韓國受精卵移植學會誌(1995) 第 10 卷 第 1 號
Korean J. Emb. Trans. (1995) Vol. 10, No. 1, pp. 83~90

소 핵이식 수정란에 의한 산자 생산에 관한 연구

황우석 · 조충호 · 한재용[1] · 이병천 · 신태영 · 이원유 · 송길영
민순기[2] · 김영찬[2] · 구자홍[2] · 이윤수[2] · 민종식[3] · 김기영[4] · 김준선[4]
장중명[5] · 임홍순[5] · 이광원[6] · 이수헌[6] · 김용길[7] · 이후식[7]
서울대학교 수의과대학

Systems for Production of Calves after Embryo Transfer of Nuclear Transplant Embryos

W. S. Hwang, C. H. Jo, J. Y. Han[1], B. C. Lee, T. Y. Shin, W. Y. Lee, K. Y. Song, S. K. Min[2], Y. C. Kim[2], C. H. Koo[2], Y. S. Lee[2], J. S. Min[3], K. Y. Kim[4], J. S. Kim[4], J. M. Jang[5], H. S. Yim[5], K. W. Lee[6], S. H. Lee[6], Y. K. Kim[7] and H. S. Lee[7]
College of Veterinary Medicine, Seoul National University

SUMMARY

Production of calves after transfer of nuclear transplant embryos is the latest technology to be applied in commercial livestock breeding. The objective of this study was to establish an efficient procedure to produce offsprings from nuclear transplant embryos. The fusion rates (72.7% vs. 80.8%), cleavage rates (62.5% vs. 71.4%) and rates of development *in vitro* (12.0% vs. 15.2%) of nuclear transplant embryos were not significantly different between 30 and 40h maturation age of cytoplast. The *in vivo* and *in vitro*-derived embryos as nuclei donor were used in this system of bovine nuclear transplantation. Fusion rates of nuclear transplant embryos were not significantly different between *in vivo* and *in vitro*-derived embryos (73.0 and 79.2%, respectively). The percentage of embryos reaching the morulae or blastocysts were 21.8% for *in vivo*-derived embryos and 11.9% for *in vitro*-derived embryos ($p<0.01$). Pregnancy rates after embryo transfer of nuclear transplant embryos were not significantly different between *in vivo* and *in vitro*-derived embryos (45.9 and 40.5%, respectively). However, calving rates after embryo transfer of nuclear transplant embryos were significantly higher in the *in vivo*-derived embryos than *in vitro* ($p<0.01$). Further research for age of cytoplast and use of *in vitro*-derived embryos as nuclei donor is required in this system.

In conclusion, these results clearly show that the use of *in vitro*-derived oocytes as recipient cytoplast can improve the nuclear transplant system for genetic progress in cattle.

[1] 서울대학교 농업생명과학대학 (College of Life Science and Agriculture, Seoul National University)
[2] 서울우유조합 (Seoul Dairy Cooperation)
[3] (주)동원육가공 (Dongwon Meat Processing Co., LTD)
[4] (주)퓨리나 코리아 (Purina Korea, Inc)
[5] 축협중앙회 (National Livestock Cooperative Federation)
[6] 농진청 축산기술연구소 (National Livestock Research Institute, RDA)
[7] 전라북도종축장 (Livestock Breeding Center of Chŏllabuk-do)

Key words : bovine, nuclear transplantation, *in vitro*-derived oocyte, embryo transfer

서 론

수정란을 이용한 핵이식은 특정한 동일세포 유래의 핵을 탈핵난자에 이식하여 목적하는 형질을 지닌 다수의 개체를 생산하는 기법으로서, 생물학, 발생공학 등의 주요 연구대상이며 희귀동물 번식문제의 해결 및 보존, 그리고 산업동물에서 우량 형질의 개체의 대량 복제생산할 수 있는 중요한 가치를 지닌 분야이다 (Yang과 Anderson, 1992; Wilmut 등, 1991; Hammer 등, 1986, 1985; McLaren, 1984).

핵이식에 관한 연구는 양서류(Briggs와 King, 1952)에서 처음으로 시도되었으며, 포유동물에서는 마우스(Illmensee와 Hoppe, 1981), 토끼(Stice와 Robl, 1988), 면양(Willadsen, 1986) 및 소(Prather 등, 1987)에서 복제된 산자를 생산하였고, 최근 학문적 및 산업적 이용을 위한 핵이식 기법의 관련 연구가 활발히 이루어져 급속한 진전을 보였다 (Bondioli 등, 1990; Marx, 1988). 이러한 결과로 소 핵이식시 metaphase II 단계의 난자를 탈핵한 후 전기적 자극에 의해 공핵란과 세포원형질을 융합함으로써 이후 발육률을 증진시킬 수 있는 방안이 실용화 되고 있으며, 핵이식 기법을 이용한 복제동물의 생산에 있어 이의 효율을 높이기 위한 방법으로 수핵난자의 세포질 활성화 및 공핵란의 세포주기 조절에 관한 연구가 진행되고 있다(Collas 등, 1992; First 등, 1992).

소 핵이식의 초기 연구(Stice 등, 1991; Willadsen 등, 1991; Bondioli 등, 1990; Prather 등, 1987)에서는 *in vivo* 성숙난자를 수핵난자로 이용하였으나, 이는 핵이식 기법의 산업화 측면에서 제한적인 비외과적 채취로 충분한 수의 난자를 얻기 어렵다는 문제점을 지닌다. 그러나 최근 *in vitro* 성숙난자도 핵이식 후 체외발육과 산자생산에 *in vivo* 성숙난자와 동일한 발육능을 지닐 수 있음이 판명되었으며(Clement-Sengewald 등, 1992; Bondioli, 1992; Barnes 등, 1991), 이러한 *in vitro* 성숙난자는 도축우의 난소로부터 염가로 대량 확보할 수 있다는 장점이 있다. 소 핵이식란의 작성에 있어 *in vitro* 성숙난자의 전기적 활성화는 세포질 성숙도에 의존적이며, 22~24시간 동안 체외성숙된 난자의 활성화는 극히 제한된 성공률만을 나타낸다고 보고되었을 뿐 아니라(Ware 등, 1989; Nagai, 1987) 난자의 탈핵률 또한 성숙시간이 연장됨에 따라 감소하는 결과를 보였다(Yang 등, 1991). 성숙난자의 탈핵률을 높이며 세포질 활성도를 극대화 하기 위해 체외성숙 개시후 22~24시간에 탈핵하고, 난의 활성화를 위해 탈핵된 난자를 배양후 체외성숙 30~40시간에 핵이식을 하는 'aged cytoplast'의 이용이 더 높은 분할율을 나타내었다(Yang 등, 1993; Yang, 1991).

공핵란으로는 *in vivo* 및 *in vitro* 유래 수정란 모두 이용 가능하지만, 일반적으로 우량 형질을 지닌 개체에서 자연배란 또는 과배란 처치 후에 수정란을 채취한 *in vivo* 유래 수정란을 이용한다. 그러나 실험에 필요한 수정란의 수적 제한을 극복하고, 핵이식란을 다시 핵이식 과정의 공핵란으로 이용하는 일련의 재순환기법 (recycling method) 으로 클론동물을 생산하며, 우량 형질의 개체에서 초음파검사를 통하여 난소에서 지속적으로 난자를 채취하여 공핵란으로 사용하기 위해서는 체외배양을 통한 공핵란의 공급 기법이 필요하다 (Hasler 등, 1995; Takano 등, 1994; Stice 와 Keefer, 1993).

고능력 유전 자원이 빈약하고 집약적 축산형태를 지닌 국내 축산여건에서는 특히 고능력축의 대량생산 수단으로써 핵이식 복제기법의 산업화가 시급한 실정이다. 저자 등은 유우 및 한우에서 고능력 공란우를 선발하여 채취한 수정란과 *in vitro* 유래 수정란을 공핵란으로 하여 핵이식 복제 수정란을 작성하고 수란우에 이식하여 1995년 1월 29일 첫 송아지가 분만된 이래 연속적 결과가 도출 중에 있어 이를 보고한다.

재료 및 방법

1. 체외성숙

도축장에서 난소를 채취하여 38℃의 멸균 생리식

염수가 들어있는 보온병에 넣어 1시간 내에 실험실로 운반하였다. 주사침(18gauge)이 연결된 10 ml의 주사기로 5% fetal calf serum (Gibco laboratories, USA; FCS)이 첨가된 tissue culture medium 199 (Gibco, TCM199)을 2 ml 흡인한 다음 직경 3~8 mm의 小난포로부터 난자를 채취하였다. 회수된 난포란은 Wiemer등 (1991)의 기준에 따라 선별하였다. 배양액은 10% FCS 첨가 TCM 199이 분주되어 있는 4-well dish (Nunc, USA)의 각 well 내에 10 ng/ml의 epidermal growth factor (Boehringer Mannheim, Germany; EGF)와 직경 10~15 mm의 성숙난포로부터 채취된 과립막세포를 세정하여 2.0×10^6 개/ml의 농도로 첨가하였다. 각 well당 15개씩의 난자를 넣어 공기 및 습도가 포화상태인 39℃, CO_2 배양기내에서 20~24시간 배양하였다.

2. 체외수정

정액은 straw당 4×10^7개의 정자가 들어 있는 유우 및 한우 동결정액을 이용하였으며, 기본배양액은 modified Tyrode-medium (Parrish 등, 1988; TALP) 이었다. 난자의 성숙배양 22시간 후에 동결정액을 38℃ 수조에 30초간 담그어 융해시킨 후 현미경하에서 정자의 운동성을 검사하였다. 준비된 10개의 round bottom plastic tube (Falcon, USA; 11×55 mm)에 1 ml의 수정능획득용 배지 (cap-TALP)를 넣고, 0.2 ml씩의 정액을 첨가하여 CO_2 배양기내에서 1시간 배양하였다 (swimup 과정). 그 후 각 tube내에서 상층액 0.8 ml를 하나의 원심관에 모으고 2회 원심분리 (500 g, 10 min) 하여 동결보호제 및 희석액을 제거하고, 생존성 있는 활력정자를 선별하였다. 수정능획득과 첨체반응 유도를 위해 정자농도를 5×10^7 개/ml로 조정하여 heparin (Gibco; 200 μg/ml) 을 포함한 cap-TALP를 동량 첨가한 후 CO_2 배양기에 15분간 배양하였다. 정자를 swim-up시키는 동안 성숙난자는 팽대된 난구세포의 1/3정도를 벗겨낸 후 light white oil (mineral oil; Sigma, USA) 이 도포된 60 mm petridish (Costar, USA) 내의 수정용 배지 (IVF-TALP) 43 μl drop에 3 μl의 배지와 함께 각각 5~10개씩 주입하였다. 체외수정은 난자의 drop에 heparin 처리 후 4 μl의 배지로 정자 농도가 2.5×10^6 개/ml가 되도록 첨가하여 CO_2 배양기내에서 30시간 동안 실시하였다.

3. 분할란의 체외배양

초기 황체기 소 난관을 5% FCS 첨가 TCM199으로 관류시켜 난관상피세포를 채취하였다. 난관상피세포는 5% FCS 첨가 TCM199으로 3회 원심분리 (700 g, 5 min) 한 후 10% FCS 첨가 TCM199이 0.5 ml씩 분주된 24-well dish에 3일간 배양하여 monolayer를 만들었다. 형성된 monolayer에는 초기배 (4-, 8-세포기)를 각 well당 12~15개씩 넣어 체외배양하였다.

4. 수핵난자의 준비 및 미세조작

수핵난자는 중기 Ⅱ 단계의 *in vitro* 성숙난자(성숙 22시간후)를 0.1% hyaluronidase (Sigma, USA)가 첨가된 PBS(−) (Gibco laboratories, USA) 내에서 난구세포를 벗겨낸 후, 제 1 극체가 보이는 것만을 선별하였다. 미세조작은 differential interference contrast(DIC)가 장착된 도립현미경 (Leitz, Germany; ×250) 하에서 실시하였다. 수핵난자는 탈핵을 용이하게 하기 위하여 미리 투명대의 10~20% 정도를 절개하고 7.5 μg/ml의 cytochalasin B (Sigma, USA)가 함유된 PBS(−) 20 μl의 미소적내에서 20분간 전배양 하였다. 전배양 후 외경 20 μm의 탈핵용 pipette을 사용하여 수핵난자의 절개되어진 투명대를 관통하여 제 1 극체와 중기 염색체를 karyoplast 형태로 흡입, 제거하였다. 수핵난자는 탈핵후 10% FCS 첨가 TCM199이 분주된 4-well dish에 넣어 CO_2 배양기내에서 8~10 혹은 18~20시간 동안 배양하였다.

5. 공핵수정란의 준비 및 미세조작

In vitro 유래 16~32세포기의 공핵란을 0.5%의 pronase(Sigma, USA)가 첨가된 PBS(−)내에서 1분 동안 처리하여 투명대를 제거한 후, PBS(−) 2 ml가 분주된 35 mm petridish로 옮겨 할구를 분리하였다. *In vivo* 유래의 공핵란 준비를 위해 생산성적, 내병성 및 번식성이 우수한 공란우를 선별하여 발정주기 13일째부터 FSH + $PGF_{2\alpha}$에 의한 감량

법으로 과배란 처치한 후 자궁경관 경유법으로 난을 회수하였다. 수정란은 실체현미경 하에서 검란하여 excellent 및 good 등급으로 판단되는 상실배를 핵이식의 공핵란으로 사용하여 *in vitro* 유래 공핵란의 준비와 동일하게 하였다. 분리한 공핵란의 할구는 수핵난자가 들어있는 35 mm petridish내의 PBS(−) 20 μl의 미소적으로 옮겨 근접시켜 놓았다. 공핵란의 할구를 외경 30 μm의 주입용 pipette 내로 흡입하여 탈핵된 수핵난자의 절개된 투명대를 관통하여 주란강에 주입하였다.

6. 전기융합

핵이식란은 light white oil이 도포된 60 mm petridish의 0.3 M sucrose (0.1 mM $MgSO_4$, 0.05 mM $CaCl_2$) 20 μl의 미소적내로 옮겨 10분동안 평형시킨 후, electrode를 사용하여 인위적으로 agglutination plane과 전류통전 방향이 수직이 되도록 정렬시켰다. 전기적 세포융합은 DC 1.0 kV/cm에서 100 μsec의 조건으로 1회 통전하였다. 통전 1시간 후에 현미경하에서 세포융합 여부를 판정하였다.

7. 핵이식 수정란의 배양

핵이식 수정란은 난관상피세포와 공배양하여 후기배로의 발육을 유도하였다. 융합이 확인된 핵이식 수정란은 10% FCS 첨가 TCM199이 0.5 ml씩 분주된 24-well dish의 각 well당 10~15개씩 첨가하여 공기 및 습도가 포화상태인 39℃, CO_2 배양기 내에서 배양하였으며, 수정후 5, 7일째에 각각 후기배로의 발육률을 조사하였다.

8. 핵이식 수정란의 이식

수란우로는 젖소 암소 중에서 생후 18개월 이상이며, 임상적 소견과 임상병리학적 검사에 의하여 건강하다고 인정되고, 처치전까지 3회 이상의 정상적인 발정주기를 보인 미경산우 및 경산우를 선발하였다. 발정 동기화시킨 수란우의 발정 7일째에 자궁의 상태 및 황체의 위치(좌 또는 우)를 확인하고 상실배 또는 배반포까지 체외배양한 핵이식 수정란을 20% FCS 첨가 PBS 배양액과 함께 0.25 ml French straw에 흡인하여 봉한 후 Cassou gun을 사용하여 비외과적 자궁경관 경유법에 의해 자궁난관 접합부로부터 5 cm이내의 자궁각 선단부에 이식하였다.

9. 임신진단 및 산자생산

핵이식 수정란은 이식후 45~60일에 직장검사법에 의한 태막할 및 양막낭 촉진과 초음파진단을 이용하여 수태 여부를 판정하였다. 이후 280여일간의 임신기간 동안 수란우의 산전관리 및 분만처치를 통해 산자를 생산하였다.

10. 통계학적 분석

실험결과의 통계학적 유의성 검정은 χ^2-test를 이용하여 실시하였다.

결 과

1. 수핵난자의 성숙시간에 따른 세포융합률 및 분할율

핵이식시 *in vitro* 유래 난자를 수핵난자로 이용하였을 경우 수핵란의 activation competence를 유도하기 위하여 전기적 융합 후의 세포융합률과 체외배양후 핵이식 수정란의 분할율 및 후기배로의 발육률은 Table 1과 같았다.

수핵난자의 세포질 성숙시간 (30h vs. 40h)에 따른 세포융합률 (72.7% vs. 80.8%), 분할율 (62.5% vs. 71.4%) 및 후기배로의 발육률 (12.0% vs. 15.2%) 은 통계적인 유의차가 인정되지 않았다.

2. 공핵란에 따른 소 핵이식 수정란의 세포융합률과 발육률

공핵란의 유래에 따른 핵이식 수정란의 발육률을 알아보기 위해 과배란처치한 소에서 회수한 *in vivo* 수정란 및 성숙, 수정, 발육의 전과정을 체외에서 실시한 *in vitro* 수정란을 공핵란으로 사용하였을 경우 세포융합률과 후기배로의 체외발육률은 Table 2에 나타나 있다.

공핵란의 유래에 따른 세포융합률의 차이는 보이지 않았으나, 후기배로의 발육률은 *in vivo* 유래의 공핵란을 사용하였을 경우(21.8%)가 *in vitro* 유래의 공핵란 사용(11.9%)에 비해 유의적으로 높았다

Table 1. The fusion rates and *in vitro* development of nuclear transplant embryos with recipient cytoplast of different ages*

Oocyte age (h)**		No. of embryos	No. (%) of	No. (%) of developed to	
En	NT	fused/examined (%)	cleaved	16-cell	Mo-BL
22	30	120/165 (72.7)	75 (62.5)	19 (25.3)	9 (12.0)
22	40	147/182 (80.8)	105 (71.4)	32 (30.5)	16 (15.2)

* IVM oocytes were used as nuclear recipients and IVM/IVF embryos (16~32 cells) were used as nuclear donor cells

** En: enucleation, NT: nuclear transfer

Table 2. Development of nuclear transplant embryos with different source of nuclear donor embryos

Source of	No. of fused/nuclear	No. (%) of developed to	
donor embryo	transferred (%)	8-16 cell	Mo-BL
In vivo-derived	344/471 (73.0)	95 (27.6)	75 (21.8)[a]
In vitro-derived	337/428 (79.2)	71 (21.1)	40 (11.9)[b]

[a, b] Values within columns with different supercripts differ. $p<0.01$

Table 3. Pregnancy and calving rates after transfer of nuclear transplant embryos

Source of	No. of	No. of
donor embryo	pregnancy/transferred (%)	calves/transferred (%)
In vivo-derived	39/71 (45.9)	17/71 (23.9)[a]
In vitro-derived	15/37 (40.5)	4/37 (10.8)[b]

[a, b] Values within columns with different supercripts differ. $p<0.01$

($p<0.01$).

3. 핵이식 수정란에 의한 수태율과 산자 생산율

핵이식 수정란은 자궁경관을 통한 비외과적 이식기법으로 발정동기화된 수란우에 이식하여 수태를 유도하였다. 수태율 및 산자 생산율은 Table 3과 같다.

서로 다른 유래의 공핵란에 의해 작성된 핵이식 수정란을 수란우에 이식하였을 때 수태율(45.9% vs. 40.5%)은 유의차가 없었으나, 산자 생산율은 *in vitro* 유래의 핵이식란(10.8%)을 이식하였을 때보다 *in vivo* 유래의 핵이식란(23.9%)의 경우에 유의적으로 높았다 ($p<0.01$).

생산된 21두의 산자에 대한 성비는 암컷이 55%로 약간 높게 나타났으며, 핵이식 산자의 경우 언급되는 과체중현상이 나타나 평균체중이 53.5 kg이었다. 이로 인해 2두는 분만과정 중에 사망하였으며, 15두는 제왕절개수술로, 4두는 자연분만으로 생산되었다.

토 의

소 핵이식 수정란의 작성시 *in vitro* 유래의 난자를 수핵난자로 사용하는 실험체계를 정립하고, *in vitro* 및 *in vivo* 유래 공핵란을 이용하여 핵이식 산자를 생산하였으며, 이의 효율을 비교 검토하였다. 소 핵이식 수정란의 체내 이식에 의한 복제동물 생산의 산업화를 위해서는 핵이식시 이식된 핵의 기질이 될 수 있는 수핵난자의 확보라는 선결과제가 제기된다. 수핵난자로 *in vivo* 및 *in vitro* 유래의 난자를 이용할 수 있으나, 경제성과 편의성 측면에서 *in vitro* 유래 난자의 이용 효율을 제고시킬 필요가 있다. 또한 우량 유전형질의 공핵란의 확보가 필수조건으로, 공란우에 대한 과배란 처치후 비외과적

난회수에 의한 공급체계가 일반적 수단이다. 그러나 향후 초음파를 사용한 우량 개체의 난소에서 직접 난자를 반복적으로 채취하여(Hasler 등, 1995) 이를 체외수정후 공핵란으로 이용하거나, *in vitro* 유래의 난을 이용하여 인위적인 형질전환 (Thomas 등, 1993), 배간세포의 이용(Pedersen, 1994) 또는 성감별(sexing; Thibier와 Nibart, 1995) 후 판명된 공핵란 유래의 핵을 수핵난자에 이식하는 기법 등을 수행하려면 핵이식 수정란 생산체계의 전과정을 체외에서 수행할 필요가 증대된다.

본 연구에서는 먼저 수핵난자로 이용된 *in vitro* 성숙난자의 서로 다른 세포질 성숙도에 따른 핵이식 수정란의 세포융합률, 분할율 및 상실배나 배반포로의 발육률을 비교 검토하였다. 난소에서 채취한 난자를 30시간이나 40시간 동안 세포질 성숙시킨 군에서의 세포융합률은 각각 72.7, 80.8%를 보여 성숙시간에 따른 유의차는 없었으며, 세포융합률이 74~80%로 나타난 Yang 등(1993)의 보고와 유사한 결과였다. 분할율은 각각 62.5와 71.4%로서 52~70%를 나타낸 Stice와 Keefer(1993)와 유사한 결과였다.

본 연구에서는 세포질 성숙도에 따른 유의적인 발육률의 차이는 인정되지 않았으나, Sims 등 (1991)은 충분한 시간동안 세포질을 성숙시킨 후 핵이식하였을 때 핵이식배의 발육률이 증가되었는데, 이는 융합시간을 지연시킴으로 핵이식 수정란의 발육에 충분한 난세포질 성숙이 이루어지기 때문이라고 하였다. 또한 수핵난자로 이용된 aging된 세포질은 어린 난세포질의 경우 보이는 성숙촉진인자 (MPF)에 의한 염색체 응축(PCC) 현상이 억제되어 공핵의 세포주기 단계와의 차이에 의한 영향이 감소된다는 보고가 있다(Collas와 Robl, 1991). 이러한 근거는 단위발생처리에 의한 소 난자 활성화율이 난자의 aging에 크게 좌우된다는 First 등 (1992)과, 분할구 주입후 융합시간이 36시간 이후로 지연됨으로써 핵이식배의 분할율과 체외발육률이 증가되었다는 Rao 등 (1993)의 보고로도 뒷받침된다고 하겠다. 비록 본 실험에서 수핵난자의 세포질 성숙도에 따른 통계적인 유의차는 인정되지 않았지만 이의 규명에 대한 진전된 연구가 후속되어야 할 것이다.

핵이식 복제동물 생산의 산업화를 위해서는 원활한 공핵란의 공급이 전제되어야 하는 바, 이의 한 수단으로 *in vitro* 유래 수정란의 이용 가능성을 알아보고자 공핵란 유래에 따른 핵이식 수정란의 발육률을 검토한 결과 *in vivo* 유래 공핵란 (21.8%)이 *in vitro* 유래 공핵란 (11.9%)에 비해 유의적으로 높은 후기배로의 발육률을 나타내어 ($p<0.01$) , *in vivo* 및 *in vitro* 유래 공핵란으로부터 각각 10과 20%의 상실배/배반포의 핵이식 수정란을 생산한 Clement- Sengewald (1992) 와 유사한 결과를 얻었으며, 작성된 핵이식 수정란을 체외에서 배양하여 얻은 후기배로의 발육률 또한 타 연구자들의 성적과 유사한 결과를 나타내었다 (Barnes 등, 1991; Stice 등, 1991; Westhusin 등, 1991; Bondioli 등, 1990).

본 연구에서 *in vitro* 유래 공핵란에 의한 핵이식 수정란의 발육률과 산자 생산율은 비록 낮은 성적이었으나, 완전한 실험체계에서 유래된 복제란이 후기배로의 발육뿐 아니라 산자로서 생산까지 가능하다는 사실을 보여 Yang 등 (1993)이 주장한 바와 같이 향후 보완연구가 성공리에 수행된다면, 핵이식 기법에 의한 복제동물 생산의 산업화에 중요한 요인을 제공할 수 있을 것이다.

결 론

소 핵이식 수정란의 이식에 의한 복제 송아지 생산을 위한 효율성 증진을 위해 수핵난자의 성숙시간 및 공핵란의 유래에 따른 전기적 세포융합률, 체외배양 성적, 그리고 핵이식 수정란을 수란우에 이식한 후 임신율 및 산자 생산율을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 수핵난자의 성숙시간(30h vs. 40h)에 따른 핵이식후 세포융합률(72.7% vs. 80.8%), 분할율(62.5% vs. 71.4%) 및 후기배로의 발육률(12.0% vs. 15.2%)을 조사한 결과 각각의 성숙시간에 따른 유의차는 인정되지 않았다.
2. *In vitro* 성숙 유래의 수핵난자에 서로 다른 *in vivo* 및 *in vitro* 유래 공핵란을 이용한 핵이식시 세포융합률은 각각 73.0% 및 79.2%으로 유사하였다. 그러나 후기배로의 발육률은 각각

21.8% 및 11.9%로 유의적인 차이를 보였다 ($p<0.01$).

3. *In vitro* 성숙 유래의 수핵난자와 *in vivo* 및 *in vitro* 유래 공핵란을 이용한 핵이식시 수란우로의 이식후 수태율은 각각 45.9% 및 40.5%로 유사한 결과를 보였으나, 산자 생산율은 각각 23.9% 및 10.8%로 *in vivo* 수정란을 공핵란으로 이용시에 유의적으로 높은 성적을 얻었다 ($p<0.01$).

참고문헌

Barnes FL, Looney CR and Westhusin ME. 1991. Embryo cloning in cattle. The current state of technology. Embryo Transfer (Schering) 6:1-5.

Bondioli KR, Westhusin ME and Looney CR. 1990. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. Theriogenology 33:165-174.

Bondioli KR. 1992. Commercial cloning of cattle by nuclear transfer. In Seidel GE, Jr(ed): "Proceedings: Symposium on the Cloning of Mammals by Nuclear Transplantation" January 15, 1992, Fort Collins, Colorado, pp. 35-38.

Briggs R and King TJ. 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cell into enucleated frog eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. 38: 455-463.

Clement-Sengewald A, Palma GA, Berg U and Brem G. 1992. Comparison between *in vitro* produced and *in vivo* flushed embryos for cloning experiments in cattle. Theriogenology 37:196(Abstr.).

Collas P, Balise JJ and Robl JM. 1992. Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant embryos. Biol. Reprod. 85:715-720.

Collas P and Robl JM. 1991. Relationship between nuclear remodeling and development in nuclear transplant rabbit embryos. Biol. Reprod. 45:455-465.

First NL, Leibfried-Rutledge ML, Northey DL and Nuttleman PR. 1992. Use of *in vitro* matured oocytes 24hr of age in bovine nuclear transfer. Theriogenology 37:211(Abstr.).

Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE Jr., Wall RJ, Bolt DJ, Palmiter RD and Brinster RL. 1986. Genetic engineering of mammalian embryos. J. Anim. Sci. 63:269-278.

Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mowei SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE and Trimmer SA. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. Theriogenology 43:141-152.

Illmensee K and Hoppe PC. 1981. Nuclear transplantation in *Mus muscuius*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. Cell 23:9-18.

Marx JL. 1988. Cloning in sheep and cattle embryos. Science 239:463-464.

McLaren A. 1984. Methods and success of nuclear transplantation in mammals. Nature 21:671-672.

Nagai T. 1987. Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes *in vitro* with ethanol. Gamete Res. 16:243-249.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA and First NL. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. Biol. Reprod. 38:1171-1180.

Pedersen RA. 1994. Studies of *in vitro* differentiation with embryonic stem cells. Reprod. Fertil. Dev. 6:543-552.

Prather RS, Barnes FL, Sims MM, Robl JM, Eyestone WH and First NL. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryo: Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. Biol. Reprod. 37:859-866.

Rao VH, Chesne P, Renade JP and Heymen Y. 1993. Influence of age of *in vitro* matured

oocytes and electrical stimulation on the development of cattle nuclear transfer embryos. Theriogenology 39:292(Abstr.).

Sims MM, Rosenkrans C and First NL. 1991. Development *in vitro* of bovine embryos derived from nuclear transfer. Theriogenology 35:272(Abstr.).

Stice SL and Keefer CL. 1993. Multiple generational bovine embryo cloning. Biol. Reprod. 48:715-719.

Stice SL, Keefer CL, Maki-Laurila M and Phillips PE. 1991. Producing multiple generations of bovine nuclear transplanted embryos. Theriogenology 35:273.

Stice SL and Robl JM. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. Biol. Reprod. 39:657-664.

Takano H, Shimizu S, Koyama K, Kozai C, Kato Y and Tsunoda Y. 1994. Production of offspring by nuclear transferred bovine embryos produced *in vitro*. J. Reprod. Dev. 40:167-170.

Thibier M and Nibat M. 1995. The sexing of bovine embryos in the field. Theriogenology 43:71-80.

Thomas WK, Schnieke A and Seidel Jr. GE. 1993. Methods for producing bovine embryos from *in vitro* matured and fertilized oocytes. Theriogenology 40:679-688.

Walker SK, Heard TM and Seamark RF. 1992. *In vitro* culture of sheep embryos without co-culture: success and perspectives. Theriogenology 37:111-126.

Ware CB, Barnes FL, Meike-Laurila M and First NL. 1989. Age dependence of bovine oocyte activation. Gamete Res. 22:265-275.

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.

Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, McKenna AI, Fick GH and Schultz GA. 1991. Effect of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. Mol. Reprod. Dev. 30:330-338.

Willadsen SM. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. Nature 321:63-65.

Willadsen SM, Janzen RE, Mcalister RJ, Shea BF, Hamilton G and McDermand D. 1991. The viability of late morula and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. Theriogenology 35:161-170.

Wilmut I, Hoopper ML and Simons JP. 1991. Genetic manipulation of mammals and its application in reproductive biology. J. Reprod. Fert. 92:245-279.

Yang X. 1991. Embryo cloning of sheep and cow embryos. Genome 31:956-962.

Yang X and Anderson GB. 1992. Micromanipulation of mammalian embryos: Principles, progress and future possibilities. Theriogenology 38:315-335.

Yang X, Jiang S and Foote RH. 1993. Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. Mol. Reprod. Dev. 34:94-100.

Yang X, Jiang S, Kovacs A and Foote RH. 1991. Age dependent activation, enucleation and nuclear transfer of bovine oocytes matured *in vitro* and *in vivo*. Biol. Reprod. 44(Suppl. 1):141(Abstr.).