

효율적인 돼지 복제수정란 생산에 관한 연구 II. 탈핵 여건의 확립

위갑인 · 강만종 · 문승주[†]

전남대학교 농업생명과학대학 동물자원학부, 농업과학기술연구소

Study of Efficient Production of Cloned Embryos in Porcine II. Establishment of Conditional Enucleation

Wee, G., M. J. Kang and S. J. Moon[†]

Department of Animal Science, Institute of Agriculture Science and Technology
College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University

ABSTRACT

This study was carried out to improve of enucleation efficiency on porcine recipient oocytes pre-activated.

In ethanol or Ca^{2+} ionophore, effect of repeating and combinational activation with 6-DMAP or cycloheximide compared with alone activated treatment. Recipient oocytes's activation by Ca^{2+} ionophore combined with 6-DMAP or cycloheximide were significantly higher than alone treatment($P<0.05$). Between repeating and alone treatments were not significantly different. In ethanol, repeating treatment was significantly lower than alone($P<0.05$), and combination treatments were not significantly different. On the basis of these results, efficiency of enucleation, electrical fusion and *in vitro* development compared preactivated with non-preactivated recipient oocytes. Enucleation and fusion rates of preactivated oocytes were improved significantly compared with non-preactivated oocytes(90.7%, 71.8 vs 77.8%, 61.1%; $P<0.05$). Behind the back, cleavage and *in vitro* development rates were significantly lower than non-preactivated oocytes(38.7%, 19.3% vs 68.8%, 30.6%; $P<0.05$).

(Key words : Enucleation, Recipient oocytes, Preactivation, Combinational activation)

I. 서 론

수핵란의 탈핵은 형광현미경하에서와 같이 가시화 되어 있지 않기 때문에 부정확한 핵제거는 핵이식기술의 주요한 장애요인이 되어 왔으며, 확실한 핵제거를 위한 1/5~1/3의 세포질 제거는 세포질내 존재하는 미지의 세포질인자의 소실뿐 아

니라 체적이 작은 체세포를 공핵란으로 사용시 융합율의 저하를 초래한다. 그러므로 세포질의 손상 없이 핵만을 제거할 수 있는 효과적인 방법이 검토되어야 한다. 지금까지 탈핵은 4가지 방법이 수행되어 왔는데, 첫 번째는 두 개의 똑같은 부분을 양분하고 cloning을 위해 두 개의 절반을 이용하는 것으로(Westhusin 등, 1991) 핵이식된 반쪽이 poly-

* 본 연구는 한국과학재단 우수연구센터 (R11-2002-100-00000-0) 지원으로 수행되었음.

[†] Corresponding author: 전남대학교 동물자원학부, E-mail: sjmoon@chonnam.ac.kr

ploid 되는 단점이 있으며, 두 번째는 MII 난자의 제1극체와 근접한 부분의 난세포질을 1/5~1/3를 흡입 제거함으로써 이용하는 것인데(Smith와 Wilmut, 1989), 제1극체의 전위 또는 퇴화 때문에 잘못된 염색체의 제거가 1/3~1/4정도 발생한다고 보고되었다(Prather와 First, 1990). 또한 탈핵 후 형광현미경하에서 핵염색 후 확인해야 하는 번거로움과 부작용이 우려되고 있다.(Parther 등, 1989) 세 번째 방법은 hoechst33342 stain 배양된 난자를 형광현미경하에서 염색체를 관찰하여 제거하는 것으로(Westhusin 등, 1992) 장시간 염색액에 노출됨으로써 수핵 난자에 손상을 초래할 수 있다. 마지막 방법으로는 화학적 자극을 가함으로써 자체 탈핵을 유도하는 것으로 Fulka와 Moor(1993)는 etoposid (ETO)와 cycloheximide(CHXM)를 M I 기의 마우스 난자와 배양시 염색체 응축 후 제1극체와 같이 방출되는 자체 탈핵을 보고하였고, Bordignon와 Smith(1998)는 성숙시킨 소 난자에 Ethanol 처리시 방출되는 제2극체와 인접하는 적은 양의 세포질을 제거함으로써 높은 탈핵율을 보였다고 하였으며, 또한 윤 등(1998)도 MII기 토끼난자에 Ionomycine 과 6-DMAP를 병용 처리하여 제2극체의 방출을 유도하고 이를 제거함으로써 높은 탈핵율을 얻었다고 보고하였다. 이 방법은 아직 탈핵 기술로서 미확립 상태이나 크기가 작은 후기배의 배아세포나 체세포를 공핵관으로 사용시 매우 유용할 것으로 기대된다. 따라서 본 연구에서는 체외 성숙시킨 MII기 난자에 여러 화학물질간의 중복 및 병용처리를 실시하여 수핵관으로서 적합한 활성화 조건과 활성화 후 자체 탈핵을 유도함으로써 보다 효율적인 탈핵 여건을 확립하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난포란의 회수

본 실험에 공시된 난소는 도축장에서 도살된 돼지 중 정상생식기를 가진 암돼지로부터 난소를 적출, 35°C, 0.9%의 생리식염수에 보존하여 실험실로 운반한 후, 18-gauge 주사기를 이용 직경 3~6 mm 난포로부터 난포액을 흡입하여 난포란을 채취

하였다. 채취된 난포란은 실체현미경(Nikon, Japan) 하에서 난구세포의 치밀도에 따라 다음과 같이 판정하였다. A등급은 난구세포로 난자의 대부분이 둘러싸여 있으며 난세포질이 균일한 것, B등급은 난세포질이 균일하나 일부분이 적게 보이는 것, 난구세포질이 거의 벗겨져 있고 전체적으로 난세포질이 어두워 보이는 것은 C등급, 난구세포층이 사방으로 퍼져 있고 난세포질이 균일하지 않은 것은 D등급으로 분류하여 A와 B등급에 해당하는 난포란만을 선별하여 체외성숙에 공시하였다.

2. 난포란의 체외 성숙

난포란의 체외성숙은 15%의 FBS(fetal bovine serum)가 함유된 Whitten's 배양액을 사용하였다. 선별된 난포란을 PMSG 10 IU/ml와 HCG 10 IU/ml의 호르몬이 첨가된 배양액을 pH 7.2로 조절, 0.2 μ m syringe filter로 여과한 후 4 well dish에 500 μ l씩 분주, mineral oil(Sigma)로 피복한 다음 각 well당 난포란 50개씩을 옮겨 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 22시간동안 배양하였고 이후 호르몬이 첨가되지 않은 15% FBS가 함유된 Whitten's 배양액 하에서 22시간 배양함으로써 총 44시간 배양시켜 체외 성숙을 유도하였다.

3. 난자의 활성화

44시간동안 체외 성숙이 유기된 성숙 난자를 0.1% hyaluronidase에 넣어 피펫을 사용하여 난구세포를 제거하였다. 실체 현미경하에서 난세포질이 검고 균일하며, 제1극체가 뚜렷이 방출된 것만을 골라 15%의 FBS가 함유된 TCM-199 medium 하에서 단위 발생을 유기하였다. Ethanol, Ca²⁺-ionophore, 6-DMAP 및 cycloheximide의 단독, 중복, 그리고 병용 처리는 Table 1에 나타내었다.

4. 활성화 여부 평가

활성화 유기후 6시간동안 체외 배양시킨 단위 발생란을 10 μ g/ml 농도의 hoechst33342 (Sigma)로 20분간 염색한 후(Westhusin 등, 1992) 형광현미경 하에서 전핵 형성을 등을 조사하였다.

Table 1. Conditional activation of recipient oocytes

Treatment	Ethanol	Ca ionnophore
Alone	Ethanol	CaA
Repeat	Ethanol + Ethanol	CaA + CaA
Combination	Ethanol + 6-DMAP	CaA + DMAP
Combination	Ethanol + Cycloheximide	CaA + Cycloheximide

5. 수핵 난자의 준비

44~46시간 체외 성숙시킨 난포란을 0.1% hyaluronidase하에서 피펫에 의해 난구세포를 제거하였다. 난구세포가 제거된 난포란들을 20% FBS가 첨가된 DPBS로 3~5회 세척한 후 실체현미경하에서 세포질이 균일하고 극체가 뚜렷이 방출된 것만을 선별, 다음 방법에 의해 탈핵을 실시하였다.

1) 물리적인 미세 조작에 의한 탈핵

7.5 µg/ml cytochalasin B와 20%의 FBS가 함유된 DPBS(-) 내에서 절개용 피펫을 이용하여 극체의 바로 위 부분의 투명대를 절개한 후 탈핵용 피펫으로 제1극체와 주변의 세포질을 1/5정도 흡입 제거하였으며(Prather 등, 1987), 탈핵 작업이 끝난 난포란들은 1 µg/ml 농도의 hoechst33342(Sigma)로 20분간 염색한 후(Westhusin 등, 1992) 형광현미경하에서 탈핵 여부를 판정하여 수핵란으로 공시하였다.

2) 화학적인 활성화 방법을 이용한 탈핵

체외 성숙된 난포란을 25 µM의 Ca²⁺-ionophore로 2분간 침지 후 2mM의 6-DMAP로 처리하여 2시간 후부터 제2극체가 방출된 난포란만을 선별하여 7.5 µg/ml cytochalasin B와 20%의 FBS가 함유된 DPBS(-)내에서 절개용 피펫을 이용하여 극체의 바로 위 부분의 투명대를 절개한 후 탈핵용 피펫으로 제 1, 2극체와 약간의 세포질만을 제거함으로

서 탈핵을 실시하였고, 탈핵 작업이 끝난 난포란들은 1 µg/ml 농도의 hoechst 33342(Sigma)로 20분간 염색한 후(Westhusin 등, 1992) 형광현미경하에서 탈핵 여부를 판정하여 수핵란으로 공시하였다.

6. 복제 수정란의 재구성

수핵란에 이식할 체세포로는 난구세포를 이용하였다. 난구세포는 체외 성숙이 완료된 난포란의 난구세포 제거시 주변의 세포를 모아 약 1분 정도 vortex mixer로 교반하여 하나의 세포들로 분리하였다. 이들 세포들은 10% FBS가 첨가된 DPBS와 섞어 1,000rpm에서 3분간 3~5회 세척 및 원심 분리한 후 10분간 정치시켜 실체 현미경하에서 위에 부유되어 있는 세포만을 선별하였다. 난구세포의 미세 주입은 7.5 µl/ml cytohalasin B가 첨가된 DPBS(-)내에서 크기가 작은 난구세포만을 미세 피펫에 흡입하고 이를 탈핵된 수핵 난자의 절개된 투명대를 통해 위란강내에 주입하였다. 세포융합은 세포융합장치(BTX-2001; BTX, San Diego, CA, USA) 및 1.0mm의 wire chamber를 이용하였으며, 융합용 배지는 0.1mM MgSO₄와 0.1mM CaCl₂를 첨가한 0.3M mannitol 용액을 사용하였다. 통전전압은 1.7kV/cm에서 15 µ sec동안 2회 통전하여 세포융합 및 난세포질의 활성화를 실시하였다.

7. 체외 배양

세포 융합이 확인된 핵이식 난자는 10% FBS가 첨가된 Whitten's medium에 3회 세척한 후, 50 µl씩 분주된 60mm petri dish에 각 소적당 20개씩의 난포란을 옮겨 39°C, 5%, CO₂ 배양기에서 120시간동안 배양하여 시간의 경과에 따라 체외발달 성적을 조사하였으며, 48시간마다 신선 배양액으로 교체하였다.

8. 통계분석

본 연구결과 얻어진 자료는 SAS package를 이용하여 분산분석을 실시하였으며, 처리구간의 유의성은 Duncan 및 LSD 방식을 사용하여 검정하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 화학적인 활성화에 있어 화학물질의 중복 및 병용처리의 효과

수핵란으로서 적합한 활성화 조건을 확인하기 위하여 Ethanol 또는 Ca^{2+} ionophore를 단독, 중복처리 및 6-DMAP, cycloheximide과 병용처리한 후 난자의 활성화 효율과 체외 배발달에 미치는 영향을 조사하였다.

1) Ethanol의 중복 및 병용처리시의 활성화 효과

Ethanol의 중복처리, 6-DMAP 또는 cycloheximide와의 병용처리시 활성화율은 중복처리에 있어 50.7%로 단독 처리 60.5%보다 유의적($P<0.05$)으로 낮았고, 6-DMAP 또는 cycloheximide와의 병용처리도 각각 56.8%, 55.8%의 활성화율을 보여 단독처리와 유의차를 보이지 않았다(Table 2). 난할율과 체외 발달에서도 50.4%, 23.1%의 단독 처리시에 비해 중복 처리시는 36.4%, 13.9%로 유의적($P<0.05$) 낮은 경향을 보였고, 병용처리구는 44.7%, 19.3%와 44.7%, 20.5%로 단독처리와 비슷한 경향을 보였다(Table 3). 따라서 Ethanol을 사용하여 돼지 수핵 난자의 활성화를 유도시 단독 처리가 적합하며, 중복 처리는 오히려 활성화 및 배발달을 저하시켰다. 이러한 결과는 소의 성숙 난자에 있어 단독처리보다는 병용처리가 아주 높은 활성을 보였다(Yang 등, 1992; 1994; Shi 등, 1993; Presicce와 Yang, 1994a,b; Susko-Parrish 등, 1994)는 보고와는 반대의 경향을 보였으며, 중복 처리시 활성화율 및 체외 배발달이 부진한 이유는 돼지 난자의 활성화 자극시 너무 과도한 칼슘의 방출로 인해 난세포질내 균형이 손상되었기 때문으로 사료되며, Ethanol에 있어 외부 난세포질의 반응 정도가 다른 종보다 더 민감한 것으로 생각된다.

2) Ca^{2+} ionophore의 중복 및 병용처리시의 활성화 효과

Ca^{2+} ionophore를 중복 처리, 6-DMAP 또는 cycloheximind와 병용 처리시 활성화율은 6-DMAP와의 병용처리가 80.8%로 유의적($P<0.05$)으로 가장 높

았고, cycloheximind와의 병용처리도 72.5%로 단독처리시 58.0%에 비해 유의적($P<0.05$)인 차이를 보였으나 중복처리는 차이를 나타내지 못했다(Table 4). 병용처리시 난할율과 체외 배발달에서는 6-DMAP와의 병용처리가 각각 78.3%, 40.6%로 62.9%, 27.0%를 보인 단독처리보다 유의적($P<0.05$)으로 높은 경향을 보였고, cycloheximind와의 병용처리는 난할율은 78.3%로 단독처리에 비해 유의적($P<0.05$) 차이를 보였으나, 배발달은 유의적 차이를 나타내지 못했다(Table 5). 중복처리는 난할율과 체외발달을 모두 단독처리와 차이가 없었다(Table 5). 따라서 Ca^{2+} ionophore를 이용하여 활성화를 유기시는 단독처리보다 병용처리가 더 적합할 것으로 보이며, 이런 결과는 칼슘 증가제와 인산화 억제제 및 단백질 합성억제제에 의해 활성화되었을 때 단독 처리시보다 활성화 및 체외 발달율이 높았다는 보고들(Collas 등, 1993a; Presicce와 Yang, 1994a,b; Takahashi 등, 1996; Tanaka와 Kanakawa, 1997; Liu 등, 1998a,b)과 일치하는 결과였다. 또한 Ca^{2+} ionophore의 병용처리시는 cycloheximind보다 6-DMAP와의 병용처리가 높은 효과를 보였는데 이런 경향은 다른 보고들(Liu 등, 1998a,b; Rho 등, 1998; Presicce와 Yang, 1994a)에서도 같은 결과를 보였다.

성숙직후 M II기 난자에 있어 MPF의 높은 활성화에 의해 감수분열이 재개될 수 없으며 이런 상태의 난자를 수핵란으로 이용시 핵막 붕괴, 미성숙 염색체의 응축(PCC)등의 과정에서 불균일한 염색체 응축으로 인한 유전적인 손상, PCC이후 S기와 G2기를 거치는 과정에서의 염색체가 2배체가 아닌 이상배수체로 변화 등의 문제점이 발생하였다. 따라서 성숙된 M II기 난자의 활성화를 유기하여 세포내 MPF의 활성을 낮게 함으로써 어느 세포주기의 핵이 들어와도 배발달이 그대로 진행될 수 있게 하는 것이 필요할 것이다. 본 실험에서는 Ethanol, Ca^{2+} ionophore, DMAP 및 cycloheximind를 처리하여 약 50%~80%의 활성화를 유기하였는데(Table 2~5), 이러한 활성화는 화학적 자극물질들이 세포질내 칼슘의 농도를 증가시키고 또한 CSF나 C-mos를 파괴함으로써 MPF의 활성을 낮

춘 결과라고 생각되며, 이는 정자의 침입에 의한 수정 후 난자내 칼슘수준이 증가되어 MPF를 불활성화 시킴으로써 감수분열이 재개되었다(Fissore 등, 1992)는 보고와 같은 원리로 여겨진다. 그러나 Ethanol과 Ca^{2+} ionophore는 단순 칼슘증가제로서 새로이 생성되는 CSF에 대해서는 영향을 미치지 못한다(Fissore와 Robl, 1992)는 보고로 인해 본 실험에서는 세포질내 칼슘의 농도를 주기적으로 증가시키거나 CSF의 재생성을 막기 위해 반복처리 및 단백질 합성 억제제인 DMAP와 cycloheximind와의 병용처리를 실시하였고(Table 1), 그 결과 Ca^{2+} ionophore의 병용처리구가 단독 처리시보다 활성화율과 체외 배발달에서 유의적($P<0.05$)인 향상을 보였으며 특히 6-DMAP와의 병용처리시 가장 높은 유의성을 보였다(Table 4, 5; $P<0.05$). 이런 경향은 다른 보고(Collas 등, 1993a; Presicce와 Yang, 1994a,b; Takahashi 등, 1996; Tanaka와 Kanakawa, 1997; Liu 등, 1998a,b)들과도 일치되는 결과였다. 그러나 위의 보고와는 달리 Ethanol의 병용처리시 단독 처리와 별 차이가 없었으며 중복처리시는 활성화와 체외 발달에 있어 유의적으로 저하되는 경향을 나타내었다(Table 9; $P<0.05$).

2. 수핵란의 탈핵전 활성화가 탈핵율, 융합율 및 체외 배발달에 미치는 영향

1) 탈핵전 활성화된 수핵란의 탈핵 효율

수핵란의 활성화 후 탈핵을 실시한 난자와 활성화 처리를 하지 않고 탈핵을 실시한 난자와의 탈핵 효율을 비교하였다. 탈핵전 활성화를 한 처리구가 90.7%의 탈핵율을 보인 반면, 활성화 처리를 하지 않은 난자에 있어서는 77.8%로 활성화 처리구가 유의적($P<0.05$)으로 높은 탈핵율을 보였다(Table 6). 이러한 결과는 Ca^{2+} ionophore의 난세포질 활성화 작용으로 인한 제2극체 방출과 6-DMAP에 의한 방추사 신장 억제간의 상호복합작용으로 인해 자체 탈핵이 유도된 것으로 사료된다. 이러한 결과는 같은 원리로 높은 탈핵율을 얻었다는 윤 등(1998)의 보고와 일치하며, Fulka와 Moor(1993)도 M I의 마우스 난자를 etoposid와 cycloheximind

로 병용처리 하였을 경우 염색체가 응축되어 제 1극체와 함께 방출되었다는 결과와 비슷한 양상을 보였다. 탈핵 성적에 있어서는 활성화시키지 않은 난자에서 77.8%로 Prather 등(1989)의 74%와 비슷한 탈핵율을 보였고, 활성화된 난자에서는 90.7%로 토끼 난자의 활성화 후 탈핵에서 96.8%을 얻은 윤 등(1998)의 보고와 비슷한 수준을 보였다.

2) 탈핵전 활성화된 수핵란의 융합율 및 체외 배발달

탈핵전 활성화된 수핵란의 세포 융합율은 71.8%로 활성화하지 않은 처리구 61.1%보다 유의적($P<0.05$)으로 높은 융합율을 보였다(Table 7). 이는 활성화 후 탈핵시 자체 탈핵이 유도되어 탈핵 미세 조작시 적은 양의 세포질 제거가 가능하였고 핵이식 후 크기가 작은 체세포와 난세포질간의 밀착정도가 좋았기 때문인 것으로 사료된다. 한편, 난할 재개 및 체외 배발달에 있어서는 탈핵전 활성화한 처리구가 38.7%, 19.3%로 활성화하지 않은 처리구 68.8%, 30.6%보다 유의적($P<0.05$)으로 저조한 성적을 보였고(Table 7), 재구성란의 변성율에서는 활성화 전 처리가 24.7%로 처리하지 않은 경우 9.0%보다 유의적($P<0.05$)으로 높은 변성율을 나타내었다. 이는 활성화된 난자를 사용하여 높은 체외 발달율을 얻었다는 보고(Campbell 등, 1993; Ayagi 등, 1994; Kono 등, 1994; Stice 등, 1994, 1996)와는 상응된 결과를 보였다. 또한 Inomycin과 6-DMAP로 자체 탈핵 유도하여 핵이식후 체외 발달율에서 차이가 없었다(윤 등; 1998)는 결과와도 다른 경향을 보였다. 이처럼 위의 보고들과 차이가 난 이유는 상실배기나 배반포기의 수정란의 공핵 할구는 대부분 S기에 머물러 있으며(Barnes와 Eystone, 1990) 수핵란도 활성화되었을 경우 S기로 넘어가 두 세포의 주기가 동조화되는 반면, 체세포를 공여핵으로 사용시 대부분은 G0기나 G1기에 있지만(Boquest 등, 1999), 활성화된 수핵란은 체세포보다 빨리 S기로 넘어가게 되어 세포주기가 일치하지 않으므로 체외 발달이 저하된 것으로, 탈핵전 활성화 처리구가 변성율이 높았던 이유도 이 때문인 것으로 사료된다.

Table 2. Effect of alone, repeating or combinational activation between ethanol and different chemicals on porcine oocytes matured *in vitro*

Treatment	No. of treated oocytes	No(%) of 6-h postactivation		
		1 Pronucleus	2 Pronuclei	Total activated
ET	86	49(57.0) ^a	3(3.5) ^a	52(60.5) ^a
ET + ET	71	32(45.1) ^b	4(5.6) ^a	36(50.7) ^b
ET + 6-DMAP	81	43(53.1) ^{ab}	3(3.7) ^a	46(56.8) ^{ab}
ET + CH	104	53(51.0) ^{ab}	5(4.8) ^a	58(55.8) ^{ab}

^{a,b}: Different superscripts within column denote significant differences (P<0.05).

ET: ethanol , 6-DMAP: 6-dimethylaminopurine, CH: cycloheximind.

Table 3. Effect of alone, repeating or combinational activation between ethanol and different chemicals on cleavage and *in vitro* development of porcine oocytes

Treatment	No. of oocytes		No(%) of oocytes developed to		
	Treated	Cleaved(%)	48hr		120hr
			2cell	4cell	Morula
ET	125	63(50.4) ^a	57(45.6) ^a	6(4.8) ^a	29(23.1) ^a
ET + ET	115	42(36.4) ^b	38(33.0) ^b	4(3.5) ^a	16(13.9) ^b
ET + 6-DMAP	105	47(44.7) ^{ab}	40(38.1) ^{ab}	7(6.7) ^a	20(19.3) ^{ab}
ET + CH	132	59(44.7) ^{ab}	52(39.4) ^a	7(5.3) ^a	27(20.5) ^{ab}

^{a,b}: Different superscripts within column denote significant differences (P<0.05).

ET: ethanol, 6-DMAP: 6-dimethylaminopurine, CH: cycloheximind.

Table 4. Effect of alone, repeating or combinational activation between Ca²⁺ ionophore and different chemicals on porcine oocytes matured *in vitro*

Treatment	No. of treated oocytes	No(%) of 6-h postactivation		
		1 Pronucleus	2 Pronuclei	Total activated
CaA	69	30(43.5) ^c	10(14.5) ^a	40(58.0) ^b
CaA + CaA	89	52(58.4) ^b	1(1.1) ^b	53(59.6) ^b
CaA + 6-DMAP	73	55(75.3) ^a	4(5.5) ^{ab}	59(80.8) ^a
CaA + CH	138	89(64.5) ^a	11(8.0) ^{ab}	100(72.5) ^a

^{a,b,c}: Different superscripts within column denote significant differences (P<0.05).

CaA: calcium ionophore, 6-DMAP: 6-dimethylaminopurine, CH: cycloheximind.

Table 5. Effect of alone, repeating or combinational activation between Ca²⁺ ionophore and different chemicals on cleavage and *in vitro* development of porcine oocytes

Treatment	No. of oocytes		No(%) of oocytes developed to		
	Treated	Cleaved(%)	48hr		120hr
			2cell	4cell	Morula
CaA	108	68(62.9) ^b	63(58.3) ^b	5(4.6) ^a	29(27.0) ^b
CaA + CaA	131	81(61.8) ^b	73(55.7) ^b	8(6.1) ^a	45(34.0) ^{ab}
CaA + 6-DMAP	138	108(78.3) ^a	96(69.6) ^a	12(8.7) ^a	56(40.6) ^a
CaA + CH	141	104(73.8) ^a	94(66.7) ^a	10(7.1) ^a	49(35.3) ^{ab}

^{a,b}: Different superscripts within column denote significant differences (P<0.05).

CaA: calcium ionophore, 6-DMAP: 6-dimethylaminopurine, CH: cycloheximind.

Table 6. Enucleation efficiency of preactivated porcine oocytes following Ca²⁺ ionophore and 6-DMAP treatments

Treatment	No. of oocytes		
	Examined	Manipulated	Enucleated(%)
Non-activated	782	243	189(77.8) ^b
Preactivated	699	214	194(90.7) ^a

^{a,b}: Different superscripts within column denote significant differences (P<0.05).

Table 7. Electrofusion and *in vitro* development of porcine embryos reconstituted with preactivated or non-activated oocytes

Treatment	No. of embryos				No(%) of embryos developed to			
	Examined	Fused(%)	Cultured	Cleaved (%)	48hr		120hr	
					2cell	4cell	frag.	Morula
Non-activated	288	176(61.1) ^b	144	99(68.8) ^a	90(62.5) ^a	9(6.3) ^a	13(9.0) ^b	44(30.6) ^a
Preactivated	213	153(71.8) ^a	150	58(38.7) ^b	52(34.7) ^b	5(3.3) ^b	37(24.7) ^a	29(19.3) ^b

^{a,b}: Different superscripts within column denote significant differences (P<0.05).

frag: fragmentation.

IV. 요약

체의 성숙시킨 MII기 난자의 여러 화학물질간의 중복 및 병용처리를 실시하여 수핵란으로서 적합한 활성화 조건과 활성화 후 자체 탈핵을 유도함으로써 보다 효율적인 탈핵 여건을 확립하고자

본 연구를 실시하였다.

1. Ethanol을 사용하여 6-DMAP 또는 cycloheximide 간의 단독, 중복, 그리고 병용처리를 실시한 결과, 활성화율, 난할율 및 체외 발달율에서 단독처리와 병용처리간의 차이는 없었으나 중복처리시 유의적으로 저하되었다(P<0.05).

2. Ca²⁺ ionophore를 가지고 활성화 조건별로 처리하였을 경우, 6-DMAP와 병용 처리가 활성화율, 난할율 및 체외 발달율에서 각각 80.8%, 78.3%, 40.6%로 단독처리시의 58.0%, 62.9%, 27.0%보다 유의적으로 높았고(P<0.05), 또한 cycloheximide와의 병용처리도 활성화 및 난할율에서 단독처리와의 유의적 차이를 보였다(P<0.05). 그러나 중복처리시에는 효과를 나타내지 못하였다.
3. 탈핵전 수핵란에 미리 활성화 처리를 한 후 핵이식란을 재구성한 결과 탈핵율 및 세포 융합율에서 90.7%, 71.8%로 활성화 처리하지 않은 것 77.8%, 61.1% 보다 유의적으로 높았다(P<0.05). 그러나 난할율 및 체외 발달율에서는 유의적으로 저하되었다(38.7%, 19.3% vs 68.8%, 30.6%, P<0.05). 또한 변성율도 활성화 처리하지 않은 구에 비해 유의적으로 높게 나타났다(P<0.05).

이상의 결과로 미루어 탈핵전 활성화하여 수핵란으로 이용할 경우 Ca²⁺ ionophore와 6-DMAP를 병용 처리가 가장 효과적이며, 주입되는 체세포와 수핵란 간의 적절한 세포주기의 조절이 효율적인 돼지 복제수정란 생산을 위해 필요할 것이다.

V. 인용문헌

1. Ayogi, Y., Konishi, M., Wada, T. and Takedomi, T. 1994. Unaged bovine oocytes successfully develop to blastocysts after parthenogenetic activation of nuclear transfer. *Theriogenology* 41: 157(abstract).
2. Boquest, A. C., Day, B. N. and Prather, R. D. 1999. Flow cytometry cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells. *Biol. Reprod.* 60:1013-1019.
3. Bordignon, V. and Smith, L. C. 1998. Telophase enucleation: An improved method to prepare recipient cytoplasts for use in bovine nuclear transfer. *Mol. Reprod. Dev.* 49:29-36.
4. Campbell, K. H. S., Loi, P., Otaegui, P. J. and Wilmut, I. 1993. Cell cycle coordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 49:40-46.
5. Collas, P., Sulluvian, E. J. and Barnes, F. L. 1993a. Histone H1 kinase activity in bovine oocytes following calcium stimulation. *Mol. Reprod. Dev.* 34:224-231.
6. Fissore, R. A. and Robl, J. M. 1992. Intracellular Ca²⁺ response of rabbit oocytes to electrical stimulation. *Mol. Reprod. Dev.* 33: 357-362.
7. Fulka, Jr. J. and Moor, R. M. 1993. Noninvasive chemical enucleation of mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 34:427-430.
8. Kono, T., Sotomaru, Y., Apno, F., Takahashi, T., Ogiwara, I., Sekizawa, F., Arai, T. and Nakahara, T. 1994. Effect of ooplast activation on the development of oocytes following nucleus transfer in cattle. *Theriogenology* 47:23-45.
9. Liu, L., Ju, J. C. and Yang, X. 1998a. Parthenogenetic development and protein patterns of newly matured bovine oocytes after chemical activation. *Mol. Reprod. Dev.* 49:298-307.
10. Liu, L., Ju, J. C. and Yang, X. 1998b. Differential inactivation of maturation promoting factor and mitogen-activated protein kinase following parthenogenetic activation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 59:537-545.
11. Prather, R. S., Sims, M. M. and First, N. L. 1989. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol. Reprod.* 41:414-418.
12. Prather, R. S. and First, N. L. 1990. Cloning of embryos. *J. Reprod. Fertil.* 40:227(suppl.).
13. Presicce, G. A. and Yang, X. 1994a. Nuclear dynamics of parthenogenesis of bovine oocytes matured for 20 and 40 hours and activated with combined ethanol and cycloheximide treatment. *Mol. Reprod. Dev.* 37:61-68.
14. Presicce, G. A. and Yang, X. 1994b. Parthenogenetic development of bovine oocytes matured

- for 24h and activated by ethanol and cycloheximide. *Mol. Reprod. Dev.* 38:380-385.
15. Rho, G. J., Wu, B., Leibo, S. P. and Betteridge, K. J. 1996. Bovine parthenogenesis following various oocyte activation regimens. *Biol. Reprod.* 54(Suppl.1).
 16. Shi, Z., Jiang, S. and Yang, X. 1993. Synergistic effect of A23187 and cycloheximide allows effective activation of freshly matured bovine oocytes. *Theriogenology* 38:309(abstract).
 17. Smith, L. C. and Wilmut, I. 1989. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development *in vitro* of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol. Reprod.* 40:1027-1035.
 18. Stice, S. L., Keefer, C. L. and Matthews, L. 1994. Bovine nuclear transfer embryos: oocyte activation prior to blastomere fusion. *Mol. Reprod. Dev.* 38:61-68.
 19. Stice, S. L., Strelchenko, N. S., Keefer, C. L. and Matthews, L. 1996. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 54:1000-110.
 20. Susko-Parrish, J. L., Leibfried-Rutledge, M. L., Notthly, D. L., Schutzkus, V. and First, N. L. 1994. Inhibition of protein kinase after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. *Dev. Biol.* 166:729-738.
 21. Takahashi, S., Kubota, C., Ogata, Y., Tokunaga, T. and Imai, H. 1996. Parthenogenetic activation and development of bovine oocytes treated with protein synthesis or protein phosphorylation inhibitors. *Theriogenology* 45:156 (Abstract)
 22. Tanaka, H. and Kanakawa, H. 1997. Influence of combined activation treatments on the success of bovine nuclear transfer using of aged oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 49:113-123.
 23. Westinhusin, M. E., Pryor, J. H. and Bondioli, K. R. 1991. Nuclear transfer in the bovine embryo: A comparison of 5-day, 6-day, frozen-thawed, and nuclear transfer donor embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 28:119.
 24. Westinhusin, M. E., Levanduski, M. J., Scarborough, Looney and Bondioli, K. R. 1992. Viable embryos and normal cleaves after nuclear transfer into Hoechst stained enucleated demioocytes of cows. *J. Reprod. Fertil.* 95:475.
 25. Yang, X., Jiang, S. and Shi, Z. 1992. Improved activation by combined cycloheximide and electric pulse treatment of bovine follicular oocytes matured for 23-24hr. *Biol. Reprod.* 46(Suppl.):117(abstract).
 27. Yang, X., Presicce, A., Morghan, L., Jiang, S. and Foote, R. H. 1994. Synergistic effect of ethanol and cycloheximide on activation of freshly matured oocyte. *Theriogenology* 41:395-403.
 28. 윤희준, 이효중, 최상용, 박충새. 1998. 활성화된 수핵란을 이용한 핵이식기법의 개선. *한국수정란이식학회지* 13(3):219-226.
- (접수일자: 2003. 5. 7. / 채택일자: 2003. 7. 2.)