

핵이식 기법을 이용한 한우 쌍태생산에 관한 연구

I. Ovum pick-up(OPU), 전기적 세포융합 및 체외배양 기법을 이용한 복제수정란 생산

황우석 · 신태영* · 노상호 · 이병천

서울대학교 수의과대학
농림부 수의과학연구소*
(1997년 11월 20일 접수)

Induction of twinning in Korean native cattle by transfer of nuclear transplanted embryos

I. Embryo cloning using ovum pick-up(OPU), electric cell fusion and *in vitro* culture system

Woo-suk Hwang, Tae-young Shin, Sang-ho Roh, Byeong-chun Lee

College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea
National Veterinary Research Institute, MAF, Anyang, Korea*

(Received 20, Nov, 1997)

Abstract : The purpose of present study is to improve the efficiency of fusion and the developmental rates of nuclear transplanted embryos to produce genetically identical twins from Korean native cattle.

The diameter of aspirated follicles had no significant effect on the recovery rates of oocytes collected by ovum pick-up technique. The fusion rates of nuclear transplanted embryos were significantly higher in 50 and 100 μ s DC duration groups(73.3 and 72.0% ; respectively) than that in 30 μ s group(55.6% ; $p<0.05$). The cleavage rates of nuclear transplanted embryos appeared to be significantly higher in donor nuclei derived from *in vivo* (65.0%) than in those from *in vitro* (50.5% ; $p<0.01$), but the developmental rates to morulae and blastocysts were not significantly different between them(13.7 vs 10.9%, respectively).

Key words : nuclear transfer, ovum pick-up, cell fusion, *in vitro* culture, bovine oocyte.

본 논문은 1996년도 교육부 학술연구조성비(유전공학 GE 96"#)에 의하여 연구되었음.

Address reprint requests to Dr. Woo-suk Hwang, Veterindary Teaching Hospital, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Republic of Korea.

서 론

산업동물에서 핵이식 기법에 의한 산자생산은 면양에서 최초로 보고되었으며¹, 이후 소² 및 돼지³에서도 그 예가 보고되었다. 최근에는 암양의 유선세포를 공여핵으로 이용하여 산자생산에 성공하는 등⁴ 핵이식 기법은 그 응용도를 높여가고 있으며 특히 경제적 가치가 높은 소에서 활발한 연구가 진행되고 있다⁵.

최근 우수한 수정란을 생산하기 위한 방법으로 소에서 초음파 유도에 의해 미성숙난자를 채취하는 ovum pick-up(OPU) 기법이 시도되고 있다. 이는 탐촉자를 질에 삽입하고 탐촉면에 난소를 견인하여 화면상에서 난소의 형태를 관찰하며 관련장치를 사용하여 직접 생체에서 미성숙난자를 회수하는 방법이다. 이러한 OPU 기법은 체외성숙, 체외수정 및 체외배양 기법을 함께 적용할 경우 과배란치치법의 제한점을 해결할 수 있는 방법으로 관심이 높아지고 있는 분야이다⁶. 일반적으로 난포 내에서 난자는 직경이 110 μ m 이상이면 완전한 감수분열능을 갖추는 것으로 알려져 있으며⁷, Fair *et al*⁸은 난포 직경이 3mm 이상인 경우 난자가 직경 120 μ m까지 자란다고 보고하였으나 높은 상관관계를 제시하지는 못하였다. Bols⁹는 도축장에서 회수된 난소로부터 혹은 OPU를 통하여 난자를 채취할 때 육안적으로 확인할 수 있는 지표는 난포의 크기가 유일하며 이것만으로 난자의 발육능을 예측하는 것은 어렵기 때문에 우수한 개체의 난소로부터 가능한 한 많은 수의 난자를 회수하는 것이 좋다고 하였다.

핵이식란을 작성한 후에는 공여핵과 수핵난자와의 세포융합과정이 필요하게 된다. 이와같은 세포융합에는 불활화한 sendai virus(HVJ)¹⁰와 polyethylene glycol(PEG)¹¹ 등을 매개로 한 방법이 이용되어 왔다. 체세포에서는 PEG에 노출시켜 융합하는 것이 보편적이거나 수정란에서는 PEG의 독성 때문에 잘 이용되지 않고 있다. 특히 이 방법은 난자의 활성화가 일어나지 않기 때문에 특정 목적에만 활용되고 있다. 융합매개체로 HVJ를 이용할 경우 불활화 과정이 필요하고 작성된 핵이식란을 재순환복제에 반복 이용하는 것이 불가능하기 때문에¹² 최근에는 간편하고 반복재현성 있는 방법으로 전기적 세포융합법이 널리 이용되고 있다¹³. 전기적 세포융합법은 물리적 수치를 완벽하게 제어하여 재현할 수 있고 세포가

융합매개체에 단시간 노출되므로 손상을 최소화할 수 있으며 수핵난자의 활성화가 동시에 유도되는 장점이 있다¹⁴. 소나 양과 같은 반추류의 경우 HVJ에 의한 융합이 설치류에서처럼 높은 비율로 나타나지 않기 때문에 전기적 세포융합법이 선호되고 있다¹. 전기적 세포융합시 적정조건을 확립하기 위한 척도로서 통전강도, 시간, 횡수 등의 제반요인에 대한 적절한 조건이 확립되어야 한다¹⁵.

핵이식 기법의 궁극적인 목적은 우량 유전형질을 지닌 개체의 대량생산에 있다. 초기의 소 핵이식 연구에서는 과배란처리후 공여핵으로 이용할 수정란을 생체로부터 회수하였으나¹⁶ 우수한 개체로부터 공여핵 수정란을 공급받는데는 많은 비용이 소모되며 특히 수 회의 반복 실험에 이용하기는 쉽지 않다. 따라서 최근에는 체외수정 및 배양기법을 이용하여 생산된 수정란이 핵이식 실험에 이용되고 있다¹⁷.

이에 저자는 수정란의 체외생산시 필요한 난자를 생체로부터 획득하기 위하여 난포의 직경을 구분하여 OPU를 실시, 난자의 회수율을 조사하고 각기 다른 통전 시간 하에서의 핵이식란의 융합률 및 공여핵원에 따른 핵이식란의 발육률을 알아보려고 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

OPU 공란우 준비 :

1) 공란우의 선발 : 공란우는 미경산우, 경산우 및 임신우(임신 2개월령)를 이용하였다. 미경산우와 경산우를 공란우로 이용시에는 임상적 검사 및 혈액·혈청학적 검사에 의해 건강하다고 인정되며 직장검사 및 초음파 검사를 통하여 난소의 활력이 인정되고 난소와 생식기도에 이상이 없는 것을 확인후 OPU를 실시하였다. 특히 발생이상으로 질강이 좁아져 있을 때, 질염(vaginitis), 기질(pneumovagina) 또는 요질(urovagina) 등을 세밀히 검진하여 공란우에서 제외시켰다. 또한 공란우는 2회 이상 정상 발정주기를 확인후 난자의 직접 채취에 이용하였다. 임신우는 미경산우 및 경산우에 준하는 임상적 검사에 의해 선발하였다.

2) 공란우의 보정 : 소의 진정과 직장벽의 이완을 위해 detomidine hydrochloride(1mg/100kg)을 정맥주사하고 2% lidocaine 5ml를 경막의 마취하여 복강의 노책을 방지

하였다. 소는 서있는 자세로 보정틀에 보정하여 난의 채취시 움직임은 최소로 하였다.

초음파를 이용한 난자의 채취 : 초음파 probe는 sector scanner(5.0 또는 7.5MHz)를 사용하였다. Long non-disposable needle(55cm, 17 또는 18G)의 dead space를 줄이고 cumulus-oocyte complex(COC)에 적합한 환경을 조성하기 위해 난자흡인용 배지(PBS pH 7.4, 2% fetal calf serum ; 이하 FBS, 0.2% W/V heparin)을 주사침 내강 및 흡입관 내에 채웠다. 자궁을 끌어당긴 후 질로 삽입되어 자궁경 부근에 고정된 transducer 위에 위치하여 난소를 관찰하여 초음파 화면상에서 검고 둥근 점의 형태의 난포내강을 확인하였다. 초음파 유도에 의해 난포가 확인되면 주사침을 난포내강으로 진입시켰다. 난포의 직경을 초음파상에서 측정하여 기록하고 인쇄하였다. 난포를 화면상에서 확고히 고정된 후 주사침이 난포내강에서 끝이 보일 때까지 밀어넣었다. 이때 화면상에서의 위치와 난소내로 주사침이 들어가는 감각이 느껴졌을 때 regulated vacuum pump의 foot switch를 작동시켜 난포액에 포함된 난자를 직접 흡인하였다. 주사침을 제거한 후 배양액으로 주사침을 세척하였다. 각각의 난포는 50ml tube에 채취하여 실험실내로 운반하였다. 난자의 흡인시 사용되는 주사침이 18G이면 압력은 105mmHg, 17G 일 때는 70mmHg로 조절하여 흡입속도를 22ml/min으로 고정하였다. 난포가 collapse 될 때까지 계속적으로 흡입하며 주사침의 끝이 난포벽에 닿아 음압이 차단될 때까지 실시하였다. 이때 주사침의 방향을 돌리면서 주사침의 경사면과 반대에 있을지도 모르는 COC를 흡인하였다. 흡인후 주사침 및 연결관내에 잔류된 난포액 회수를 위해 흡인용 PBS로 세척하였다. 난자의 흡인은 주 1회 또는 주 2회 채취법의 두가지로 구분하였다¹⁸. 일주일에 일회 채취법은 발정주기에 3번 채란하는 방법으로 발정주기(발정일 = 0일) 3일 또는 4일, 9일 또는 10일 및 15일 또는 16일에 행하였다. 이때 초음파상에서 보이는 난포를 <5, 5~10, 10~15 및 >15mm로 구분하여 양측 난소에서 모두 흡인하였다. 회수한 난포액을 실제 현미경하에서 검경하여 다층의 치밀한 난구세포를 가지며 세포질이 균질한 난자를 선별하여 체외성숙, 수정 및 배양에 공여하였다.

체외성숙 : 도축장에서 난소를 채취한 후 100IU/ml의 penicillin과 100µg/ml의 streptomycin이 첨가된 38℃의 생리식염수가 들어있는 보온병에 넣어 2시간내에 실험실

로 운반하였다. 주사침(18gauge)이 연결된 10ml의 주사기로 5% FBS(Gibco BRL, USA)가 첨가된 TCM199 (Gibco BRL, USA)을 2ml 흡인한 후 직경 3~5mm의 소난포로부터 난자를 채취하였다. 회수된 난포란은 Wiemer *et al*¹⁹의 기준에 준해 난구세포가 치밀하게 부착되고 세포질이 균질한 것만을 선별하여 사용하였다. 체외성숙은 4-well dish(Nunclon, Denmark)의 각 well당 10% FBS 및 5µAU/ml의 FSH(Antrin[®], Denka Pharm., Japan)가 포함된 TCM199 0.5ml를 분주하고 여기에 15개씩의 미성숙 난자를 넣어 공기 및 습도가 포화상태인 39℃, CO₂ 배양기내에서 20~24시간 배양하였다.

체외수정 : 정액은 straw당 4×10^7 개의 정자가 들어있는 동결정액을 사용하였으며 기본배양액은 modified Tyrode's medium²⁰(이하 TALP로 약함)을 사용하였다. 난자의 성숙배양개시 22시간 후에 체외수정을 위해 동결정액을 38℃ 수조에 30초간 침치하여 진탕용해시킨 후 현미경하에서 운동성을 확인하였다. 준비된 10개의 round bottom plastic tube(Falcon, USA ; 11×55mm)에 1ml의 수정능 획득용 배양액(sp-TALP)을 넣고 0.2ml씩의 정액을 첨가하여 CO₂ 배양기내에서 1시간 정치하였다(swim-up 처리). 그후 정액의 상층액 0.8ml를 pasteur pipette으로 흡입하여 하나의 원심관에 모으고 세정을 위해 2회 원심분리(700g, 5분)하여 활력정자를 선별하였다. 수정능 획득은 원심관에 들어있는 정자를 농도가 1×10^8 개/ml 되도록 조정하고 heparin(Gibco BRL, USA ; 200µg/ml)을 포함한 sp-TALP를 동량첨가하여 CO₂ 배양기에 15분간 배양함으로써 유도하였다. 한편 정자를 swim-up 시키는 동안 성숙난자는 세정과정을 통하여 팽대된 난구세포의 1/3 정도를 제거한 후 light white oil(Sigma, USA)이 도포된 35mm petridish(Costar, USA)내의 수정용-TALP 43µl drop에 3µl의 배지와 함께 각각 5개씩 주입하였다. 체외수정은 준비된 난자의 drop에 heparin 처리후 동량의 sp-TALP를 혼합한 다음 4µl의 배지로 정자를 최종농도가 2×10^6 /ml가 되도록 첨가하여 CO₂ 배양기내에서 18~24시간동안 배양하여 실시하였다.

분할란의 체외배양 : 난관상피세포와의 공배양을 위하여 초기황체기 소 난관을 채취한 후 5% FBS 첨가 TCM199으로 관류시켜 난관상피세포를 채취하였다. 난관상피세포는 5% FBS 첨가 TCM199으로 3회 원심분리(1,000g, 10분)하여 세정한 후 각 well당 10% FBS 첨가 TCM199을 0.5ml씩 분주한 4-well dish에 3일간 배양하여

난관상피세포의 monolayer를 작성하였다. 형성된 monolayer는 수정란과 함께 배양하기 3시간 이전에 배양액을 교환하여 부유하고 있는 잔존 과사세포들을 제거하고 평형시켰다. 초기배(2-4세포기 이상)는 monolayer가 형성된 dish에 각 well당 12~15개씩을 넣어 co-culture를 실시하였다.

수핵난자의 활성화 및 미세조작 : 수핵난자로 준비된 체외성숙난자(성숙 22시간후)는 0.1% hyaluronidase(Sigma, USA)가 첨가된 PBS(+)(Gibco BRL, USA) 2ml가 분주된 35mm petridish에서 mouth pipetting을 실시하여 난구세포를 완전히 벗겨낸 후 제 1극체가 보이는 것만을 선별하여 실험에 사용하였다. 난구세포를 벗긴 난자는 0.1mM의 Ca²⁺ 및 Mg²⁺가 함유된 0.28M mannitol 20μl의 융합미소적내로 옮겨 10분간 평형시킨 후 동일한 배양액을 분주한 32mm chamber내에서 1.0kV/cm에서 40μs 동안 통전시켜 전기적 활성화를 유도하였다. 이후 미세조작은 differential interference contrast(DIC)가 장착된 도립현미경(Leitz Germany ; ×250)하에서 실시하였다. 수핵란은 탈핵을 용이하게 하기 위하여 미리 투명대를 10~20% 정도 절개하고 미세조작시의 손상을 최소화 하기 위해 절개 후 7.5μg/ml의 cytochalasin B(Sigma, USA)가 함유된 PBS(-) 20μl의 미소적내에서 20분간 전배양시켰다. 전배양후 외경 20μm의 탈핵용 pipette을 사용하여 수핵란의 절개되어진 투명대를 관통하여 제 1극체와 metaphase chromosome을 한꺼번에 karyoplast 형태로 흡입, 제거하였다. 수핵란은 탈핵을 마친 후 세정과정을 거쳐 핵이식에 공여하였다.

공여핵의 준비 및 핵이식 : 공여핵으로는 체내회수란과 체외생산란을 이용하였다. 체내회수란은 다음과 같이 준비하였다. 능력이 우수한 우군에서 번식장에 경력이 없었던 암소중 3회 이상의 규칙적인 정상발정을 보인 공란우를 선발하였다. 발정주기 13일부터(발정일 0일) 4-6AU의 follicle stimulating hormone(FSH, Antrin®, Japan)을 1일 2회 감량법으로 4일간 근육주사하였으며, 주사 3일째 오전에 25mg의 PGF_{2α}를 근육주사하여 발정을 유도하였고, 발정시 2~3회의 인공수정후 5~6일째에 PBS 배지로 비외과적 자궁관류법에 의해 수정란을 채취하였다. 자궁관류액은 자체제작한 separating funnel을 사용하여 30분 정지후 검란 및 수정란 선별과정을 거쳐 실험에 이용하였다. 체외생산란은 전술한 방법에 준하여 준비하였다. 난자의 체외성숙 22시간제에 수핵란의 탈핵을

실시하고 16~32세포기의 공여핵을 0.5%의 pronase(Sigma, USA)가 첨가된 PBS(-)내에서 1분동안 처리하여 할구를 분리하였다. 핵이식은 공핵수정란의 할구를 외경 30μm의 주입용 pipette내로 흡입하여 탈핵된 수정란의 절개된 투명대를 관통한 다음 주란강에 주입함으로 실시하였다.

전기융합 : 핵이식란은 light white oil이 도포된 60mm petridish의 PBS(+), 0.28M mannitol 그리고 0.28M mannitol이 20μl의 융합미소적내로 옮겨 10분간 평형시킨 후 세포융합을 실시하였다. 전기적 세포융합은 실험설계에 따라 1.0kV/cm에서 30, 50 및 100μs의 조건으로 실시하였으며, 1회 통전하였다. 직류전압을 통전하기 전에 20V, 5초간 교류전압을 통전하여 agglutination plane과 통전방향이 수직이 되도록 alignment를 형성시켰다. 통전 1시간 후에 현미경하에서 검사하여 세포융합여부를 판정하였다.

핵이식란의 배양 : 핵이식란은 체외수정용 TALP에 2% essential amino acid 및 non-essential amino acid를 첨가한 modified TALP(mTALP)를 이용, 배양을 실시하여 후기배로의 발육을 유도하였다. 수정란을 세정용 TALP에서 3회 세정한 후 35mm dish에 배양용 mTALP로 30μl의 미소적을 작성, light white oil 도포 및 2시간의 전배양처리후 실시하였다. 각각의 실험군은 각각의 미소적에 6~10개씩 첨가하였으며 수정후 7일째에 후기배로의 발육률을 조사하였다.

통계학적 분석 : 실험결과의 통계학적 유의성 검정에는 χ^2 -test를 실시하였다.

결 과

난포직경에 따른 소 난자의 회수율 : 난포의 직경을 <5, 5~10, 10~15 및 >15mm으로 구분하여 난자를 회수한 결과, 각각 24.5, 30.3, 26.2 및 22.0%의 난자 회수율을 보

Table 1. Recovery rates of bovine oocytes by OPU from the follicles of different diameters

Estimated follicle	No. of follicles punctured	No. of oocytes recovered	Recovery rates (%)
< 5	278	68	24.5
5~10	340	103	30.3
10~15	233	61	26.2
> 15	50	11	22.0

여 난포의 직경에 따른 회수율에는 유의적인 차이가 없었다(Table 1).

통전시간에 따른 핵이식란의 융합률 : 통전시간을 30, 50 및 100 μ s로 구분하고 1kV/cm의 직류전압으로 통전한 결과(Table 2), 50 및 100 μ s 통전시간군의 융합률이 각각 73.3 및 72.0%로 30 μ s 군의 55.6%에 비하여 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$).

Table 2. The fusion rates of nuclear transplanted embryos with various DC pulse duration

DC volt(kV/cm)	Pulse duration	No. of embryos examined	No.(%) of embryos lysed	No.(%) of embryos fused
1.0	30	180	16(8.9)	100(55.6) ^a
1.0	50	180	20(11.1)	132(73.3) ^b
1.0	100	200	20(10.0)	144(72.0) ^b

*Prior to fusion, oocytes were aligned using an AC field, a frequency of 1MHz, a voltage of 20V, and a duration of 5s. Immediately, a single pulse for various duration followed.

^{a,b}Different superscripts denote significant differences($p < 0.05$)

공여핵원에 따른 핵이식란의 후기배로의 체외발육률 : 체외생산란 및 체내회수란을 공여핵원으로 이용, 핵이식을 실시하여 분할 및 이후 발육률을 조사한 결과(Table 3) 체내회수란을 공여핵원 이용한 군의 분할율(65.0%)이 체외생산란을 이용한 군(50.5%)에 비하여 유의적으로 높게 나타났으나($p < 0.01$) 이후 상실배이상 후기배로의 발육률은 각각 13.7 및 10.9%로 두 군간의 유의적인 차이는 없었다.

Table 3. Effect of *in vivo* donor embryos on development of nuclear transplanted embryos

Source of donor nuclei	No. of NT embryos cultured*	No.(%) of cleaved embryos	No.(%) of MO, BL**	% of MO, BL** /cleaved
<i>In vivo</i>	180	117(65.0) ^a	16(8.9)	13.7
<i>In vitro</i>	200	101(50.5) ¹⁾	11(5.5)	10.9

*Fused embryos following nuclear transplantation

**MO : morulae, BL : blastocysts

^{a1)}Different superscripts denote significant differences($p < 0.01$).

핵이식 및 형질전환동물 생산 등 최근 관심이 높아지고 있는 번식기법 중에서 가장 중요한 요인의 하나는 양질의 난자 및 수정란을 공급받는 것이다. 특히 경제성이 높은 소에서 난자 및 수정란의 공급은 이후 각종 실험을 수행하는데 매우 중요하다. 일반적으로 난자는 도축장에서 도살직후의 생체로부터 난소를 회수한 후 채취되며 이는 체외성숙, 수정 및 배양을 통해 성숙난자 및 수정란을 생산하게 된다. 그러나 특정 개체에서의 반복채취를 위하여 Pieterse *et al*²¹은 사람에서 이용되는 OPU 기법을 소에 적용하였으며 이후 OPU와 난자의 회수에 관련된 연구가 보고되고 있다²². 다양한 발정주기중의 난소에서 회수된 난자는 각기 다른 발육능을 가지는데 발정 14~16일의 황체에 회수된 난자가 발정 7~9 혹은 19~20일째에 회수된 난자에 비하여 높은 발육능 및 빠른 발육속도를 보이는 것으로 알려져 있다²³. 발정주기 외에도 신체상태²⁴, 품종²⁵ 및 공란우의 나이²⁶에 따라 난자의 회수 및 회수한 난자의 발육능에 차이가 있는 것으로 보고되어 있으나 실제적으로 초음파에 의한 난소 관찰시 측정가능한 척도는 난포의 직경이 유일하다. Longergan *et al*²⁷은 도축장에서 채취한 난자를 2~6mm와 6mm 이상으로 나누어 체외성숙, 수정 및 배양한 후 발육률을 보고하였다. 본 연구에서는 난포의 크기를 구분하여 난자를 채취하였는데 난포의 직경별 난자 회수율에는 유의적인 차이가 없었다. 그러나 일반적으로 3mm 이하의 소 난포로부터 채취된 난자는 이후 발육능이 없는 것으로 알려져 있기 때문에²⁸ 난포의 직경별 난자 회수율 뿐만아니라 회수한 난자의 이후 발육능에 대해서도 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

핵이식 과정중 난자의 활성화를 위하여 전기자극이 이용되는데 만일 수핵난자의 활성화를 통해 maturation promoting factor(MPF)의 수준을 떨어뜨리지 않을 경우 공여핵의 세포주기를 G1기로 동기화 하여 nuclear envelope breakdown(NEBD), premature chromosome condensation (PCC), nuclear envelope reformation(NER) 및 nuclear swelling (NS) 등을 유도, 정상적인 핵형을 유지해야 하며 S 및 G2기의 경우 DNA 재복제에 의한 핵형이상이가 나타나기 때문에 융합전 활성화를 통해 MPF 수준을 저하시켜 NEBD, PCC 및 NER의 과정을 거치지 않고 정상세포주기에 도입토록 해야 핵형의 변화없이 발생이 가능하게 된다²⁹. 따라서 본 연구에서는 1.0kV/cm, 40 μ s의 전기자극으로 탈핵 및 융합전에 난자의 활성화를 유도하여 이

고 찰

후 활성화된 난자(universal cytoplasm)를 핵이식에 공여, 공여핵의 세포주기 동기화과정을 거치지 않고 핵이식을 실시하였다. 특히 소의 경우 분할란의 세포주기가 대부분 S기에 머물러 있고 G1기는 매우 짧기 때문에³⁰ 전기 자극을 통해 활성화된 universal cytoplasm가 유용한 것으로 생각된다.

핵이식란의 세포융합에서 통전조건은 난자의 활성화 때와 유사한데 특히 전기적 세포융합시에는 융합면과 통전방향은 수직으로 맞추기 위해 직류통전 전에 교류전압을 걸게 된다. 특히 핵이식란은 이식할 할구와 수핵 난자의 크기에 큰 차이가 있기 때문에 수작업으로나 교류통전을 통해 반드시 수정란을 정렬해야 한다. 결과에는 제시하지 않았으나 본 실험에서 20V, 5s의 교류통전을 통해 60~80%의 핵이식란이 정렬되는 것은 확인할 수 있었다. 포유류 핵이식란의 전기적 세포융합시 적용되는 통전조건은 1kV/cm 전후의 직류전압을 50~100 μ s 동안 걸어주는 것이 일반적이다³¹. 본 연구에서 직류전압을 1.0kV/cm으로 고정하고 각기 다른 통전시간에서 핵이식란의 융합률을 조사한 결과, 50 및 100 μ s 통전한 핵이식란의 융합률이 30 μ s 통전군에 비하여 유의적으로 높게 나타나 1kV/cm로 통전할 경우 최소한 50 μ s 이상의 통전시간을 주어야 높은 융합율이 나타날 것으로 생각된다. 이러한 결과는 유사한 조건에서 Mitani *et al*¹⁷이 보고한 84~90% 보다 낮은 수준이었으나 그의 결과는 핵이식란을 수작업을 통해 정렬하고 난자에 직접 전극을 대어 융합한 것으로 본 실험에서 교류에 의한 수정란의 정렬이 69~80% 정도인 것을 감안하면 유사한 수준으로 볼 수 있다.

소의 핵이식기법이 도입된 초기에 수핵난자는 체내에서 과배란유도를 통해 성숙난자를 회수하여 이용하였으나³² 최근에는 도축우의 난포란 회수 및 체외성숙과정을 거쳐 회수하는 방법이 보편화 되어 있다⁵. 공여핵의 경우에는 과배란처치후 자궁관류로 수정란을 회수하는 방법이 이용되고 있으나³³ 최근 체외수정 및 배양유래의 수정란을 공여핵으로 이용, 난자채취 이후의 전 과정을 체외에서 수행하려는 시도가 행해지고 있다³⁴. 본 연구에서 체내 및 체외유래 상실배를 공여핵으로 이용하여 핵이식란을 작성, 체외에서 배양한 후 분할 및 발육률을 비교한 결과, 융합후 핵이식란의 분할율은 체내회수란이 체외생산란에 비하여 유의적으로 높게 나타났으나 체외발육률에는 큰 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과

는 공여핵원으로 체내회수란을 이용하는 것이 효율적이라는 Yang *et al*³⁴의 결과와는 차이를 보였으나 체외생산란이 체내회수란과 동일한 수준으로 공여핵원으로 이용될 수 있다는 Heyman *et al*³⁵의 견해와 유사하였다. 따라서 본 연구에서와 같이 체외생산 수정란이 공여핵원으로 활용된다면 OPU 기법을 통해 고능력우의 난소로부터 난자를 채취하여 체외수정 및 배양을 통해 수정란을 생산, 핵이식에 공여할 수 있을 것으로 사료된다.

결론

난포의 직경을 구분하여 OPU를 실시, 회수율을 조사하고 각기 다른 통전시간 하에서의 핵이식란의 융합률 및 공여핵원에 따른 핵이식란의 발육률을 알아보고자 수행한 연구에서 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 난포의 직경을 <5, 5~10, 10~15 및 >15mm로 구분하여 난자를 회수한 결과 난포의 직경에 따른 회수율에는 유의적인 차이가 없었다.
2. 통전시간을 30, 50 및 100 μ s로 구분하고 1kV/cm의 DC로 융합을 실시한 결과 50 및 100 μ s 통전시간군의 융합률이 30 μ s 군에 비하여 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$).
3. 체외생산란 및 체내회수란을 공여핵원으로 사용, 핵이식을 실시하여 분할 및 이후 발육률을 조사한 결과 체내회수란을 공여핵원으로 사용하여 핵이식란 군의 분할률이 체외생산란을 사용한 군에 비하여 유의적으로 높게 나타났으나($p < 0.01$) 이후 상실배이상 후기배로의 발육률에는 유의적인 차이를 보이지 않았다.

이상의 결과로 보아 OPU시 난포의 크기는 회수율에 영향을 미치지 못하였고 세포융합시 직류통전시간은 50 μ s 이상이 효과적인 것으로 나타났다. 또한 체외생산란이 핵이식 과정의 공여핵원으로 활용가능한 것으로 사료된다.

참고 문헌

1. Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, 321:63-65, 1986.
2. Prather RS, Barnes FL, Sims MM, *et al*. Nuclear transplantation in the bovine embryo : Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol Reprod*, 37:

- 859-866, 1987.
3. Prather RS, Sims MM, First NL. Nuclear transplantation in early porcine embryos. *Biol Reprod*, 41: 123-132, 1989.
 4. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385:810-813, 1997.
 5. Barnes FL, Endebrock M, Looney CR, *et al.* Embryo cloning in cattle: the use of *in vitro* matured oocytes. *J Reprod Fert*, 97:317-320, 1993.
 6. Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL, *et al.* Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*, 41:67-72, 1994.
 7. Hyttel P, Fair T, Callesen H, *et al.* Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, 47:23-32, 1997.
 8. Fair T, Hyttel P, Greve T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev*, 42:437-442, 1995.
 9. Bols PEJ. Bovine oocyte retrieval : Which follicles to puncture? In : Transvaginal ovum pick-up in the cow: Technical and biological modifications. *Thesis, Universiteit Gent*, 23-48, 1997.
 10. McGrath J, Solter D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science*, 220:1300-1302, 1983.
 11. Eglitis MA. Formation of tetraploid mouse blastocysts following blastomere fusion with polyethylene glycol. *J Exp Zool*, 213:309-313, 1980.
 12. Kono T, Tsunoda Y. Effects of induction current and other factors on large-scale electrofusion for pronuclear transplantation of mouse eggs. *Gamete Res*, 19: 349-357, 1988.
 13. Stice SL, Robl JM. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod*, 36:657-664, 1988.
 14. Robl JM, Stice SL. Prospects for the commercial cloning of animals by nuclear transplantation. *Theriogenology*, 31:75-84, 1989.
 15. Stice SL, First NL. Progress towards efficient commercial embryo cloning. *Anim Reprod Sci*, 33:83-98, 1993.
 16. Robl JM, Prather R, Barnes F, *et al.* Nuclear transplantation in bovine embryos. *J Ani Sci*, 64:642-647, 1987.
 17. Mitani T, Utsumi K, Iritani A. Developmental ability of enucleated bovine oocytes matured *in vitro* after fusion with single blastomeres of eight-cell embryo matured and fertilized *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, 34:314-322, 1993.
 18. Bungartz L, Lucas-Hahn A, Rath D, *et al.* Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. *Theriogenology*, 43:667-675, 1995.
 19. Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, *et al.* Effect of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol Reprod Dev*, 30:330-338, 1991.
 20. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA, *et al.* Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod*, 38: 1171-1180, 1988.
 21. Pieterse MC, Kappen KA, Kruip ThAM, *et al.* Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30: 751-762, 1998.
 22. Bols PEJ, Vandenheede JMM, Van Soom A, *et al.* Transvaginal ovum pick-up(OPU) in the cow : A new disposable needle guidance system. *Theriogenology*, 43:677-687, 1995.
 23. Machatkova JE, Petilikova J, Dvoracek V. Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. *Theriogenology*, 44:801-810, 1995.
 24. Lopez Ruiz L, Alvarez N, Nunez I, *et al.* Effect of body condition on the developmental competence of IVM/IVF bovine oocytes. *Theriogenology*, 45:292 abstr., 1996.
 25. Dominguez MM. Effects of body condition, reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows. *Theriogenology*, 43:1405-

- 1418, 1995.
26. Katska L, Smorag Z. Number and quality of oocytes in relation to age of cattle. *Anim Reprod Sci*, 7:451-460, 1984.
 27. Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, *et al.* Effect of follicle size on bovine oocyte quality and development competence following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, 37:48-53, 1994.
 28. Blondin P, Sirard MA. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev*, 41:54-62, 1995.
 29. Collas P, Balise JJ, Robl JM. Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod*, 46:492-500, 1992.
 30. Barnes FL, Eyestone WH. Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos. *Theriogenology*, 33:141-152, 1990.
 31. Smith LC. Production of Genetically Identical Embryos by Electrofusion. In : Guide to Electroporation and Electrofusion. *Academic Press*, 371-392, 1992.
 32. Westhusin ME, Pryor JH, Bondioli KR. Nuclear transplantation in the bovine embryo : A comparison of 5-day, 6-day, frozen-thawed and nuclear transfer donor embryos. *Mol Reprod Dev*, 28:119-123, 1991.
 33. Kanka J, Fulka J, Fulka J, *et al.* Nuclear transplantation in bovine embryos : Fine structural and autoradiographic studies. *Mol Reprod Dev*, 29:110-116, 1991.
 34. Yang X, Jiang S, Farrell P, *et al.* Nuclear transfer in cattle : Effects of nuclear donor cells, cytoplasm age, co-culture and embryo transfer. *Mol Reprod Dev*, 35: 29-36, 1993.
 35. Heyman Y, Chesne P, Lebourhis D, *et al.* Developmental ability of bovine embryos after nuclear transfer based on the nuclear source : *in vivo* versus *in vitro*. *Theriogenology*, 42:695-702, 1994.