

소 체외수정란의 단일분할구와 제핵미수정란 융합배의 초기발생에 관한 연구

김정익 · 정희태 · 박춘근 · 양부근

강원대학교 축산대학

Developmental Ability of Enucleated Bovine Oocytes Matured *In Vitro* Following Fusion with a Single Blastomere of Embryos Matured and Fertilized *In Vitro*

Kim, C. I., H. T. Cheong, C. K. Park and B. K. Yang

College of Animal Agriculture, Kangwon National University

SUMMARY

This study was conducted to examine the condition of activation of the nuclear transplant bovine embryos. *In vitro* fertilized (IVF) and nuclear transplant embryos (NTs) were co-cultured with bovine oviduct epithelial tissue (BOET). NTs were treated with cycloheximide (CHXM) for 0 to 6 h after electrofusion to investigate the activation condition of recipient ooplasm. Then, the influence of the CHXM treatment timing on the cleavage and development of NTs were investigated in relation to the nuclear transplant time. The cleavage rates of NTs were increased with the increasing time of the CHXM treatment from 0 to 6 h (54.7 to 91.3%, $P < 0.01$). Similar trend was shown in the development into the morula or blastocyst stage, but very limited. Activation of enucleated oocytes prior to fusion enhanced development of NTs compared with that post fusion. This result suggests that the frequency of activation of NTs can be greatly enhanced by treating with CHXM for 6 h. The result also suggests that if blastomeres of unknown cell cycle stage are used, activation of enucleated oocytes prior to fusion enhances development of NTs.

I. 서 론

핵이식에 의한 복제동물생산(cloning)기술의 확립은 경제적으로 우수한 가축의 유전형질을 대량 복제할 수 있다는 점에서 커다란 잠재적 의미를 가진다. 가축에 있어 수정란의 핵이식에 의한 면양의 생산이 Willadsen(1986)에 의해 최초로 보고된 이래, 학문적인 면과 산업적인 차원에서 많은 연구가 급진전되어 다른 가축에 있어서도 성공례가 보고되었고(Smith와

Wilmut, 1989; Prather 등, 1987, 1989) 심지어 복제가축의 생산에 성공하기에 이르렀다(Bondio 등, 1990; Westhusin 등, 1992; Sims와 First, 1993; Stice와 Keefer, 1993).

핵이식기술은 발육 도중에 있는 수정란의 핵을 제핵미수정란세포질에 이식하여 개체를 생산하는 기술이므로, 핵이식란의 정상적인 발육을 위해서는 제핵미수정란세포질이 활성화 되어야 한다. 소의 핵이식의 경우 난세포질의 활성화는 핵과 세포질의 융합시에 부여되는 전기적 자극에 의해 동시에 실시할 수 있으나

이 논문은 1993년도 교육부 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

(Prather 등, 1987), 어린 난자를 recipient로 사용할 경우에는 활성화율이 극히 저조하다. 따라서 난세포질의 활성화 효율을 높이기 위하여 제핵후 핵이식 및 융합시간을 지연시켜 난세포질의 과성숙을 유도하거나 (Sims 등, 1991; Barnes 등, 1993a; Stice와 Keef-er, 1993), 전기융합후 추가적인 활성화 처리를 실시하기도 한다(First 등, 1992; Aoyagi 등, 1994).

한편, 소의 핵이식에 있어서 기존의 많은 연구들은 난자 및 수정란을 모두 체내에서 회수하여 사용하였는데 많은 수의 난자를 확보하기 위하여 최근에는 도축된 소의 난소로부터 미성숙난포란을 회수하여 체외성숙시킨 후 핵이식에 공여하고 있으며(Barnes 등, 1993a, b; Keefer 등, 1993; Kono 등, 1993; Yang 등, 1993; Aoyagi 등, 1994), 체외수정란이 핵이식의 donor로 이용되고 있다(Keefer 등, 1993; Kono 등, 1993; 김 등, 1993).

본 연구는 소 체외성숙, 체외수정 유래의 난자 및 배를 이용하여 핵이식을 실시하여 핵이식란의 활성화 처리 조건을 검토하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난자 및 배의 준비

핵의 donor용으로 사용할 수정란은 도축장에서 회수한 소의 난소로부터 채취한 난포란을 10% fetal calf serum(FCS; Gibco, NY, USA), 0.2mM Na-pyruvate, FSH(Sigma, St. Louis, MO, USA) 0.02U/ml, 17-β estradiol(Sigma) 1μg/ml 및 gentamycin(Sigma) 50μg/ml이 첨가된 TCM 199(Gibco)액중에서 39℃, 5% CO₂ 및 95% 공기조건하에 22~24시간 성숙배양 후, heparin(Sigma) 10μg/ml과 caffeine(Sigma) 5mM이 첨가된 BO액(Brackett와 Oliphant, 1975)내에서 8~12시간 수정한 다음, 3mg/ml BSA가 첨가된 TCM199 액중에서 소 난관상피조직(bovine oviduct epithelial tissue; BOET)과의 공동배양 배지로 옮겨 39℃, 5% CO₂ 및 95% 공기조건 하에서 4~5일간 배양하여 16~32세포기로 발육한 수정란을 사용하였다. Recipient란은 동일한 방법으로 22~24시간 체외성숙시킨 난포란을 1ml의 TCM199액이 들어있는 원심관에 옮겨, vortex mixer로 3분간 처리하여 난구세포를 제

거한 후, 세포질의 색조가 균일하고 제1극체가 확인된 난자만을 실험에 공시하였다.

2. 핵이식

미수정란의 제핵 및 핵이식은 5μg/ml cytochalasin B(Sigma)와 0.3μg/ml nocodazol(Aldrich Chem. Co. Milw. WI. USA)이 함유된 수정 PBS액(modified phosphate buffered saline; mPBS)내에서 Prather(1987) 및 김 등(1993)의 방법에 준하여 실시하였다. 미수정란의 제핵은 성숙배양후 23~25시간에 제1극체와 주변의 세포질을 약 1/3정도 흡입 제거한 후, 난세포질을 1μg/ml 농도의 Hochest 33342(Sigma)로 20분간 처리하여(Westhusin 등, 1992) 형광현미경하에서 염색체의 유무를 확인하고, 제핵이 확인된 난자만을 recipient 세포질로 사용하였다. Donor 배의 단일할구를 직접 injection pipett으로 흡인하여 제핵을 실시했던 구멍을 통하여 제핵란의 위란강내로 주입하였다.

3. 전기융합

핵이식란의 전기융합은 Cheong 등(1993) 및 김 등(1993)의 방법에 준하여 실시하였다. 할구 주입란은 3mg/ml BSA가 함유된 TCM199 액중에서 1시간 배양한 후, BTX 200(BTX, San Diego, CA, USA)를 이용하여 전기융합을 실시하였다. 할구 주입란은 0.1mM MgSO₄, 0.05mM CaCl₂, 0.05mg/ml BSA를 첨가한 0.3M mannitol 용액을 넣은 wire chamber(0.5mm 폭)의 양 전극 사이로 옮긴 후, 0.6MHz, 12V/mm의 교류전류(A. C)를 6초간 통전하여 분할구와 세포질의 접촉면의 양 전극에 수평이 되도록 유도하고, 이어서 1.25kV/cm의 직류전류(D.C)를 70μsec간 3회 통전하였다. 통전후 즉시 TCM199 + 3mg/ml BSA액내에서 수회 세척후 동일 배양액내에 옮겨 융합 여부를 관찰하였다.

4. 핵이식배의 체외배양

핵이식배는 TCM199 + 3mg/ml BSA액내에서 39℃, 5% CO₂ 및 95% 공기조건하에서 7~9일간 BOET와 공동배양하여 분할을 및 발육을 검사하였다. BOET의 준비는 결체조직과 혈액을 제거한 소난관을 slide glass로 압축하여 회수한 후 15ml 플라스

탁 원심관 내에서 TALP액으로 진탕후 5분간 정치하여 상층액을 제거하는 방식으로 4회 세척하고 최종적으로 TCM199 + 3mg/ml BSA액으로 50배액으로 조정하여 조직배양용 플라스틱병에 2.5ml씩 주입하여 2일간 배양하였다. 그후 배양접시 (Falcon dish, ϕ 35mm)에 5 μ 소적을 만들어 paraffin oil로 피복하였다. 배양액은 매 2~3일 마다 전체의 1/2씩 교환하였다.

5. 실험설계

1) Cycloheximide(CHXM)처리의 영향 검토

핵이식후 추가적인 활성화 처리의 일환으로 CHXM 처리시간의 영향을 검토하였다. 제핵후 즉시 핵이식 및 전기융합을 실시하고 10 μ g/ml의 CHXM이 첨가된 TCM199액중에 0, 2, 4, 6시간 동안 배양한 후 공동배양배지로 옮겨 분할율 및 발육율을 검사하였다.

2) 활성화 방법의 영향 검토

CHXM처리를 핵이식전 또는 후에 실시할 경우에 핵이식배의 분할 및 발육에 미치는 영향을 검토하였다. 제핵후 즉시 핵이식 및 전기융합을 실시한 후 CHXM으로 6시간 처리한 구(FA)와 제핵후 일단 1.25 kV/cm의 전류를 70 μ sec간 2회 통전하고 추가적으로 CHXM에 6시간 처리후 핵이식 및 전기융합을 실시한 구(AF)간에 분할율 및 발육율을 비교 검사하였다.

III. 결 과

1. CHXM처리가 핵이식배의 분할 및 발육에 미치는 영향

핵이식배의 분할율을 융합후 CHXM처리시간에 따라 영향을 받아 처리시간의 증가와 함께 증가하는 경향을 보여 (Table 1), 무처리구에서 54.7%에 불과하였으나 6시간 처리구에서는 91.3%로 유의적으로 증가되었다($P < 0.05$). 한편, 상실배기는 또는 배반포기로의 발육율도 CHXM처리시간의 증가에 따라 증가하는 경향을 보였으나 유의차는 인정되지 않았으며, 높은 분할율을 나타낸 6시간 처리구에서조차 매우 저조하였다(17%).

2. 활성화 방법에 따른 핵이식배의 체외발육율

핵이식관을 활성화 방법에 따라 제핵후 즉시 핵이식을 실시하고 융합후 CHXM으로 6시간 추가적인 활성화 처리를 실시한 구(FA)와, 제핵후 일단 1.25 kV/cm의 전류를 70 μ sec간 2회 통전하고 추가적으로 CHXM에 6시간 처리후 핵이식 및 전기융합을 실시한 구(AF)간에 분할율 및 발육율을 검토한 결과를 Table 2에 나타내었다. 핵이식후 분할율은 양 구에서 각각 88.0%와 87.5%로 차가 없었으나 상실배기 이상으로 발육한 난자의 비율은 각각 14.0%(7/50)와 29.2%(14/48)로 핵이식전에 난세포질의 활성화를 유기한 AF구에서 증가하는 경향을 보였다.

IV. 고 찰

본 연구의 결과는 핵이식배에 CHXM으로 추가적인 활성화 처리를 실시하므로써 핵이식배의 활성화를 향상시킬 수 있으며, 세포주기단계가 명확하지 않

Table 1. Effect of cycloheximide(CHXM) treatment on development of bovine nuclear transplant embryos(NTs)

CHXM treatment time	No. (%) of embryos		No. (%) of embryos developed to	
	NTs	Cleaved	Morula	Blastocyst
0 h	53	29(54.7) ^a	1(1.9)	0(0.0)
2 h	68	43(63.2) ^{ab}	3(4.4)	2(2.9)
4 h	44	34(77.3) ^{bc}	1(2.3)	4(9.1)
6 h	46	42(91.3) ^c	2(4.3)	6(13.0)

Table 2. *In vitro* development of nuclear transplant embryos(NTs) after different activation treatments

Treatment	No. (%) of embryos		No. (%) of embryos developed to	
	NTs	Cleaved	Morula	Blastocyst
FA	50	44(88.0)	2(4.0)	5(10.0)
AF	48	42(87.5)	5(10.4)	9(18.8)

1)FA : Enucleated oocytes fused with a donor blastomere followed by incubation in CHXM for 6 h.

AF : Enucleated oocytes were activated by a combination of two electric pulses(1.25 kV/cm, 70 μ sec)and subsequent incubation in CHXM for 6 h before nuclear transfer and electrofusion.

은 수정란의 핵을 이식할 경우는 핵이식 및 융합전에 제핵란세포질을 활성화 시키므로서 핵이식배의 발육을 증진시킬 수 있음을 시사하였다.

핵이식란의 활성화 조건을 검토하기 위한 실험의 결과는 CHXM으로 6시간 이상 처리하므로서 recipient 세포질의 활성화를 유지할 수 있음을 나타냄과 동시에, 성숙배양 직후(24시간)의 어린 난자를 전기자극이나 에탄올에 의해 활성화 처리를 실시한 후 CHXM으로 추가적인 활성화 처리를 실시하므로써 난세포질의 활성화율이 현저하게 향상되었다고 한 기존의 보고(First 등, 1992; Presicce와 Yang, 1993)를 확증하였다. 그런 CHXM 처리에 의해 난세포질의 활성화가 유지 되었음에도 불구하고 발육율이 저조하였는데, 저조한 발육율의 원인으로 고려할 수 있는 것은 우선 핵이식배의 염색체 구성의 이상을 들 수 있다. 비활성 제핵미수정란을 recipient 세포질로 사용할 경우 세포질 내에 존재하는 성숙촉진인자(maturation promoting factor; MPF)의 작용으로 융합된 핵의 염색체 응축(premature chromosome condensation; PCC)이 일어나고, 핵의 세포주기단계에 따라 PCC의 형태 및 활성화 형태가 다르게 나타나는데(Collas 등, 1992; Cheong 등, 1993), 그 결과 핵이식배의 염색체 구성에 이상이 생겨 발육능을 저하시키는 것으로 사료된다(Cheong 등, 1994). 또 다른 가능성은 CHXM의 영향이거나 처리시간의 부족 등을 들 수 있다. 그러나 First 등(1992)은 소 체외수정란을 10 μ g/ml의 CHXM에 4시간 배양한 경우 배의 발육에 영향을 미치지 않았다고 보고하였다. 또한 Aoyagi 등(1994)은 소 체외성숙란(24시간 성숙후)을 전기자극과 6시간의 CHXM 처리전에 5분간의 Ca²⁺-ionophore A23187(5 μ M) 처리를 추가하므로서 50%이상이 배반포로 발

육되었다고 보고하여 활성화 정도가 배의 발육에 영향을 줄 수 있음을 시사하였다.

본 실험의 결과는 제핵후 핵이식전에 활성화 처리를 실시한 구(AF)가 핵이식후 활성화 처리를 실시한 구(FA)에 비하여 발육율이 향상되는 경향을 나타내었다. Barnes 등(1993b)은 소의 25~48세포기배의 세포주기단계를 검사한 결과 약 80%가 S기에 속해 있으며, 이들 수정란의 단일할구핵을 세포주기의 S기에 동조한 제핵세포질에 이식하므로써 유사분열중기(metaphase II; M II)의 세포질에 이식한 경우에 비하여 발육율이 현저히 증가되었다고 보고하였으며, Aoyagi 등(1994)도 핵이식전에 세포질의 활성화를 유지한 경우 40%이상의 핵이식배가 배반포까지 발육하였다고 보고하였다. 이들의 결과로 미루어 볼 때 핵이식전 활성화 처리를 실시하므로써 제핵난세포질이 S기로 진입하여 결과적으로는 핵과 세포질의 세포주기단계가 동조되어 발육율이 증가되었다고 사료된다. 한편, recipient로 M II의 세포질을 사용할 경우는 핵의 세포주기단계를 G1기에 동조하므로써 핵이식배가 정상적인 염색체 구성을 가지며 배반포로의 발육율도 현저히 개선될 수 있으나(Collas 등, 1992; Cheong 등, 1993), 소 수정란의 경우 제1세포주기를 제외하고는 G1기가 너무 짧거나 결여되어 있어(Barnes와 Eyestone, 1990) 핵의 세포기를 G1기에 동조하는 것이 용이하지 않다.

V. 적 요

본 연구는 소에 있어서의 체외성숙, 체외수정 유래의 난자 및 배를 이용하여 핵이식을 실시하여 핵이식배의 활성화 처리조건을 검토하였다. 우선 CHXM처

리시간의 영향을 검토하기 위하여 제핵 직후에 핵이식 및 전기융합을 실시하고 CHXM(10 μ g/ml)으로 0~6시간 처리하여 분할율 및 발육율을 검사하였다. 또한 CHXM 처리를 핵이식의 전, 후에 각각 실시하여 CHXM처리시기에 따른 영향을 검토하였다.

핵이식배의 분할율은 CHXM 무처리구에서 54.7%(29/53)였으나 6시간 처리구에서는 91.3%(42/46)로 유의적으로 증가되었고(P<0.05) 상실배기 또는 배반포기로의 발육율도 비슷한 증가 경향을 보였으나, 높은 분할율을 나타낸 6시간 처리구에서 초차 매우 저조한 발육율을 보였다(17%). 핵이식후 CHXM으로 처리한 구(FA)와 제핵후 핵이식전에 CHXM처리를 실시한 구(AF)에서 분할률은 각 88.0%와 87.5%로 차가 없었으나, 상실배기 이상으로 발육한 난자의 비율은 각각 14.0%(7/50)와 29.2%(14/48)로 AF구에서 증가하는 경향을 보였다.

이상의 결과는 핵이식배에 CHXM으로 추가적인 활성화 처리를 실시하므로써 핵이식배의 활성화율을 향상시킬 수 있으며, 세포주기단계가 명확하지 않은 수정란의 핵을 이식할 경우는 핵이식 및 융합전에 제핵란세포질을 활성화 시키므로써 핵이식배의 발육을 증진시킬 수 있음을 시사한다.

VI. 인용문헌

- Aoyagi, Y., M. Konishi, T. Wada and T. Takedomi. 1994. Unaged bovine oocytes successfully develop to blastocysts after parthenogenetic activation or nuclear transfer. *Theriogenology*, 41:157(abstr.).
- Barnes, F.L., M. Emdebrock, C. Looney, R. Powell, M. Westhusin and K. Bobdioli. 1993 a. Embryo cloning in cattle: the use of *in vitro* matured oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 97:317-320.
- Barnes, F.L., P. Collas, R. Powell, W.A. King, M. Westusin and D. Shephee. 1993b. Influence of recipient oocyte cell cycle stage on DNA synthesis, nuclear envelope breakdown, chromosome constitution, and development in nuclear transplant bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 36:33-41.
- Barnes, F.L. and W.H. Eyestone. 1990. Early cleavage and maternal zygotic transition in bovine embryos. *Theriogenology*. 33:141-152.
- Bondioli, K.R., M.E. Westhusin and C.R. Looney. 1990. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenology*. 33:65-174.
- Brackett, B.G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 12:260-274.
- Cheong, H.T., Y. Takahashi and H. Kanagawa. 1993. Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. *Biol. Reprod.*, 48:958-963.
- Cheong, H.T., Y. Takahashi and H. Kanagawa. 1994. Relationship between nuclear remodeling and subsequent development of mouse embryonic nuclei transferred to enucleated oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 37:138-145.
- Collas, P., C. Pinto-Correia, F.A Ponce De Leon and J.M. Robl. 1992. Effect of donor cell cycle stage on chromatin and spindle morphology in nuclear transplant rabbit embryo. *Biol. Reprod.*, 46:501-511.
- First, N.L., M.L. Leibfried-Rutledge, D.L. Northey and P.R. Nuttleman. 1992. Use of *in vitro* matured oocytes 24hr of age in bovine nuclear transfer. *Theriogenology*, 37:211 (abstr.).
- Keefer, C.L., S.L. Stice and J. Dobrinsky. 1993. Effect of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during bovine *in vitro* maturation on development following *in vitro* fertilization and nuclear transfer. *Mol. Reprod. Dev.*, 36:467-474.
- Kono, T., Y. Sotomoru, F. Aono, T. Takahashi, K. Ogihara, F. Sekizawa, T. Arai

- and T. Nakagara. 1993. Effect of ooplast activation on the development of nuclear transferred bovine embryos. *Theriogenology*, 39:248(abstr.)
13. Prather, R.S., F.L. Barnes, M.M. Sims, J. M. Robl, W.H. Eyestone and N.L. First. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryo : assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. reprod.*, 37:859-866.
 14. Prather, R.S., M.M. Sims and N.L. First. 1989. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol. Reprod.*, 41:414-418.
 15. Presicce, G.A. and X. Yang. 1993. Dynamics of activation of *in vitro* matured bovine follicular oocytes following combined ethanol and cycloheximide treatment. *Theriogenology* 39:290(abstr.).
 16. Smith, L.C. and I. Wilmut. 1989. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development *in vitro* of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol. Reprod.*, 40: 1027-1035.
 17. Sims, M.M. and N.L. First. 1993. Production of fetuses from totipotent cultured bovine inner cell mass cells. *Theriogenology*, 39:313(Abstr.).
 18. Sims, M.M., C.F. Rosenkrans, Jr. and N.L. First. 1991. Development *in vitro* of bovine embryos derived from nuclear transfer. *Theriogenology*, 35:272(abstr.).
 19. Stice, S.L. and C.L. Keefer. 1993. Multiple generational bovine embryo cloning. *Biol. Reprod.* 48:715-719.
 20. Westhusin, M.E., M.J. Levanduski, R. Scarborough, C.R. Looney and K.R. Bondioli. 1992. Viable embryos and normal calves after nuclear transfer into Hoechst stained enucleated demi-oocytes of cows. *J. Reprod. Fert.*, 95:475-480.
 21. Willadsen, S.M. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature.*, 320:63-65.
 22. Yang, X., S. Jiang, P. Farrel, R.H. Foote and A.B. McGrath. 1993. Nuclear transfer in cattle: Effect of of nuclear donor cells, cytoplasm age, co-culture, and embryo transfer. *Mol. Reprod. Dev.* 35:29-36.
 23. 김정익, 양부근, 정희태. 1993. 핵이식에 의한 소 난자 및 초기배의 핵-세포질의 상호작용에 관한 연구. *한국가축번식학회지* 17:287-294.