

Ionomycin과 6-Dimethylaminopurine이 토끼의 난자 활성화와 핵이식배 생산효율에 미치는 효과

하란조 · 강다원 · 최창용* · 윤희준* · 강태영* · 최상용* · 이효종* · 박충생
경상대학교 축산학과, 축산진흥연구소

Effect of Ionomycin and 6-Dimethylaminopurine on Oocyte Activation and Production of Rabbit Nuclear Transplant Embryos

R. J. Ha, D. W. Kang, C. Y. Choe*, X. J. Yun*, T. Y. Kang*, S. Y. Choe*, H. J. Lee* and C. S. Park

*Department of Animal Science, Institute for Development of Livestock Production,
Gyeongsang National University*

SUMMARY

This study was to determine the effect of ionomycin and 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) and/or electrical stimulation on the oocyte activation and production of rabbit nuclear transplant embryos. The oocytes were collected from the oviduct of superovulated rabbits at 14 h post hCG injection and cultured in TCM-199 containing 10% FBS until 19 h post hCG injection. To determine the optimum concentration and exposure time of 6-DMAP, some oocytes were activated with 5 μ M ionomycin for 5 min and then in 2.0 mM 6-DMAP for 0.5 to 3.0 h, or in 1.0 to 3.0 mM 6-DMAP for 2.0 h. Other control oocytes were stimulated electrically (3X, 1.25 kV/cm, 60 μ sec) in 0.3 M mannitol solution supplemented with 100 μ M CaCl₂ and MgCl₂.

The nuclear donor embryos of 8-cell stage were synchronized to G₁ phase of 16-cell stage, and the recipient cytoplasm was obtained from removal of the first polar body and a portion of membrane bound cytoplasm of the oocytes collected at 15 h post hCG injection. A separated blastomere was injected into the perivitelline space of the enucleated oocytes. The oocytes injected with nucleus were cultured until 19 h post hCG and then electrofused and activated by electrical stimulation with or without ionomycin and 6-DMAP. These nuclear transplant embryos were cultured in TCM-199 containing 10% FBS in 39°C, 5% CO₂ incubator for 120 h.

For the oocytes activated parthenogenetically with electrical stimulation with or without ionomycin and the various concentration of exposure time of 6-DMAP, the highest cleavage (92.3%) and development to blastocyst stage (41.0%) were resulted from the oocytes activated by ionomycin and 2.0 mM 6-DMAP for 2.0 h, which were found to be significantly ($P < 0.05$) higher than the cleavage (45.2%) and development to blastocyst stage (14.3%) from the oocytes activated with electrical stimulation. The significantly ($P <$

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

0.05) more oocytes(71.4%) developed to 4 cell stage at 24 h post activation by ionomycin and 6-DMAP than those by electrical stimulation(18.9%).

For the nuclear transplant embryos, the cleavage rate was similarly high in oocyte activation by electrical stimulation with(79.4%) or without ionomycin and 6-DMAP(70.5%). However, the embryo development to blastocyst stage was significantly($P < 0.05$) higher in oocyte activation by electrical stimulation with ionomycin and 6-DMAP(44.4%) than by electrical stimulation only(25.0%). The significantly($P < 0.05$) more nuclear transplant embryos(45.6%) developed to 4 cell stage at 18 h post activation by electrical stimulation with ionomycin and 6-DMAP than those by electrical stimulation only(10.6%).

These results indicated that the supplemental oocyte activation by ionomycin and 6-DMAP with electrical stimulation enhanced and accelerated the preimplanted *in vitro* development of the rabbit nuclear transplant embryos.

(Key words : 6-DMAP, ionomycin, oocyte activation, nuclear transplant embryo)

서 론

핵이식에서 사용하는 수핵란은 주로 제2감수분열 중기(M II ; metaphase II)에 정지하고 있는 성숙한 난자를 사용하고 있다(Biggers, 1986). 이 단계의 난자는 전핵 단계의 난자보다 탈핵이 쉬우며, 핵이식 후 새로운 배로 발달될 수 있는 능력을 가지고 있으나 수정과정에서와 같은 활성화 자극이 필요하므로 이를 위하여 인위적 활성화 자극을 주고 있다. 이러한 핵이식 난자의 활성화 방법은 단위발생적 활성화에 대한 연구 결과를 응용하고 있다(Sun와 Moor, 1995). 일반적으로 핵이식에서 널리 사용되는 전기자극법(Tarkowski 등, 1970)은 전기자극에 의해 세포막에 생성된 미세공을 통하여 용액 중의 Ca^{2+} 이온이 난자내로 유입됨으로써 수정과정에서와 유사한 인위적 난자 활성화를 이루므로 (Ozil, 1990; Collas 등, 1993, 1995) 난자 활성화와 동시에 세포융합을 일어나게 한다.

그러나 최근에는 난자 활성화율을 높이고, 후기 배로의 발달율을 증진시키고자 여러 가지 물질들을 이용하는 연구를 수행하고 있다. 그 중 protein kinase 억제제인 6-DMAP이 M II기 난자에서 높게 유지되고 있는 MPF의 활성을 저하시킨다고 보고한 (Rebhun, 1973) 이후, 핵이식 난자의 활성화에 응용하고자 많은 연구를 수행하였다. 6-DMAP은 puromycin의 유사체로서 protein kinase의 활성을 억제시켜 MPF 활성의 하락을 유도하고(Neant와

Guerrier, 1988; Fulka, 1991), 단독으로는 M II에 정지된 난자에서 histone H1 kinase를 불활성화시킬 수 없으나 난자를 어떤 활성화 유기물질로 activation시킨 후 6-DMAP을 처리하면 보다 빠르게 단백질 인산화를 억제시킴으로써 난자의 핵의 팽화와 일시적인 재응축, microtubules의 interphase network 형성, 전핵형성 등의 형태학적 변화를 촉진시켜 간기로 들어가게 한다(Szollasi 등, 1993; Zang와 Masui, 1992). 특히 Ca^{2+} 의 복합체인 ionomycin처리 후 6-DMAP를 병용하면 면양(Loi 등, 1997)과 소(Tatham과 Trounson, 1996; Lavior 등, 1997a, 1997b)의 핵이식 난자의 활성화를 증진시켜 핵이식배의 발달율과 임신율을 높였다 한다.

이에 본 연구는 토끼의 난자 활성화와 핵이식배의 생산에 있어서도 복합적인 활성화 처리방법의 하나로 ionomycin과 6-DMAP를 병용하여 난자 활성화 효율을 높일 수 있는지를 구명하고자 하였다. 이를 위하여 토끼 난자에 있어서 6-DMAP의 최적 노출 시간과 농도를 구명하고, 종래의 전기자극법에 비하여 ionomycin과 6-DMAP 병용이 난자 활성화 및 핵이식배의 배반포로의 발달율에 얼마나 효과적인지를 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물 및 사육관리

본 실험에 사용한 토끼는 New Zealand White종으로 암컷은 생후 3~6개월령의 체중이 2.5~3.5

kg, 수컷은 생후 8개월령 이상의 체중 3.0~4.0 kg 인 것을 공시하였고, 실험 전에 각 cage에 분리하여 사육하였으며, 사료와 물은 자유로이 급여하였다. 점등으로 매일 14시간은 light, 10시간은 dark로 명암 주기를 조절하였다.

2. 과배란유기 및 수핵 난자의 준비

과배란 유기는 성숙한 암토끼를 40mg의 FSH (Foltropin-V®, Australia)를 3일 동안 하루에 2회 12시간 간격으로 분할하여 근육 주사하였고, 마지막 투여 12시간 후 hCG(Yuhan Co., Korea) 100 IU를 정맥 주사하였다. hCG주사 후 14~15시간에 암토끼를 chlorpromazin HCl(Sepamine®, Samsung Co., Korea)로 진정시킨 후 ketamine HCl (Yuhan Co., Korea)로 전신마취한 다음 수술하여 난관으로부터 10% FBS(Gibco Co., U.S.A.)가 함유된 D-PBS(Sigma Co., U.S.A.)로 배란된 난자를 회수하였다.

회수된 난자는 300 IU/ml의 hyaluronidase에서 39°C의 5% CO₂ 조건에서 7분간 배양한 다음, 150 μm fire-polished pipette으로 반복 pipetting하여 난구세포를 제거하고 제 1극체가 명확하고 세포질이 균일하고 충실한 것만 수핵란으로 사용하였다.

3. 공핵배의 준비 및 세포주기 조절

공핵란 확보를 위한 수정란의 과배란 유기는 수핵 난자의 경우와 동일하게 FSH 처리를 한 후 hCG 주사 및 교미를 시키고 그 후 29~32시간에 4-cell기의 수정란을 채취하였다. 채취후 8시간 체외배양하여 8-세포기에 이른 이들 수정란을 0.5% pronase(Sigma Co., U.S.A.)에서 mucin coat를 제거한 후 할구세포를 Collas 등(1992a)의 방법에 따라 세포주기를 동기화시켜 16-cell의 G₁기로 조절하였다.

4. 미세조작과 세포융합

수핵란의 탈핵과 할구 주입을 위한 미세조작은 Stice와 Robl(1988) 및 Collas와 Robl(1990)의 방법에 준하여 실시하였다. 세포융합은 G₁기로 조절된 핵을 탈핵된 난자의 위란강에 주입한 후 0.1 μg/ml의 aphidicolin과 10% FBS가 포함된 TCM-

199에서 배양하여 hCG투여 후 19 시간 경에 전기세포융합기(ECM 200, BTX Co., U.S.A.)를 사용하여 이 등(1993)의 융합조건에 따라 난자의 활성화는 CaCl₂ 및 MgCl₂가 함유된 0.3 M mannitol 용액에서 이 등(1993)에 따라 1.25 kV/cm의 전류를 60 μsec동안 3회 자극하였다.

5. 난자의 활성화 방법

1) 단위발생 난자의 활성화 처리 방법

난구세포를 제거한 난자를 4~5시간 배양하여 hCG 투여 후 19시간 경에 활성화 유기를 실시하였는데, 이 배양시간 중에 사용한 기본 배양액은 10% FBS가 포함된 TCM-199이었다. 활성화 처리 방법은 ① 전기자극법과 ② ionomycin 및 6-DMAP 처리의 2가지 방법을 실시하여 처리 효과를 비교하였다. 전기자극법에 의한 난자의 활성화는 이 등(1993)에 따랐으며 CaCl₂ 및 MgCl₂가 함유된 0.3 M mannitol 용액에서 실시하였다. Ionomycin과 6-DMAP 처리에 의한 난자활성화를 위하여는 Moses와 Masui(1994)의 생쥐 실험의 결과를 참고하되 토끼에 적합한 6-DMAP의 노출시간과 농도를 결정하기 위해 5 μM ionomycin(Sigma, 10634)에서 5분간 처리한 후 소에서 일반적으로 사용하는 2 mM 6-DMAP의 농도를 임의로 선정하여 0.5, 1.0, 2.0 또는 3.0시간 노출시켜 적절한 노출시간을 선정하고, 또 5 μM ionomycin에서 5분간 처리한 후 1.0, 1.5, 2.0 또는 3.0 mM 농도에서 2시간 노출시켜 적절한 농도를 선정하였다. 활성화 처리 후 이들 난자를 10% FBS가 포함된 TCM-199에서 배양하여 난자의 활성화율과 배반포로의 발달율을 관찰하였다.

2) 핵이식 난자의 활성화 처리 방법

핵이식 난자의 활성화 처리 방법은 ① 전기자극법과 ② 전기자극 및 ionomycin과 6-DMAP 병용 처리의 2가지 방법을 실시하여 처리 효과를 비교하였다. 전기자극법에 의한 난자의 활성화는 세포융합을 위한 전기자극이 동시에 난자 활성화처리로 된 것이다. 전기자극과 ionomycin 및 6-DMAP의 복합 처리에 의한 난자의 활성화는 전기한 방법으로 전기자극을 준 후 5 μM ionomycin에서 5분간 처리

후 2.0 mM의 6-DMAP에 2시간 노출시켜 실시하였다. 활성화 처리 후 이들 난자를 10% FBS가 포함된 TCM-199에서 배양하여 난자의 활성화율과 배반포로의 발달을 관찰하였다.

6. 난자와 핵이식배의 체외배양

단위발생 처리를 한 난자와 핵이식배는 4-well dish에 10% FBS가 포함된 TCM-199 배양액에서 monolayer가 형성된 토끼 난관 상피세포와 같이 39°C의 5% CO₂ 배양기내에서 120시간 공배양하였다. 배양액은 48시간마다 신선한 배양액으로 교환하였으며, 24시간마다 핵이식배의 발달 성적과 배반포 발달률을 조사하였다.

7. 통계학적 분석

실험결과와 통계학적 분석은 SAS package를 이용하여 실시하였으며, GLM(General Linear Model) procedure를 적용하여 각 요인의 least square means를 구하여 요인간의 유의차를 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 난자 활성화에 대한 ionomycin과 병용한 6-

DMAP의 노출시간과 농도에 따른 효과 비교

토끼의 난자 활성화에 대한 ionomycin처리 후의 6-DMAP 노출시간과 농도의 효과를 규명하기 위한 실험의 결과는 Table 1과 2에서 보는 바와 같다. Table 1에서 6-DMAP 노출시간 효과를 보면 난자 활성화율은 2.0시간 처리구에서 92.3%로 1.0시간이나 3.0시간구에 비해서 유의적($P < 0.05$)으로 높았다. 배반포 발달율도 0.5시간 처리구(24.0%)에 비하여 1.0시간구(36.7%)나 2.0시간구(41.0%)에서 유의적인 차이는 없었지만 집중하였으며, 3.0시간 처리구에서는 오히려 8.6%로서 유의적으로($P < 0.05$) 저하되었다. 그리고 Table 2에서는 난자 활성화율이 1.0 mM(35.5%)이나, 1.5 mM(64.5%)보다 2.0 mM에서는 유의적($P < 0.05$)으로 증가된 92.3%로 가장 높았으나 3.0 mM로 농도를 더욱 높였을 경우는 오히려 저하되는 경향을 보였다. 배반포로의 발달율도 1.0 mM(6.5%)이나, 1.5 mM(16.1%)보다 2.0 mM에서는 유의적($P < 0.05$)으로 증가된 41.0%로 가장 높았다. 그러나 3.0 mM(7.7%)로 농도를 더욱 높였을 경우는 오히려 유의적($P < 0.05$)으로 저하되었다. Table 1과 2에서 보는 바와 같이 토끼의 난자 활성화에 대한 6-DMAP의 최적 농도와 노출시간이 2.0 mM에 2시간으로 나타났다.

Table 1. Effect of 6-DMAP exposure time on activation and *in vitro* development of rabbit oocytes

Exposure time(h)	No. of oocytes used	No. (%) of oocytes cleaved	No. (%) of oocytes developed			
			4-cell	8-cell	Morula	Blastocyst
0.5	25	18(72.0) ^{ab}	16(64.0) ^b	14(56.0) ^b	11(44.0) ^{bc}	6(24.0) ^{ab}
1.0	30	18(60.0) ^b	18(60.0) ^b	18(60.0) ^b	17(56.7) ^{ab}	11(36.7) ^a
2.0	39	36(92.3) ^a	36(92.3) ^a	33(84.6) ^a	28(71.8) ^a	16(41.0) ^a
3.0	35	20(57.1) ^b	17(48.6) ^b	14(40.0) ^b	11(31.4) ^c	3(8.6) ^b

* Values with different superscripts within the column were significantly different ($P < 0.05$).

Table 2. Effect of 6-DMAP concentration on activation and *in vitro* development of rabbit oocytes

Concentration (mM)	No. of oocytes used	No. (%) of oocytes cleaved	No. (%) of oocytes developed to			
			4-cell	8-cell	Morula	Blastocyst
1.0	31	11(35.5) ^c	9(29.0) ^c	8(25.8) ^b	6(19.4) ^b	2(6.5) ^b
1.5	31	20(64.5) ^b	15(48.4) ^{bc}	14(45.2) ^b	9(29.0) ^b	5(16.1) ^b
2.0	39	36(92.3) ^a	36(92.3) ^a	33(84.6) ^a	28(71.8) ^a	16(41.0) ^a
3.0	26	19(73.1) ^{ab}	15(57.7) ^b	12(46.2) ^b	9(34.6) ^b	2(7.7) ^b

* Values with different superscripts within the column were significantly different ($P < 0.05$).

Table 3. Comparative effect of electrical stimulation and ionomycin with 6-DMAP treatment on rabbit oocyte activation

Treatment	No. of oocytes used	No. (%) of oocytes cleaved	No. (%) of oocytes developed to			
			4-cell	8-cell	Morula	Blastocyst
Electrical stimulation	42	19(45.2) ^b	17(40.5) ^b	15(35.7) ^b	14(33.3) ^b	6(14.3) ^b
Ionomycin + 6-DMAP	39	36(92.3) ^a	36(92.3) ^a	33(84.6) ^a	28(71.8) ^a	16(41.0) ^a

* Values with different superscripts within column were significantly different ($P < 0.05$).

이러한 결과는 소(Rho 등, 1966)와 면양(Loi 등, 1997)의 경우에 1.9 mM 또는 2.0 mM의 6-DMAP에서 3시간 노출과, 생쥐(Liu 등, 1997)의 경우 2.0 mM에서 1시간 노출이 최적의 결과이었다는 보고와는 약간 상이한 결과로서 이는 동물 종의 차이에 기인하는 것으로 생각된다.

2. 난자 활성화에 대한 전기자극법과 ionomycin 및 6-DMAP 처리법의 효과 비교

토끼의 난자 활성화 및 배반포 발달률에 대한 전기자극법에 대비한 ionomycin과 6-DMAP의 병용 효과를 비교하기 위한 실험결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. 즉 ionomycin과 6-DMAP의 병용법에서 난자 활성화율이 92.3%, 배반포로의 발달률이 41.0%로 나타나, 전기자극법의 45.2%와 14.3%보다 유의적($P < 0.05$)으로 높게 나타났다.

Rho 등(1996)은 소의 난자 활성화에서 ionomycin의 단독처리와 ionomycin과 6-DMAP을 병용법을 비교하여 난자 활성화율 23.5%와 70.0%, 배반포 발달률 1.2%와 17.3%로 유의적인 차이를 보여 병용처리의 효과를 나타내어 본 연구와 상이한 결과를 나타내었다. Tateno와 Kamiguchi(1997)도 Chinese hamster에서 한가지 활성화 유기물질에 의해서는 효과적인 활성화 자극을 주지 못하여 전핵형성 직전 단계에서 난자의 분열과정이 정지된다고 보고하였으며, 이를 극복하는 방안으로서 ethanol과 cyclohexamide, calcium ionophore와 cycloheximide 등 2가지 난자 활성화 유기물질을 병용하여 활성화 효율을 증가시켰으며, 특히 calcium ionophore와 다른 활성화 유기물질을 병용할 때 더 효과적이라고 보고하였다.

Fig. 1은 토끼의 난자 활성화에서 전기자극법에

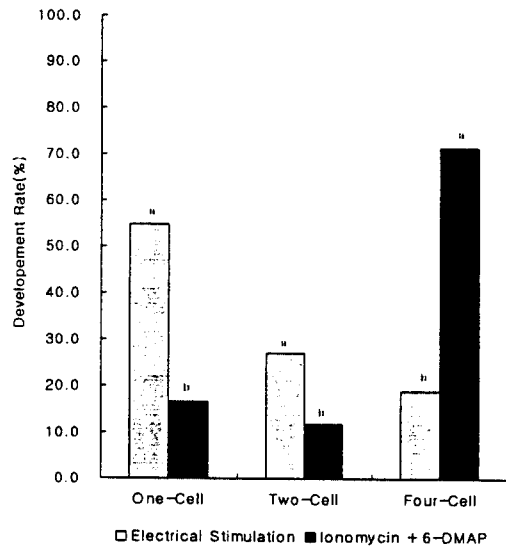


Fig. 1. Parthenogenetic development at 24 h post-activation of rabbit oocytes.

Different superscripts between treatments in the same cell stage denote significant ($P < 0.05$) difference.

대비한 ionomycin과 6-DMAP 병용법의 단위발생적 초기 발달속도를 비교한 실험 결과이다. 난자 활성화 자극 후 24시간에 4-세포기로의 발달률이 전기자극법에서는 18.9%(7/37)에 불과했으나 ionomycin과 6-DMAP의 병용법에서는 71.4%(30/42)로 유의적($P < 0.05$)으로 높아 단위발생적 초기 발달속도가 빨랐다. Mouse 난자에서 Moses와 Masui 등(1994) 및 Szollosi 등(1993)도 6-DMAP이 간기로의 변환을 촉진시켜 줌으로써 난자 활성화와 단위발생적 발달에 효과적이라고 보고하여 본

Table 4. *In vitro* development of nuclear transplanted rabbit embryos from oocytes activated by electrical stimulation and/ or ionomycin with 6-DMAP

Treatment	No. of embryos used	No. (%) of embryos fused	No. (%) of oocytes cleaved	No. (%) of oocytes developed to			
				4-cell	8-cell	Morula	Blast
Electrical stimulation	58	44(75.9) ^a	31(70.5) ^a	25(56.9) ^b	23(52.3) ^a	17(38.6) ^b	11(25.0) ^b
Electrical stimulation + Ionomycin + 6-DMAP	79	63(79.7) ^a	50(79.4) ^a	49(77.8) ^a	43(68.3) ^a	40(63.5) ^a	28(44.4) ^a

* Values with different superscripts within the column were significantly different ($P < 0.05$).

연구와 비슷한 결과를 보이고 있다.

3. 핵이식배 생산에 대한 전기자극과 ionomycin 및 6-DMAP 처리법의 효과 비교

전기자극 단독처리법과 전기자극 후 ionomycin 및 6-DMAP의 복합처리법에 의한 난자 활성화 처리가 핵이식배의 생산효율에 미치는 효과를 비교 실험한 결과는 Table 4에 나타난 바와 같다. 핵이식 난자의 활성화율은 전기자극법이나 전기자극 및 ionomycin과 6-DMAP의 복합처리법에서 각각 70.5% 및 79.4%로 나타나 양구간에 유의차가 인정되지 않았지만 핵이식배의 배반포 발달률은 전기자극법의 25.0%에 비하여 복합처리법에서는 44.4%로 유의적($P < 0.05$)으로 높았다.

소에서 Aoyagi 등(1994)도 핵이식된 난자에 전기자극, calcium ionophore 및 cycloheximide를 복합처리하여 핵이식 난자를 활성화시킨 결과 배반포로의 발달율이 42.0%로 나타나 본 연구의 토끼에 대한 성적과 비슷한 결과를 얻었으며, Tatham과 Trounson(1996)도 세포융합 전 탈핵된 난자의 활성화를 위하여 ionophore와 6-DMAP을 병용하여 70.0%의 활성화율을 얻었으며, 면양에서 Loi 등(1997)은 ionomycin과 6-DMAP의 병용법에서 82%의 높은 배반포 발달율을 보고한 바 있다.

4. 핵이식배의 초기발달 속도에 대한 6-DMAP 처리 효과

토끼의 핵이식배 생산에서 전기자극에 추가하여 처리한 ionomycin과 6-DMAP의 난자 활성화 촉진이 핵이식배의 초기 발달에 미치는 효과를 규명하기 위한 실험의 결과는 Fig. 2에 나타난 바와 같다. 전기자극 및 ionomycin과 6-DMAP 처리 후 18시간

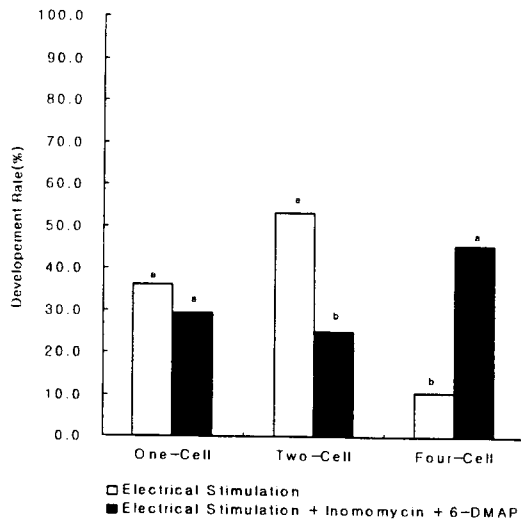


Fig. 2. Embryo development at 18 h post-fusion of rabbit nuclear transplanted embryos from oocytes activated by electrical stimulation and/ or ionomycin with 6-DMAP.

Different superscripts between treatments in the same cell stage denote significant ($P < 0.05$) difference.

에 4-세포기로의 발달률은 전기자극 단독처리법에서는 10.6%(5/47)였으나, 전기자극 및 ionomycin과 6-DMAP 복합처리법에서는 45.6%(31/68)로 유의적($P < 0.05$)으로 높게 나타났다.

Mckiernan 등(1991)은 mouse의 배발달 실험에서 배의 생존율이 초기발달이 늦은 경우에는 26.0%에 불과하였으나 초기발달이 빠른 처리구에서는 51.0%로 높은 결과를 얻어 초기 배발달이 빠를수록 배의 생존성이 높다고 보고하였으며, 전 등(1997)

도 토끼의 핵이식배에서 세포융합 18시간 후 3~4-세포기로 발달한 것이 2-세포기로 발달한 것에 비해 배반포 발달률이 58.0%와 11.8%로 3~4-세포기에서 현저히 높아 초기 배의 발달 속도가 후기배로의 발달률에 결정적인 요인이 된다고 보고하였다. 이러한 연구 결과에 의하면 본 실험에서 6-DMAP과의 복합처리가 초기배의 발달을 가속화시키고, 이로 인하여 배반포 단계의 후기배로의 발달률도 증가됨을 알 수 있었다.

적 요

본 연구는 토끼의 난자 활성화와 핵이식배 생산에 대한 전기자극법과 ionomycin 및 6-DMAP의 효과를 구명하고자 하였다. 난자는 과배란시킨 토끼의 난관으로부터 hCG 주사 후 14시간에 채란하여 10% FBS가 포함되어 있는 TCM-199에서 19시간까지 배양하였다. 토끼 난자 활성화에 대한 6-DMAP의 최적 노출시간과 농도를 선정하기 위하여 5 μ M ionomycin에서 5분 처리 후 1.0에서 3.0 mM 6-DMAP의 농도에서 0.5에서 3.0시간 동안 노출시켜 활성화율을 비교하였다. 일부 난자는 100 μ M CaCl₂과 MgCl₂가 포함되어 있는 0.3 M mannitol 용액에서 전기적(1.25 kV/cm, 60 μ sec, 3회)으로 활성화시켜 그 효과를 비교 조사하였다. 핵이식에서 공핵배는 8-세포기의 수정란을 16-세포기의 G₁기 할구로 세포주기를 조절한 다음 분리하여 공핵배로 사용하였다. 수핵란은 hCG 투여 후 15시간에 채란된 난자를 미세조작으로 제1극체와 인접한 세포질을 제거하여 제 2감수분열 중기의 염색체를 탈핵한 후 사용하였다. 분리된 할구는 탈핵된 수핵난자의 위관강에 주입하고, 할구세포가 주입된 난자는 hCG 주사로부터 19시간까지 배양한 다음 직류전류로서 세포융합시키고 전기자극법 또는 전기자극과 ionomycin 및 6-DMAP의 복합처리법에 의해 활성화시켰다. 핵이식배는 10% FBS가 포함되어 있는 TCM-199 배양액에서 39°C의 5% CO₂ 배양기에서 120시간 동안 배양하였다.

토끼 난자의 단위발생적 활성화 실험에서 5 μ M ionomycin에서 5분 처리 후 최적수준인 2.0 mM의 6-DMAP에 2.0시간 노출한 경우가 난자 활성화율

및 배반포 발달률이 92.3%와 41.0%로 가장 높았고, 전기자극법의 단위발생적 활성화(45.2%)와 배반포 발달률(14.3%)에 비하여 유의적($P < 0.05$)으로 높았다. 난자 활성화 후 24시간에 4-세포기로 발달한 초기 발달률도 ionomycin과 6-DMAP(71.4%)의 병용법이 전기자극법(18.9%)에 비하여 유의적($P < 0.05$)으로 높았다. 핵이식난자에서 전기자극과 ionomycin 및 6-DMAP를 병용 처리한 경우는 전기자극 단일처리에 비하여 난자 활성화율은 각각 79.5%와 70.5%로 유사하였으나, 배반포 발달률은 44.4%와 25.0%로 유의적($P < 0.05$)으로 증가되었으며, 난자 활성화 후 18시간에 4-세포기로 발달된 비율도 45.6%와 10.6%로 유의적($P < 0.05$)으로 높았다.

이러한 결과를 종합해 보면 토끼의 단위발생적 난자 활성화에서 ionomycin과 6-DMAP의 처리 효과를 핵이식 난자의 활성화 방법에 응용하여 전기자극, ionomycin 및 6-DMAP을 복합적으로 처리하면 핵이식배의 배반포 발달률과 4-세포기로의 초기 발달을 유의적으로 증진시킬 수 있다고 생각된다.

참고문헌

- Aoyagi Y, Konishi M, Wada, T and Takedomi T. 1994. Unaged bovine oocytes successfully develop to blastocyst after parthenogenetic activation or nuclear transfer. *Theriogenol.* 41:157.
- Biggers JD. 1986. The potential use of artificially produced monozygotic twins for comparative experiment. *Theriogenol.* 26:1-25.
- Collas P and Robl JM. 1990. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 43:877-884.
- Collas P, Balise JJ, Hofmann GA and Robl JM. 1992(a). Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Bio. Reprod.* 46:492-500.
- Collas P, Chang T, Long C and Robl JM. 1995.

- Inactivation of Histone H1 kinase by Ca^{2+} in rabbit oocytes. *Mol. Reprod. Develop.* 40:253-258.
- Collas P, Fissore R and Robl JM. 1993. Preparation of nuclear transplant embryos by electroporation. *Anal. Biochem.* 208:1-9.
- Fulka J, Leibfried-Rutledge ML and First NL. 1991. Effect of 6-dimethylaminopurine on Germinal Vesicle Breakdown of bovine oocytes. *Mol. Reprod. Develop.* 29:379-384.
- Lavior MC, Rumph ND, Fuente R, Barnes F, King WA and Betteridge KJ. 1996. The influence of cytoplasmic age on the development of embryos made by nuclear transfer. *Theriogenol.* 45:286(Abstr.).
- Lavior MC, Rumph ND, Moens A, King WA, Plant Y, Johnson WH, Ding J and Betteridge KJ. 1997. Development of bovine nuclear transfer embryos made with oogonia. *Biol. Reprod.* 56:194-199.
- Liu H, Fan B and Wang H. 1997. Parthenogenetic activation of mouse oocytes by 6-dimethylaminopurine. *Theriogenol.* 47:208(Abstr.)
- Loi P, Ledda S and Cappai P. 1997. Nuclear dynamics and developmental potential of sheep nuclear transfer embryos treated with protein kinase inhibitor 6-dimethylaminopurine. *Theriogenol.* 47:232(Abstr.).
- McKiernan SH, Bavister BD and Tasca RJ. 1991. Energy substrate requirements for *in vitro* development of hamster 1-cell and 2-cell embryos the blastocyst stage. *Hum. Reprod.* 6:64-75.
- Moses RM and Masui Y. 1994. Enhancement of mouse egg activation by the kinase inhibitor, 6-dimethylaminopurine. *J. exp. Zool.* 270:211-218.
- Neant I and Guerrier P. 1988. 6-Dimethylaminopurine Blocks Starfish Oocytes Maturation by inhibiting a relevant protein kinase activity. *Exp. Cell Res.* 176:68-79.
- Ozil J. 1990. The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation. *Develop.* 109:117-127.
- Rebhun LI, White D, Sander G and Ivy N. 1973. Cleavage inhibition in marine eggs by puromycin and 6-dimethylaminopurine. *Exp. Cell. Res.* 77:12-318.
- Rho GJ, Wu B, Leibo SP and Betteridge KJ. 1996. Bovine parthenogenesis following various oocyte activation regimens. *Biol. Reprod.* 54(Suppl.1): .
- Stice SL and Robl JM. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 39:657-664.
- Sun FZ and Moor RM. 1995. Nuclear transplantation in mammalian eggs and embryos. In RA Pederson, GP Schatten(eds). *Current Topics in Developmental Biology*. Vol 30. Academic Press, San Diego. pp 147-176.
- Szöllösi MS, Kubiak JZ, Debey P, Pennart HD, Szöllösi D and Maro B. 1993. Inhibition of protein kinase by 6-dimethylaminopurine accelerates the transition to interphase in activated mouse oocytes. *J. Cell Sci.* 104:861-872.
- Tarkowski AK, Witkowska A and Nowicka J. 1970. Experimental parthenogenesis in mouse. *Nature* 226:62-165.
- Tateno H and Kamiguchi Y. 1997. Parthenogenetic activation of Chinese hamster oocytes by chemical stimuli and its cytogenetic evaluation. *Mol. Reprod. Develop.* 47:2-78.
- Tatham BG and Trounson AO. 1996. Effect of activation treatment on the cleavage of nuclear transfer embryos produced after enucleation by centrifugation. *Proc. 13th Int. Cong. Anim. Reprod. Art. Insem.* pp 21-22.
- Zang SC and Masui Y. 1992. Activation of *Xenopus laevis* eggs in the absence of intracellular Ca activity by the protein phosphorylation inhibitor, 6-dimethylaminopurine (6-

DMAP). J. Exp. Zool. 262:317-329.

이효종, 최민철, 최상용, 박충생, 윤창현, 강대진.

1993. 반복핵이식에 의한 복제동물 생산에 관한 연구. I. 토끼 수핵난자의 전기자극에 의한 활성화. 한국수정란이식학회지 8:151-154.

전병균, 윤희준, 공일근, 이효종, 최상용, 박충생.

1997. 토끼에서 핵이식 수정란의 초기 발달속도와 난자 활성화가 후기배로의 발달에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지 12:1-10.

(접수일자 : 1997. 12. 23 / 채택일자 : 1998. 2. 4)