

Demecolcine 처리에 의한 탈핵과 수핵란 세포질의 세포 주기가 소 핵이식란의 발육에 미치는 영향

백진주 · 박춘근 · 양부근 · 김정익 · 정희태*

강원대학교 동물자원과학대학

초 록

본 연구는 demecolcine 처리에 의한 탈핵과 수핵란 세포질의 세포 주기가 소 체세포 핵이식란의 발육에 미치는 영향을 검토하였다. 체외에서 16~20시간 성숙배양된 난자를 극체 방출 유무 및 MI, MII기 난자로 구분하여 0.4 μ L/mL demecolcine으로 40분간 처리 후 염색체 부위가 돌출된 난자는 탈핵 후 핵이식에 공시하였다. 소의 귀 피부 세포를 탈핵란에 이식하여 전기융합과 활성화 처리(Ca-ionophore+DMAP)를 거쳐 체외 배양하였다. Demecolcine 처리 후 86.2%의 난자가 염색체 부위의 돌출을 보여 이 중 98.8%가 탈핵에 성공하였다. Demecolcine은 핵이식란의 발육에 영향을 주지 않았다. 제1극체 방출란 유래 핵이식란의 배반포 발육율은 극체 미방출란 유래 핵이식란에 비하여 유의적으로 높았다(18.2% vs. 4.6%; $P<0.05$). 한편, MI 난자 유래 핵이식란의 분할율 및 배반포 발육율은(69.4%와 5.9%) MII 난자 유래 핵이식란에 비하여 유의적으로 낮았다(96.7%와 23.9%, $P<0.05$). 본 연구의 결과는 demecolcine 처리가 소 난자의 탈핵에 매우 효과적이며 MII기 난자가 MI기 난자에 비하여 수핵란 세포질로 더 적절하나 극체 미방출란 및 MI기 난자도 비록 제한적이기는 하지만 핵이식란의 배반포 발육을 지원할 수 있음을 보여준다.

(주제어 : Nuclear transfer, Enucleation, Demecolcine, Recipient cell cycle stage, *In Vitro* development, Bovine)

서 론

체세포 핵이식에 의한 복제동물 생산 효율은 donor 핵과 수핵란 세포질의 세포주기나 핵과 세포질 간의 상호작용과 같은 세포학적 요인과 탈핵, 융합, 활성화 처리와 같은 기술적 요인에 의해 영향을 받을 수 있다. 특히, 미수정란의 탈핵 과정은 수핵란의 핵물질을 완전하게 제거하여 핵이식 후 생산된 재구축배의 정상적인 배수성 유지를 위해 매우 중요하다. 제 1극체와 극체 주위의 세포질을 제거하여 탈핵하는 기존의 방법은 탈핵율이 저조하며(Barnes 등, 1993), 많은 양의 세포질을 제거하게 되므로 재구축란의 발육에 나쁜 영향을 줄 수 있다.

돼지와 소 난자의 경우 Hoechst 33342로 염색하여 UV 광원 하에서 핵의 위치를 확인한 후 제 1극체와 중기 염색체를 제거하는 방법이 이용될 수 있으나(Tsunoda와 Kato, 2000), 단백질 변성이나(Smith 등, 1993), 생존율 감소(Yang 등, 1990) 등이 보고되고 있다. Liu 등(2002)은 0.3M 이상의 sucrose가 포함된 고장액으로 처리하여 난자를 수축시키고 원형질막에 metaphase II(MII)기 염색체를 돌출시켜 탈핵을 시도하였다. 또한, Mohamed 등(1999)은 탈핵 전 인위적인 활성화 처리로 수핵란의 세포 주기를 Telophase II기로 유도하고 세포막으로 돌출된 핵을 확인하면서 탈핵하는 방법을 이용하였다. 그러나 활성화 처리

된 난자는 세포질 내 성숙 촉진인자 (maturation promoting factor; MPF)의 활성이 감소되며 체세포를 이식하였을 경우 donor 세포의 세포 주기에 관계없이 재구축란의 발육이 제한된다(Tani 등, 2001). 최근 Yin 등은 돼지(2002a)와 토끼(2002b)의 성숙난자에 demecolcine을 처리하여 70% 이상의 수핵란에서 세포질 막으로 염색질(chromosome mass)이 돌출되는 것을 확인하고 이를 탈핵에 이용하여 적은 양의 세포질을 흡입하고도 높은 탈핵율을 얻을 수 있음을 보고하였으며, Gasparrini 등(2003)은 탈핵 시 demecolcine을 이용하여 배아 줄기 세포(Embryonic stem cell, ES) 유래의 복제 쥐를 생산하였다. 따라서 소에서도 화학적으로 염색질을 세포막으로 돌출시켜 탈핵하는 방법을 이용하여 수핵란의 이용 효율을 높일 수 있을 것으로 기대된다.

이식된 핵의 초기화(reprogramming)와 관련된 핵-세포질 상호작용 역시 핵이식 재구축란의 발육과정에 중요한 영향을 미친다(Cheong 등, 1993). 핵이식 복제 동물의 생산을 위한 대부분의 연구에서 활성화 되지 않은 MII기 난자를 이용하였다(Wilmot 등, 1997; Kato 등, 1998; Polejaeva 등, 2000). MPF 수준이 높은 MII기 난자를 수핵란으로 사용할 경우 이식된 donor 핵의 핵막붕괴(nuclear envelop break down; NEBD)와 미성숙 염색체 응축(premature chromosome condensation; PCC)이 일어나는 등 다양한 형태적 변화를 거치게 된다(Cheong 등, 1994). 그

* 본 연구는 2004년도 농림기술개발사업 기획연구과제의 연구지원(300012-5)에 의해 수행되었음.

* Corresponding author : H. T. Cheong, Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

E-mail: htcheong @kangwon.ac.kr

러나 체세포 핵이식에 있어서 활성화 처리 후, MPF 활성이 낮은 상태의 세포질에 donor 핵이 이식되었을 때에는 이러한 변화가 일어나지 않으며, 이후 발육율도 감소되는 것으로 보고되었다(Tani 등, 2001). 따라서 핵과 세포질간의 상호 작용에 있어 수핵란의 세포 주기가 핵이식란의 발육에 크게 영향을 미치는 것으로 여겨진다. 난자 성숙 과정 동안 MPF 활성은 metaphase I(MI)기 난자와 MII기 난자 모두에서 최고조로 나타난다(Campbell 등, 1996). 이론상으로 MI기 난자를 수핵 세포질로 이용할 경우에도 donor 핵이 높은 수준의 MPF 활성화에 노출되므로 효과적인 핵의 초기화가 가능할 것이다. 돼지(Miyoshi 등, 2001)와 토끼(Zhang 등, 2004)를 이용한 연구에서 MI기 난자를 이용한 체세포 핵이식란의 발달 효율은 MII기 난자를 이용하였을 때보다 저조한 것으로 보고되었으나, MI기 난자도 핵이식에 이용할 수 있는 가능성이 확인되었다.

본 연구는 소 체세포 핵이식에 있어서 demecolcine 처리에 의한 탈핵과 수핵란의 세포 주기에 따른 핵이식란의 발육능을 검토하였다.

재료 및 방법

난포란의 채취 및 성숙배양

도축장에서 도살된 암소의 난소를 회수하여 30~35°C의 생리식염수 용액에 넣어 실험실로 운반하여 직경 2~7 mm의 난포로부터 18 gauge 주사바늘이 부착된 주사기로 난포액을 흡입하여 미성숙 난자를 채취하였다. 채취된 난자는 실제 현미경 하에서 난구세포가 균일하고 세포질이 균질한 것만을 선별하여 난자성숙용 배양액으로 수회 세척 후 성숙배양에 이용하였다. 난포란의 성숙배양액은 TCM-199액(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)에 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco-BRL), 0.2 mM Na-pyruvate, 0.02 IU/mL FSH(Sigma, St. Louis, MO, USA), 1 µg/mL 17β-estradiol(Sigma) 및 50 µg/mL gentamicin(Gibco-BRL)이 함유된 성숙배양액을 50 µL의 소적으로 만들어 paraffin oil로 피복하고 성숙배양 2~3시간 전에 5% CO₂ 39°C의 조건 하에서 평형시킨 후, 각 소적당 10개의 난포란을 넣어 16~20시간 배양하였다.

Whole-Mount 표본의 제작

체외에서 성숙시킨 난자의 세포 주기를 판단하기 위하여 성숙된 난자를 고정하여 표본을 제작하였다. 성숙란을 vaseline과 paraffin 혼합물(9:1)로 사각에 소적을 배치한 slide glass 위에 소량의 배양액과 함께 옮겨놓고 cover glass로 가볍게 압착하였다. 그 후 ethanol과 acetic acid를 3:1로 혼합한 고정액으로 24~72시간 고정한 후 aceto-orcein으로 5분간 염색하고 25% aceto-glycerol로 세척하여 위상차 현미경으로 관찰하여 난자의 세포주기를 판단하였다.

체세포의 준비

소 귀 피부세포는 Choi 등(2004)의 방법에 따라 준비하여 배양 후 동결보존하였다. 동결보존된 체세포는 사용 전에 용해하여 10% FBS, 0.2 mM Na-pyruvate 및 50 µg

/mL gentamicin이 함유된 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM, Gibco-BRL)으로 200 ×g의 조건에서 5분간 원심 분리하여 세척한 다음 신선한 세포배양액에 재부유시켜 4-well dish에 0.5mL씩 분주하여 5% CO₂ 및 37°C의 조건에서 10일 이상 장기 배양하여 높은 세포 밀도(confluence 상태)를 만들어 줌으로써 G0/G1기에 동조시켰다. 배양된 세포의 G0/G1기 동조 여부는 본 실험에서는 검토하지 않았으나 별도의 실험에서 90% 이상의 세포가 G0/G1기에 동조되는 것으로 확인되었다(Cheong 등, 2003).

Demecolcine 처리

체외에서 16~20시간 체외 성숙시킨 난포란을 1 mL의 TCM-199액과 1 mL hyaluronidase(300 IU/mL)가 들어 있는 원심관에 옮겨 vortex mixer로 5분간 처리하여 난구세포를 제거한 후, 세포질의 색조가 균일한 난자를 실험에 따라 제 1극체가 확인된 난자와 확인되지 않은 난자를 분리하여 이용하였다. 난구세포가 제거된 난자는 0.4 µL/mL demecolcine으로 40분간 처리하고, 3 mg/mL BSA를 함유한 TCM-199액의 drop으로 옮겨 15분간 정지시킨 후 chromosome mass의 돌출이 확인된 난자를 실험에 이용하였다.

핵이식

모든 미세조작은 실온에서 DIC 장치와 Narishige 미세조작기가 갖춰진 독립현미경을 이용하여 5 µg/mL cytochalasin B가 함유된 수정 TCM-199 + 3 mg/mL BSA 액의 배양소적(50 µL) 내에서 실시하였다. 먼저 고정용 피펫(holding pipette; OD 150~200 µm)으로 난자를 고정시키고, 주입용 피펫(injection pipette; ID 30 µm)을 이용하여 대조구의 경우 제 1극체와 주변의 세포질을 약 1/3 정도 흡입하여 제 2 성숙분열 중기 염색체를 제거하는 방법으로 탈핵을 실시하였다. Demecolcine을 처리한 난자는 chromosome mass의 돌출을 확인하고 돌출된 chromosome mass를 제거하는 방법으로 탈핵을 실시하였다. 이때 제 1극체가 방출된 난자는 제 1극체를 함께 제거하였다. 탈핵된 세포질은 1 µg/mL의 Hoechst 33342(Sigma)를 함유한 TCM-199액에 15분간 염색하여 형광현미경으로 탈핵 여부를 검사하여 탈핵이 확인된 미수정란만을 수핵란으로 사용하였다.

배양된 체세포는 0.05% trypsin-EDTA 용액으로 1~3분간 처리하여 pipetting에 의하여 배양접시의 저면에서 분리하였다. 분리된 체세포는 200 ×g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 3 mg/mL BSA를 함유한 TCM-199액의 drop에 보관하여 사용하였다. Donor 세포는 직접 injection pipette으로 흡입하여 탈핵을 실시한 구멍을 통하여 탈핵란 세포질의 위관강 내로 주입하였다.

재구축란의 전기융합, 활성화 및 체외배양

재구축란의 전기융합은 BTX 세포융합장치(BTX, San Diego, CA, USA) 및 1-mm 폭의 wire chamber를 사용하여 실시하였다. 재구축란은 0.1 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂, 0.05 mg/mL BSA를 첨가한 0.3 M mannitol 용액을 넣은 wire chamber의 양 전극 사이로 옮겨, pipette을 이용하여 donor 세포와 수핵란 세포질의 접촉면이 양 전

극에 수평이 되도록 유도하고, 이어서 1.5 kV/cm의 직류(DC) 전류를 30 μ s간 1회 통전하였다. 통전 후 즉시 TCM-199 + 3 mg/mL BSA액 내에서 수회 세척 후 배지 내에서 0.5~1시간 후에 세포의 융합 여부를 관찰하였다. 융합이 확인된 핵이식란은 융합 1시간 후 활성화를 유기하기 위해 10 μ M의 Ca^{++} -ionophore (A23187; Sigma)로 5분간 처리 후 즉시 2 mM의 6-dimethylaminopurine (6-DMAP, Sigma)을 함유한 체외배양액의 drop 내로 옮겨 4시간 동안 배양하여 활성화를 유기하였다. 활성화 처리 후 핵이식란은 3 mg/mL BSA가 함유된 CR1aa 배양액의 50 μ L drop으로 옮겨 5% CO₂ 및 39°C의 조건하에서 48시간 배양하여 분할율을 검사하였다. 분할된 핵이식란은 10% FBS를 함유한 CR1aa 내로 옮겨 4~6일간 추가 배양하여 배반포 형성율을 검사하였다.

실험설계

실험 1) Demecolcine 처리에 따른 핵이식

체세포 핵이식 과정에 있어서 demecolcine을 체외성숙 20시간째의 미수정란에 처리하여 chromosome mass의 돌출을 확인하였고, 이를 탈핵 과정에 이용하여 대조구와 탈핵을 및 발육율을 검토하였다.

실험 2) 극체 방출 유무에 따른 핵이식

체외 성숙 20시간에 극체가 방출된 난자와 극체가 방출되지 않은 난자를 구분하여 각각 demecolcine을 처리하여 탈핵하고, 핵이식 후 복제란의 발육율을 검토하였다.

실험 3) 난자의 세포주기별 핵이식

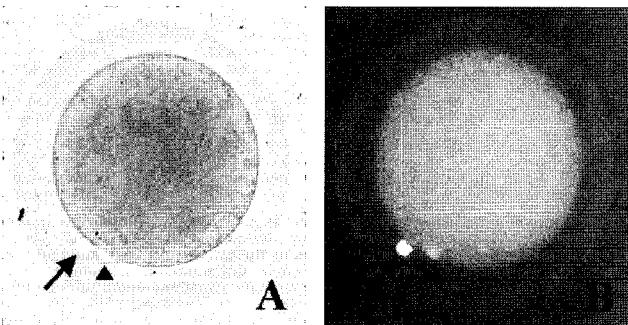


Fig. 1. MII oocyte with membrane protrusion 40 min after demecolcine treatment. Arrow shows the 1st polar body, and arrowhead indicates the membrane protrusion.

16시간 체외 성숙시킨 후 제 1극체가 방출되지 않은 추정 MI기 난자와 20시간 성숙시킨 MII기 난자에 demecolcine을 처리하여 탈핵하고, 핵이식 후 복제란의 발육율을 검토하였다. MI기 난자는 체외성숙 16시간째에 난자를 고정하여 제 1 성숙분열 중기 염색체를 확인하였다.

통계처리

실험의 결과는 Duncan 다중검정에 의해 유의성을 검정하였다.

결 과

Demecolcine 처리에 따른 핵이식

Demecolcine 처리 후, 제 1극체와 돌출된 핵(Fig. 1)을 제거하여 탈핵을 실시한 결과 탈핵율이 98.8%로 대조구의 75.7%보다 유의적으로 높게 나타났다($P<0.01$). 핵이식란의 배반포기 발육율은 대조구(18.6%)와 demecolcine 처리구(20.5%) 유의적인 차이가 없었다(Table 1).

극체 방출 유무에 따른 핵이식

극체가 방출되지 않은 난자의 chromosome mass 돌출율은 63.1%로 극체가 방출된 난자의 85.9%보다 유의적으로 낮게 나타났다($P<0.05$). 핵이식 후 배반포기 발육율은 극체 미방출란이 4.6%로 극체 방출란의 18.2%보다 유의적($P<0.05$)으로 낮게 나타났다(Table 2).

난자의 세포주기별 핵이식

난자의 세포주기를 확인하기 위해 체외성숙 16시간째에 난자를 고정해 본 결과, 84.3%가 MI기로 확인되었으며(Fig. 2), 제1극체가 방출 중이거나(TI) 방출된 난자(MII)를 제외한 난자 중에서는 95.1%가 MI기 염색체 상을 보였다. 이에 따라 16시간 성숙시킨 난자 중 제 1극체가 방출되지 않은 난자를 MI기라고 추정하여 실험에 이용하였다. MI기 난자와 MII기 난자에 demecolcine을 처리하여 chromosome mass 돌출을 확인한 결과, 돌출율이 각각 79.0%와 88.8%로 MII기 난자의 염색체 돌출율이 유의적으로 높게 나타났으며($P<0.05$), 탈핵 후 핵이식한 결과, 분할율과 배반포 발육율 모두 MI기 난자(69.4%와 5.9%)가, MII기 난자(96.7%와 23.9%)에 비하여 유의적으로($P<0.05$) 낮게 나타났다(Table 3).

Table 1. Effect of demecolcine on enucleation and development of nuclear transfer embryos (NTs)

Treatment	Protrusion (%)	Enucleation (%)	No. of NTs	No. (%) of embryos developed to		
				2-Cell	Morula	Blastocyst
Control	-	112/148(75.7) ^a	59	49(83.1)	18(30.5)	11(18.6)
Deme	162/188(86.2)	158/160(98.8) ^b	73	67(91.8)	20(27.4)	15(20.5)

* Deme: Demecolcine.

^{a,b} Values with different superscripts differ($P<0.01$).

Table 2. Effect of polar body (PB) extrusion on development of nuclear transfer embryos (NTs)

Group [*]	Protrusion ^{**} (%)	No. of NTs	No. (%) of embryos developed to		
			2-Cell	Morula	Blastocyst
1st PB -	258/409(63.1) ^a	130	96(73.9) ^a	15(11.5) ^a	6(4.6) ^a
1st PB +	462/538(85.9) ^b	233	205(88.7) ^b	60(26.0) ^b	42(18.2) ^b

^{*} 1st PB-, 1st PB-nonextruded recipients; 1st PB+, 1st PB-extruded recipients.

^{**} Oocytes were examined at 20h of IVM.

^{a,b} Values with different superscripts in the same column differ($P<0.05$).

Table 3. Effect of recipient cell cycle stage on development of nuclear transfer embryos (NTs)

Recipient cell cycle stage [*]	Protrusion (%)	No. of NTs	No. (%) of embryos development to		
			2-Cell	Morula	Blastocyst
MI	180/228(79.0) ^a	85	59(69.4) ^a	11(12.9) ^a	5(5.9) ^a
MII	159/179(88.8) ^b	92	89(96.7) ^b	27(29.3) ^b	22(23.9) ^b

^{*} MI: metaphase I, MII: metaphase II.

^{a,b} Values with different superscripts in the same column differ($P<0.05$).

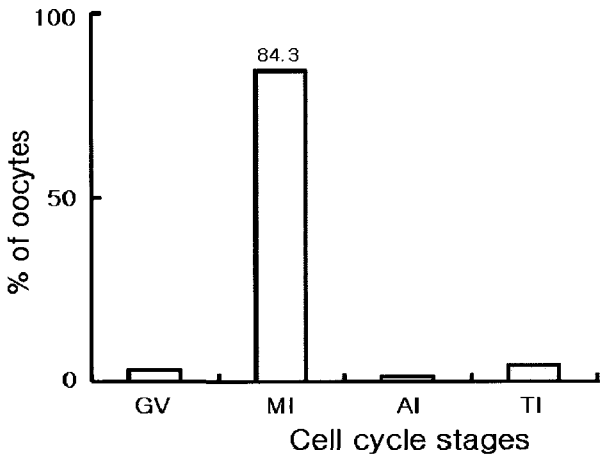


Fig. 2. Cell cycle stage of oocytes matured for 16h. GV, germinal vesicle; MI, metaphase I; AI, anaphase I; TI, telophase I; MII, metaphase II.

고찰

일반적으로 복제 동물은 MII기 난자를 수핵란으로 이용하여 물리적으로 탈핵된 난자에 체세포 핵을 주입하여 생산되었다. 이는 MII기 세포질에 이식된 세포의 핵은 다양한 형태적 변화를 거치게 되어, 핵이식란의 발육에 영향을 주는 것으로 여겨지기 때문이다(Cheong 등, 1993, 1994). 수핵란 세포질의 탈핵을 위한 다양한 방법이 시도되었는데, 제1극체와 극체 주위의 세포질을 흡인하는 방

법에 의한 물리적인 탈핵 방법은 필요 이상의 세포질이 제거되며 그 효율 또한 소의 경우 50~80%, 돼지의 경우에는 60~80% 수준에 불과하다. 수핵란에서 원래의 세포질 양과 거의 같은 최적의 세포질을 제공할 수 있는 탈핵방법으로 화학적으로 유도된 탈핵 방법이 이용되었다. Fulka와 Moor(1993)는 쥐 난자에 etoposide와 cycloheximide를 처리하여 염색체를 방출시키는 방법으로 96%의 탈핵 효율을 보고하였으나, 동물 종마다 그 효율에 차이가 있었으며 핵이식 후의 발육율도 매우 낮았다(Elsheikh 등, 1997; Savard 등 2004). Zernicka-Goetz 등(1993)은 쥐의 MII기 난자에 nocodazole을 처리하면 actin-rich domain에 덮여 chromosome mass가 포함된 물질이 돌출되어 이를 제거함으로써 탈핵이 가능하다고 보고하였다. 한편, 자세한 기작은 아직 완전히 밝혀지지 않았지만 난자 내 미체소관의 중합반응을 억제하는 demecolcine을 난자에 처리하였을 경우 세포질 막에 chromosome mass를 포함하고 있는 맑은 부위가 돌출되었다고 보고되었다(Yin 등, 2002a,b; Gasparrini 등, 2003). 본 연구에서는, demecolcine을 처리하여 핵이 돌출된 소 난자를 demecolcine이 없는 배양액으로 옮기면 수분 후에 돌출된 부위가 세포질 속으로 다시 들어가기 때문에 돼지(Yin 등, 2002a)와 토끼(Yin 등, 2002b)에서 보고되었던 pipette을 이용하여 제 1극체와 돌출된 핵을 기계적으로 제거하는 화학적인 방법과 물리적인 방법을 혼용한 탈핵 방법을 이용하였다. 비록 Gasparrini 등(2003)의 보고에서와 같이 demecolcine에 의해 난자로부터 핵 물질이 자발적으로 완벽하게 분리되는 탈핵 방법이 아닌 물리적인 방법이 혼용된 것이었지만, 제1극체와 돌출된 핵만을 제거하였기 때문에 과다한 세포질의 손실을 막아 물리적인 손상은 받지 않았을 것으로 생각되며, 핵이식 후 발육율에 있어서 대조구와 유의

적인 차이를 보이지 않아 demecolcine이 소의 체세포 핵 이식란의 발육에 있어서 유해한 영향을 보이지 않음이 확인되었다.

복제란의 저조한 발육율과 산자로의 낮은 발달율을 극복하기 위해서는 복제란 생산에 이용되는 절차들과 생리학적인 요소 모두에서 효율적인 기술로의 개선이 필요하다. 이식된 핵의 완벽한 초기화와 후기 배의 정상적인 발육을 위해서는 각 동물 중에 적당한 수핵란의 세포질을 규명하고 찾아냄으로써 양질의 세포질을 제공하는 것이 매우 중요하다. MPF 활성이 높은 상태의 세포질에 donor 핵을 주입시 발생하는 핵의 구조적 변화는 핵과 세포질간의 단백질 상호 교환의 결과로 추정되며 이러한 변화는 이식된 핵의 초기화 과정에 있어서 필수적이다(Collas와 Robl, 1991). MPF가 존재시 핵막이 소실되어 단백질 교환이 용이하기 때문에 높은 수준의 MPF가 존재하는 난자를 수핵란으로 이용하는 것이 적합할 것이다. Campbell 등(1996)은 난자의 성숙 과정 동안 MPF의 활성은 MI기 난자와 MII기 난자 모두에서 높게 나타났다고 보고하였으며, Wehrend와 Meinecke(2001)는 소에서 성숙 과정 동안 MPF의 수준은 성숙 개시 후 8시간째에 증가하기 시작하여 14시간 전후에 높게 나타났다가 19시간까지 다소 감소되고 22시간 성숙 이후에 다시 증가된다고 보고되어 MI기 난자도 수핵란으로 활용할 가능성이 있다고 판단된다. Miyoshi 등(2001)은 돼지에서 MI기 난자를 수핵란으로 이용 시 34.4~50.0%의 재구축란에서 핵의 초기화 과정의 필수 요소인 전핵 팽창(swelling)이 확인되어, MI기 난자를 수핵란으로 이용시 핵의 초기화를 개시할 수 있다는 것을 증명하였다. 본 연구에서도 핵을 이식받은 소의 MI기 난자가 배반포기로 발육되어 MI기 난자를 수핵란으로 이용할 수 있음이 확인되었다. 하지만 이론적인 배경에도 불구하고 Zhang 등(2004)과 Miyoshi 등(2001)의 보고에서와 마찬가지로 본 연구에서도 MI기 난자를 이용한 핵 이식란의 발육율이 MII기 난자를 이용하였을 경우보다 매우 낮게 나타났다. 하지만 비록 낮은 효율일지라도 배반포가 형성되었다는 것은 MI기 난자를 이용한 재구축란에서 이식된 핵의 초기화가 이루어질 수 있음을 의미하며, 다만 완벽한 초기화가 이루어지지 않았기 때문에 발육 효율이 저조하였을 것으로 판단된다. Zhang 등(2004)은 이식된 핵의 초기화를 위해 요구되는 미지인자가 MI기 염색체 근처에 존재하여 탈핵시 MI기 염색체와 함께 제거되었거나 또는 MII기 단계에만 그 미지인자가 존재하여 MI기 난자 내에서는 활성화 되지 않거나 아예 존재하지 않을 것이라고 보고하였다. 한편, Gao 등(2002)은 쥐에서 pro-MI기의 난자를 수핵란으로 이용한 재구축란에서 미세섬유의 분포가 MII기 난자를 이용한 재구축란과 매우 달랐으며 보다 적은 양의 미세섬유의 분포를 나타냈다고 보고하였다.

본 연구의 결과, 수핵란에 demecolcine의 처리는 탈핵 효율을 향상시켜 소의 핵이식에 유용하게 사용할 수 있을 것으로 판단되며, 소의 핵이식에 있어서 MII기 난자가 수핵란으로 적절하나 제 1극체가 방출되지 않은 난자나 MI기 난자도 핵이식 후 배반포기로 발육될 수 있음이 확인되었다.

Effects of Demecolcine-Assisted Enucleation and Recipient Cell Cycle Stage on the Development of Nuclear Transfer Bovine Embryos

J. J. Baek, C. K. Park, B. K. Yang, C. I. Kim
and H. T. Cheong

College of Animal Resource Sciences,
Kangwon National University

Abstract

This study was conducted to examine the effects of demecolcine-assisted enucleation and recipient cell cycle stage on the development of bovine somatic cell nuclear transfer (NT) embryos. *In vitro* cultured oocytes for 16~20 h were classified by first polar body (1st PB) extrusion and cell cycle stage (MI and MII) and treated 0.4 μ L/mL demecolcine for 40 min before enucleation. Enucleated oocytes were fused electrically with bovine ear skin cells, activated by Ca-ionophore+DMAP, and cultured *in vitro*.

Most of eggs (86.2%) treated with demecolcine protruded a chromosome mass and enucleated efficiently (98.8%, $P<0.01$). Demecolcine did not have a deteriorative effect on the development of NT embryos. Developmental rate of NT embryos reconstituted with oocytes extruded 1st PB significantly higher than that of NT embryos produced by oocytes without 1st PB (18.2% vs. 4.6%; $P<0.05$). Cleavage and blastocyst formation rate of embryos reconstituted with MI oocytes (69.4% and 5.9%, respectively) were significantly lower than those of embryos reconstituted with MII oocytes (96.7% and 23.9%, respectively, $P<0.05$).

From the present result, it is suggested that demecolcine is useful for the enucleation of recipient oocytes in bovine NT procedures, and MII oocytes rather than MI oocytes are more appropriate for recipient cytoplasm. Although, the potential to develop into blastocysts of NT embryos produced by 1st PB-nonextruded and MI oocytes was very low, these oocytes could be used for NT.

(Key words: Nuclear transfer, Enucleation, Demecolcine, Recipient cell cycle stage, *In vitro* development, bovine)

인용문헌

1. Barnes F, Endebrock M, Looney C, Powell R, Westhusin M, Bondioli K (1993): Embryos cloning in cattle the use of *in vitro* matured oocytes. J Reprod Fertil 97:317-320.
2. Campbell KHS, Loi P, Otaegui P, Wilmut I (1996a): Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. Rev Reprod 1:40-45.
3. Cheong HT, Takahashi Y, Kanagawa H (1993): Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. Biol Re-

- prod 48:958-963.
4. Cheong HT, Takahashi Y, Kanagawa H (1994): Relationship between nuclear remodeling and subsequent development of mouse embryonic nuclei transferred to enucleated oocytes. *Mol Reprod Dev* 37:138-145.
 5. Cheong HT, Park TM, Ikeda K, Takahashi Y (2003): Cell cycle analysis of bovine cultured somatic cells by flow cytometry. *Jpn J Vet Res* 51:95-103.
 6. Choi JB, Kim CI, Park CK, Yang BK, Cheong HT (2004): Effect of activation time on the nuclear remodeling and *in vitro* development of nuclear transfer embryos derived from bovine somatic cells. *Mol Reprod Dev* 69:289-295.
 7. Collas P, Robl JM (1991): Relationship between nuclear remodeling and development in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod* 45:455-465.
 8. Elsheikh AS, Takahashi Y, Katagiri S, Kanagawa H (1997): Developmental ability of mouse late 2-cell stage blastomeres fused to chemically enucleated oocytes *in vitro*. *J Vet Med Sci* 59:107-113.
 9. Fulka J Jr, Moor RM (1993): Noninvasive chemical enucleation of mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 34:427-430.
 10. Gao S, Gasparrini B, McGarry M, Ferrier T, Fletcher J, Harkness L (2002): Germinal vesicle material is essential for nucleus remodeling after nuclear transfer. *Biol Reprod* 67:928-934.
 11. Gasparrini B, Gao S, Ainslie A, Fletcher J, McGarry M, Ritchie WA, Springbett AJ, Overstrom EW, Wilmut I, De Sousa PA (2003): Cloned mice derived from embryonic stem cell karyoplasts and activated cytoplasts prepared by induced enucleation. *Biol Reprod* 68:1259-1266.
 12. Ibanez E, Albertini DF, Overstrom EW (2003): Demecolcine-induced oocyte enucleation for somatic cell cloning: coordination between cell-cycle egress, kinetics of cortical cytoskeletal interactions, and second polar body extrusion. *Biol Reprod* 67:442-446.
 13. Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y (1998): Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282:2095-2098.
 14. Liu JL, Sung LY, Barber M, Yang X (2002): Hypertonic medium treatment for localization of nuclear material in bovine metaphase II oocytes. *Biol Reprod* 67:1853-1863.
 15. Miyoshi K, Rzucidlo SJ, Gibbons JR, Arat S, Stice SL (2001): Development of porcine embryos reconstituted with somatic cells and enucleated metaphase I and II oocytes matured in a protein-free medium. *BMC Dev Biol* 1:12.
 16. Mohamed Nour MS, Takahashi Y (1999): Preparation of young preactivated oocytes with high enucleation efficiency for bovine nuclear transfer. *Theorogenology* 51:661-666.
 17. Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walke S, Ayares DL, Colman A, Campbell KHS (2000): Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407:505-509.
 18. Savard C, Novak S, Saint-Cyr A, Moreau M, Pothier F, Sirard MA (2004): Comparison of bulk enucleation methods for porcine oocytes. *Mol Reprod Dev* 67:70-76.
 19. Smith LC (1993): Membrane and intracellular effects of ultraviolet irradiation with Hoechst 33342 on bovine secondary oocytes matured *in vitro*. *J Reprod Fertil* 99:39-44.
 20. Tani T, Kato Y, Tsunoda Y (2001): Direct exposure of chromosomes to nonactivated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming. *Biol Reprod* 64:324-330.
 21. Tsunoda Y, Kato Y (2000): The recent progress on nuclear transfer in mammals. *Zool Sci* 17:1177-1184.
 22. Wehrend A, Meinecke B (2001): Kinetics of meiotic progression, M-phase promoting factor(MPF) and mitogen-activated protein kinase(MAP kinase) activities during *in vitro* maturation of porcine and bovine oocytes: Species specific differences in the length of the meiotic stages. *Animal Reprod Sci* 66:175-184.
 23. Wilmut I, Schnieke AE, McWhirl J, Kind AJ, Campbell KHS (1997): Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813.
 24. Yang X, Zhang L, Kovacs A, Tobback C, Foote RH (1990): Potential of hypertonic medium treatment for embryo micromanipulation: II. Assessment of nuclear transplantation methodology, isolation, subzona insertion and electrofusion of blastomeres to intact or functionally enucleated oocytes in rabbits. *Mol Reprod Dev* 27:118-129.
 25. Yin XJ, Tani T, Yonemura I, Kawakami M, Miyamoto K, Hasegawa R, Kato Y, Tsunoda Y (2002a): Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes. *Biol Reprod* 67:442-446.
 26. Yin XJ, Kato Y, Tsunoda Y (2002b): Effect of enucleation procedures and maturation conditions of the development of nuclear-transferred rabbit oocytes receiving male fibroblast cells. *Reproduction* 124:41-47.
 27. Zernicka-Goetz M, Kubiak J, Antony C, Maro B (1993): Cytoskeletal organization of rat oocytes during metaphase II arrest and following abortive activation: A study by confocal laser scanning microscopy. *Mol Reprod Dev* 35:165-175.
 28. Zhang LS, Zhang KY, Yao LJ, Liu SZ, Yang CX, Zhong ZS, Zheng YL, Sun QY, Chen DY (2004): Somatic nucleus remodelling in immature and mature Rassa oocyte cytoplasm. *Zygote* 12:179-184.
- (접수일자: 2005. 9. 18. / 채택일자: 2005. 9. 25.)