

수핵난자와 전기적 융합조건이 산양의 이종간 복제수정란의 체외발달에 미치는 영향

이 명 열 · 박 회 성[†]

진주산업대학교 동물생명과학과 · 동물생명산업지역협력연구센터

Effects of Recipient Oocytes and Electric Stimulation Condition on *In Vitro* Development of Cloned Embryos after Interspecies Nuclear Transfer with Caprine Somatic CellLee, M. Y. and H. S. Park[†]

Department of Animal Science and Biotechnology & RAIRC, Jinju National University

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the developmental ability of caprine embryos after somatic cell interspecies nuclear transfer. Recipient bovine and porcine oocytes were obtained from slaughterhouse and were matured *in vitro* according to established protocols. Donor cells were obtained from an ear-skin biopsy of a caprine, digested with 0.25% trypsin-EDTA in PBS and primary fibroblast cultures were established in TCM-199 with 10% FBS. The matured oocytes were dipped in D-PBS plus 10% FBS + 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cytochalasin B and 0.05M sucrose. Enucleation were accomplished by aspirating the first polar body and partial cytoplasm which containing metaphase II chromosomes using a micropipette with an out diameter of 20~30 μm . A Single donor cell was individually transferred into the perivitelline space of each enucleated oocyte. The reconstructed oocytes were electric fusion with 0.3M mannitol fusion medium. After the electrofusion, embryos were activated by electric stimulation. Interspecies nuclear transfer embryos with bovine cytoplasts were cultured in TCM-199 medium supplemented with 10% FBS including bovine oviduct epithelial cells for 7~9 day. And porcine cytoplasts were cultured in NCSU-23 medium supplemented with 10% FBS for 6~8 day at 39°C, 5% CO₂ in air.

Interspecies nuclear transfer by recipient bovine oocytes were fused with electric length 1.95 kv/cm and 2.10 kv/cm. There was no significant difference between two electric length in fusion rate(47.7 and 44.6%) and in cleavage rate(41.9 and 54.5%). Using electric length 1.95 kv/cm and 2.10 kv/cm in caprine-porcine NT oocytes, there was also no significant difference between two treatments in fusion rate(51.3 and 46.1%) and in cleavage rate(75.0 and 84.9%). The caprine-bovine NT oocytes fusion rate was lower($P<0.05$) in 1 pulse for 60 μsec (19.3%), than those from 1 pulse for 30 μsec (50.8%) and 2 pulse for 30 μsec (31.0%). The cleavage rate was higher($P<0.05$) in 1 pulse for 30 μsec (53.3%) and 2 pulse for 30 μsec (50.0%), than in 1 pulse for 60 μsec (18.2%). The caprine-porcine NT oocytes fusion rate was 48.1% in 1 pulse for 30 μsec , 45.2% in 2 pulse for 30 μsec and 48.6% in 1 pulse for 60 μsec . The cleavage rate was higher($P<0.05$) in 1 pulse for 30 μsec (78.4%) and 1 pulse for 60 μsec (79.4%), than in 2 pulse for 30 μsec (53.6%). In caprine-bovine NT embryos, the developmental rate of morula and blastocyst stage embryos were 22.6% in interspecies nuclear transfer and 30.6% in parthenotes, which was no significant differed. The developmental rate of morula and blastocyst stage embryos with caprine-porcine NT embryos were lower($P<0.05$) in interspecies nuclear transfer(5.1%) than parthenotes(37.4%).

(Key words : Somatic cell, Nuclear transfer, Fusion, Blastocyst, Caprine)

I. 서 론

핵이식 기법은 유전적으로 능력이 우수한 개체를 단기간

* 본 연구는 한국과학재단 지정 진주산업대학교 동물생명산업지역협력연구센터(과제번호: R12-2002-001-01004-0)의 연구비 지원에 의한 것.

[†] Corresponding author : Dept. of Animal Science & Biotechnology, Jinju National University, Jinju, 660-758, Korea. E-mail : hspark@jinju.ac.kr

내 대량생산이 가능함으로써 가축의 개량 및 번식에 가장 유용한 수단중의 하나이다. 뿐만 아니라 희귀·멸종위기 동물의 보존, 형질전환동물의 생산을 통한 인간 대체장기이식용 동물생산, 치료용 생체물질생산, 특정유전인자생산, 질환모델동물의 생산과 줄기세포의 이용으로 세포분화, 세포노화, 세포재생, 세포치료 등의 기초 생물학 혹은 의학적 가치를 지닌 동일한 개체를 무한정 복제가 가능하므로 인간의 질병 치료기술에 응용이 가능하다.

핵이식은 1983년 McGrath와 Solter에 의하여 핵이식에 의한 복제 생쥐가 생산된 이래 소(Prather 등, 1987)를 비롯한 대부분의 포유동물에서 복제동물이 생산되었다. 그러나 Wilmut 등(1997)이 체세포를 이용한 복제면양을 탄생시킨 이후부터 핵이식 기술은 단순 복제동물의 생산에만 국한하지 않고 인간의 질병치료분야에 까지 응용범위가 확대되었다. 뿐만 아니라, Dominko 등(1999)은 소난자에 영장류를 포함한 5종류의 체세포를 이용한 이종간 핵이식을 시도하여 이종간 핵이식란도 reprogramming이 가능함을 증명한 이래 Loi 등(2001)은 이종간 핵이식을 실시하여 면양에서 *Mouflon* (*Ovis ammon musimon*)의 산자를 생산하기에 까지 이르렀다.

그러나 핵이식에 의한 복제동물생산은 낮은 수태율, 거대산자, 조기노화 내지 사망, 기형산자 생산 등의 문제가 해결되지 않고 있으며, 뿐만 아니라, 미세조작기술, 공여핵과 수핵란의 세포주기조절, 공여핵의 종류, 공여핵의 분화정도, 핵이식란의 융합, 활성화, 배양조건, 핵이식란의 reprogramming 기전 등을 해결하기 위해서는 많은 연구가 진행되어야 할 것이다. 본 연구는 인간의 질병치료 및 멸종위기동물의 종 보존 등에 활용할 수 있는 기초자료를 얻고자 재래산양(*Capra hircus*)을 공여세포로 이용하고 소와 돼지 난자를 수핵란으로 하여 이종간 핵이식을 실시하여 융합, 분할 및 체외발달을 등을 조사하여 최적의 수핵난자 및 공여세포의 조건을 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공여세포의 분리 및 배양

공여세포는 성숙한 재래산양(*Capra hircus*)으로부터 귀를 5×5mm 정도 크기로 절제하여 채취하였으며, D-PBS(Sigma, U.S.A)로 세정한 후 미세하게 세절하여 0.25% trypsin-EDTA(Sigma, U.S.A)가 첨가된 D-PBS로 분리한 다음 10% FBS(Gibco, U.S.A)가 첨가된 TCM-199(Sigma, U.S.A) 배양액으로 원심분리를 실시하여 세정하였다. 세정한 세포는 10% FBS

가 첨가된 TCM-199로 25 cm² flask(Falcon, U.S.A)에 분주하여 5% CO₂ 98~99% 습도, 39°C 배양기내에서 배양을 실시하였으며, 바닥에 세포가 붙는 것을 확인한 후 3일 간격으로 신선한 배양액으로 교체하면서 배양을 실시하였다. 계대배양은 공여세포가 flask에서 90% 이상 confluence 되었을 때 0.25% trypsin과 EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 1:2 비율로 나누어 반복해서 배양을 실시하였다.

공여세포의 동결은 10% DMSO(Sigma, U.S.A) 및 10% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 동결 보존해 두고, 핵이식에 사용할 때는 39°C 온수에 용해하여 동결보호제를 제거한 다음 10% FBS가 첨가된 신선한 TCM-199 배양액을 첨가하여 4-well dish에 분주하여 배양기 내에서 배양을 실시하였다. 10% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 배양한 세포가 dish 바닥에 monolayer 형성이 충분히 되었을 때, 0.5% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 3~5일간 기아배양을 실시하였다.

2. 수핵난자 준비

본 실험에 사용된 난포란은 도축장에서 도축되는 암소 및 모든 난소의 난포로부터 채취하였으며, 도살직후 적출된 난소는 100units/ml penicillin G(Sigma U.S.A)와 100 µg/ml의 streptomycin(Sigma, U.S.A)이 첨가된 37°C의 멸균된 생리식염수에 담아 1~2시간 내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 상기 항생제가 첨가된 37~39°C의 신선한 생리식염수로 3~4회 세척하여 표면을 멸균된 키친타올로 깨끗이 닦은 후 18G needle이 부착된 10 ml 주사기로 난포액과 함께 난포란을 흡입하여 미성숙 난포란을 채취하였다. 회수된 난포란은 39°C 배양기내에서 15분간 정치시킨 후 도립현미경(Nikon, Japan)하에서 난포란을 채집하였으며, 난포란은 난구세포층이 치밀하고 세포질이 양호한 난포란만을 선별하여 체외성숙을 유도하였다.

난포란의 체외성숙은 소 난포란의 경우 25 mM의 HEPES가 첨가된 TCM-199 체외성숙용 기본배양액에 10% FBS, 10 µg/ml LH(luteinizing hormone), 1 µg/ml estradiol 17-β 및 35 µg/ml FSH(follicular stimulating hormone)을 첨가하였으며, 돼지 난포란은 NCSU-23에 10% FBS, 10% pFF(porcine follicular fluid), 10 µg/ml LH(Sigma, U.S.A), 1 µg/ml estradiol 17-β(Sigma, U.S.A), 2.5 µg/ml FSH(Sigma, U.S.A) 및 2I U/ml hCG(human chorionic hormone)을 첨가하여 5% CO₂ 98~99% 습도, 39°C 배양기 내에서 3시간 이상 전 배양을 시킨 다음 4 well-dish(NUNC, Denmark)에 well 당 30~40개의 미성숙 난포란을 적하하여 소 난포란은 22~24시간, 돼지 난포란은 46~48시간

동안 배양함으로써 체외성숙을 유도하였다.

3. 핵이식

핵이식에 사용된 피펫은 직경이 1mm인 capillary tube (Narishige, Japan)를 증류수, H₂SO₄ 및 Nonidet P-40(Sigma U.S.A)로 세척한 다음 Sigmacote(Sigma U.S.A)로 실리콘 처리를 한 후 멸균시켜 보정용 피펫(holding pipette), 탈핵용 피펫(enucleation pipette) 및 주입용 피펫(injection pipette)을 각각 달리 제작하였으며, 피펫의 세공은 먼저 micropipette puller(Narishige, Japan)를 이용하여 피펫을 날카롭게 뽑은 다음 micropipette grinder(Narishige, Japan)로 끝부분을 경사지고 날카롭게 제작하였다. 보정용 피펫은 끝부분을 일직선이 되게 절단한 후 microforge(Narishige, Japan)로 무디게 하였으며, 이때 피펫의 외경은 160~180 μm 의 크기로 제작하였다. 탈핵과 주입용 피펫은 외경이 20~30 μm 가 되게 하였으며, 증류수 및 H₂SO₄로 세척한 다음 멸균시켜 사용하였다.

체외성숙이 이루어진 수핵난자는 0.3% hyaluronidase (Sigma, U.S.A)가 첨가된 D-PBS로 3~5분간 처리하여 난구세포를 제거하고 10% FBS가 첨가된 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 먼저 2개의 각기 다른 배양액 (60~80 μl)소적을 만들었으며, 첫 번째 소적에는 10% FBS가 첨가된 D-PBS 배양액에 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 cytochalasin B (Sigma, U.S.A)와 0.05 M의 sucrose를 첨가하여 수핵난자를 넣었다. 두 번째 소적에는 기아배양을 실시한 공여세포를 필요한 양만큼 넣고 먼저 주입용 피펫에 다수의 공여세포를 흡입하여 loading한 후 수핵난자는 탈핵 및 주입용 피펫의 삽입을 용이하게 하기 위하여 zona drilling한 다음 탈핵용 피펫을 위관강내로 진입시켜 극체와 세포질을 흡입하여 제거하였다. 이때 세포질의 제거는 약 30~40% 정도의 세포질을 흡입함으로써 핵을 제거하였다. 탈핵한 난자는 곧바로 세포질이 제거된 공간에 공여세포를 세포질과 부착되게 주입함으로써 미세조작 과정을 완료하였다.

Laser system(MTM, Switzerland)을 이용한 zona drilling은 Park 등(2001)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, laser system이 부착된 도립현미경하에서 laser전용 렌즈($\times 400$)로 drilling할 수핵난자의 투명대를 맞춘 다음 20~40 μsec 의 강도로 laser를 1~2회 투과시킴으로써 zona drilling을 실시하였다. 이때 drilling은 핵이식조작시 불필요한 배양액의 침투 등을 막기 위하여 zona 두께의 약 60~80% 정도의 부분적 drilling 하

였다. 공여세포가 주입된 수핵난자는 cytochalasin B의 충격으로부터 수핵난자를 예방하기 위하여 곧바로 조작용 배양액에서 10% FBS가 첨가된 D-PBS로 옮긴 다음 전기융합 전까지 10% FBS가 첨가된 TCM-199 및 NCSU-23 배양액에서 30분~1시간 동안 배양을 실시하였다.

4. 핵과 세포질의 융합 및 활성화

핵이식이 완료된 난자의 공여세포와 수핵난자의 세포질 융합은 전기세포융합장치(BTX, U.S.A)로 실시하였다. 이때 융합매지는 0.1mM CaCl₂(Sigma, U.S.A) 및 0.1mM MgSO₄(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 "+" 극쪽으로 향하게 하고 세포질은 "-" 극쪽으로 향하게 하여 직류전류(DC)로 1.95~2.10 kv/cm, 30~60 μsec , 1~2회 통전하여 세포 융합을 유도하였다. 통전 후 핵이식란은 수핵란이 소 난자의 경우 10% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액으로, 돼지 난자는 10% FBS가 첨가된 NCSU-23 배양액으로 배양을 실시하였다. 융합여부는 배양 후 1시간 정도 경과 후에 판단하였다.

융합이 이루어진 핵이식 수정란의 활성화는 전기세포융합장치로 교류전류(AC) 5 v/mm, 5sec, 1회와 직류전류(DC) 1.56 kv/cm, 30 μsec , 1회 전기적 자극으로 융합란의 활성화를 유도하였다.

5. 복제수정란의 체외배양 및 염색체 분석

전기적 활성화를 유도한 이종간 핵이식란의 체외배양은 수핵란이 소 난자를 이용한 경우 소 난관상피세포의 monolayer가 형성된 10% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액에 넣어 5% CO₂, 98~99% 습도, 39 $^{\circ}\text{C}$ 배양기 내에서 48시간마다 10% FBS가 첨가된 신선한 TCM-199 배양액으로 교환하면서 7~9 일동안 체외배양을 실시하였으며, 수핵란이 돼지 난자를 이용한 경우는 10% FBS가 첨가된 NCSU-23 배양액에 넣어 5% CO₂, 98~99% 습도, 39 $^{\circ}\text{C}$ 배양기 내에서 48시간마다 10% FBS가 첨가된 신선한 NCSU-23 배양액으로 교환하면서 6~8일까지 체외배양을 실시하여 후기배로의 발달을 유도하였다. 염색체 분석은 본 학과 세포유전학실험실에서 실시하여 하였다.

6. 통계학적 분석

실험결과와 통계학적 분석은 SAS package를 이용하여 요인간의 유의차를 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 전기자극 조건이 이종간 핵이식란의 융합 및 분할율에 미치는 영향

산양 체세포를 공여핵으로 이용한 이종간 핵이식란은 공여세포와 수핵란의 융합을 위하여 전기자극의 세기, 시간 및 횟수가 융합 및 분할율에 미치는 영향은 Table 1 및 2에서 보는 바와 같다.

전기자극의 세기를 1.95 kV/cm와 2.10 kV/cm로 주었을 때 수핵란이 소 난자의 경우 융합율은 47.7 및 44.6%였으며, 분할율도 41.9 및 54.5%로써 차이가 없었다. 수핵란이 돼지 난자인 경우는 융합율은 51.3 및 46.1%로써 차이가 없었으며, 분할율도 75.0 및 84.9%로써 차이가 없었다. 전기융합 세기를 2.1kV/cm로 고정하고, 전기자극 시간을 30 또는 60 μ sec, 횟수는 1 또는 2회 주었을 때 수핵란이 소 난자의 경우 융합율은 30 μ sec 1회(50.8%)와 2회(31.0%)간에 차이가 없었으나, 60 μ sec 1회(19.3%)가 가장 낮았다($P < 0.05$). 융합란의 분할율은 30 μ sec 1회(53.3%)와 2회(50.0%)간에 차이가 없었으

나, 60 μ sec 1회(18.2%)보다 유의적($P < 0.05$)으로 높게 나타났다. 돼지 난자의 경우 융합율은 30 μ sec 1회(48.1%), 2회(45.2%) 및 60 μ sec 1회(48.6%)간에 차이가 없었으며, 분할율은 30 μ sec 1회(78.4%)와 60 μ sec 1회(79.4%)간에 차이가 없었으나, 30 μ sec 2회(53.6%)보다 유의적($P < 0.05$)으로 높게 나타났다.

White 등(1999)은 argali(*Ovis ammon*)의 피부섬유아세포를 이용하여 면양(*Ovis aries*)의 난자에 핵이식 후 1.4 kV/cm, 30 μ sec, 2회 전기자극을 주었을 때 융합율은 77%였다. Saikhun 등(2002)은 buffalo(*Bubalus bubalis*)의 태아섬유아세포, 난구세포, 난관세포를 이용하여 소(*Bos indicus*)의 난자에 핵이식을 실시하여 2.1 kV/cm, 20 μ sec, 1회 전기자극을 주었을 때 융합율은 각각 77, 73 및 83%였으며, 분할율은 각각 84, 68 및 78%로써 본 연구에서 돼지 난포란을 수핵난자로 사용하여 1.95 kV/cm, 30 μ sec, 1회 전기자극을 주었을 때의 융합율 51.3% 보다 높게 나타났다. Sansinena 등(2002)은 소의 수핵난자에 각각 다른 두 마리의 암말 및 암소의 섬유아세포를 핵이식 후 1.5~1.9 kV/cm, 30 μ sec, 2회 전기자극을 주었을 때

Table 1. Effect of electrical field strength on fusion and cleavage rates of caprine interspecies nuclear transferred oocytes

Recipient oocytes	Electric length(KV/cm)	No. of oocytes manipulated	No. of oocytes fused (%)	No. of oocytes cleaved (%)
Bovine	1.95	65	31(47.7)	13(41.9)
	2.10	74	33(44.6)	18(54.5)
Porcine	1.95	78	40(51.3)	30(75.0)
	2.10	115	53(46.1)	45(84.9)

* There are not significantly different on the same column($P < 0.05$).

Table 2. Effect of duration and pulse of electric stimulation on fusion and cleavage rates of caprine interspecies nuclear transferred oocytes

Recipient oocytes	Duration (μ sec)	Pulse (times)	No. of oocytes manipulated	No. of oocytes fused (%)	No. of oocytes cleaved (%)
Bovine	30	1	59	30(50.8) ^a	16(53.3) ^a
		2	58	18(31.0) ^{ab}	9(50.0) ^a
	60	1	57	11(19.3) ^b	2(18.2) ^b
Porcine	30	1	77	37(48.1) ^a	29(78.4) ^a
		2	62	28(45.2) ^a	15(53.6) ^b
	60	1	70	34(48.6) ^a	27(79.4) ^a

* Values with different superscripts were significantly different($P < 0.05$).

융합율은 각각 54, 60 및 51%, 분할율은 각각 70, 50 및 51%로써 융합율과 분할율은 공여세포와 수핵란이 동종과 이종간의 핵이식에 따른 차이가 없었다고 보고하였다. Chen 등(2002)은 panda-rabbit와 cat-rabbit의 이종간 핵이식 후 1.4 kv/cm, 80 μ sec, 2회 전기자극을 주어 얻은 57.2 및 48.7%의 융합율은 본 연구와 비슷한 결과이다. Dominko 등(2000)은 chinese hamster ovary cells를 이용하여 bovine 와 hamster의 난자에 이식하여 45 및 38%의 융합율을 얻었다고 보고한 성적은 본 연구 결과보다 다소 낮은 성적이다. Bui 등(2002)은 멸종위기 동물인 Saola(*pseudoryx nghetinhensis*) 피부 세포를 공여세포로 이용하여 소 난자에 핵이식을 실시 하였을 때 융합율과 분할율은 60.67 및 79.12%로써 공여세포를 소로 이용하였을 때 53.21 및 78.92%와 차이가 없었다고 보고하였다.

이상의 결과에서 이종간 핵이식란의 융합율과 분할율은 핵이식에 사용한 공여세포와 수핵란의 전기자극의 세기, 시간 및 횟수뿐만 아니라 동물의 종(계통), 공여세포의 종류, 배양기간 등 다양한 요인들이 영향을 미치는 것으로 보인다. 따라서 이종간의 핵이식에 있어서 전기자극에 의한 융합은 동종간의 핵이식란 보다는 다양한 조건들을 종합적으로 검토하여 융합조건을 확립해야 할 것으로 생각된다.

2. 이종간 핵이식 수정란의 체외발달

이종간 핵이식란의 체외배양은 수핵란이 소의 경우 난관상피 세포의 monolayer가 형성된 10% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액에서, 돼지는 10% FBS가 첨가된 NCSU-23 배양액으로 7-9일간 체외배양을 실시하여 상실배 또는 배반포기로의 발달율은 Table 3에서 보는 바와 같다.

이종간 핵이식란의 체외발달에 있어서 수핵란이 소 난자

의 경우 상실배와 배반포기로의 발달율이 22.6%로써 단위발생란 30.6%와 차이가 없었으며, 돼지 난자의 경우는 이종간 핵이식란이 5.1%로써 단위발생란 37.4% 보다 유의적($P < 0.05$)으로 낮게 나타났다.

Tao 등(1999)은 돼지의 태아섬유아세포를 이용한 핵이식란을 NCSU-23 배양액으로 배양을 실시하였을 때 상실배 및 배반포기로의 발달율은 44.4%였고, 단위발생란은 TL-Hepes (calcium-free) 및 NCSU-23 배양액으로 배양을 하였을 때 상실배 및 배반포기로의 발달율은 27.6 및 15.7%로써 TL-Hepes로 배양한 단위발생란이 높게 나타났는데 이것은 본 연구에서 돼지 난자를 이용한 단위발생란의 경우 상실배 및 배반포기로 발달율 37.4%보다는 다소 낮은 성적이다. 박과 박(2002)은 돼지 난포란을 단위발생을 유도하였을 때 상실배(23.8%)와 배반포기(6.4%) 발달율이 핵이식 수정란에 비하여 높게 나타났다고 하였다. Chen 등(2002)은 panda-rabbit 와 cat-rabbit의 이종간 핵이식 후 10% FBS가 첨가된 M199 배양액으로 배양을 실시하였을 때 배반포기로의 발달율은 18.5 및 5.2%로써 공여세포와 수핵난자로 사용한 동물종간에 차이가 있다고 하였다.

이상의 결과로 볼 때 이종간 핵이식란은 단위발생란 및 체외수정란에 비하여 상실배 및 배반포기로의 발달율이 낮게 나타났으며, 산양의 이종간 핵이식시 수핵란은 돼지보다는 소를 사용하는 게 좋을 것으로 생각된다. 이종간 핵이식에 있어서 수핵란, 공여세포, 융합, 활성화 및 배양조건 등 아직 초보 수준에 있으며, 앞으로 보다 많은 연구를 통하여 이러한 문제들이 해결되면 멸종위기 상태에 있는 동물들의 종 보존에도 활용이 가능할 것으로 생각된다.

IV. 요약

Table 3. *In vitro* development of cloned embryos by interspecies nuclear transfer with caprine somatic cells

Recipient oocytes	Embryos	No. of cleaved oocytes	No. of oocytes developed to (%)		
			4-cell	8-cell	Mol. & Blst
Bovine	Parthenotes	72	45(62.5)	39(54.2)	22(30.6) ^a
	INT**	31	19(61.3)	10(32.3)	7(22.6) ^a
Porcine	Parthenotes	139	105(75.5)	80(57.6)	52(37.4) ^a
	INT**	39	31(79.5)	13(33.3)	2(5.1) ^b

* Values with different superscripts were significantly different($P < 0.05$).

** INT : Interspecies nuclear transfer.

본 연구는 이종간 핵이식란의 생산성 향상에 기여하기 위한 기초연구로서 핵이식 수정란의 융합과 활성화 과정에 있어서 수핵난자 및 전기적 융합조건이 핵이식 수정란의 융합 및 체외발달에 미치는 요인들을 조사하기 위하여 실시하였다. 도축되어지는 소 및 돼지의 난소에서 난포란을 채취하여 TCM-199 및 NCSU-23에 혈청 및 호르몬을 첨가하여 39°C, 5% CO₂ 배양기내에서 24 및 48시간 체외성숙을 실시하여 수핵난자를 준비하고, 공여세포의 준비는 산양의 귀세포를 채취하여 0.25% Trypsin-EDTA의 처리로 세포를 분리, 배양하여 사용하였으며, 계대배양과 함께 세포는 TCM-199 + 10% FBS + 10% DMSO로 동결을 실시하였다. 핵이식은 성숙된 난자의 극체 및 전핵을 laser system으로 투명대를 drilling 하여 제거하고 준비된 공여세포를 핵이 제거된 난자에 주입하여 전기적 자극으로 융합을 실시하여 융합된 난자는 전기적 자극으로 활성화를 유도하였다. 활성화가 이루어진 복제 수정란은 수핵란이 소난자의 경우 monolayer가 형성된 10% FBS가 첨가된 TCM199 배양액에서 7~9일 동안 체외배양하였으며, 수핵란이 돼지의 경우 10% FBS가 첨가된 NCSU-23 배양액으로 6~8일 동안 체외배양을 실시하여 배반포기로 유도하였다. 본 연구에서 얻은 결과를 요약하면 다음과 같다.

전기자극의 세기를 1.95 kv/cm와 2.10 kv/cm로 주었을 때 수핵란이 소 난자의 경우 융합율은 47.7 및 44.6%였으며, 분할율도 41.9 및 54.5%로써 차이가 없었다. 수핵란이 돼지 난자인 경우는 융합율은 51.3 및 46.1%로써 차이가 없었으며, 분할율도 75.0 및 84.9%로써 차이가 없었다. 전기자극 시간을 30 또는 60 μ sec, 횟수는 1 또는 2회 주었을 때 수핵란이 소 난자의 경우 융합율은 30 μ sec 1회(50.8%) 와 2회(31.0%) 간에 차이가 없었으나, 60 μ sec 1회(19.3%)가 가장 낮았다($P < 0.05$). 융합란의 분할율은 30 μ sec 1회(53.3%)와 2회(50.0%) 간에 차이가 없었으나, 60 μ sec 1회(18.2%)보다 유의적($P < 0.05$)으로 높게 나타났다. 돼지 난자의 경우 융합율은 30 μ sec 1회(48.1%), 2회(45.2%) 및 60 μ sec 1회(48.6%)간에 차이가 없었으며, 분할율은 30 μ sec 1회(78.4%)와 60 μ sec 1회(79.4%)간에 차이가 없었으나, 30 μ sec 2회(53.6%)보다 유의적($P < 0.05$)으로 높게 나타났다. 이종간 핵이식란의 체외발달에 있어서 수핵란이 소 난자의 경우 상실배와 배반포기로의 발달율이 22.6%로써 단위발생란 30.6%와 차이가 없었으며, 돼지 난자의 경우는 이종간 핵이식란이 5.1%로써 단위발생란 37.4% 보다 유의적($P < 0.05$)으로 낮게 나타났다. 이상의 실험결과로 보아 산양의 체세포를 이용한 이종간 핵이식 복제수정란의 생산을 위하여 수핵란으로 소와 돼지를 사용하여 복제수정란의 발달을 확인할 수 있었으며, 이종간 핵

이식에 있어서 수핵란, 공여세포, 융합, 활성화 및 배양조건 등 아직 초보 수준에 있으며, 앞으로 보다 많은 연구를 통하여 이러한 문제들이 해결되면 멸종위기 상태에 있는 동물들의 종 보존에도 활용이 가능할 것으로 생각된다.

V. 인용문헌

- Bui, L. C., Vignon, X., Campon, E., Laloy, E., Lavergne, Y., Yy, L. V., Nguyen, B. X. and Renard, J. P. 2002. Use of interspecies nuclear transfer to study the early embryonic development and nuclear activities of the endangered species pseudoryx nghetinhensis(SAOLA). *Theriogenology* 57 : 427(abstr).
- Chen, D. Y., Wen, D. C., Zhang, Y. P., Sun, Q. Y., Han, Z. M., Liu, Z. H., Shi, P., Li, J. S., Xiangyu, J. G., Lian, L., Kou, Z. H., Wu, Y. Q., Chen, Y. C., Wang, P. Y. and Zhang, H. M. 2002. Interspecies implantation and mitochondria fate of panda-rabbit cloned embryos. *Biol. Reprod.* 67 : 637-642.
- Dominko, T., Mitalipova, M., Haley, B., Beyhan, Z., Memili, E., McKusick, B. and First, N. 1999. Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biol. Reprod.* 60 : 1496-1502.
- Dominko, T., Simerly, C., Ramalho-Santos, J., Moreno, R., Chan, A.W.S. and Schatten, G. P. 2000. Donor chromatin transfection after nuclear transfer into metaphase II -Arrested oocytes depends on the species of recipient cytoplasm. *Theriogenology* 53 : 216(abstr).
- Loi, P., Ptak, G., Barboni, B., Fulka, J. Jr., Cappai, P. and Clinton, M. 2001. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nature Biotechnology* 19 : 962-964.
- McGrath, J. and Solter, D. 1983. Nuclear transplantation in the mouse embryo on micromanipulation and cell fusion. *Science* 220 : 1300-1302.
- Park, H. S., Jin, J. I., Hong, S. P., Lee, J. S. and Jung, J. Y. 2001. Effect of laser drilling on blastocyst hatching and pregnancy rates from *in vitro* produced cattle embryos. *Theriogenology* 55 : 352(abstr).
- Prather, R., Barnes, F. L., Sins, M. M., Robl, J. M.,

- Eyestone, W. H. and First, N. L. 1987. Nuclei transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.* 37 : 859-866.
9. Saikhun, J., Pavasuthipaisit, K., Jaransuwan, M. and Kitiyanant, Y. 2002. Xenonuclear transplantation of buffalo (*Bubalus bubalis*) fetal and adult somatic cell nuclei into bovine (*Bos indicus*) oocyte cytoplasm and their subsequent development. *Theriogenology* 57 : 1829-1837.
10. Sansinena, M. J., Reggio, B. C., Denniston, R. S. and Godke, R. A. 2002. Nuclear transfer embryos from different equine cell lines as donor 1 using the bovine oocyte as recipient cytoplasm. *Theriogenology* 6577 : 1-3.
11. Tao, T., Machaty, Z., Boquest, 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. *Ani. Reprod. Sci.* 56 : 133-141.
12. White, K. L., Bunch, T. D., Mitalipov, S. and Reed, W. A. 1999. Establishment of pregnancy after the transfer of nuclear transfer embryos produced from the fusion of argali (*Ovis ammon*) nuclei into domestic sheep (*Ovis aries*) enucleated oocytes. *Cloning* 1 : 47-54.
13. 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.
14. 박준규, 박희성, 2002. 전기적 융합조건이 돼지 핵이식 수정란의 융합 및 체외발달에 미치는 영향. *한국수정란 이식학회지* 26 : 125-132.
- (접수일자: 2004. 2. 4. / 채택일자: 2004. 2. 28.)