

## 활성화 처리에 따른 소 단위발생란의 발달

이성림 · 강태영 · 유재규 · 여현진 · 김세나 · 옥선아<sup>1</sup> · 노규진 · 최상용<sup>†</sup>  
경상대학교 수의학과, 동물의학연구소

## Development of Parthenotes Produced by Various Treatments in Bovine

S. L. Lee, T. Y. Kang, J. G. Yoo, H. J. Yeo, S. N. Kim,  
S. A. Ock<sup>1</sup>, G. J. Rho and S. Y. Choe<sup>†</sup>

*Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University*

### SUMMARY

Development of effective activation protocols is of great importance for improving the success of cloning and subsequent transgenic. Three methods for oocyte activation, including 5  $\mu$ M ionomycin (5 min) alone, ionomycin + 1.9 mM 6-dimethylaminopurine (DMAP, 3 hrs) and ionomycin + 10  $\mu$ g/ml cycloheximide (CHX, 3 hrs) were compared for their effects of pronuclei (PN) formation, development, developmental velocity and ploidy of parthenotes to IVF control in bovine. In group of ionomycin + DMAP, the oocytes having more 3PN were significantly ( $P < 0.05$ ) higher than in groups of ionomycin alone and of ionomycin + CHX (45.5% vs. 0 and 0%, respectively). Activation with the ionomycin alone, ionomycin + DMAP and ionomycin + CHX resulted in cleavage rates of 30, 85.5 and 57.9%, respectively. The blastocysts rate of parthenotes activated by ionomycin + DMAP treatment was significantly higher (12.3%,  $P < 0.05$ ) than those of other treated groups. Chromosome analysis shows that ionomycin + DMAP treatment greatly enhances the incidence of chromosomal abnormality of the parthenotes.

From the results, we may conclude that DMAP treatment to the oocytes accelerates developmental velocity resulting in both the higher incidence of chromosome abnormality and of PN formation, and strongly suggest that CHX combined with ionomycin is better than DMAP for the purpose of successful nuclear transplantation. Developmental velocity of parthenotes activated by ionomycin + DMAP treatment was significantly ( $P < 0.05$ ) faster than others.

(Key words: activation, chromosome, pronuclear formation, developmental velocity, bovine oocyte)

### 서 론

지난 수년간 생명공학 분야에 대한 무한한 도전

에 따라 많은 연구가 수행되어졌으며, 그 중 핵이식 기법을 이용해서 복제 및 형질전환 동물의 생산이 가능하게 되었다. 그러나 이러한 방법이 실용화되기 위해서는 여러 분야의 검증이 있어야 하며

본 연구는 2000년 농림기술개발사업 기획연구과제의 연구비 (MAF-SGRP, 300012-5)로 수행되었음.

<sup>1</sup> 경상대학교 생물학과(Department of Biology, Gyeongsang National University)

<sup>†</sup> Correspondence : sychoe@nongae.gsnu.ac.kr

또한 반복적인 실험의 결과가 수행되어야 한다고 본다

핵이식 기법을 수행할 때 수핵 난자의 발육 능력과 탈핵 정도, 수핵 난자와 공핵 세포의 융합 효율, 수핵 난자와 공핵 세포의 세포주기, 핵의 재구성 (reprogramming), 수핵 난자의 활성화 등 많은 요인이 재조합된 핵이식란의 발달에 영향을 주게 된다 (Fulka 등, 1998).

핵이식 시 활성화 유도 물질에는  $Ca^{2+}$  ionophore (Ernst 등, 1999; Liu 등, 1998a; Liu 등, 1998b), ethanol (Kuznetsova 등, 2000; Nagai, 1987) 및 electrical stimulation (Bodo 등, 1998) 등이 이용될 수 있으며, MPF (maturation promoting factor) 를 안정화 시키기 위하여 cycloheximide (CHX, Ernst 등, 1999; Bodo와 Yang 등, 1998; Presicce 등, 1994), 6-dimethylaminopurine (DMAP, Liu 등, 1998ab) 및 cdc2 kinase inhibitor (Alberio 등, 2000; Motlik 등, 1998) 등이 병용될 수 있다. 이는 정상적으로 배란된 난자가 제 2 감수분열기 중기에 정지해 있을 때 MPF 수치가 높은 상태로 유지되다가 정자에 의해서 수정이 일어나면서 MPF 수치는 감소하고 그에 따라 세포분열이 일어나는 기전을 근간으로 하고 있다.

소 난자의 핵이식 활성화에 대한 여러 연구 (Stice 등, 1994; Presicce와 Yang 등, 1994; Ware 등, 1989; Nagai, 1987)들이 지난 10여년간 수행되어져 왔으며, 최근에는 핵이식 수핵 난자의 활성화 병용물질로 H1-histone kinase inhibitor 로써 DMAP 을 널리 사용하고 있다. 그러나 DMAP은 높은 활성화 효율에도 불구하고 염색체 배수성 (ploidy)과 세포주기에 문제가 발생할 수 있다는 주장들이 제기되고 있다 (Avery 등, 1998; De la Fuente와 King 등, 1998; Rho 등, 1998; Winger 등, 1997). 또한 토끼에서 Dinnyes 등 (2001)은 재조합된 핵이식란의 활성화 유도에 cycloheximide (CHX)와 DMAP을 적용하였을 때 대부분 분할율과 배반포 발달율은 높지만 산자 생산에는 실패하였다고 보고하였다. 이는 재조합한 핵이식란이 배반포까지 발달한 후 DNA reprogramming의 문제라고 제시하였지만, 염색체 이상에 대한 연구는 수행되지 못하였다.

따라서 본 실험은 소 난자의 활성화를 위해서

$Ca^{2+}$  ionophore 제재인 ionomycin과 H1-histone kinase inhibitor인 DMAP 및 protein synthesis inhibitor인, CHX를 각각 병용처리하여 단위발생란의 전핵 형성, 발달율, 발달속도 및 염색체의 배수성을 조사하고, 효율적인 난자 활성화 방법을 규정함으로써 향후 복제 수정란 생산에 이용하고자 하였다.

## 재료 및 방법

본 실험에 사용된 모든 배양액은 초 순수장치 (Millipore S.A. 67120, France)에서 생산된 Milli-Q 물을 이용하여 제조하였으며, pH 7.2~7.4, 삼투압은  $280 \pm 5\%$  mOsm/kg으로 조정하여 사용하였다. 실험에 사용된 시약과 배양액은 Sigma Chemical Co.로 부터 구입하였다.

### 1. 난포란의 채란 및 체외 성숙

도축장 유래 소 난소를 penicillin-streptomycin (Gibco, Pen-Strep)이 0.6 mL/L 함유된 302°C의 PBS (Phosphate Buffered Saline)로 3~4회 세척한 후, slicing 방법으로 난포란을 채란하였다. 난포란의 체외 성숙용 배양액은 25 mM HEPES가 함유된 TCM199 배양액 (Earle's salt)에 2.2 g/L sodium bicarbonate, 0.11 g/L sodium pyruvate, 0.6 mL/L Pen-Strep 및 10% steer serum (Cansera Inc., Rexdale, ON, Canada)을 첨가시켜 사용하였다. 난포란의 체외 배양은 체외 성숙 배양액 50  $\mu$ L 미세 소 적에 15개의 난포란을 넣고 CO<sub>2</sub> incubator (5% CO<sub>2</sub>, 98~99% 습도, 39°C)에서 22시간 동안 배양하였다.

### 2. 체외 성숙 난자의 활성화 처리

난자의 활성화를 위해서 calcium ionophore 제재인 ionomycin은 2% BSA와 10 mM HEPES가 함유된 Tyrode's albumin lactate pyruvate (TALP) 배양액, DMAP 및 CHX는 0.599 g/L Hemi ca-lactate, 20 ml/L와 10 ml/L 필수와 비필수 아미노산, 0.2 g/L L-glutamine, 0.6 ml/L Pen-Strep 그리고 3 mg/mL BSA이 첨가된 CR1aa 배양액에 용해하여 사용하였다.

체의 배양 후 22시간 경과한 난자를 3% sodium-citrate 용액에서 교반시켜 난구 세포를 제거하고, 도립현미경 (Nikon, 200 magnification) 하에서 제 1극체가 방출되고 세포질이 균질한 제 2 감수분열 중기 상태의 난자만을 선별하여 세 실험군으로 구분하였다. 실험군 1 (ionomycin treated group)의 난자는 5  $\mu$ M ionomycin으로 5분간 단독 처리하였으며, 실험군 2 (ionomycin + DMAP treated group)의 난자는 5  $\mu$ M ionomycin으로 5분간 처리 후 1.9 mM DMAP 용액에 3시간 배양하였고, 실험군 3 (ionomycin + CHX treated group)의 난자는 5  $\mu$ M ionomycin으로 5분간 처리 후 10  $\mu$ g/mL CHX 용액에서 3시간 동안 배양시켰다.

### 3. 체외 수정 및 체외 배양

정자의 처리 및 체외 수정에 이용된 배양액은 2% BSA (Fraction V)와 10 mM HEPES가 함유된 TALP 배양액을 기본으로 하여 10  $\mu$ g/mL heparin을 첨가시켜 체외 수정용 배양액(IVF-TALP)으로 이용하고, heparin이 첨가되지 않은 배양액을 정자 세척용 (Sperm-TALP)으로 이용하였다.

난포란의 체외 수정시 사용된 정자는 본 실험실에서 동결보존시킨 정자를 이용하였으며, Rho 등 (1998)의 방법에 준하여 Percoll density gradient 방법으로 실시하였다. Percoll gradient의 준비는 100% percoll 용액 (S-1644)에 10 $\times$  salt 용액 (NaCl, 2.889 g; KCl, 0.238 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.116 g; CaCl<sub>2</sub>, 0.112 g; HEPES, 0.163 g; Milli-Q 물, 50 mL)을 첨가하여 90% percoll 용액을 만들고, 90% percoll 용액에 동량의 sperm-TALP을 첨가하여 45% percoll 용액을 준비하였다. 15 mL conical plastic tube의 아래층에 90% percoll 용액 2 mL을 넣고 그 상층에 45% percoll 용액 2 mL을 두 층이 섞이지 않도록 조심스럽게 분주한 후, 45% percoll 용액 상층부위에 융해된 동결정액 0.5 mL을 넣어 1,000 $\times$ g에서 15분 동안 원심 분리한 후, 정자 pellet을 회수하였다. 회수된 정자 pellet을 10 mL의 sperm-TALP 용액에 넣어 350 $\times$ g에서 10분간 원심 분리시켜 세척하였다.

체의 수정은 체외 성숙된 난포란을 sperm-TALP 배양액으로 교반하여 난구 세포층의 일부를 제거

한 다음 IVF-TALP 배양액에서 2~3회 세척한 후, 수정용 IVF-TALP 배양액 50  $\mu$ L 미세 소적 당 15개의 난자를 넣은 다음 percoll gradient에 의해서 준비된 정자를 최종농도가 2 $\times$ 10<sup>6</sup> sperm/ml이 되도록 첨가하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 16~18시간 체외 수정을 유도하였다.

활성화 및 체외 수정 후 배양은 제 4일까지 CR1aa 배양액에서 배양하였고, 그 후 TCM199 배양액에 옮겨 배반포기까지 배양하였다. 체외 배양시 배양액은 50  $\mu$ L 미세 소적 당 15개의 난자를 넣어 5% CO<sub>2</sub>, 39C의 조건 하에서 배양하였으며, 활성화 자극 및 체외 수정 후 12시간부터 48시간까지 6시간 간격으로 발달속도를 조사하였고, 제 2일째 (제 0일: 활성화 자극 및 체외 수정일)에 분할율 및 제 8일째에 배반포기 형성율을 각각 비교 조사하였다.

### 4. 세포학적 분석

활성화 자극 및 체외 수정 18시간 후 단위발생란과 체외 수정란의 전핵 형성율을 조사하기 위해서 methanol:acetic acid (3:1, v/v)에 18시간 이상 고정한 후 1% aceto-iacmoid로 염색하여 전핵 형성과 핵상을 관찰하였다. 활성화 자극 및 체외 수정 108시간의 단위발생란과 체외 수정란의 세포수 및 염색체의 분석을 위해서 0.05  $\mu$ g/mL Karyo-MAX Colcemid solution (GIBCO BRL)이 포함된 CR1aa 배양액에서 6시간동안 배양하여 세포주기를 중기로 동기화 시키고 1% Na-citrate에서 4분간 처리하여 각 단위발생란을 0.5  $\mu$ L의 1% Nacitrate와 1.5  $\mu$ L methanol:acetic acid (1:1, v/v)에 넣었다가 slide glass에 얹고 입으로 붙여서 염색체를 넓게 퍼트리고, slide를 methanol:acetic acid (3:1, v/v)로 18시간 이상 고정한 후 4% (v/v) Giemsa 염색액으로 염색하여 세포수와 염색체를 관찰하고, 염색체의 배수성은 반수체 (haploid), 이배체 (diploid), 배수체 (polyploid) 또는 혼합 염색체 (mixoploid)로 구분하였다.

### 5. 통계 처리

각 처리군의 전핵 형성, 분할율, 발달율 그리고 염색체의 배수성 검증은 One-Way ANOVA로 분

석하였다. 염색체의 분석은 Student's t-test로 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 난자의 활성화 유도에 따른 전핵 형성

체의 성숙된 제 2감수분열 증기 난자에 각기 다른 활성화 유도를 가한 후 18시간 동안 배양한 후 전핵 형성을 조사한 결과는 Table 1과 같다. Ionomycin 처리 후 DMAP을 처리한 난자는 1PN 형성이 9.1%로 ionomycin을 단독 처리하였거나 ionomycin 처리 후 CHX를 처리한 난자에서의 1PN 형성을인 77.8과 79.0%보다 유의적 ( $P<0.05$ )으로 낮게 나타났으며, 또한 3PN 이상의 형성은 45.5%로 다른 두 군보다 유의적 ( $P<0.05$ )으로 높게 나타났다.

Avery 등 (1998)은 2 mM DMAP으로 활성화 자극을 가한 난자의 20시간 체외 배양 후 전핵 형성이 1PN은 11% 나타난 반면, 2PN이 76%가 나타났다고 보고하였다. 이러한 보고는 본 실험에서 ionomycin 처리 후 DMAP으로 활성화 자극을 가하였을 때 1PN이 9.1%에 불과하지만 3PN 이상이 45.5%나 나타난 결과와 유사한 양상을 보였다.

또한 본 실험에서는 ionomycin 처리 후 DMAP로 활성화를 유도하였더니 다수의 난자에서 전핵 형성이 3N, 4N 및 6PN이 나타나는 등 비정상적인 양상을 보였다. 반면 ionomycin 단독 처리하거나 ionomycin 처리 후 CHX로 활성화를 유도하였을

때는 대부분이 1PN을 가지고 3PN 이상의 전핵을 나타내는 경우는 없었다. 이러한 결과는 소와 쥐 난자를 체외 성숙시 DMAP으로 처리하였을 때 비정상적인 제 2 감수분열 증기가 나타났으며 (Fluka 등, 1991; Rime 등, 1989), 이러한 요인이 후기 배로의 발달을 방해할 수 있다고 보고한 결과(Kawarsky 등, 1996; King 등, 1979)와 일치하였다. 따라서 DMAP은 난자의 비정상적인 전핵 형성을 유도한다는 것을 알 수 있었고, 이는 향후 발달중인 단위발생란의 염색체에도 이상이 유발될 것으로 사료되어 본 실험에서 염색체의 분석도 실시하게 되었다.

### 2. 난자의 활성화 유도에 따른 체외 발달율

체의 성숙된 제 2 감수분열 증기 난자에 각기 다른 활성화 자극을 가한 후 분할율 및 발달율을 비교 조사한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다.

Ionomycin을 처리하고 DMAP으로 활성화를 유도한 실험군의 분할율은 85.5%로 체외 수정한 대조군의 72.5%와는 유의적 차이 ( $P<0.05$ )가 인정되지 않았지만, ionomycin을 단독 처리하거나 ionomycin 처리 후 CHX로 활성화를 유도한 실험군의 30.3와 57.9%에 비해 유의적 ( $P<0.05$ )으로 높게 나타났다. 그러나 DMAP으로 난자의 활성화를 유도하였을 때 분할율은 대조군과 유사하였지만 배반포까지의 발달율은 12.3%로 대조군의 27.8%와는 유의적인 차이 ( $P<0.05$ )를 나타냈다. 이는 난자를 ionomycin으로 처리하고 DMAP로 활성화 자극

Table 1. Comparisons of pronuclei formation in parthenotes produced by various treatments to IVF controls at 18 hrs after activation and insemination

Treatments	No. of oocytes	No. (%) of pronuclei			
		1	2	≥3	0
Ionomycin	18	14 (77.8) <sup>a</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>c</sup>	4 (22.2) <sup>a</sup>
Ionomycin+DMAP	22	2 (9.1) <sup>b</sup>	10 (45.5) <sup>b</sup>	10 (45.5) <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>
Ionomycin+CHX	19	15 (79.0) <sup>a</sup>	2 (10.5) <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	2 (10.5) <sup>b</sup>
Control (IVF)	32	3 (9.4) <sup>b</sup>	23 (71.9) <sup>a</sup>	4 (12.5) <sup>b</sup>	2 (6.3) <sup>b</sup>

<sup>abcd</sup> Percentages with different superscripts within columns indicate significant differences ( $P<0.05$ ).

Ionomycin, 5  $\mu$ M ionomycin; DMAP, 1.9 mM 6-dimethylaminopurine; CHX: 10  $\mu$ g/mL cycloheximide, Control (IVF): IVF embryos.

Table 2. Comparisons of development of bovine parthenotes produced by various treatments to IVF controls

Treatments	No. of oocytes	No. (%) of oocytes developed to	
		2-cell	Blastocyst
Ionomycin	142	43 (30.3) <sup>c</sup>	1 ( 0.7) <sup>c</sup>
Ionomycin+DMAP	138	118 (85.5) <sup>a</sup>	17 (12.3) <sup>b</sup>
Ionomycin+CHX	133	77 (57.9) <sup>b</sup>	7 ( 5.3) <sup>b</sup>
Control (IVF)	327	237 (72.5) <sup>a</sup>	91 (27.8) <sup>a</sup>

<sup>abcd</sup> Percentages with different superscripts within columns indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

Ionomycin, 5  $\mu$ M ionomycin; DMAP, 1.9 mM 6-dimethylaminopurine; CHX: 10  $\mu$ g/mL cycloheximide, Control (IVF): IVF embryos.

을 가하였을 때 분할율과 배반포율이 각각 70.0와 17.3%였다는 Rho 등 (1998)의 보고와 유사한 결과를 보였다.

Yang 등 (1994)은 소의 난자를 ethanol로 처리하고 CHX로 활성화를 유도하여 24시간 경과하였을 때 전핵 형성이 49%, 2~8세포기가 45%를 나타내었다고 보고하였다. 이는 본 실험에서 ionomycin 처리 후 CHX로 활성화 유도를 하였을 때 2세포기가 57.9%를 나타내었던 결과와 유사하다. 그리고 Bodo 등 (1998)은 전기자극과 CHX를 병행하여 난자의 활성화를 유도한 결과 배반포의 발달율이 14%로 나타났다고 보고하여 본 실험에서 ionomycin 처리 후 CHX로 활성화를 유도한 실험군의 배반포 발달율인 5.3%보다 높은 발달율을 보였다.

### 3. 난자의 활성화 유도에 따른 발달속도 비교

체의 성숙된 제 2감수분열 중기 난자에 각기 다른 활성화 자극을 가한 후 2-세포기로 분열되기까지의 시간을 조사한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같다.

Ionomycin 처리 후 DMAP으로 활성화 유도된 단위발생란은 자극 후 18시간에 이미 28%의 분열율을 보였으나 대조군, ionomycin 단독 처리군 및 ionomycin 처리 후 CHX로 활성화를 유도한 실험군은 각각 5, 2 및 3% 수준의 분할율을 보여 유의적 ( $P < 0.05$ )으로 높게 나타났다. Ionomycin 처리 후 DMAP으로 활성화를 유도한 실험군은 24시간 경과하였을 때 52%로 높은 분할율을 보인 반면 대

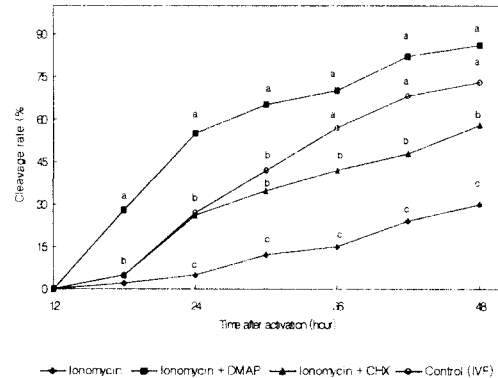


Fig. 1. Diagram of developmental velocity of parthenotes produced by various activation treatments. <sup>abcd</sup> Percentages with different superscripts within columns indicate significant differences ( $P < 0.05$ ). Ionomycin, 5  $\mu$ M ionomycin; DMAP, 1.9 mM 6-dimethylaminopurine; CHX: 10  $\mu$ g/mL cycloheximide, Control (IVF): IVF embryos.

조군, ionomycin 단독 처리군 및 ionomycin 처리 후 CHX로 활성화 유도한 실험군은 각각 26, 5와 27%의 낮은 분할율을 보였다. 또한 48시간 경과하였을 때에도 ionomycin 처리 후 DMAP로 활성화를 유도한 실험군에서 86%의 분할율을 보여 대조군의 73%와는 유사하지만 ionomycin 단독 처리군과 CHX로 활성화를 유도한 실험군에 비해 유의적 ( $P < 0.05$ )으로 높은 발달율을 보였다.

이러한 결과는 명확히 설명될 수 없지만, Winger 등 (1997)이 소 난자를 활성화 처리 후 DMAP을 사용할 경우 세포 주기 (cell-cycle) 중 DNA 합

성기인 S-phase에서 G2-phase로 진행되지 않고 S-phase 를 한번 더 개시해서 세포주기 및 핵형에 이상이 초래될 수 있다고 가설한 바 있다.

따라서 본 실험의 결과로 DMAP 처리된 난자는 세포주기가 가속화되어 초기에 배 분열속도가 빠르게 진행되어 비정상적인 배 분열로 인하여 핵 및 염색체상에 문제점이 야기될 거라는 가설 하에 핵형 분석을 하고자 하였다.

#### 4. 난자의 활성화 유도에 따른 평균 세포수 및 염색체 분석

각기 다른 활성화 자극을 가한 후 108시간 동안 체외 배양된 단위발생란의 세포수와 염색체 분석을 조사한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. Ionomycin + DMAP처리군의 평균 세포수는  $12.6 \pm 1.46$ 개로 대조군의  $11.3 \pm 0.34$ 개와 유사하게 나타난 반면 ionomycin 단독 처리군과 ionomycin 처리 후 CHX 처리군의 평균 세포수는 각각  $3.4 \pm 0.75$ 개,  $4.2 \pm 0.49$ 개로 ionomycin 처리 후 DMAP 처리군 및 대조군의 평균세포수에 비해 유의적 ( $P < 0.05$ )으로 낮게 나타났다.

Ionomycin 처리 후 DMAP으로 활성화를 유도한 실험군의 염색체수는 반수체 (haploid)가 2.1%로 ionomycin 단독 처리하거나 ionomycin 처리 후 CHX로 활성화 자극을 가한 실험군의 89.3%와 63.8%에 비해 유의적 ( $P < 0.05$ )으로 낮은 반면 혼합 염색체 (mixoploid)는 60.4%로 0.0%과 22.7%에 비해 유의적 ( $P < 0.05$ )으로 높게 나타났다. 이러한

결과는 DMAP으로 활성화를 유도하면 감수분열기에 핵과 세포질간의 분열이 정상적으로 일어나지 않아 후기 배 발달율이 낮아지며 배가 발달하더라도 염색체 이상이 빈번하게 일어난다는 보고 (Avery 등, 1998; Rho 등, 1998; Winger 등, 1997)와 일치되는 결과이며, 또한 De la Fuente 와 King 등 (1998)도 난자를 DMAP로 활성화 유도를 하였더니 활성화 효율은 높지만 염색체가 비정상적이거나 활성화 시에 DNA의 합성이 너무 이르게 일어나는 문제점이 있다고 보고한 바 있다. 복제 혹은 형질전환 소의 생산을 위해서 난자의 활성화 자극 방법으로 많은 연구진이 calcium + DMAP 처리를 그 기본으로 수행하고 있으나, 일부 연구진 (Wells 등, 1999; Cibelli 등, 1998)에 의해서만 산자 생산을 보고한 바 있다. 산자 생산에 실패하는 이유는 각기 다른 공핵 세포와 수핵 난자의 reprogramming의 원인으로 일축하고 있으나, 본 연구의 결과로는 reprogramming 뿐만 아니라 적절하지 못한 활성화 자극 때문인 것으로 사료되어진다. Hagemann 등 (1995)은 난자의 활성화에 CHX를 단독으로 사용하거나 병용하였을 때 활성화 효율이 높고 균일한 반수체 (haploid) 핵형을 가진다고 보고하였으며 본 실험에서도 ionomycin 처리 후 CHX로 활성화 자극을 가하였을 때 반수체 (haploid)가 63.8%로 나타나 비교적 정상적인 핵형을 가지는 것으로 보인다.

따라서 단위발생란과 대조군인 체외수정란의 전핵형성율, 분할율, 발달속도 및 핵형을 비교 조

Table 3. Comparisons of cell number and chromosomal composition of parthenotes at 108 hrs post-activation and IVF embryos at 108 hrs post-insemination

Treatments	No. of oocytes	Mean cell number $\pm$ SEM	% of chromosome composition classified as			
			Diploid	Haploid	Mixoploid	Polyloid
Ionomycin	36	$3.4 \pm 0.75^b$	10.7 <sup>c</sup>	89.3 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>
Ionomycin+DMAP	48	$12.6 \pm 1.46^a$	35.4 <sup>b</sup>	2.1 <sup>c</sup>	60.4 <sup>a</sup>	2.1 <sup>b</sup>
Ionomycin+CHX	39	$4.2 \pm 0.49^b$	13.5 <sup>c</sup>	63.8 <sup>b</sup>	22.7 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>
Control (IVF)	33	$11.3 \pm 0.34^a$	85.8 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>	11.3 <sup>b</sup>	2.9 <sup>a</sup>

<sup>abcd</sup> Percentages with different superscripts within columns indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

Ionomycin, 5  $\mu$ M ionomycin; DMAP, 1.9 mM 6-dimethylaminopurine; CHX: 10  $\mu$ g/mL cycloheximide, Control (IVF) : IVF embryos.

사한 본 실험의 연구 결과, 핵이식시 활성화 처리 방안으로 ionomycin 처리 후 DMAP으로 활성화를 유도하는 방법보다 ionomycin 처리 후 CHX으로 활성화를 유도하는 것이 더욱 효과적일 것으로 사료된다.

## 적 요

본 연구는 최근 형질전환동물의 생산 및 복제동물 생산에 이용되고 있는 핵이식 기법을 시행할 때 재조합된 핵이식란의 활성화를 위해 널리 적용되고 있는 6-dimethylaminopurine (DMAP)의 활성화 효율과 근래에 제기되고 있는 단위발생란의 비정상적인 염색체 및 핵형에 대해 알아보고 적합한 활성화 유도물질을 찾고자 시행되어졌다.

도축장 유래의 난소에서 채란한 난자를 10% 거세한 수소혈청이 포함된 TCM-199배양에서 22시간동안 체외 성숙을 시킨 후 제 2감수분열 중기의 난자만을 선별해서 5  $\mu$ M ionomycin에서 5분간 처리하고 1.9 mM 6-dimethylaminopurine (DMAP)와 10  $\mu$ g/mL cycloheximide (CHX)에서 각 3시간동안 처리하여 활성화를 유도하였다. 활성화가 유도된 난자를 18시간 동안 체외 배양시 전핵 형성, 제 2 세포기까지 분할속도, 배반포까지의 발달을 및 활성화 및 체외수정 후 108시간에 평균 세포수와 염색체를 분석하여 활성화 물질의 효율뿐만 아니라 문제점을 알아보려고 하였다.

1. 활성화 자극에 따른 난자의 전핵 형성은 ionomycin 처리 후 DMAP을 처리한 난자에서는 1PN 형성율이 9.1%로 ionomycin을 단독 처리하거나 ionomycin 처리 후 CHX를 처리한 난자에서의 1PN 형성율인 77.8와 79.0%보다 유의적 ( $P<0.05$ )으로 낮게 나타났으나, 3PN 형성율은 45.5%로 유의적 ( $P<0.05$ )으로 높게 나타났다. 따라서 ionomycin 처리 후 DMAP으로 활성화를 유도한 난자는 비정상적인 핵형을 가지지만 CHX로 활성화를 유도하였을 때는 정상적인 전핵 형성이 이루어지는 것으로 보인다.
2. 활성화 자극을 가한 난자의 체외 발달율은 ionomycin을 처리하고 DMAP으로 활성화 자

극을 가하였을 때 분할율이 85.5%로 체외 수정한 대조군의 72.5%와 유사하였다. 그러나 ionomycin을 단독 처리하거나 ionomycin 처리 후 CHX로 활성화 자극을 가한 실험군의 분할율인 30.3와 57.9%에 비해 유의적 ( $P<0.05$ )으로 높게 나타났다. DMAP 처리군의 분할율은 대조군과 유사하였지만 배반포까지의 발달율은 12.3%로 대조군의 27.8%와는 유의적인 차이는 없으나 발달율이 낮은 경향으로 나타났다.

3. Ionomycin으로 처리 후 DMAP로 활성화 자극을 가한 실험군에서 난자의 발달속도는 활성화 자극 후 18시간 경과하였을 때 28%의 배분율을 보여 분열속도가 가장 빨랐으며 활성화 자극 후 24~48시간동안 체외 배양을 하였을 때에도 ionomycin 단독 처리하거나 ionomycin 처리 후 CHX로 활성화 자극을 준 실험군에 비해 DMAP으로 활성화 자극을 가한 실험군이 유의적 ( $P<0.05$ )으로 빠른 발달속도를 보였다.
4. Ionomycin을 단독 처리하거나 ionomycin 처리 후 DMAP과 CHX로 활성화 자극을 주고 108시간동안 체외 배양하여 활성화된 난자의 평균 세포수와 염색체를 분석한 결과 DMAP으로 활성화 자극을 가한 실험군에서 평균 세포수가  $12.6 \pm 1.46$ 개로 대조군의  $11.3 \pm 0.34$ 와 유사하게 나타났으며 ionomycin 단독 처리군과 CHX로 활성화 자극을 가한 실험군의 평균 세포수인  $3.4 \pm 0.75$ 와  $4.2 \pm 0.49$ 에 비해 유의적 ( $P<0.05$ )으로 높게 나타났다.
5. 활성화 자극을 가한 난자의 염색체는 ionomycin 처리 후 DMAP으로 활성화 자극을 가하였을 때 반수체 (haploid)가 2.1%로 ionomycin을 단독 처리하거나 ionomycin 처리 후 CHX로 활성화 자극을 가한 실험군의 89.3%와 63.8%에 비해 유의적 ( $P<0.05$ )으로 낮은 반면 혼합 염색체 (mixoploid)는 60.4%로 0.0와 22.7%에 비해 유의적 ( $P<0.05$ )으로 높게 나타났다. 또한 DMAP으로 활성화 자극을 가한 처리군에서는 배수체(polyploid)도 존재하여 비정상적인 염색체가 많이 나타나는 것으로 보인다.

이상의 결과를 보아 현재 핵이식의 활성화 유도 물질로 널리 이용되고 있는 6-dimethylaminopurine (DMAP)은 난자의 활성화 효율과 분할 및 배 발달율은 다른 활성화물질에 비해 비교적 높지만 배 발달 중에 염색체의 이상과 핵형의 형성이 비정상적으로 일어나는 문제점이 확인되었다. 반면 cycloheximide (CHX)는 활성화 효율과 배 발달율은 DMAP에 비해 다소 낮지만 정상적인 전핵형성과 염색체상을 가짐으로 부작용이 적어 활성화 유도에 보다 안전한 경향이 있다.

따라서 DMAP이 수핵 난자뿐만 아니라 공핵 세포에도 유사한 영향을 끼칠 것으로 사료되어 이에 대해 조사가 필요할 것이며, 또한 이런 문제점들이 apoptosis와도 연관이 있을 것으로 보고 이에 대한 연구도 수행되어야 할 것으로 생각된다.

### 참고문헌

- Alberio R, Kubelka M, Zakhartchenko V, Hajduch M, Wolf E and Motlik J. 2000. Activation of bovine oocytes by specific inhibition of cyclin-dependent kinase. *Mol. Reprod. Dev.*, 55:422-432.
- Avery B, Hay-Schmidt A, Hyttel P and Greve T. 1998. Embryo Development, oocyte morphology, and kinetics of meiotic maturation in bovine oocytes exposed to 6-dimethylaminopurine prior to *in vitro* maturation. *Mol. Reprod. Dev.*, 50:334-344.
- Bodo S, Dinnyes A, Baranyai B, Solti L and Dohy J. 1998. Comparison of different treatments for parthenogenetic activation of bovine oocytes matured *in vitro*. *Acta. Vet. Hung.*, 46:493-500.
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PL, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA and Robl JM. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblast. *Science*, 280:1256-1258.
- De La Fuente R and King WA. 1998. Developmental consequences of karyokinesis without cytokinesis during the first mitotic cell cycle of bovine parthenotes. *Biol. Reprod.*, 58:952-962.
- Dinnyes A, Dai Y, Barber M, Liu L, Xu J, Zhou P and Yang X. 2001. Development of cloned embryos from adult rabbit fibroblasts: effect of activation treatment and donor cell preparation. *Biol. Reprod.*, 64:257-263.
- Ernst CA, Leibfried-Rutledge LM and Dentine MR. 1999. Development of an efficient method to produce uniformly haploid parthenogenones. *J. Exp. Zool.*, 284:112-118.
- Fulka J, Leibfried-Rutledge ML and First NL. 1991. Effect of 6-dimethylaminopurine on germinal vesicle breakdown of bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 29:379-384.
- Fulka J, First NL, Loi P and Moor RM. 1998. Cloning by somatic cell nuclear transfer. *Bio. Essays.*, 20:847-851.
- Hagemann LJ, Hillery-Weinhold FL, Leibfried Rutledge ML and First NL. 1995. Activation of murine oocytes with  $Ca^{2+}$  ionophore and cycloheximide. *J. Exp. Zool.*, 271:57-61.
- King WA, Linares T, Gustavsson I and Bane A. 1979. A method for preparation of chromosomes from bovine zygotes and blastocysts. *Vet. Sci. Commun.*, 3:51-56.
- Kuznietsova IB, Kuznietsov and Lukashenko OO. 2000. The activation of bovine oocytes to parthenogenetic development by ethanol. *Tsitol. Genet.*, 34:57-64.
- Liu L, Ju JC and Yang X. 1998a. Differential inactivation of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase following parthenogenetic activation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, 59:537-545.
- Liu L, Ju JC and Yang X. 1998b. Parthenogenetic development and protein patterns of newly matured bovine oocytes after chemical activation. *Mol. Reprod. Dev.*, 49:298-307.
- Motlik J, Sutovsky P, Kalous J and Kalab P. 1998. Interplay between cdc2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian



- oocytes. *Theriogenology*, 49:461-469.
- Nagai T. 1987. Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes *in vitro* with ethanol. *Gamete Res.*, 16:243-249.
- Presicce GA and Yang X. 1994. Nuclear dynamics of parthenogenesis of bovine oocytes matured *in vitro* for 20 and 40 hours and activated with combined ethanol and cycloheximide treatment. *Mol. Reprod. Dev.*, 37:61-68.
- Rime H, Neant I, Guerrier P and Ozon R. 1989. 6-dimethylaminopurine, a reversible inhibitor of the transition to metaphase during the first meiotic cell division of the mouse oocyte. *Dev. Biol.*, 133:169-179.
- Rho GJ, Johnson WH and Betteridge KJ. 1998. Cellular composition and viability of demi- and quarter-embryos made from bisected bovine morulae and blastocysts produced *in vitro*. *Theriogenology*, 50:885-895.
- Rho GJ, Wu B, Kawarsky S, Leibo SP and Betteridge KJ. 1998. Activation regimens to prepare bovine oocytes for intracytoplasmic sperm injection. *Mol. Reprod. Dev.*, 50:485-492.
- Stice SL, Keefer CL and Matthews L. 1994. Bovine nuclear transfer embryos: Oocyte activation prior to blastomere fusion. *Mol. Reprod. Dev.*, 38:61-68.
- Ware CB, Barnes FL, Maiki-Laurila M and First NL. 1989. Age dependence of bovine oocyte activation. *Gamete Res.*, 22:265-275.
- Wells DN, Misica PM and Tervit HR. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol. Reprod.*, 60:996-1005.
- Winger QA, De La Fuente R, King WA, Armstrong DT and Watson AJ. 1997. Bovine parthenogenesis is characterized by abnormal chromosomal complements: Implications for maternal and paternal co-dependence during early bovine development. *Dev. Genetics*, 21:160-166.
- Yang X, Presicce GA, Moraghan L, Jiang SE and Foote RH. 1994. Synergistic effect of ethanol and cycloheximide on activation of freshly matured bovine oocytes. *Theriogenology*, 41:395-403.

---

(접수일: 2001. 4. 16 / 채택일: 2001. 6. 1)