

돼지 공여세포의 조건이 핵이식 수정란의 체외발달에 미치는 영향

홍승표 · 박준규 · 이명열 · 이지삼 · 정장용 · 박희성[†]
진주산업대학교 동물생명과학과

Effects of Donor Somatic Cell Conditions on *In Vitro* Development of Nuclear Transplanted Porcine Embryos

S. P. Hong, J. K. Park, M. Y. Lee, J. S. Lee, J. Y. Jung and H. S. Park[†]

Dept. of Animal Science & Biotechnology, Chinju National University,
Chinju 660-758, Republic of Korea

SUMMARY

This study was conducted to examine *in vitro* developmental ability of porcine embryos after somatic cell nuclear transfer. The porcine ear cell was cultured *in vitro* for confluency in serum-starvation condition(TCM-199 + 0.5% FBS) for 3 ~ 6 days of cell confluency. The zona pellucida of IVM oocytes were partially drilled using laser system. Single somatic cell was individually transferred into enucleated oocytes. And the reconstructed embryos were electrically fused(single DC 1.9kv/cm, 30 μ sec) with 0.3M mannitol. After electrofusion, embryos were activated(single AC 5v/mm, 5sec) and cultured in NCSU-23 medium containing 10% FBS at 39°C, 5% CO₂ in air for 6 to 8 days.

The fusion rate of donor cells was 45.6, 36.8 and 46.1% in 3 ~ 4, 5 ~ 6 days of serum starvation and non serum starvation(N-S), and were 52.7, 53.0 and 51.7% in 1 ~ 2, 5 ~ 6 and 13 ~ 14 passages of donor cell culture, respectively. No significant difference was found in the fusion rate of donor cells by the duration of serum starvation treatment or the number of donor cell passages. By the size of donor cells, however, the fusion rate was significantly higher(P<0.05) for reconstructed embryos derived from 25 μ m \geq size of donor cells (65.3%) than that of 25 ~ 30 μ m(42.5%) or 30 μ m(45.5%) \leq cells. The cleavage rate was significantly(P<0.05) higher in 3 ~ 4 days of serum starvation treatment(67.1%) than that in N-S (50.7%) or 5 ~ 6 days of starvation(57.1%). The activation rate by the size of donor cells in fused oocytes was 56.5, 68.8 and 58.5%, respectively, and was not significant. The developmental rate to blastocyst in nuclear transplanted embryos(10.5%) using somatic cell was similar to IVF embryos(12.4%). The mean number of cells at blastocyst stage was fewer(P<0.05) in nuclear transferred embryos(18.6 \pm 2.1 nuclei) than those of *in vitro* fertilized embryos(28.5 \pm 2.8 nuclei). These results suggest that the developmental potential of nuclear transplanted embryos *in vitro* depends, in part, on suitable culture time and size of donor somatic cells.

(Key words: somatic cell, nuclear transfer, fusion, activation, blastocyst, pig)

서 론

체세포를 이용한 복제동물은 1997년 Wilmut 등
에 의해서 면양의 유전세포유래 복제 면양 (Dolly)

[†]Correspondence : E-mail : hspark@chinju.ac.kr

의 탄생 이후, 많은 연구자들에 의하여 태아섬유아 세포(fibroblast; Schnieke 등, 1997), 태아피부 및 근육세포(fibro skin and muscle; Vignon 등, 1998), 배아간세포(embryonic stem cell; First 등, 1998) 등을 이용한 복제수정란 및 산자 생산에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 핵이식에 있어서 공여세포(donor cell)로 사용되는 체세포는 태아섬유아세포가 일반적으로 가장 많이 사용되고 있으나, 이외에도 Goto 등(1999)은 난구세포와 난관상피세포를 사용하여 복제수정란을 생산하였으며, Kato 등(2000)은 태아의 피부, 심장, 간, 폐, 유선, 신장, 정소, 혀 등을 공여세포로 사용하였다. Wakayama 등(1998)도 생쥐 난구세포, sertoli 세포 및 neuron 세포를 사용함으로써 다양한 체세포들이 공여세포로서의 이용 가능성을 시사하였다.

이러한 핵이식 기술은 우량동물의 번식, 희귀·멸종위기 동물의 보존, 특정영양물질의 생산, 치료용 생체물질 생산, 장기이식용 동물생산, 질병질환 동물 생산, 세포·유전자치료와 같은 의학적으로 가치를 지니는 장기이식 대체용 동물생산 등 활용 가치가 다양할 뿐만 아니라, 특히 체세포 핵이식 기술을 응용하여 경제적 형질을 지닌 우량돼지의 복제는 양돈가의 소득증대에 기여할 수 있으며, 이 종간의 장기이식시 거부반응에 관여하는 유전자의 조작에 의한 형질전환 복제동물의 생산은 인간의 질병치료 또는 대체장기의 이용이 가능함으로써 축산분야 뿐만 아니라, 의학분야에서도 활용 가치가 매우 높은 기술이다.

돼지는 체외수정과 체외수정란의 배양조건이 다른 포유동물에 비하여 까다로울 뿐만 아니라, 돼지에서 체세포를 이용한 복제수정란 또는 복제동물의 생산은 여러 가지 요인에 의해 영향을 받는다. 즉, 공여세포의 동기화, 세포의 크기, 계대배양, 세포주기의 동기화, 수핵난자의 세포질 성숙시간과 배양액 등이 핵이식 후 복제수정란의 융합과 분할에 많은 영향을 미치기 때문에 복제 돼지의 생산효율은 다른 포유동물에 비하여 매우 낮은 실정이다(Tao 등, 1999). 그러므로 핵이식에 의한 복제 돼지의 생산효율을 높이기 위해서는 공여세포의 세포주기 조절, 복제수정란의 체외발달을 개선, 이식 후 수태율 향상 등 기초연구가 선행되어야

할 것이다.

따라서 본 연구는 복제 돼지의 생산성 향상과 형질전환에 의한 대체장기용 복제 돼지 생산에 기여하기 위한 기초연구로 공여세포의 배양조건, 핵이식 수정란의 융합 및 활성화, 복제수정란의 체외발달에 미치는 각종 요인들을 조사하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공여세포의 채취 및 배양

본 실험에 사용된 귀 유래 공여세포(ear cell)는 생후 10개월 된 Landrace 종 돼지의 귀를 5 × 5mm 정도 절제하여 채취하였으며, 조직을 미세하게 세절하여 0.05% trypsin(Gibco, U.S.A)과 EDTA(Sigma, U.S.A)가 첨가된 D-PBS(Gibco, U.S.A)로 3분간 vortexing을 실시하였다. 10% FBS(Gibco, U.S.A)가 첨가된 TCM-199(Sigma, U.S.A)배양액으로 원심분리를 실시하여 trypsin 과 EDTA를 제거한 다음 10% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 세포를 분리하였다.

분리된 세포는 10% FBS가 첨가된 TCM-199를 25cm² flask(Falcon, U.S.A)에 분주하여 5% CO₂ 98~99% 습도, 39°C 배양기내에서 배양을 실시하였으며, 배양 12시간 후 바닥에 붙지 않은 세포는 제거하고, 신선한 TCM-199 배양액으로 48시간마다 교체하면서 6~8일간 배양을 실시하였다. 계대배양은 공여세포가 flask에서 90% 이상 자랐을 때, 0.05% trypsin과 EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 1/2정도씩 나누어 15회 이상 반복해서 배양을 실시하였다. 계대배양한 공여세포는 10% DMSO(Sigma, U.S.A)가 첨가된 TCM-199 배양액으로 동결 보존해 두고 핵이식에 사용할 때는 39°C 온수에 용해하여 동결보호제를 제거한 다음, 신선한 TCM-199 배양액을 첨가하여 4-well dish(NUNC, Denmark)에 분주하여 배양을 실시하였다. 10% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 배양한 세포가 dish 바닥에 monolayer 형성이 충분히 되었을 때, 0.5% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 기아배양을 실시하였는데, 기아배양은 3일 이상 실시하여 세포주기를 G0 또는 G1 기로 유도한 다음

공여세포로 사용하였다.

2. 수핵난자의 체외성숙

본 실험에 사용된 난포란은 도축장에서 도축되는 성숙모돈 난소의 난포로부터 채취하여 사용하였으며, 채집한 난포란은 난구세포층이 치밀하고 세포질이 양호한 난포란만을 선별하여 박 등(1999)의 방법에 준하여 성숙을 유도하였다. 즉, 회수된 난포란은 체외성숙용 기본배양액 NCSU-23(Wang 등, 1997)에 10% FBS, 10% pFF(porcine follicular fluid), 10 µg/ml LH, 2IU/ml hCG, 1 µg/ml estradiol 17-β, 1 µg/ml FSH 를 첨가하여 5% CO₂와 98~99% 습도가 유지된 39°C 배양기내에서 3시간이상 전 배양을 시킨 다음, 4 well-dish에 well 당 30~40개의 미성숙 난포란을 적하하여 46~48시간동안 배양함으로써 체외성숙을 유도하였다.

3. 핵이식

핵이식에 사용된 pipette은 직경이 1mm인 capillary tube(Narishige, Japan)를 사용하여 보정용(holding) pipette, 탈핵용(enucleation) pipette 및 주입용(injection) pipette을 각각 제작하였다. 보정용 pipette의 외경은 160~180 µm, 탈핵과 주입용 pipette은 외경이 20~30 µm가 되도록 하였다. 제작이 완료된 pipette은 증류수, H₂SO₄ 및 Nonidet P-40(Sigma, U.S.A)으로 세척한 다음, Sigmacote(Sigma, U.S.A)로 실리콘 처리를 한 후 멸균시켜 사용하였다.

체외성숙된 수핵난자를 0.3% hyluronidase(Sigma, U.S.A)가 첨가된 D-PBS에 넣어 난구세포를 제거하고, D-PBS로 3~4회 세척한 다음, 0.05M sucrose(Sigma, U.S.A) 및 10% FBS가 첨가된 D-PBS에서 세포질이 양호하고 극체가 뚜렷하게 보이는 난자만을 선별하여 사용하였다. 핵이식은 D-PBS 배양액 소적(60~80 µl)에 7.5 µg/ml의 cytochalasin B(Sigma, U.S.A)와 0.05M의 sucrose를 첨가하여 수핵난자를 넣은 다음 다른 소적에는 기아배양을 실시한 공여세포를 넣어서 주입용 pipette에 다수의 공여세포를 loading 한 후 수핵난자는 laser로 zona pellucida를 부분적으로 drilling

한 다음 탈핵용 pipette으로 극체와 세포질을 제거하였다. 이때 세포질의 제거는 약 30~40% 정도의 세포질을 흡입함으로써 핵을 제거하였다. 탈핵한 난자는 곧바로 세포질이 제거된 공간에 공여세포를 세포질과 부착되게 주입함으로써 핵이식을 완료하였다.

Laser system(MTM, Switzerland)을 이용한 zona drilling은 Park 등(2001)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, laser system이 부착된 도립현미경하에서 laser 전용 렌즈(×400)로 drilling 할 수핵난자의 투명대를 맞춘 다음 20~30 µsec의 강도로 laser를 1회 부과시킴으로써 zona drilling을 실시하였다. 이때 drilling은 핵이식시 불필요한 배양액의 침투 등을 막기 위하여 zona 두께의 약 60~80%를 drilling 하였다. 공여세포가 주입된 10% FBS가 첨가된 D-PBS로 옮겨 전기융합 전까지 NCSU-23 배양액에서 30분~1시간 배양을 실시하였다.

4. 핵이식 수정란의 융합 및 활성화

핵이식이 완료된 난자의 공여세포와 세포질의 융합은 전기세포융합장치(BTX, U.S.A)로 실시하였다. 이때 융합배지는 0.1mM CaCl₂(Sigma, U.S.A) 및 0.1mM MgCl₂(Sigma, U.S.A)가 첨가된 0.3M Mannitol(Sigma, U.S.A) 용액에 2~3분간 평형을 실시한 다음, 핵이식란을 chamber로 옮겨 양전극사이에 일렬로 주입하여 핵은 전극의 양극(+) 쪽으로 향하게 하고 세포질은 음극(-) 쪽으로 향하게 하여 직류전류(DC) 1.90kv/cm, 30 µsec로 1회 통전하여 세포융합을 유도하였다. 융합이 이루어진 핵이식 수정란의 활성화는 교류전류(AC) 5v/mm 5sec 1회와 직류전류 1.50kv/cm, 30 µsec 1회 전기적 자극으로 활성화를 유도하였다. 활성화가 유도된 핵이식란은 NCSU-23으로 3~4회 세척한 후 10% FBS가 첨가된 NCSU-23에서 배양을 실시하였다.

5. 체외수정 및 배양

체외수정용 기본배양액은 mTBM(Wang 등, 1997)에 2mM caffeine(Sigma, U.S.A)을 첨가하여 milipore filter(0.2 µm)로 여과시켜 멸균하였으며, 세척용 mTBM 용액은 dish에 소적용 만들어

paraffin oil(Sigma, U.S.A.)로 피복하여 CO₂ 배양기내에서 24시간 전배양을 유도하였다. 체외수정용 정액은 정소상체 미부정액을 사용하였으며, 정자의 처리는 기본배양액으로 2~4배 희석한 다음 800xg에서 2회 원심 분리하여 15분간 5% CO₂와 98~99% 습도가 유지된 39°C 배양기 내에 정치하여 활력이 양호한 상층정자만을 채집하여 사용하였다. 최종 정자의 농도는 1~2 ×10⁶/ml이 되게 조정하여 수정용 소적(60~80 μl)에 15 μl의 정자와 난자를 주입하여 체외수정을 유도하였으며, 수정이 완료된 수정란은 NCSU-23 배양액으로 3~4회 세척하여 24 well-dish (Corning, U.S.A)에 넣어 5% CO₂와 98~99% 습도가 유지된 39°C 배양기내에서 48시간마다 신선한 NCSU-23 배양액으로 교환하면서 6~8 일간 체외배양을 실시하여 후기 배로의 발달을 유도하였다.

6. 복제수정란의 체외배양

전기적 활성화를 유도한 복제수정란의 체외배양은 10% FBS가 첨가된 NCSU-23 배양액으로 3~4회 세척하여 60×15mm dish(Corning, U.S.A) 소적에 수정란을 넣어 5% CO₂ 98~99% 습도, 39°C 배양기내에서 48시간마다 신선한 NCSU-23 배양액으로 교환하면서 핵이식 후 6~8일까지 체외배양을 실시하여 후기배로의 발달을 유도하였다.

7. 복제수정란의 활구수 조사

복제수정란의 활구수는 체외배양 후 7~9일째 복제 배반포기 수정란을 Hoechst 33342(Sigma, U.S.A)로 핵염색을 실시하여 조사하였다. 2.3% sodium citrate dihydrate 0.75ml 과 ethanol 0.25ml 및 1mg Hoechst 33342 15 μl를 혼합하여 제조한 염색액을 실리콘 처리한 slide glass에 trypan blue(Sigma, U.S.A.) 15 μl를 떨어뜨려 소적액을 만들어 수정란을 3~4분간 소적내에 두었다가 trypan blue를 완전히 제거한 다음 Hoechst 33342 염색액을 15 μl 가하여 3~5분간 정치 후 Hoechst 33342 염색액만을 제거한 다음 곧바로 polymount (Polyscience, U.S.A) 20 μl를 떨어뜨린 후 cover glass를 덮어 형광현미경(x200)하에서 핵 수를 조

사하였다.

8. 통계학적 분석

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

결과 및 고찰

1. 기아배양기간에 따른 핵이식 수정란의 융합율과 분할율

핵이식을 위하여 공여세포의 세포주기동기화(G0/G1)를 유도하고자 0.5% serum을 첨가한 TCM-199 배양액으로 기아배양(serum-starvation)을 실시하였을 때 기아배양기간에 따른 핵이식 수정란의 융합율과 분할율은 Table 1에서 보는 바와 같다.

공여세포의 기아배양을 3~4 및 5~6일간 실시하여 핵이식 후 DC 1.90kv/cm, 30 μsec 1회의 전기 자극으로 융합을 실시하였을 때 핵이식 수정란의 융합율은 각각 45.6 및 36.8%로써 기아배양 기간에 따른 유의적인 차이가 없었고, 기아배양한 공여세포는 기아배양을 하지 않았을 때(N-S) 46.1%의 융합율과도 유의적인 차이가 없었다. 융합 및 활성화가 유지된 핵이식 수정란의 분할율은 3~4일간

Table 1. Effect of serum-starvation treatment period on fusion and cleavage rates of nuclear transferred oocytes in porcine somatic cell NT**

Days of serum starvation	No. of oocytes used	No. of oocytes fused(%)	No. of oocytes cleaved(%)
N-S*	154	71(46.1) ^a	36(50.7) ^a
3~4	160	73(45.6) ^a	49(67.1) ^b
5~6	152	56(36.8) ^a	32(57.1) ^{ab}

* N-S : Nonserum-starvation

** NT : Nuclear transfer

*** Values with same superscripts in the same column were not significantly(P<0.05) different.

기아배양을 실시한 공여세포가 67.1%로써 가장 높게 나타났으며, 5~6일간 기아배양을 실시한 공여세포의 57.1%와는 유의적($P < 0.05$)인 차이가 없었다. 그러나 N-S의 50.7% 보다는 유의적($P < 0.05$)으로 높은 분할율을 나타내었다.

Verma 등(2000)은 돼지 태아섬유아세포유래 공여세포를 cycling과 기아배양을 실시하여 핵이식 후 1.5kV/cm, 60 μ sec 2회의 전기자극으로 융합을 실시하였을 때 융합율은 각각 81 및 77%로써 이들간에 차이는 없었으나, 본 연구결과보다는 다소 높은 융합율을 나타내었다. 이러한 차이는 공여세포의 종류와 전기융합 조건의 차이에 기인한 것으로 생각된다. 또한 Kühholzer 등(2001)도 돼지 태아섬유아세포유래 공여세포를 cycling과 기아배양 후 핵이식란을 2.6kV/cm, 30 μ sec 2회의 전기자극에 의한 융합율은 각각 58 및 62%로써 본 연구결과보다는 다소 높은 성적이었으나, 활성화를 융합조건과 같은 방법으로 실시하였을 때 핵이식란의 분할율은 각각 38%와 44%로써 본 연구결과보다는 낮은 경향이었다. Dinnyes 등(2001)도 토끼에서 핵이식에 사용한 공여세포(귀 세포유래)의 기아배양여부(75% : 80%)에 따른 융합(2.4kV/cm, 60 μ sec)율은 유의적인 차이는 없었으며, 전기적 자극에 의한 활성화 후 분할율은 각각 49 및 71%로써 본 연구결과보다 다소 낮은 분할율을 나타내었다. Hill 등(2000)의 연구보고에서 소의 adult cell을 공여세포로 이용한 핵이식 수정란의 전기융합(1.6kV/cm, 20 μ sec 2회) 후 기아배양 여부에 따른 융합율은 각각 58 및 60%로써 차이가 없었다.

이상의 결과를 볼 때 공여세포의 기아배양 여부는 융합율보다는 분할율에 더 많은 영향을 미치며, 공여세포의 기아배양여부 보다는 융합조건과 활성화 방법이 직접적인 영향을 미치는 것으로 생각된다. 체세포 핵이식에 있어서 사용한 동물의 종류, 공여세포의 종류, 융합방법, 활성화방법 등이 연구자들에 따라서 많은 차이가 있지만, 본 연구 결과로부터 공여세포를 N-S 상태보다는 기아배양을 3~6일 정도 실시한 후 핵이식에 사용하는 것이 융합율과 분할율을 높이는데 바람직한 것으로 생각된다.

2. 계대배양에 따른 핵이식 수정란의 융합과 분할율

핵이식에 있어서 공여세포를 10% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 증식시켰을 때 계대배양(passage)에 따른 핵이식 수정란의 융합율과 분할율은 Table 2에서 보는 바와 같다.

공여세포를 1~2, 5~6 및 13~14대 계대배양한 것을 사용하여 핵이식 후 전기자극(1.90kV/cm, 30 μ sec 1회)으로 융합을 실시하였을 때 핵이식 수정란의 융합율은 각각 52.7, 53.0 및 51.7%로써 계대배양에 따른 유의적인 차이가 없었다. 융합이 이루어진 핵이식 수정란을 융합 후 1시간 뒤에 전기자극에 의한 활성화(AC 5v/mm, 5sec 1회)를 유도하였을 때 1~2, 5~6 및 13~14대 계대배양한 공여세포의 분할율은 각각 42.7, 46.8 및 45.5%로써 유의적인 차이가 없었다.

Hill 등(2001)은 소 태아섬유아세포유래 공여세포를 2대와 18대 계대배양한 세포를 이용한 핵이식란의 전기자극(1.6kV/cm, 20 μ sec 2회) 후 융합율은 각각 60%와 55%로써 계대배양에 따른 유의적인 차이는 없었으나, 본 연구결과보다는 다소 높은 융합율을 보였다. 정 등(2000)은 소 태아섬유아세포유래 공여세포를 4, 5 및 6대 계대배양을 실시한 핵이식 수정란의 전기자극(1.25kV/cm, 70 μ sec 1회) 후 융합율은 각각 69.6, 73.1 및 72.6%로써 계대배양에 따른 융합율에는 차이가 없었으며, 융합란의 화학적(Ca^{2+} ionophore와 cycloheximide) 활성화

Table 2. Effect of the number of cell passage on fusion and cleavage rates of nuclear transferred oocytes in porcine somatic cell NT*

No. of Passages	No. of oocytes used	No. of oocytes fused(%)	No. of oocytes cleaved(%)
1 ~ 2	131	69(52.7) ^a	56(42.7) ^a
5 ~ 6	149	79(53.0) ^a	37(46.8) ^a
13~14	149	77(51.7) ^a	35(45.5) ^a

* NT : Nuclear transfer

** Values with same superscripts in the same column were not significantly($P < 0.05$) different.

화 후 분할율은 각각 84.6, 92.1 및 79.3%로써 계대배양이 핵이식 수정란의 분할율에 영향을 미친다고 하였다. 상기의 연구결과와 본 연구의 상이한 성적은 동물 종의 차이, 공여세포의 종류, 융합과 활성화 방법 등의 차이에 기인하는 것으로 생각된다. Urakawa 등(2001)도 소에서 공여세포를 13일과 20일간 배양한 세포를 이용하였을 때 융합율은 각각 79.3%와 60.0%였으며, 활성화(Ca^{2+} ionophore와 cycloheximide) 후 분할율은 각각 59.8%와 72.6%로써 공여세포의 배양기간에 따라 유의적($P<0.05$)인 차이가 있었다고 하였다. 이상의 결과로 볼 때 공여세포의 계대배양이 융합율과 분할율에 영향을 미치기보다는 융합 및 활성화 방법에 의한 영향이 더 클 것으로 생각된다.

3. 공여세포의 크기에 따른 핵이식 수정란의 융합과 분할율

기아배양한 공여세포를 trypsin과 EDTA가 첨가된 D-PBS 배양액으로 분리한 후 single cell로 처리하여 핵이식을 실시하였을 때 공여세포의 크기가 핵이식 수정란의 융합율과 분할율에 미치는 영향은 Table 3에서 보는 바와 같다.

25 $\mu m \geq$ 크기의 공여세포를 사용하였을 때 핵이식 수정란의 융합율은 65.3%로써 25~30 및 30 $\mu m \leq$ 크기 공여세포의 융합율은 각각 42.5 및 45.5% 보다는 유의적($P<0.05$)으로 높게 나타났다. 융합과 활성화가 유기된 핵이식 수정란의 분할율은 25 $\mu m \geq$, 25~30 μm 및 30 $\mu m \leq$ 크기에서 각

각 56.5, 68.8 및 58.5%로써 공여세포의 크기에 따른 분할율은 유의적($P<0.05$)인 차이가 없었다.

황 등(1999)은 한우 태아섬유아세포유래 공여세포를 20 $\mu m \geq$, 20~40 μm 및 40 $\mu m \leq$ 크기를 사용한 핵이식 수정란의 융합율은 각각 50.0, 52.3 및 67.2%로써 공여핵의 크기가 융합율에 영향을 미치지 않는다고 하였으며, 본 연구결과도 유사한 경향이다. 융합이 이루어진 핵이식 수정란을 활성화(ionomycin + 6-DMAP)처리 후 분할율은 40 $\mu m \leq$ 크기의 공여세포가 51.2%로써 20 $\mu m \geq$ 및 20~40 μm 크기를 공여세포로 사용하였을 때 분할율 각각 76.7 및 73.5% 보다는 유의적($P<0.05$)으로 낮았으며, 또한 공여세포의 크기가 핵이식 수정란의 체외발달율에도 영향을 미친다고 하였다. 이와 같은 성적은 본 연구결과와 상반되는 성적으로써 공여세포로 사용한 세포의 종류, 융합과 활성화방법 등의 차이에 의한 것으로 생각된다.

이상의 결과로 미루어 볼 때 공여세포의 크기는 20~30 μm 크기가 융합율, 분할율 및 체외 발달율을 높이는데 적합한 것으로 생각된다. 핵이식을 위한 미세조작시 수핵난자의 극체와 핵제거를 목적으로 세포질 제거에 의한 위란강과 공여세포의 크기가 접촉이 용이하도록 적정 크기일수록 융합율이 높은 것으로 분석된다. 그러나 공여세포의 크기가 분할율에 직접적인 영향을 미치는지는 알 수 없으며, 이 부분에 대한 연구가 체계적으로 이루어진다면 복제수정란의 생산효율성 제고측면에서 크게 기여할 것으로 생각된다.

4. 핵이식 수정란의 체외발달

돼지 섬유아세포유래 공여세포를 사용하여 핵이식을 실시하였으며, 핵이식 수정란을 NCSU-23 배양액으로 7~9일 동안 체외배양을 실시하여 배반포기로의 발달율과 배반포기 수정란의 활구수를 조사한 성적은 Table 4에서 보는 바와 같다.

체외수정란과 체세포 핵이식 수정란의 발달에 있어서는 분할율이 각각 80.1%와 64.0%로써 핵이식 수정란이 체외수정란 보다 낮았으나($P<0.05$), 후기배로의 발달에 있어서는 상실배가 각각 26.8%와 15.7%로써 차이가 없었고, 배반포기로의 발달에 있어서는 각각 12.4%와 10.5%로써 차이가 없

Table 3. Effect of donor cell size on fusion and cleavage rates of nuclear transferred oocytes in porcine somatic cell NT*

Donor cell size	No. of oocytes used	No. of oocytes fused(%)	No. of oocytes cleaved(%)
25 $\mu m \geq$	95	62(65.3) ^a	35(56.5) ^a
25~30 μm	106	45(42.5) ^b	31(68.8) ^a
30 $\mu m \leq$	90	41(45.5) ^b	24(58.5) ^a

* NT : Nuclear transfer

** Values with same superscripts in the same column were not significantly($P<0.05$) different.

Table 4. *In vitro* development of cloned embryos by nuclear transfer of porcine somatic cell

Embryos	No. of oocytes	No. of cleaved oocytes	No of embryos developed to(%)			No. of nuclei (Mean \pm SEM)
			4-cell	Morula	Blastocyst	
Parthenotes	48	41(85.4) ^a	34(82.9) ^a	15(36.6) ^a	2(4.9) ^a	16.0 \pm 4.0 ^b
IVF	181	145(80.1) ^a	86(59.3) ^b	39(26.8) ^{ab}	18(12.4) ^a	28.5 \pm 2.8 ^a
NT	89	57(64.0) ^b	47(82.4) ^a	9(15.7) ^b	6(10.5) ^a	18.6 \pm 2.1 ^b

* Values with same superscripts in the same column were not significantly(P<0.05) different.

었다. 배반포기 수정란의 할구수는 체외수정란이 28.5 \pm 2.8개로써 핵이식 수정란과 단위발생란의 각각 18.6 \pm 2.1 및 16.0 \pm 4.0 개보다 유의적(P<0.05)으로 많았다.

Tao 등(1999)은 돼지 태아섬유아세포를 공여세포로 이용한 핵이식 수정란을 NCSU-23 배양액으로 배양을 실시하였을 때 배반포로의 발달율은 3%(상실배 포함 44.4%), 단위발생란은 18.3%, 배반포기 수정란의 할구수도 각각 15개와 19.3 \pm 10.8 개이었다고 보고하였다. Onishi 등(2000)은 핵이식 수정란을 NCSU-23 배양액으로 체외배양을 실시하였을 때 배반포기로의 발달율은 31.2%로써 BECM-3 및 mWM 배양액을 사용하였을 때는 15.2 및 4.0% 보다 유의적(P<0.001)으로 높게 나타남으로써 배양액의 종류가 체외발달율에 영향을 미친다고 하였다. Koo 등(2000)은 돼지 핵이식 수정란을 NCSU-23 배양액에서 배반포기로의 발달율은 9.4 \pm 0.9%로써 체외수정란과 단위발생란의 21.4 \pm 1.9 및 22.4 \pm 7.2% 보다 낮았다고 하였으며, 배반포기 수정란의 할구수에 있어서도 체외수정란이 36.2 \pm 9.7 개로써 핵이식 수정란의 28.9 \pm 11.5 개보다 유의적(P<0.05)으로 많았다. Park 등(2001)은 granulosa cell 을 공여세포로 사용하였을 때 핵이식 수정란의 배반포로의 발달율은 4.9 \pm 2.4%로써 단위발생란의 26.8 \pm 3.8% 보다 유의적(P<0.05)으로 낮았으며, 할구수도 각각 15.7 \pm 5.7 및 23.5 \pm 24.7 개로써 핵이식 수정란의 발달율은 본 연구결과보다 저조한 성적이었다.

이상의 결과로 볼 때 돼지 핵이식 수정란이 체외수정란이나 단위발생란에 비하여 배반포기로의 발달율과 할구수가 낮았으며, 소나 다른 동물의 핵

이식 수정란의 발달율에 비하여 매우 낮은 경향을 나타내었는데, 이러한 차이는 동물종의 차이에 의한 것일 수 있으며, 복제 수정란의 발달율을 높이기 위해서는 적정 공여세포의 조건, 융합 및 활성화 방법, 배양액 조건 등의 확립이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

적 요

본 연구는 복제 돼지의 생산성 향상과 형질전환에 의한 대체상기용 복제 돼지 생산에 기여하기 위한 기초연구로 공여세포의 조건, 핵이식 수정란의 융합 및 활성화와 체외발달에 미치는 각종 요인들을 조사하였다. 공여세포는 생후 10개월 된 Landrace 종으로부터 귀 세포조직(5 \times 5mm)을 채취하여 0.05%의 trypsin과 EDTA가 첨가된 D-PBS로 세포를 분리하여 10% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 계대배양을 실시하여 사용하였다. 핵이식은 laser system 으로 투명대를 drilling하여 수핵난자의 극체와 핵을 제거한 후 공여세포를 주입하였으며, 핵이식란은 DC 1.9kv/cm, 30 μ sec 1회의 전기자극으로 융합과 1시간 후 AC 1.50kv/cm, 30 μ sec 1회의 조건으로 활성화를 실시하여 분할을 유도하였다. 분할된 핵이식 수정란은 10% FBS가 첨가된 NCSU-23 배양액으로 CO₂ 배양기에서 6~8일 동안 체외배양을 실시하여 배반포기로 발달한 수정란을 Hoechst 33342로 핵염색을 하여 할구수를 조사하였다.

공여세포의 기아배양을 3~4 및 5~6 일간 실시하여 핵이식 후 전기자극으로 융합을 실시하였을 때 융합율은 각각 45.6 및 36.8%로써 기아배양 기

간에 따른 차이는 없었다. 융합 및 활성화가 유기된 핵이식란의 분할율은 3~4일간 기아배양을 실시한 공여세포가 67.1%로써 가장 높았으며($P < 0.05$), 5~6일간 기아배양을 실시한 공여세포의 57.1%와는 차이가 없었다. 공여세포를 1~2, 5~6 및 13~14대 계대배양한 것을 사용한 핵이식란의 융합율은 각각 52.7, 53.0 및 51.7%로써 차이가 없었다. 융합이 이루어진 핵이식란을 활성화를 유도했을 때 1~2, 5~6 및 13~14대 계대배양한 공여세포의 분할율도 각각 42.7, 46.8 및 45.5%로써 차이가 없었다. $25 \mu\text{m} \geq$ 크기의 공여세포를 사용하였을 때 핵이식란의 융합율은 65.3%로써 $25 \sim 30 \mu\text{m}$ 및 $30 \mu\text{m} \leq$ 크기 공여세포의 융합율 42.5 및 45.5% 보다는 유의적($P < 0.05$)으로 높았다. 융합과 활성화가 유기된 핵이식란의 분할율은 $25 \mu\text{m} \geq$, $25 \sim 30 \mu\text{m}$ 및 $30 \mu\text{m} \leq$ 크기에서 각각 56.5, 68.8 및 58.5%로써 공여세포의 크기에 따른 분할율은 유의적인 차이가 없었다. 체외수정란과 체세포 핵이식 수정란의 발달에 있어서는 분할율이 각각 80.1%와 64.0%로써 핵이식 수정란이 체외수정란보다 낮았으나, 배반포기로의 발달율에 있어서는 각각 12.4%와 10.5%로써 차이가 없었다. 배반포기 수정란의 할구수는 체외수정란이 28.5 ± 2.8 개로써 핵이식 수정란과 단위발생란의 18.6 ± 2.1 및 16.0 ± 4.0 개보다 유의적($P < 0.05$)으로 많았다.

이상의 결과를 볼 때 공여세포의 기아배양기간은 3~6일 정도 실시한 후에 핵이식에 사용하는 것이 융합율과 분할율을 높이는데 바람직하고, 공여세포의 크기는 $20 \sim 30 \mu\text{m}$ 가 적합하며, 복제 수정란의 발달율을 높이기 위해서는 적정 공여세포의 조건, 융합 및 활성화방법, 배양액 조건 등의 확립이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

참고문헌

- 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.
- First NL, Sims MM, Park SP and Kent-First MJ. 1994. Systems for production of calves from cultured bovine embryonic cells. *Reprod. Fert. Dev.*, 6:553-562.
- Goto Y, Kaneyama K, Kobayashi S, Imai K, Shin-Noh M, Tsujino T, Nakano T, Matsuda S, Nakane S and Kojima T. 1999. Birth of cloned calves derived from cultured oviductal epithelial cells of a dairy cow. *Anim. Sci. Japan*, 70:243-245.
- Hill JR, Winger QA, Long CR, Looney CR, Thompson JA and Westhusin ME. 2000. Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Biol. Reprod.*, 62:1135-1140.
- Hill JR, Winger QA, Burghardt RC and Westhusin ME. 2001. Bovine nuclear transfer embryo development using cells derived from a cloned fetus. *Anim. Reprod. Sci.*, 67:17-26.
- Kato Y, Tani T and Tsunoda Y. 2000. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J. Reprod. Fertil.*, 120:231-237.
- Koo DB, Kang YK, Choi YH, Park JS, Han SK, Park IY, Kim SU, Lee KK, Son DS, Chang WK and Han YM. 2000. *In vitro* development of reconstructed porcine oocytes after somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 63:986-992.
- Kühholzer B, Hawley RJ, Lai L, Simonds DK and Prather RS. 2001. Clonal lines of transgenic fibroblast cells derived from the same fetus result in different development when used for nuclear transfer in pigs. *Biol. Reprod.*, 64:1695-1698.
- Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H and Perry ACF. 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 289:1188-1190.
- Park HS, Jin JI, Hong SP, Lee JS and Jung JY. 2001. Effects of laser drilling on blastocyst hatching and pregnancy rates from *in vitro* produced cattle embryos. *Theriogenology*, 55:

- 352(abstract).
- Park KW, Kühholzer B, Lai L, Machaty Z, Sun QU, Day BN and Prather S. 2001. Development and expression of the green fluorescent protein in porcine embryos derived from nuclear transfer of transgenic granulosa-derived cells. *Anim. Reprod. Sci.*, 68:111-120.
- Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scoot AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A and Campbell KHS. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 278:2130-2133.
- Tao T, Machaty Z, Boquest AC, Day BN and Prather RS. 1999. Development of pig embryos reconstructed by microinjection of cultured fetal fibroblast cells into *in vitro* matured oocytes. *Anim. Reprod. Sci.*, 56:133-141.
- Urakawa M, Uruno K, Ideta A and Aoyagi Y. 2001. Effect on the development of bovine embryos by nuclear transfer using different cultured days of fetal fibroblast. *Theriogenology*, 55:294(abstract).
- Verma PJ, Du ZT, Crocker L, Faast R, Grupen CG, Mcilpatrick SM, Ashman RJ and Lyons IG. 2000. *In vitro* development of porcine nuclear transfer embryos constructed using fetal fibroblasts. *Mol. Reprod. Dev.*, 57:262-269.
- Vignon X, Chesne P, LeBourhis D, Heyman Y and Renard JP. 1998. Developmental potential of bovine embryos reconstructed with somatic nuclei from cultured skin and muscle fetal cells. *Theriogenology*, 49:392.
- Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR and Yanagimachi R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 393:369-373.
- Wang WH, Abeydeera LR, Canley TC and Day BN. 1997. Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by *in vitro* fertilization. *J. Reprod. Fertil.*, 111: 101-108.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ and Campbell KHS. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385:810-813.
- 박성원, 홍승표, 진종인, 이지산, 정장용, 박희성. 1999. 돼지 난포란의 체외수정 및 체외발달에 관한 연구. *한국수정란이식학회지*, 14:185-193.
- 정희태, 권대진, 박연수, 황환섭, 박춘근, 양부근, 김정익. 2000. 소 태아섬유아세포 유래 복제란의 발육능에 관한 연구. *한국가축번식학회지*, 24:49-57.
- 황우석, 박종업, 조종기, 김기연, 신수정, 용환율, 이병천. 1999. 복제 한우 생산을 위한 Bovine Fetal Fibroblasts의 이용에 관한 연구:공여핵원의 배양기간 및 세포 크기가 핵이식의 효율에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지*, 14:93-97.

(접수일: 2001. 10. 9/ 채택일: 2001. 11. 29)