

토끼의 체외배양 난자를 이용한 핵이식으로 복제수정란 및 복제산자의 생산†

박충생 · 전병균 · 이경미 · 윤희준* · 이효종* · 광대오** · 최상용*
경상대학교 축산학과

Production of Cloned Rabbits Embryos and Offsprings by Nuclear Transplantation using *In Vitro* Matured Oocytes in Rabbits †

C. S. Park, B. G. Jeon, K. M. Lee, H. J. Yun*, H. J. Lee*, D. O. Kwack** and S. Y. Choe*

Department of Animal Science, Gyeongsang National University

SUMMARY

The purposes of this study were to produce cloned rabbit embryos and offsprings by nuclear transplantation(NT) using *in vitro* matured oocytes as nuclear recipient cytoplasm and to determine the effect of frozen nuclei donor embryos on the production efficiency of cloned embryos. The 8-cell embryos were collected from the mated does by flushing oviducts with Dulbecco's phosphate buffered saline containing 10% fetal calf serum(FCS) at 40 hours after hCG injection. A portion of collected embryos were preserved at 4°C for 24 hours and a portion of them were frozen by vitrification method. The embryos used for donor nuclei were synchronized in the phase of G1/S transition. The *in vitro* matured oocytes were used as recipient cytoplasm following removing the nucleus and the first polar body.

The synchronized blastomeres from fresh, cooled or frozen embryos were injected into the enucleated oocytes by micromanipulation and were electrofused by electrical stimulation of three pulses for 60 μ sec at 1.0 kW/cm in 0.28 M mannitol solution. The fused oocytes were co-cultured with a monolayer of rabbit oviductal epithelial cells in M-199 solution containing 10% FCS for 120 hours at 39°C in a 5% CO₂ incubator. Following *in vitro* culture of the NT embryos to blastocyst stage, they were stained with Hoechst 33342 dye for counting the number of blastomeres by fluorescence microscopy.

The nuclear transplant embryos developed *in vitro* to 2- to 4-cell stage were transferred into the oviducts of synchronized recipient does. The results obtained were summarized as follows:

1. The fusion rates of the blastomeres from fresh, cooled and frozen embryos with the *in vitro* matured and enucleated oocytes were 100, 95.8 and 64.3%, respectively.
2. Development *in vitro* to blastocyst was significantly($p < 0.05$) different between the

† 이 연구는 1992년도 한국과학재단에서 지원한 특정기초연구 사업비로 연구되었음(KOSEF:92-24-00-10).

* 경상대학교 수의학과(Department of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University)

** 경상대학교 과학교육과(Department of Science Education, Gyeongsang National University)

cloned embryos with the blastomeres from fresh, cooled or frozen embryos as 39.0, 20.9 and 15.7%, respectively.

3. The mean numbers of cell cycle per day during *in vitro* culture of cloned embryos blastomeres from fresh, cooled or frozen embryos was 1.31, 1.29 and 1.16, respectively.
4. A total of 77 nuclear transplant embryos were transferred into 6 recipient does, of which two offsprings were produced from a foster mother 31 days after embryo transfer.

Key words : nuclear transplantation, *in vitro* maturation, frozen embryos, oocytes, rabbit

서 론

핵이식에 의한 복제배의 대량생산을 위해서는 많은 수핵난자가 필요하므로 체내에서 배란된 난자를 이용한다는 것은 배란된 난자수가 적어 수핵난자로 사용하기에는 한계가 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 Prather 등(1987)과 Bondioli 등(1990)은 체외성숙된 난자를 수핵란으로 이용하였으나 체내성숙 난자보다 발달율이 낮았으며, 체외성숙 난자는 체내성숙 난자보다 질적인 면에서 좋지 않아 핵이식의 성공율이 저조하다고 보고하였다. 그러나 Barnes 등(1993)은 체외성숙 난자를 선택적으로 수핵란으로 사용한다면 발달율에 있어서 체내성숙 난자와 유의적인 차이를 나타내지 않는다고 하였고, Ushijima와 Eto(1992) 및 Barnes 등(1993)은 소의 체외성숙난자를 수핵란으로 이용하여 산자의 생수를 보고하고 있다.

한편, 핵이식에 있어서는 수핵란의 확보뿐만 아니라 할구의 공급원 확보도 중요한 문제이다. 유전적으로 우수한 수정란을 공핵란으로 사용할 때 수정란을 장기보존시켜 공핵란으로 사용한다면 복제배의 생산효율을 더욱 증진시킬 수 있을 것이며, 나아가서 가축의 우량유전자 보급의 극대화, 번식효율의 개선, 동일한 성과 유전형질을 가진 복제수정란과 복제동물의 생산 등에 매우 유익하게 활용되어 가축의 번식, 육종에 있어서 새로운 전기를 마련하게 될 것이다.

국내외에서는 토끼에서 체외성숙 난자를 수핵란으로 사용하여 복제수정란 및 복제산자를 작출한 예가 아직까지는 보고된 바가 없을 뿐만 아니라, 단기 저온보존 및 동결보존란 수정란을 공핵란으로

사용하여 복제배의 생산이 보고된 바도 없다.

본 실험에서는 핵이식 기술의 향상을 도모하고, 복제수정란 및 복제동물 생산효율의 향상을 위하여, 토끼 수정란을 단기 저온보존 및 동결보존 하다가 G1/S기로 세포주기를 동기화시킨 후, 핵의 공급원으로 사용하고, 체외성숙 난자를 수핵란으로 사용하여 핵이식을 실시하고, 이들의 핵융합율과 체외발달능력의 차이 및 산자의 생산능력을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물 및 사양관리

본 실험에 사용된 공시동물은 New-Zealand White 종의 성숙된 토끼로서 연암원예측산전문대학에서 구입하였으며, 사용 전에 분리 사육하였고 물과 사료는 자유로이 급식하였다.

2. 수핵란의 체외성숙

건강하고 성숙한 암토끼에게 PMSG(Sigma) 100 IU를 근육주사한 다음 68시간 후에 도살하여 난소를 적출하였다. 적출된 난소의 불필요한 조직을 제거한 후 항생제(penicillin G: 100,000 IU/L, streptomycin: 125 mg/L)가 포함된 생리식염수로 3번 씻은 다음, 10% FCS가 함유된 Brackett-Oliphant defined medium(BO-DM)이 들어 있는 35×10 mm dish (Falcon)에 놓고서 난소의 대난포(1~1.5 mm)를 23 gauge 주사침으로 천자하였다. 그 후 실체현미경 하에서 4~5층 난구세포로 둘러싸인 난포란을 채란하여 5% FCS가 함유된 BO-DM으로 3번 씻은 후 35 µg/ml FSH, 10 µg/ml LH, 1 µg/ml estradiol-17β 및 10% FCS가

함유된 BO-DM을 1 ml씩 분주한 4-well dish에 넣어 14시간 동안 5% CO₂, 39°C incubator에서 체외 성숙시켰다. 체외성숙된 난자는 300 IU/ml의 hyaluronidase(Sigma)에서 39°C, 5% CO₂조건에서 7분간 배양한 다음, 150 μm fire-polished pipette으로 난구세포를 제거하여 제1극체가 명확하고 세포질이 충실한 것만을 사용하였다.

3. 공핵란의 확보

핵을 수핵난자에 공급할 수정란의 과배란 유기는 성숙한 암토끼를 10 mg의 FSH(Folltropin, Australia)를 하루에 한번 3일 동안 피하주사하고, 마지막 투여 12시간 후 hCG(Peamax, Japan) 100 IU를 정맥주사하였고, 수토끼에 교미를 시켰다. 8-세포기의 수정란은 hCG 주사 후 40시간에 암토끼를 chlorpromazine HCl과 ketamine HCl로 전신마취한 다음 개복수술하여 난관으로부터 수정란을 10% FCS가 함유된 D-PBS로 회수하였다. 수정란은 0.5%의 pronase(Sigma)에서 8분간 배양한 다음 150 μm 정도의 pipette으로 투명대를 제거하고, 이들을 다시 50 μm 정도의 pipette으로 Ca²⁺ 및 Mg²⁺이 없는 PBS에서 할구를 분리하였다.

4. 수정란의 저온보존 및 동결보존

회수된 수정란의 일부는 세포주기의 조절을 위하여 핵이식의 공핵란으로 사용하였고, 일부는 문(1992)의 방법에 따라 저온 보존하였다. 즉 10% FCS가 함유된 D-PBS에서 미세소체에 수정란을 옮기고 4°C의 냉장고에서 24시간 동안 저장한 다음, 세포주기를 조절하고 공핵란으로 사용하였다. 또한 수정란의 일부는 이(1994)의 방법에 따라 vitrification 방법으로 동결하였다. 즉, 수정란을 EGS(ethylene glycol sucrose) 용액에서 2분 동안 평형을 실시한 후 0.25 ml plastic straw에 수정란을 주입하여 30초 이내에 -196°C의 액체질소에 침지하였다. 수정란의 용해는 straw를 액체질소에서 꺼낸 즉시 20°C의 물에 침지하여 10~20초간 흔들면서 용해하였고, 0.5 M sucrose 용액에서 5분간 정지시켜 EFS 용액을 제거한 후 TCM-199 배양액으로 세척한 다음 수정란을 배양하였으며, 세포주기를 조절한 후 공핵란으로 사용하였다.

5. 공핵수정란 할구의 세포주기 조절

할구의 세포주기를 G1/S기로 동기화하는 방법은 Collas 등(1992)의 방법을 따랐다. 즉, 0.5 μg/ml의 미세관 중합 저해제인 colcemid(Gibco, U.S.A.)가 포함된 vitreous humor(VH)에서 10시간 배양으로 분열의 중기에 정지시킨 다음 DNA 합성 저해제인 0.1 μg/ml의 aphidicolin(Sigma)을 포함한 VH에서 1.5~2시간 동안 배양하여, 다음 세포기로 발달한 G1/S기의 할구를 사용하였다. 또한, 미세조작도 aphidicolin이 함유된 배양액에서 실시하였고, 미세조작 후 핵의 융합때까지 aphidicolin이 함유된 배양액에서 배양하였다.

6. 미세조작에 의한 탈핵과 핵주입

수핵란의 탈핵을 위한 미세조작은 Collas와 Robl(1990)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 수핵란 과공핵란으로부터 분리된 할구세포를 7.5 μg/ml의 cytochalasin B(Sigma), 0.1 μg/ml의 aphidicolin 그리고 10% FCS가 함유된 Earle's balanced salt solution(EBSS, Sigma)에서 미세조작 15분전에 전처리를 하였고, 미세조작을 위하여 미세조작기(Narishige Co., Japan)를 DIC 도립현미경(Nikon Co., Japan)위에 장치하였다. 미세조작 또한, 7.5 μg/ml의 cytochalasin B(Sigma), 0.1 μg/ml의 aphidicolin 그리고 10% FCS가 함유된 EBSS에서 실시하였고, 탈핵은 McGrath와 Solter(1983)의 비파괴적 조작법에 의하여 실시하였다. 즉, 성숙된 난자로부터 핵을 제거하기 위하여 외경 30 μm의 연마된 미세 pipette을 투명대 내로 진입시키고, 제1극체와 그 주위에 위치하는 핵을 원형질막에 싸여진 채로 흡입하여 제거하였다. 한편, 공핵배로부터 분리된 G1/S기에 정지되어 있는 할구세포 하나를 미세 pipette에 흡입하고, 이를 미세조작으로 탈핵된 수핵란의 원형질 바깥 위관막강에 주입하였다. G1/S기에 있는 핵이 주입된 난자는 aphidicolin이 0.1 μg/ml 포함된 VH에서 미세조작 후 핵의 융합 때까지 배양하였다. 미세조작 및 세포주기 조절을 위한 배양액은 사전에 미리 평형된 기본배양액에서 사용하기 바로 직전에 만들어 사용하였다.

7. 핵의 융합과 난자의 활성화

핵이 주입된 난자는 Robl 등(1987)의 방법에 따라 핵융합을 실시하였다. 전기융합은 전압을 1.0 kV/cm, 통전시간을 60 μ sec 그리고 통전횟수를 3회로 실시하였다. 융합과 난자의 활성화를 위해서는 할구가 이식된 난자를 100 μ M CaCl₂ 및 MgCl₂가 함유된 0.28 M mannitol 용액으로 세척한 다음, paraffin oil이 덮여 있는 소직에 옮기고, electro cell manipulator (Eyela Co., Japan)에 장치되어 있는 두 전극 사이에서 핵의 융합과 난자의 활성화를 유도하였다. 그리고 난자와 할구의 융합 및 난자의 활성화는 체외성숙 후 20시간에 전기자극으로 유도하였다. 이를 aphidicolin이 0.1 μ g/ml을 포함한 0.28 M mannitol에서 핵에서 premature chromosome condensation이 일어나는 동안 DNA의 합성을 막기 위하여 20분 동안 배양하였고, 난자의 세포질과 핵의 융합이 확인된 난자는 7.5 μ g/ml의 cytochalasin B와 10% FCS가 함유된 M-199 (Earl's salt, Sigma)에서 1시간 동안 배양한 다음 10% FCS가 함유된 M-199에서 체외배양을 하였다.

8. 핵이식 수정란 체외배양, 염색 및 할구수 조사

노 등(1994)의 기술에 따라 융합이 확인된 수정란은 4-well dish에 분주되어 있는 10% FCS가 포함된 M-199 배양액에 옮겨 monolayer가 형성된 토끼난관상피세포와 같이 39°C의 5% CO₂ 배양기내에서 120시간 공배양하였다. 모든 기본 배양액은 배양하기 12시간에서 24시간 전에 incubator에서 배양을 하여 pH의 균형을 유도하였다.

배양기간 동안 이들 핵이식 수정란의 발달과 배반포 형성율을 조사하였고, 체외배양 120 시간째에 Pursel 등(1985)의 방법에 따라 Hoechst 33342로서 핵염색을 실시하여 할구수를 조사하였다.

9. 핵이식 수정란의 체내이식

핵이식 수정란의 체내이식은 핵의 융합후 18시간이 지난 다음 2-~4세포기로 발생한 수정란을 발정 동기화된 토끼의 난관내로 이식하였다. 수란도의 발정동기화를 위하여 이식 24시간 전에 자면발정이 온 토끼를 골라 정관절찰이 된 수토끼로 교미

자극을 준 후 100 IU의 hCG를 주사하였다.

10. 통계학적 분석

실험결과는 Chi-square test 및 Student t-test를 실시하여 평균간의 차이에 대한 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 체외배양된 난자와 할구의 융합율

체외성숙된 난자를 탈핵하여 수핵란으로 사용하고, 저온보존 및 동결보존된 수정란으로부터 분리된 할구를 사용하여 핵이식하였을 때 이들의 융합율을 조사한 결과는 Table 1과 같다.

핵의 공급원으로서 신선, 저온보존 및 동결보존된 수정란으로부터 분리된 할구를 탈핵된 수핵란에 주입한 후의 이들의 융합율은 각각 100, 95.8 및 64.3%로서 신선수정란과 저온보존 수정란에서의 융합율이 동결한 것보다 유의적($p < 0.05$)으로 높게 나타났다. 박과 박(1991)은 생쥐에서 신선수정란과 저온보존한 수정란에서 융합율의 차이를 보인다고 하였으나, 토끼에서는 유의할 만한 차이를 보이지 않았다. Histoshi와 Eto(1992)가 소의 체외배양된 난자에 16-세포기의 신선수정란과 동결수정란의 할구를 주입한 후 융합율이 각각 87%와 68%로서 신선수정란이 동결수정란보다 유의적($p < 0.05$)으로 높았다는 보고와 본 실험의 결과는 일치하는 경향을 보였다. 그러나 Westhusin 등(1991)은 소의 체내배양된 난자의 핵을 탈핵하지 않고 양분한 후 위관강내에 신선 수정란 및 동결수정란의 융합율에 유의적인 차이를 보이지 않는다고 보고하였다.

Bondioli(1993)는 소에서 체내성숙 및 체외성숙 난자와 주입된 할구의 융합율에서 유의적인 차이를 보이지 않는다고 보고하였다. 토끼에서 박 등(1994)은 체내성숙된 난자와 16-세포기 할구의 융합율 89.3%로 보고하였으나, 본 실험에서는 100%로 높게 나타났다. 이러한 결과는 체외성숙 난자는 체내성숙 난자보다 더 좁은 위관강을 가지고 있어서 할구와 난자의 원형질막과 접촉이 보다 넓어 융합이 더 잘 일어날 수 있다고 사려된다.

또한 수정란은 원형질막의 파괴로 할구의 용해현

Table 1. Effect of type of donor nucleus on fusion rate of nuclear transplant rabbit embryos using *in vitro* matured oocytes as recipient cytoplasm*

Type of donor nucleus	No. of oocytes used	No. of oocytes fused	Fusion rate(%)
Fresh	90	90	100.0 ^a
Cooled	71	68	95.8 ^a
Frozen	84	54	64.3 ^b

* The values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

Table 2. Effect of type of donor nucleus on *in vitro* development of nuclear transplant rabbit embryos using *in vitro* matured oocytes as recipient cytoplasm*

Type of donor nucleus	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to			
		2-cell	4-cell	Morula	Blastocyst
Fresh	82	69(86.3)	58(70.7)	55(67.7)	32(39.0) ^a
Cooled	67	48(71.6)	35(52.2)	33(49.3)	14(20.9) ^b
Frozen	51	33(64.7)	22(43.1)	19(37.3)	8(15.7) ^c

* The values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

상이 나타난다. Westhusin 등(1991)은 용해 후 10~15%의 할구가 용해된다고 보고하였는데, 이러한 결과가 동결, 용해된 수정란을 공핵배로 사용할 때 융합율의 저하를 가져온다고 사려된다.

2. 체외배양된 난자의 핵이식 후의 체외발달 능력

체외배양된 난자와 여러 공급원의 할구를 융합한 후 120시간 동안 토끼 난관상피세포와 공배양한 후 배반포로의 발달율을 조사한 결과는 Table 2와 같다.

핵이식배를 체외배양한 결과 신선수정란의 할구를 이식한 것은 39.0%, 저온보존수정란의 할구를 이식한 것은 20.9% 그리고 동결 수정란의 할구를 이식한 것은 15.7%가 배반포로 발달하였는데, 신선수정란이 저온보존과 동결보존수정란을 공핵배로 사용한 것보다 유의적으로($p < 0.05$) 높은 발달율을 보였다.

그러나 Hitoshi와 Eto(1992)는 소에서 신선수정란과 동결수정란의 할구들의 핵이식 후 배반포로의 발달율은 2.2와 4.7%라고 보고하여 유의적인 차이가 없었다고 한다. 또한 Westhusin 등(1991)은 배란 5일과 6일째 수정란의 할구들의 핵이식 후 상실배 및 배반포로의 발달율이 각각 20.7과 23.5%, 배란 5일째의 동결 수정란의 할구를 핵이식 후 상실배

및 배반포 발달율은 25.2%라고 보고하여, 체내배양된 성숙난자를 수핵란으로 사용할 경우에는 동결수정란의 할구를 핵이식하여도 신선수정란의 할구와 비교하여 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

토끼에서 체내성숙 난자의 핵이식 후 배반포로의 발달율은 Collas 등(1992)이 71%, 이 등(1995)이 56.8%를 보고한 것과 비교해 보면, 본 실험에서 체외성숙난자를 핵이식 후 39%가 배반포로 자라 발달능력면에서 차이가 나는 것을 알 수 있으나, Barnes 등(1993)은 소에서 체외, 체내성숙난자 간에 유의적인 차이를 나타내지 않는다고 보고하였다.

3. 체외배양된 핵이식 배반포의 할구수와 세포분열주기 비교

핵이식배를 체외에서 120시간 동안 배양한 후 Hoechst 33342로 핵염색을 하여 핵의 수를 조사함으로써 핵이식배의 발달능력을 비교, 검토한 결과는 Table 3과 같다.

신선수정란과 저온보존수정란의 할구들에서는 120시간 동안 배양한 결과 할구수가 각각 93.1개와 90.1개로서 동결수정란의 59.6개보다 유의적으로($p < 0.05$) 많았으며, 이는 1일 동안 세포분열주기가 각각 1.31회, 1.29회 그리고 1.16회임을 나타낸다.

박 등(1994)은 체내배양난자와 16-세포기의 할구

Table 3. Effect of type of donor nucleus on blastomere counts of nuclear transplant rabbit embryos developed *in vitro* to blastocyst stage*

Type of donor nuclei	No. of embryos stained	No. of blastomeres	No. of cell cycle /day
Fresh	10	93.1±7.6 ^a	1.31±0.02 ^a
Cooled	10	90.1±9.3 ^a	1.29±0.03 ^a
Frozen	7	59.6±5.1 ^b	1.16±0.02 ^b

* Mean±SEM. The values with different superscripts in the column are significantly different (p<0.05).

Table 4. Production of cloned rabbit pups using nuclear transplant embryos

Trial no.	No. of embryos transferred	Cell stage of NT embryos transferred		Pregnancy diagnosis	No. of offsprings born
		2-cell	4-cell		
1	13	7	6	+	2
2	10	6	4	-	0
3	13	7	6	-	0
4	16	11	5	-	0
5	15	4	11	-	0
6	10	4	6	-	0
Total	77	39	38		2

를 핵이식한 후 72시간 동안 체외배양하였을 때, 배반포의 할구수가 43.2개로서 1일 평균 세포분열주기가 1.81회라고 보고하였고, 노 등(1994)은 hCG 투여와 교미 후 24시간에 회수된 1 또는 2-세포기의 토끼 수정란을 토끼 난관상피세포와 함께 72시간 배양하여 할구수가 216.0였다고 보고하였으며, Dainel(1964)은 교미 후 7일째 착상시의 토끼 수정란의 할구수가 255,000개라고 보고하였다. 그러나 본 실험에서 신선수정란의 할구를 핵이식한 수정란을 120시간 동안 체외배양하여 조사한 평균 할구수는 93.1개로서 그 수가 현저히 적어 이상의 결과들과 비교해 볼 때, 체외배양난자를 핵이식한 수정란의 발달이 지연되는 것으로 사료된다. Yang 등(1992)은 부적당한 체외배양조건과 활성화 그리고 다배체 형성에 의해 발달지연이 나타난다고 하였으며, Northey 등(1991)은 소의 난자세포질을 수정전에 제거할 경우 할구수가 감소된다고 보고하였다. Fisher(1987)는 체외배양한 수정란의 단백질 합성량의 측정으로 발달능력을 조사한 결과, 체내에서 자란 수정란보다 발달이 지연되는 것을 알아 내었고, Schumacher 등(1988)과 Bedford 등(1989)은 토끼의 수정란에서 가시광선은 DNA의 손상을 주고, 25℃의 실온에 노출되었을 때 세포내

기관의 이동과 세포골격에 손상을 주어 발달이 지연된다는 것을 보고하였다.

4. 핵이식에 의한 산자의 생산 효율

미세조작된 핵이식 수정란을 핵융합 후 18시간 체외배양하여 2- 또는 4-세포기로 자란 77개를 6마리의 수란토에 체내이식을 한 결과 Table 4에 나타난 바와 같이 이식 후 31일에 1마리의 수란토에서 2마리(2.6%)의 복제산자를 생산하였다.

토끼에서 체내성숙된 수핵난자를 이용한 핵이식 수정란을 이식하여 산자생산에 성공한 예는 Stice 등(1988)에 의하여 최초로 보고되었다. 이들은 164개의 핵이식 수정란을 수란토끼에 이식하여 6마리(3.7%)의 산자를 생산하였다. Yang 등(1992)도 핵이식 후 2- ~ 4-세포기로 자란 수정란 243개를 15마리의 수란토끼에 이식하여 8마리(3%)의 산자를 생산하였다. 다른 동물종에 있어서는 Prather 등(1987)이 소에서 핵이식 기법으로 산자생산에 성공한 이래 Willadsen 등(1991)은 33.1%의 산자 생산 성공율을 얻었다. 돼지에서는 Prather 등(1989)이 12.6%의 산자생산율을, 양에서는 Smith 등(1989)이 4%의 산자 생산율을 얻고 있다. 소에서는 체외 성숙된 난자를 수핵란으로 사용하여 Barnes 등

(1993)은 22%, 그리고 Ushijima와 Eto(1992)가 5.5%의 산자생산율을 보고하고 있다.

아직도 핵이식 수정란으로 복제동물을 생산하는 성공율은 낮은 수준인데, 이는 체외에서의 탈핵과 핵주입 등 미세조작에 의한 수핵난자의 손상, 전기 자극, 체외배양에서의 발달 지연 및 체내이식시 수란측과의 동기화의 부적합 등 많은 기술적 어려움이 있기 때문이다. 그러나 무엇보다도 비정상적인 핵형이나 DNA를 소유하는 핵이식 수정란은 배반포로의 발달이 감소할 뿐만 아니라 산자를 생산할 수 없다. DiBerardino (1980)은 양서류의 핵이식 수정란에서 핵이식 수정란의 초기 퇴화는 공핵란과 수핵란의 세포주기의 불일치 때문이며, 이러한 것은 핵물질의 비정상에 의한 것이라고 보고하였다. 또한 생쥐에서 7번 염색체에 손상된 DNA를 가지게 되면 2~8-세포기에서 치사하게 된다(Lewis 1978 ; Nadijicka 등, 1979). 앞으로 핵이식 수정란을 이식하여 산자의 생산율을 높이기 위해서는 핵이식 수정란에 물리적인 손상을 줄이고, 정상적인 핵형을 가지는 수정란을 생산하는 방법 등 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

적 요

본 실험에서는 토끼의 체외배양된 난자를 핵이식하여 융합율, 체외발달율 및 산자의 생산율을 조사하였다. 과배란시킨 토끼의 난관으로부터 8-세포기의 수정란을 채란하고 일부는 저온보존과 동결보존을 실시하고 이들을 각각 colcemid와 aphidicolin으로 할구의 세포주기를 G1/S 기로 조절한 할구세포를 분리하여 공핵란으로 사용하였다. 이들 분리된 할구세포를 체외성숙 후 14시간째에 제1극체와 핵을 제거한 체외성숙 난자의 위란막강에 미세조작으로 주입하였다. 할구세포가 주입된 난자는 체외성숙으로부터 20시간에 직류전류로서 1.0 kV/cm, 60 μ sec를 3회 반복 통전하였던 바, 신선수정란, 저온보존 그리고 동결 수정란의 할구를 주입하여 전기융합시킨 결과 융합율이 각각 100, 95.8 그리고 64.3%의 융합율을 보였다. 신선수정란 그리고 저온보존한 수정란과 동결보존한 수정란과의 융합율에는 유의적인 차이를 나타내었다. 이들 융합된 핵이

식 난자는 10% FCS가 함유된 M-199 배양액에서 토끼 난관 상피세포층과 같이 5% CO₂, 39°C 배양기에서 120시간 공배양하였던 바, 이들의 배반포 형성율은 신선수정란, 저온보존 수정란 및 동결보존 수정란에서 각각 39.0, 20.9 및 15.7%로 유의적인 차이를 나타내었다. 또한 체내성숙 난자와의 체외발달능력면에서 차이를 나타내었다. 그리고 이들 배반포를 Hoechst 33342로서 핵염색을 실시하여 보았던 바 신선수정란, 저온보존 그리고 동결수정란에서 할구수가 93.1개, 90.1개 및 59.6로서 신선수정란 및 저온보존수정란의 할구수가 동결보존수정란보다 유의적으로 많았으며, 24시간의 평균 분열주기 회수는 신선수정란, 저온보존 그리고 동결수정란에서 각각 1.31, 1.29 그리고 1.16회였는데, 이는 체내배양난자의 핵이식배보다 체외배양난자의 발달이 지연됨을 나타낸다. 이상의 결과로부터 토끼에서도 체외배양난자도 핵이식시 수핵난자로의 이용이 가능한 것으로 사료되나, 체외성숙 난자를 수핵란으로 사용한 핵이식 수정란과 동결보존한 수정란을 공핵배로 사용할 때, 토끼에서는 핵이식 수정란에서 체외발달 능력면에서는 차이가 있음이 확인되었다.

참고문헌

- Barnes F, Endebrock M, Looney CR, Powell R, Westhusin M and Bondioli K. 1993. Embryo cloning in cattle; the use *in vitro* matured oocytes. J. Reprod. Fert. 97:317-320.
- Bondioli KR, Westhusin ME and Looney CR. 1990. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. Theriogenology. 33:165-174.
- Bondioli KR. 1993. Nuclear transfer in cattle. Mol. Reprod. Dev. 36:274-275.
- Collas P, Balise J, Hofmann GA and Robl JM. 1992. Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. Biol. Reprod. 46: 492-500.
- Collas P and Robl JM. 1990. Factor affecting

- the efficiency of nuclear transplantation in rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 43:877-884.
- Hitoshi U and Eto T. 1992. Production of calf from nuclear transfer embryo using *in vitro* matured oocytes. *J. Reprod. Fert.* 38:61-65.
- Lewis SE. 1978. Developmental analysis of lethal effects of homozygosity for the c^{24H} deletion in the mouse. *Dev. Biol.* 65:553-557.
- McGrath J and Solter D. 1983. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science* 220:1300-1302.
- McGrath J and Solter D. 1983. Nuclear transplantation of rat embryos. *J. Exp. Zool.* 248:303-305.
- Nadijcka MD, Hillman N and Gluecksohn-Waelsch S. 1979. Ultrastructural studies of lethal c^{25H} , c^{25H} mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 52:1-11.
- Northey DL, Nuttleman PR and Rosenkrans CF. 1991. Removal of bovine oocyte cytoplasm prior to fertilization reduce cell number in embryos. *Biol. Reprod.* (Suppl. 1)156.
- Prather RS, Barnes FL, Sims MM and First NL. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryos; assessment of donor nuclear and recipient oocyte. *Biol. Reprod.* 37:859-866.
- Prather RSM, Sims M and First NL. 1989. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol. Reprod.* 41:414-418.
- Robl JM, Prather R, Barnes FL, Eyestone WH, Northey D, Gilligan B and First NL. 1987. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenology.* 24:687-691.
- Smith LC and Wilmut I. 1989. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development *in vivo* of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol. Reprod.* 40:1027-1035.
- Stice SL and Robl JM. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 39:657-664.
- Westhusin ME, Pryor JH and Bondioli KR. 1991. Nuclear transfer in the bovine embryo: A comparison of 5-day, 6-day, frozen-thawed and nuclear transfer donor embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 28:119-123.
- Willadsen SM, Janzen RE, McAlister RJ and Shea BF. 1991. The viability of late morula and blastocyst produced by nuclear transplantation in cattle. *Theriogenology* 35:161-170.
- Willadsen SM. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 320:63-65.
- Yang X, Jiang S, Kovacs A and Foote RH. 1992. Nuclear totipotency of cultured rabbit morulae to support full-term development following nuclear transplant. *Biol. Reprod.* 47:636-643.
- 노규진, 이효종, 송상현, 윤희준, 박충생. 1995. 수정란의 체외발달에 미치는 배양액 및 소와 토끼의 난관상피세포들과의 공배양 효과. *한국가축번식학회지* 18:39-46.
- 문승주. 1992. 가토 수정란의 단기 체외보존에 관한 연구. *한국가축번식학회지* 16:301-310.
- 박희성, 박충생. 1991. 저온보존한 공핵란을 이용한 생쥐 수정란의 핵이식. *한국축산학회지* 33:831-837.
- 이영락. 1994. Vitrification 방법에 의한 토끼 수정란의 동결보존시 발달단계와 평형시간이 생존성에 미치는 영향. *경상대학교 석사학위논문.*
- 이효종, 전병균, 윤희준, 이경미, 송상현, 공일근, 노규진, 최민철, 최상용, 박충생. 1994. 핵이식에 의한 복제토끼 생산. *한국수정란이식학회지* 9:161-165.