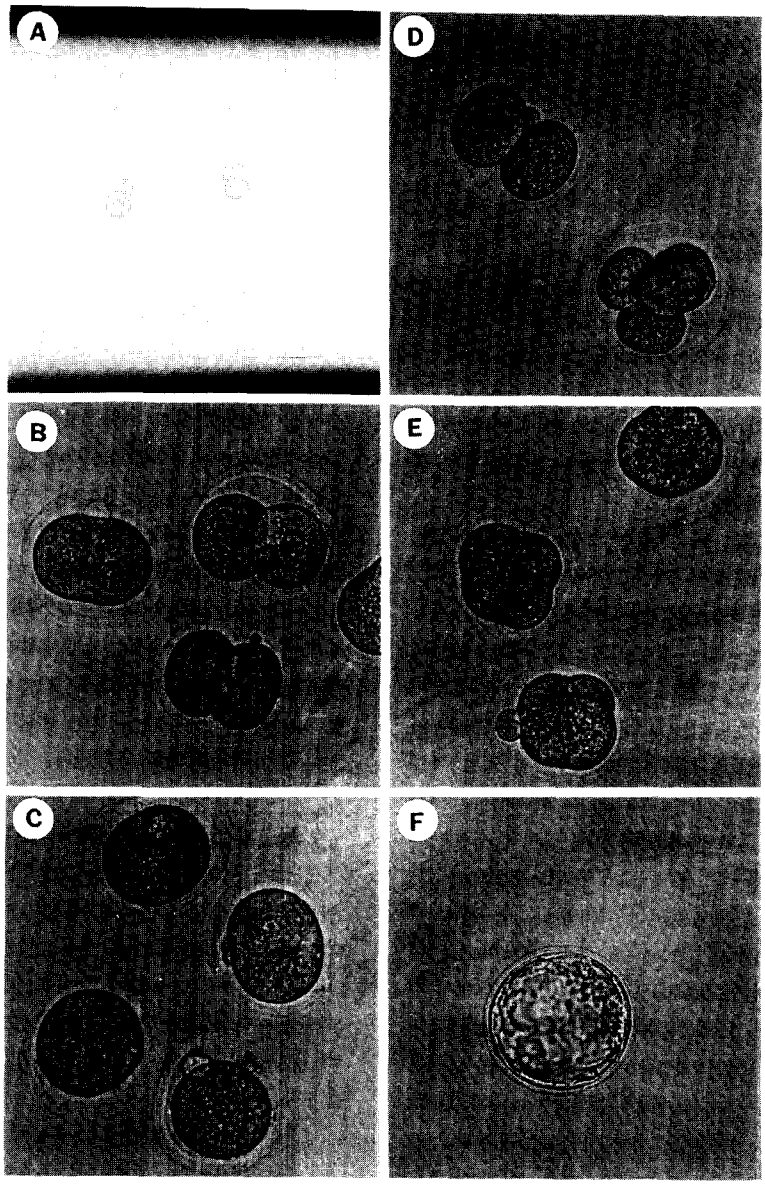

Fig. 1. This series shows that after electrostimulation, blastomeres of mouse 2-cell embryos are fused and developed into blastocyst.

A. 2-cell embryos between the electrodes 0.5mm apart were arranged for electrostimulation.

B. 2-cell-embryos fusing 10 min. after electrostimulation.

C. 2-cell embryos fused 15 min. after electrostimulation.

D. Fused-embryos cleavaged 24 hrs after electrostimulation.

E. Fused-embryos compacted 48hrs after electrostimulation.

F. Fused-embryos developed into blastocyst by culturing 72hrs after electrostimulation.

Table 2. Effect of various voltages on *in vitro* developmental ability of fused 2-cell embryos developed to blastocyst after electrofusion

Voltages used	No. (%) of fused-embryos		Mean cell no. of blastocyst[a]
	Examined	Developed to blastocyst*	
Control	60	51(85.0)	100.5
100	60	46(76.7)	44.5
90	60	46(76.7)	58
80	54	44(81.5)	64
70	49	38(77.6)	67
60	30	23(76.7)	68

[a] 20 blastocysts per each group were used to count the number of nucleus.

* $P>0.05$

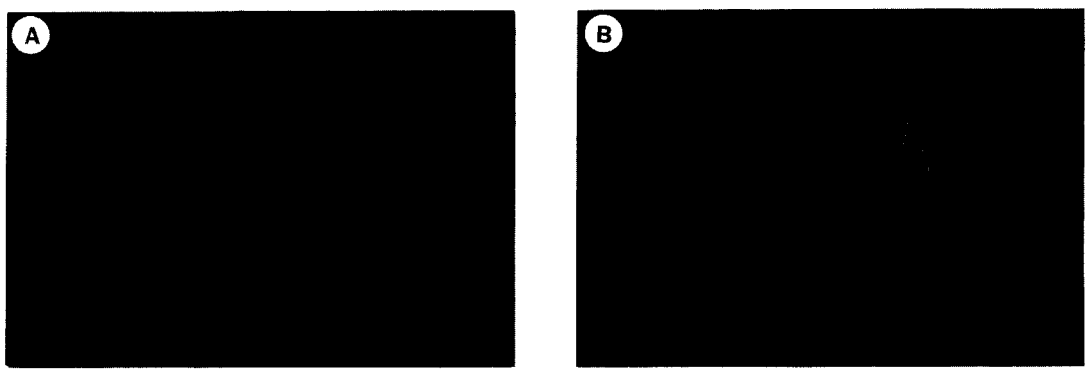

Fig. 2. Blastocyst from Fig. 1 is stained with Hoechst 33342 so that its nuclei can be counted(200×).
A. Control blastocyst
B. Blastocyst developed after electrostimulation
(1 pulse, duration 60μsec in 90 Volt)

Kato와 Tsunoda(1987)의 84~100%, Taniguchi 등(1991)의 81.8~100% 및 Cheong 등(1991)의 80.7~96.9%보다는 다소 저조한 성적이었는데, 이는 사용되는 배양액과 통전시간, 통전회수, 전압등과 같은 전기자극을 위한 여러가지 실험조건 때문이라고 생각된다.

또한 배반포기까지 발달한 융합된 난자는 형태학적으로 정상적이였고, 배반포의 특징인 뚜렷한 내부세포괴를 가지고 있었다(Fig. 1, 2). 그러나 배반포의 핵의 수를 조사한 결과(Table 2), 대조구의 난자는 평균 100.5개가 관찰되었고, 처리구의 난자(100, 90, 80, 70 및 60V)는 각각 44.5, 58, 64, 67, 및 68개로 처리된 전압의 세기가 강할수록 조사된 핵의 수는 감소하는 경향을 보였고, 대조구의 핵과 비교할 때, 역시 전체 처리구는 대조구의 핵의 수보다 현저하게 감소하였다. 그러나 처리구의 핵의 수가 감소한 대신에 처리구의 핵의 크기는 약 1.3배 정도 대조구의 것보다 커진 것을 관찰할 수 있었고, 처리구 사이에는 대개가 유사한 크기였으나 전압의 강도가 강할수록 커지는 경향이 있었다(Fig. 1). 이와 같은 결과에서 Kubiak과 Tarkowski(1985)는 전기융합의 결과 4배체가 된 2-세포기 수정란이 배양되어 배반포로 발달했을 때, 그 배반포의 세포수는 평균 26개였고, 대조구의 세포수는 평균 47개로 전기처리 난자의 세포수가 대조구 난자의 세포수

Table 3. Effects of pulse number and various voltages on the fusion and development of mouse 2-cell embryos after electrofusion

Voltages used	Pulse number	No(%). of embryos			Mean cell no. of blastocysts[@]
		Examined	Fused	Developed to blastocysts	
Control	–	60	–	48(80.0)	81.3
100	1	60	60(100.0)[a]	46(76.7)	44.5
100	3	60	60(100.0)[d]	43(71.7)	31.3
60	1	60	30(50.0)[b]	23(76.7)	58
60	3	60	* 43(71.7)[e]	32(74.4)	42
30	1	60	0[c]	–	–
30	3	60	0[f]	–	–

@ 20 blastocysts per each group were used to count the number of cells.

Pulse duration was 60 μsec for each voltage.

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

[abc, def] Values with different superscripts in the same column are significantly different($P<0.01$).

의 약 1/2정도였다고 보고하였고, Taniguchi 등(1991)도 대조구의 평균 세포수는 F1 계통의 난자가 102.9, ICR 계통이 97.3개인데 비해 전기처리된 난자는 47.3개라고 보고하였고, 이는 본 연구의 결과와 일치하는 것이었다. 이렇게 처리구의 세포수가 대조구의 세포수보다 적은 이유는 처리구의 난자가 대조구의 난자보다 난할율이 떨어지기 때문이다(Taniguchi 등, 1991). 따라서 이러한 원인이 4배체 난자의 착상후 발생정지와 어떤 관계가 있는지는 알 수 없다. 그러나 처리구의 난자의 핵이 대조구의 난자의 핵의 크기보다 큰 원인도 전기자극에 그 원인이 있다고 인정되나 구체적으로는 알 수 없고, 이에 대해서는 향후 좀더 구체적인 연구가 필요하다고 사료된다.

3. 수정란의 융합과 배발생에 미치는 통전회수의 효과

전기자극에 의한 세포융합과 배발생의 효율에 미치는 통전회수의 효과를 검토하기 위하여 통전시간을 60μsec로 고정하고, 30V, 60V 및 100V에서 각각 1회와 3회씩 통전회수를 조절하여 얻은 결과를 Table 3에 제시하였다.

Table 3에서 보는 바와 같이, 100V에서는 통전회수에 관계없이 공시된 모든 수정란이 융합을 완료하였고, 60V에서는 1회 통전하였을 때, 공시된 60개의 난자 중 30개가 융합되어 평균 50%의 융합율을 보였고, 3회 통전하였을 때에는 60개 중, 43개가 융합되어 7%의 융합성적을 나타내었다. 그러나 30V의 전압에서는 통전회수에 관계없이 융합된 난자는 관찰되지 않았다. 그리고 60V의 경우, 1회 통전보다는 3회 통전시켰을 때, 융합율이 더욱 높았다.

융합된 수정란을 배양하였을 때, 배반포기까지 발달한 난자는 60V와 100V에서는 통전회수에 관계없이 평균 71.7~76.7%로 대조구의 80.0%와 유의한 차는 인정되지 않았다.

배반포기까지 발달한 융합된 난자의 세포수에 있어서도 Table 2와 유사한 결과를 얻었지만, 100V에서 1회 통전처리하여 얻은 배반포의 세포수는 44.5개, 3회 통전처리한 난자의 것은 31.3개였고, 60V에서는 1회 통전이 58개, 3회 통전이 42개로 60V와 100V 두 구공히 전압의 세기에 관계없이 세포수가 감소하였다. 따라서 본 연구에서 얻은 결과는 통전회수를 증가시키면 명백한 세포융합의 효과는 인정되고, 배반포기로의 배발생율은 통전회수에 관계없이 유사한 성적을 얻을 수 있고, 또한 통전회수의 증가는 세포수를 현저하게 감소시키는 것으로 보아 전기융합을 위한 실험에서 통전 회수의 증가는 바람작하지 않다고 생각된다. 그 이

Table 4. Effect of various voltages on electrical activation of mouse oocytes*

Voltages used	No(%). of oocytes				
	Examined	Activated @	Fragmented	Lysed	Unidentified
100	53	27(50.9)	8(15.1)	17(32.1)	1(2.0)
90	53	27(50.9)	6(11.3)	18(34.0)	2(3.8)
80	53	32(60.4)	8(15.1)	9(17.0)	4(7.6)
70	53	24(45.3)	4(7.5)	16(30.2)	9(17.0)
60	53	30(56.6)	4(7.5)	14(26.4)	5(9.5)

* Pulse duration and number of electrostimulation for oocyte activation were applied 60 μsec and 1 pulse per each voltage.

@ AII, TII and pronucleate oocytes were evaluated to be activated oocytes by staining with Hoechst 33342 dye.

유로서 Gulyas(1976)는 난자에 전기자극을 가하면, microvilli, cortical granule의 수, meiotic spindle의 한외구조적 변화가 심하게 발생한다고 보고하였다. 그러나 핵치환시 낮은 전장에서 여러번 전기자극을 가하는 것이 배의 융합과 발생에 효과적이라는 보고도 있다(Kline와 Kline, 1991).

4. 미수정란의 활성화

난자의 활성화에 최적인 조건을 확립하기 위하여 통전시간을 60 μsec로, 통전회수를 1회로 고정하고, 60, 70, 80, 90 및 100V의 전압을 hCG 투여후 16~18시간째에 회수하여 6시간 동안 배양기에서 배양하여 노화시킨 난자에 각각 처리한 다음, 그 활성화의 정도를 Table 4에 제시하였다.

Table 4에서 보는 바와 같이, 60, 70, 80, 90 및 100V의 전압을 난자에 처리하였을 때, 활성이 유도된 난자의 비율은 각각 56.6, 45.3, 60.4, 50.9 및 50.9%로서 비교적 낮은 성적이였으나, 80V에서 가장 양호한 성적을 얻었다. 그러나 처리된 전압에 따른 각각의 성적간에 유의차는 인정되지 않았다. 그리고 처리된 전압에 따른 세포의 파편화 비율은 7.5~15.1%였고, 파열된 난자의 비율은 17~32.1%로 비교적 높았으며, 확인 불가능한 난자의 비율도 10%정도였다. 이와 같은 본 연구의 활성화에 대한 성적은 Onodera와 Tsunoda(1989)의 78% 보다는 떨어지는 성적이였으나, 토끼에서 Stice와 Robl(1988)이 배란후 6시간 동안 노화시켜 얻은 52%와는 유사한 성적이였으며, Collas 등(1989)의 32%, Didion 등(1990)이 85V, 30 μsec에서 얻은 30%보다는 높은 성적이였다.

Collas 등(1989)과 Henery 등(1993)은 난모세포의 전기적 활성화에서 이러한 차이가 발생하는 원인은 전기자극에 사용되는 전압의 강도, 통전시간, 통전회수, 난자의 노화정도 및 배양액의 차이에 기인하는 것이라고 보고하였다.

Kaufman(1973)과 Webb등(1986)은 배란과 난모세포의 활성화 사이의 최적시간은 20시간이라고 보고한 바 있다. 따라서 난자의 노화는 보다 쉽게 난자를 활성화시킬 수 있다. 그러나 hCG 주사후 25시간째에 전기자극에 의해 난자가 활성화될 때, 난자의 파편화 비율은 더욱 높아지게 되며, 그의 발생능도 저하된다(Austin, 1961; Kaufman, 1978; Collas 등, 1989).

이상의 본 연구의 결과를 종합하여 고찰하여 볼 때, 전기자극에 의한 최적의 세포융합과 난자의 활성화 조건은 전압의 강도는 80V~100V, 그 중에서 90V가 가장 좋으며, 통전시간은 60 μsec, 통전회수는 1회, 세포융합을 위한 배양액은 0.3M sucrose를 사용할 때, 양호한 세포융합과 난모세포의 활성화를 유도시킬 수 있다고 생각한다.

Ⅳ. 적 요

본 연구는 생쥐 2-세포기 수정란과 미수정란을 이용하여 핵치환시 세포융합과 난자의 활성화에 사용할 최적의 전기자극 조건을 설정하기 위하여 실시하였다. 전기융합과 난자의 활성화에 제공되는 난자는 전기자극 처리전에 0.3M sucrose 용액에서 5~10분간 평형

을 실시한 다음, 60 μsec 동안 100, 90, 80, 70 및 60V의 직류전압에서 1회 통전처리하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 2-세포기 수정란을 각각 다른 전압(100, 90, 80, 70 및 60V)하에 전기자극 에 노출하였을 때, 모든 처리구에서 할구융합이 일어났으며, 그 중에서도 90V와 100V에서는 100%의 난자가 융합되었다.
2. 융합된 수정란을 사용된 전압의 종류에 따라 체외 발생능을 조사한 결과, 배반포기까지 발달한 난자는 76.7~81.5%였고, 사용된 전압에 따른 유의차는 인정되지 않았다. 그러나 배반포의 핵의 수는 대조구의 약 1/2이였고, 전압의 강도가 강할수록 핵의 수는 감소하는 경향을 보였다.
3. 통전회수의 증가는 세포융합율에는 효과가 인정되었으나, 융합된 배의 발생율에는 효과가 인정되지 않았고, 배반포의 핵의 수 또한 더욱 감소시키는 경향을 보였다.
4. 난모세포의 활성화를 위해서 회수된 난모세포를 6시간 동안 노화시킨 다음 수정란의 융합시에 사용했던 전기자극 조건과 동일한 방법으로 난모세포의 활성화를 유도한 결과, 활성화가 유도된 난자의 비율은 45.3~60.4%로 처리된 전압의 상호간에 유의한 차는 인정되지 않았다. 그러나 난자의 파편화 비율과 전기융합시 파열된 난자의 비율은 각각 7.5~15.1%와 17.0~34.0%로 비교적 높게 나타났다.

이상의 본 연구의 결과를 살펴보면, 전기자극에 의한 최적의 세포융합과 난자의 활성화 조건은 전압의 강도는 90V, 통전시간은 60 μsec, 통전회수는 1회, 세포융합을 위한 배양액은 0.3M sucrose 용액을 사용하는 것이 핵치환시 양호한 세포융합과 난모세포의 활성화를 유도시킬 수 있다고 생각한다.

V. 인용문헌

1. Annelies, E. P., V. Stekelenburg-Hamers, W. G. Van Inzen, T. A. E. Van Achterberg, T. A. M. Kruip, S. W. De Laat and S. M. Weima. 1993. Nuclear transfer and electrofusion in bovine *in vitro*-matured / *in vitro*-fertilized embryos : Effect of media and electrical fusion parameters. Mol. Reprod. Dev., 36:307-312.
2. Austin, C. R. 1961. The mammalian egg. Blackwell, Oxford.
3. Cheong, H. T., T. Taniguchi, M. Hishinuma, Y. Takahashi, and H. Kanagawa. 1991. Effects of various electric fields on the fusion and *in vitro* development of mouse two-cell embryos. Theriogenology, 36(5):875-885.
4. Collas, P., J. J. Balise, G. A. Hofmann and J. M. Robl. 1989. Electrical activation of mouse oocytes. Theriogenology, 32:835-844.
5. Collas, P. and J. M. Robl. 1991. Relationship between nuclear remodeling and development in nuclear transplant rabbit embryos. Biol. Reprod., 45:455-465.
6. Collas, P., Clara Pinto-Correia, F. Abel Ponce De Leon and J. M. Robl. 1992. Effect of donor cell cycle stage on chromatin and spindle morphology in nuclear transplant rabbit embryos. Biol. Reprod., 46:501-511.
7. Collas, P., J. J. Balise, and J. M. Robl. 1992. Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. Biol. Reprod., 46:492-500.
8. Cutherbertson, K. S. R. and P. H. Cobbold. 1985. Phorbol ester and sperm activate mouse oocytes by inducing sustained oscilations in cell Ca. Nature, 316:541-542.
9. Didion, B. A., M. J. Martin and C. L. Markert. 1990. Parthenogenetic activation of mouse and pig oocytes *in vitro*. Theriogenology, 33:1165-1175.
10. Gulyas, B. A. 1976. Ultrastructural observations on rabbit, hamster and mouse eggs following electrical stimulation *in vitro*. Am. J. Anat., 147:203-218.
11. Kono, T. and Y. Tsunoda. 1988. Effects of induction current and other factors on

large-scale electrofusion for pronuclear transplantation of mouse eggs. Gamete Res., 19:349-357.

12. Henery, C. C. and M. H. Kaufman. 1993. The incidence of aneuploidy after single pulse electroactivation of mouse oocytes. Mol. Reprod. Dev., 34:299-307.
13. Igusa, Y. and S. Miyasaki. 1986. Periodic increase of cytoplasmic free calcium in fertilized hamster eggs measured with calcium -sensitive electrodes. J. Physiol., 377:193 -205.
14. Kato, Y. and Y. Tsunoda. 1987. Blastomere fusion of mouse 2-cell embryos by electric stimulus. Jpn. J. Anim. Reprod., 33:19-26.
15. Kaufman, M. H., E. Huberman and L. Sachs. 1975. Genetic control of haploid parthenogenetic development in mammalian embryos. Nature, 254:694-695.
16. Kaufman, M. H. 1978. The experimental production of mammalian partheno- genetic embryos. In: Daniel, J. C. (ed). Methods in mammalian reproduction. Academic press, New York, pp. 21-47.
17. Kaufman, M. H. 1973. Parthenogenesis in the mouse. Nature, 242:475-476.
18. Kline, D. and J. T. Kline. 1991. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. Develop. Biol. (in press).
19. Komar, A. 1982. Fertilization of parthenogenetically activated mouse egg; 1. Behaviour of sperm nuclei in the cytoplasm of parthenogeneti- cally activated egg. Exp. Cell Res., 139:361-367.
20. Kubiak, J. Z., and A. K. Tarkowski. 1985. Electrofusion of mouse blastomere. Exp. Cell Res., 157:561-566.
21. McGrath, J. S. and D. Solter. 1983a. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. Science, 220:1300 -1302.
22. McGrath, J. S. and D. Solter. 1983b. Nuclear transplantation in mouse embryos. J. Exp. Zool., 228:355-362.
23. McGrath, J. S. and D. Solter. 1984. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. Science, 226:1317-1319.
24. Mitani, T., K. Utsumi and A. Iritani. 1993. Developmental ability of enucleated bovine oocytes matured *in vitro* after fusion with single blastomeres of eight-cell embryos matured and fertilized *in vitro*. Mol. Reprod. Dev., 34:314-322.
25. Onodera, M. and Y. Tsunoda. 1989. Parthenogenetic activation of mouse and rabbit eggs by electric stimulation *in vitro*. Gamete Res., 22:277-283.
26. Ozil, J. P. and J. A. Modlinski. 1986. Effects of electric field on fusion rate and survival of 2-cell rabbit embryos. J. Embryol. Exp. Morph., 96:211-228.
27. Prather, R. S., F. L. Barnes, M. M. Sims, J. M. Robl, W. H. Eyestone and N. F. First. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryo : assessment of donor nuclei and recipient oocyte. Biol. Reprod., 37:859-866.
28. Prather, R. S. and N. L. First. 1990. Cloning of embryos. J. Reprod. Fert., Suppl. 40:227-234.
29. Robl, J. M., B. Gilligan, E. S. Critser and N. L. First. 1986. Nuclear transplantation in mouse embryos : Assessment of recipient cell stage. Biol. Reprod., 34:733-739.
30. Robl, M. M., R. S. Prather, F. L. Barnes, W. H. Eyestone, B. D. Northey, B. Gilligan, and N. L. First. 1987. Nuclear transplantation in bovine embryos. J. Anim. Sci., 64:642-647.
31. Robl, J. M., R. Fissore, P. Collas and R. T. Duby. 1992. Cell fusion and oocyte acti-

vation. In G. E. Seidel(ed) : "Proc. Symb. Cloning Mammalian Embryos". Jan. Fort Collins. pp. 24-25. Sowers(eds). Handbook of Electroporation and Electrofusion. Academic Press, San Diego.

32. Sowers, A. E. 1989. The mechanism of electroporation and electrofusion in erythrocyte membranes. In "Electroporation and electrofusion in cell biology"(E. Neuman, A. E. Sowers, and C. A. Jordan, eds.), Plenum Press, New York. pp. 229-256.
33. Spindle, A. 1981. Polyethylene glycol-induced fusion of two-cell mouse embryo blastomeres. Exp. Cell Res., 131:465-470.
34. Stice, S. L. and J. M. Robl. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. Biol. Reprod., 39:657-664.
35. Taniguchi, T., H. T. Cheong and H. Kanagawa. 1991. Fusion and development rates of single blastomere pairs of mouse 2-and 4-cell embryos using the electrofusion method. Theriogenology, 36:645-654.
36. Tsunoda, Y., Y. Kato and Y. Shioda. 1987. Electrofusion for the pronuclear transplantation of mouse eggs. Gamete Research, 17:15-20.
37. Uehara, T. and R. Yanigimachi. 1976. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. Biol. Reprod., 15:467-470.
38. Webb, M., S. Howlett and B. Maro. 1986. Parthenogenesis and cytoskeletal organization in aging mouse eggs. J. Embryol. Exp. Morph., 95:131-145.
39. Whittingham, D. G. 1980. Parthenogenesis in mammals. Oxford Rev. Reprod. Biol., 2:205-231.
40. Willadsen, S. M. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. Nature, 320:63-65.
41. Witkowska, A., 1973. Parthenogenetic development of mouse embryos in vivo. : I. Preimplantation development. J. Embryol. Exp. Morph., 30:519-545.
42. Zimmerman, U. and J. Vienken. 1982. Electric field-induced cell-to-cell fusion. Membrane Biol., 67:165-182.