

## 전기적 융합조건이 돼지 핵이식 수정란의 융합 및 체외발달에 미치는 영향

박준규·박희성<sup>†</sup>

진주산업대학교 동물생명과학과

## Effects of Electric Stimulation Conditions on *In Vitro* Fusion and Developmental Rates of Nuclear Transplanted Porcine Embryos

Park, J. K. and H. S. Park<sup>†</sup>

Dept. of Animal Science and Biotechnology, Chinju National University

### ABSTRACT

This study was conducted to examine the effects of electric stimulation conditions on *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 cell confluency. The zona pellucida of IVM oocytes were partially drilled using laser system. Single somatic cell was individually transferred into the enucleated oocyte. The reconstructed embryos were electrically fused with 0.3M mannitol. After electric fusion, the embryos were activated and cultured in NCSU-23 medium containing 10% FBS at 39°C, 5% CO<sub>2</sub> in air for 6 to 8 days.

Nuclear transferred(NT) oocytes which fused at a field strength of 1.90kv/cm showed a higher ( $P < 0.05$ ) fusion rate(49.5%, 50/101) compared to 2.10 kv/cm(25.8%, 24/93) or 2.50kv/cm(30.3%, 27/89). After electric activation, the cleavage rate of NT embryos was 48.0(24/50), 66.6(16/24) and 70.3% (19/27), respectively and these were not different. There was no significant difference in fusion rate by duration and pulse of electric stimulation. In cleavage rate, however, more NT embryos(76.3%, 45/59) cleaved at 60  $\mu$ sec twice than other embryos(49.1 to 56.5%) with different conditions of electric stimulation( $P < 0.05$ ). NT embryos activated at a field strength of 1.50kv/cm showed a higher developmental rate(9.8%, 5/51) than those embryos activated at 1.25kv/cm(0%) or parthenotes(6.4%, 7/109).

These results suggest that some factors such as field strength, duration and pulse of electric stimulation could be affected to *in vitro* developmental ability of nuclear transplanted porcine embryos.

(Key words: Oocytes, Laser-drilled, Nuclear transfer, Activation, Electric fusion, Porcine)

### I. 서론

가축의 핵이식에 의한 복제수정란의 생산에 있어서 유전적인 정보를 지닌 공여핵과 수핵란 세포 질과의 융합은 수정란의 발생에 반드시 필요한 과

<sup>†</sup> Corresponding author : Department of Animal Science and Biotechnology, Chinju National University, Chinju, 660-758, Korea, E-mail : hspark@chinju.ac.kr

정이다. 이러한 핵이식 수정란의 공여핵과 세포질 간의 융합은 포유동물에 있어서 핵이식기법이 개발될 당시에는 주로 Sendai virus(MaGrath와 Solter, 1983)를 매개체로 한 융합방법이 실시되었으나, 점차 소와 같은 대동물의 핵이식이 실시되면서 핵이식 수정란의 융합은 전기자극(Zimmermann과 Greyson, 1983)에 의한 융합법이 주로 이용되어 왔다. 뿐만 아니라 전기자극에 의한 융합법은 간편하면서도 융합율이 높음으로서 근년에 와서 주로 이루어지고 있는 체세포 핵이식에 있어서도 일반적으로 사용하고 있는 방법이다(Wilmut 등, 1997; Tao 등, 1999; Onishi 등, 2000). 그러나 전기융합은 공여세포와 수핵난자의 종류에 따라서 융합 조건을 달리 하여야 하며(Wilmut 등, 1997; Shiga 등, 1999; Miyoshi 등, 2000), 또한 핵이식 수정란의 분할을 유도하기 위해서는 융합된 난자의 인위적인 활성화가 이루어져야 한다. 체세포 핵이식 수정란의 융합후 활성화는 전기자극에 의한 활성화(Wilmut 등, 1997), Thimerosal과 Dithiothreitol(Tao 등, 1999), Ca-ionomycine과 6-Dimethylaminopurin (Cibelli 등, 1998; Keeper 등, 2001) 등에 의한 화학약품처리에 의한 활성화 방법들이 사용되고 있으며, 전기자극과 화학요법을 병행한 복합적인 활성화 방법(Shiga 등, 1999; Kato 등, 2000)도 사용되고 있으나, 방법적으로 매우 번거로운 단점을 가지고 있다.

돼지에서 체세포 핵이식 수정란의 융합은 전기자극에 의한 융합방법이 많이 이용되고 있으며, 활성화 방법은 전기적(Onishi 등, 2000), 화학적(Tao 등, 1999) 및 전기-화학적 방법에 의한 복합적 활성화(Park 등, 2001b)방법이 이용되고 있다. 돼지 핵이식 수정란은 다른 동물에 비하여 활성화율은 높으나, 분할율과 발달율이 낮음으로써 핵이식에 의한 복제수정란의 생산효율이 다른 동물에 비하여 매우 낮은 실정이다(Tao 등, 1999). 따라서 핵이식에 의한 복제수정란의 생산효율을 높이기 위해서는 적절한 전기융합 방법과 활성화 방법이 확립되어야 하며, 전기자극에 의한 융합도 적절한 전기자극의 세기가 설정되어야 할 것이다.

그러므로 본 연구는 돼지 복제수정란의 생산성

향상에 기여하기 위한 기초연구로써 핵이식란의 융합과 활성화에 있어서 전기적 조건이 핵이식 후 융합, 활성화 및 체외발달에 미치는 각종 요인들을 조사하기 위하여 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공여세포의 채취 및 배양

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

분리된 세포는 10% FBS가 첨가된 TCM-199로 25 cm<sup>3</sup> flask(Falcon, USA)에 분주하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양을 실시하였으며, 배양 12시간 후 바닥에 붙지 않은 세포는 제거하고, 신선한 TCM-199 배양액으로 48시간마다 교체하면서 6~8일간 배양을 실시하였다. 계대배양은 공여세포가 flask에 90% 이상 자랐을 때, 0.05% trypsin과 EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 1/2씩 나누어 15회 이상 반복해서 배양을 실시하였다. 계대배양한 공여세포는 10% DMSO(Sigma, USA)가 첨가된 TCM-199 배양액으로 동결 보존해 두고, 핵이식에 사용할 때는 39℃ 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 monolayer를 충분히 형성하였을 때 0.5% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 기아배양을 실시하였는데, 기아배양은 3일 이상 실시하여 세포주기를 G0 또는 G1기로 유도한 다음 공여세포로 사용하였다.

### 2. 수핵난자의 체외성숙

본 실험에 사용된 난포란은 도축장에서 도축되

는 성숙모돈 난소의 난포로부터 채취하여 사용하였으며, 채집한 난포란은 난구세포층이 치밀하고 세포질이 양호한 난포란만 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  $\mu$ g/ml LH, 2IU/ml hCG, 1  $\mu$ g/ml estradiol 17- $\beta$ , 1  $\mu$ g/ml FSH를 첨가하여 5% CO<sub>2</sub>와 98~99% 습도가 유지된 39°C 배양기내에서 3시간 이상 전 배양을 시킨 다음, 4well-dish에 well당 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), 탈핵용(enucleation) 및 주입용(injection) pipette을 각각 제작하였다. 보정용 pipette의 외경은 160~180  $\mu$ m, 탈핵과 주입용 pipette은 외경이 20~30  $\mu$ m로 조절하였다. 제작이 완료된 pipette은 증류수, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 및 Nonidet P-40(Sigma, USA)으로 세척한 다음, Sigmacote(Sigma, USA)로 실리콘 처리를 한 후 멸균시켜 사용하였다. 체외성숙된 수핵난자를 0.3% hyluronidase(Sigma, USA)가 첨가된 D-PBS에 넣어 난구세포를 제거하고, D-PBS로 3~4회 세척한 다음, 0.05M sucrose(Sigma, USA) 및 10% FBS 가 첨가된 D-PBS에서 세포질이 양호하고 극체가 뚜렷하게 보이는 난자만을 선별하여 사용하였다. 핵이식은 D-PBS 배양액 소적(60~80  $\mu$ l)에 7.5  $\mu$ g/ml의 cytochalasin B(Sigma, USA)와 0.05M의 sucrose를 첨가하여 수핵난자를 넣은 다음 다른 소적에는 기아배양을 실시한 공여세포를 넣어서 주입용 pipette에 다수의 공여세포를 loading한 후 수핵난자는 laser로 zona pellucida를 부분적으로 drilling한 다음 탈핵용 pipette으로 극체와 세포질을 흡입하여 제거하였다. 이때 세포질의 제거는 약 30~40% 정도의 세포질을 흡입함으로써 핵을 제거하였다(홍 등, 2001). 탈핵한 난자는 곧바로 세포질이 제거된 공간에 공여세포를 세포질과 부착되게 주입함으로써 핵이식을 완료하였다. La-

ser system(MTM, Switzerland)을 이용한 zona drilling은 Park 등(2001a)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, laser system이 부착된 독립현미경하에서 laser 전용렌즈( $\times$ 400)로 drilling할 수핵난자의 투명대를 맞춘 다음 20~30  $\mu$ sec의 강도로 laser를 1회 투과 시킴으로써 zona drilling을 실시하였다. Drilling은 핵이식시 불필요한 배양액의 침투 등을 막기 위하여 zona 두께의 약 60~80% 정도만 drilling하였다. 공여세포가 주입된 난자는 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, USA)로 실시하였다. 이때 융합배지는 0.1mM CaCl<sub>2</sub>(Sigma, USA) 및 0.1mM MgCl<sub>2</sub>(Sigma, USA)가 첨가된 0.3M Mannitol(Sigma, USA) 용액에 2~3분간 평형을 실시한 다음, 핵이식란을 chamber로 옮겨 양 전극 사이에 일렬로 주입하여 핵은 전극의 양극(+)쪽으로 향하게 하고 세포질은 음극(-)쪽으로 향하게 하여 전기자극을 가하였다. 핵이식 완료된 수정란의 융합과 전기활성화는 다음과 같이 실시하였다.

- 실험 1) DC 1.90kv/cm, 30  $\mu$  sec 1회+AC 5v/mm, 5sec 1회+DC 1.50kv/cm, 30  $\mu$ sec 1회  
2.10kv/cm, 30  $\mu$  sec 1회+AC 5v/mm, 5sec 1회+DC 1.50kv/cm, 30  $\mu$  sec 1회  
2.50kv/cm, 30  $\mu$  sec 1회+AC 5v/mm, 5sec 1회+DC 1.50kv/cm, 30 $\mu$ sec 1회
- 실험 2) DC 1.90kv/cm, 30 $\mu$ sec 1회와 2회+AC 5v/mm, 5sec 1회+DC 1.50kv/cm, 30  $\mu$  sec 1회  
DC 1.90kv/cm, 60  $\mu$ sec 1회와 2회+AC 5v/mm, 5sec 1회+DC 1.50kv/cm, 30  $\mu$  sec 1회
- 실험 3) AC 5v/mm, 5sec 1회+1.25kv/cm, 30  $\mu$  sec 1회  
AC 5v/mm, 5sec 1회+1.50kv/cm, 30  $\mu$  sec 1회

활성화가 유도된 핵이식 수정란은 NCSU-23으로 3~4회 세척한 후 10% FBS가 첨가된 NCSU-23 배양액에서 배양하였다.

### 5. 복제수정란의 체외배양

복제수정란의 체외배양은 10% FBS가 첨가된 NCSU-23 배양액으로 3~4회 세척하여 60×15 mm dish(Corning, USA) 소적에 수정란을 넣어 5% CO<sub>2</sub>와 98~99% 습도가 유지된 39°C 배양기내에서 48시간마다 신선한 NCSU-23 배양액으로 교환하면서 핵이식 후 6~8일까지 체외배양을 실시하여 배반포기로의 발달을 유도하였다.

### 6. 통계학적 분석

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

## Ⅲ. 결과 및 고찰

### 1. 전기융합 조건에 따른 핵이식 수정란의 융합율과 분할율

핵이식 수정란의 융합을 위하여 전기적 융합조건을 1.90, 2.10 및 2.50kv/cm로 자극을 주었을 때 융합율과 분할율은 Table 1에서 보는 바와 같다.

1.90kv/cm, 30 μsec 1회의 전기자극으로 융합을 실시하였을 때 수정란의 융합율은 1.90kv/cm조건이 49.5%(50/101)로써 2.10kv/cm(25.8%, 24/93)와

2.50kv/cm(30.3%, 27/89)의 조건보다 유의적(P<0.05)으로 높았다. 융합 후 활성화(AC; 5v/mm 5sec 1회+DC; 1.50kv/cm, 30 μsec 1회)가 유기된 핵이식 수정란의 분할율은 2.50kv/cm 전기자극이 70.3%(19/27)로써 가장 높게 나타났으며, 2.10kv/cm(66.6%, 16/24)와 1.90kv/cm(48.0%, 24/50)와는 차이가 없었다.

Miyoshi 등(2000)은 전기자극을 100, 150, 200, 250 및 300v/mm의 다양한 전기세기 자극을 가하였을 때 핵이식 수정란의 융합율이 100v/mm에서는 융합이 전혀 이루어지지 않았으나, 200v/mm와 250v/mm에서는 64%와 77%가 융합이 이루어져 150v/mm(28%)와 300v/mm(52%)보다 유의적(P<0.05)으로 높았다고 하였다. Du 등(1999)은 돼지 태아섬유아세포 유래 핵이식 수정란의 융합을 위하여 전기자극(1.5kv/cm, 60 μsec 2회)을 주었을 때 융합율과 분할율은 각각 76.5% 및 58%이었다고 하였으며, Ott 등(2000)은 돼지 태아섬유아세포 유래 핵이식 수정란을 1.1kv/cm, 40 μsec 2회 조건으로 전기자극을 주었을 때 융합율이 74%였으며, 분할율은 56%이었다고 하였다. 또한 Hill 등(2000)은 소에서 공여세포를 1.6kv/cm, 20 μsec 2회의 전기자극으로 실시하였을 때 fetal과 adult의 융합율이 각각 42%와 59%로써 공여세포의 종류에 따라서 차이가 있다고 하였다. 본 연구결과, 전기자극 후 융합율은 상기 연구자들의 성적보다는 다소 낮았으며, 분할율은 이들의 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 이상의 결과를 볼 때 핵이식 수정란의 전기적 융합은 공여세포와 수핵난자의 조건에 적합한 전기자극 조건이 확립되어야 할 것으로 생각된다.

Table 1. Effect of electric field strengths on fusion and cleavage rates of porcine NT embryos

Strength (kv/cm)	No. of oocytes used	No. of oocytes fused(%)	No. of embryos cleaved(%)*
1.90	101	50(49.5) <sup>a</sup>	24(48.0) <sup>a</sup>
2.10	93	24(25.8) <sup>b</sup>	16(66.6) <sup>a</sup>
2.50	89	27(30.3) <sup>b</sup>	19(70.3) <sup>a</sup>

\* Electric activation : AC; 5v/mm 5sec once and DC; 1.50kv/cm, 30 μsec once.

\*\* Values with different superscripts in the same column were significantly(P<0.05) different.

## 2. 전기자극 시간과 횡수에 따른 핵이식 수정란의 융합율과 분할율

전기융합의 세기를 1.90kv/cm으로 고정하고, 전기자극의 통전시간을 30  $\mu$ sec와 60  $\mu$ sec 자극의 횡수를 1회와 2회로 각각 주었을 때 핵이식 수정란의 융합율과 분할율은 Table 2에서 보는 바와 같다.

핵이식 수정란을 30  $\mu$ sec 동안 1회와 2회의 전기자극으로 융합을 실시하였을 때 핵이식 수정란의 융합율은 각각 50%(55/110)와 50%(46/92)였으며, 60  $\mu$ sec 동안 1회와 2회의 조건에서도 각각 58.4%(66/113)와 50.8%(59/116)로써 핵이식 수정란의 융합율에 있어서 전기의 자극시간과 횡수에 따른 차이는 없었다. 융합이 이루어진 핵이식 수정란의 전기활성화(AC 5v/mm 5sec 1회 + DC 1.50kv/cm, 30  $\mu$ sec 1회)유도 후 융합시의 전기적 조건에 따른 분할율은 30  $\mu$ sec 동안 1회와 2회에 있어서는 49.1%(27/55)와 56.5%(26/46)로써 차이가 없었으나, 60 $\mu$ sec 동안 2회(76.3%, 45/59)실시하였을 경우에는 1회(56.1%, 37/66)에 비하여 유의적(P<0.05)으로 높은 분할율을 보였다.

Onishi 등(2000)은 돼지 태아섬유아세포 유래 핵이식 수정란의 전기활성화를 1.5kv/cm, 100  $\mu$ sec 1회와 1.3kv/cm, 60  $\mu$ sec 3회를 실시하였을 때 핵이식 수정란의 분할율이 각각 90.8%와 86.4%로써 차이가 없었다고 하였다. Shin 등(2001)은 체외성숙시간을 달리한 난자(24시간과 28시간)를 소 귀 세포 유래 공여세포로 핵이식을 실시하여 전기자극(1.75~1.85kv/cm, 15  $\mu$ sec 1회)방법으로 융합을

실시하였을 때 융합율이 체외성숙 24시간(53%)과 28시간(61%)간에 차이가 없었으며, 분할율도 각각 77%(24시간)와 81%(28시간)로써 수핵란의 체외성숙시간에 따른 차이는 없었다고 하였다. 또한 K uhholzer 등(2001)은 돼지 태아섬유아세포를 공여세포로 이용하여 기아배양과 기아배양을 실시하지 않았을 때 2.6kv/cm, 30  $\mu$ sec 2회의 전기적 융합 조건에서는 융합율이 62%와 58%로써 차이가 없었으며, 분할율도 38%와 44%로써 차이가 없었다고 하였다. 그러나 이 등(1999)은 전기자극의 세기(strength)를 1.75kv/cm으로 고정하고, 횡수를 1, 2 및 3회를 주었을 때 융합율이 1회에서 65.2%로써 2회(43.2%)와 3회(36.5%)보다 높았으며, 분할율에 있어서도 각각 88.4, 62.9 및 13.0%로써 1회 자극이 높게 나타났다고 보고하였다. 이상에서 보는 바와 같이 핵이식 수정란을 전기자극으로 융합을 실시하였을 때 전기자극의 조건에 따른 융합율과 분할율은 연구자들에 따라서 많은 차이가 있음을 알 수 있는데 이러한 이유는 융합시의 전기자극조건 뿐만 아니라 공여세포의 종류, 기아배양 여부, 동물의 종, 수핵란의 성숙조건 및 배양액 등 다양한 요인들이 종합적으로 영향을 미치는 것으로 보이며, 이러한 영향을 배제할 수 있는 적정 융합조건의 확립이 시급한 것으로 생각된다.

## 3. 핵이식 수정란의 활성화 조건에 따른 체외 발달율

융합이 이루어진 핵이식 수정란의 활성화를 위하여 전기자극을 1.25kv/cm과 1.50kv/cm의 조건으

**Table 2. Effect of different duration and pulse of electric stimulation on fusion and cleavage rates of porcine NT embryos**

Duration	No. of pulse	No. of oocytes used	No. of oocytes fused(%)	No. of embryos cleaved(%)*
30	1	110	55(50.0) <sup>a</sup>	27(49.1) <sup>a</sup>
	2	92	46(50.0) <sup>a</sup>	26(56.5) <sup>a</sup>
60	1	113	66(58.4) <sup>a</sup>	37(56.1) <sup>a</sup>
	2	116	59(50.8) <sup>a</sup>	45(76.3) <sup>b</sup>

\* Values with different superscripts in the same column were significantly(P<0.05) different.

**Table 3. Effect of different electric activation on *in vitro* development of porcine NT embryos with somatic cells**

Strength (kv/cm)	No. of fused oocytes	No. of embryos cleaved(%)	No. of embryos developed to(%)		
			4-cell	Morula	Blastocyst
Parthenotes	175/	109(62.3) <sup>ab</sup>	68(62.4) <sup>a</sup>	26(23.8) <sup>a</sup>	7(6.4) <sup>ab</sup>
1.25	28/ 90	16(57.1) <sup>a</sup>	10(62.5) <sup>a</sup>	2( 7.1) <sup>b</sup>	0(0.0) <sup>a</sup>
1.50	70/127	51(72.8) <sup>b</sup>	27(53.0) <sup>b</sup>	9(17.6) <sup>ab</sup>	5(9.8) <sup>b</sup>

\* Values with different superscripts in the same column were significantly(P<0.05) different.

로 유도하였을 때 핵이식 수정란의 분할율과 체외 발달율은 Table 3에서 보는 바와 같다.

전기자극 후 융합이 이루어진 수정란의 분할율은 1.50kv/cm의 전기적 활성화 조건에서는 72.8%(51/70)로써 1.25kv/cm의 57.1%(16/28)보다 유의적(P<0.05)으로 높았으며, 단위발생을 유도하기 위하여 AC 5v/mm 5sec 1회+DC 1.50kv/cm, 30 μsec 1회의 자극을 주었을 때 분할율은 60.9%(64/105)로써 차이가 없었다. 핵이식 수정란의 배반포기로의 발달율은 1.50kv/cm의 융합조건에서는 9.8%(5/51)가 배반포기로 발달하였으나, 1.25kv/cm 조건에서는 배반포기로의 발달이 전혀 없었다(P<0.05). 단위발생란은 배반포기로의 발달율이 6.4%(7/109)로써 핵이식 수정란(1.5kv/cm)과 유의적(P<0.05)인 차이가 없었다.

Miyoshi 등(2000)은 융합이 이루어진 핵이식 수정란을 융합 후 전기활성화(120v/mm)를 실시하였을 때 분할율이 65%로써 전기활성화를 실시하지 않았을 때의 38%보다 높았으며, 배반포기의 발달에 있어서도 전기자극을 가하지 않았을 때는 발달이 전혀 없었고, 전기자극을 가하였을 때는 3%이었다고 하였다. Onishi 등(2000)은 돼지 체내 난포란을 전기자극 방법으로 단위발생을 유도하여 NCSU-23을 배양액으로 배양을 실시하였을 때는 배반포기로의 발달율이 31.2%(1.5kv/cm, 100 μsec 1회)와 21.4%(1.3kv/cm, 60 μsec 3회)였으나, mWM 배양액에서는 각각 4.0 및 1.0%가 배반포기로 발달하여 배양액에 따라서 발달율이 차이가 있다고 하였다. Koo 등(2000)은 핵이식 수정란을 120v/mm와 150v/mm로 전기활성화를 유도하였을 때 분할

율이 각각 71.4±10.9%와 63.7±8.1%로써 차이가 없다고 하였고, 배반포기로의 발달에 있어서는 120v/mm가 11.6±1.6%로써 150v/mm의 6.5±2.3%보다 높게 나타났다고 하였다. Park 등(2001b)은 핵이식 수정란을 전기자극(1.14kv/cm, 30μsec 1회) 방법으로 활성화를 유도하였을 때 핵이식 수정란의 분할율이 24.5±7.2%로써 단위발생란의 79.3±5.6%보다 낮았다고 하였으며, 핵이식 수정란의 배반포기로의 발달에 있어서는 4.9±2.4%로써 단위발생(26.8±3.8%)보다 낮았다고 하였다. 이것은 본 연구결과보다 다소 저조한 성적이며, 핵이식 수정란의 배반포기로의 발달은 융합 및 활성화 과정에 있어서 세포종류, 전기자극의 세기 및 통전시간 등이 영향을 미치는 것으로 생각된다. 이상의 결과로 볼 때 돼지 핵이식 수정란의 전기적 융합조건은 1.90kv/cm, 60 μsec., 2회, 융합란의 활성화 조건에 따른 배반포기로의 발달율은 1.50kv/cm가 적합한 것으로 생각된다.

#### IV. 적 요

본 연구는 돼지 복제수정란의 생산성 향상에 기여하기 위한 기초연구로써 핵이식 수정란의 융합과 활성화 과정에 있어서 전기적 조건이 핵이식 수정란의 융합 및 체외발달에 미치는 요인들을 조사하기 위하여 실시하였다. 공여세포는 Landrace 종의 귀 세포조직을 채취하여 0.05%의 trypsin과 EDTA가 첨가된 D-PBS로 세포를 분리하여 TCM-199 배양액으로 계대배양을 실시하여 사용하였다. 핵이식은 laser system으로 투명대를 drilling하

여 수핵난자의 극체와 핵을 제거한 후 공여세포를 주입하였으며, 핵이식 수정란은 전기적 자극으로 융합과 활성화를 실시하여 분할을 유도하였다. 분할이 이루어진 핵이식 수정란은 10% FBS가 첨가된 NCSU-23 배양액으로 CO<sub>2</sub> 배양기에서 6~8일 동안 체외배양을 실시하여 배반포기로 발달을 유도하였다. 본 연구결과에서 얻은 결과를 요약하면 다음과 같다.

1.90kV/cm, 30  $\mu$ sec 1회의 전기자극으로 융합을 실시하였을 때 핵이식 수정란의 융합율은 1.90kV/cm의 조건이 49.5%로써 2.10kV/cm(25.8%)와 2.50kV/cm(30.3%)의 조건보다 유의적(P<0.05)으로 높았으며, 융합 후 활성화가 유지된 핵이식 수정란의 분할율은 2.50kV/cm 전기자극이 70.3%로써 가장 높게 나타났다. 핵이식 수정란을 30  $\mu$ sec 동안 1회와 2회의 전기자극으로 융합을 실시하였을 때 융합율은 모두 50%였으며, 60  $\mu$ sec 동안 1회와 2회의 조건에서도 각각 58.4%와 50.8%로써 전기적 자극시간과 횟수에 따른 차이는 없었다. 융합이 이루어진 핵이식 수정란의 전기활성화 유도 후 융합시의 전기적 조건에 따른 분할율은 30  $\mu$ sec 동안 1회와 2회에 있어서는 49.1%와 56.5%로써 차이가 없었으나, 60  $\mu$ sec 동안 2회(76.3%) 실시하였을 경우에는 1회(56.1%)에 비해 유의적(P<0.05)으로 높은 분할율을 보였다. 전기자극 후 융합이 이루어진 융합란의 분할율은 1.50kV/cm의 전기적 활성화 조건에서는 72.8%로써 유의적(P<0.05)으로 높았으며, 단위발생란의 분할율 60.9%와는 차이가 없었다. 핵이식 수정란의 배반포기로의 발달율은 1.50kV/cm의 융합조건에서는 9.8%가 배반포기로 발달하였으나, 1.25kV/cm 조건에서는 배반포기로의 발달이 전혀 없었다. 단위발생란의 배반포기로의 발달율은 6.4%로써 핵이식란(1.5kV/cm)과 유의적(P<0.05)인 차이가 없었다. 이상의 결과를 볼 때 핵이식 수정란의 배반포기로의 발달은 융합 및 활성화 과정에 있어서 세포종류, 전기자극의 세기 및 통전 시간 등이 영향을 미치는 것으로 생각되며, 돼지 핵이식 수정란의 전기적 융합조건은 1.90kV/cm, 60  $\mu$ sec., 2회, 융합란의 활성화 조건에 따른 배반포기로의 발달율은 1.50kV/cm가 적합한 것으로 생각

된다. 따라서 적정 전기적 융합 및 활성화 조건을 확립한다면 핵이식 수정란의 융합율과 체외발달율을 보다 더 높일 수 있을 것으로 생각된다.

## V. 인용문헌

1. Cibelli, J. B., Stice, S. L., Golueke, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C., Leon, F. A. P. and Robl, J. M. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 280:1256-1258.
2. Du, Z. T., Verma, P. J., Crocker, L. A., Faast, R., Lyons I. G. and Nottle, M. B. 1999. Development of nuclear transfer embryos using porcine fetal fibroblasts. *Theriogenology*, 51:201 (abstr).
3. Hill, J. R., Winger, Q. A., Long, C. R., Looney, C. R., Thompson J. A. and Westhusin, M. E. 2000. Development rates of male bovine nuclear transfer embryo derived from adult and fetal cells. *Biol. Reprod.*, 62:1135-1140.
4. 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.
5. Keefer, C. L., Baldassarre, H., Keyston, R., Wang, B., Bhatia, B., Biolodeau, A. S., Zhou, J. F., Leduc, M., Downey, B. R., Lazaris, A. and Karatzas, C. N. 2001. Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and nontransfected fetal fibroblasts and *in vitro*-matured oocytes. *Biol. Reprod.*, 64:849-856.
6. Koo, D. B., Kang, Y. K., Choi, Y. H., Park, J. S., Han, S. K., Park, I. Y., Kim, S. U., Lee, K. K., Son, D. S., Chang, W. K. and Han, Y. M. 2000. *In vitro* development of reconstructed porcine oocytes after somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 63:986-922.
7. Kühholzer, B., Hawley, R. J., Lai, L., Kolber

- Simonds, D. and Prather, R. S. 2000. Clonal lines of transgenic fibroblast cells derived from the same fetus result in different development when used for nuclear transfer in pig. *Biol. Reprod.*, 64:1695-1698.
8. McGrath, J. and Solter, D. 1983. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science*, 220:1300-1302.
  9. Miyoshi, K., Taguchi, Y., Sendai, Y., Hoshi, H. and Sato, E. 2000. Establishment of a porcine cell line from *in vitro*-produced blastocyst and nuclear transfer of the cells into enucleated oocytes. *Biol. Reprod.*, 62:1640-1646.
  10. Onishi, A., Iwamoto, M., Akita, T., Mikawa, S., Takeda, K., Awata, T., Hanada, H. and Perry, A. C. F. 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 289:1188-1190.
  11. Ott, M., Schernthaner, W., Hinterhuber, M., Holy, T., Alberio, R., Prella, K. and Zakhartchenko, V. 2000. Production of pig embryos by nuclear transfer using porcine fetal fibroblasts as karyoplasts. *Theriogenology*, 53:238(abstr).
  12. Park, H. S., Jin, J. I., Hong, S. P., Lee, J. S. and Jung, J. Y. 2001a. Effects of laser drilling on blastocyst hatching and pregnancy rates from *in vitro* produced cattle embryos. *Theriogenology*, 55:352(abstr).
  13. Park, K. W., Kühholzer, B., Lai, L., Machaty, Z., Sun, Q. Y., Day, B. N. and Prather, R. S. 2001b. Development and expression of the green fluorescent in porcine embryos derived nuclear transfer of transgenic granulosa-derived cells. *Anim. Reprod. Sci.*, 68:111-120.
  14. Shiga, K., Fujita, T., Hirose, K., Sasac, Y. and Nagai, T. 1999. Production of calves by transfer of nuclei from cultured somatic cells obtained from Japanese black bulls. *Theriogenology*, 52:527-535.
  15. Shin, S. J., Lee, B. C., Park, J. I., Lim, J. M. and Hwang, W. S. 2001. A separate procedure of fusion and activation an ear fibroblast nuclear transfer program improves preimplantation development of bovine reconstituted oocytes. *Theriogenology*, 55:1697-1704.
  16. Tao, T., Machaty, Z., Boques, A. C., Day, B. N. and Prather, R. S. 1999. Development of pig embryos reconstructed by microinjection of cultured fetal fibroblast cells into *in vitro* matured oocytes. *Anim. Reprod. Sci.*, 56:133-141.
  17. Wang, W. H., Abeydeera, L. R., Canley, T. C. and Day, B. N. 1997. Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by *in vitro* fertilization. *J. Reprod. Fertil.*, 111:101-108.
  18. Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. and Campbell, K. H. S. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385:810-813.
  19. Wakayama, T., Perry, A. C. F., Zuccotti, M., Johnson, K. R. and Yanagimachi, R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394:369-373.
  20. Zimmermann, U. and Greyson, J. 1983. Electric field-induced cell fusion. *Biotechniques* 1:118-122.
  21. 박성원, 홍승표, 진종인, 이지삼, 정장용, 박희성. 1999. 돼지 난포란의 체외수정 및 체외발달에 관한 연구. *한국수정란이식학회지* 14:185-193.
  22. 이병천, 박종임, 조종기, 김기연, 신수정, 용환을, 황우석. 1999. Bovine fetal fibroblast를 이용한 핵이식 및 세포 융합에 관한 연구. *한국수정란이식학회지* 14:107-111.
  23. 홍승표, 박준규, 이명열, 이지삼, 정장용, 박희성. 2001. 돼지 공여세포의 조건이 핵이식 수정란의 체외발달에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지* 16:213-221.
- (접수일자: 2002. 3. 28. / 채택일자: 2002. 4. 20.)