

## 수핵란의 전활성화가 토끼 핵이식 수정란의 체외발달에 미치는 효과<sup>†</sup>

전병균 · 송상현 · 정기화\* · 광대오\*\* · 이호중\*\*\* · 최상용\*\*\* · 박충생

경상대학교 축산학과

## Effect of Electrical Preactivation of Recipient Cytoplasm on *In Vitro* Development in Nuclear Transplant Rabbit Embryos

Jeon, B. G., S. H. Song, K. H. Chung\*, D. O. Kwack\*\*,

H. J. Lee\*\*\*, S. Y. Choe\*\*\* and C. S. Park

Department of Animal Science, Gyeongsang National University

### SUMMARY

To examine the efficiency of nuclear transplantation the influence of electrical preactivation of recipient cytoplasm on the *in vitro* developmental potency in the nuclear transplant rabbit embryos were evaluated. The embryos of 16-cell stage were collected and synchronized to G<sub>1</sub> phase of 32-cell stage. The recipient cytoplasm was obtained by removing the first polar body and chromosome mass by non-disruptive microsurgery procedure. The separated G<sub>1</sub> phase blastomeres of 32-cell stage were put into the non-preactivated and /or the preactivated recipient cytoplasm by electrical stimulation. After culture until 20h post-hCG injection, the nuclear transplant oocytes were electrofused. The fused nuclear transplant embryos were co-cultured with rabbit oviduct epithelial cells and monitored every 24h to assess for developmental rate. After *in vitro* culture for 120h, the nuclear transplant embryos developed to blastocyst stage were stained with Hoechst 33342 and their blastomere were counted.

The electrofusion rate was similar to the non-preactivated and preactivated recipient cytoplasm(81.8 and 85.7%, respectively). However, the *in vitro* developmental rate to blastocyst stage with the non-preactivated recipient cytoplasm (57.1%) was found significantly ( $P < 0.05$ ) higher, compared to the preactivated recipient cytoplasm(20.8%). The cell counts of nuclear transplant embryos developed to blastocyst stage were increased significantly ( $P < 0.05$ ) more in the non-preactivated recipient cytoplasm (163.7 cells), as compared with the preactivated recipient cytoplasm(85.4 cells). These results considered better that non-preactivated oocytes, M II phase oocytes, were used for recipient cytoplasm in the rabbit nuclear transplant procedure.

(Key words : Rabbit nuclear transfer, Preactivation, Embryo developments, Recipient cytoplasm)

<sup>†</sup> 본 연구는 교육부에서 1995년도에 지원한 유전공학 학술연구조성비로 수행되었음.

\* 축산기술연구소 사천지소(Sacheon Branch Institute, Korean National Livestock Research Institute)

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

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

## I. 서론

핵이식 수정란을 생산하는데 있어서 수핵란은 전핵 단계를 탈핵한 난자를 사용하여 왔으나 생쥐를 이용한 실험에서 전핵 단계 수핵란을 이용한 핵이식 수정란의 체외발달율은 낮은 실정이다(McGrath와 Solter, 1983; Robl 등, 1987). 또한 소, 양, 돼지 등과 같은 대동물 난자나 수정란의 세포질에는 많은 지질소포가 존재하며 이것으로 인하여 염색체나 핵의 관찰이 용이하지 않기 때문에, Robl 등(1987)은 소에서 난자를 원심분리하여 관찰된 핵을 제거한 다음 수핵란으로 사용하였다. 그러나 제2감수분열의 중기(metaphase II, M II)에 정지하고 있는 난자의 염색체는 제 1극체 아래에 난자의 원형질막과 인접한 세포질 내에 존재하므로 우선 탈핵이 용이하며, 이러한 난자를 이용하여 1986년 Willadsen이 처음으로 면양에서 산자를 생산하여, 핵이식 기법에서 수핵란은 전핵 단계보다는 성숙된 M II 난자가 더 효율적이라고 하였다.

체세포와 마찬가지로 난자와 수정란에서도 간기와 분열기의 전이는 maturation promoting factor (MPF)라 불리는 물질에 의해서 유도되며(Masui와 Markert, 1971; Newport와 Kirschner, 1984; Gerhart 등, 1984; Christmann 등, 1994) 제2감수분열의 중기에 정지하고 있는 성숙된 M II 난자 역시 높은 수준의 MPF가 존재한다(Miake-Lye 등, 1983; Lohka와 Maller, 1985; Miake-Lye와 Kirschner, 1985). 이러한 세포질 속의 MPF는 nuclear envelope breakdown(NEBD), prematurely chromosome condensation(PCC), nucleoli의 분산 그리고 핵막을 재형성하여 전핵을 형성하고 핵이 팽화(nuclear swelling)되는 일련의 수정란 reprogramming 과정에 선도적 역할을 한다(Stice와 Robl, 1988; Murray와 Kirschner, 1989; Stice와 Robl, 1988; Collas와 Robl, 1991; Collas 등, 1992a; Campbell 등, 1993; Pinto-correia 등, 1995). DiBerardino (1987), Modlinski와 Smorag(1991) 및 Barnes 등(1987)은 개구리의 핵이식 수정란에 있어서 사용된 공핵란이 분화로 인하여 핵의 비가역적인 변화와 부적당한 reprogramming이 수정란의 발달에 장애를 준다고 하였다. 또한 Keefer 등(1994)은 소에서 성숙한

M II 난자를 수핵란으로, 내세포괴를 공핵란으로 사용하여 산자를 생산하였으나 산자는 해부학적으로 비정상적이었는데, 이러한 원인으로는 제한된 reprogramming으로 인한 유전자 발현의 부족이라고 하였으며, Collas와 Barnes(1994)도 토끼의 핵이식 수정란의 발달 정지나 지연은 분화된 세포에서 유전자 발현의 부족에 기인한다고 하였다. 또한, Latham 등(1994)은 생쥐에서 전핵 단계의 수핵란과 8-세포기의 공란핵을 융합한 후 단백질을 분석한 결과, 핵이식 수정란의 발달정지 원인은 공란핵의 reprogramming의 부족으로 인한 유전자의 재활성화가 일어나는데 실패했기 때문이라고 보고하였다. 수핵란의 측면에서 성숙한 M II 난자는 전핵단계보다 융합 후 핵의 재구성에 의하여 좀더 기능적인 전핵으로 염색질을 변화시킨다고 하며(DiBerardino, 1992), 전핵 단계의 수정란보다 성숙된 M II 난자가 reprogramming 능력이 우수하다고 보고하였다(Smith와 Wilmut, 1989).

그러나 Collas 등(1992b) 및 Banes 등(1993)은 S기의 할구를 M II 난자에 융합하였을 경우 PCC 등의 핵 재구성 과정에서 염색체의 이상이 많다고 하였으며, 토끼에서 Pinto-correia 등(1995)은 핵이식 수정란은 난자 내로 융합된 S기 공란핵의 염색체 응축으로 인하여 DNA 합성, 핵인의 활동 및 특이한 물질이 손상이 일어난다고 하여, 성숙된 M II 난자에 융합하는 공핵란 할구 세포의 세포주기는 핵이식 수정란의 핵형을 유지하게 하고 핵이식 수정란의 발달에 많은 영향을 미치게 되므로 공핵란 할구의 세포주기는 매우 중요한 요인으로 알려져 있다(Collas 등, 1992a, 1992b; Kono 등, 1992; Cheong 등, 1993; Pinto-correia 등, 1993). 또한, 핵이식 수정란에서 정상적인 핵형을 유지하는데 융합된 핵의 핵막 유지는 중대한 문제라고 보고하였다(Campbell 등, 1993, 1994). 성숙된 M II 난자를 인위적인 활성화 자극으로 난자가 활성화 되고 나면 난자 내 높은 수준의 MPF는 차츰 감소하게 된다(Powell과 Barnes, 1992). 이때의 수핵란에 융합된 할구들은 핵막의 소실, 염색체의 응축이나 핵의 팽화 등과 같은 핵의 재구성 과정이 생기지 않고 할구의 핵은 핵막을 그대로 유지하여 정상적인 핵형을 가지는 핵이식 수정란을 생산할 수 있을 것이다. Campbell 등(1994)은 면양에서 난자 내의 MPF 활성이 낮아진 난자를 사용하여 높은 배반포로의 발달율과 산자 생산

에 성공하였다. 소에서 Aoyagi 등(1994) 및 Stice 등(1994)도 S기의 할구를 공핵란으로 사용하고 탈핵한 MII 난자에 인위적인 자극을 준 다음 사용한 수핵란이 MII 난자를 수핵란으로 사용한 경우보다 배반포로의 향상된 발달율을 얻었으며, Stice 등(1994)은 산자를 생산하였다. 그러나 생쥐에 있어서 Cheong 등(1992)은 전핵 단계와 MII 난자를 각각 수핵란으로 사용하고 8-세포기를 공핵란으로 사용한 핵이식 수정란의 발달율과 산자의 생산은 비슷하다고 보고하고 있다.

본 연구는 토끼를 사용하여 세포주기를 조절한 32-세포기의 G<sub>1</sub>기 할구를 공핵란으로 사용하여 탈핵된 난자를 전기적 방법으로 활성화를 유도한 후 핵이식 수정란을 생산하여, 수핵란의 전환성화가 핵이식 수정란의 체외 발달에 미치는 영향을 조사하고자 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시 동물

본 실험에 사용된 공시 동물은 New-Zealand White 종의 성숙된 토끼로서 연암원에축산전문대학으로부터 공급받았으며 사용 전에 개체별 분리 사육하였고 물과 사료는 자유로이 급식하였다.

### 2. 수핵란의 준비

토끼의 과배란 유기는 성숙한 암토끼를 30 mg FSH(Foltropin<sup>®</sup>, Australia)를 3일 동안 하루에 두 번씩 분할하여 근육주사하였고, 마지막 주사 12시간 후 hCG(Puberogen<sup>®</sup>, Japan) 100IU를 정맥주사하였다. hCG 주사 후 13~15시간에 chlorpromazine HCl과 ketamine HCl로 전신마취한 다음 개복 수술하여 난관으로부터 성숙 난자를 10% fetal calf serum(FCS, Gibco Co., U.S.A.)이 함유된 Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS, Sigma Co., U.S.A.)으로 회수하였다. 회수된 난자는 300 IU/ml hyaluronidase (Sigma Co., U.S.A.)용액에서 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 7분간 방치한 다음, 150 $\mu$ m fire-polished pipette으로 반복 pipetting하여 난구 세포를 제거하고 제 1극체가 명확하고 세포질이 균일하며 충실한 것만 수핵란으로 사용하였다.

### 3. 공핵란의 준비 및 세포주기의 조절

토끼의 과배란 유기는 수핵란 준비와 같은 방법으로 실시하였으며, hCG주사 직후 성숙된 수토끼와 교미시켰다. 16-세포기의 수정란은 hCG 주사 후 48시간에 채란하였고, 32-세포기의 G<sub>1</sub>기로 세포주기를 조절하였다. 할구 세포를 32-세포기의 G<sub>1</sub>기로 세포주기를 동기화하는 방법은 Collas 등(1992a)의 방법으로, 간단히 요약하면, 채란된 16-세포기의 수정란을 0.5 $\mu$ g/ml microtubules 중합 억제제인 colcemid(Gibco Co., U.S.A.) 및 10% FCS가 포함된 M-199(Earl's salt, Sigma Co., U.S.A.) 배양액에서 10시간 배양하여 16-세포기 단계에서 32-세포기 단계로 넘어가는 세포분열의 중기에 정지시킨 할구를 0.5% pronase(Sigma Co., U.S.A.)에서 8분간 배양하여 mucin coat 및 투명대를 제거한 다음, 50 $\mu$ m 정도의 pipette으로 Ca<sup>2+</sup> 및 Mg<sup>2+</sup> 결여된 PBS에서 할구를 분리하였다. 이를 세척 후 DNA 합성 억제제인 0.1 $\mu$ g/ml aphidicolin(Sigma Co., U.S.A.) 및 10% FCS를 포함한 M-199 배양액에서 1.5~2시간 동안 배양하여 세포분열 완성 후 32-세포기의 G<sub>1</sub>기로 동기화된 할구를 공핵란으로 사용하였다.

### 4. 핵이식을 위한 미세조작

수핵란의 탈핵을 위한 미세조작은 Stice와 Robl(1988)과 Collas 등(1989)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 수핵란과 공핵란으로부터 분리된 할구 세포를 7.5 $\mu$ g/ml cytochalasin B(Sigma Co., U.S.A.), 0.1 $\mu$ g/ml aphidicolin 그리고 10% FCS가 함유된 Earl's balanced salt solution(EBSS, Sigma Co., U.S.A.)에서 15분간 방치한 다음 DIC 도립현미경(Nikon Co., Japan)에 장착된 micromanipulators(Narishige Co., Japan)에서 미세조작을 실시하였다. 미세조작은 동일한 EBSS용액에서 McGrath와 Solter(1983)의 non-disruptive 방법에 의하여 탈핵을 실시하였는데, 성숙된 MII 난자를 한편에 직경 150 $\mu$ m 정도의 미세 pipette으로 고정시키고 다른 한편에 직경 30 $\mu$ m의 연마된 미세 pipette를 투명대 내로 진입시켜 제1극체와 그 주위에 위치하는 제2감수분열 중기의 염색체를 원형질막에 싸여진 채로 흡입하여 제거하였다. 탈핵된 난자는 hCG 주사 후 18시간까지

배양한 다음 세포 융합과 같은 조건의 전기자극으로 난자의 전활성화를 유도하였다. 이러한 난자를 Ozil (1990)의 방법에 따라 난자 세포질의 형태에 의하여 난자의 활성화 여부를 판단하여 난자가 활성화된 것을 골라 수핵란으로 사용하였고, 세포주기가 조절된 G<sub>1</sub>기의 공란할구를 주입하였다. 할구가 주입된 핵이식 난자는 0.1 $\mu$ g/ml aphidicolin 및 10% FCS가 포함된 M-199 배양액에서 난자의 세포질과 할구의 융합 때까지 배양하였다.

### 5. 세포 융합 및 난자의 활성화

난자와 할구의 융합 및 난자의 활성화는 hCG 주입 후 20시간에 이 등(1993)의 방법에 따라 1.25kV/cm, 60 $\mu$ sec로 3회 전기자극으로 유도하였다. 세포 융합과 난자의 활성화를 위한 용액은 100 $\mu$ M CaCl<sub>2</sub> 및 MgCl<sub>2</sub>가 함유된 비전해질의 0.28M mannitol 용액으로 25 $^{\circ}$ C의 실온에서 2시간 동안 평형시킨 후 사용하였다. 할구가 이식된 난자는 이 용액으로 세척한 다음 paraffin oil이 덮여 있는 소척에 옮기고 할구가 주입된 난자를 배열하여 electro cell fusion manipulator(Eyela Co., Japan)로 할구와 세포질의 융합 및 난자의 활성화를 유도하였다.

### 6. 핵이식 수정란의 체외배양

난자의 세포질과 할구의 융합이 확인된 난자는 0.1 $\mu$ g/ml aphidicolin을 포함한 0.28M mannitol 용액에서 염색체의 응축이 일어나는 동안 DNA의 합성을 억제하기 위하여 대략 20분 동안 배양하였고, 이를 7.5 $\mu$ g/ml cytochalasin B와 10% FCS가 함유된 M-199 배양액에서 1시간 동안 배양한 다음 체외배양을 실시하였다. 체외배양은 노 등(1994)의 방법에 따라 4-well dish에 10% FCS가 포함된 M-199 배양액(Earle's salt, Sigma Co., U.S.A.)에 옮겨 monolayer가 형성된 토끼 난관상피세포와 같이 39 $^{\circ}$ C의 5% CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 120시간 공배양하였다. 배양기간 동안 24시간마다 핵이식 수정란의 발달을 조사하였고, 세포 융합 후 120시간째에 Pursel 등(1985)의 방법에 따라 형광 염색하여 배반포로 발달한 핵이식 수정란의 할구수를 조사하였다.

### 7. 통계학적 분석

실험 결과의 통계학적 분석은 Microsta computer statistical program package를 사용하여 체외발달율은 Chi-square test를 실시하였고, 할구수는 Student T-test를 실시하여 처리군 간의 유의성을 검정하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 핵이식 수정란의 세포 융합율

32-세포기의 G<sub>1</sub>기 할구를 공핵란으로 사용하고 non-preactivated 및 preactivated 난자를 수핵란으로 사용하여 핵이식을 실시한 다음 이들의 세포 융합율을 조사한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다.

32-세포기의 G<sub>1</sub>기 할구를 공핵란으로 사용하고 non-preactivated 및 preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 핵이식 수정란에서 각각 81.8 및 85.7%의 세포 융합율을 보여 세포 융합율에 있어서는 수핵란 세포질의 상태에 따라 서로 유의적인 차이는 나타내지 않았다. 이러한 결과는 이 등(1995) 및 박 등(1996)이 32-세포기 할구를 탈핵된 M II 난자에 핵이식한 수정란에서 80% 내외의 세포 융합율을 보고한 결과와 유사한 성적이었다. Mondlnski와 Smorag(1991)는 토끼에서 M II 난자보다 전핵 단계의 수핵란에서 더 높은 세포 융합율을 보고하였고, Campbell 등(1994)은 면양에서 전핵 단계보다 M II 난자에서 더 높은 세포 융합율을 보고하였다. 그러나 Collas와 Robl(1991)

**Table 1. Effect of electrical preactivation of recipient cytoplasm on the fusion rate of nuclear transplant rabbit embryos**

Recipient cytoplasm	No. of embryos used	No. of embryos fused	Fusion rate(%)
Non-preactivated*	77	63	81.8 <sup>a</sup>
Preactivated**	84	72	85.7 <sup>a</sup>

\* The M II oocytes were fused and activated by electrical pulses at 20 hrs post-hCG.

\*\* After enucleation, the oocytes were preactivated with electrical pulses at 18 hrs post-hCG, and followed by electrical fusion at 20 hrs post-hCG.

<sup>a</sup> The values with same superscripts in the column were not significantly different (P < 0.05).

은 non-preactivated 및 preactivated 난자를 사용한 경우 그 융합율이 모두 100%를 보여 융합율에 차이를 보이지 않았다고 하여 보고자에 따라 결과가 다르게 나타났다. 난자의 성숙도가 진행되고 활성화가 되면 난자 원형질막이 변화되고 전기자극을 주었을 때 미세공 형성의 부족과 피질과립의 방출로 인하여 세포의 융합율은 떨어진다고 보고하고 있으나(Collas 등, 1989), 본 실험에서는 preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 경우에 다소 높은 융합율을 보이고 있으나 유의적인 차이는 없었다. 보고자에 따라 상이한 융합율을 나타낸 것은 실험 방법 및 융합 조건에 의한 차이에 의한 것으로 사료된다.

## 2. 핵이식 수정란의 체외 발달율

G<sub>1</sub>기 할구를 non-preactivated 및 preactivated 난자에 핵이식한 다음, 융합이 확인된 핵이식 수정란을 120시간 동안 10% FCS가 포함된 M-199 배양액에서 토끼 난관상피세포와 공배양한 후 배반포로의 발달율을 조사한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같다.

Non-preactivated 및 preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 핵이식 수정란에서 배반포로의 발달율은 각각 57.1 및 20.8%를 나타내어 preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 핵이식 수정란에서 유의적( $P < 0.05$ )으로 발달율이 낮았다. Collas와 Robl(1991)은 32-세포기 S기의 공핵란과 M II 난자를 수핵란으로 사용한 경우 30~40%, 박 등(1994)은 25% 내외, Yang 등(1990)은 상실배 이상 발달하는 것이 15%이었다고 하였다. 또한 Collas 등(1992a)은 G<sub>1</sub>기를 공핵란으로 M II 난자에 핵이식했을 경우 71%의 높은 배반포로의 발달율을 보고한 성적에 비하여 본 실험에

서는 다소 낮은 발달율을 나타내었으나, 이 등(1995) 및 박 등(1996)의 결과와 비슷한 발달율이었다. 한편, Collas와 Robl(1991)은 32-세포기의 S기 공핵란을 preactivated 난자에 이식하여 22%의 발달율을 보였으나, non-preactivated 난자 즉, M II 난자를 사용한 핵이식 수정란에서는 36%의 발달율을 보여 M II 난자를 수핵란으로 사용한 경우 발달율이 유의적으로 높았다고 하였으며, Modlinski와 Smorag(1991)도 16-세포기의 S기 공핵란을 탈핵한 전핵 단계와 M II 난자를 수핵란으로 사용하여 핵이식 하였을 때 각각 9.5 및 3.7%의 발달율을 보고하여 M II 난자를 수핵란으로 사용한 핵이식 수정란이 더 높은 발달율을 나타내었다고 보고하여 본 실험과 비슷한 경향을 나타내었다.

그러나 Cheong 등(1992)은 생쥐에서 전핵 단계와 M II 난자 사이에 발달율에서 차이를 나타내지 않는다고 하였으며, Campbell 등(1994)은 면양에서 S기의 공핵란을 이식하였을 때 M II 수핵란과 preactivated 난자는 각각 21%와 65%의 발달율로 preactive 난자가 수핵란으로 더 좋다고 하였다. 또한 소에서도 preactivated 난자가 수핵란으로 더 좋다고 보고하였고(Stice 등, 1994; Aoyagi 등, 1994), Kono 등(1994)은 소에서 탈핵한 난자를 전기적인 방법으로 활성화시킨 후 9시간째에 할구를 융합한 핵이식 수정란이 가장 좋은 발달율을 나타내었다고 보고하였으나 본 실험에서는 반대되는 결과를 얻었다.

본 실험의 결과에서 토끼에 있어서 G<sub>1</sub>세포기를 공핵란으로 이용할 때 수핵란은 M II 기 난자를 이용하는 것이 핵이식 수정란의 발달율을 향상시킬 수 있을 것으로 사료된다.

**Table 2. Effect of electrical preactivation of recipient cytoplasm on the *in vitro* development of nuclear transplant rabbit embryos**

Recipient cytoplasm	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to			
		2-cell	8-cell	Morula	Blastocyst
Non-preactivated*	63	58(92.1)	50(79.3) <sup>a</sup>	48(76.2) <sup>a</sup>	36(57.1) <sup>a</sup>
Preactivated**	72	60(83.3)	43(59.7) <sup>b</sup>	28(38.8) <sup>b</sup>	15(20.8) <sup>b</sup>

\* The M II oocytes were fused and activated by electrical pulses at 20 hrs post-hCG.

\*\* After enucleation, the oocytes were preactivated with electrical pulses at 18 hrs post-hCG, and followed by electrical fusion at 20 hrs post-hCG.

<sup>a,b</sup> The values with different superscripts in the column were significantly different ( $P < 0.05$ ).

**Table 3. Effect of electrical preactivation of recipient cytoplasm on the number of blastomere and daily cell cycles of nuclear transplant rabbit embryos *in vitro* developed to blastocyst stage at 120 hrs post-fusion**

Recipient cytoplasm	No. of embryos stained	No. of blastomeres counted*	Mean no. of cell cycle /day
Non-preactivated	10	163.7±17.1 <sup>a</sup>	1.47±0.82 <sup>a</sup>
Preactivated	10	85.4±15.4 <sup>b</sup>	1.28±0.79 <sup>b</sup>

\* Mean±SEM.

<sup>a, b</sup> The values with different superscripts in the column were significantly different ( $P < 0.05$ ).

### 3. 핵이식 수정란의 할구수 및 세포분열 주기

32-세포기의 G<sub>1</sub>기 할구를 공핵란으로 사용하고 non-preactivated 및 preactivated 난자를 수핵란으로 사용하여 핵이식 융합 후 120시간 동안 배양하였다. 배반포기까지 발달한 수정란을 Hoechst 33342로 핵을 형광 염색을 하여 형광현미경 하에서 할구수와 그들의 하루 평균 세포분열 주기를 조사하여 핵이식 수정란의 체외발달 능력을 비교한 결과는 Table 3에 나타난 바와 같다.

배반포로 발달한 핵이식 수정란의 할구수는 non-preactivated 수핵란이 163.7개, preactivated 수핵란이 85.7개로 할구의 수에서 현저하게 차이를 나타내었고 ( $P < 0.05$ ), 1일 동안 핵이식 수정란의 평균 세포분열 주기는 각각 1.47회 및 1.28회를 나타내어, preactivated 난자를 수핵란으로 이용할 경우 120시간 배양 기간동안 1회 정도의 세포분열이 지연됨을 알 수 있었다. 이러한 결과에서 수핵란으로 preactivated 난자를 사용한 경우보다 non-preactivated 난자를 사용하였을 때 높은 체외발달 능력을 나타내어 핵이식에서 수핵란은 활성화 자극을 가하지 않은 탈핵된 M II 난자를 사용하는 것이 좋다고 사료된다. 노등(1994)은 교미 후 24시간에 회수된 1- 또는 2-세포기의 토끼 수정란을 M-199 배양액에서 72시간 배양하였던 바 할구의 수가 216.0±33.6개로 발달되었다고 하였으나 본 실험에서는 120시간 공배양 이후의 할구의 수가 정상 수정란보다 적어 핵이식 수정란이 정상

수정란보다 발달이 지연됨을 알 수 있었다. Modlinski와 Smorag(1991)은 탈핵된 M II 수핵란에 S기의 8-세포기 공핵란을 핵이식하여 120시간 체외배양한 결과 평균 할구수가 109개이었고 12개 중 1개만이 100개 이하의 할구를 가졌으나, 탈핵한 전핵 단계를 수핵란으로 사용하였을 경우 평균 할구수는 96개이었고 12개 중 1개만이 100개 이상의 할구수를 가졌다고 보고하여 성숙한 M II 난자를 사용한 핵이식 수정란이 발달 능력이 높았음을 보여주었다.

Smith와 Wilmot(1989)는 전핵 단계보다 M II 난자가 reprogramming의 능력이 좋다고 하였는데, 본 실험 결과에서도 높은 MPF의 활성을 가지고 있는 non-preactivated 난자 즉, M II 난자에서 높은 발달율을 나타내었는바, 이는 높은 MPF에 의하여 주입된 핵이 재구성되고 reprogramming되므로 인하여 발달율이 향상 되었으라 사료된다.

토끼에서 2-세포기부터 시작된 수정란 genome의 활성화는 32-세포기 단계까지 많은 genome이 활성화되므로 핵이식된 32-세포기 할구는 reprogramming 과정에서 genome의 재활성화가 일어나고 새로운 핵이식 수정란이 발달하는데 유의하다고 사료된다. 그러나 소나 면양의 경우처럼 16-세포기의 단계에서 수정란 genome이 활성화되므로 이 시기 혹은 이 시기를 조금 지난 할구를 공핵란으로 사용한다면 핵의 재구성 여부는 핵이식 수정란의 발달에 미치는 영향이 적을 것으로 사료된다. 따라서 동물 종간의 차이는 있겠지만, 토끼와 소를 비교할 때 32-세포기 단계를 공핵란으로 사용하고 preactivated 난자를 수핵란으로 사용하면 핵이식 수정란의 발달 능력에는 많은 차이가 있을 것으로 사료된다.

## IV. 적 요

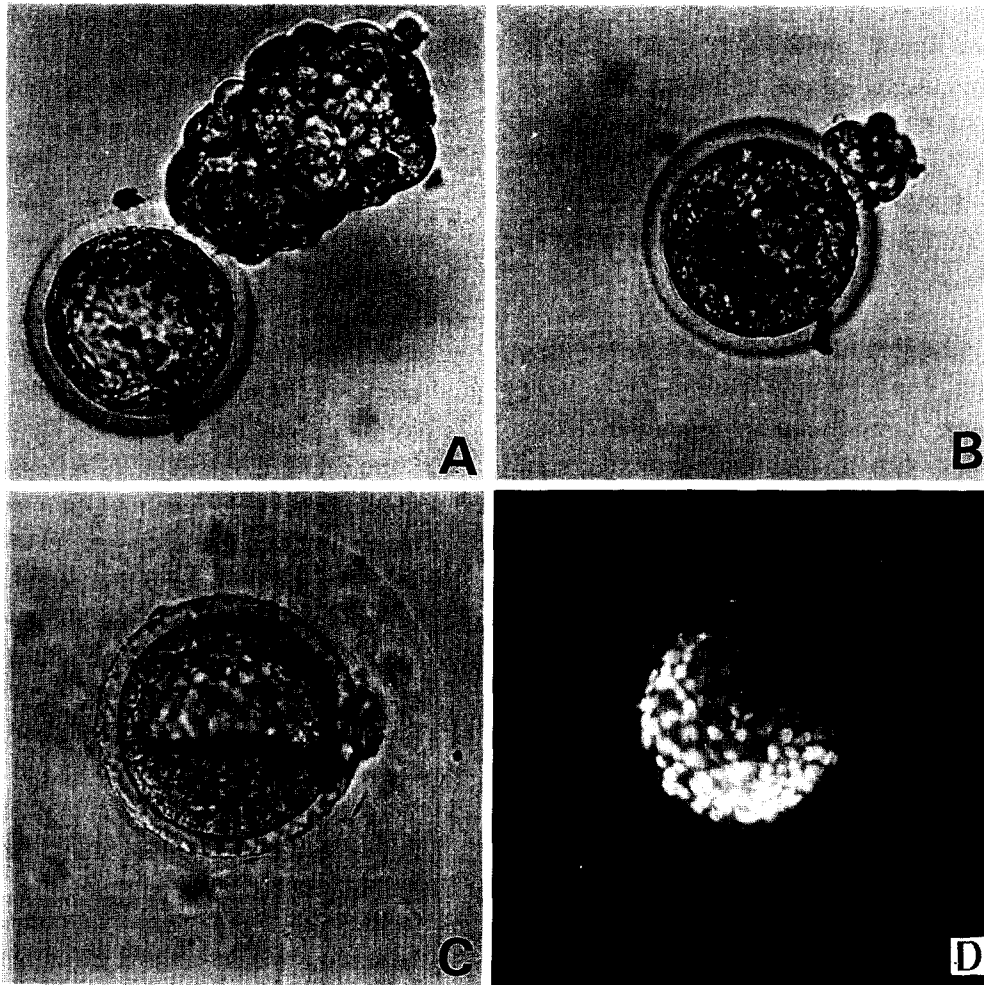
본 연구는 토끼의 핵이식에 있어서 수핵란의 preactivation이 핵이식 수정란의 체외 발달능력에 미치는 효과를 구명코자 G<sub>1</sub>기로 세포주기가 조절된 32-세포기의 할구를 공핵란으로 사용하여 실시하였다.

수핵란은 과배란시킨 토끼로부터 hCG 주사 후 13~15시간에 채란하여 미세조작으로 제1극체와 인접한 제2감수분열 중기의 염색체를 탈핵하여 사용하였다. 탈핵한 수핵란을 hCG 주사 18시간까지 배양한 다

음 전기자극으로 난자의 활성화를 유도하였고, G<sub>1</sub>기로 조절된 32세포기 할구세포를 탈핵한 non-preactivated 및 preactivated 수핵난자의 위란강에 각각 미세조작으로 주입하였다. 할구세포가 주입된 난자는 hCG 주사로부터 20시간에 직류 전류로서 세포의 융합 및 난자의 활성화를 유도하였고, 융합이 확인된 핵이식 수정란은 체외배양을 실시하였다.

Non-preactivated 및 preactivated 난자를 수핵란

으로 사용한 핵이식 수정란에서 각각 81.8 및 85.7%의 융합율을 보여 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 그러나 이들 융합된 핵이식 수정란을 10% FCS가 함유된 M-199 배양액에서 토끼 난관 상피세포층과 같이 5% CO<sub>2</sub>, 39℃ 배양기에서 120시간 공배양하였던 바, 배반포로의 발달율은 non-preactivated 및 preactivated 난자 각각 57.1 및 20.8%를 보여 non-preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 경우에 유의적으로(P



**Fig. 1.** Nuclear transplant rabbit embryos *in vitro* developed to blastocyst at 120 hours post-fusion following nuclear transplant using non-preactivated(A) and preactivated(B) recipient cytoplasm. A intact blastocyst embryo(C) *in vitro* developed after 96 hours from 1-cell stage collected at 24 hours post-hCG injection. A nuclear transplant embryo of blastocyst stage(D) with Hoechst 33342( $\times 100$ ).

< 0.05) 배반포로의 발달율이 높았다. 그리고 이들 배반포를 Hoechst 33342로서 핵염색을 실시하였던 non-preactivated 및 preactivated 난자 유래 수정란의 평균 할구수는 각각 163.7 및 85.4개로서 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 보였으며, 또한 1일간의 평균 세포분열 회수는 각각 1.47 및 1.28회로 preactivated 난자를 수핵란을 사용한 핵이식 수정란에서 120시간의 체외배양 기간동안에 non-preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 핵이식 수정란보다 1회 정도의 세포분열 주기가 지연되었다.

이러한 결과를 종합해 보면 토끼의 핵이식은 non-preactivated 난자 즉, M II 난자를 수핵란으로 사용하고, G<sub>1</sub>기에 있는 할구를 공핵란으로 사용하여 염색체의 손상을 줄이고 주입된 핵의 재구성에 의한 핵이식 수정란의 reprogramming이 일어나게 함으로써 핵이식 수정란의 발달율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 인용문헌

1. Ayogi, Y., M. Konishi, T. Wada and T. Takedomi. 1994. Unaged bovine oocytes successfully develop to blastocysts after parthenogenetic activation of nuclear transfer. *Theriogenology*, 41:157(Abstr.).
2. Barnes, F. L., J. M. Robl and N. L. First. 1987. Nuclear transplantation in mouse embryos : Assessment of nuclear function. *Biol. Reprod.*, 36:1267-1274.
3. Barnes, F. L., P. Collas, R. Powell, W. A. King, M. Westhusin and D. Sheperd. 1993. 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.
4. Campbell, K. H. S., W. A. Pitchie and I. Wilmut. 1993. Nuclear cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos : Implications for deoxyribonucleic acid replication and development. *Biol. Reprod.*, 49:933-942.
5. Campbell, K. H. S., P. Loi, P. Cappai and I. Wilmut. 1994. Improved development to blastocyst of ovine nuclear transfer embryos reconstituted during the presumptive S-phase of enucleated activated oocytes. *Biol. Reprod.*, 50:1385-1393.
6. Cheong, H. T., Y. Takahashi and H. Kanagawa. 1992. Development of mouse embryonic nuclei transferred to enucleated oocytes and zygotes. *Jpn. J. Vet. Res.*, 40:149-159.
7. Cheong, H. T., Y. Takahashi and H. Kanagawa. 1993. Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into oocytes. *Biol. Reprod.*, 48:958-963.
8. Christmann, L., T. Jung and R. M. Moor. 1994. MPF components and meiotic competence in growing pig oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 38:85-90.
9. Collas, P., J. J. Balise, G. A. Hofmann and J. M. Robl. 1989. Electrical activation of mouse oocytes. *Theriogenology*, 32:835-844.
10. Collas, P. and J. M. Robl. 1991. Relationship between nuclear remodelling and development in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 45:455-465.
11. Collas, P., J. J. Balise, G. A. Hofmann and J. M. Robl. 1992a. Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 46:492-500.
12. Collas, P., C. Pinto-Correia, F. A. Ponce De Lean and J. M. Robl. 1992b. Effect of donor cell stage on chromatin and spindle morphology in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 46:501-511.
13. Collas, P. and F. L. Barnes. 1994. Nuclear transplantation by microinjection of inner cell mass and granulosa cell nuclei. *Mol.*



- Reprod. Dev., 38:264-267.
14. DiBerardino, M. A. 1980. Genetic stability and modulation of metazoan nuclei transplanted into eggs and oocytes. *Differentiation*, 17:17-30.
  15. DiBerardino, M. A. 1987. Genetic potential of differentiated cells analyzed by nuclear transplantation. *Am. Zool.*, 27:623-644.
  16. DiBerardino, M. A. 1992. Nuclear reprogramming of amphibian differentiated cell. Symposium on cloning mammals by nuclear transplant (Fort Collins). pp5-7.
  17. Gerhart, J., M. Wu and N. W. Kirschner. 1984. Cell cycle dynamics of an M-phase specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *J. Cell Biol.*, 98:1247-1255.
  18. Keefer, C. L., S. L. Stice and D. L. Mathews. 1994. Bovine inner cell mass cells as donor nuclei in the production of nuclear transfer embryos and calves. *Biol. Reprod.*, 50:935-937.
  19. Kono, T., O. Y. Kwon, T. Watanabe and T. Nakahara. 1992. Development of mouse enucleated oocytes receiving a nucleus from different stages of the second cell cycles. *J. Reprod. Fert.*, 94:481-487.
  20. Kono, T., Y. Sotomaru, F. Apno, T. Takahashi, I. Ogiwara, F. Sekizawa, T. Arai and T. Nakahara. 1994. Effect of ooplast activation on the development of oocytes following nucleus transfer in cattle. *Theriogenology*, 41:1463-1471.
  21. Latham, K. E., J. I. Garrels and D. Solter. 1994. Alteration in protein synthesis following transplantation of mouse 8-cell stage nuclei to enucleated 1-cell embryos. *Dev. Biol.*, 163:341-350.
  22. Lohka, M. J. and J. L. Maller. 1985. Induction of nuclear envelope breakdown, chromosome condensation and spindle formation in cell-free extracts. *J. Cell Sci.*, 101:518-523.
  23. Masui, Y. and C. Market. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.*, 177:129-146.
  24. McGrath, J. and D. Solter. 1983. Nuclear transplantation in mouse embryos. *J. Exp. Zool.*, 228:355-362.
  25. Miake-Lye, R., J. Newport and M. W. Kirschner. 1983. Maturation promoting factor induces nuclear breakdown in cyclohexamide-arrested embryos of *Xenopus laevis*. *J. Cell Biol.*, 97:81-91.
  26. Miake-Lye, R. and M. Kirschner. 1985. Induction of early mitotic events in a cell-free system. *Cell*, 41:165-175.
  27. Modlinski, J. A. and Z. A. Smorag. 1991. Preimplantation development of rabbit embryos after transfer of embryonic nuclei into different cytoplasmic environment. *Mol. Reprod. Dev.*, 28:361-372.
  28. Murray, A. W. and M. W. Kirschner. 1989. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature*, 339:275-280.
  29. Newport, J. and M. Kirschner. 1984. Regulation of the cell cycle during early *Xenopus* development. *Cell*, 30:675-686.
  30. Ozil, J. 1990. The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation. *Development*, 109:117-127.
  31. Pinto-correia, C., C. R. Long, T. Chang and J. M. Robl. 1995. Factors involved in nuclear reprogramming during early development in the rabbit. *Mol. Reprod. Dev.*, 40:292-304.
  32. Powell, R. and F. L. Barnes. 1992. The kinetics of oocyte activation and polar body formation in bovine embryo clones. *Mol. Reprod. Dev.*, 33:53-58.
  33. Pursel, V. G., R. J. Wall, C. E. Rexroad Jr, R. E. Hammer and R. L. Brinster. 1985. A

- rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenology*, 24:687-691.
34. Robl, J. M., R. Prather, F. L. Barnes, W. H. Eyestone, D. Northey, B. Gilligan and N. L. First. 1987. Nuclear transplantation in bovine embryos. *J. Anim. Sci.*, 64:642-647.
  35. Smith, L. C. and I. Wilmut. 1989. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development *in vivo* of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol. Reprod.*, 40: 1027-1035.
  36. Stice, S. L., C. L. Keefer and L. Matthews. 1994. Bovine nuclear transfer embryos : Oocyte activation prior to blastomere fusion. *Mol. Reprod. Dev.*, 38:61-68.
  37. Stice, S. L. and J. M. Robl. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 39:657-664.
  38. Webb, M., S. K. Howlett and B. Marot. 1986. Parthenogenesis and cytoskeletal organization in aging mouse eggs. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 95:131-145.
  39. Willadsen, S. M. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, 320:63-65.
  40. Yang, X, L. Zhang, A. Kovacs, C. Tobback and R. H. Foote. 1990. Potential of hypertonic medium treatment for embryos micromanipulation II. : Assessment of nuclear transplantation methodology, isolation, subzona insertion, and electrofusion of blastomeres to intact of functionally enucleated oocytes in rabbit. *Mol. Reprod. Dev.*, 27:118-129.
  41. 노규진, 이효종, 송상현, 윤희준, 박충생. 1994. 수정란의 체외발달에 미치는 배양액 및 소와 토끼의 난관상피세포들과의 공배양 효과. *한국가축번식학회지*, 18(1): 39-46
  42. 박충생, 전병균, 이효종, 최상용. 1996. 토끼 핵이식 수정란의 체외발달에 미치는 공핵란 세포주기의 효과. *한국가축번식학회지*, 20(2):143-153.
  43. 이효종, 전병균, 박충생, 최상용, 윤창현, 강대진. 1995. 반복핵이식에 의한 복제동물 생산에 관한 연구. II. 토끼에서 공핵배의 세포주기 조절에 의한 제 2세대 복제배의 생산효율 개선. *한국수정란이식학회지*, 10(1):73-82.
  44. 이효종, 최민철, 최상용, 박충생, 윤창현, 강대진. 1993. 반복핵이식에 의한 복제동물 생산에 관한 연구. I. 토끼 수핵난자의 전기자극에 의한 활성화. *한국수정란이식학회지*, 8(2):151-154.  
(접수일자 : 1997. 8. 4. / 채택일자 : 1997. 9. 10.)