

외래유전자 도입정자를 이용한 돼지 체외성숙 난포란의
Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) 후 후기배로의 발달율과
외래유전자의 발현에 관한 연구

조성근·정기화[†]
경상대학교 농업생명과학연구원

**Development and Expression of Porcine Embryos by
Direct Injection of Sperm Treated with Exogenous DNA**

S. K. Cho and K. H. Chung[†]

*Institute of Agriculture and Life Sciences, Gyeongsang National University, Jinju, 660-701,
Republic of Korea*

SUMMARY

The main goal of this study was to produce transgenic porcine embryos by direct injection of sperm-mediated exogenous DNA. Spermatozoa (6×10^6 sperms of final concentration) were mixed with pcDNA LAC Z (20 ng/ μ l) and subjected into electroporation (300~750 volts, 25 μ F, 0.4 cm electrode). After sperm injection, the oocytes were activated electrically (1.7 KV/cm, 30 μ sec, single pulse) in 0.3 M mannitol solution or not. The sperm injected eggs were cultured in NCSU 23 medium (0.4% BSA) at 39°C, 5% CO₂ in air for 144 h. The rates of cleavage and development into blastocyst stage in activation group were significantly higher than those of non-activation group (79.6% and 24.1% vs. 46.3% and 14.4%, respectively, $P < 0.05$). Control oocytes and shame injection were developed to blastocysts low (2.5%). Sixty five (27.1%) out of 240 embryos observed in activation and non-activation groups were showed positive by X-gal staining. However, all embryos in both groups were expressed partial or mosaic pattern.

These results suggested that electrical stimulation for oocytes activation after sperm injection enhances the incidence of both fertilization and development following sperm injection in the pig. Our study also suggested that sperm-mediated transfer of exogenous DNA by ICSI would be used as a valuable tool for the production of transgenic porcine embryos.

(Key words : ICSI, activation, sperm-mediated gene transfer, porcine)

서 론

형질전환동물을 생산하기 위하여 사용한 일반적인 방법으로는 pronuclear injection (Hammer 등, 1985), retroviral vector (Kim 등, 1993), sperm vec-

tor (Spadafora, 1998; Huguet와 Esponda, 1998; Kim 등, 1997; Lavitrano 등, 1989) 그리고 somatic cell nuclear transfer (Cibelli 등, 1998; Schnieke 등, 1997) 등이 있으며, 이 중 형질전환동물 생산에 있어서 쉽게 이용할 수 있는 방법 중의 하나로 sperm-mediated gene transfer 방법이 개발되었다. 모든

[†]Correspondence : kchung@gshp.gsnu.ac.kr

종의 sperm cells은 단백질과 DNA를 binding하는 성질을 갖고 있어(Lavitrano 등, 1989; Brackett 등, 1971), 정자를 외래유전자를 매개하는 vector로 사용하여 정상 체외수정이나 ICSI (intracytoplasmic sperm injection, 세포질내정자주입법)를 통하여 난자에 도입하는 것이 가능하기 때문이다. 정자에 외래유전자를 binding하기 위한 방법으로는 liposome 처리법(Bachiller 등, 1991), electroporation법(Horan 등, 1992; Gagne 등, 1991), Triton X-100처리법(Kurataka 등, 1996), freeze-thawing법(Wakayama 등, 1998), Freeze-dry법(Wakayama와 Yanagimachi, 1998) 및 sperm/DNA 공배양법 (Chan 등, 2000b; Lavitrano 등, 1989) 등이 주로 이용되고 있다.

Perry 등(1999)은 mouse에서 정자와 외래유전자를 각각 Triton X-100 처리법(Kuretake 등, 1996), freeze-thawing 처리법(Wakayama 등, 1998) 및 Freeze-dry 처리법(Wakayama와 Yanagimachi, 1998)으로 준비한 후 ICSI를 통해 각각 6마리, 2마리, 3마리의 형질전환 mouse생산에 성공하였다. 그러나, Chan 등(2000b)은 Rhesus monkey를 이용하여 sperm/DNA co-incubation 처리법으로 외래유전자를 흡착(binding)한 정자를 ICSI에 의한 방법으로 산자생산에는 성공하였으나, 외래유전자의 발현은 단지 체외수정란 상태에서만 발현되었고, 생산된 산자에서는 발현되지 않았다고 보고하였다.

최근 돼지에서는 체외성숙 난자를 이용하여 ICSI를 통한 체외수정란의 발달율을 보고하였고(Di Bernardino 등, 2001; Lee 등, 2001; Kolbe와 Holtz, 1999; Kim 등, 1998, 1999), Kolbe와 Holtz (2000) 그리고 Matrin (2000)은 체내성숙 난자를 이용한 ICSI후 체외수정란을 이식하여 산자생산에 성공하였다고 보고하였다. 그러나, 지금까지 돼지에서 성숙된 난자를 이용하여 ICSI에 의한 산자생산과 sperm-mediated gene transfer에 의한 ICSI후 산자를 생산하였다는 보고는 없었다.

따라서 본 연구는 sperm-mediated gene transfer를 이용하여 ICSI에 의한 형질전환동물생산의 기초자료로서 활용하기 위하여, ICSI에 사용할 정자를 electroporation 처리법(Gagne 등, 1991)으로 외래유전자(Reporting-encoding DNA, pcDNA Lac)를 도입하여 ICSI을 실시하였으며, ICSI 후 추가

전기자극을 통한 난자의 활성화를 유도함으로써 수정율 및 후기배로의 발달율을 향상시키고, 그에 따른 외래유전자의 발현 여부를 조사하기 위하여 X-Gal 염색을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 배양액

체외성숙용 배양액은 NCSU 23 배양액에 10% 난포액, 0.1mg/ml cysteine, 0.01 μ g/ml EGF, 10 IU/ml eCG 그리고 10 IU/ml hCG를 첨가하여 제조하였다. 체외배양액은 NCSU 23 배양액에 0.4% BSA를 첨가하여 사용하였다. 돼지 난포액은 2~7mm 크기의 난포에서 난포액을 채취하여 1,900 \times g로 3회 원심분리하고, 최종 0.2 μ m 필터로 거른 후 -20 $^{\circ}$ C 냉장고에 보관하여 사용하였다.

2. 난포란의 채란

본 실험에 공시된 난소는 도축장에서 도살직후 난소를 적출하여 penicillin G (100 units/ml)와 streptomycin (100 μ g/ml)이 함유된 생리식염수(30~35 $^{\circ}$ C)가 들어있는 보온병에 담아 3~4시간 내에 실험실로 운반하였고, 18-G needle이 부착된 20 ml 주사기를 이용하여 2~7mm의 가시난포를 흡입하여 난포란을 채란하였다. 난포란의 채취시 사용된 배양액은 0.1 mg/ml PVA가 첨가된 TALP-HEPES (Prather 등, 1995)를 사용하였다. 흡입된 난포액은 5~10 분간 정지시킨 후 침전된 하부액을 5 ml의 피펫으로 흡입하여 직경 60mm 배양접시에 옮겨 40 \times 배율의 도립현미경(Olympus Co., Japan)에서 난포란을 수집한 후 체외성숙용 기본배양액 NCSU 23으로 4~5회 세척하면서 선별하였다. 난포란의 선별은 난구세포의 부착정도와 세포질의 충실도에 따라 실시하였으며, 최소한 2층 이상의 난구세포층으로 되어 있고, 세포질이 균일하고 충실한 것을 선별하여 실험에 공시하였다.

3. 난포란의 체외성숙

난포란의 체외성숙은 체외성숙용 배양액을 35mm dish (Nunc, Denmark)에 100 μ l씩 drop 분주하여 18시간 이상 전 배양을 실시하여 평형을 유도한

다음, 체외성숙용 배양액에 난구세포가 2층 이상이고 세포질이 충실한 15~20 개의 난포란을 넣고 5% CO₂, 98~99% 습도, 39°C CO₂ incubator에서 20~22시간 동안 호르몬이 첨가된 체외성숙용 배양액에서 배양하고, 다음 20~22시간은 호르몬이 첨가되지 않은 배양액에서 배양하여 총 40~44시간 동안 배양하였다.

4. 정자의 준비

정자의 준비는 신선정액, 액상정액 및 동결정액을 각각 이용하여 Swim-up방법으로 2.5 mM caffeine과 0.4% bovine serum albumin (BSA)이 첨가된 modified Tris-buffered medium으로 활력이 높은 정자를 채취하기 위하여 5% CO₂, 98~99% 습도, 39°C CO₂ incubator에서 실시하였다. Swim-up의 유도는 15 ml conical plastic tube에 농후정자와 체외수정용 배양액이 층을 이루도록 하기 위해서 tube의 아래층에 정자를 넣고 그 위의 층에 modified Tris-buffered medium을 섞이지 않도록 조심스럽게 분주한 후 45의 각도로 눕혀서 1시간 동안 활력 정자의 부유를 유도하였다. Swim-up을 유도하여 부유된 상층액의 정자를 채취한 후 500×g에서 2회 5분간 원심분리하여 정자를 세척하였다.

5. 정자와 외래유전자의 처리

정자와 함께 이용될 외래유전자 (Reporting-encoding DNA)는 β-galactosidase가 포함된 pcDNA LacZ 유전자를 사용하였다. 정자와 외래유전자를 처리하는 방법에 있어서 대조군으로서 0.6 ml TALP medium (0.6% fatty acid-free BSA)에 정자(6×10^6 sperms/ml)와 외래유전자(600 ng)를 30분 동안 공동배양하는 방법을 사용하였으며(Parrish 등, 1986), 실험군으로서는 같은 배양액에 정자(6×10^6 sperms/ml)와 외래유전자(600 ng)를 4 mm 간격의 전극으로 구성된 1.4 ml Gene Pulser Cuvette (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)에 넣어 300~750 V, 25 μF, 0.25 sec의 Gene Pulser Apparatus (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)에서 처리하였다 (Rieth 등, 2000; Gagne 등, 1991).

6. Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI)용 난자의 준비

40~44시간 체외성숙된 난자는 난구세포를 제거하기 위하여 0.1% hyaluronidase가 첨가된 D-PBS 배양액으로 vortexing 및 repipetting한 후, 제1극체가 선명하게 나타나고 세포질이 균질한 난자를 선별하여 사용하였다.

7. Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI)

외경 1mm capillary tube (Narishige Co., Japan)를 이용하여 정자주입용 pipette은 내경 6~7 μm, 외경 8~9 μm로 제작하여 사용하였으며, 난자고정용 pipette은 외경이 100~120 μm로 조절하였고 내경은 10~15 μm로 제작하여 사용하였다.

세포질내 정자의 주입은 micromanipulator (Narishige Co., Japan)가 부착되어 있는 200배 도립현미경(Nikon Co., Japan)을 이용하여 Kim 등(1998)의 방법을 약간 수정하여 이용하였다. 10% polyvinylpyrrolidone (PVP)이 첨가된 10 μl 정자용 D-PBS drop에서 정자의 꼬리를 먼저 주입용 pipette으로 흡인하여 0.4% BSA가 첨가된 20 μl 난자용 D-PBS drop으로 이동하였다.

체외성숙된 난자의 난구세포를 제거하여 도립현미경의 stage 위에 준비된 0.4% BSA가 첨가된 ICSI용 D-PBS drop으로 옮겨 제1극체가 6시 또는 12시 방향으로 향하게 하여 고정용 pipette으로 난자를 고정시킨 후, 정자가 들어있는 주입용 pipette을 고정된 난자의 적도 부근(3시 방향) 약간 아래에서 난자의 세포질 속으로 진입시킨 다음 세포질의 내용물을 약간 흡인하여 정자용 pipette의 진입 여부를 확인한 후 흡인된 세포질의 내용물과 함께 정자를 세포질 속으로 진입시켰다. 이때 정자를 진입시키고 동시에 10% polyvinylpyrrolidone (PVP)이 첨가된 정자용 D-PBS 배양액의 최소량을 함께 주입한 후 주입용 pipette을 빨리 후퇴시켰다.

Shame injection 방법은 주입용 pipette에 정자를 흡인·장착하는 과정을 제외한 모든 과정은 ICSI와 동일한 방법으로 실시하였다.

8. ICSI 후 난자의 활성화와 체외수정란의 체외배양

ICSI 후 난자는 두 그룹으로 나누어 전기적 활성화를 실시한 군과 실시하지 않은 군으로 나누었

으며, 전기적 자극은 BTX Electro Cell Manipulator (Biotechnologies and Experimental Research, Inc., San Diego, CA)를 이용하여 85 V, 30 μ sec, 1 pulse에서 실시하였다. 두 그룹은 각각 0.4% BSA가 첨가된 체외배양액 NCSU 23에 3~4회 세척한 후 20~30개의 수정란을 50 μ l drop에 넣어 39°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 수정 후 48시간에 수정율을 조사하였으며, 144~168시간까지 배반포기 상태의 수정란을 조사하였다.

9. 체외수정란의 외래유전자 발현을 조사

체외수정란의 pcDNA LacZ 유전자 발현 유·무를 확인하기 위하여 ICSI후 72~144 시간동안 배양된 체외수정란을 5 mg/ml BSA가 첨가된 D-PBS액으로 3~4회 세척하여 1%(v/v) formaldehyde, 0.2%(v/v) glutaraldehyde와 5 mg/ml BSA가 첨가된 D-PBS (pH 7.6) 고정액으로 4°C에서 15분간 고정시킨 후 D-PBS액으로 3~4회 세척한 다음, 1 mg/ml의 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside (X-gal)이 첨가된 X-Gal staining용액으로 옮겨 39°C incubator에서 배양하였다. 배양 후 5시간부터 광학현미경하에서 pcDNA Lac Z 유전자의 발현 유·무를 확인하였다(Tsukui 등, 1996).

10. 통계학적 분석

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

결과 및 고찰

1. 정자의 조건에 따른 ICSI처리된 체외수정란의 발달

ICSI에 이용될 정자의 조건에 따른 정자의 주입 후 수정율과 배발달율을 비교·조사한 결과는 Table 1과 같다. 정소상체미부정자(epididymal spermatozoa), 사출정자(ejaculated spermatozoa) 및 동결정자(frozen-thawed spermatozoa) 각각을 ICSI에 공여한 후의 수정율은 각각 72.3%, 64.1% 및 74.1%로 나타나 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 또한 후기배로의 발달율에 있어서도 각각 17.6%, 18.7% 및 15.0%로 나타나 각 처리군간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

지금까지 ICSI에 사용된 정자는 정소상체미부정자(Di Berardino 등, 1999), 사출정자(Martin, 2000; Kolbe와 Holtz, 1999; Kim 등, 1998) 및 동결정자(Lee 등, 2001; Kolbe와 Holtz, 1999)의 3종류로 보고되고 있으나, 본 실험에서 이들을 각각 ICSI에 사용하여 최적의 조건을 확립하고자 하였다. 따라서, 3종류의 정자를 각각 ICSI에 사용하였으나, 수정율과 후기배로의 발달율에 있어서는 차이를 나타내지 않았다. 이는 앞에서 언급한 연구자의 결과와는 다소간에 차이를 보였으나, 각 연구실에서 사용되는 난자나 배양액 및 여러 가지 실험조건들의 차이가 있어 정확한 실험 결과를 비교하기에는 적합하지 않았다. 그 결과로 본 실험에서는 연구실의 조건에 적합하고, 준비하기가 쉬우며, 오염을 최소

Table 1. *In vitro* development of porcine embryos cultured for 7 days following intracytoplasmic injection of various sperm-condition

Sperm condition	No. of oocytes used	No.(%) of oocytes cleaved	No.(%) of embryos developed to blastocysts
Epididymal	94	68 (72.3)	12 (17.6)
Ejaculated	117	75 (64.1)	14 (18.7)
Frozen-thawed	81	60 (74.1)	9 (15.0)

† Values with same column are not significantly different (P<0.05).

화 할 수 있는 정소상체미부정자를 사용하기로 하였다.

2. ICSI후 난자의 활성화에 따른 배발달을

Table 2에서는 Table 1에 나타난 결과에 따라 사용이 편리한 정소상체미부정자를 이용하여 ICSI 후 전기적 자극을 실시한 군과 실시하지 않은 군에 의한 난자의 활성화에 따른 수정율과 후기배로의 발달율을 조사하였다. 그 결과 수정율에 있어서는 대조군으로 이용한 shame injection과 전기적 활성화를 실시하지 않은 군에 있어서는 각각 47.1%와 46.3%로 나타나 전기적 활성화를 실시한 군의 79.6%에 비해 유의적인 차이를 나타내었다. 또한, 후기배로의 발달율에 있어서도 전기적 활성화를 실시한 군에는 24.1%로 나타나 전기적 활성화를 실시하지 않은 군의 14.4%에 비교하여 유의적인 차이를 나타내었다. 그리고 대조군으로 이용한 shame injection에서 후기배로의 발달율은 2.5%로 낮은 결과를 나타내었다.

체외성숙된 난자에 ICSI 주입용 pipette을 이용한 자극만으로도 어느 정도의 난자활성화를 유도하여 2세포기로 발달할 수는 있으나, ICSI후 전기적 활성화를 실시한 군에 비해서는 수정율과 후기배로의 발달율에 큰 차이를 나타내었다. 지금까지 돼지에 있어서 전기적 자극에 의한 난자의 활성화에 대하여 많은 연구 결과가 보고되었다(Zhu 등, 2002; Polejaeva 등, 2000; Onish 등, 2000; Wang 등, 1998; Leal 등, 1998; Liu 등, 1997; Jilliff 등, 1997; Yamauchi 등, 1996; Kure-bayashi 등, 1996; Kikuchi 등, 1995; Robl 등, 1992). 그러나, 이러한

연구결과는 다양한 연구의 목적에 따라 활용되었으며, 돼지의 난자를 이용한 ICSI에서 난자활성화에 대한 연구는 미미한 상태이다. 그럼에도 불구하고, Kim 등(1998)은 돼지에서 ICSI 후 난자의 추가적 활성화는 필요하지 않고, ICSI에 의해 주입된 정자 자체만으로 난자의 활성화가 가능하다고 하였으며, 이는 정자 두부의 침체 적도면에 난자의 활성화를 유도하는 oscillin이라는 단백질이 존재하기 때문이라 보고하였다(Parrington 등, 1996). 이러한 결과와는 달리 Lee 등(2001)은 돼지의 난자를 이용한 ICSI에 있어서 동결정자의 주입후 추가적 전기활성화가 정자 자체만의 주입보다는 높은 후기배로의 발달율을 나타내었다고 보고하였다. 또한, Di Berardino 등(2000)은 ICSI후 A23187 calcium ionophore로 정자가 주입된 난자에 활성화를 주는 것이 후기배로의 발달율을 향상시킨다고 보고하였다. 본 연구에 있어서도 ICSI후에 추가로 전기적 자극에 의한 난자의 활성화를 유도하는 것이 수정율과 후기배로의 발달율을 향상시키는 것으로 나타났다. 그러나, 돼지에 있어서 ICSI 전·후에 추가적으로 전기적 자극에 의한 난자의 활성화에 대해서는 여러 가지의 측면에서 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

3. ICSI후 난자의 활성화에 의한 외래유전자의 발현을

Table 3에서는 정자와 pcDNA LacZ 유전자의 처리시 electroporation 방법을 실시하여 ICSI후 난자를 전기적 활성화를 실시한 군과 실시하지 않은 군에서의 pcDNA LacZ 유전자의 발현율을 조사한

Table 2. *In vitro* development of porcine embryos cultured for 7 days following intracytoplasmic sperm injection

ICSI groups	No. of oocytes used	No.(%) of oocytes cleaved	No.(%) of embryos developed to blastocysts
Shame injection	85	40 (47.1) ^a	1 (2.5) ^a
Activation*	255	203 (79.6) ^b	49 (24.1) ^b
Non-activation	285	132 (46.3) ^a	19 (14.4) ^c

[†] Values with different superscripts in the columns are different significantly (P<0.05).

* Activation; 30 min after ICSI, 85 volts, 30 μsec, 1 pulse.

Table 3. Transgenic expression of porcine embryos after microinjection into metaphase II stage oocytes with or without electrical stimulation

Oocyte treatments	No. of embryos used*	Tg expression embryos	
		Negative	Positive (%)**
Activation***	116	81	35 (30.2)
Non-activation	124	94	30 (24.2)

† Values with same column are not significantly different ($P < 0.05$).

* Sperm electroporation; 300~750 volts, 25 μ F, 0.4 cm electrode.

* 72~144 h post-insemination.

** All mosaic expression of pcDNA Lac Z.

*** Activation; 30 min after ICSI, 85 volts, 30 μ sec, 1 pulse.

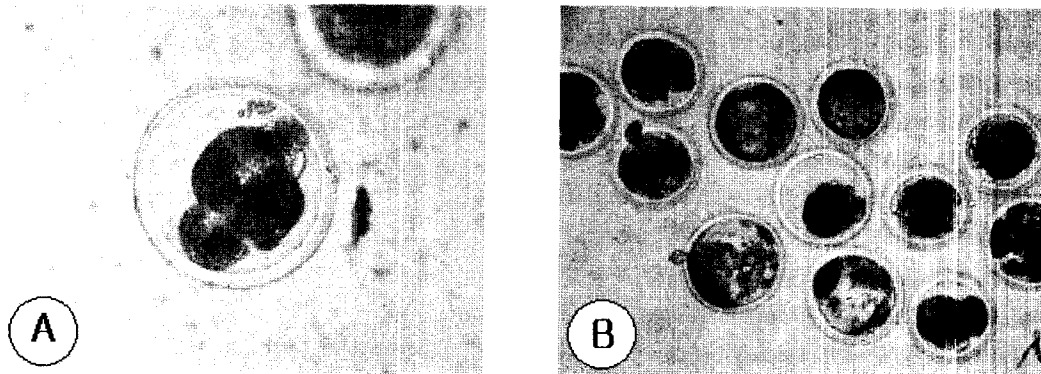


Fig. 1. Expression of sperm-mediated gene transfer by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in porcine embryos. A; 4 cell embryos, B; blastocysts expressing mosaicism of pcDNA LacZ gene. All embryos were examined by light microscopy.

결과를 나타내고 있다. pcDNA LacZ 유전자가 발현된 결과에서 전기적 활성화를 실시한 군이 30.2%, 전기적 활성화를 실시하지 않은 군이 24.2%로 나타났으나 두 처리간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 그러나, 두 처리군 모두에서 발달한 배는 pcDNA LacZ 유전자가 mosaic 발현 양상으로 나타났다.

Sperm-mediated gene transfer에 있어서 체외수정란이나 산자생산을 위한 방법으로 ICSI를 이용한 보고서는 몇 편에 불과하다(Sim 등, 2000; Chan 등, 2000a, 2000b; Perry 등, 1999). Perry 등(1999)은 mouse에서 정자와 외래유전자 pCX-EGP와 px-CANLacZ를 각각 Triton X-100 처리법(Kurataka 등, 1996), freeze-thawing 처리법(Wakayama 등,

1998) 및 Freeze-dry 처리법(Wakayama와 Yanagimachi, 1998)으로 준비한 후 ICSI를 통해 11마리의 형질전환 mouse생산에 성공하였으며, 또한 Chan 등(2000b)은 Rhesus monkey를 이용하여 sperm/DNA co-incubation 처리법으로 외래유전자 GFP를 binding한 정자를 이용하여 ICSI에 의한 방법으로 산자생산에는 성공하였으나, 외래유전자 GFP의 발현은 단지 체외수정란 상태에서만 발현되었고, 생산된 산자에서는 발현되지 않았다고 보고하였다. Sim 등(2000)은 정자의 두부와 pGFP-N1 유전자를 co-incubation 처리법으로 처리한 다음, ICSI에 의해서 수정된 4 세포기 단계의 돼지 체외수정란이 높은 외래유전자 발현율을 보고하였다.

이러한 결과들은 종간의 차이가 분명하였음을

시사하고 있다. 본 연구의 결과는 돼지에 있어서 ICSI에 의한 체외수정란의 외래유전자 도입에 따른 발현율을 비추어볼 때 형질전환 돼지의 생산이 가능함을 시사하였다.

적 요

본 연구는 sperm-mediated gene transfer를 이용하여 ICSI에 의한 형질전환동물 생산의 기초자료로서 활용하기 위해, ICSI에 사용될 정자의 조건과, 그에 따라 적합한 돼지 정자와 외래유전자의 전처리 및 ICSI를 통한 수정을 및 후기배로의 발달율과 외래유전자의 발현 여부를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

ICSI에 이용될 정자의 조건에 따라 정소상체미부정자, 사출정자 및 동결정자를 이용하여 ICSI후 수정율은 각각 72.3%, 64.1% 및 74.1%로 나타나 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 또한 후기배로의 발달율에 있어서도 각각 17.6%, 18.7% 및 15.0%로 나타나 각 처리군간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 그리고, ICSI후 전기적 자극을 실시한 군과 실시하지 않은 군에서 난자의 활성화에 따른 수정율은 대조구로 이용한 shame injection 과 전기적 활성화를 실시하지 않은 군에서 각각 47.1%와 46.3%로 나타나 전기적 활성화를 실시한 군의 79.6%에 비해 유의적인 차이를 나타내었다. 후기배로의 발달율에 있어서도 전기적 활성화를 실시한 군에서는 24.1%로 나타나 전기적 활성화를 실시하지 않은 군에서의 14.4%와 유의적인 차이를 나타내었다. 그리고 대조구로 이용한 shame injection 에 있어서 후기배로의 발달율은 2.5%로 낮은 결과를 나타내었다. 또한, 정자와 pcDNA LacZ 유전자의 처리시 electroporation 방법을 실시하여 ICSI후 난자를 각각 전기적 활성화를 실시한 군과 실시하지 않은 군에 있어서 유전자 발현율은 각각 30.2%와 24.2% 나타났으나, 두 처리군간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 그러나, 두 군에서 pcDNA LacZ 유전자는 모두 mosaic 발현 양상을 보였다.

이상의 실험 결과들을 종합해 보면, ICSI에 사용될 수 있는 돼지의 정자는 정소상체미부정자, 사출정자 및 동결정자 모두가 이용 가능하며, ICSI후

추가 전기적 자극에 의한 난자의 활성화가 수정율과 후기배로의 발달율을 향상시킬 수 있음을 시사하였다.

따라서, 돼지에 있어서 정자의 외래유전자 도입에 대한 정확하고 실용적인 방법은 보고되고 있지는 않은 상태로, 정자와 외래유전자의 처리법을 향상시키기 위하여 다양한 방법으로 많은 연구가 요구된다.

참고문헌

- Bachiller D, Schellander K, Peli J and Ruther U. 1991. Liposome-mediated DNA uptake by sperm cells. *Mol. Reprod. Dev.*, 30:194-200.
- Brackett BG, Baranska W, Sawicki W and Kopro-wski H. 1971. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 68(2):352-357.
- Chan AWS, Luetjens CM, Dominko T, Ramalho -antos J, Simerly C, Hewitson L and Schatten G. 2000a. TransgeneICSI review: Foreign DNA transmission by intracytoplasmic sperm injection in Rhesus monkey. *Mol. Reprod. Dev.*, 56: 325-328.
- Chan, AWS, Luetjens CM, Dominko T, Ramalho -Santos J, Simerly C, Hewitson L and Schatten G. 2000b. Foreign DNA transmission by ISI: injection of spermatozoa bound with exogenous DNA results in embryonic GFP expression and live Rhesus monkey birth. *Mol. Human Reprod.*, 6:26-33.
- Cibelli JB, Stice SL, Golucke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Leon PFA and Robl JM. 1998. Cloned transgenic calves produced from non-quiescent fetal fibroblasts. *Science*, 280:1256-1258.
- Di Berardino D, Gil MA, Parrilla I, Fernandez MA, Coppola G, Mazza MR, RToca J, Vazquez JM, Lucas X and Martinez EA. 2000. Pronuclear formation and embryo development in pig oo-

- cytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, 53(1):389. Abstr.
- Gagne, MB, Pothier F and Sirard MA. 1991. Electroporation of bovine spermatozoa to carry foreign DNA in oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 29:6-15.
- Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE, Wall Jr RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD and Brinster RL. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, 315: 680-683.
- Horan R, Powell R, Bird JM, Gannon F and Houghton JA. 1992. Effects of electroporation on the association of foreign DNA with pig sperm. *Arch. Androl.*, 28:105-114.
- Huguet E and Esponda P. 1998. Foreign DNA introduced into the vas deferens is gained by mammalian spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.*, 51:42-52.
- Jolliff WJ and Prather RS. 1997. Parthenogenetic development of *in vitro*-matured, *in vitro*-cultured porcine oocytes beyond blastocyst. *Biol. Reprod.*, 56:544-548.
- Kikuchi K, Izaike Y, Noguchi J, Furukawa T, Daen FP, Niato K and Toyoda Y. 1995. Decrease of histon H1 kinase activity in relation to parthenogenetic activation of pig follicular oocytes matured and aged *in vitro*. *J Reprod. Fertil.*, 105:325-330.
- Kim JH, Jung-Ha HS, Lee HT and Chung KS. 1997. Development of a positive method for male stem cell-mediated gene transfer in mouse and pig. *Mol. Reprod. Dev.*, 46:1-12.
- Kim NH, Lee JW, Jun SH, Lee HT and Chung KS. 1998. Fertilization of porcine oocytes following intracytoplasmic spermatozoon or isolated sperm head injection. *Mol. Reprod. Dev.*, 51:436-444.
- Kim NH, Shin JS, Kim C, Jun SH, Lee HT and Chung KS. 1999. Fertilization and *in vitro* development of porcine oocytes following intracytoplasmic injection of round spermatid or round spermatid nuclei. *Theriogenology*, 51: 1441-1449.
- Kim T, Leibfried-Rutledge ML and First NL. 1993. Gene transfer in bovine blastocysts using replication with Gibbon ape leukemia virus envelopes. *Mol. Reprod. Dev.*, 35:105-113.
- Kolbe T and Holtz W. 1999. Intracytoplasmic injection (ICSI) of *in vivo* or *in vitro* matured oocytes with fresh ejaculated or frozen-thawing epididymal spermatozoa and additional calcium-ionophore activation in the pig. *Theriogenology*, 52:671-682.
- Kolbe T and Holtz W. 2000. Birth of a piglet derived from an oocyte fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Animal Reproduction Science*, 64:97-1001.
- Kurebayashi S, Miyake M, Katayama M, Miyano T and Kato S. 1996. Development of porcine blastocysts from *in vitro*-matured and activated haploid and diploid oocytes. *Theriogenology*, 46:1027-1036.
- Kuretake S, Kimura Y, Hoshi K and Yanagimachi R. 1996. Fertilization and development of mouse oocytes injected with isolated sperm heads. *Biol. Reprod.*, 55:789-795.
- Labitrano M, Camaioni A, Frati VM, Dolci S, Farace MG and Spadafora C. 1989. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell*, 57:717-723.
- Leal CL and Liu L. 1998. Differential effects of kinase inhibitor and electrical stimulus on activation and histon H1 kinase activity in pig oocytes. *Anim. Reprod. Sci.*, 52:51-61.
- Lee JW, Jeong BS, Riesen J, Hoagland T and Yang X. 2001. Fertilization and embryonic development following injection of frozen-thawing spermatozoon into *in vitro* matured porcine oocyte. *Theriogenology*, 55(1):506. Abstr.
- Liu L and Moor RM. 1997. Factors affecting electrical activation of porcine oocyte matured

- in vitro*. Anim. Reprod. Sci., 48:67-80.
- Martin MJ. 2000. Development of *in vivo*-matured porcine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. Biol. Reprod., 63:109-112.
- 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, 1188-1190.
- Parrington J, Swann K, Schevchenko VI, Sesay AK and Lai FA. 1996. Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. Nature, 379:364-368.
- Perry AC, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y and Yanagimachi R. 1999. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. Science, 14:1180-1183.
- Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A and Campbell KH. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. Nature, 407:86-90.
- Prather RS, Boice ML, Gibson J, Hoffman KE and Parry TW. 1995. *In vitro* development of embryos from Sinclair miniature pigs: A preliminary report. Theriogenology, 43:1001-1007.
- Rieth A, Pothier F and Sirars MA. 2000. Electroporation of bovine spermatozoa to carry DNA containing highly repetitive sequences into oocytes and detection of homologous recombination events. Mol. Reprod. Dev., 57:338-345.
- Robl MJ, Collas P, Fissore R and Dobrinsky J. 1992. Electrically induced fusion and activation in nuclear transplant embryos. In: Guide to electroporation and electrofusion. New York: Academic Press:535-551.
- Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycook K, Scott AR, Retchie 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.
- Sim SW, Kim YH, Jun SH, Lim JM, Chung HM, Ko JJ, Lee HT, Chung KS and Shim H. 2000. Transgenesis of porcine embryos using intracytoplasmic sperm injection. Theriogenology, 53 (1):521. Abstr.
- Spadafora C. 1998. Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation. Bioessays., 20:955-964.
- Tsukui T, Kanegae Y, Saito I and Toyoda Y. 1996. Transgenesis by adenovirus-mediated gene transfer into mouse zona-free eggs. Nature Biotechnol., 14:982-985.
- Wakayama T, Whittingham DG and Yanagimachi R. 1998. Production of normal offspring from mouse oocytes injected with spermatozoa cryopreserved with or without cryoprotection. J. Reprod. Fertil., 112:11-17.
- Wakayama T and Yanagimachi R. 1998. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. Nat. Biotechnol., 16:639-641.
- Wang WH, Abeydeera LR and Prather RS. 1998. Functional analysis of activation of porcine oocytes by spermatozoa, calcium ionophore, and electrical pulses. Mol. Reprod. Dev., 51:346-353.
- Yamauchi Y, Sasada H, Sugawgra S and Nagai T. 1996. Effect of culture conditions on artificial activation of porcine oocytes matured *in vitro*. Reprod. Fertil. Dev., 8:1153-1156.
- Zhu J, Telfer EE, Fletcher J, Springbett A, Dobrinsky JR, De Sousa PA and Wilmut I. 2002. Improvement of an electrical activation protocol for porcine oocytes. Biol. Reprod., 66:635-641.

(접수일: 2002. 1. 30/ 채택일: 2002. 4. 3)