

최 종
연구보고서

체세포 복제기술에 의한 형질전환 소의 생산에
관한 연구

Production of Bovine Cloned Transgenic Embryos
by Somatic Cell Nuclear Transfer

연구기관

경 상 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “체세포 복제기술에 의한 형질전환 가축의 생산에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 12월 13일

주관연구기관명 : 경상대학교

총괄연구책임자 : 최상용

세부연구책임자 : 김진희

세부연구책임자 : 노규진

연구진 (선임급): 조상래

연구진 (선임급): 옥선아

연구진 (선임급): 이성립

연구진 (원급) : 김정곤

연구진 (원급) : 손우진

연구진 (원급) : 안현철

협동연구기관명 : 강원대학교

협동연구책임자 : 김정익

세부연구책임자 : 양부근

세부연구책임자 : 박춘근

세부연구책임자 : 정희태

요 약 문

I. 제 목

체세포 복제기술에 의한 형질전환 가축의 생산

II. 연구개발의 목적 및 필요성

핵이식기술은 우수한 가축의 대량생산 뿐 아니라 형질전환동물 생산을 위한 효율적인 기술로, 1997년 복제양 "Dolly" 의 탄생 이후 많은 동물에서 복제의 성공이 보고되고 있다. 최근 핵이식기술에 의한 복제 송아지 생산효율이 많이 향상되고 있으나 산업적으로 실용화하기 위해서는 아직 해결해야 할 기술적인 문제들이 있다

첫째, 우수한 개체로부터 세포를 채취하고, 계대 배양하여 동결 보존하는 과정을 통하여 필요한 세포의 cell line 이 확립되어야 하고, 둘째, 체세포를 복제란의 대량확보를 위한 기술개선이 이루어져야 하며, 셋째는 복제소(형질전환 복제 포함) 생산에 적합한 세포에 대한 검토가 이루어져야 하며, 넷째, 수정란의 품질을 향상시킬 수 있는 배양기술 및 동결보존기술이 확립되어야 하고 다섯째, 수정란이식에 의한 수태율 향상방안이 강구되어야 하며, 아울러, 조기 배 사망 및 비정상 산자발생 원인분석, 산자의 유전능력 검정기술 및 이용성 향상 방법 등이 검토되어야 한다.

본 연구의 목적은 형질전환 복제소 생산기반기술 제공을 위한 체세포 핵이식에 의한 복제 송아지 생산 기술을 확립하는데 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 형질전환 복제소 생산기술을 확립할 목적으로 다음과 같은 내용의 연구를 수행하였다.

1. 사람 혈청 알부민 도입 및 발현 프로모터 크로닝 기법 확립
2. 원시 생식 세포, 태아 섬유아세포 및 난구세포 등 다양한 한우 체세포 cell line을 확립

3. 확립된 cell line의 세포주기분석과 최적 세포주기 동조방법 확립
4. 유전자 도입 기법 확립
5. 체세포 핵이식에 의한 복제수정란 생산기술, 즉 수핵란의 탈핵 및 활성화기술, 체세포 핵과 수핵란 세포질의 전기융합조건, 세포의 상태 및 종류에 따른 핵이식란의 발육능 등을 검토, 확립
6. 수핵란의 세포주기에 따른 핵이식란의 발육능 검토 및 복제수정란의 동결기술 개발
7. 수란우 발정 동기화 기법 확립
8. 형질전환 수정란 생산 및 형질 전환 산자의 분석
9. 수정란이식에 의한 한우 복제송아지의 생산 및 유전자 확인에 의한 정확성 검토

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

가. 연구결과

1. 사람 혈청 알부민(human serum albumin, hSA)는 간에서 생산되는 성인의 혈장내 주된 단백질 요소로서 혈류에서 정상 삼투압 유지에 큰 역할을 하며, 수많은 작은 분자들의 전달자로서 기능한다. 사람 혈청 알부민과 그 발현 프로모터의 크로닝에 대한 체외 연구를 성공적으로 시도하였다.
2. 체세포 핵이식을 위한 효과적인 소 체세포의 G0+G1기 동조는 혈청기아나 confluency 세포를 trypsin처리 후 제한된 시간동안 배양함으로써 이루어진다.
3. 성숙 후 18시간에 CB를 첨가한 배양액 내에서 UV-light를 이용하여 탈핵을 실시하는 것이 효과적이며, donor 세포 또는 융합 전 재구축란의 PHA-P 처리가 융합율을 향상시킬 수 있고, 또한, 융합란을 A23187과 DMAP으로 병용처리 함으로써 난자의 활성화 및 배반포 발육율을 향상시켜, 결과적으로 핵이식기술의 효율성을 증진시킬 수 있다.
4. 융합액 내 Ca^{++} 농도의 증가(0.5-1.0 mM)가 소 체세포 핵이식란의 융합율 및 배반포 발육율을 향상시킬 수 있다
5. 융합 후 1~2시간 동안 PCC를 유도한 후 활성화 처리하여 정상적인 염색질 구조를 갖도록 함으로써 핵이식란의 배반포기까지의 발달율을 향상시킬 수 있을 것으로 사료된

다.

6. 소 체세포 핵이식란의 발육이 체세포의 종류 및 세포 제공 개체에 따라서는 영향을 받지 않으나, passage 수 및 체세포의 trypsinization 시간에 따라서는 영향을 받으므로 적은 passage와 짧은 시간의 trypsinization 처리가 효과적이다.
7. 3단계 평형에 의한 초자화동결 방법에 의해서 핵이식 복제란을 성공적으로 동결할 수 있으며, 높은 생존율과 부화배 형성율을 얻을 수 있었다.
8. Demecolcine 처리가 소 난자의 탈핵에 매우 효과적이며 MIII기 난자가 MI기 난자에 비하여 수핵란 세포질로 더 적절하나 극체 미방출란 및 MI기 난자도 비록 제한적이기는 하지만 핵이식란의 배반포 발육을 지원할 수 있다.
9. 복제란의 발육 및 핵형은 수핵란의 활성화 시간에 따라 영향을 받을 수 있어, 핵이식 전에 활성화를 한 경우에는 활성화 전 난자와 비교하여 배반포 발육은 차이가 없으나 배반포로 발육되는 속도는 지연되었다.
10. 복제란의 수정란이식 결과 2두의 복제송아지가 생산되었으나 1두는 생후 사망하였다. 한우 체세포 유래 복제송아지의 생산 가능성과 동결 융해된 난자의 이식에 의해서도 산자가 생산될 수 있음을 확인하였으나 생산효율을 높이기 위해서는 수정란이식상의 기술적인 문제보다는 유산의 원인을 규명하여 배아생존율을 높이는 것이 중요할 것으로 판단된다.
11. pEGFP-N1 유전자의 삽입 유무에 관계없이, 여러 세포 종류들(CFC, FFC, AEFC)에서의 염색체형과 세포자가 사멸율은 차이가 없었다.
12. Cysteamine을 첨가하여 체외 성숙시킴으로써 저온 보존에 대한 배반포의 생존성을 높여, 상업적인 목적으로 단시간 동안 소 체외 수정란을 이동시킬 경우 동결을 대체할 수 있는 방법으로 활용가능하다.
13. 체외 생산 수정란은 냉각 시 손상을 받기 쉬우며, 배반포의 세포 수를 셈으로써 냉각 및 저온 보존의 영향을 판단할 수 있다.
14. 구리선을 이용한 초자화 방법으로 소 난자를 동결할 수 있었으나, 동결 시 microtubule과 mitochondria의 손상이 일어나 생존율이 감소하게 된다. 체외 성숙 시, cytochalasin B를 첨가함으로써 난자 동결 시, microtubule을 안정화시키는 효과가 있었다.

15. 세가지 처리 방법으로, 즉 confluent, roscovitine 및 혈청기아방법으로 소 태아 섬유아세포를 효과적으로 G0/G1기에 동기화시킬 수 있었다. 그러나 5~10 계대 배양된 세포를 confluent상태로 했을 때, 세포자가사멸 및 괴사 발현이 감소하였으며 세포 주기 동기화 효율 및 염색체 안정성이 높아, 핵이식 공핵세포로서 적절한 것으로 나타났다.
16. 난자를 ionomycin에 처리한 후, 즉시 DMAP에 노출하였을 때, 제 2극체의 방출을 막아 염색체 형의 변화를 초래한다. 그러므로 ionomycin과 DMAP의 처리간격이 소의 세포질내 정자 주입술 시행 시 중요하다고 사려된다.
17. Ionomycin과 sodium pyro phosphate를 함께 사용하여 비정상적 염색체 발현을 줄일 수 있었으며, 소 체세포 복제 수정란의 활성화에 적용할 수 있다.
18. Ionomycin 적용 후, DMAP의 처리는 활성화란의 발달을 촉진시키나, CHX 처리군과 비교할 때, 배반포로의 발달에는 차이가 없었다. 그러나, DMAP을 처리하였을 때, 2세포기로의 발달 속도는 빨랐으며, 또한 활성화란과 체세포 복제란에서 염색체 이상 빈도가 증가하였다. 따라서 ionomycin과 CHX 혼합 처리 방법이 소 체세포 복제 과정 중, 난자 활성화 시에 DMAP보다 더 적절하다고 판단된다.
19. 원형정세포핵 주입술 시행 시, ionomycin과 CHX를 병용 처리하였을 때, 효과적으로 발달능이 우수한 수정란을 생산해 내었다.
20. 체외 수정란과 비교하여, 체세포 복제란과 형질전환란에서 높은 세포자가사멸율을 관찰할 수 있었는데 이는 발달능에 부정적인 영향을 미치고, pEGF-N1 도입 공핵세포를 이용한 형질 전환 수정란이 체세포 복제란 보다 내세포괴에서 낮은 세포자가 사멸율을 보였다.
21. 과배란 처리를 위해 polyethylen glycol에 녹인 FSH를 피하에 1회 주사하는 것은 근육주사를 주회 시행하는 것과 비교해볼 때, 회복율, 이식율 및 임신율에 있어 차이가 없었다. 따라서, 소에게 스트레스를 덜 주고, 비용 및 노동력 절감 차원에서 FSH를 1회 주사하는 것이 실용적인 측면에서 과배란 처리에 적용할 수 있는 방법이라 사료된다.

나. 연구결과 활용에 대한 건의

본 연구에서 다년간 시도한 형질 전환 동물을 생산하기 위한 기술의 결과는 의심의 여지없는 소중한 유용한 자료라 생각된다. 체세포 복제 기술을 이용한 형질 전환 소의 계대 번식 방법은 기존의 생산 방법들보다 한층 발전된 형태로 많은 관심을 가지도록 하였다. 다양한 세포들에 유전자를 도입한 뒤, 형질 전환 수정란 생산을 위한 공핵 세포로 활용하였다. 공핵세포와 난자의 융합 및 활성화시킨 후, 배반포를 발정 동기화 처리된 수란우에 이식하였다.

유전자 도입, 활성화 방법, 공핵 세포의 동기화 방법 등과 같은 기초 분자학적인 측면의 실험 결과, 핵이식 과정을 개선시키는 효과를 얻을 수 있었으며, 동결 및 용해 후의 난자, 수정란의 생존율에 부정적 영향을 최소화할 수 있는 성공적인 결과를 얻었다. 이러한 적절한 공핵 세포의 선택과 기술적인 진전덕택에, 핵이식 과정 중 야기되는 여러 가지 문제점들을 줄일 수 있었다. 그러나 성공적인 형질전환 동물의 대량 생산을 위해서는 초기 배아 소실 및 유산이 해결해야할 과제로 남아있다.

또한 이러한 소중한 결과들을 가축개량 및 형질전환 복제가축의 생산에 유용하게 활용할 수 있을 것으로 판단되나, 기술의 활용을 극대화하기 위해서는 연구개발기관과, 국가, 농민의 유기적인 협조가 필요하며, 특히 국가의 정책적인 지원이 절대 필요하다. 아울러 최근 소에서의 체세포복제는 돼지 등에 밀려 연구의 진척이 별로 없으므로 본 연구의 결과를 실용적으로 활용하기 위해서는 정부 차원에서 소 체세포 핵이식에 관한 연구를 지원할 필요가 있다고 판단된다.

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title

Production of bovine cloned transgenic embryos by somatic cell nuclear transfer

II. Purpose and Necessity of the Research

Several new techniques, which have not yet been fully evaluated or used in routine, are likely to facilitate gene addition and replacement in animals. The use of transgenic animals to solve the urgent problems of modern or future medicine is a necessity rather than a matter of choice. During the last two decades, there have been significant improvements resulting in novel, more efficient technologies, including nuclear transfer and the use of lentiviral vectors. These technologies now enable sophisticated genetic modifications to be carried out not only in mice but also in sheep, cattle, goats, pigs and rabbits. The efficacy of altering the genotype of the donor animal by genetic modification, to improve the survival of the donor tissue in the host, is currently being tested.

Transgenic animals are also valuable as models of human genetic diseases. These might be of benefit either indirectly, to investigate the biology of the disease, or directly, to test potential treatments. To create animals resistant to diseases that can be passed from animal host to humans, therefore reducing the likelihood of transmission is a use of transgenic technology.

At present, Somatic cell nuclear transfer (SCNT) has been proven to be more efficient method of producing transgenic livestock than pronuclear injection. An important aspect of SCNT technology is the source and the in vitro techniques used to obtain viable donor nuclei for the procedure. The whole process of SCNT involves numerous steps that are interlinked and the success appears to depend at least in part on the appropriate combination of cell cycle stages among the donor and host cell, and tissue origin or state of differentiation of donor cell types. To address some of the

problems encountered in SCNT procedures necessitates the present research.

III. Contents and Scope of the Research

The contents of this study were 1) to clone expression promotor and human serum albumin (hSA) genes as a transgene, 2) to establish bovine somatic cell lines, including primordial germ cells, fetal fibroblasts and cumulus cells, 3) to analyze and synchronize the cycle of the cells, 4) to establish the method of gene transfection into the cells, 5) to develop nuclear transfer techniques, such as enucleation, fusion, activation and embryo development, 6) to produce cloned transgenic embryos and 7) to synchronize the estrus of the recipients.

IV. Result and Application of the Research

1. Results

- 1) The Human serum albumin (hSA), a major protein complement in adult plasma which is produced in the liver and is largely responsible for maintaining normal osmolarity in the blood stream and functions as a carrier for numerous small molecules. In vitro studies on cloning of expression promoter and human serum albumin genes have been successfully attempted.
- 2) The chromosomal aneuploidy and apoptosis rates were not different among various cell types (CFC, FFC and AEFC), transfected with or without pEGFP-N1. However, FFCs were the cell type most effectively transfected and Effectene was a suitable agent for transfection.
- 3) Serum starvation and culture to confluence are efficient means of synchronizing bovine somatic cells in G0/G1, and indicate that a more efficient synchronization of the cells in G0/G1 could be established by incubation for a limited time period after trypsinization of serum-starved or confluent cells.
- 4) Oocytes matured for 18 h resulted in high enucleation efficiency and further improvement in fusion rate using PHA-P treatment and activation with a combination of A23187 and DMAP could enhance the embryo development.
- 5) In fusion medium, increased Ca^{++} concentrations of 0.5 mM and 1.0 mM could

- enhance the fusion and blastocyst formation rates of bovine nuclear transfer embryos.
- 6) The proportion of embryos with normal chromosome constitutions decreased as activation time was prolonged and blastocyst development rates were higher in eggs activated within 2 hr after fusion. Thus implying that activation time could affect the chromatin structure and *in vitro* development of bovine nuclear transfer embryos.
 - 7) Different donor cell types (skin, muscle and cumulus cells) and individuals did not affect the development of cloned bovine embryos. Moreover, passage number and trypsinization time of donor cells affect the *in vitro* development. Hence, low (5) passages and short trypsinization time (1 min) of donor cells could be used to enhance the *in vitro* development of cloned bovine embryos.
 - 8) High survival and hatching rates of NT blastocysts adopting 3 step equilibration offers promise for successful cryopreservation by vitrification method.
 - 9) 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. 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.
 - 10) Developmental rate to the blastocyst stage was slightly high in the post-AC group compared to that of pre-AC group whereas, the developmental speed was faster in the pre-AC than post-AC group. Further, blastocyst rates were similar among different activation time before fusion. This stresses that activation status of the recipient cytoplasm before fusion could affect the development and nuclear morphology.
 - 11) In Hanwoo cattle, cloned calves can produced following embryo transfer of SCNT embryos, however, the problem of abortion still exists. This necessitates steps to overcome the abortion in order to improve the cloning efficiency.
 - 12) The high survival following chilling of blastocysts produced by IVM-IVF of oocytes matured in media supplemented with cysteamine offers promise as a viable alternative to freezing for commercial applications requiring short-term storage to

facilitate transport of *in vitro* produced bovine embryos.

- 13) IVF-produced embryos are differentially susceptible to cooling injury. Cell counts made of those blastocysts formed from chilled embryos indicated subtle effects of chilling.
- 14) Bovine oocytes can be cryopreserved by vitrification within small droplets using copper grids. However, damage of microtubules and mitochondria might reduce the viability. Supplementation of IVM medium with cytochalasin B appears to enhance the stabilization of microtubules during oocyte cryopreservation.
- 15) Bovine fetal fibroblasts could be effectively synchronized at G0/G1 stages by three different treatments, confluent, roscovitine and serum-starvation. However, cells in confluence with passage 5-10 exhibited higher donor cell cycle synchronization efficiency along with reduced apoptosis and necrosis, and stable chromosome diversity making it suitable as nuclear donor.
- 16) Immediate DMAP treatment after ionomycin exposure of oocytes results in arrest of release of the second polar body, and thus leads to changes in chromosomal pattern. Therefore, the time interval between ionomycin and DMAP plays a crucial role in bovine ICSI.
- 17) The use of Sodium Pyro Phosphate with ionomycin reduced greatly the incidence of chromosomal abnormalities, and might be applied for the activation of nuclear transplant bovine embryos.
- 18) DMAP treatment after ionomycin greatly increased the developmental rates of parthenotes, but did not differ in blastocyst development compare with CHX treatment. However, DMAP treatment increased the time-dependent cleavage rate to two-cell stage embryos. Further, it greatly enhanced the incidence of chromosomal abnormalities in parthenotes and SCNT embryos. Hence, CHX combined with ionomycin is more desirable than DMAP for oocyte activation during nuclear transfer in cattle.
- 19) Intracytoplasmic Round Spermatid injection combined with repeated ionomycin activation and additionally CHX treatment is more efficient for producing developmentally competent embryos.
- 20) The high occurrence of apoptosis observed in SCNT and TG embryos compared

to IVF counterparts might influence the developmental competence. Moreover, the SCNT embryos derived using non transfected donor cells exhibited a lower apoptosis expression in ICM cell than in TG embryos derived using pEGP-N1 transfected donor cells suggesting a possible role of negative gene effect in TG embryos.

21) A single subcutaneous injection with FSH dissolved in polyethylene glycol to induce superovulation in cattle did not differ from multiple intramuscular injection protocol on the rates of recovery, transferable and pregnancy rate. Hence a more practicable approach for superovulation treatment would be a single injection procedure as it reduces stress in cattle and less cost and labor intensive.

2. Implementation and Application of the Research

Technologies for the production of transgenic cattle that have been attempted over the last few years in this project will undoubtedly have an important impact in obtaining high and sustained results. Generation of transgenic cattle using somatic cell nuclear transfer technique has given lot of expectations about this elegant approach to improve the production of transgenic cattle. Different nuclear donor cell types (CFC, AEFC and FFCs) were transfected in vitro screened for transgenic integration and then transferred into enucleated oocytes. After fusion of both components and activation of the reconstituted nuclear transfer complexes, blastocysts were transferred to synchronized recipients.

The outcome of some fundamental and molecular aspects of this project such as gene transfection method, activation protocol, cell cycle synchronization of the donor cells contributes substantially to the nuclear transfer procedures and cryopreservation without compromising their viability could be successfully implemented. With the appropriate selection of donor cells and other technical improvements, the problems associated with nuclear transfer may be decreased or eliminated. However, early embryonic loss and abortion still remain as challenge to be over come for the successful large scale application of transgenic technology.

CONTENTS
(영 문 목 차)

Abstract	2
Summary	7
Contents(English)	12
Contents	17
Chapter 1. Outline of the subject	21
Chapter 2. The present condition of internal and external new technique	33
Chapter 3. Research achievement and result	38
1) Cloning of expression promoter and gene	38
2) Construction of cell line and gene transfection	52

2-1. Efficiency of gene transfection into donor cells for nuclear transfer of bovine embryos
..... 52

3) Improvement of efficiency for producing bovine embryos
..... 64

3-1. Microtubulin configuration and mitochondrial distribution after ultra-rapid cooling of bovine oocytes
..... 64

3-2. Vitrification of in vitro fertilized and somatic cell nuclear transfer embryos in bovine
..... 73

3-3. Effect on development of chilling in vitro produced bovine embryos at various cleavage stages
..... 84

3-4. Effect of cysteamine supplementation of in vitro matured bovine oocytes on chilling sensitivity and development of embryos
..... 92

3-5. Enhanced cryosurvival of bovine blastocysts produced in vitro in serum-free medium

.	102
3-6. Different activation regimens for successful development of bovine embryos produced by intracytoplasmic sperm injection(ICSI)	
.	109
3-7. In vitro development of bovine oocytes reconstructed with round spermatids	
.	117
4) Production of somatic cell nuclear transferred and transgenic Korean Native Cattle and Dairy Cow	129
4-1. Cell cycle analysis of bovine cultured somatic cells by flow cytometry	
.	129
4-2. Study on the improvement of bovine somatic cell nuclear transfer technique	
.	141
4-3. Effect of Ca ²⁺ concentration in fusion medium on the fusion, nuclear morphology and development of bovine somatic cell nuclear transfer embryos	
.	154
4-4. Effect of activation time on the nuclear remodeling and in vitro development of nuclear transfer embryos derived from bovine somatic cells	
.	164

4-5. Development of somatic cell nuclear transfer embryos following donor cell type and cell treatment In cattle	182
4-6. Effects of demecolcine-assisted enucleation and recipient cell cycle stage on the development of nuclear transfer bovine embryos	193
4-7. Development of somatic cell nuclear transfer bovine embryos following activation time of recipient cytoplasm	208
4-8. Effects of confluent, roscovitine treatment and serum starvation of the cell cycle synchronization of bovine foetal fibroblasts	225
4-9. Efficient production of cloned bovine embryos using CDC2 kinase inhibitor	234
4-10. Developmental rate and ploidy of embryos produced by nuclear transfer with different activation treatment in cattle	245
4-11. Cellular composition and viability of cloned bovine embryos using exogene transfected somatic cells	

.	258
5) Improvement of efficiency for embryo transfer	
.	267
5-1. Superovulation response and quality of embryos recovered from cattle after a single subcutaneous injection of FSH dissolved in polyethylene glycol	
.	267
5-2. Viability of somatic cell nuclear transfer embryos following embryo transfer in Hanwoo	
.	284
Chapter 4. Goal of completion and contribution rate of the objective	
.	298
Chapter 5. Application of research achievement and result	
.	308
Chapter 6. Collected data from overseas scientific technique	
.	309

목 차

제 1 장. 연구개발과제의 개요	21
제 2 장. 국내외 기술개발 현황	33
제 3 장. 연구개발의 목표 및 내용	38
제 1절. 유전자 및 발현 프로모트 크로닝	38
제 2절. Cell line 구축 및 유전자 도입	52
2-1. 유전자가 삽입된 공여세포를 이용한 소난자의 핵이식 효과	52
제 3절. 수정란 생산 효율 향상	64
3-1. 소난자의 초급속 냉각후의 미세소관의 배열과 미토콘드리아의 분포	64
3-2. 소 체외수정란 및 체세포 복제란의 초자화 동결	73
3-3. 다른 발달단계에서 냉각 효과를 준 체외생산수정란의 발달율	

.	84
3-4. 체외 성숙 시, cysteamine의 첨가가 소 난자의 저온 감수성 및 수정란의 발달에 미치는 영향	92
3-5. 무혈청배지에서 생산한 소배반포의 향상된 동결감수성	102
3-6. 다양한 활성화 처리방법이 소 난자 세포질내정자주입술의 발달율에 미치는 영향	109
3-7. 원형정세포가 체외생산 소난자의 재생에 미치는 영향	117
 제 4절. 체세포 복제 및 형질 전환 한우와 젖소 수정란 생산	129
4-1. 체세포분석기를 이용한 체외배양한 소 체세포의 세포주기 분석	129
4-2. 소 체세포 핵이식기술의 효율 증진에 관한 연구	141
4-3. 세포 융합액 중의 Ca ⁺⁺ 농도가 소 체세포 핵이식란의 융합, 핵형 및 체외발육에 미치는 영향	

.	154
4-4. 소체세포를 이용한 핵이식수정란의 체외발달율과 난자 활성화 시간이 핵의 리모델링에 미치는 영향	164
4-5. Donor 세포의 종류 및 세포처리에 따른 소 체세포 핵이식란의 체외발육	182
4-6. Demecolcine처리에 의한 탈핵과 수핵란 세포질의 세포주기가 소 핵이식란의 발육에 미치는 영향	193
4-7. 수핵란의 활성화시간에 따른 소 체세포 핵이식란의 발육	208
4-8. 혈청기아처리와 roscovitin처리, confluent 처리가 소태아섬유아세포의 세포동기화에 미치는 영향	225
4-9. CDC2 Knase Inhibitor를 사용하여 복제소를 생산 했을때의 효과	234
4-10. 다양한 활성화 처리방법이 핵이식후 소수정란의 발달율과 배수성에 미치는 영향	245
4-11. exogene이 제거된 소체세포를 사용하여 복제하였을 때, 세포막조성과 생존성에 미치는 영향	

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 목적

최근 복제를 통하여 우수한 형질의 보전으로 고능력 가축 보급과 질병모델동물 생산, 멸종 위기 동물생산, 이식용 장기 생산등이 현실적으로 가능해졌다. 복제를 위한 핵이식 기술은 1981년 Illemnsee와 Hoppe가 생쥐에서 처음으로 성공한 이래 많은 발전이 이루어져 왔다. 최근 영국의 Roslin 연구소의 Wilmut 박사 team에 의해서 탄생된 최초의 체세포 복제동물인 “Dolly”는 금세기 자연과학의 큰 업적이라고 할 수 있다. 이러한 연구 업적은 생식세포가 아니면 생명이 창출될 수 없다는 현재까지의 학설에 큰 충격을 주었으며, 또한 생명과학 분야에 있어서 대단한 진보임에 틀림없다 (Wilmut 등, 1997). 이후체세포를 이용한 복제동물의 생산기술 개발에 관한 많은 연구가 이루어졌는데, 유선조직세포 뿐만 아니라 태아의 조직세포, 난구세포 및 난관상피세포를 사용하여서도 핵이식으로 산자를 생산할 수 있는 기술이 개발되었다.

”Dolly” 탄생 이후 양에서 뿐만 아니라 소 (Wilmut 등, 1997), 돼지 (Polejaeva 등, 2000), 염소 (Baguisi 등, 1999), 고양이 (Shin 등, 2002), 원숭이(Chan 등, 2001) 등에서 체세포를 이용한 핵이식으로 복제산자를 생산하는데 성공하였다. 일부 선진국에서는 형질전환동물 생산에 성공하여(Brinster 등, 1981; Gordon 등; 1980) 일부 산업적으로 응용하는 수준에 도달해 있으나 이의 성공율은 매우 낮아서 주입된 수정란을 기준으로 할 때 산자에서의 발현율은 생쥐 같은 실험동물에서는 1-5% 정도이고, 토끼에서는 0.75%이며, 가축인 소에서는 0.7%, 산양에서는 0.99%, 면양에서는 0.88%, 돼지에서는 0.91% 등 1%에 미치지 못하고 있다(Pursel 과 Rexroad; 1993, Riego 등; 1993, Thomas 등; 1993). 이를 개선하기 위하여 PCR분석에 의한 조기감별, 여러 가지 vector 개발 등 많은 연구가 수행되고 있다.

국내에서도 황 등(1999)은 젖소의 난구세포를 사용하여 복제 송아지를 생산하는데 성공한 바 있다. 국내에서는 이철상 등(1989)이 처음으로 핵이식에 의한 생쥐 생산에 성공하였다는 보고가 있었고, 본 연구진도 핵이식기법으로 생쥐와 토끼에서 복제 산자를 생산한 바 있다(최 등; 1990, 이 등; 1994). 특히 황우석 등(1999)은 국내 최초의 체세포 복제 산자인 “영롱이”를 생산하였다고 보고 하였으며 이어서 “진이”를 생산하여 복제 소 생산 기술을 세계적 반열에 올려 놓았다.

또한 최초의 형질전환 산자는 이경광 등(1989)이 쥐의 전핵내 유전자 도입을 이용하여 사람의 성장호르몬을 발현하는 6마리의 형질전환 쥐를 생산하였다고 보고하고 있으며 이어서 1998에 lactoferrin을 유즙으로 분비하는 형질전환 젖소를 생산하였다고 보고하였다, 유육준 등(1998)은 사람의 조혈인자인 G-CSF를 가진 형질전환 산양을 생산하는데 성공하였다고 보고하고 있다.

또한 국내에서 경북축산기술연구소에서 2003년 4월 체세포 복제된 성숙된 암소에 인공수정을 실시하여 정상적인 산자를 생산하였다고 보고하였다. 따라서 체세포 복제소의 형질이 다음 세대에도 이전된다는 것을 확인할수 있는 계기가 되었다.

특히 2004년 2월 국내의 황 등(2004)이 최초의 human embryonic stem cell을 이용하여 신경장애의 개에 이식하여 치료를 하였다고 보고 하는 등 세계적으로 국내 연구진들의 연구업적이 인정을 받고 있다.

선진국에서는 사람혈청알부민을 유즙으로 생산하는 형질전환 생쥐와 토끼를 생산하는데 성공한 예가 있다. 그러나 아직까지는 태아의 원시생식세포에 유전자를 삽입시키고 이를 핵이식으로 복제한 다음 대리모에 이식하여 복제 산자를 생산한 실적은 국내·외에서 발표된 바가 없다.

본 과제를 수행하는 연구진은 다년간 연구수행으로 수정란의 체외생산기술, 유전자 조작과 유전자전환 수정란의 조기선별기술, 핵이식에 의한 복제기술, 및 수정란이식기술을 확보하고 있어서 다년간 익혀온 경험과 축적된 기술을 바탕으로 하여 인체에 유용한 단백질을 생산하는 형질전환 동물을 생산하는 기술을 개발하고 이를 통해서 유용단백질을 생산하는 젖소를 생산하는데 그 목적이 있다. 유용단백질을 유즙 내에서 분비하는 형질전환 동물을 생산함으로써 생명공학의 산업적 측면에 큰 기여를 할 것으로 기대한다.

제2절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

가. 체세포 복제 가축 생산 기술

핵이식기술은 능력이 우수한 가축을 짧은 기간에 대량 생산하고 보급하는데 가장 효과적인 기술이며, 특히 우리나라와 같이 우량 종축 자원이 부족한 실정에서는 값비싼 종축을 다량 수입하지 않고서도 짧은 기간에 가축을 증식하고 능력을 개선시키는데 매우

효과적으로 활용될 수 있다.

핵이식 기술은 1981년 Illemnsee와 Hoppe가 생쥐에서 처음으로 성공한 이래 많은 발전이 이루어져 왔다. 최근 영국의 Roselin 연구소의 Wilmut 박사 team에 의해서 탄생된 “Dolly”는 금세기 자연과학의 큰 업적이라고 할 수 있다. 이러한 연구는 생식세포가 아니면 생명이 창출될 수 없다는 현재까지의 학설에 큰 충격을 주었으며, 또한 생명과학 분야에 있어서 대단한 진보임에 틀림없다 (Wilmut 등, 1997). 이후 체세포를 이용한 복제동물의 생산기술 개발에 관한 많은 연구가 이루어졌는데, 유선조직세포 뿐만 아니라 태아의 조직세포, 난구세포 및 난관상피세포를 사용하여서도 핵이식으로 산자를 생산할 수 있는 기술이 개발되었다. 국내에서도 황 등(1999)은 젓소의 난구세포를 사용하여 복제 송아지를 생산하는데 성공한 바 있다. 최근 이 기술에 의한 복제 송아지 생산효율이 많이 향상되고 있으나 산업적으로 실용화하기 위해서는 아직 해결해야 할 기술적인 문제들이 있다.

첫째, 우수한 개체로부터 세포를 채취하고, 계대 배양하여 동결 보존하는 과정을 통하여 필요한 세포의 cell line 이 확립되어야 하고, 둘째, 체세포를 복제란의 대량확보를 위한 기술개선이 하루 속히 이루어져야 하며, 셋째는 복제소(형질전환 복제 포함) 생산에 적합한 세포에 대한 검토가 이루어져야 하며, 넷째, 수정란의 품질을 향상시킬 수 있는 배양기술 및 동결보존기술이 확립되어야 하고 다섯째, 수정란이식에 의한 수태율 향상방안이 강구되어야 하며, 아울러, 조기 배 사망 및 비정상 산자발생 원인분석, 산자의 유전능력 검정기술 및 이용성 향상 방법 등이 검토되어야 하며, 이러한 복제동물 생산기술은 일부 핵심기술이 특허로 등록되어 있고 고도의 숙련을 필요로 하여 우수한 소를 외국으로부터 도입하기에는 너무나 많은 외화가 지불되어야 하므로 국내에서 기술개발이 되지 않으면 안 된다고 본다.

나. 형질전환 가축생산 기술

근래에 유전자재조합기술, 동물복제기술 및 수정란이식기술의 발달로 인류에 유익한 유전자를 재조합하고 이를 여러 동물에 도입시켜 왔으며, 생쥐 이외에도 소, 양, 돼지, 산양, 닭, 토끼, 물고기 등 많은 동물 중에서 형질전환동물이 생산되었다. 이러한 **형질전환동물생산기술**은 ① 가축에서 육질개선과 성장속도의 조절 등 생산성향상을 통한 더

육 효율적이고 질 좋은 축산식품의 생산, ② 희귀한 단백질이나 약물을 양이나 소의 유선에서 생산하는 분야에의 이용, ③ 동물의 질병에 대한 저항성의 증가, ④ 질병과 생체기작에 관한 연구에 있어서 매우 독특하고 유용한 질환모델동물의 생산 등에 있어서 획기적인 기여를 할 가능성이 있기 때문에 세계 각국은 이 기술의 산업화를 위하여 막대한 투자를 하고 있다(Reviews; Pursel 과 Rexroad, 1993; Brem, 1993; Wall 등, 1997).

또한 형질전환 동물은 미국을 위시한 선진국에서 특허로 등록되어 오고 있어서 이의 도입에 따른 기술적 어려움과 외화지불을 절감하기 위하여서는 국내에서의 기술개발이 역시 필요하다.

본 연구에서는 태아유래 체세포 및 원시생식세포의 cell line을 확보하여 이들에게 재조합된 유전자를 전이시키고 핵이식기술로 복제하며, 이들 수정란을 대리모에 이식하여 형질전환된 유우를 생산하고, 나아가서 이들을 성장 및 번식시켜 분만 후 우유에서 단백질을 분리한다. 이 방법의 장점은 수정란에 유전자를 도입하는 경우 형질전환율이 1%미만이나, 생식세포 또는 체세포를 이용한 핵이식기법을 이용하면 매우 높은 효율로서 형질전환 산자의 생산이 가능하기 때문에, 이 방법의 개발을 매우 유익하고도 효과적으로 형질전환동물의 생산이 가능할 것이다.

2. 경제·산업적 측면

가. 체세포 복제 가축 생산 기술

핵이식기술은 능력이 우수한 가축을 짧은 기간에 대량 생산하고 보급하는데 가장 효과적인 기술이며, 특히 우리나라와 같이 우량 종축 자원이 부족한 실정에서는 값비싼 종축을 다량 수입하지 않고서도 짧은 기간에 가축을 증식하고 능력을 개선시키는데 매우 효과적으로 활용될 수 있으므로 외화를 절약할 수 있다. 성장속도가 빠르고 육질이 좋은 극히 우수한 몇 두의 한우 및 젖소를 이용하여 빠른 시간에 이를 증식 및 보급하기 위하여서는 체세포 복제기술의 개발과 활용이 매우 유용하다고 사려되며, 2001년 쇠고기 수입 자유화에 직면하여 국내 축산업의 경쟁력 제고와 수익성 향상을 위하여 우량 한우 및 젖소의 대대적 보급이 필요하다고 본다.

나. 형질전환 가축 생산 기술

1) 형질전환 동물 생산의 경제 산업적 효과

사람 혈청알부민 단백질은 매년 10%이상
신장하는 고가의 생리활성물질이다.

- 한국생산성본부 자료에 의하면 1998년 사람 혈청의 국내생산량은 401,804 liter이며, 수입량은 189,000 liter로서 매년 10%이상 증가하고 있다.
- 1998년 국내에서는 알부민을 88,000 liter 소모하고 있으며, 이를 의료보험수가 기준으로 계산하면 약 785억원이다.
- 미국 내 알부민 연간 소요량은 315×1000 kg으로서 약 1조 3440억원이다.

1998년도 미국 생명공학 의약품의 매출실적은 연간 약 20억\$이었다. 이중 혈청알부민은 생명공학 의약품 중 판매량이 상위 10위 이내에 드는 판매실적을 가지고 있으며, 2000년경에는 30억\$이상의 시장 규모로 매년 10% 이상 신장될 것으로 예상된다.

따라서, 현재 혈청 알부민이 동물의 유전을 통하여 생산하는 기술이 개발된다면,

가) 농민의 소득원인 생산성을 향상시켜, 동물산업의 발전을 도모하고,

나) 혈장의 연간 수입량인 189,000 liter를 전량 국산화함으로써 수입대체 효과를 가지며,

다) 연간 20조원 이상에 달하는 세계시장에 수출함으로써 외화를 획득하며,

라) 각종 질환에 시달리는 환자에게 저렴한 알부민을 공급함으로써 국민의 삶의 질을 향상시킴으로써 국민의 복리증진에 기여할 수 있으며,

마) 본 기술의 개발에 따른 각종 고가의 의료생리활성물질을 국내에서 대량생산하여, 보급할 수 있는 기술이 확립될 것이다.

2) 가축에서 형질전환 동물 생산을 위해서 특정 유전자를 수정란 전핵 내 미세주입법에 의한 방법은 그 성공률이 1% 미만이다. 그러므로 한 마리의 형질전환 동물을 생산하기 위하여서는 적어도 100 마리 이상의 대리모가 필요하다. 그러나 PCR분석 기법을 응용하여 이식전의 수정란에서 주입된 유전자의 발현여부를 조기에 가려냄으로써 수란우의 수를 80% 정도 줄일 수 있으므로(Bowen 등,1993) 그 경제적

시간적 절약은 막대하다. PCR 분석기법으로 조기감별을 실시하면 유전자의 통합을 조기에 확인함으로써 **형질전환 동물의 생산 성공률을 10배 이상 향상시킬 수 있다.**

- 3) 핵이식기법으로 유전자가 전환된 원시생식세포 및 태아 유래 체세포만을 가려서 복제함으로써 **수 많은 복제수정란을 작출할 수 있어 형질전환 수정란의 생산비를 절감할 수 있을 뿐만 아니라**(Krisher 등 1995), 태아의 성별을 구별하여 사용함으로써 100% 원하는 성의 산자를 생산할 수 있어 **조기 성감별이 필요 없게 된다.**

3. 사회·문화적 측면

가. 체세포 복제 가축 생산 기술

- 1) 국내 산업 중 축산업의 발전에 중요한 영향을 미칠 것이다.
- 2) 복제기술의 확립은 농업 뿐 만 아니라 생명산업, 의학의 발전에도 많은 기여를 할 것이다.
- 3) 특히 이러한 기술은 형질전환 동물을 생산하는데 기초를 구축할 뿐 만 아니라 향후 장기 이식용 동물을 생산함에 있어서도 매우 유용하게 활용될 것이다.

나. 형질전환 가축 생산 기술

- 1) 선진각국에서는 형질전환동물이 특별히 보호되어 있어서 이를 외국으로부터 도입할 경우 특허 도입비 및 고가의 수입비용이 앞으로 부가될 것이며, WTO 체제에 대비하여 의학적 및 산업적으로 유익하며 우량한 가축 및 형질전환 동물을 국내에서 생산할 수 있는 기술을 갖추어야 한다.

- 2) 이식 전 수정란 단계에서 외부 유전자 통합을 조기에 판정하고, 체세포 복제기술로 수정란생산기술을 극대화하며, 나아가 특정유전자 주입에 의한 형질전환동물의 효율적 생산은 가축의 개량에 가장 유효한 방법이며 형질전환 동물생산 분야의 발전에 큰 밑거름이 될 것이다

제3절 연구개발의 목표 및 내용

1. 총괄 연구개발 목표

가. 연구목표 : 체세포 복제 한우 생산 및 우유에서 사람 혈청알부민을 생산하는 젖소 생산

나. 연구내용 :

- 체세포 복제기술에 의한 형질전환 송아지 생산(주관연구기관 : 경상대)

- 제1세부 과제 (김진희 : 유전자 및 발현 프로모터 크로닝)

1) 사람 혈청알부민 (hSA) 유전자의 크로닝

가) 사람 간(liver)으로부터 total RNA와 mRNA를 분리하여 PCR 혹은 구축된 library로부터 subcloning에 의하여 T-vector에 재조합

나) T-vector에 삽입된 hSA 유전자는 automatic sequencing에 의하여 염기배열을 검정하고, 이미 발표된 유전자의 단백질 배열과 비교함으로써 돌연변이 삽입유무를 검정

2) 유선훈이적 발현 프로모터의 크로닝

가) 소의 β -casein 유전자의 5'상류측 약 6kb의 프로모터유전자를 소 library로부터 LA-PCR에 의하여 증폭하여, T-vector에 삽입한 후 automatic sequencing에 의하여 염기배열 검정

나) 5'측 promoter 영역의 활성은 reporter 유전자를 재조합한 발현백터를 유선세포주에 도입함으로써 검정

3) 조직특이 강화 또는 프로모터 활성 강화를 위한 enhancer영역의 크로닝

- 가) 닭의 β -globin 유전자로부터 조직특이적 발현과 프로모터의 발현을 증폭시키는 β -globin insulator 유전자를 크로닝
- 4) 형질전환 젖소의 생산을 위한 발현 벡터의 재조합
 - 가) 사람 혈청알부민을 유선에서 생산하는 발현벡터는 β -globin insulator에 β -casein 프로모터를 재조합하고, 이들 유전자에 β -casein의 untranslated intron1과 2을 삽입한 후 사람 혈청알부민 유전자를 삽입
 - 나) cDNA의 발현상의 문제점을 극복하기 위하여 β -casein genomic intron 7,8,9을 삽입하고, mRNA의 안정성을 위하여 5.5kb의 β -casein polyA을 삽입하여 재조합
- 5) 형질전환 수정란 및 송아지 분석

- 제2세부 과제 (노규진 : cell line 구축 및 유전자 도입)

- 1) 우량 젖소로부터 원시생식세포 및 태아 섬유아세포 cell line 확보
 - 가) 인공수정 후 30-35일 췌에 PGF_{2α} 및 PGE₂를 이용해서 유산 유도 및 태아 분리
 - 나) 분리된 태아로부터 효율적인 원시생식세포 및 태아 섬유아세포 분리 기술 확립
 - 다) 분리된 세포의 동정
- 2) cell line의 배양체계 구축
 - 가) feeder layer cell 인 STO cell line 구축
 - 나) 계대배양 효율성 조사 및 배양체계 구축
 - 다) 세포주기분석
- 3) cell line에 hSA 유전자 도입 및 도입된 cell의 선별
 - 가) electrofusion 혹은 lipofectin을 이용해서 적정 유전자 도입율 조사 및 검정
 - 나) G418의 효율성 검정
- 4) cell line, feeder layer cell 및 유전자 도입된 cell line의 동결보존
- 5) 형질전환 수정란이식

- 제3세부 과제 (최상용 : 체세포 복제기술에 의한 형질전환 복제수정란 생산)

- 1) 소 난포란의 체외성숙 및 수정란(복제수정란 및 형질전환수정란)의 배양기술 확립
 - 가) 난자의 세포질의 각종 요인 조사 : mitochondria content, microfilament 및 microtubule
 - 나) 난자의 최적 활성화 방법 확립
- 2) 수핵난자의 탈핵기술 개선
- 3) 체세포 핵의 cell cycle의 조건 확립
- 4) 원시생식세포 및 태아 섬유아세포간의 핵이식 후 발달능 조사
 - 가) 핵형 및 발달율을 조사하여 형질전환을 위한 세포주 결정
- 5) 체세포핵의 난세포질내에 직접주입에 의한 복제수정란 생산기술 개발
- 6) 유전자 도입된 세포주를 이용해서 형질전환 수정란 생산기술 확립
- 7) 복제수정란 및 형질전환 수정란의 동결법 확립
- 8) 제2협동 연구기관에 형질전환 복제수정란 공급

o 체세포 복제 한우와 젖소의 수정란 생산(협동연구기관 : 강원대)

- 1) 우량 한우로부터 체세포 확보
 - 가) 분리된 세포의 동정
 - 나) 세포의 회수, 계대배양 및 동결보존에 의해 cell line 확보
 - 다) 각 세포의 세포주기분석과 최적 세포주기 동조방법 확립
- 2) 체세포 핵이식에 의한 복제수정란 생산기술 확립
 - 가) 수핵란의 탈핵기술 개선 및 활성화기술 확립
 - 나) 체세포 핵과 수핵란 세포질의 최적 전기융합조건 확립
 - 다) 체세포 핵과 수핵란 세포질의 세포주기동조 핵이식의 최적조건 확립
 - 라) 세포의 배양방법, 세포주기동조방법, age에 따른 핵이식란의 발육능 확인
 - 마) 세포의 종류에 따른 핵이식란의 발육능 검토-복제 적합한 세포검정
- 3) 복제수정란의 공급 및 이식에 의한 한우 복제송아지 생산
 - 가) 체세포 복제란의 동결 및 이식

4) 복제송아지 생산 및 평가 (주관연구 기관과 협조)

가) 체세포 유래 복제란의 이식에 의한 한우 복제송아지 생산

나) 복제송아지의 유전자 확인에 의한 정확성 검토

2. 연차별 연구개발목표 및 내용

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2000)	<ul style="list-style-type: none"> ● 유전자 및 발현 프로모터 크로닝 ● cell line 구축 및 유전자 도입 ● 체세포 복제기술에 의한 형질전환 복제수정란 생산 (주관연구기관 : 경상대) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유전자 크로닝 <ul style="list-style-type: none"> - hSA 유전자 크로닝 - 유선특이적 발현 프로모트의 크로닝 ○ 원시생식세포 및 태아 섬유아세포 cell line 확보 ○ Cell line 배양체계 구축 ○ 난포란의 체외성숙 및 수정란의 배양체계 확립 ○ 난자의 활성화 방법 확립
	<ul style="list-style-type: none"> ● 체세포 복제 한우와 젖소 수정란 생산 (제1협동연구기관 : 강원대) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 한우 cell line 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 분리된 세포의 계대배양 - 계대배양 및 세포주의 동결보존 ○ 배양 체세포의 세포주기 분석 ○ 수핵란의 효율적인 탈핵기술 개발
	<ul style="list-style-type: none"> ● 체세포 복제 수정란 및 형질전환 수정란 이식 (제2협동연구기관 : 동신대) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 수란우 확보체계 구축 <ul style="list-style-type: none"> - 나주축협 조합원 및 산학농가 대상 ○ 수란우의 발정동기화에 의한 최적이식 조건 확립

2차년도 (2001)	<ul style="list-style-type: none"> ● 유전자 및 발현 프로모터 크로닝 ● Cell line 구축 및 유전자 도입 ● 체세포 복제기술에 의한 형질전환 복제수정란 생산 (주관연구기관 : 경상대) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Enhancer 영역의 크로닝 ○ 발현 벡터 크로닝 ○ Cell line에 hSA 유전자 도입 및 선별 ○ 체세포를 이용한 핵이식 수정란 생산 ○ 체세포를 이용한 형질전환 수정란 생산 체계 확립
	<ul style="list-style-type: none"> ● 체세포 복제 한우와 젖소 수정란 생산 (제1협동연구기관 : 강원대) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 1년차 과제 연속 ○ 체세포를 핵이식에 의한 복제수정란 생산 기술 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 전기융합조건 확립, 세포주기 동조 확립 ○ 수정란 동결법 확립
	<ul style="list-style-type: none"> ● 체세포 복제 수정란 및 형질전환 수정란 이식 (제2협동연구기관 : 동신대) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 복제수정란 이식 ○ 수란우의 발정동기화에 의한 최적이식 조건 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 자연발정 및 호르몬 처리에 의한 발정동기화간의 수태율 비교
3차년도 (2002)	<ul style="list-style-type: none"> ● 유전자 및 발현 프로모터 크로닝 ● Cell line 구축 및 유전자 도입 ● 체세포 복제기술에 의한 형질전환 복제수정란 생산 (주관연구기관 : 경상대) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 형질전환 수정란 발현율 ○ Cell line 구축 및 유전자 도입 ○ 형질전환 수정란 자체 이식 ○ 형질전환복제수정란 생산 <ul style="list-style-type: none"> - 형질전환 수정란 생산 - 형질전환 수정란 동결보존
	<ul style="list-style-type: none"> ● 체세포 복제 한우와 젖소 수정란 생산 (제1협동연구기관 : 강원대) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 복제수정란 생산 ○ 복제 수정란 동결 및 공급 (제2협동연구진) ○ 복제 수정란 자체 이식
	<ul style="list-style-type: none"> ● 체세포 복제 수정란 및 형질전환 수정란 이식 (제2협동연구기관 : 동신대) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 복제수정란 및 형질전환 수정란 이식 ○ 영양막세포와 공이식법 확립

4차년도 (2003)	<ul style="list-style-type: none"> ●유전자 및 발현 프로모터 크로닝 ●Cell line 구축 및 유전자 도입 ●체세포 복제기술에 의한 형질전환 복제수정란 생산 (주관연구기관 : 경상대) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 형질전환 수정란 및 송아지 분석 ○ 복제송아지 유전자 분석 ○ Cell line 구축 및 유전자 도입 ○ 형질전환 수정란 자체 이식 ○ 형질전환복제수정란 생산 <ul style="list-style-type: none"> - 형질전환 수정란 생산 - 형질전환수정란 동결
	<ul style="list-style-type: none"> ●체세포 복제 한우와 젓소 수정란 생산 (제1협동연구기관 : 강원대) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 복제수정란 생산 ○ 복제수정란 동결 ○ 복제수정란 이식
	<ul style="list-style-type: none"> ●체세포 복제 수정란 및 형질전환 수정란 이식 (제2협동연구기관 : 동신대) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 복제수정란 및 형질전환 수정란 이식
5차년도 (2005)	<ul style="list-style-type: none"> ●유전자 및 발현 프로모터 크로닝 ●Cell line 구축, 유전자 도입 및 형질전환 수정란이식 ●체세포 복제기술에 의한 형질전환 복제수정란 생산 (주관연구기관 : 경상대) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 형질전환 복제수정란 및 송아지 분석 ○ 복제송아지 유전자 분석 ○ 형질전환 수정란 자체 이식 ○ 형질전환 복제수정란 생산 ○ 형질전환 송아지 생산 ○ 형질전환 수정란 착상관련 유전자 발현분석 및 검증 ○ 형질전환 태아 및 태반의 분석 ○ 형질전환 송아지 계대번식 검정
	<ul style="list-style-type: none"> ●체세포 복제 한우와 젓소 수정란 생산 (협동연구기관 : 강원대) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 한우 체세포 복제수정란의 이식 및 공급 <ul style="list-style-type: none"> - 신선, 동결융해 복제수정란 이식 - 한우 체세포 복제 송아지 생산 ○ 체세포 복제송아지의 유전자 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 복제소의 혈액 채취 - Donor 및 복제송아지 혈액의 DNA 검출 - DNA 분석에 의한 복제확인 (주관협조) ○ 복제송아지 및 형질전환 복제송아지 평가

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 핵이식에 의한 복제동물 생산기술

1997년 Wilmut 박사의 유선세포의 핵을 이용한 핵이식으로 복제 양을 생산한 연구 이후로 체세포를 이용한 동물복제 가능성은 여러 학자들에 의하여 입증되었으며 그 효율도 점차 향상되고 있다.

국내에서는 이철상 등(1989)이 처음으로 핵이식에 의한 생쥐 생산에 성공하였다는 보고가 있었고, 본 연구진도 핵이식기법으로 생쥐와 토끼에서 복제 산자를 생산한 바 있다(최 등; 1990, 이 등; 1994). 최근 황우석 등(1999)은 젓소에서 체세포 복제를 실시하여 송아지(영롱이)를 생산하는데 성공하였으며, 또한 이들은 한우(진이)에서도 성공한 바 있다.

● 체세포 핵이식 성공 예

Species	성공 예 (최초)	세 포
Mouse	Wakayama 등, 1998	Cumulus
Sheep	Wilmut 등, 1997	Mammary gland, Fetal fibroblast
Goat	Baguisi 등, 1999	Fetal fibroblast
Pig	Polejaeva 등, 2000	Granulosa
Bovine	Kato 등, 1998	Cumulus, Oviduct
Cat	Shin 등, 2002	Cumulus
Rabbit	Chesne 등, 2002	Cumulus
Horse	Galli 등, 2003	Skin
Mule	Woods 등, 2003	Fetal cell
Dog	Lee 등, 2005	Skin

● 체세포 핵이식의 주요 성과

Species	Cell type	연구자	비고
Sheep	Fetal fibroblast	Schnieke 등, 1997 McCreath 등, 2000 Denning 등, 2001	Transgenic Knock-in Knock-out
Mouse	Tail skin Various cells	Wakayama 등, 1999 Wakayama 등, 2001	
Bovine	Fetal fibroblast Cumulus, oviduct Granulosa Muscle Skin	Cibelli 등, 1998 Kato 등, 1998 Wells 등, 1999 Shiga 등, 1999 Kubota 등, 2000	Transgenic
Goat	Fetal fibroblast	Keefer 등, 2001	Transgenic
Pig	Granulosa Fetal fibroblast	Polejaeva 등, 2000 Onish 등, 2000 Betthausen 등, 2000 Park 등, 2001 Lai 등, 2002 Dai 등, 2002	serial NT Injection In vitro Transgenic Knockout “
Cat	Cumulus	Shin 등, 2002	
Rabbit	Cumulus	Chesne 등, 2002	
Horse	Skin	Galli 등, 2003	
Mule	Fetal cell	Woods 등, 2003	
Dog	Skin	Lee 등, 2005	In vivo

가. 당해 연구기관의 연구개발실적

경상대 및 강원대의 경우, 체외성숙, 체외수정에 관한 연구는 상시 시행중이며, 도축장에서 회수한 난소로부터 미성숙난자를 채취하여 체외성숙, 체외수정 후 배양체계를 검토하여, 높은 수정률과 함께 배반포까지의 체외발육성적도 30-40% 까지 얻을 수 있게 되었다. 또한 배반포기로 발육된 수정란을 수란우에 이식하는 방법도 연구 개발되어, 1994년 체외수정유래 한우(정 등, 1994; 박 등, 1995) 및 젓

소를 생산하는데 성공하였다. 핵이식기술 관련 연구로는 1989년부터 4년간 본 과제의 연구원 중 한 명이 일본에서 복제동물생산에 관한 연구를 수행하여 핵 및 세포질의 세포주기동기화의 중요성 등 많은 결과를 저명한 국제잡지에 수 편 발표하기도 하였다(Cheong 등, 1992; 1993; 1994). 최근에는 복제가축생산에 관한 연구를 수행하여 1993년에 국내에서는 처음으로 소의 핵이식에 관한 논문(김 등, 1993)을 발표하여 체외수정 유래의 32세포기 단일 분할구핵을 이식하여 배반포까지 발육될 수 있음을 확인하였으며, 계속하여 공핵란의 발육단계, 수핵란의 활성화, 핵과 세포질의 세포주기 등에 관한 기초적인 연구를 수행하여 정보를 축적하고 있으며(김 등, 1994; 정 등, 1996a,b), 수정란의 핵이식에 의한 송아지 생산에도 성공하였다(정 등, 1998). 현재는 소 태아섬유아세포 및 체세포를 이용한 핵이식에 관한 연구를 수행 중에 있으며, 금년 6월에 태아체세포 유래 수컷 한우복제에 성공하였다(출생 당일 사망 함). 태아 체세포복제는 형질전환가축 생산을 위하여 가장 적합하다고 판단되고 있는 기술이다.

2. 형질전환 동물 생산 기술

일부 선진국에서는 형질전환동물 생산에 성공하여(Brinster 등, 1981; Gordon 등; 1980) 일부 산업적으로 응용하는 수준에 도달해 있으나 이의 성공율은 매우 낮아서 주입된 수정란을 기준으로 할 때 산자에서의 발현율은 생쥐 같은 실험동물에서는 1-5% 정도이고, 토끼에서는 0.75%이며, 가축인 소에서는 0.7%, 산양에서는 0.99%, 면양에서는 0.88%, 돼지에서는 0.91% 등 1%에 미치지 못하고 있다(Pursel 과 Rexroad; 1993, Riego 등; 1993, Thomas 등; 1993). 이를 개선하기 위하여 PCR분석에 의한 조기감별, 여러 가지 vector 개발 등 많은 연구가 수행되고 있다.

국내에서는 이경광 등(1989)이 사람의 성장호르몬 유전자를 생쥐 수정란의 전핵내에 미세주입하고 이들을 가친의 난관내에 382개 이식하여 140 마리(36.6%)의 산자를 얻었는데 이 중 6마리에서 사람의 성장호르몬 유전자가 발현되었음을 확인함으로써 국내에서는 최초로 형질전환 동물생산에 성공하였다. 그 이후 이경광 등

(1998)은 lactoferrin을 유즙으로 분비하는 형질전환 젖소를 생산하였고, 유육준 등 (1998)은 사람의 조혈인자인 G-CSF를 가진 형질전환 산양을 생산하는데 성공하였다. 이 외에도 몇 가지 인체 생리활성 물질을 분비하는 형질전환 동물생산에 관한 연구가 수행되고 있다. 선진국에서는 사람혈청알부민을 유즙으로 생산하는 형질전환 생쥐와 토끼를 생산하는데 성공한 예가 있다. 그러나 아직까지는 태아의 원시생식세포에 유전자를 삽입시키고 이를 핵이식으로 복제한 다음 대리모에 이식하여 복제 산자를 생산한 실적은 국내·외에서 발표된 바가 없다.

본 연구진은 다년간 연구수행으로 수정란의 체외생산기술, 유전자조작과 유전자전환 수정란의 조기선별기술, 핵이식에 의한 복제기술, 및 수정란이식기술을 확보하고 있으며, 1989년 생쥐에서 핵이식으로 복제 산자를 생산하는데 성공한 이래, 1994년에는 토끼에서 복제산자를 생산하였고, 유전자주입 수정란의 PCR 및 GFP 검색에 의한 조기 선별법(1995-1998)을 개발 연구한 바 있다. 본 연구에서는 그간 익혀온 경험과 축적된 기술을 바탕으로 하여 인체에 유용한 단백질을 생산하는 형질전환 동물을 생산하는 기술을 개발하고 이를 통해서 유용단백질을 생산하는 젖소를 생산하는데 그 목적이 있다. 이러한 방법이 개발되면 형질전환 동물로부터 인류에 유익한 물질생산이 가능하고, 세계 시장에 진출함으로써 국가 경쟁력을 향상시킬 수 있다.

가. 문제점

국내외적으로 형질전환 복제 가축 생산기술의 개발 및 실용화에 관한 연구가 다양하게 수행되고 있으나, 위에서 언급한 바와 같이 이 기술이 실용화된 기술로 정착되기 위해서는 아직도 해결하여야 할 문제점이 많이 있다. 실험동물의 경우에는 상당한 연구의 진전이 이루어져 핵이식배의 배반포까지의 발육률이 생쥐나 토끼의 경우는 70% 까지 달하고, 이식 후 산자 생산까지의 성공률도 비교적 높은 편이다. 반면, 소의 경우 핵이식기술에 의해 생산된 재구축배가 이식 가능한 배로 발육될 수 있는 비율은 평균 30%를 넘지 못하며, 이식 후 산자발생능도 아직은 30-40%정도이기 때문에 핵이식에 의한 산자 생산의 성공률은 평균 10% 전후이다. 더 나아가, 태아세포나 체세포를 이용한 복제의 경우는 이제 막 시작한

단계로 성공례가 보고되고 있는 수준이다. 그렇다고는 하지만, 이 기술이 곧 가축 증식 및 유용 유전자 확보를 위한 중요한 기술로 활용될 것은 자명하다. 국내에서도 본 연구팀을 비롯하여 몇몇 연구기관에서 꾸준한 연구가 이루어지고 있기 때문에 장래가 밝다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 유전자 및 발현 프로모트 크로닝

서론

Human serum albumin (HSA)은 성인 혈장 내의 주된 단백 성분으로 간에서 생산되며, 주로 혈류에서의 정상 삼투압 유지에 관여하고 수많은 작은 분자들의 매개체로 작용을 한다(Rosenoer, et al., 1977;Peters, 1977). 또한 Ruoslahti et al.(1976)이 태아에서 HSA에 상응하는 물질인 a-fetoprotein을 발견하였다. 이 두 단백질은 생리 화학적인 특징이 유사하며 태아와 성인의 간에서 상호 유의적인 수준의 양이 검출된다고 보고되었다(Sala-Trepat et al. 1979). 랫드에서는 혈청 알부민과 a-fetoprotein은 34% 정도 amino acid가, 50% 정도 nucleotide sequence가 동일하다고 보고되었다(Jagodzinski et al, 1981).

형질전환 동물이란 다른 종의 유전자를 삽입, 조작함으로써 본래의 것과는 다른 유전적 특성을 갖게된 동물을 말한다. 다시 말하면 인위적인 DNA조작에 의해 만들어진 동물을 말하며 인위적으로 돌연변이를 만들어 내는 것이다. 이러한 형질전환 동물을 만들기 시작한 목적은 산업적, 의학적으로 사용하기 위해서이다. 성장촉진에 관여하는 유전자나 산유 및 산란능력을 촉진하는 유전자를 이용하여 가축의 생산능력을 높일 수 있다. 특정질병에 저항성을 가지는 유전자를 도입한 형질전환 젖소나 닭을 생산함으로써 값비싼 단백질을 우유나 달걀로부터 생산할 수 있다. 유전병의 예방, 치료 및 진단을 위한 실험동물을 생산하여 인류의 질병퇴치를 위한 모델동물로 사용할 수 있다. 새롭게 형질전환된 품종이나 계통을 만듦으로써 가축육종을 효과적으로 할 수 있다.

본 실험에서는 HSA 및 그 발현 프로모트를 크로닝하고자 하였다.

재료 및 방법

hSA 혹은 casein promoter 유전자 크로닝

Library Screening을 위한 단계는 다음과 같다.

Preparation of plating bacteria

20% maltose를 최종 농도 0.2%로 첨가한 5ml LB media에 하나의 bacteria colony를 접종하고 밤새 37℃에서 배양한다. 50ml LB media(0.2% maltose 포함)에 bacteria colony를 접종한 것에서 culture한 것의 1%만 옮겨 2.5시간 배양한다.

OD600 측정에서 0.5정도가 될 때까지 키운다. 상온에서 2500rpm 10분 원심분리한 후, Cell pellet을 멸균된 10ml MgSO₄에 suspension한다. (final 1.0×10¹⁰ cell/ml) 이후, 4℃에 보관한다.

Titration

Library를 연속적으로 SM 용액에 희석한 후, LB plate를 37℃ incubator에서 데운다. Top agar를 녹여서 48℃ water bath에 놓아둔 다음, 여러 농도로 희석된 phage solution 10μl 와 bacteria colony로 준비한 host cell을 100μl 섞어 37℃에서 infection시킨다. Top agar에 infection 된 host cell을 넣고 잘 흔들어 준 뒤 LB plate에 붓는다. 15분 뒤 LB plate를 거꾸로 뒤집어 37℃ incubator에서 밤새 배양한다.

Plating

LB plate를 뒤집은 상태로 37℃ incubator에서 데운 다음, top agarose(0.7%) 3ml을 녹여 48℃ water bath에 놓아둔다. Phage solution 10μl와 host cell 100μl를 섞어 37℃에서 20분간 infection시킨 뒤, top agarose에 infection된 cell을 넣고 잘 섞은 뒤 plate에 붓는다. 37℃ incubator에서 배양한 후, 4℃에서 1 시간 이상 cooling시킨다.

Immobilization of DNA on nitrocellulose filter

3개의 tray에 각각 denaturation solution, neutralizing solution, 2XSSC을 담은 뒤, NC filter 가장자리를 양손으로 잡고 가운데서부터 filter가 적셔지도록 한다. filter에 needle로 수직으로 찢어 표시하고 1분 후 천천히 떼어 낸 다음, 3개의 tray에 담긴 solution에 각각 1분씩 담근다. filter에 DNA가 완전히 고정 되도록 80℃ oven에 2시간 둔다.

Hybridization

Filter를 2X SSC 위에 띄워 적신 후 prehybridization solution이 들어 있는 petri dish 에 하나씩 넣는다. 68℃에서 1시간 동안 살살 흔들어 주면서 prehybridization 한다. Denaturation 된 probe를 넣고 68℃에서 18시간 살살 흔들어 hybridization한다.

Washing

1차 washing solution(2X SSC, 0.1% SDS)으로 10분 동안 흔들면서 씻어 준 다음, 2차 washing solution을 68℃로 데워서 10분 동안 흔들면서 씻어 준 후, filter를 공기중에서 말린다. Autoradiogram을 이용한다.

Picking up a single plaque

Autoradiogram과 plate를 잘 맞추어 보고 signal이 있으면 signal로 있는 plaque

을 선택 하여 SM buffer 500 μ l에 넣어 Chloroform한 방울을 첨가 한 뒤 vortexing 해 4 $^{\circ}$ C에 보관 한다.

Purification of λ phage DNA

Host cell 40 μ l 와 plaque 1개를 섞어 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 두어 infection 시킨 후, 50 ml NZCYM media에 옮겨 넣어 37 $^{\circ}$ C shaker에서 10시간 배양하고, chloroform 200 μ l을 첨가한 뒤 1 시간 더 배양한다. DNase/RNase를 최종 농도 1 μ g/ml가 되게 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 다음, NaCl 첨가한 뒤 녹여서 얼음에 1시간 방치한다. 4 $^{\circ}$ C 에서 10분 동안 12,000 rpm으로 원심분리한 뒤, 상층액을 옮겨 PEG를 첨가한 뒤 녹인 다음 얼음에서 1시간 또는 밤새 방치한다. 4 $^{\circ}$ C에서 12분 동안 11,000rpm으로 원심분리한 다음, PEG 용액을 완전히 제거한 후 TE 500 μ l에 녹인 뒤 eppendorf tube로 옮긴다. 같은 양의 chloroform을 넣고 vortexing한 뒤, 4 $^{\circ}$ C에서 1분 동안 원심분리하여 상층액을 새 tube에 옮긴다. DNase 1과 RNase A를 각각 최종농도 1 μ g/ml 가 되게 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1~3시간 정도 반응시킨다. 5분 동안 원심분리하여 cell debris를 제거한다. PEG/NaCl 용액을 같은 양 첨가하여 얼음에 30분간 방치하고, 4 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 원심분리한다. 10% SDS 5 μ l 와 proteinase K를 첨가한 뒤 68 $^{\circ}$ C water bath에 5분간 방치한 후, 5M NaCl 10 μ l 를 첨가한 뒤 phenol 500 μ l를 넣고 거꾸로 뒤집어 가며 살살 섞어 준다. Chloroform 200 μ l를 넣고 섞은 뒤 원심 분리한 후, 상층액을 새 tubr에 옮긴 뒤 phenol/chloroform으로 extraction한다. 같은 양의 isopropanol을 넣고 섞은 뒤 -70 $^{\circ}$ C에서 10분 방치한다. 4 $^{\circ}$ C에서 15분간 원심분리70% ethanol로 washing한 뒤 상온의 공기 중에서 말린 후, 70% ethanol 로 washing 한 뒤 상온의 공기중에서 말린다. TE 50 μ l에 녹이고 그 일부를 0.8% agarose gel electrophoresis로 확인한 후 보관한다

cDNA의 제한효소 절단, transfer, 그리고 hybridization

분석하고자 하는 cDNA 10 μ g과 반응완충용액 및 증류수를 혼합하여 총 194 μ l로 만든 다음, 40 U의 제한효소를 가하고 조심스럽게 혼합한 뒤 37 $^{\circ}$ C에 16 시간 보관한다. Phenol chloroform 추출을 실시하여 수용액층을 분리한 후 2.5배의 ethanol을 첨가하고 -20 $^{\circ}$ C에 1시간 이상 보관한다. 4 $^{\circ}$ C에서 10,000 rpm의 속도로 10분간 원심분리한 후 상층액을 제거한 다음 침전물을 완전히 건조시키고 TE 용액 20 μ l로 녹인다. 위에서 준비된 제한효소로 절단된 cDNA 시료를 0.7% agarose gel에 가한 후 100 V 전압을 걸고 2시간 동안 전기영동한다. 전기영동이 끝난 gel을 ethidium bromide를 0.5 μ g/ml의 농도로 가한 후 gel을 적당 시간(10분 이상) 염색한 후 자외선하에서 확인한다. 변성용액(1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH)에 gel이 충분히 담기도록 하여 천천히 흔들면서 45분간 방치하여 gel 내부의 DNA가 변성되도록 한다. Gel을 중화용액(1 M Tris-Cl, pH 7.4, 1.5 M NaCl)에 담가 상온에서 30분간 흔들어주면서 중화시킨다. 플라스틱 통위에 길이와 폭이 gel보다 길고 넓은 유리판을 놓고 2

장의 Whatman 3MM 여과지를 이동완충용액(10x SSC 혹은 SSPE)에 적신 다음 유리판 위로 bridge를 만든다. 3 mm 여과지가 이동완충용액으로 균일하게 젖은 후에 유리봉등으로 밀어서 공기방울을 제거한다. 또한 날카로운 칼등을 사용하여 nylon membrane을 gel 크기와 동일하게 자르고 가위로 한쪽끝을 잘라 방향을 표시한다. 자른 nylon membrane을 증류수의 띄워서 균일하게 젖도록 하고, 완전히 젖으면 이동완충용액에 5분 이상 담가두어 평형을 이루도록 한다. Nylon membrane은 물에 잘 젖는다. 만일 nitrocellulose membrane을 사용할 경우 잘 젖지 않으므로 한쪽 모서리부터 서서히 물에 잠기도록 주의한다. Gel을 중화시키는 용액으로부터 꺼내어 윗면이 아래쪽으로 향하도록 뒤집은 후 유리판 위에 걸쳐 놓은 3MM 여과지의 중심에 올려 놓는다. 매 과정에 공기방울이 남아 있지 않도록 주의한다. Gel 위에 기포가 생기지 않도록 주의하면서 membrane을 올려놓는다. Gel의 가장자리를 parafilm이나 랩으로 둘러 덮는다. 이때 gel 윗 부분까지 덮지 않도록 한다. 플라스틱 통 속에 이동완충용액을 여과지가 충분히 잠길 정도로 부어 넣는다. Gel 크기와 동일한 두장의 3MM 여과지를 10x SSC 용액에 적신 후 nylon membrane위에 덮고 여러장의 종이 흡수지(paper pad)를 gel의 크기만큼 오려 10 cm 정도 높이가 되게 쌓는다. 맨위에 유리판을 덮고 300 내지 500 g의 추로 눌러 두고 8시간 내지 24시간 동안(overnight) 방치해 둔다. Transfer(blotting)가 끝나면 membrane을 떼어내고 10x SSC에서 rinsing하여 membrane에 붙어 있는 agarose 찌꺼기등을 제거한 후 여과지 위에 놓아 공기 중에서 말린다. Membrane으로 옮겨진 cDNA가 완전히 결합되도록 80°C에서 2시간 동안 굽는다. Membrane을 vinyl bag에 넣은 후 최소 부피의 hybridization 용액으로 membrane이 완전히 잠기도록 (약 15 ml)로 vinyl bag속에 담는다. 기포를 완전히 제거한 후 sealing을 한다. 68°C shaking incubator에 1시간 이상 보관해 둔다. Vinyl bag의 한쪽 끝을 절단하고 용액을 빼낸 후 15 ml의 hybridization 용액과 함께 제조한 probe를 넣는다. 기포가 생기지 않도록 잘 sealing한 다음 68°C shaking incubator에 하룻밤 방치해둔다. 하룻밤 hybridization시킨 vinyl bag을 열고 용액을 모두 제거한다. 상온에서 세척용액 1(2x SSC, 0.1% SDS)을 교체해가며 30분간 membrane을 세척한다. 55°C에서 세척용액 2(0.2x SSC, 0.1% SDS)을 교체해가며 30분간 membrane을 세척한다. Membrane을 상온에서 완전히 건조시키고, membrane 뒤에 Whatman 3MM 종이를 대고 랩으로 싼 다음 cassette에 고정시키고 암실에서 X-ray film을 넣은 후 cassette를 장착시킨다. -70°C에 하룻밤 보관해 둔 후 film을 현상하여 결과를 관찰한다.

결과 및 고찰

베타케이신 3' 유전자를 포함하고 있다. 그 결과의 sequencing 결과는 다음과 같다.

β-casein 5'-UTR 프로모터 영역의 유전자 sequencing (4.1kb)

GATGGGGCTCTAGAGGGACAGCCCCCCCCAAAGCCCCCAGGGATGTAAT

TACGTCCCTCCCCGCTAGGGGCAGCAGCGAGCCGCCCGGGGCTCCGCTCCGG
TCCGGCGCTCCCCCGCATCCCCGAGCCGGCAGCGTGCGGGGACAGCCCGGGC
ACGGGAAGGTGGCACGGGATCGCTTTCCTCTGAACGCTTCTCGCTGCTCT
TTGAGCCTGCAGACACCTGGGGGATACGGGGAAAAAGCTTTAGGCTGAAA
GAGAGATTTAGAATGACAGAATCATAGAACGGCCTGGGTTGCAAAGGAGC
ACAGTGCTCATCCAGATCCAACCCCTGCTATGTGCAGGGTCATCAACCAGC
AGCCAGGCTGCCAGAGCCACATCCAGCCTGGCCTTGAATGCCTGCAGGGA
TGGGGCATCCACAGCCTCCTTGGGCAACCTGTTTCAGTGCCTCACCACCTCT
GGGGGAAAACTGCCTCCTCATATCCAACCCAAACCTCCCCTGTCTCAGTG
TAAAGCCATTCCCCCTTGTCTATCAAGGGGGAGTTTGCTGTGACATTGTT
GGTCTGGGGTGACACATGTTTGCCAATTCAGTGCATCACGGAGAGGCAGAT
CTTGGGGATAAGGAAGTGCAGGACAGCATGGACGTGGGACATGCAGGTGTT
GAGGGCTCTGGGACACTCTCCAAGTCACAGCGTTCAGAACAGCCTTAAGGA
TAAGAAGATAGGATAGAAGGACAAAGAGCAAGTTAAAACCCAGCATGGAG
AGGAGCACAAAAAGGCCACAGACACTGCTGGTCCCTGTGTCTGAGCCTGCA
TGTTTGATGGTGTCTGGATGCAAGCAGAAGGGGTGGAAGAGCTTGCCTGGA
GAGATACAGCTGGGTCAGTAGGACTGGGACAGGCAGCTGGAGAATTGCCAT
GTAGATGTTTCATACAATCGTCAAATCATGAAGGCTGGAAAGCCTCCAAGA
TCCCCAAGACCAACCCCAACCCACCCACCGTGCCCACTGGCCATGTCCCTCA
GTGCCACATCCCCACAGTTCTTCATCACCTCCAGGGACGGTGACCCCCCAC
CTCCGTGGGCAGCTGTGCCACTGCAGCACCGCTCTTTGGAGAAGGTAAATC
TTGCTAAATCCAGCCGACCCTCCCCTGGCACAACGTAAGGCCATTATCTCT
CATCCAACTCCAGGAACGGAGTCAGTGAGGATGGGGCTCTAGAGGATCCCT
CGACCTGCAGGTCAACGGATCACAACAACTGGAAAATTCTTCAAGAGAAG
AATACCAGACCACCTACCTGCTTCTGAGAAAATCTGTTTGCTGCTCAGAA
GCAACAGTTAGAACCAGACATGGAACAACAGACTGGTTCCAAATCAGGAA
AGGAGTATGTCAAGGCTGTATATCGTCACCCTGATTATTTAACTTATATG
CATAGTACATAATAACAAAATGCCAGGCTGGATGAATCGCAAGCTGGAATC
AAGATTTCTGGGAGAAATATCAATAAACGAGATACAAAGATACACCACAC
TTATGGCAGAAAATAAGAAGAACTAAAGAGCCTCTTGATGAAAGTGAAA
GAGGAGAGTGAAAAAGCCAGCTTAAAACCCAACATTCAAAATCAAGATCA
TCATTTTCATGGCAAATAAATGGGGAAACAATGGAAACAGTGAGAGACTTT

ATTTTCTTGGGCTCCAAAATCACTGCAGATTGTGACTACAGCCATGATTAA
AAGATGCTTGCTCCTTGGAAGAGAAGCTATTACCAAAGCTAGAAAGCATAT
TAAAAAGCAGAGACGTTACTTTGCTGACTAAGTTCTGTCTAGTCAAACCT
ATGGTTTTTCCAGTAGTCATATATGGATGTGAGTTGAACTATAAAGAAAG
CTGAGCACCAAAGAATTGATGCTTTTGAAATTTGGTGTGGAGAAGTCTC
TTGAGAGTCCCTTGAACCTGCAAGGAGATCCAACCAGTCCATCCTAAAGGA
AATCAGTCCCTGAATATTCATTGGAAGGACTGATGCTGAAATTGAAGATTA
ACGTTTTGGACTCACCTAATGCAGAAGAGCCAACCTACTAGAAAAGACCCC
ATGTTGGCAAAAATTGAAGCCAGGAAGAGAAGTGAATGACAGAGGATGAG
ATGGTTGGATGGCATCGTTGACTGAATGGACATGAGTCTGATCAAGTTCCG
GGAGACAGCAAAGGACAGGGCTGCCTGGTCTGCTGCAGTCCATGGGGTTGC
AAAGAGTCGGTCTCAAATGAGTAACTAAACAACAACCAAGCAGTAGAAAA
ATAAATAAAAATTTGTCTCTGAGATCTCAGTACCTCTTTCTGTGCATATCC
GTCTCCTGTTATTGTACTTTGTCTTCTGCTTGTAATAAAGCTGTCCCTGTTA
GTAAAATCTGTTTGGGTCCCTCTGAATTCCTTTTAGCTATCAAAAATGGAAG
GTGATTATTGTGCAATGTCCACCTCTGAGTAATATACAGAGAATAAAAAGA
AGGGAGAAATTATGTGCAAGTTCTCTCTCATCTCCTGCTTCTCATTTAAAA
GATTCTACCTCAGTGGGGGCTAAAACCTCCACATTTAACAGTAGCAAAAACC
AATATCCATAGCTTCTTAGGAAACCATTTTTTATACTCTTGTATGTAAT
TACATTCAAGCTCAAAAGCAAAGAAGTGATTCTGCGTTGGTGAAGGCCCA
ACCATAGAAAAGAGGAAGAAAATAGGCCACATACTGTGCTTCCCCCATAGC
TCAGTTGGTAAAGAATCTACCTACAATGCAGGAGGCCTGGGCTTGATCCCT
GGGTAAGGGAGATCCCCTGGAGAAGGAAATGGTAACCCACTCCAGTACTCT
TGCCTGTAAATCCCATGGACGGAGGAGCCTGGCAGCTACAGCCTTGGGGTG
GCAAGAGTTGGACATGATTAACAACCTAAACCACTGCCACCACTCCACATAC
TGAGTGCTCCCCAGTGGCACTAGTGGTAAAGAACCACCTGCCGGTGCAGAA
GACATTAAAGACACTGGCTCTATCCCTGCTTGGGAAGTAGGGAAGATCCCC
TAGAGAGGGAAATAGCAACCCACTCCAGAATTCCTTGCTGGAAAATCCCAT
GAATGAAGACTGGCGGGCTGTAGTAACTGGGGTCACAAAGAGTTAAACAT
GATTTAGCAACTAAACATCACCACATTAAAAAAATTACCACCAAAAATAGT
CATATCCAGGCTAAGGGGAATAATAGCACTAGTACCTGAGAGAACTTTC
TCAGATTCTCTGTCAAGTTCTTCCCTTCTCTCATATAACCAGTAGTCTAGTT

TACCTCATCAGATATTA ACTACTCATCGATTCTAAATTATCTAATTATGG
GGGGGGGCACTACATTGCATTATATTTTGTGTCCATTGACTATCACTCAAT
TTATTTATAAAAAATTCATCCATGTTGTTTCTGTGACAGTAACTCATTCA
CATTAATTGTAATATCTCATTGCATTGTATACTACAATTTATTTATACAA
AATACTATTATTCACACTTCTGTTGATTTTAATTTGGAACATCAACAATA
ACGTGGCTGAGAAGCTTCTTTCTTTAGTATATTGTTAAGGATTTCCCTTGA
TCAAGATTTTACCTACTTTTCTGGTCCAATTGGTGAGAGACAGTCATAAG
GAAATGCTGTGTTTATTGCACAATATGTAAAGCATCTTCCTGAGAAAATA
AAAGGGAAATGTTGAATGGGAAGGATATGCTTTCTTTTGTATTCCCTTTTC
TGAGAAATCAGACTTTTTACCTTGGCCTTGGCCACCAAAAAGCTAACAAAT
AAAGGCATATGAAGTAGCCAAGGCCTTTTCTAGTTATATCTATGACACTG
AGTTCATTTTCATCATTTTATTTTCCCTGACTTCCTCCTGGGTCCATATGAGCA
GTCTTAGAATGAATATTAGCTGAATAATCCAAATACATAGTAGATGTTGA
TTTGGGTTTTCTAAGCAATCCAAGACTTGTATGACAGTAAGATGTATTAC
CATCCAACACACATCTCAGCATGATATAAATGCAAGGTATATTGTGAAGA
AAAATTTTTAATTATGTCAAAGTGCTTACTTTAGAAGGTCATCTATCTGT
CCCAAAGCTGTGAATATATATATTGAAGGTAATGAATAGATGAAGCTAAC
CTTGTA AAAATGAGTAGTGTGAAATACA ACTACAATTATGAACATCTGTC
ACTAAAGAGGCAAAGAACTTGAAGATTGCTTTTGCAAATGGGCTCCTAT
TAATAAAAAGTACTTTTGAGGTCTGGCTCAGACTCTATTGTAGTACTTAG
GGTAAGACCCTCCTCCTGTATGGGCTTTCATTTTCTTTCTTGCTTCCCTCA
TTTGCCCTTCCATGAATACTAGCTGATAAACATTGACTATAAAAGATATG
AGGCCAACTTGAGCTGTCCATTTTAATAAATCTGTATAAATAATATTT
GTTCTACAAAAGTATTATCTAAATAAATGTTACTTTCTGTCTTAAAATCC
CTCAACAAATCCCCACTATCTAGAGAATAAGATTGACATTCCTGGAATCA
CAGCATGCTTTGTCTGCCATTATCTGACCCCTTTCTCTTTCTCTCTTCTCA
CCTCCATCTACTCCTTTTTTCTTGCAATTCATGACCCAGATTCACTGTTTG
ATTTGGCTTGCATGTGTGTGTGCTGAGTTGCGTCTGACTGTTATCAACCCC
ATGAATGATAGTCCACCAGGCTCTACTGTCCATGAAATTTTCCAGTCAAGA
ATACTGGAGTGGAATGCATTTCCCTACTCCATTTGATTAATTTAGTGACTT
TTAAATTTCTTTTTCCATATTCGGGAGCCTATTCTTCCTTTTTAGTCTAT
ACTCTTTCCTCCTCAGGTCTAAGGTATCATCGTGTGCTTGTTAGCTTGT

TACTTTCTCCATTATAGCTTAAGCACTAACAACCTGTTTCAGGTTGGCATGAA
ATTGTGTTCTTTGTGTGGCCTGTATATTTCTGTTGTGTATTAGAATTTAC
CCCAAGATCTCAAAGACCCACTGAATACTAAAGAGACCTCATTGTGGTTAC
AATAATTTGGGGACTGGGCCAAAACCTCCGTGCATCCCAGCCAAGATCTGT
AGCTACTGGACAATTTCAATTTCTTTATCAGATTGTGAGTTATTCCTGTT
AAAATGCTCCCCAGAATTTCTGGGGACAGAAAAATAGGAAGAATTCATTT
CCTAATCATGCAGATTTCTAGGAATTCAAATCCACTGTTGGTTTTATTTTC
AAACCACAAAATTAGCATGCCATTAATACTATATATAAACAGCCACTAA
ATCAGATCATT

β-casein 3-UTR 영역의 유전자 sequencing (5.5kb)

AATTGTGATTATTATTTCTTTAAGAATCTATTTCCCTAACCCAGTCATTT
CAATAAATTAACCCTTAGGCATATTTAAGTTTTCTTGTCTTTATTATATTT
TTAAAAATGAAATTGGTCTCTTTATTGTTAACTTAAATTTATCTTTGATG
TTAAAAATAGCTGTGGAAAATTTAAATTTGAATAGAATTCTTTGAATTGAG
TTCCAAAGGATATCAAAAAGTGAGGGAAAAGATAGGGTGAGCCTATGCTGC
ATATGTCCTTAGAAAGTCTTGGTTTATACCTGTTACCTAAGTTAAACAATT
ATACTTGTTCCTTTCACTCTCGAAAGTACCCAGCATTGGATGTTAAATTTT
ATAGTCATCCTAGACAAAAAAAAAAAAAAAAACAAACAACCCTCAAATGT
GATATCTGAATCACAGCTCTACAGTGTGGTAGCTAAGTGGTGCTGTGTAAG
TTAGTCTCCAAGAGATTCATTTCTACATTTATAAACAGTCAATTTAAGGT
GTTTTATTGAAGTTTTAATGTGAAAAGTGCACTATATGGTGCATGATAGG
AGTTCCTGGTTGAATCTCATTTCTGACATCACTGACACCAGTGCAGCAAGGA
CTAGTGTTACAATCAGAAGGAGCTGAGTTGTGTAATTTTAGCCATTAATGC
CCAAGAGACTAGAACTTACACAAAGCTCTAATATCCATTGTCTCTGTCTGT
GGAGTAATTATTTCAATTGCCATGAATTATCTGTCTGTCATATCCTGCATTT
TTATACATGATTCAGTTCCCTTCAGTTCACACAATGACTTGTCTAATTTCA
TCTTTCCTGCATCCTCCATGTTTTCTCCTCACTTCAGGATTAAGTGAAGCCGTA
CTTAGGCACAATATTTCTTATCTTTAAAGAAAAATCCATCTTTGAGAGTT
GTTATTGTTTCAGTCACTAGGTCATGTCCAACCTCTTTGTGACCCCATGCACTG
CAGCATGCCAGGCTTCCCTGCCCTTCGCTCTCTCCTGGAGTTTGCTCAGACTC
ATGTAGATTGAGTCGGTGATGGTATCCAACCTATCTCATCAACTGTTGTGCC

TCTCTTGGCAATTTTGGATTCCAGCCTGCACTTCTTCCAGCCCAGTGTTTCTC
ATGATGTACTCTGCATATAAATTAAATAAGCAGAGTGACAATATACAGCCT
TGACATACTCTTTTTTCTATTTGGAACCAGTCTGTTGTTCCATGTCCAGTTC
TAACTGTTGTTTCTGACCTGCATACAGGTTTCTCAAGAGGCAAGTCAGGT
GGTCTGGTATTCTCACCTGTTTCAGAATTTTCCACAGTTTATTGTGATCCA
CACAGTCAAAGGCTTTGGCATAGCCAATAAAGCAGAAAGAGATGTTTTTCT
GGAACTCTCTTACTTTTTTTGATGATCCAGTGGATGTTGGCAATTTGATCTC
TGGTTCCTCTGCCTTTTTCTAAAACCAGCTTTAACATCTGGAAGTTCATGGT
TCACGTAATACAAAATGTAATACAAAATGTCTGCAAAAACAAAGGAATGA
AAAGTAATGCTAAAAAATGTTAATATTTACAGAAATTTTTATAGTAGTAA
AGAATTCACCTGCAATACAGGAGAACCGGGTTAGATCCCTGGGTTGGAAGA
CCTCCTGGAGAAGGAAATGGCTACCCAATCTAGTATTCCTTGTCTGGAGAAG
GCAAGAATGGACAGAGAAGCCCAGCGGGCTATGGTCCATCGGGTCACAAAGA
GTCAGAAGCTACCTTGCACACAGCAAGCACGGTGC GCGCGCGTGCACACACA
CACACACACACACACAGACACACACACTCTAAAACATTTACCCAAGCT
TGTCCAATGGAAAATCAAAAAGCCAGCAATTTAAGATGACATCAGGTACCA
CTGTCCAGGTAAGCCTCAGAACAATGACCAGTAAGAAGCAAAGTGCCAT
ATGAGCAACTCGAATTTTTTGCAATGTTACCTAAGAGCTTCCATTTTTTATAA
TGCAAAAGAATTTTCATATGGGGAAATTGTATTAGATAACCCTGAATGAGGA
GCAAGATATAGTCAAAGTAAGATGCTCTAGTACTATTTTTTTATAAGCATGA
TTTGTTCAGCCAAAGGTTTTTTTCCCATATGGCCAATGAACTGAAATATGCA
GTCCTGAGATTTGCATATATTTCTAGCTGAAACCAAGTAAATAATATCCTC
AAGAAAGAAATCAATAGAAAAGTTGGATGAAGAGTACAATAAAGGGACCA
AAAATATTCAGAAATAAGAAGTACTAGAGGAGATATTGGGAAATCCCTGGTGAG
TCCAGTTTAGGATTTTGTACTTTTCACTGCAGTTGGCATGGATATAATCCCT
CACTGGGGAACTAAGATCCCATAAGCTGTGTTGGATTGCCAAAAAATAAA
TATTAAGAGATATCATTTCATAGAATATTTTAAAGATATTTTAGAGAAGAG
GAAATTAAGGATGTGAGAATTTGTATTACTTTTTTCAAGATACTAAAGCTA
TTTAGAGATAGAGCTGTTACTAAAACTTCAGTTTCCTAAAAATTATTTG
AAGCACTGTTTAAATAAATTCCAAAATATAGAGGAAGGAAAACAAAATACT
GAGGATTCATATAATGATTCAGATTTAGAAACAATATAACACAGAATTAG
TGAATTCTGACAAATTATTAGGTAGGAGTAGATAGTTCAGCATTACTCGTA

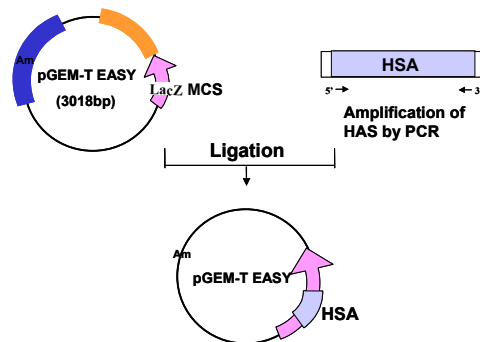
TAGATGGAGTATTTAATCCTTTCCATGAGATTATCCAAATATAATAATTTTC
GTATCTATGTGAAGTATAACTATTAAGATTACTTTATAAAGTAAATCAAG
AACCAGAGAATAAGAAAAATGTTTTGTGAACCAGCAGATACTATGAACACA
TAAAACTCAGAACCCTGATTCCTAAGACACACAGCTAATCCTGATTATTCT
TCCTTTACATGTGACCATAGAACTTCACACAAGTTCAAGATACATTTGTTG
AGCACATCAGTATCAGTTCAGTCACTCAGTCATGTCCGAATCTTTGTGACCT
TGTGGACTGCAGCACGCCAGGCTTTCCTGTCCACCACCAACCCCTGGAGCTT
ACTCAAACCTCATGTCCATTGAGTCAGTGATCCCATCCAACCATCTCATCCTC
TGTCATCCTCTTCTCCTGCCTTCAATCTTTCCAGACATTGGAGTCTTTTCC
AATGAGTCAGATCTTCACATTAGGTGGCCAAAGTATAGGAGTTTCAGCTTC
AGCATCAATCCTTCCAATGAATATTCCTTGATGTACCCCTTTCGCAGTTTGG
AACCAGTCTGTTGTTCCATGTCCAGTTCTAACTGCTGCTTCTGGACCTGTAT
ACAGATTTCTCAGGAGGCAGGTAAAGTGGTCTGGTATTCCCATCTCTTGAA
GAATTTTCCACAGTTTATTGTGATCCACACAATCAAAGGCTTTAGCGTAGT
CAATAAAGCAGATGTTTTTCTGGAACCTCTCGTGCTTTTTTGTATGATCCAAT
GGATGTTGGCAATTTGATCTCTGGTTCCTCTGCCTTTTCTAAATCCAGCTTG
AACATCTGGAAGTTCATGGTCCACGTACTGTTGAAGCCTGGCTTGGAGAAT
TTTGAGAGTTATTTTGCTAGCATGTGAGATGAGTGCAATCATGTGGGTGTT
TGAACATACTTTGTCATTGCTTTTCTTTGGGATTGTGGCAGTCCTGTGGCC
ACTGCTGAGTTTTCCAAATTTGCTGACATATTGAGTGCAGCACTTTCACAG
CATCACCTTTTAAGATTTGAAATAGCTCAACTGGAATTCCATCACCTCCAC
TAGCTTTGTTTCATAGTGAGGCTTCTAAGGCCGTTTGACTTTGCATTCCAG
GGTGTCTGGCTCTAGGTGAGTGATCCGTTGACCTGCAGCGGCCGCAAT

소의 우유로부터 분비된다. 크로닝된 닭 유래의 insulator 유전자는 다음과 같다.

GGACAGCCCCCCCCAAAGCCCCCAGGGATGTAATTACGTCCCTCCCCCGCT
AGGGGCAGCAGCGAGCCGCCCGGGCTCCGCTCCGGTCCGGCGCTCCCCCGC
ATCCCCGAGCCGGCAGCGTGCGGGGACAGCCCGGGCACGGGGAAGGTGGCAGC
GGATCGCTTTCCTCTGAACGCTTCTCGCTGCTCTTTGAGCCTGCAGACACCT
GGGGGATACGGGGA AAAAGCTTTAGGCTGAAAGAGAGATTTAGAATGACA
GAATCATAGAACGGCCTGGGTTGCAAAGGAGCACAGTGCTCATCCAGATCCA
ACCCCTGCTATGTGCAGGGTCATCAACCAGCAGCCCAGGCTGCCAGAGCCA
CATCCAGCCTGGCCTTGAATGCCTGCAGGGATGGGGCATCCACAGCCTCCTT
GGGCAACCTGTTTCAGTGCGTCACCACCCTCTGGGGGAAAAACTGCCTCCTCA

TATCCAACCCAAACCTCCCCTGTCTCAGTGTAAGCCATTCCCCCTTGTCTCT
 ATCAAGGGGGAGTTTGTCTGTGACATTGTTGGTCTGGGGTGACACATGTTTG
 CCAATTCAGTGCATCACGGAGAGGCAGATCTTGGGGATAAGGAAGTGCAGG
 ACAGCATGGACGTGGGACATGCAGGTGTTGAGGGCTCTGGGACACTCTCCAA
 GTCACAGCGTTCAGAACAGCCTTAAGGATAAGAAGATAGGATAGAAGGACA
 AAGAGCAAGTTAAAACCCAGCATGGAGAGGAGCACAAAAAGGCCACAGACA
 CTGCTGGTCCCTGTGTCTGAGCCTGCATGTTTGATGGTGTCTGGATGCAAGC
 AGAAGGGGTGGAAGAGCTTGCCCTGGAGAGATACAGCTGGGTCAGTAGGACT
 GGGACAGGCAGCTGGAGAATTGCCATGTAGATGTTTCATACAATCGTCAAAT
 CATGAAGGCTGGAAAGCCTCCAAGATCCCCAAGACCAACCCCAACCCACCCA
 CCGTGCCCACTGGCCATGTCCCTCAGTGCCACATCCCCACAGTTCTTCATCAC
 CTCCAGGGACGGTGACCCCCCACCTCCGTGGGCAGCTGTGCCACTGCAGCAC
 CGCTCTTTGGAGAAGGTAAATCTTGCTAAATCCAGCCCGACCCTCCCCTGGC
 ACAACGTAAGGCCATTATCTCTCATCCAACCTCCAGGACGGAGTCAGTGAG

Human serum albumin 유전자의 크로닝은 간장 유래의 cDNA library을 이용하여 선발하였다. Probe DNA는 이미 알려진 유전자 은행의 sequence을 활용하여 PCR로 증폭하였으며, 이들 유전자는 pGEM-vector에 재조합한 후 sequencing에 의하여 확인하였다.



이 probe 유전자를 이용하여 library screening을 행한 결과는 아래와 같다. 이들 colony로부터 DNA을 회수한 후 제한효소를 사용하여 절단한 후 pGEM vector에 재조합한 후 sequencing한 결과는 다음과 같다.

ATGAAGTGGGTAACCTTTATTTCCCTTCTTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATT
 CCAGGGGTGTGTTTCGTTCGAGATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTT
 TAAAGATTTGGGAGAAGAAAATTTCAAAGCCTTGGTGTGATTGCCTTTGC
 TCAGTATCTTCAGCAGTGTCCATTTGAAGATCATGTAAAATTAGTGAATGA

AGTAACTGAATTTGCAAAAACATGTGTTGCTGATGAGTCAGCTGAAAATTG
TGACAAATCACTTCATACCCTTTTTGGAGACAAATTATGCACAGTTGCAACT
CTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTG
AGAGTAATGAATGCTTCTTGCAACACAAAGATGACAACCCAAACCTCCCCG
ATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGCACTGCTTTTCATGACAATGAA
GAGACATTTTTGAAAAAATACCTATATGAAATTGCCAGAAGACATCCTTAC
TTTTATGCCCCGGAACCTCTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTTTA
CAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAGCTCGA
TGAACCTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAGTGT
GCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTAGCTC
GCCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGT
GACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTGCTTGAA
TGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAATCAAGATT
CGATCTCCAGTAAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCTGTTGGAAAAATC
CCACTGCATTGCCGAAGTGGAAAATGATGAGATGCCTGCTGACTTGCCTTCA
TTAGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAACCTATGCTGAG
GCAAAGGATGTCTTCCTGGGCATGTTTTTGTATGAATATGCAAGAAGGCATC
CTGATTACTCTGTCGTGCTGCTGCTGAGACTTGCCAAGACATATGAAACCAC
TCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCCAAAGTG
TTCGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGCCTCAGAATTTAATCAAACAA
AATTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGGAGAGTACAAATTCCAGAATGCGCTAT
TAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCAACCTTGTAGA
GGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAAACATCCTGGA
GCAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGTCCTGAACCAGT
TATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCACCAAATGCTG
CACAGAATCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAAGTCGAT
GAAACATACGTTCCCAAAGAGTTTAATGCTGAAACATTCACCTTCCATGCAG
ATATATGCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAAACTGCAC
TTGTTGAGCTTGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGC
TGTTATGGATGATTTTCGAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGAT
AAGGAGACCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAACTTGTGCTGCAAGTCAAG
CTGCCTTAGGCTTATAA

참고문헌

- Rosenoer, V.M., Oratz, M., M.A. Eds. (1977) *Albumin Structure, Function and Uses*, Pergamon Press, Oxford.
- Peters, T. (1977) *Clin. Chem. (Winston-Salem, N.C.)* 23, 5-12.
- Ruoslahti, E. and Terry, W.D. (1976) *Nature* 260, 804-805.
- Sala-Trepat, J.M., Dever, J., Sargent, T.D., Thomas, K., Sell, S. and Bonner, J. (1979) *Biochemistry* 18, 2167-2178.
- Jagodzinski, L.L., Sargent, T.D., Yang, M., Glackin, C. and Bonner, J. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3521-3525.

제2절 Cell line 구축 및 유전자 도입

2-1. 유전자가 삽입된 공여세포를 이용한 소난자의 핵이식 효과

(EFFICIENCY OF GENE TRANSFECTION INTO DONOR CELLS FOR NUCLEAR TRANSFER OF BOVINE EMBRYOS)

Abstract

The production of transgenic animals by somatic cell nuclear transfer (SCNT) has proven to be a more efficient method than other methods, such as gene injection or sperm mediation. The present study was intended to evaluate the efficiency of gene transfection by Effectene (Qiagen Inc.), a lipid-based reagent compared to electroporation in fetal-derived fibroblast cells (FFC), cumulus-derived fibroblast cells (CFC) and adult ear skin-derived fibroblast cells (AEFC). Parameters compared were factors such as chromosome abnormality, gene expression, and the incidence of apoptosis. Further, the transgenic (TG) embryos with transfected donor cells generated by electroporation or Effectene were compared to IVF and SCNT embryos in terms of rates of cleavage, blastocyst formation and blastocyst cell number. Most of the cells (>80%) at confluence were at G0/G1 and considered to be suitable nuclear donors for cloning. Transfection with a plasmid containing the enhanced green fluorescent protein (pEGFP-N1) gene into FFC did not increase the incidence of chromosomal abnormalities. The rates of apoptosis in different cell types transfected with pEGFP-N1 were 3.3-5.0%, and the values did not differ among groups. In addition, the rates of apoptosis in various cells between 5-7 and 20-22 cell passages did not differ. However, the efficiency of gene transfection into FFC by Effectene reagent (14.21.7) was significantly ($P<0.05$) higher than that obtained by electroporation (5.11.0). Among various cell types, the efficiency of gene transfection by Effectene and electroporation of FFC (14.21.7 and 5.11.0, respectively) was significantly ($P<0.05$) higher than transfection of CFC and AEFC by either method (9.41.5 and 3.30.8, 8.80.7 and 2.10.4, respectively). In transgenic (TG) embryos produced by SCNT with electroporation and Effectene, the rates of cleavage and blastocyst formation were significantly lower ($P<0.05$) than those of IVF controls, but rates did not differ between SCNT and TG embryos.

Similarly, significantly higher ($p < 0.05$) total cell numbers in day-8 blastocysts were observed in IVF controls than those in SCNT and TG embryos, but did not differ between SCNT and TG (136 vs. ~110, respectively). The results demonstrated that, though there were no difference in the rates of chromosomal aneuploidy and the incidence of apoptosis among various cell types, transfected with or without pEGFP-N1, FFC were the cell type most effectively transfected and Effectene was a suitable agent for transfection.

서론

형질 전환 동물 생산은 사람치료 및 농업 분야에 있어서 중요하다. 형질전환 동물 생산을 위해서 외부 유전자의 주입 방법에는 retroviral vectors (Chan et al., 1999), fusion (Zou et al., 1996), 음성전핵내 미세주입법 (Brister et al., 1985), electroporation (Zou et al., 1995) 및 sperm carrier (Shemesh et al., 2000) 등이 있다.

현재까지, 체세포 핵이식 방법 (somatic cell nuclear transfer, SCNT)이 전핵 주입법 보다 형질전환 동물을 생산하는데 효율적이라고 보고된 바 있다 (Cibelli et al., 1998; Baguisi et al., 1999; McCreath et al., 2000). 형질전환 및 유전자 적중 동물 생산을 위해서 SCNT 기법은 공핵세포의 종류와 체외배양 기법이 중요한 관점으로 대두되고 있다. 특히 소의 경우 여러 종류의 체세포, fetal fibroblasts (Cibelli et al., 1998), oviductal cells (Kato et al., 1998), cumulus cells (Kato et al., 2000), mural granulosa cells (Wells et al., 1999), muscle cells (Shiga et al., 1999) ear fibroblasts (Zakhartchenko et al., 1999a), 및 fetal germ cells (Zakhartchenko et al., 1999b; Yoo et al., 2003)에서 수정란 및 산자를 생산한 바 있다. 그 중 fetal fibroblasts가 가장 많이 보편적으로 사용되고 있는데, 이는 세포 증식이 용이하기 때문이라고 한다 (Schnieke et al., 1997 Cibelli et al., 1998; Baguisi et al., 1999; Kuhholzer et al., 2000). 그러나, Wells et al. (1999)의 보고에 의하면 소 체세포 보게 효율은 mural cells, cumulus cells 및 granulosa cells이 fibroblasts 보다 좋다고 하였으며, 이는 세포의 종류에 따라 발달 효율이 달라지는 것을 보여 준다.

형질 전환 동물 생산에 있어서 또 다른 중요한 요인은 유전자 transfection 방법이 라고 한다. 일반적으로 electroporation, liposome-mediated transfection이 널리 이용되고

있다. Electroporation 방법은 simple하고 높은 효율을 보이고 (Lurquin, 1997), 또한 Effectene 같은 cationic liposome based reagent 는 Lipofectamine, Lipofectin, SuperFect, DMRIE-C and DOTAP 보다도 높은 효율을 보인다(Uchida et al., 2002; Nikcevic et al., 2003).

Enhanced green fluorescence protein (EGFP) 는 검출 및 gene expression이 쉽기 때문에 널리 이용되는 marker gene이다. 이를 이용해서 돼지 (Park et al., 2001 Lai et al., 2002; Hyun et al., 2003) 그리고 소 (Roh et al., 2000 Arat et al., 2001) 수정란 및 산자를 생산한 바 있다. EGFP가 산자의 생산효율을 낮춘다는 보고도 있지만, 큰 영향은 없는 것으로 보고 되어졌다 (Ikawa et al., 1995; Roh et al., 2000).

포유류에 있어서 SCNT를 통해서 여러 동물에서 산자 성공 보고가 있다. 그러나 아직까지도 산자효율은 극히 저조한 편이다 (Hill et al., 1999; Westhusin et al., 2001). 여러 요인들이 작용하지만, 그 중 수정란의 apoptosis가 중요한 작용을 한다 (Fahrudin et al., 2002). 생화학적 형태학적인 변화에 의해서 수반되는 apoptosis는 DNA fragmentation, caspase activation, alteration of mitochondrial function, release of cytochrome C, chromatin condensation, cytoplasmic fragmentation, 그리고 수정란의 발달 저해를 동반하게 된다 (Hockenberry et al., 1990; Hardy, 1997 Green and Reed, 1998 Hardy et al., 2001; Ranger et al., 2001; Levy et al., 2001).

재료 및 방법

배양액

Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)에서 구입된 시약 및 배양액을 본 실험에 공시하였다. 난자성숙 배양액 (IVM)은 2.5 mM sodium pyruvate, 1 mM L-glutamine, 1.0% (v/v) penicillin-streptomycin (10,000 IU and 10,000 g/mL, respectively; Pen-Strep; GIBCO), 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL), 10 g/mL FSH, 10 g/mL LH, and 1 g/mL estradiol 17 함유된 TCM199를 이용하였다. Albumin, lactate, pyruvate 가 함유된 Tyrode's medium으로 Hapes-TALP 및 IVF-TALP)를 만들었고, 수정란 배양액으로는 modified Eagle medium (MEM) non-essential amino acids, 0.4 mM sodium pyruvate, 1 mM L-glutamine 및 50 g/mL

gentamycin이 함유된 synthetic oviduct fluid medium (SOF) 배양액을 이용하였다. 모든 배양액은 pH 7.4 그리고 삼투압 280 mOsm/kg.로 보정하여 사용하였다.

세포배양

세 종류의 세포, fetal-derived fibroblast cells (FFC), cumulus-derived fibroblast cells (CFC) 및 adult ear skin-derived fibroblast cells (AEFC)를 사용하였다. 임신 35 일 령의 태아로부터 FFC, 두 살 된 암소의 귀로부터 AEFC, 그리고 2-7 mm follicles로부터 CFC를 각각 분리하였다. 태아 조직 및 귀조직은 0.25% trypsin-0.04% EDTA 용액에 39C 10분간 처리한 후 7% (v/v) FBS가 함유된 modified Eagle medium (MEM)에서 disperse시켰다. 난자-난구세포 복합체를 0.5 mg/mL hyaluronidase로 처리하여 난구세포를 분리하였다. 분리된 세포를 300 Xg 10분간 원심한 후 10% (v/v) FCS, 1.0% (v/v) Pen-Strep가 함유된 MEM배양액에서 39C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

80-90% confluence 상태에서 0.25% Trypsin-0.04% EDTA 로 5분간 처리한 후 다음 passage로 옮기고, 일부 세포는 10% dimethyl sulfoxide (DMSO)로 동결 보존 하였다 (Keefer et al., 2002).

Gene Transfection 및 Expression

3-5 passage의 세포를 2-5 일간 배양 후 electroporation 방법으로 pEGFP-N1을 도입하였다. 이때 사용된 배양액의 조성은 75% cytosalts (120 mM KCl, 0.15 mM CaCl₂, 10 mM K₂HPO₄, 5 mM MgCl₂, pH 7.6) (Van den Hoff et al., 1992) 및 15 g pEGFP-N1이 함유된 25% Opti-MEM으로 하였고, 세포수는 5x10⁶ cells/mL로 하였다. 전기 충격 조건은 2회의 0.38 kV, 400 F 으로 하였고, Gene Pulser (Bio-rad)를 사용하였다. Effectene 은 Effectene Transfection Reagent (Qiagen inc.)을 사용하였고, 방법은 제조사의 protocole에 따랐다. 600 g/mL G418 (Geneticin, Gibco BRL) 이 첨가된 배양액에서 48시간 배양함으로써 유전자 도입된 세포를 선별하였다 (Hogan et al., 1994). 유전자 도입의 유무는 FITC (Excitation maximum = 488 nm; emission maximum = 507 nm) inverted fluorescent microscope (Nikon, Japan) 하에서 관찰하였고, 100개의 세포를 PCR 방법으로 확인하였다. 이때 사용한 primer는 18-base sense primer로는 5'-CAG

AGC TGG TTT AGT GAA-3' 과 20-base antisense primer 5'-GAA CTT GTG GCC TAC GT-3'를 사용하였다.

Cellcycle분석

Cell cycle 분석은 CYSTAIN DNA 2 steps kit (PARTEC, Germany)를 이용한 flow cytometry (PARTEC. PA-1)로 실시하였다. 2 x 10⁶cells/mL 세포를 70% ethanol (4C)에 18시간 고정하였고, 고정액 제거를 위해서 200 Xg 10 분간 원심시켰다. 세포를 DNA flurochrome 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)로 2분간 염색한 후 (Boquest et al., 1999), 분석하였다.

ChromosomalAnalysisofCells

염색체 분석은 Williams et al. (2003) 방법에 준하였다. 0.05 g/mL democolcine (Gibco, colcemide)이 첨가된 MEM에 itrks 배양한 후, 0.075 mM KCl에 5분, 0.8% sodium citrate에 30분간 처리 한 다음, spread 하고 methanol : acetic acid (3:1, v/v)에 고정하였다. 4% Giemsa 액으로 5분간 염색한 후 light microscope (Nikon)에서 검경하였다.

Apoptosis분석

Apoptosis 조사는 In Situ Cell Death Detection Kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) 와 propidium iodide (PI, Molecular Probes, Eugene, OR)의 대조 염색에 의한 TUNEL 방법으로 실시하였다.

In Vitro Embryo Production

도축장 유래 난포란을 수집하였고, 15개의 COCs를 IVM 배양액 50 uL drops에 넣고 39C, 5% CO₂ 배양기에서 배양시켰다. SCNT 방법은 Wells et al., (1999)의 방법에 따라 실시하였다.

배양 18시간WO에, 난구세포를 3% (v/v) sodium citrate 용액에서 2분간 vortexing 하여 제거시켰고, 탈핵을 위해서 5 ug/mL Hoechst 33342에 2-3분간 염색하였다.

Trypsin 처리된 공핵세포를 탈핵된 난자의 위란강에 주입하고, 전기 융합은 10 uM MgCl₂, CaCl₂가 첨가된 0.28 M mannitol 용액에서 1.6 kV/cm, 30 usec 의 조건을 두 번 실시하였다. 융합된 SCNT 수정란을 5 uM ionomycin에서 5분, 10 g/mL CHX에서 3시간 배양하였다.

대조구로써 체외수정란 생산은 Ali and Sirard, (2002) 방법을 이용하였고, 정자의 준비는 Rosenkrans et al. (1993)의 방법대로 하였다. 30개의 수정란을 SOF 30 uL drops에서 8일간 39C, 5% CO₂, 5% O₂ 및 90% N₂ 조건 하에서 배양하였고, 2일 WO 및 8일 WO에 수정란 분할율 및 배반포기 발달율을 조사하였으며, 전체 핵의 수도 비교 조사하였다.

통계처리

Gene expression, apoptosis, cleavage 및 development는 arc-sine transformation 후 one-way ANOVA 로 실시하였고, 비교분석은 Duncan's and Tukey multiple comparisons test를 이용하였다. Chromosome analysis은 Student's t-test를 이용하였으며, $P < 0.05$ 일EO 유의적 차이를 인정하였다.

결과 및 고찰

Cell Cycle 분석

표 1은 FFC, CFC 및 AEFC 세포를 pEGFP-N1로 도입 한 후 cell cycle을 조사한 결과이다. 세 군간에 G₀/G₁, S 및 G₂/M 는 유의적 차이를 인정할 수 없었다. FFC, CFC 및 AEF 군의 대부분의 세포가 G₀/G₁기 였다 (88.81.9, 91.21.3 86.71.6, 90.41.5 및 86.91.1, 87.71.5, respectively). 유전자 도입된 세포와 도입 안된 세포간의 cell cycle에 있어서 유의적 차이를 인정할 수 없었다.

TABLE 1. The Cycles of Different Cell Types Transfected With or Without pEGFP-N1

Cell types	Transfected	Percentage (mean \pm SEM) of cells at		
		G0/G1	S	G2/M
FFC	-	88.8 \pm 1.9	4.5 \pm 0.5	6.7 \pm 1.6
	+	91.2 \pm 1.3	3.4 \pm 0.8	5.3 \pm 0.9
CFC	-	86.7 \pm 1.6	4.9 \pm 0.8	8.3 \pm 1.7
	+	90.4 \pm 1.5	4.5 \pm 1.3	5.1 \pm 0.9
AEFC	-	86.9 \pm 1.1	5.2 \pm 0.9	7.9 \pm 0.8
	+	87.7 \pm 1.5	4.8 \pm 0.7	7.5 \pm 1.2

Passages (5-7).

FFC, fetal-derived fibroblast cells; CFC, cumulus-derived fibroblast cells; AEFC, adult ear skin-derived fibroblast cells.

Efficiency of pEGFP-N1 transfection into Cells

그림 1은 각기 다른 passage 간 (short term, 5-7; long term, 20-22) pEGFP-N1 도입 후 발현율을 비교 조사한 결과이다. FFC에 있어서 short term과 long term 배양군 간의 유전자 transfection 효율은 CFC와 AEFC 보다 유의적으로 ($P < 0.05$) 높았다.

그림 2는 Effectene과 electroporation 방법간의 transfection 율을 조사한 결과이다. Effectene과 electroporation 두 방법에 있어서, FFC가 다른 세포군 보다 유의적으로 높은 transfection율을 보였다. 또한 Effectene 처리가 electroporation 보다 높은 발현율을 보였다.

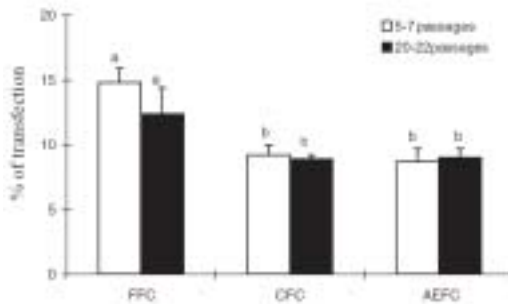


Fig. 1. Efficiency of transfection by Effectene with pEGFP-N1 on the gene expression in cell passages of different cell types as determined by fluorescence microscope. Standard error bars are indicated. Means with different superscripts differ significantly at $P < 0.05$. FFC, fetal-derived fibroblast cells; CFC, cumulus-derived fibroblast cells; AEFC, adult ear skin-derived fibroblast cells.

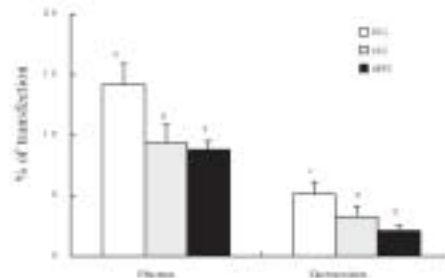


Fig. 2. Efficiency of transfection methods with pEGFP-N1 on the gene expression at 5-7 cell passages as determined by fluorescent microscope. Standard error bars are indicated. Means with different superscripts differ significantly at $P < 0.05$. FFC, fetal-derived fibroblast cells; CFC, cumulus-derived fibroblast cells; AEFC, adult ear skin-derived fibroblast cells.

그림 3은 pEGFP-N1 positive cells을 보여 주고, 그림 4는 80 colonies를 PCR 분석한 결과 모두 positive로 나타났다.

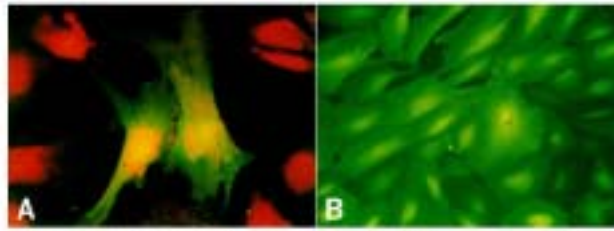


Fig. 3. Expression of pEGFP-N1 in fetal-derived fibroblast cells. A: No selection of the cells. B: Selection

Chromosomal Analysis of Cells

표 2는 염색체 수를 조사한 결과로써, 58%의 cell이 60개의 염색체수를 나타내었고, 각기 다른 세포간, 유전자 도입 방법간이 차이는 인정되지 않았다.

TABLE 2. Chromosome Numbers of FFC Transfected With pEGFP-N1 by Two Different Methods

Treatments	No. of cells counted	No. (% mean \pm SEM) of cells with chromosomes of		
		>60	60	<60
Nontransfection	46	7 (15.2 \pm 0.5)	28 (60.1 \pm 3.3)	11 (23.9 \pm 0.96)
Transfection				
Electroporation	39	7 (17.9 \pm 1.2)	21 (53.8 \pm 5.4)	11 (28.2 \pm 3.9)
Effectene	58	8 (13.8 \pm 1.8)	34 (58.6 \pm 4.5)	16 (27.6 \pm 2.5)

FFC, fetal-derived fibroblast cells at 2-5 passages, four replicates.

Apoptosis Detection

그림 5는 cell passage에 따른 apoptosis율을 나타낸 결과이다. 5-7 passages와 20-22 passages 간의 유의적 차이는 인정되지 않았고, 유전자 도입 유무에 따라서도 차이를 인정할 수 없었다 (그림 6, 7).

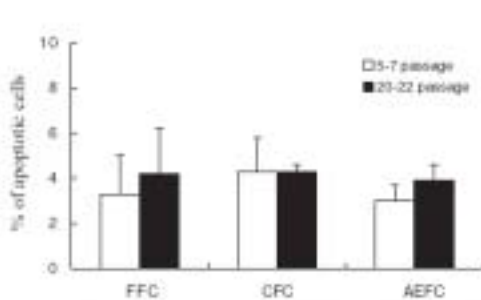


Fig. 5. The proportions of apoptosis in different cell types with different cell passages. Standard error bars are indicated. FFC, fetal-derived fibroblast cells; CFC, cumulus-derived fibroblast cells; AEFC, adult ear skin-derived fibroblast cells.

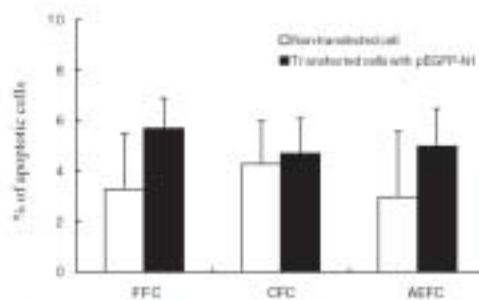


Fig. 6. The proportions of apoptosis in different cell types transfected with or without pEGFP-N1. Standard error bars are indicated. FFC, fetal-derived fibroblast cells; CFC, cumulus-derived fibroblast cells; AEFC, adult ear skin-derived fibroblast cells.

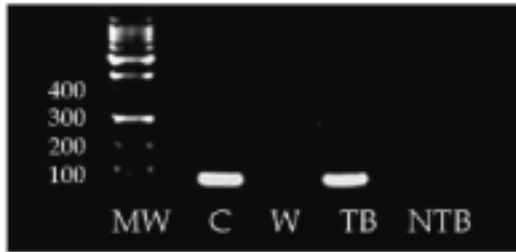


Fig. 4. PCR results of pEGFP-N1 transfected fetal-derived fibroblast cells. C, positive control; W, negative control; TB, transfected cells; NTB, nontransfected cells.

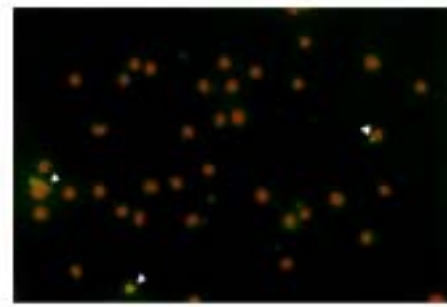


Fig. 5. Detection of apoptosis in adult ear skin-derived fibroblast cells transfected with pEGFP-N1. Arrowheads represent apoptotic

Development Rate of Various Embryos

표 3은 IVF, SCNT (non-transfected donor cells) 및 TG (transfected donor cells by electroporation or Effectene with pEGFP-N1) 수정란 간의 발달율 및 전체세포수를 비교 조사한 결과이다. IVF 수정란이 배반포기 발달율에 있어서 SCNT 및 TG 보다 유의적으로 높았다 (33.7% vs 18.0 - 24.3%). 5-7 passages dml FFC와 20-22 passages 간의 발달율은 차이가 없었다. IVF에 있어서 전체세포수는 SCNT 및 TG 보다 유의적으로 높았다.

TABLE 3. Development of Cloned Embryos Produced by Different Passages of Transfected or Nontransfected FFC

Embryos	Donor passage	Eggs used	No. (%) of development		Total cells (mean \pm SEM)
			Cleavage	Blastocyst	
IVF		362	287 (79.3)	122 (33.7) ^a	136.3 \pm 10.2 ^a
SCNT	5-7	244	197 (80.7)	56 (23.0) ^b	108.6 \pm 9.4 ^b
	20-22	185	146 (78.9)	45 (24.3) ^b	110.2 \pm 11.0 ^b
TG-Electric	5-7	138	101 (73.0)	25 (18.0) ^b	100.8 \pm 9.6 ^b
	20-22	122	91 (75.0)	22 (18.0) ^b	103.2 \pm 7.6 ^b
TG-Effectene	5-7	197	154 (78.1)	41 (20.8) ^b	111.0 \pm 16.1 ^b
	20-22	188	144 (76.6)	37 (19.7) ^b	103.0 \pm 10.8 ^b

IVF, in vitro fertilization; SCNT, cloned embryos; TG-Electric, transgenic cloned embryos with FFC transfected by electric pulse; TG-Effectene, transgenic cloned embryos with FFC transfected by Effectene. FFC, fetal-derived fibroblast cells, seven replicates.

^{a,b}Percentages with different superscripts within columns indicate significant differences ($P < 0.05$).

이상의 결과로 유전자 transfection 에 대한 적당한 세포로는 fetal fibroblast 임이 증명되었고, Effectene 방법이 electroporation 보다 효율적인 방법이라고 사료된다. 따라서, 향후 형질전환 복제 수정란을 만들기 위해서는 fetal fibroblasts를 이용해서 effectene 방법으로 유전자transfection 하는 것이 효율적이라고 사료된다.

참고문헌

- Ali A, Sirard MA. 2002. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. *Biol Reprod* 66:901-905.
- Arat S, Rzucidlo SJ, Gibbons J, Miyoshi K, Stice SL. 2001. Production of transgenic bovine embryos by transfer of transfected granulosa cells into enucleated oocytes. *Mol Reprod Dev* 60:20-26.
- Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempes MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overstrom EW, Echelard Y. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol* 17:456-461.
- Boquest AC, Day BN, Prather RS. 1999. Flow cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells. *Biol Reprod* 60:1013-1019.
- Brister RL, Chen ME, Trumbauer Yagle MK, Palmiter RD. 1985. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjection. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 82:4438-4442.
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Poncedeleon FA, Robl JM. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280:1256-1258.
- Fahrudin M, Otoi T, Karja NW, Mori M, Murakami M, Suzuki T. 2002. Analysis of DNA fragmentation in bovine somatic nuclear transfer embryos using TUNEL. *Reproduction* 124:813-819.
- Green DR, Reed JC. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1312.
- Hardy K. 1997. Cell death in the mammalian blastocyst. *Mol Hum Reprod* 3:919-925.
- Hardy K, Spanos S, Becker D, Iannelli P, Winston RM, Stark J. 2001. From cell death to embryo arrest: mathematical models of human preimplantation embryo development. *Proc Natl Acad Sci* 98:1655-1660.
- Hill JR, Winger QA, Long CR, Looney CR, Thompson JA, Westhusin ME. 2000. Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Biol Reprod* 62:1135-1140.
- Hockenberry D, Nunez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. 1990. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348: 334-336.
- Hyun S, Lee G, Kim D, Kim H, Lee S, Nam D, Jeong Y, Kim S, Yeom S, Kang S, Han J, Lee B, Hwang W. 2003. Production of nuclear transfer-derived piglets using porcine fetal fibroblasts transfected with

- the enhanced green fluorescent protein. *Biol Reprod* 69:1060-1068.
- Ikawa M, Kominami K, Yoshimura Y, Tanaka K, Nishimura Y, Okabe M. 1995. A rapid and non-invasive selection of transgenic embryos before implantation using green fluorescent protein (GFP). *FEBS Lett* 375:125128.
- Kato M, Yamanouchi K, Ikawa M, Okabe M, Naito K, Tojo H. 1999. Efficient selection of transgenic mouse embryos using EGFP as a marker gene. *Mol Reprod Dev* 54:4348.
- Kato Y, Tani T, 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.
- Lai L, Park KW, Cheong HT, Kuhholzer B, Samuel M, Bonk A, Im GS, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Prather RS. 2002. Transgenic pig expressing the enhanced green fluorescent protein produced by nuclear transfer using colchicine-treated fibroblasts as donor cells. *Mol Reprod Dev* 62:300-306.
- Levy RR, Cordonier H, Czyba JC, Goerin JF. 2001. Apoptosis in preimplantation mammalian embryo and genetics. *IT J Anat Embryol* 106:101-108.
- Lurquin PF. 1997. Gene transfer by electroporation. *Mol Biotechnol*. 7:5-35.
- McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KH, Colman A, Schnieke AE, Kind AJ. 2000. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* 405:10661069.
- Nikcevic G, Kovacevic-Grujicic N, Stevanovic M. 2003. Improved transfection efficiency of cultured human cells. *Cell Biology International* 27:735737.
- Park KW, Kuhholzer B, Lai L, Machaty Z, Sun QY, Day BN, Prather RS. 2001. Development and expression of the green fluorescent protein in porcine embryos derived from nuclear transfer of transgenic granulosa-derived cells. *Anim Reprod Sci* 68:111-120.
- Ranger AM, Malynn BA, Korsmeyer SJ. 2001. Mouse models of cell death. *Nature Genetics* 28: 113-118.
- Roh S, Shim H, Hwang W, Yoon J. 2000. In vitro development of green fluorescent protein (GFP) transgenic bovine embryos after nuclear transfer using different cell cycles and passages of fetal fibroblasts. *Reprod Fertil* 12:16.
- Rosenkrans CF Jr, Zeng GQ, McNamara GT, Schoff PK, First NL. 1993. Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biol Reprod* 49:459-462.

- Shemesh M, Gurevich M, Harel-Markowitz E, Benvenisti L, Shore S, Stram Y. 2000. Gene integration into bovine sperm genome and its expression in transgenic offspring. *Mol Reprod Dev* 56 (Suppl 2): 306-308.
- Shiga K, Fujita T, Hirose K, Sasae Y, Nagai T. 1999. Production of calves by transfer of nuclei from cultured somatic cells obtained from Japanese black bulls. *Theriogenology* 52:527535.
- Uchida E, Misugachi H, Ishii-Watabe A, Hayakawa T. 2002. Comparison of the efficiency and safety of non-viral vector-mediated gene transfer into a wide range of human cells. *Biol. Pharm. Bull* 25:891-897.
- Wells DN, Misica PM, Tervit HR. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod* 60:9961005.
- Westhusin ME, Long CR, Shin T, Hill JR, Looney CR, Pryor JH, Piedrahita JA. 2001. Cloning to reproduce desired genotypes. *Theriogenology* 55:3549.
- Yoo JG, Choe SY, Rho GJ. 2003. Efficient production of cloned bovine embryos using CDC2 kinase inhibitor. *Reproduction in Domestic Animals* 38:444-450.
- Zakhartchenko V, Durcova-Hills G, Stojkovic M, Schernthaler W, Prella K, Steinborn R, Muller M, Brem G, Wolf E. 1999a. Effects of serum starvation and re-cloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts. *J Reprod Fertil* 115:325331.
- Zakhartchenko V, Alberio R, Stojkovic M, Prella K, Schernthaler W, Stojkovic P, Wenigerking H, Wanke R, Duchler M, Steinborn R, Mueller M, Brem G, Wolf E. 1999b. Adult cloning in cattle: potential of nuclei from a permanent cell line and from primary cultures. *Mol Reprod Dev* 54:264272.
- Zou XG, Xian J, Popov AV, Rosewell IR, Muller M, Bruggemann M. 1995. Subtle differences in antibody responses and hypermutation of λ light chains in mice with a disrupted κ constant region. *Eur J Immunol* 25:2154-2162.
- Zou XG, Xian J, Davies NP, Popov AV, Bruggemann M. 1996. Dominant expression of a 1.3 Mb human Igk locus replacing mouse light chain production. *FASEB J* 10:1227-1232.

제 3절. 수정란 생산 효율 향상

3-1. 소난자의 초 급속 냉각후의 미세소관의 배열과 미토콘드리아의 분포

Microtubulin Configuration and Mitochondrial Distribution After Ultra-Rapid Cooling of Bovine Oocytes

Abstract

Considerable attention has been focused on the cryopreservation of mammalian oocytes, as a consequence of poor development of cryopreserved bovine oocytes in vitro, in order to enhance the application of genetic engineering. Experiments were carried out to evaluate the viability and ultra-structural changes of bovine oocytes cryopreserved by ultra rapid cooling methods. Oocytes that had been allowed to mature for 22 h were exposed to a mixture of cryoprotectants (3.2 M ethyleneglycol, 2.36 M DMSO, 0.6 M sucrose), and were cryopreserved by very rapid cooling either within glass capillaries or as droplets on copper electron microscope grids. After being warmed, the oocytes were cultured in IVM medium for an additional 2 h. Viability was assessed by determining the development rate after fertilization with frozen semen from which motile sperm had been recovered using a Percoll density gradient, and by immunochemical evaluation of microtubule and mitochondrial morphology. Cleavage and development rates were significantly ($P < 0.05$) lower in oocytes cryopreserved by vitrification than in IVF control group, but did not differ in the open pulled glass (OPG) or copper grid (CG) groups. In most oocytes cryopreserved by vitrification, the microtubules were partially or completely broken. Similarly mitochondria appeared to be abnormal compared to that of unfrozen oocytes. Oocytes cultured in IVM medium supplemented with both cytochalasin B (a protein synthesis inhibitor) and 2-mercaptoethanol (an antioxidant) showed less damage to microtubules, but not to mitochondria after cryopreservation. In conclusion, this study showed that bovine oocytes can be cryopreserved by vitrification within small

droplets using copper grids. While damage to microtubules and mitochondria may be involved in reduced viability, supplementation of IVM medium with cytochalasin B appears to enhance stabilization of microtubules during oocyte cryopreservation.

서론

도축장에서 회수하는 소 난자는 체외 수정, 핵이식 및 다른 산과적 기술을 응용하는 재료로 널리 사용되고 있다. 그러나 난자가 생존, 수정 및 활성화될 수 있는 시간이 일정하고, 특정한 날에 회수가 가능한 난자 수가 제한적이기 때문에, 소 난자를 동결하여 보존할 수 있다면 상업적으로나 기초 과학적으로 유용한 점이 많을 것이다.

난자와 수정란을 동결 시키는 방법에는 여러 가지가 있으며 크게 완만동결과 급속동결이 널리 사용되었다(Rall and Fahy, 1985; Niemann et al., 1991). 전통적인 완만동결의 대안으로 유리화(vitrification)방법이 사용되고 있는데 이는 높은 농도의 동결보호제가 함유된 용액을 사용하여, 급속도로 냉각시킴으로써 얼음 결정 형성을 방지하는 방법이다. 유리화 방법은 간단하고 빠른 기술로 알려져있다(Rall, 1987). 그러나 이러한 수정란을 동결하였을 경우, 세포소기관에 치명적인 영향을 미친다고 보고되고 있으며(Dobrinsky et al., 1996), 동결 과정 중 불가피하게 형성되는 얼음 결정으로 혈장막이 용해된다고 보고한다. 난자를 동결한 후, 염색체 이상(Johnson and Pickering, 1987; Sathananthan et al., 1988; Carroll et al., 1989; Aman and Parks, 1994), 수정능 감소(Tsunoda et al., 1976) 및 다정자침입증 증가(Glenister et al., 1987; Hyttel et al., 2000)등이 발생한다고 한다.

따라서 본 연구에서는 microtubule 및 mitochondria와 같은 소기관들의 상태를 측정함으로써 급속 동결 시, 난자의 생존성을 측정해보고, 체외 수정 후 발달능을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

배양액

Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)에서 구입된 시약 및 배양액을 본 실험에 공시하였다. 난자성숙 배양액 (IVM)은 2.5 mM sodium pyruvate, 1 mM L-glutamine, 1.0% (v/v) penicillin-streptomycin (10,000 IU and 10,000 g/mL,

respectively; Pen-Strep; GIBCO), 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL), 10 g/mL FSH, 10 g/mL LH, and 1 g/mL estradiol 17 함유된 TCM199를 이용하였다. Albumin, lactate, pyruvate 가 함유된 Tyrode's medium으로 HEPES-TALP 및 IVF-TALP)를 만들었고, 수정란 배양액으로는 modified Eagle medium (MEM) non-essential amino acids, 0.4 mM sodium pyruvate, 1 mM L-glutamine 및 50 g/mL gentamycin이 함유된 synthetic oviduct fluid medium (SOF) 배양액을 이용하였다. 모든 배양액은 pH 7.4 그리고 삼투압 280 mOsm/kg.로 보정하여 사용하였다.

난자준비 및 유리화(vitrification)동결

도축장 유래 난포란을 수집하였고, 15개의 COCs를 IVM 배양액 50 uL drops에 넣고 39C, 5% CO₂ 배양기에서 배양시켰다. 동결은 Martino et al.(1996b)와 Vajta et al.(1999)의 방법에 따라 실시하였다.

배양 22시간째에, 난구세포를 HEPES-TALP 용액에서 30초간 vortexing 하여 제거 시켰고, holding media(M199+20%FCS, HM)에서 2분동안 둔다. 그리고 1.6M ethylene glycol(EG)와 1.18M dimethyl sulfoxide(DMSO)가 든 HM에 30~45초 가량 둔 다음, 3.2M EG, 2.36M DMSO 및 0.6M sucrose가 든 HM에 20~25초 정도 둔다. 10개정도의 난자를 모세혈관 유리관인 open-pulled glass(OPG)에 두며, 동시에 30개 정도의 난자를 electron microscopic copper grid(CG, 400 mesh; Gilder, Westchester, PA)에 놓는다. 그리고 즉시, OPG와 CG를 액체 질소에 담근다.

OPG와 CG의 한쪽을 39°C로 맞춰진 0.3M sucrose가 첨가된 HM에 넣어서 유리화된 난자를 용해시킨다. 그 후, 즉시 난자를 HM에 넣고 5분 동안 둔 뒤, 0.2M sucrose가 함유된 HM에 5분 동안 놓아둔다. 수정을 시키기 전에 체외 성숙 배양액에 2시간동안 둔다.

In Vitro Embryo Production

체외수정란 생산은 Ali and Sirard, (2002) 방법을 이용하였고, 정자의 준비는 Rosenkrans et al. (1993)의 방법대로 하였다. 배양 22시간 째에 난구세포를 제거하고 2 X 10⁶개/ml의 농도로 수정을 시킨 다음, 소 난관 상피세포가 첨가된 IVC 배양액에 배양

을 한다. 48 및 120시간째에 신선한 IVC 배양액 25ul를 첨가한 뒤, 192시간 동안 두며, 분할을 및 배반포 발달을 확인한다.

Microtubule 및 mitochondria 염색

Microtubule 염색은 mouse anti-chicken α -tubulin(maxium Biotech, CA)를 이용하였다. 3% sodium citrate에서 vortexing하여 난구 세포를 제거한 뒤, 4% formaldehyde로 고정된 다음, 10% goat serum으로 10분간 처리하고 anti-chicken α -tubulin(1:100)이 든 saline용액에서 4°C, 하루 정도 놓아둔다. 그 다음 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG antibody로 암실에서 1시간 처리한 뒤, 10ug/ml propidium iodide(PI)로 염색체를 염색한다. 염색된 난자는 laser-scanning microscope (Nikon)에서 관찰하였으며, 정상(normal), 부분 감소(partially reduced) 및 완전 감소(completely reduced)로 평가하였다.

Mitochondria 염색은 난구세포를 제거한 난자를 10ug/ml rhodamine-123(R-123;Molecular Probes, Eugene, OR)을 이용하여 염색하며, epifluorescence microscope을 이용하여 관찰하여 정상(normal) 혹은 부분 감소(partially reduced)로 평가하였다.

실험계획

실험은 세 가지로 나누어서 시행하였다. 첫 번째 실험에서는 체외 수정 이전에 단계에서 난자를 유리화 동결하였을 때의 발달을 비교하였다. Group 1(IVF group)은 24시간동안 체외 성숙 후, 수정을 시켰고, group 2(handled control)은 22시간 동안 체외 성숙시킨 후, CPA에 노출한 다음 2시간 배양시켰다. Group 3과 4는 22시간 동안 체외 성숙시킨 후, 각각 CG 혹은 OPG를 사용하여 유리화 동결시켰다. 두 번째 실험에서는 첫 번째 실험군인 group 1과 2,3에서 난자의 microtubule과 mitochondria 변화를 측정해보았다. 세 번째 실험에서는 두 번째 실험결과를 토대로, 유리화 동결 난자의 microtubule과 mitochondria 안정성에 대한 cytochalasin B와 2-mercaptoethanol의 영향을 비교하였다. 이를 위해, 실험군을 네 개로 나누었는데, group 1(control)은 24시간 동안 체외 성숙시켰고, group 2(handled control)은 체외 성숙 22시간 째에 CG를 이용하여 유리화 동결시킨

후, 용해하여 2시간동안 더 배양하였다. Group 3은 22시간 동안 체외 성숙시킨 후, 5 uM cytochalasin B가 든 IVM 배양액에 15분간 둔 뒤, 유리화 동결을 시켰고, group 4는 22시간 동안 2-mercaptoethanol이 든 IVM 배양액에서 체외 성숙시킨 후, 유리화 동결한 뒤, 2시간동안 더 배양을 시켰다.

통계처리

처리군 간의 분할율 및 배반포 발달율의 차이는 arcsine transformation 후, one-way ANOVA 로 분석하였고, microtubule과 mitochondria의 변화는 General Linear Model(GLM)을 이용하였다. $P<0.05$ 일때 유의적 차이를 인정하였다.

결과및고찰

유리화 동결 난자의 발달

본 연구를 수행하기 전 기초 자료로써 metaphase II 단계 난자를 회수하는 적절한 시기를 알아보았다. 체외 성숙 12시간째, 50% 이하가 metaphase I 단계였으며, 16~20시간 사이에는 anaphase I과 telophase I이 주로 관찰되었으며, 22시간 째에 metaphase II가 70%가량 관찰되었다. 따라서 본 실험에서는 체외 성숙 22시간째의 난자를 유리화 동결 시켰다.

Control인 체외 수정란과 동결 난자의 분할율 및 발달율을 비교 분석한 결과는 표 1에서 보는 바와 같다. Control군에서 대부분의 난자는 수정 후에도 생존율이 높았으나 (316/335, 94.3%), CPA control의 경우 체외 수정 후, 정상적인 형태는 73.9% (257/348)로 나타나 유의적인 차이가($P<0.05$) 있었다. OPG와 CG를 사용하여 유리화동결 하였을 경우, 50%이하의 생존율을 보였다.

분할율에 있어서는 IVF control군이 handled control과 유리화 동결군보다 유의적으로 ($P<0.05$) 높았으나 handled control과 유리화 동결군 간에는 차이가 없었다. 배반포 발달율에 있어서, handled control이 IVF control군보다 유의적으로 ($P<0.05$) 낮았지만, 유리화 동결군에 비해서는 유의적으로 ($P<0.05$) 높았다. 그러나 유리화 동결군 간에는 유의적인 차이가 없었다.

TABLE 1. Cleavage and Development of Cryopreserved Bovine Oocytes Into Blastocysts

Treatment ^a	No. of oocytes ^b		Development to (%)	
	IVM	IVC	Cleaved	Blastocysts
Control	335	316 (94.3)	220 (69.6) ^c	78 (24.7) ^c
Handled control	348	257 (73.9)	118 (50.8) ^d	32 (12.5) ^{de}
Cryopreservation OPG	372	183 (49.2)	76 (41.5) ^{de}	14 (7.7) ^e
CG	385	191 (49.6)	75 (39.3) ^d	16 (8.4) ^e

^aControl, IVF control; handled control, exposed to cryoprotectant; OPG, Open-pulled glass; CG, Copper grid.

^bIVM, number of oocytes matured; IVC, number of in vitro cultured oocytes out of matured oocytes.

Percentages with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

동결 난자에서의 microtubule과mitochondria 변화

첫 번째 실험 결과, OPG와 CG를 이용한 유리화 동결 방법에서 유의적 ($P < 0.05$) 차이가 인정되지 않았으므로, 다음 실험은 CG를 이용하여 수행하였다. 표 2와 3은 미세 기관 들의 변화를 나타내고 있다. 표 2는 microtubule의 변화를 나타내는 결과로서, IVF control이 CPA control과 동결군에 비해 유의적으로 높은 정상 microtubule형태를 보였으며(92% vs. 64 and 31%, $P < 0.05$), CPA control과 동결군에서 부분적 및 완전히 감소된 microtubule 형태가 관찰되었다. Control군에서는 meiotic spindle이 대칭형, 원통모양이며 비성상의 넓은 극을 함유하고, 주변부 및 방사상으로 걸쳐있으나, 동결 난자의 경우, 대부분의 microtubule이 퍼져보이나 제1극체내의 microtubule은 완전히 깨져보였다.

표 3은 동결 난자에서의 mitochondria 변화를 나타내는 결과로서, 정상 mitochondria 형태가 control 군이 CPA control과 동결군에 비해 유의적으로 높게 나타났다(82% vs. 74 and 58%, $P < 0.05$).

난자동결시 화학약품이microtubule과mitochondria에 미치는영향

표 4는 cytochalasin B가 소 난자 동결 시, microtubule에 미치는 영향을 나타낸 결과로서, 동결군이 control군과 cytochalasin B처리군에 비해 정상적인 비율이 유의적으로 낮았다(31% vs. 93 and 61%, $P < 0.05$). 표 5는 2-mercaptoethanol가 소 난자 동결 시, mitochondria에 미치는 영향을 나타낸 결과로서, 2-mercaptoethanol를 첨가하더라도 동결

후의 정상 mitochondria 비율을 개선하지는 못했다. 동결군에서의 정상 mitochondria 구조는 control군에 비해 유의적으로 낮았으나(58% vs. 81%, $P < 0.05$), 2-mercaptoethanol 처리군간에는 차이가 없었다(61% vs. 58%).

TABLE 2. Microtubule Changes in Control, Handled Control, and Cryopreserved Oocytes

Treatment	No. of oocytes	Microtubule changes (%)		
		Normal	Partially reduced	Completely reduced
Control	26	24 (92.3) ^a	2 (7.7)	0 (0)
Handled control	33	21 (63.6) ^b	9 (27.2)	3 (9.1)
Cryopreservation	29	9 (31.0) ^c	14 (48.3)	6 (20.7)

Percentages with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

Five replicates.

Control, untreated; handled control, exposed to cryoprotectant.

TABLE 3. Mitochondria Changes in Control, Handled Control, and Cryopreserved Oocytes

Treatments	No. of oocytes	Mitochondria changes (%)	
		Normal	Reduced
Control	33	27 (81.8) ^a	6 (18.2)
Handled control	35	26 (74.3) ^b	9 (25.7)
Cryopreservation	36	21 (58.3) ^c	15 (41.7)

Percentages with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

Five replicates.

Control, untreated; handled control, exposed to cryoprotectant.

TABLE 4. Effect of Cytochalasin B on Microtubule Pattern of Cryopreserved Bovine Oocytes

Treatment	No. of oocytes	Microtubule changes (%)		
		Normal	Partially reduced	Completely reduced
Control	29	27 (93.1) ^a	2 (6.9)	0 (0)
Cryopreservation	35	11 (31.4) ^b	17 (48.6)	7 (20)
CCB	31	19 (61.3) ^c	8 (25.8)	4 (12.9)

Percentages with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

Five replicates.

Control, untreated; cryopreservation, cryopreserved; CCB, prior to cryopreservation, cultured in cytochalasin B medium.

TABLE 5. Effect of 2-Mercaptoethanol on Mitochondrial Distribution Pattern of Cryopreserved Bovine Oocytes

Treatment	No. of oocytes	Mitochondria changes (%)	
		Normal	Reduced
Control	32	26 (81.3) ^a	6 (18.8)
Cryopreservation	33	19 (57.6) ^b	14 (42.4)
2-ME	33	20 (60.6) ^b	13 (39.4)

Percentages with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

Five replicates.

Control, untreated; cryopreservation, cryopreserved; 2-ME, prior to cryopreservation, cultured in 2-mercaptoethanol medium.

이상의 결과로, CG와 OPG는 난자 동결 시 유용한 수단으로 활용가능함을 알 수 있으며, microtubule과 mitochondria의 변화가 소 동결 난자의 생존성 감소의 원인이 될 수 있다는 사실을 관찰할 수 있었다. 체외 배양액에 cytochalasin B를 첨가함으로써 난자 동결 시, microtubule을 안정화시킬 수 있었으나, 2-mercaptoethanol은 효과가 없음을 입증하였다.

참고문헌

- Ali A, Sirard MA, 2002: Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. Biol Reprod 66:901-905.
- Aman RR, Parks JE. 1994. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of in vitro-matured bovine oocytes. Biol Reprod 50:103-110.
- Carroll J, Warnes GM, Matthews CD. 1989. Increase in digyny explains polyploidy after in vitro fertilization of frozen-thawed mouse oocytes. J Reprod Fertil 85:489-494.
- Dobrinsky JR. 1996. Cellular approach to cryopreservation of embryos. Theriogenology 45:17-26.
- Glenister PH, Wood MJ, Kirby C, Whittingham DG. 1987 Incidence of chromosome anomalies in first-cleavage mouse embryos obtained from frozen-thawed oocytes fertilized in vitro. Gamete Res 16:205-216.
- Hyttel P, Vajta G, Callesen H. 2000. Vitrification of bovine oocytes with the open pulled straw method:

- Ultrastructural consequences. *Mol Reprod Dev* 56:80-88.
- Johnson MH, Pickering SJ. 1987. The effect of dimethylsulphoxide on the microtubular system of the mouse oocyte. *Development* 100:313-324.
- Martino A, Songsasen N, Leibo SP. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 54:1059-1069.
- Niemann H. 1991. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. *Theriogenology* 35:109-124.
- Rall WF. 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 24:384-402.
- Rall WF, Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 313:573-575.
- Rosenkrans CF Jr, Zeng GQ, McNamara GT, Schoff PK, First NL. 1993. Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biol Reprod* 49:459-462.
- Sathananthan AH, Ng SC, Trounson AO, Bongso A, Ratnam SS, Ho J, Mok H, Lee MN. 1988. The effects of ultrarapid freezing on meiotic and mitotic spindles of mouse oocytes and embryos. *Gamete Res* 21:385-401.
- Tsunoda Y, Parkening TA, Chang MC. 1976. In vitro fertilization of mouse and hamster eggs after freezing and thawing. *Experientia* 32:223-224.
- Vajta G, Rindom N, Peura TT, Holm P, Greve T, Callesen H. 1999. The effect of media, serum and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts after Open Pulled Straw (OPS) vitrification. *Theriogenology* 52:939-948.

3-2. 소 체외수정란 및 체세포 복제란의 초자화 동결

Vitrification of in vitro fertilized and somatic cell nuclear transfer embryos in bovine

Abstract

This study was conducted to examine the development of invitro fertilized (IVF) and nuclear transfer (NT) embryos following vitrification for the establishment of vitrification method of NT embryos. IVF embryos developed to the blastocyst stage were equilibrated by 1 to 3 steps, vitrified and thawed, and their survival and hatching rates were examined. Survival and hatching rates (67% and 47.7%, respectively) were high in 3 step equilibrated group (E1) compared to 2 (E3) and 1 step (E3) groups ($P<0.05$). Higher survival (82.1%) and hatching rates (64.1%) were obtained in expanded blastocysts compared to blastocysts ($P<0.05$). High survival and hatching rate were also obtained by vitrification of NT blastocysts, especially in expanded and hatching blastocysts (81.1 and 78.3%, respectively). The result of this study shows that NT blastocysts are successfully cryopreserved by vitrification in company with 3 step equilibration.

서 론

핵이식기술에 의한 복제동물 생산이 실용화되기 위해서는 생산된 복제란을 높은 생존성을 유지하면서 동결시키는 기술의 개발이 필요하다. 수정란 동결기에 의한 동결은 프로그램 되어있는 동결방법에 의해 난자를 동결할 수 있다는 장점이 있으나 액체질소의 낭비와 시간의 낭비가 크며, 때로는 생존율이 떨어지는 단점이 있다. 따라서 경제적, 시간적 손실을 최대한 줄이면서, 높은 생존율을 보장할 수 있는 초자화 동결법을 이용한 핵이식 복제란의 동결법이 확립되어야 한다.

포유동물 수정란의 초자화동결은 1985년에 Rall 과 Fahy가 DMSO(dimethyl sulfoxide), acetamide, propylene glycol 및 polyethylen glycol을 함유한 초자화동결액을 이용하여 생쥐 8 세포기 수정란의 초자화동결에 성공한 것이 최초이다. 그후 생쥐

(Scheffen 등, 1986; Kasai 등, 1990), 토끼(Smorag 등, 1989; Kobayashi 등, 1990), 면양(Schiewe 등, 1991; Ali 와 Shelton, 1993), 돼지(Dobrinisky 와 Johnson, 1993; Kuwayama 등, 1997) 및 소(Massip 등, 1986; Kuwayama 등, 1992) 에서도 초자화 동결에 성공하였다. Massip 등(1987)은 소의 상실배기에서 초기 배반포기 수정란을 초자화 동결하여 산자를 얻는데 성공하였으나, 동해방지제로 사용한 glycerol 과 1,2-propanediol의 혼합액은 소 배반포의 동결보존에는 비효과적인 것으로 나타났다. 최근, Kuwayama 등(1992)은 glycerol 과 1,2-propanediol의 혼합물에 sucrose를 첨가하여 단계별 평형을 시키는 방법이 소 배반포의 초자화동결에 효과적이라고 보고하였다. 비슷한 방법으로 Saito 등(1994)은 glycerol 과 ethylene glycol의 혼합물에 sucrose 와 dextrose를 첨가한 GESD액으로 소 체외수정 유래 배반포를 단계적으로 평형시켜 초자화 동결하는 방법으로 높은 생존율을 얻었다고 보고하였다. 한편, 초자화동결과 일반적인 완만동결 후 수정란의 생존율을 비교한 경우, 차이가 없는 것으로 보고되었으며(Van Wagtenonk-De Leeuw 등, 1995), 오히려 2단계 평형에 의한 초자화동결과 완만동결에 의한 소 체외수정란의 생존율을 검토한 결과, 초자화동결에 의하여 수정란의 생존율이 증가하였다(Mahmoudzadeh 등, 1994).

본 연구는 체세포 핵이식란의 초자화동결법을 확립하기 위하여 체외수정란을 이용한 초자화동결기술을 검토한 후 복제란의 초자화 동결기술로 응용할 수 있는 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 채취 및 성숙배양

도축장에서 회수된 난포의 난소로부터 미성숙 난자를 채취하여 난구세포가 균일하고 세포질이 균질한 것만을 선별하여 5% CO₂, 39°C의 조건하에서 18~20시간 성숙배양하였다. 난포란의 성숙배양액은 TCM-199액(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)에 10% FBS(Gibco-BRL), 0.2 mM Na-pyruvate, 0.02 U/ml FSH(Sigma, St. Louis, MO, USA), 1 µg/ml 17β-estradiol(Sigma) 및 50 µg/ml gentamicin(Gibco-BRL)을 첨가한 것을 사용하였다.

2. 체외수정란의 생산

체외수정은 한우의 동결정액을 사용하였다. 성숙 난포란은 5mM caffeine(Sigma), 10 μ g/ml heparin(Sigma), 3 μ g/ml BSA 및 2 \times 10⁶ 정자/ml 가 함유된 BO액(Brackett 와 Oliphant, 1975)의 50 μ l 소적 내에 난구세포가 둘러싸인 채로 10여개씩 투입하여 5% CO₂, 39 $^{\circ}$ C의 조건하에서 12~20시간 배양하였다. 수정 후 난자는 난구세포가 붙어있는 채로 3 μ g/ml BSA를 함유한 TCM-199액의 소적으로 옮겨 32-40시간 배양 후 난구세포를 제거하고 2 세포기 이상으로 발육된 수정란은 10% FBS를 함유한 CR1aa내에서 5-7일간 추가 배양하여 배반포로 발육된 수정란 중 난자의 질이 우수하다고 판정되는 난자만을 초자화 동결 실험에 공시하였다.

3. 핵이식란의 생산

핵이식은 Campbell 등(1996)의 방법에 준하여 한우의 피부세포를 동결 용해하였다가 배양한 후 사용하였다. 난자의 탈핵은 cytochalasin B(CB)를 함유한 TCM-199 + 3 mg/ml BSA의 배양소적(50 μ l) 내에서 제 1극체와 주변의 세포질을 약 1/3정도 흡입하여 제 2 유사분열 중기 염색체를 제거하는 방법으로 탈핵을 실시하였다. Donor 세포는 직접 injection pipette으로 흡입하여 탈핵란 세포질의 위관강 내로 주입하였다.

재구축란의 전기융합은 BTX 세포융합장치(BTX, San Diego, CA, USA) 및 0.5-mm폭의 wire chamber를 이용하여 실시하였다. 재구축란은 0.1 mM MgSO₄, 0.05 mM CaCl₂, 0.05 mg/ml BSA를 첨가한 0.3 M mannitol 용액을 넣은 wire chamber의 양 전극 사이로 옮겨, 1.5 kV/cm의 직류(DC)전류를 30 μ s 간 1회 통전하여 융합을 유도하였다. 융합이 확인된 핵이식란은 융합 1시간 후 10 μ M의 Ca⁺⁺-ionophore(A23187; Sigma)로 5분간 처리 후 즉시 10 μ g/ml 농도의 2 mM의 6-dimethylaminopurine (6-DMAP, Sigma)을 함유한 체외배양액의 drop 내로 옮겨 4시간 동안 배양하여 활성화를 유도하였다. 활성화처리 후 핵이식란은 3 mg/ml BSA가 함유된 CR1aa 배양액의 50 μ l drop으로 옮겨 5% CO₂ 및 39 $^{\circ}$ C의 조건하에서 48시간 배양하여 분할된 핵이식란은 10% FBS를 함유한 CR1aa 내로 옮겨 5~7일간 추가 배양하였다. 생산된 배반포 복제란 중 난자의 질이 우수하다고 판단되는 수정란만을 초자화동결 실험에 공시하였다.

4. 초자화동결액 및 희석액의 준비

초자화동결액(vitrification solution; VS)은 Saito 등(1994)이 사용한 GESD를 수정하여 사용하였다. 동결액의 구성은 20% FBS(Gibco)가 첨가된 D-PBS(Dulbecco's PBS)를 기본액으로 하여, 20% glycerol, 20% ethylene glycol, 3/8 M sucrose 및 3/8 M dextrose가 함유되도록 조정하였다(VS3). 초자화동결액 조제 시, 먼저 동해방지제 및 sugar를 D-PBS액에 최종농도의 1.25배 농도로 용해하여 사용 전에 FBS와 4:1의 비율로 혼합하여 조제하였다. 또한, 동결 전 평형을 위하여 20% FBS가 함유된 D-PBS를 이용하여 VS3액을 각각 50% 및 25%로 희석하여 VS2 및 VS1을 만들었다. 한편, 용해 후 동해방지제의 희석액으로는 20% FBS를 함유한 D-PBS액에 1/2 M sucrose를 첨가하여(S-PBS) 사용하였으며, 단계적 희석을 위하여 1/4 M sucrose액도 같은 방법으로 준비하였다.

5. 수정란의 초자화동결

동결 전 평형(equilibration)방법은 세 처리구로 나누어 비교하였다. 첫째는 배반포를 VS1, VS2 및 VS3에 각각 5분, 5분 및 1분간씩 평형 시켰으며(E1), 둘째는 VS2 및 VS3에 각각 5분 및 1분간 평형 시켰고(E2), 마지막 방법은 VS3에만 1분간 평형 시켰다(E3). 모든 평형과정은 실온에서 실시하였다.

수정란은 VS3액에 평형하는 1분 이내에 0.25-ml 플라스틱 straw(FHK, Japan) 내로 봉입하였다. 봉입방법은 우선 straw내에 S-PBS 2층(~10 및 ~70 mm), VS3 2층(~3 및 10 mm)을 각각 0.5 mm의 공기 층으로 분리하여 흡인한 뒤 수평으로 유지하였다. 3-6개의 체외수정 유래 배반포를 VS3액에 세척한 후 바로 10 mm의 VS3층에 옮겨 넣고 이어서 VS3 1층(~3 mm) 과 S-PBS(~15 mm) 1층을 만든 후 straw의 끝을 불에 달군 겹자를 이용하여 봉인하였다(김 등, 1998). 수정란이 함유된 straw는 즉시 열 봉인한 쪽부터 LN2 내로 침지하였다. 처음 1/2정도는 빠르게 침지하고, 나머지 1/2 부분은 서서히 침지하였으며, VS3에 평형개시부터 1분 이내에 수정란의 straw내 봉인 및 LN2내 침지 과정이 끝나도록 하였다. 동결 straw는 용해 시까지 LN2 용기 내에 보관하였다.

6. 동결란의 용해 및 회석

수정란 용해 후 동해방지제의 회석을 위하여 0.25 및 0.5M sucrose를 사용하였다. 동결 straw는 LN2 내에서 꺼내어 20℃ 수조에서 약 10초간 용해 후 1 ml의 0.5M sucrose가 들어있는 배양접시 내로 내용물을 배출시켜 혼합시켰다. 수정란은 즉시 0.5M sucrose액 내로 옮겨 실온에서 5분간 유지 후 다시 0.25M sucrose 액 내로 옮겨 5분간 유지한 다음 20% FBS를 함유한 D-PBS로 세척하여 배양하였다.

7. 용해란의 체외배양

동결 용해란은 세척 후 10% FBS가 첨가된 CR1aa 배지로 옮겨 5% CO₂, 39℃의 조건하에서 2-3일간 배양하며 생존율 및 부화율(hatching rate)을 검사하였다. 수정란의 생존율은 배양 후 24시간 및 48시간에 동결 전 상태 이상으로 재 확장된 배반포의 수로 판정하였다.

8. 통계처리

실험의 결과는 Chi-square test에 의하여 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 평형방법에 따른 체외수정란의 용해 후 생존능

소 체외수정 유래 배반포를 각각 다른 평형방법으로 평형시킨 후 초자화동결 및 용해하여 생존성을 검토한 결과, VS1, VS2 및 VS3에 각각 5분, 5분 및 1분간 평형시킨 E1구에서 67%(73/109)로, VS2 및 VS3에 각각 5분 및 1분간 평형시킨 E2구(20%) 및 VS3에만 1분간 평형시킨 E3구(1.9%)에 비하여 유의적으로($P < 0.05$) 높았다(Table 1). 한편, 용해 후 72시간 배양하여 부화율을 검사한 결과, E1구에서는 47.7%(52/109)가 부화배로 발육된 반면, E2 및 E3구에서는 각각 10.0% 와 0%로 유의적($P < 0.05$)으로 낮았다.

Table 1. Survival and hatching rates of vitrified IVF embryos after thawing.

Group	No. Thawed	No. Survived(%)	No. Hatching(%)
E1	109	73(67.0) ^a	52(47.7) ^a
E2	110	22(20.0) ^b	11(10.0) ^b
E3	104	2(1.9) ^c	0 ^c

*Embryos were equilibrated in VS1, VS2 and VS3 each for 5, 5 and 1 min(E1), for 0, 5 and 1 min(E2), and for 0, 0 and 1 min(E3). Hatching rate was assessed at 72 hr after culture.

^{ab,c}Values with different superscripts in the same column differ(P<0.05).

2. 난자의 발육단계별 체외수정란의 용해 후 생존능

체외 수정란의 초자화동결 및 용해 후 난자의 발육단계별 생존율은 배반포가 51.0%, 확장배반포가 82.1%로 확장배반포의 경우가 유의적(P<0.05)으로 높았으며, 배양 후 부화배 형성율도 확장배반포가 64.1%로 배반포의 26%에 비하여 유의적(P<0.05)으로 높았다(Table 2).

Table 2. Survival and hatching rates of vitrified IVF embryos after thawing*.

Embryo stage	No. Thawed	No. Survived(%)	No. Hatching(%)
Blastocyst(BL)	104	53(51.0) ^a	27(26.0) ^a
Expanded BL	117	96(82.1) ^b	75(64.1) ^b

*Embryos were equilibrated in VS1, VS2 and VS3 each for 5, 5 and 1 min(E1).

^{ab}Values with different superscripts in the same column differ (P<0.05).

3. 난자의 발육단계별 복제란의 용해 후 생존능

핵이식 복제란의 초자화동결 및 용해 후 생존율은 배반포가 71.8%, 확장 및 부화배가 81.1%로 유의적인 차이는 인정되지 않았으나 확장 및 부화배의 경우가 다소 높게 나타났으며, 부화배 형성율도 배반포에 비하여 확장 및 부화배의 경우가 78.3%로 높게 나타났다. 그러나 두 구 간의 유의적인 차이는 없었다(Table 3).

Table 3. Survival and hatching rates of vitrified reconstituted embryos after thawing*.

Embryo stage	No. Thawed	No. Survived(%)	No. Hatching(%)
Blastocyst(BL)	39	28(71.8)	21(53.8)
Expanded and hatching BL	37	30(81.1)	29(78.3)

*Embryos were equilibrated in VS1, VS2 and VS3 each for 5, 5 and 1 min(E1).

고 찰

초자화 동결은 수정란 세포질의 결빙에 의한 손상을 최소화함으로써 동해를 방지할 수 있고, 고가의 장비가 필요 없으며, 시간을 절약할 수 있고, 비교적 높은 생존율을 얻을 수 있어서 소 체외수정란의 동결에 유용하게 이용되어져 왔다(Massip 등, 1986; Kuwayama 등, 1992; Saito 등, 1994; 김 등, 1998). 초자화 동결용액 및 구체적인 방법은 사용자에 따라 다양하나 본 연구에서는 Saito 등(1994)의 방법을 보완하여 사용하였다. Saito 등(1994)은 GESD를 이용하여 소 체외수정란을 3단계 평형 후 초자화 동결한 결과, 배반포의 경우 83%가, 그리고 확장배반포의 경우는 96%가 용해 후 생존하였으며, 96시간 배양 후의 부화율도 각각 74% 와 86%로 매우 높았다. 비록 이식 후 산자의 생산은 검증하지 않았지만, sucrose 와 dextrose의 첨가가 수정란의 생존에 유리하였다고 보고하였다. Kasai 등(1990)도 ethylene glycol, Ficoll 및 sucrose를 혼합한 초자화동결액으로 생쥐 상실패를 동결 후 높은 생존율을 얻었다. 동해방지제에 sucrose를 첨가함으로써 다른 동해방지제의 과도한 침투성을 완화하고(Széll 과 Shelton, 1987), 세포질 내 단백질의 농도를 증가시킴으로서 세포 내 초자화를 돕는 것으로 보고되고 있다(Rall, 1987). Dextrose 도 동해방지제의 독성을 완화하는 것으로 여겨지며(Clark 등, 1984), sucrose와 함께 초자화동결시의 냉각충격을 완화시키고(Sutton, 1992), 동해방지제의 불필요한 세포 내 침투를 감소시키는 역할을 하는 것으로 알려지고 있다(Utsumi 등, 1992).

Kuwayama 등(1994)은 소 체외수정란을 glycerol과 1,2-propanediol의 혼합액으로 초자화동결 시, 각 단계 당 5분씩 평형시킨 2단계 평형과 1분 정도씩 평형시킨 16단계 평형방법을 비교하였다. 실험 결과, 2단계평형의 경우는 수정란의 생존율이 0%인 반면, 16단계 평형의 경우는 83.3%로 현저한 차이를 보였다. 뿐만 아니라, 세포질의 미세구조에 있어서도 2단계 평형의 경우는 공포(vesicles)가 관찰되어, 초자화동결 전 평형방법이 수정

란의 생존성에 영향을 미칠 수 있음이 시사되었다. 본 연구에서도, 비록 1, 2, 3단계 평형만을 비교하였으나, 다단계 평형의 경우가 유의적으로 높은 생존율과 부화율을 나타내었다. Kuwayama 등(1994)의 결과를 고려할 때, 평형 단계를 여러 단계로 하고 짧은 시간동안 평형시키는 것이 유리할 수도 있으나, 본 연구에서는 검토하지 않았다. Ohboshi 등(1997)은 ethylene glycol, polyethylene glycol 및 sucrose의 혼합액으로 소 체외수정 배반포를 초자화동결 시, 1단계평형으로 13%의 생존율을 보인 반면, 2단계평형에 의해서는 72.7%의 생존율을 얻어, 1단계와 2단계 평형 사이에도 현저한 차이를 나타내었다. 적절한 단계의 평형은 고농도의 동결액에 직접 노출함으로써 생길 수 있는 삼투압 충격을 완화하여, 초자화동결 시 세포막 손상을 최소화하고, 수정란의 초자화를 더욱 안정적으로 유지하는 것으로 사료된다.

김 등(1998)은 소 수정란의 초자화 동결 시 동결전 평형방법 및 용해 후 회석방법을 검토하여 3단계 평형과 2단계 회석이 효과적임을 보고하였다. 본 연구에서도 ethylene glycol 및 당이 첨가된 초자화 동결액을 2단계로 회석하여 수정란을 동결 전 평형 시키고, 동결하였다가 용해 후 sucrose 용액으로 2단계 회석하는 방법으로 비교적 높은 생존율과 부화배 형성율을 얻을 수 있었다. 또한 김 등(1998)의 보고에서와 마찬가지로 수정란의 발육단계가 진전된 확장배반포 시에 동결하는 것이 용해 후 배의 생존에 유리하다는 결론을 얻을 수 있었다. 복제란의 경우도 체외수정란의 결과와 비슷하나 배반포의 경우는 체외수정란 보다 높은 생존율과 부화배 형성율을 나타내었다. 복제란은 투명대에 구멍이 뚫려있어 일반적으로 동해를 입기 쉬운 것으로 예상할 수 있으나 본 연구의 결과는 복제란에 대한 동해가 예상보다 크지 않다는 것을 시사한다. 이와 같은 결과는 이미 부화가 시작되는 복제란의 경우에서도 보여졌는데, 체외수정란의 경우는 부화배를 초자화 동결하면 용해 후 세포가 퇴행되는 비율이 높은 반면(미 제시), 복제란의 경우는 부화 중의 수정란이라 할지라도 높은 생존율을 나타내었다.

결론적으로, 본 연구의 결과는 3단계 평형에 의한 초자화동결 방법에 의해서 핵이식 복제란을 성공적으로 동결할 수 있으며, 높은 생존율과 부화배 형성율을 얻을 수 있음을 보여준다.

요 약

본 연구는 체세포 핵이식란의 초자화동결법을 확립하기 위하여 체외수정란을 이용한 초자화동결기술을 검토한 후 복제란의 초자화 동결기술로 응용할 수 있는 가능성을 검토하였다. 배반포로 발육된 체외수정란을 동결 전 1~3단계로 평형을 실시하여 vitrification에 의해 동결하였다가 용해하여 생존능을 검사하였다. 난자의 생존율은 3단계 평형구(E1, 67%)가 2단계(E2) 및 1단계(E3) 평형구 보다 유의적으로 높았으며($P<0.05$), 부화율도, E1구에서는 47.7%로 E2 및 E3구보다 유의적($P<0.05$)으로 높았다. 한편 발육단계별로는 확장배반포가 배반포기 난자에 비하여 생존율(82.1%)과 부화율(64.1%)에서 모두 유의적으로 높았다($P<0.05$). 핵이식 배반포를 3단계 평형하여 동결 용해한 경우도 체외수정란과 비슷한 경향을 보여 확장 및 부화배의 생존율과 부화율이 81.1%와 78.3%로 배반포에 비하여 다소 높게 나타났다. 본 연구의 결과는 3단계 평형에 의한 초자화동결 방법에 의해서 핵이식 복제란을 성공적으로 동결할 수 있으며, 높은 생존율과 부화배 형성율을 얻을 수 있음을 보여준다.

참고문헌

- Ali J and Shelton JN. 1993. Successful vitrification of day-6 sheep embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 99:65-70.
- Brackett BG and Oliphant G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.*, 12:260-274.
- Clark P, Fahy GM and Karow AM, Jr. 1984. Factor influencing renal cryopreservation. II. Toxic effects of three cryoprotectants in combination with three vehicle solution in nonfrozen rabbit cortical slices. *Cryobiology*, 21:260-273.
- Dobrinsky JR and Johnson LA. 1993. Effect of vitrification media on the in vitro development of porcine embryos. *Theriogenology*, 39:209 (abstr.)
- Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H and Sakurai T. 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J. Reprod. Fertil.*, 89:91-97.
- Kobayashi K, Nagashima H, Yamakawa H, Kato Y and Ogawa S. 1990. The survival of whole and bisected rabbit morulae after cryopreservation by the vitrification method. *Theriogenology*, 33:777-788.
- Kuwayama M, Fujikawa S and Nagai T. 1994. Ultrastructure of IVM-IVF bovine blastocysts vitrified after

- equilibration in glycerol 1,2-propanediol using 2-step and 16-step procedures. *Cryobiology*, 31:415-422.
- Kuwayama M, Hamano S and Nagai T. 1992. Vitrification of bovine blastocysts obtained by in vitro culture of oocytes matured and fertilized in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 96:187-193.
- Kuwayama M, Holm P, Jacobsen H, Greve T and Callesen H. 1997. Successful cryopreservation of porcine embryos by vitrification. *Vet. Rec.*, 141:365(abstr.)
- Mahmoudzadeh AR, Van Soom A, Ysebaert MT and de Kruif A. 1994. Comparison of two-step vitrification versus controlled freezing on survival of in vitro produced cattle embryos. *Theriogenology*, 42:1389-1397.
- Massip A, Van der Zwalmen P and Ectors F. 1987. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology*, 27:69-79.
- Massip A, Van der Zwalmen P, Scheffen B and Ectors F. 1986. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-Letters*, 7:270-273.
- Ohboshi S, Fujihara N, Yoshida T and Tomogane H. 1997. Usefulness of polyethylene glycol for cryopreservation by vitrification of in vitro-derived bovine blastocysts. *Anim. Reprod. Sci.*, 48:27-36.
- Rall WF. 1987. Factors affecting the survival of vitrified mouse embryos. *Cryobiology*, 24:387-402.
- Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature(Lond.)*, 313:573-575.
- Saito N, Imai K and Tomizawa M. 1994. Effect of sugars-addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro. *Theriogenology*, 41:1053-1060.
- Scheffen B, Van der Zwalmen P and Massip A. 1986. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. *Cryo-Letters*, 7:260-269.
- Schiewe MC, Rall WF, Stuart LD and Wildt DE. 1991. Analysis of cryoprotectant, cooling rate and in situ dilution using conventional freezing or vitrification for cryopreserving sheep embryos. *Theriogenology*, 36:279-293.
- Smorag Z, Gadja B, Wiczorek B and Jura J. 1989. Stage-dependant viability of vitrified rabbit embryos. *Theriogenology*, 31: 1227-1231.
- Sutton RL. 1992. Critical cooling rates for aqueous cryoprotectants in the presence of sugars and polysaccharides. *Cryobiology*, 29:585-598.

- Széll AZ and Shelton JN. 1987. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solution on Day-3 mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 80:309-316.
- Utsumi K, Hochi S and Iritani A. 1992. Cryoprotective effect of polyols on rat embryos during two-step freezing. *Cryobiology*, 29:332-341.
- 김정익, 유재원, 박춘근, 양부근, 정희태. 1998. 동결액의 평형방법과 회식방법이 초자화 동결된 소 체외수정란의 생존성에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지* 13:313-321.

3-3. 다른 발달 단계에서 냉각 효과를 준 체외생산 수정란의 발달율

Effect on Development of Chilling In Vitro Produced Bovine Embryos at Various Cleavage Stages

Abstract

Bovine embryos and zygotes are known to be sensitive to "temperature shock" when cooled to temperatures near 0°C. The effect of chilling on in vitro derived embryos at various cleavage stages was investigated. Cumulus-oocyte-complexes (COCs) were matured in IVM medium with serum. Presumptive zygotes were cultured in serum free IVC medium. Embryos were used as chilled or control samples at the 2-cell, 4-cell, 8-cell, morula, and blastocyst stages. Embryos in 0.2 ml PBS in plastic straws were cooled rapidly in ethanol baths at 0°C for 30 min. Embryo viability was assessed by in vitro development. The percentage of control embryos that hatched as blastocysts increased the later stage at which they were selected. Relative proportion of embryos increased from 28% to 48% to 68% when chilled at the 8-cell, morula or blastocyst stages. Cell counts made of those blastocysts formed from chilled embryos indicated subtle effects of chilling.

서론

축산업에 있어서, 유전적으로 가치 있는 수정란의 보관 기술은 부가가치가 높은 기술이다. 따라서 수정란을 장기간 보관할 수 있는 동결기술에 대하여, 많은 연구가 보고되고 있다. (Leibo et al., 1986). 과거에는 외과적인 수술에 의하여 수정란을 회수 할 수 있었지만, 현재는 체외에서 성숙, 수정, 배양시켜, 다양한 단계의 수정란을 회수 할 수 있다. (Gordon, 1994) 따라서 초기 발달단계의 수정란을 온도를 차게 하여 장기간 보관하는 방법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 0°C 에 가깝게 차게 하였을 때 세포는 많은 손상을 받는데 그것을 온도 충격이라 한다. 후에 그것을 동결에 의한 직접 손상, 혹은 "cold shock" 이라 부르게 되었다. (Morris et al., 1984). 최근 동결 감수성라는 단어는 포유동물이 아닌 동물에서 낮은 온도에 의한 손상에도 이러한 단어를 붙이게 되었다. (Mazur

wt al., 1992,6).

손상 없는 소수정란의 동결의 경제적인 가치는 수정란의 이동이 단거리에서부터, 장거리 까지 가능하다는 것이다. 수정란에 적용되는 대부분의 동결 용해 방법은, 세포의 손실과 같은 부정적인 영향을 수정란에 미친다. 따라서, 장기 보관을 위하여 0°C 에서 5°C 로 차게하여 보관하느냐, 생존성을 높이기 위하여 실온에서 보관하느냐 선택 사항이다.(Gordon ,1994; Gordon, 2003). 쥐의 경우 발달 단계에 상관없이 차게 하여 보관하여도 손상을 받지 않는다. 따라서 동결 시키지 않고 0°C에서 보관하는 것이 가능하다. (Kasai et al., 1986).

실온이나, 더 높은 온도에서 영양이 많이 들어 있지 않은, PBS와 같은 배양액에서 수정란을 보관 하였을 경우, 비정상적인 발달이 나타난다. 이것은 0°C 에서 4°C 정도로 차게 하여 보관하는 방법을 이용하여 막을 수 있다. . 대부분, 체외배양 한 초기 배반포의 경우, PBS에서 보관한 것은 0°C에서 slow혹은 rapid cooling 하였을 때 생존 하지 못한다. (Leibo et al., 1993).

1970년대에 캠브리지에서 발달 단계와 발달 능력, 생존성과 차게하는 방법과 동결방법과의 차이를 명확히 보여주었다.(Trounson et al., 1976.). 소의 경우 , 할구가 조밀하지 못할 때, 회수 하여 7.5°이하로, 차게 하면 생존하지 못하였지만, 초기 배반포의 경우 생존할 수 있었다. (Richards et al., 1988). 수정란의 발달 단계와 , 동물의 종은, 동결 손상과 밀접한 관계가 있다 것을 확인하였다(Mohr et al, 1981).

따라서 본 연구는 형질전환 복제 수정란의 장기 보존을 위한 전 단계로 체외 생산 수정란의 발달 단계에 따라 chilling의 효과를 비교해 보았다.

재료 및 방법

난포란의 채취

Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)에서 구입된 시약 및 배양액을 본 실험에 공시하였다.

도축장에서 도살된 암소의 난소를 회수하여 30~35°C 의 생리식염수 용액에 넣어 실험실로 운반하여 직경 2~7 mm의 난포로부터 18 gauge 주사바늘이 부착된 주사기로 난포액을 흡입하여 미성숙 난자를 채취하였다. 채취된 난자는 실제 현미경하에서 난구세포가 균

일하고 세포질이 균질한 것만을 선별하여 난자성숙용 배양액으로 수회 세척 후 성숙배양에 이용하였다

체의 성숙, 수정 및 배양

난포란의 성숙배양액은 TCM-199액(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)에 10% 소태아혈청(fetal bovine serum; FBS, Gibco-BRL), 0.2 mM Na-pyruvate, 0.02 IU/ml FSH(Sigma, St. Louis, MO, USA), 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 17 β -estradiol(Sigma) 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamycin(Gibco-BRL)이 함유된 성숙배양액을 50 μl 의 소적으로 만들어paraffin oil로 피복하고 성숙배양 2~3시간 전에 5% CO₂, 39°C의 조건하에서 평형 시킨 후, 각 소적 당 10개의 난포란을 넣어 18~20시간 배양하였다.

체의성숙 후 난자 주변의 난구세포를 제거한 다음IVF-TALP 미디어 드랍에 옮겨놓는다. 동결 정액을 ml당 2106 개가 되도록 넣고 20-24시간 수정시킨다. 이때 소난관상피세포 (이하 BOEC)와 공배양한다. BOEC 회수법은 Rieger et al (1995)의 방법을 따랐다. 혈청이 들어가 있지 않은 IVC 미디어(혈청이 들어가 있지 않은 M199미디어에 0.1% polyvinyl alcohol 을 첨가)에 BOEC를 공배양하여 48시간 후 분할율을 확인한다. 체외성숙, 수정 , 배양시에 50 μl 드랍에 20개의 난자를 사용한다. 멸균된 오일(Dow Corning, Midland, MI)을 배양액 위에 사용하였다.

혈청이 들어가 있지 않은 IVC 미디어(혈청이 들어가 있지 않은 M199미디어에 0.1% polyvinyl alcohol 을 첨가)에 BOEC를 공배양하여 48시간 후 분할율을 확인하였으며, 체외 성숙, 수정, 배양 시에 50 μl 미세소적에 20개의 난자를 사용하였다.

실험 디자인

Experiment 1: 다른 발달 단계를 가진 체외 생산 수정란을 이용하여, chilling의 효과를 알아보았다. 30-34시간에 이세포기의 수정란을 , 42-46시간에 4세포기의 수정란을, 48-52시간에 8세포기의 수정란을, 142-146시간에 상실배기의 수정란을, 166-170시간에 배반포를 회수하여 Control 그룹과 Chilled 그룹으로 나누어서, 발달율을 보았다.

Experiment 2: Chilling 한후, 각 단계별로 배반포까지의 발달율을 확인한 후, 세포수를 조사하여 세포의 어떠한 영향을 주었는지를 확인하였다.

Statistical Analysis

배반포와 hatching율은 one way ANOVA를 사요하였고, control과 chilled그룹간의 세포수의 평균값은 Student's t-test를 이용하여 비교하였다. P값이 0.05보다 작을 때 유의성을 인정하였다.

결과 및 고찰

The effect of chilling on the in vitro viability of in vitro produced bovine embryos at different developmental stages

0°C에서 30분간 chilling이 다른 발달 단계의 체외생산 수정란의 형태에 미치는 영향을 chilling후 12시간 간격으로 수정란이 퇴화하거나, 배반포가 될 때까지 관찰하였다. Cooling후 바로 형태적인 변화는 없었지만, 어떤 수정란들은 12시간 에 , 세포질이 검게 되기 시작하였다. 비록 형태적인 변화는 없었지만, 36시간후에 비대칭 분할율이 높았다.

각기 다른 발달 단계에 있는 수정란을 0°C 에서 30분간 chilling하였을 때 수정란에 미치는 영향은 표 1에 나와 다. control 그룹의 2,4,8,세포기의 경우 30~50%정도 만큼만 배반포로 발달 하였다. chilling 그룹의 경우, 2,4세포기는 배반포로 발달 하지 못하였고, 8 세포기의 경우 15%, 상실배기의 경우, 2 % 배반포로 발달하였다. control의 경우 2,4,8,세포기 유래 배반포들은 2/3 정도가 hatching을 하였다. Chilling한 그룹의 경우 2,4 세포기 유해 배반포들은 hatching하지 못하였지만, 상실배기나 배반포의 경우 hatching하여다. 7,8일에 형성된 배반포의 크기에는 차이 가 없었다.

Table 1. Effect of Chilling on Survival of Different Developmental Stages of In Vitro Produced Bovine Embryos

Embryo Stage	Group	Embryos used	Number (%) of embryos that developed into		Normalized survival (%)
			Expanded blastocyst	Hatching blastocyst	
2-Cell	Control	77	25 (32.5)a	22 (28.6)a	100
	Chilled	77	2 (2.6)b	0 (0)b	0
4-Cell	Control	59	23 (39.0)ae	19 (32.2)a	100
	Chilled	59	0 (0)b	0 (0)b	0
8-Cell	Control	54	27 (50.0)c	18 (33.3)a	100
	Chilled	54	8 (14.8)d	5 (9.3)b	27.9
Morula	Control	73	31 (42.5)e	25 (34.2)a	100
	Chilled	73	16 (21.9)d	12 (16.4)c	48.0
Blastocyst	Control	71	-	59 (83.1)d	100
	Chilled	71	-	40 (56.3)e	67.7

a-e Values with different letters within a column are significantly different ($P < 0.05$).

The comparison of Cell Number of Different Developmental Stages of In Vitro Produced Bovine Embryos After Chilling

다른 발달 단계에 있는 체외생산 소수정란을 chilling 한 후, 평균 세포수를 관찰한 결과는 표 2에 나와 있다. control 그룹의 경우 8세포기와 상실배기 유래 7.8일 배반포의 평균 세포수는 각각 145와 142이다. 8세포기와 상실배기 세포기 사이의 세포수 차이에서 chilling 한 그룹과 유의적인 차이가 인정되었다.

체외 생산 수정란 생산 기술은 생산비가 적게 든다는 점에서 아주 큰 매력을 가지고 있다. 따라서 여러 가지 다양한 분야에 손쉽게 쓰일 수 있다. 수정란 이식, 수정란 진단, 체 세포 핵이식, 형질 전환 소의 생산, 수정과 발생학의 기초적인 기전을 밝힐 때 아주 유용하게 쓰일 수 있다(Hcshi et al., 2003). 따라서, 손상이 적으면서, 장기간 보관할 수 있는 동결법에 대한 관심도 높아가고 있다(Pollard et al., 1994).

Table 2. Comparison of Cell Number of Different Developmental Stages of In Vitro Produced Bovine Embryos After Chilling

Stage	Group	Embryos used	Blastocyst cell count (Mean±SEM)		
			Day-7	Day-8	Day-9
8-cell	Control	22	145.0±8.0a	-	-
		25	-	160.8±7.0a	-
	Chilled	1	94	-	-
		14	-	119.4±3.3b	-
Morula	Control	27	142.5±6.5a	-	-
		29	-	156.9±7.8a	-
	Chilled	23	101.8±8.1b	-	-
		20	-	125.3±4.6ab	-
blastocyst	Control	14	-	175.5±2.8a	-
		14	-	-	191.8±2.2a
	Chilled	10	-	170.6±1.9a	-
		8	-	-	188.1±3.3a

*Number of cells within the same column is significantly different (P<0.05).

Looney et al. (1989)은 cooling 직후는 형태적인 변화가 없지만, 3-7시간이 지난 후 38°C에서 배양 하였을 때 세포막의 손상을 입는다고 보고하였다. 발달 단계에 따른 다른 chilling감수성은 일반적인 현상이다. 낮은 온도에서, 생존율은 낮아진다. (Mazur et al., 1992; Zhang et al., 1996). 8-16세포기의 소수정란의 경우 10°C이하로 cooling하면 생존율이 떨어진다고 보고되어진 바 있다 (Wilmot et al., 1975). 본 실험 결과는 2,4세포기의 수정란을 chilling한 경우 생존성이 아주 낮지만, 8세포기 이상부터는 생존성이 증가하기 시작한다. 이러한 발견은 발달 단계에 따라 chilling감수성이 다르다는 것을 말해준다. 혈청이 들어가 있는 배지에서 소수정란을 키울 경우, 혈청이 들어 있지 않은 배지에서 키울 때보다, 미성숙 미토콘드리아가 많고, 지방의 함량이 높다. 지방과 혈청의 단백질이 만나, 미토콘드리아의 기능을 저하 시키는 결과를 야기하기 때문이다. 이러한 기작들이 chilling과 동결 감수성에 부정적인 영향을 미치는 것으로 보고 되고있다. (Abe et al., 2003). 본 실험에서 8세포기, 상실배기의 경우 control군과 chilling군사이의 배반포의 세포수에 차이가 낮지만, 배반포의 경우 chilling과 control의 경우 세포수에 유의적 차이가 나타나지 않았다. chilling그룹이 세포수가 낮은 경향이 있는것은 세포손실을 입었거나, 분할능력이 떨어져 세포수가 적은 것으로 사료된다.

참고문헌

- Leibo SP: Cryobiology- Preservation of mammalian embryos. In: Genetic Engineering of Animals (Evans, J.W. and A. Hollaender. eds) New York: Plenum 1986; pp. 251-272
- Gordon I: Laboratory Production of Cattle Embryos, 1st edn. CAB International Wallingford Oxon, UK. 1994 pp. 295-297
- Morris GJ, Watson PF: Cold shock injury - A comprehensive bibliography. CryoLetters 1984;5:352-372
- Mazur P, Schneider U, Mahowald P: Characteristics and Kinetics of subzero chilling injury in Drosophila embryos. Cryobiology 1992;29:39-68
- Zhang T, Rowson DM: Studies of chilling sensitivity of Zebra fish (*Brachydanio rerio*) embryos. Cryobiology 1995;32: 239-246
- Gordon I: Laboratory Production of Cattle Embryos, 2nd edn. CAB International Wallingford Oxon, UK. 2003; pp.277
- Kasai M: Nonfreezing technique for short-term storage of mouse embryos. J. In Vitro Fertilization and Embryo Transfer 1986;3:10-14
- Leibo SP, Loskutoff NM: Cryobiology of in vitro derived bovine embryos. Theriogenology 1993;39:81-94.
- Trounson AO, Willadsen SM, Rowson LEA: The storage of cows eggs at room temperature and at low temperatures. J Reprod Fertil 1976a;146:173-178.
- Trounson AO, Willadsen SM, Rowson LEA: The influence of in vitro culture and cooling on the survival and development of cow embryos. J Reprod Fertil 1976b;47:367-370
- Richards DW, Sibes JD, Murphy CN: Non surgical transfer and survival of frozen-thawed bovine embryos supplemented with raffinose. Theriogenology 1988;21:138-149
- Mohr LR, Trounson AO: Structural changes associated with freezing of bovine embryos. Biol Reprod 1981;25:1009-1025
- Pollard JW, Leibo SP: Chilling sensitivity of mammalian embryos. Theriogenology 1994;41:101-106
- Hoshi H: In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. Theriogenology 2003;59:675-685
- Looney CR, Westhusin ME, Bondioli, KR: Effect of cooling temperatures on precompacted bovine embryos.

Theriogenology 1989;31:218 (Abstr).

Wilmot I, Polge C, Rowson LEA: The effect on cow embryos of cooling to 20°, 0° and -196°C. J Reprod Fertil 1975;45:409-411

Abe H, Hoshi H: Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. J Reprod Dev 2003;49:193-202

3-4. 체외 성숙 시, cysteamine의 첨가가 소 난자의 저온 감수성 및 수정란의 발달에 미치는 영향

EFFECT OF CYSTEAMINE SUPPLEMENTATION OF *IN VITRO* MATURED BOVINE OOCYTES ON CHILLING SENSITIVITY AND DEVELOPMENT OF EMBRYOS

Abstract

In vitro techniques for production of bovine embryos including *in vitro* oocyte maturation (IVM), fertilization (IVF) and culture (IVC) are becoming increasingly employed for a variety of research purposes. However, decreased viability following cryopreservation by conventional methods has limited commercial applications of these technologies. A practical alternative to facilitate transport would be to arrest development by chilling without freezing. The present research was undertaken to evaluate chilling sensitivity of IVM-IVF embryos at different stages of development, and to determine possible beneficial effects of cysteamine treatment during IVM, previously shown to enhance embryo development in culture, on survival following chilling at different stages. Embryos produced by standard IVM-IVF-IVC methods were chilled to 0°C for 30 minutes at 2-cell (30-34 hour post-insemination, hpi), 8-cell (48-52 hpi), or blastocyst (166-170 hpi) stages. Viability after chilling was assessed by IVC with development to expanded blastocyst stage determined on days 7 and 8 post insemination (pi), and hatching blastocyst stage determined on days 9 and 10 pi. Control embryos at the same stages were handled similarly, but without chilling, and development during culture similarly assessed. The effect of cysteamine supplementation (100 M) of the IVM medium was determined for both chilled and non-chilled (control) embryos. Cysteamine supplementation during IVM had no significant effect on oocyte maturation or fertilization, but increased the proportions of oocytes developing to blastocyst stage by day 7 (13.7±0.9% vs 7.2±0.9%; $P<0.05$), total blastocysts (20.5±0.9% vs 15.3±1.3%; $P<0.05$), and hatching blastocysts (16.8±1.6% vs

12.0±1.5%; $P<0.05$). The high survival following chilling of blastocysts produced by IVM-IVF of oocytes matured in media supplemented with cysteamine offers promise as a viable alternative to freezing for commercial applications requiring short-term storage to facilitate transport of *in vitro* produced bovine embryos.

서론

체의 성숙 난자의 생산율은 증가하고 있으며, 상업적으로 널리 이용되고 있다. 그러나 효과적이고 이용하기 쉬운 보존 방법은 아직 확립되어 있지 않기 때문에, 난자에 치명적인 손상이 없으며, 운반이 용이한 동결방법에 대하여 많은 연구가 진행되고 있다. 따라서 0°C - 5°C로 냉각 시키는 방법과 상온에 저장하는 방법에 대해서 많은 연구가 진행되고 있다 (Gordon, 1994, 2003).

Damoulin 등은 1992년에 hypotaurine 과 taurine(산화된 hypotaurine)이 수정란의 발달에 긍정적인 효과를 낸다고 보고하였다. Cysteamine은 hypotaurin의 전구 물질이며, 체외에서 산화작용에 의하여 hypotaurine으로 바뀐다 (Huxtable, 1992). 소 수정란의 체외 배양 미디어인 TCM-199에서 cysteine의 양은 아주 낮고, cystine의 양이 훨씬 많다 (Cysteine, 0.6 M; Cystine, 83.2 M) (Morgan et. al., 1950). 이러한 낮은 cysteine의 양은 배양액 속의 cysteine이 산화되어 cystine으로 바뀌기 때문이다(Mohindru et. al., 1985).

활성산소를 통하여 세포성분이 산화되는 것은 정상적인 세포의 기능을 손상시키는 위험한 변화이다.(Del corso and Mura, 1994). mercaptoethanol 와 cysteamine은 cystin을 감소시키며, glutathione(GSH) 합성을 향상시키는 cysteine을 증가시킨다(Bannai, 1984; Issels et. al., 1988). De Matos et al., (1995, 1996)은 cysteamin과 같은 티올성분을 체외 성숙 배양액에 첨가하는 것은 GSH합성을 촉진하여 배반포 발달율을 높인다고 보고하였다. 이전 연구에서 ,2세포기와 4세포기에서는 동결 후 해동하였을 때 발달하지 않았지만, 8세포기, 상실배기, 배반포기에서 각각 28%,48%,68%의 비례하는 발달율을 얻었다. 그리고 동결 해동 후 배반포가 된 수정란은 세포수가 적었는데 이것은 동결이 해로운 영향을 미쳤기 때문이다 (Balasubramanian et. al., 1998).

따라서 실험은 체외성숙 미디어에 cysteamine 첨가가 전핵형성, 분할율, 발달율, 다

른 단계에서 동결한 후의 발달율에 어떠한 영향을 미치는지에 대하여 알아보았다.

재료 및 방법

배양액

Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)에서 구입된 시약 및 배양액을 본 실험에 공시하였다.

체외 성숙, 수정 및 배양

1등급 난자를 주사기의 음압을 이용하여 채취한 다음 성숙배양액에서 22-24시간 성숙시켰다. 난자성숙 배양액 (IVM)은HEPES가 들어있는M199미디어(Earle's salts; Canadian life Technologies, Burlington, Ontario)에 sodium bicarbonate (2.2g/L), sodium pyruvate (110 mg/L), Penicillin (3,000 IU/L) Streptomycin (3,000 μ g/L) and 10% Steer Serum (SS, CanSera Inc. Rexdale, Ontario, Canada) 을 첨가하고 100 μ M의 cysteamine이 들어있는 군과 들어있지 않은 군으로 나누어 실험을 하였다.

체외성숙 후 난자 주변의 난구세포를 제거한 다음 IVF-TALP 미디어 드랍에 옮겨 놓는다. 동결 정액을 ml당 2×10^6 개가 되도록 넣고 20-24시간 수정시킨다. 이때 소난관상 피세포 (이하 BOEC)와 공배양한다. BOEC 회수법은 Rieger et al (1995)의 방법을 따랐다.

혈청이 들어가 있지 않은 IVC 미디어(혈청이 들어가 있지 않은 M199미디어에 0.1% polyvinyl alcohol 을 첨가)에 BOEC를 공배양하여 48시간 후 분할율을 확인한다. 체외성숙, 수정, 배양시에 50 μ l드랍에 20개의 난자를 사용한다. 멸균된 오일(Dow Corning, Midland, MI)을 배양액 위에 사용한다.

실험 디자인

1. 체외 성숙 미디어의 cysteamine 첨가가 소 난자의 전핵 형성에 미치는 영향

난구세포를 벗겨낸 난자를 ethanol 과 acetic acid (3:1[v/v])에 48시간동안 고정시킨 후, 1% aceto-lacmoid로 염색하여 위상차 현미경을 사용하여 관찰한다.

2. 체외성숙 미디어의 cysteamine 첨가가 분할율 및, 배반포 발달율에 미치는 영향

수정 후, 2일 후 분할율을, 7일과 8일 후 배반포 발달율을 관찰한다. 배반포는 2일

더 배양하여 9일과 10일에 세포수를 관찰한다.

3. cysteamine 첨가가 다른 발달 단계의 소난자의 동결 감수성에 미치는 영향

수정 후 30-34시간 에 2세포기를, 수정후48-52시간에 8세포기를, 수정 후 166-170시간에 배반포를 한개씩 회수하여, cysteamine함유의 유무에 따라 군을 나누고, 동결한다. 동결은 스트로에 programmable freezer (BioCool III FTS systems, Stone Ridge, NY)를 이용하여 30분 동안 0°C 에 둔다. 동결 하는 시간동안 대조군은 D-PBS, 38.5°C , 5% CO₂ 환경 하에 둔다.

동결이 끝난 후 5초 동안 따뜻하게 한 다음 35°C 워터베이스에서 15초 동안 녹인다. 그리고 IVC미디어로 옮긴다. 24시간의 간격을 두고 7,8,9,10일에 각각 배반포율을 기록한다.

4. 다른 발달 단계의 소 난자를 동결 하였을 때 배반포율에 미치는 영향

동결 방법은 3번에서 설명한 것과 같다. 2세포기와 8세포기에서 동결하여 배양한 8일째 확장 배반포를 회수하여 1% sodium citrate solution에 4분간 둔다. Grease-free glass slide에 옮긴 후, acetic acid and methanol (1:1) 용액을 슬라이드에 뿌리고 마를 때 까지 부드럽게 붙여준다. 그 그 슬라이드를 acetic acid:methanol(1:3) 용액에 두고 4°C 에서 하루동안 둔다. 4% Giemsa 염색을 하여 위상차 현미경을 이용하여 세포수를 관찰한다.

통계처리

전핵 형성과 배반포의 발달율은 one way analysis of variance (ANOVA)를 사용하였고, 처리군의 평균은 Tukey-Kramer multiple comparisons test를 사용하였다. P값이 0.05이상일때 유의적 차이가 있다고 인정하였다.

결과 및 고찰

1. Cysteamine supplementation to IVM medium on PN formation

표1은 체외 성숙 미디어의 cysteamine 첨가가 소 난자의 전핵 형성에 미치는 영향에 대한 결과를 나타내었다. 100 uM의 cysteamine 을 성숙 미디어에 첨가하는 것은 난자의 성숙과 수정에 유의적인 차이를 나타내지 않는다. Cysteine 혹은 cystine 첨가에 관계없이, 자동산화 때문에 cysteine이 사라진다 (Bannai,1984;Sagara et.al.,1993). Yoshida et

al.,(1993)은 난자의 GSH는 정자의 응축을 막아 준다고 하였다.(Grupen,et.al.,1994) 하지만, 본 실험에서는 별다른 영향을 미치지 않았다.

Table 1. Effect of cysteamine supplementation during *in vitro* maturation on pronuclear formation

Hour post insemination (hpi)	Treatment	Oocytes used	Fertilization status (% mean±SD)*			
			Unfertilized	1PN/Decon	2PN	3PN
12	Cys	83	14 (16.9±2.8)	33 (39.8±6.5)a	36 (43.4±4.3)a	-
	Cys	65	13 (20.0±4.5)	26 (40.0±4.2)a	25 (38.5±4.4)a	1 (1.5±2.8)
18	Cys	73	14 (19.2±4.6)	12 (16.4±1.7)b	46 (63.0±5.0)b	1 (1.4±2.4)
	Cys	88	17 (19.3±1.8)	20 (22.7±5.1)b	50 (56.8±3.1)b	1 (1.1±1.8)

Superscripts within columns differ significantly; *P* 0.05.

*Unfertilized, unfertilized eggs; 1PN/Decon, eggs with one pronucleus and decondensed sperm; 2PN, eggs with two pronuclei; 3PN, eggs with three pronuclei.

2. Cysteamine supplementation to IVM medium on embryo development

표 2는 체외성숙 미디어에 100M cysteamine 첨가가 분할율 및, 배반포 발달율에 미치는 영향이다. 각 군별로 분할율에는 차이가 없었지만, 배양후 배반포로의 발달율에는 cysteamine을 첨가한 군이 유의적으로 높은 발달율을 보였다. De Matos et al.(2002)은 EGF 나 cysteamine이 성숙 미디어의 수정과 발달, 동결에 영향을 미치지 않는다고 하였다(Oyamada and Fukui,2004). 하지만 본 실험에서는 100M Cysteamine 을 첨가한 군이 분할율에는 유의적인 차이가 없었지만, 배반포로의 발달율은 유의적으로 높았다.

Table 2. Effect of cysteamine supplementation during *in vitro* maturation on cleavage and blastocyst development

Treatment*	Oocytes used	Cleaved	Blastocyst development (% mean±SD)			Hatched Blastocyst (%)
			Day 7	Day 8	Total	
IVM - Cys	333	241				
		(72.4±4.1)	24 (7.2±0.9)a	27 (8.1±1.7)	51 (15.3±1.3)a	40 (12.0±1.5)a
IVM + Cys	322	249	44	22	66	54
		(77.3±2.5)	(13.7±0.9)b	(6.8±1.2)	(20.5±0.9)b	(16.8±1.6)b

Superscripts within columns differ significantly; P 0.05.

*IVM - Cys, oocytes matured in TCM199 in the absence of cysteamine; IVM + Cys, oocytes matured in TCM199 in the presence of 100 M cysteamine.

3. Cysteamine supplementation to IVM medium on chilling sensitivity

표3은 cysteamine 첨가가 다른 발달 단계의 소난자의 동결 감수성에 미치는 영향을 나타낸 결과이다. 동결 후 배양한 수정란을 비교군을 100으로 하였을 때 각각 2세포기, 8세포기, 배반포기 단계에서 24.2%, 36.3%, 90.2%의 발달율을 얻었다. Leibo and Loskutoff(1993)은 배양 미디어는 발달을 뿐만 아니라, 동결후의 생존율에도 영향을 미친다고 하였다. 본 실험은 GSH를 높이고 티올성분을 낮추었을 때 수정과 후기 발달에 긍정적인 영향을 준다고 한 Matos et al(1995)과 동일한 결론을 얻었다.

Table 3. Effect of cysteamine supplementation in IVM medium on chilling sensitivity of different developmental stages of in vitro produced bovine embryos

Embryo stage	Treatment*	Group	Embryos used	No. (mean±SD) of embryo that developed into				Normalized survival (%)
				Expanded Blastocyst		Hatched Blastocyst		
				n	%	n	%	
2 - Cell	IVM - Cys	Control	91	36	39.2±4.7a	29	31.4±5.2a	100
		Chilled	91	1	1.1±1.9c	0	0	0
	IVM + Cys	Control	98	48	49.1±6.9a	37	37.8±7.2a	100
		Chilled	98	11	11.0±5.5b	9	9.1±6.7b	24.2
8- Cell	IVM - Cys	Control	78	34	43.6±7.2a	25	32.0±5.8a	100
		Chilled	78	12	15.4±4.7b	9	11.5±4.4b	35.9
	IVM + Cys	Control	82	40	48.7±7.1a	33	40.2±6.3a	100
		Chilled	82	15	18.3±4.3b	12	14.6±4.0b	36.3
Blastocyst	IVM - Cys	Control	68	-	-	57	83.8±7.3c	100
		Chilled	68	-	-	40	58.8±7.9d	70.2
	IVM + Cys	Control	70	-	-	61	87.1±6.2c	100
		Chilled	70	-	-	55	78.6±7.0c	90.2

Superscripts within column differ significantly; P 0.05

*IVM - Cys, oocytes matured in TCM199 in the absence of cysteamine; IVM + Cys, oocytes matured in TCM199 in the presence of 100 M cysteamine.

4. Effect of chilling sensitivity at different developmental stages on blastocyst cell number

표4는 다른 발달 단계의 소 난자를 동결 하였을 때 배반포율에 미치는 영향이다. 비교군과 비교하여 cysteamine의 첨가에는 유의적인 차이는 없었지만, 2세포기와 8세포기

에서는 비교군과 동결군 사이에 유의적인 차이가 나타났다. 착상 전 배아에 있어서 세포 수는 생존성과 외형적인 건강함을 나타내 주는 지표이다. (Papaionnou and Ebert,1986). 수정란의 발달 단계는 동결후 발달에 영향을 미치지 않지만, cysteamine의 첨가는 영향을 미치지 않았다.

Table 4. Comparison of blastocyst cell number from different developmental stage bovine embryos after chilling

Embryo stage	Treatment*	Group	Embryos used	Cell number (mean±SEM)	
				Day 8	Day 9
2 - Cell	IVM - Cys	Control	32	169.8 ± 6.9a	-
		Chilled	-	-	-
	IVM + Cys	Control	43	170.7 ± 6.7a	-
		Chilled	12	126.8 ± 14.9b	-
8- Cell	IVM - Cys	Control	28	163.0 ± 5.3a	-
		Chilled	8	110.0 ± 7.2b	-
	IVM + Cys	Control	30	172.7 ± 5.5a	-
		Chilled	14	116.1 ± 4.6b	-
Blastocyst	IVM - Cys	Control	36	-	188.6 ± 3.0
		Chilled	28	-	178.8 ± 4.9
	IVM + Cys	Control	30	-	191.1 ± 4.5
		Chilled	26	-	185.2 ± 4.2

Superscripts within column differ significantly; P 0.05

*IVM -Cys, oocytes matured in TCM199 in the absence of cysteamine; IVM + Cys, oocytes matured in TCM199 in the presence of 100 M cysteamine.

결론적으로 소 난자를 체외 배양 할 때 cysteamine의 첨가는 분할율에는 영향을 미치지 않지만, 수정란의 발달율과, 동결 용해후의 생존율과 동결 저항성을 높인다. 그러나 본 연구는 성숙 시에만 cysteamine의 첨가에 대하여 알아본 것이기에 후속연구에는 수정 및 배양 단계에서의 cysteamine의 영향에 대한 조사가 수행되어야 할 것이다.

참고문헌

- Balasubramanian, S., Rho, G.J., Leibo, S.P., 1998. Effect on development of chilling in vitro produced bovine embryos at various cleavage stages. *Theriogenology*. 49,162 Abstr.
- Bannai, S.,1984. Transport of cystine and cysteine in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Acta*. 779, 289-306.
- Del corso, A., Cappiello M Mura, U.,1994. Thiol dependent oxidation of enzymes : The last chance against oxidative stress. *Int. J. Biochem*. 26, 745-750.
- de Matos, D.G., Furnus, C.C., Moses, D.F., Baldassarre, H.,1995. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro. *Mol. Reprod. Dev*. 42, 432-436.
- de Matos, D.G.,Furnus, C.C., Moses, D.F., Martinez, A.G., Matkovic, M., 1996. Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol. Reprod. Dev*. 45, 451-457.
- de Matos, D.G., Herrera, C., Cortvrindt, R., Smitz, J., Van Soom, A., Nogueira, D., Pasqualini, R.S., 2002. Cysteamine supplementation during in vitro maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine in vitro embryo production. *Mol. Reprod. Dev*. 62, 203-209.
- Damoulin, J.C.M., Evers, J.L.H., Bras, M., Pieters, M.H.E.C., Geraeldts, J.P.M.,1992. Positive effect of taurine on preimplantation development of mouse embryos in vitro. *J. Reprod. Fertil*. 94, 373-380.
- Gordon, I., 1994. *Laboratory production of Cattle Embryos*, 1st edn, CAB International Wallingford Oxon, UK. pp 295-297.
- Gordon, I., 2003. *Laboratory production of Cattle Embryos*, 2nd edn, CAB International Wallingford Oxon, UK. pp 277-282.
- Gruppen, C.G., Nagashima, H., Nottle, M.B., 1994. Cysteamine enhances synchronous pronuclear formation in porcine oocyte matured and fertilized in vitro. *Proceedings of the 26 th annual conference of the Australian Society for Reproductive Biology*, Brisbane, Australia. Sept. 26-28.

- Huxtable, R.J., 1992. Physiological actions of taurine. *Physiol. Rev.* 72, 101-163.
- Issels, R.D., Nagele, A., Eckert, K.G., Wilmanns, W., 1988. Promotion of cystine uptake and its utilization for glutathione biosynthesis induced by cysteamine and N - acetyl-cysteine. *Biochem. Pharmacol.* 37, 881-888.
- Leibo, S.P., Loskutoff, N.M., 1993. Cryobiology of in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology* 39, 81-94.
- Mohindru, A., Fisher, J.M., Rabinovitz, M., 1985. Endogenous copper is cytotoxic to a lymphoma in primary culture which requires thiols for growth. *Experientia.* 41, 1064 -1066.
- Morgan, F.J., Mortan, J.H., Parker, C.R., 1950. Nutrition of animal cells in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 73, 1-8.
- Oyamada, T., Fukui, Y., 2004. Oxygen tension and medium supplements for in vitro maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. *J. Reprod. Dev.* 50,107-117
- Papaionnou, V.E., Ebert, K.M., 1986. Development of fertilized embryos transferred to oviducts of immature mice. *J. Reprod. Fertil.* 76, 603-608.
- Rieger, D., Grisart, B., Semple, E., Van Langendonck, A., Betteridge, K.J., Dessy, F., 1995. Comparison of effects of oviductal cell co-culture and oviductal cell-conditioned medium on the development and metabolic activity of cattle embryos. *J. Reprod. Fertil.* 105, 91-98.
- Sagara, J., Miura, K., Bannai, S., 1993. Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and in suspension. *J. Neurochem.* 61, 1667-1671.

3-5. 무혈청 배지에서 생산한 소배반포의 향상된 동결감수성

Enhanced Cryosurvival of Bovine Blastocysts Produced In Vitro in Serum-Free Medium

Abstract

Culture systems affect the development of IVP embryos and consequently their cryosurvival potential. The viability of post-thawed bovine IVP embryos developed from IVM/IVC medium in the presence or absence of serum was compared. Cumulus-oocyte complexes were matured in IVM medium supplemented with or without serum. Some oocytes were evaluated for nuclear maturation status and others were inseminated with semen. Presumptive zygotes were cultured in IVC medium supplemented with or without serum for 9 days. Blastocysts were cryopreserved with 1.5 M ethylene glycol in PBS. No difference was observed in the nuclear maturation status and cleavage rates in both groups, but significantly ($P < 0.05$) higher in blastocyst rates in the serum-supplemented group. After freezing, survival of blastocysts was higher in the serum-free group. At 36 h culture after thawing, blastocysts developed without serum had significantly ($P < 0.05$) higher cell number than those cultured with serum. We conclude that serum-free culture system enhances the viability of frozen-thawed bovine embryo

서론

소의 체외수정란 생산 기술은 다양한 배양액 조성과 배양조건을 이용하여 배반포 발달을 유도하는데 있어 획기적인 발전을 이루었다(Pinyopummintr et al., 1991; Shamsuddin et al., 1993). 소 수정란은 주로 혈청이 첨가된 배양액에서 체세포와 공배양을 한다. 그러나 혈청 자체의 불확실한 조성에도 불구하고, 소태아혈청(fetal calf serum, FCS)을 첨가하는 방법이 널리 사용되고 있다. 소 수정란의 발달에 대한 혈청의 양면성은 익히 보고된 바 있으며(Bavister BD, 1995), 반면 소 혈청 알부민(bovine

serum albumin, BSA) 중 몇몇은 수정란 발달을 개선 혹은 억제한다고 알려져 있다 (Gray et al., 1992). 동결 수정란을 이용하여 처음으로 송아지가 태어난 이후(Wilmot et al., 1973), 체내 수정란의 동결 분야에 있어 획기적인 발전이 있었다. 체외 배양(in vitro culture, IVC)중 혈청을 첨가하는 것은 수정란 동결 시, 그 결과에 영향을 미친다고 할 수 있겠다. 최근, 동결 후 체외수정란의 생존율 향상을 위해 많은 노력을 하고 있으며, 주로 소 수정란에 있어 활발한 연구가 이루어지고 있다(Leibo et al., 1993; Suzuki et al., 1993). BSA, insulin, transferrin과 selenium이 첨가된 M199 배양액을 사용하였을 경우, estrous cow serum(ECS) 단독 혹은 oviductal epithelial cells (BOEC)과 공배양 시 보다 동결 용해 후 생존율이 높았다는 보고가 있다(Dinneys et al., 1996). 체외성숙 및 수정을 통해 소 배반포를 생산하는데 있어 다양한 종류의 배양액을 이용할 수 있지만, 배반포의 형태, 세포수 및 동결 후 생존성과 같은 면에서 많은 차이를 보인다고 한다(Leibo et al., 1993; Voelkel et al., 1992; Rosenkrans et al., 1993). 게다가, 체내 수정란에 적용할 경우 높은 생존율을 보이는 동결방법이라 할지라도 체외 수정란에 있어서는 저조한 결과를 나타내었다(Leibo et al., 1993; Rosenkrans et al., 1993). 이는 수정란 발달 동안의 배양조건이 동결 후 생존에 중요한 영향을 미친다고 볼수 있다.

그러므로, 배양조건을 개선함으로써 동결 시 체외수정란의 손상을 줄일 수 있으며 (Semple et al., 1995), 동결 후 다양한 조건하에서 배양하였을 경우 배반포의 질에 있어 명확한 차이가 있다고 한다(Shamsuddin et al., 1993; Voelkel et al., 1992; Takahashi et al., 1992). 최근 Yamashita et al.(1999)은 무혈청 배지를 사용하여 체외 성숙/수정 난자로 부터 소 배반포 형성율과 질을 향상시킬 수 있다고 보고하였다.

따라서, 체외 성숙 및 배양 시 혈청의 유무에 따른 배반포 발달율과 동결 용해 후, 수정란의 생존율을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

배양액

Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)에서 구입된 시약 및 배양액을 본 실험에 공시하였다. 난자성숙 배양액 (IVM)은 2.5 mM sodium pyruvate, 1 mM L-glutamine, 1.0% (v/v) penicillin-streptomycin (10,000 IU and 10,000 g/mL,

respectively; Pen-Strep; GIBCO), 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL), 10 g/mL FSH, 10 g/mL LH, and 1 g/mL estradiol 17 함유된 TCM199를 이용하였다. Albumin, lactate, pyruvate 가 함유된 Tyrode's medium으로 Hepes-TALP 및 IVF-TALP)를 만들었고, 수정란 배양액으로는 modified Eagle medium (MEM) non-essential amino acids, 0.4 mM sodium pyruvate, 1 mM L-glutamine 및 50 g/mL gentamycin이 함유된 synthetic oviduct fluid medium (SOF) 배양액을 이용하였다. 모든 배양액은 pH 7.4 그리고 삼투압 280 mOsm/kg.로 보정하여 사용하였다.

난자의준비

도축장 유래 난포란을 수집하였고, 15개의 COCs를 IVM 배양액 50 uL drops에 넣고 39C, 5% CO₂ 배양기에서 배양시켰다. 이때 10% FCS를 첨가한 군과 첨가하지 않은 군으로 나누어 배양시킨다. 22시간 후, 3% sodium citrate를 이용하여 vortexing한 후, 기계적으로 난구세포를 제거한 뒤, 1% aceto-orcein염색법으로 핵의 상태를 확인한다. 우선, 24시간 동안, aceto-methanol(acetic acid:methanol, 1:3, v/v)로 고정한 뒤, 1% aceto-orcein을 사용하여 염색을 한다. 위상차 현미경으로 400배율하에서 핵의 상태를 관찰한다.

수정란의 체외생산

체외수정란 생산은 Ali and Sirard, (2002) 방법을 이용하였고, 정자의 준비는 Rosenkrans et al. (1993)의 방법대로 하였다. 배양 22시간 째에 난구세포를 제거하고 2 X 10⁶개/ml의 농도로 수정을 시킨 다음, 10% FCS가 첨가 혹은 첨가되지 않은 IVC 배양액에 배양을 한다. 48 및 120시간째에 신선한 IVC배양액 25ul를 첨가한 뒤, 수정 후 192시간째에 배반포 발달을 및 세포 수를 확인한다.

난자동결

수정 후 192시간 째, Semple et al.(1995)의 방법으로 배반포를 동결하였다. 0.25mL plastic straw를 이용하여 수정란을 넣은 뒤, freezer control (BIOGENICS CL863, USA)를 이용하여 초기에는 7℃에서 10분동안 평형을 시키고, -7℃에서 -35℃사이는 분당 -0.6℃의 냉

각속도로 동결한 후, 액체질소에 담근다. 동결된 straw는 공기 중에서 5초간, 37°C에서 15초간 용해한 뒤, 36시간 동안 동결 용해한 배반포를 배양한다.

Differential Staining

전체 세포 수에 대한 inner cell mass(ICM)의 비율 관찰은 Papaioannous와 Ebert의 방법(1988)에 따라 시행했다. ICM은 푸른 색으로 trophoblast는 분홍색으로 관찰된다.

통계처리

처리군 간의 생존율 및 ICM 세포 수의 차이는 arcsine transformation 후, one-way ANOVA 로 실시하였고, 비교분석은 Tukey-Kramer multiple comparisons test 를 이용하였다. $P < 0.05$ 일때 유의적 차이를 인정하였다.

결과 및 고찰

Effect of Serum on the nuclear maturation of bovine oocytes

표 1은 소 난자를 혈청이 첨가된 M199배지 혹은 첨가되지 않은 배지에서 성숙시킨 후의 핵상태를 나타낸 것이다. 혈청 유무에 관계없이 metaphase II단계는 79과 72%로 유의적인 차이가 없었다. 이는 소 난자의 성숙 시, 혈청 첨가가 필수적이 아님을 시사한다.

Table 1. Nuclear Status of Bovine Oocytes Matured in M199 Supplemented With or Without Serum for 22 h^a

Serum ^b	Oocytes (n)	Nuclear status (%) ^c			
		MI	AI-TI	MII	Degenerated
+	82	11 (13.4)	2 (2.4)	65 (79.2)	4 (4.8)
-	85	9 (10.5)	8 (9.4)	61 (71.7)	9 (10.5)

^a Results of four replicates.

^b +, supplemented with 10% FCS; -, supplemented without 10% FCS.

^c MI, Metaphase I; AI-TI, Anaphase I-Telophase I; MII, Metaphase II.

Effect of Serum on the development of IVP bovine embryos

표 2는 성숙 및 배양 시 혈청의 첨가가 체외 수정란의 발달에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 혈청 첨가 유무에 관계없이 분할율은 유의적인 차이가 없었으며(59~69%), 체외 성숙 시, 혈청의 첨가는 배반포 발달율에 영향을 미치지 않았다. 반면 IVC에만 첨가한 군이 무혈청 군에 비해 배반포 발달율에 있어 유의적으로 높은 결과를 보였다(21 and 20% vs. 13 and 9%).

표 3은 배양 조건을 다르게 하여 얻은 8일째 배반포의 총세포 수와 ICM 세포 수를 나타낸 것이다. 체외 성숙 시, 혈청의 유무에 관계없이 세포 수는 차이가 없었으나, IVC에 혈청을 첨가한 군이 무혈청으로 배양한 군보다 유의적으로 높은 세포 수를 보였다. ICM의 세포 수에 있어서는 유의적인 차이가 없었다.

Table II. Development of IVP Bovine Embryos Cultured in M199 Supplemented With or Without Serum^a

Serum ^b		Oocytes (n)	Development (%)	
IVM	IVC		Clearage	Blastocysts ^c
+	+	374	257 (68.7)	55 (21.4) ^a
+	-	362	215 (59.3)	27 (12.5) ^b
-	+	376	247 (65.6)	49 (19.8) ^a
-	-	362	225 (62.1)	21 (9.3) ^b

^a Results of six replicates.

^b +, supplemented with 10% FCS; -, supplemented without 10% FCS.

^c Values with different superscripts (a, b) in the same column were significantly different ($P < 0.05$).

Table III. Total Cell Number and ICM Ratio of Day-8 Blastocysts Cultured in M199 Supplemented With or Without Serum

Serum ^a		Embryos (n)	Cell number (Mean \pm SEM) ^b			Percent of ICM
IVM	IVC		Total	ICM	TE	
+	+	14	120 \pm 6	19	101	15.8
+	-	15	105 \pm 7	24	81	22.8
-	+	10	118 \pm 5	20	98	16.9
-	-	12	103 \pm 4	22	81	21.3

^a +, supplemented with 10% FCS; -, supplemented without 10% FCS.

^b ICM, inner cell mass; TE, trophoblasts.

Effect of serum on the survivability of frozen-thawed blastocyst

표 4는 동결 용해한 후, 배반포의 생존성에 대한 혈청의 영향을 나타낸 것으로 수정란 배양 시 혈청을 첨가하지 않은 군의 생존성이 유의적으로 높았다(76, 78% vs. 51, 56%). Dorland et al.(1994)는 FCS가 미토콘드리아의 구조에 부정적인 영향을 미쳐, 정상적으로는 미토콘드리아에 의해 대사되는 지질들이 축적되게 된다고 보고하였으며, 이러한 지질의 함량이 높은 수정란의 경우, 동결 시 손상을 쉽게 받는다고 보고하였다(Leibo et al., 1993; Mohr et al., 1981). 따라서 체외 수정란의 동결 시, 무혈청 배양 조건이 적절하다고 결론 내릴 수 있다.

표 5는 배양 조건을 달리하여 얻은 배반포를 동결, 용해하였을 때, 총 세포수와 ICM 세포수의 비율을 나타낸 것으로, 용해한 뒤 36시간동안 배양한 결과, 무혈청 IVC 배양이 혈청을 첨가하였을 때보다 유의적으로 세포수가 많았으나, ICM 세포수에 있어서

는 차이가 없었다.

Table IV. Survivability of Frozen-Thawed Blastocysts Cultured in M199 Supplemented With or Without Serum

Serum ^a		Embryos ^b (n)	No. of (%) blastocysts hatched ^c
IVM	IVC		
+	+	49	25 (51.0) ^a
+	-	25	19 (76.0) ^b
-	+	32	18 (56.3) ^a
-	-	32	25 (78.1) ^b

^a +, supplemented with 10% FCS; -, supplemented without 10% FCS.

^b Cultured for more 24 h post thawing of Day-8 blastocysts.

^c Values with different superscripts (a, b) in the same column were significantly different ($P < 0.05$).

Table V. Total Cell Number and ICM Ratio Following 36-h Culture of Frozen-Thawed Day-8 Blastocysts Cultured in M199 Supplemented With or Without Serum

Serum ^a		Embryos ^b (n)	No. of cells (Mean \pm SEM) ^c			Percent of ICM
IVM	IVC		Total ^d	ICM	TE	
+	+	16	159 \pm 4 ^a	24	135	15.0
+	-	15	177 \pm 7 ^b	38	139	21.4
-	+	15	151 \pm 2 ^a	25	126	16.5
-	-	15	180 \pm 5 ^b	39	141	21.0

^a +, supplemented with 10% FCS; -, supplemented without 10% FCS.

^b Cultured for more 36 h post thawing of Day-8 blastocysts.

^c ICM, inner cell mass; TE, trophoblasts.

^d Values with different superscripts (a, b) in the same column were significantly different ($P < 0.05$).

이 상의 결과로 무혈청 배양액을 사용하는 것은 배반포 발달율은 저하시키지만, 형태 및 세포수, 동결에 대한 저항성을 개선하는 효과를 얻을 수 있었다.

참고문헌

- Ali A, Sirard MA, 2002: Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. *Biol Reprod* 66:901-905.
- Pinyopummintr T, Bavister BD: In vitro-matured/in vitro-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. *Biol Reprod* 1991;45:736-742.
- Shamsuddin M, Larsson B, Gustafsson H, Roderiguez-Martinez H: In vitro development up to hatching of bovine in vitro-matured and fertilized oocytes with or without support from somatic cells. *Theriogenology* 1993;39:1067-1097.
- Bavister BD: Culture of preimplantation embryos: Facts and artifacts. *Hum Reprod* 1995;1:91-148.
- Gray CW, Morgan PM, Kane MT: Purification of an embryotrophic factor from commercial bovine serum albumin and its identification as citrate. *J Reprod Fertil* 1992;94:471-480.
- Wilmot I, Rowson LE: Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet Rec* 1973;92:686-690.
- Leibo SP, Loskutoff NM: Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology* 1993;39:81-94.
- Suzuki T, Takagi M, Yamamoto M, Boediono A, Saha S, Sakakibara H, Oe M: Pregnancy rate and survival in culture of in-vitro fertilized bovine embryos frozen in various cryoprotectants and

- thawed using a onestep system. *Theriogenology* 1993;40:651-659.
- Dinnyes A, Carolan C, Lonergan P, Massip A, Mermillod P: Survival of frozen or vitrified bovine blastocysts produced in vitro in synthetic oviduct fluid. *Theriogenology* 1996;46:1425-1439.
- Voelkel SA, Hu YX: Effect of gas atmosphere on the development of one-cell bovine embryos in two culture systems. *Theriogenology* 1992;37:1117-1131.
- Rosenkrans CF, Zeng GQ, McNamara GT, Schoff PK, First NL: Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biol Reprod* 1993;49:459-462.
- Semple ME, Betteridge KJ, Leibo SP: Cryopreservation of in vitro-derived bovine embryos produced in a serum-free culture system. *Theriogenology* 1995; 43:320.
- Takahashi Y, First NL: In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 1992;37: 963-978.
- Yamashita S, Abe H, Itoh T, Satoh T, Hoshi H: A serum- free culture system for efficient in vitro production of bovine blastocysts with improved viability after freezing and thawing. *Cytotechnology* 1999;31:123-131.
- Dorland M, Gardner DK, Trounson AO: Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in ovine embryos. *J Reprod Fertil* 1994;13:25.
- Mohr LR, Trounson AO: Structural changes associated with freezing of bovine embryos. *Biol Reprod* 1981;25:1009-1025.

3-6. 다양한 활성화 처리방법이 소 난자 세포질내 정자주입술의 발달율에 미치는 영향

DIFFERENT ACTIVATION REGIMENS FOR SUCCESSFUL DEVELOPMENT OF BOVINE EMBRYOS PRODUCED BY INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION (ICSI)

Abstract

In this study, developmental capacity and cytogenetic composition of different oocyte activation protocols was evaluated following intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of in vitro matured bovine oocytes. Motile spermatozoa selected by Percoll density gradient were treated with 5mM dithiothreitol (DTT) and analysed for ultrastructural changes of the head using transmission electron microscopy (TEM) . the alterations in sperm morphology agter DTT treatment for different times(15,30 and 60 min) were 10%,45-55% and 70-85% , respectively. Further, a partial decondensation of sperm heads was observed agter DTT treatment for 30min. Oocytes were injected with sperm treated with DTT for 30min. In Group 1, sperm injection was performed without any further activation stimuli to the oocytes. In Group 2, sham injection was performed without activation. Oocytes injected with sperm exposed to 5 M ionomycin for 5 min (Group 3), 5 M ionomycin + 1.9 mM dimethylaminopurine (DMAP) for 3 h(Group 4) and 5 M ionomycin + 3 h culture in M199 + 1.9 mM DMAP (Group 5) were also evaluated for cleavage, development and chromosomal abnormality . Cleavage and development rates in Groups 1, 2 and 3 were significantly ($P<0.05$) lower than those in Groups 4 and 5. The incidence of chromosomal abnormality in the embryos treated directly with DMAP after ionomycin (Group 4) was higher than in Group 5. we conclude that immediate DMAP treatment after ionomycin exposure of oocytes results in arrest of release of the second polar body, and thus leads to changes in chromosomal pattern. Therefore, the time interval between ionomycin and DMAP plays a crucial role in bovine ICSI.

서론

본 연구는 형질전환 수정란 생산을 위해서 외부 유전자가 함유된 정자를 난자내 직접 주입함에 따라 수정란의 발달과 유전자 표현을 관찰하고자 하였다.

기계적인 방법으로 난자의 세포질 속으로 정자를 넣는 난자세포질내정자주입술에 대하여 배우자 생식과 관련한 메커니즘을 밝혀내기 위하여 많은 연구가 진행되고 있다. 사람의 경우, 난자세포질내정자주입술이 효과가 높은 편이다. 수정율은 60%에 이르며, 착상율은 30%이다(Redgment et al.,1994). 소에서도 역시 난자세포질내정자주입술을 이용하여 산자가 생산되어 졌지만 (Goto et al., 1990,Hamano et al., 1999,Wei&Fukui,2002,Horiuchi et al., 2002), 그 효율성은 만족하기가 어렵다. 소에서의 효율적인 난자세포질내정자주입술 확립하기 위해서는 정자의 삽입, 난자의 준비, 난자의 활성화 등 많은 것 들이 고려되어 져야 한다.(Susko-Parrish et al., 1994; Perry et al., 1999; Suttner et al., 2002) . 비록 피펫을 이용하여 정자를 주입함으로써 때때로 기계적인 활성화가 일어나기도 하지만, 그 이상의 활성화가 필요하다. 따라서 몇몇 종류의 포유동물에서 효과적인 난자의 활성화를 유도하기 위하여 여러다른 약품과 물리적 방법,전기적 자극이 동원되었다(kaufman,1983, Qian et al., 1996; Chen&Seidel,1997;rho et al .,1993;Ware et al.,1989; Powell & Robl,1993). 그러나 그 효용성은 여전히 낮았다. 따라서 본 실험은 효율적인 난자내정자주입술의 확립을 위하여 많은 중요한 사항이 있지만, 그 중에서도 효과적인 활성화 방법을 찾기 위하여, 3시간 간격으로 ionomycin과 DMAP처리를 하여 핵형을 분석하여 약물의 효과를 확인하였다. 그리고 정자 세포막의 미세구조의 변화 역시 함께 관찰하였다.

재료 및 방법

배양액

Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)에서 구입된 시약 및 배양액을 본 실험에 공시하였다. 난자성숙 배양액 (IVM)은 2.5 mM sodium pyruvate, 1 mM L-glutamine, 1.0% (v/v) penicillin-streptomycin (10,000 IU and 10,000 g/mL, respectively; Pen-Strep; GIBCO), 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL), 10 g/mL FSH, 10 g/mL LH, and 1 g/mL estradiol 17 함유된 TCM199를 이용하였

다. Albumin, lactate, pyruvate 가 함유된 Tyrode's medium으로 HEPES-TALP 및 IVF-TALP)를 만들었고, 수정란 배양액으로는 modified Eagle medium (MEM) non-essential amino acids, 0.4 mM sodium pyruvate, 1 mM L-glutamine 및 50 g/mL gentamycin이 함유된 synthetic oviduct fluid medium (SOF) 배양액을 이용하였다. 모든 배양액은 pH7.4 그리고 삼투압 280 mOsm/kg.로 보정하여 사용하였다.

난자의 준비

난자 난구 복합체를 50 μ l 체외성숙 배양액에 24시간 둔다. 난구세포를 벗기고, 세포질이 충실한 것만을 골라 실험에 공시한다.

정자의 준비

정자는 PERCOLL(Pharmacia, Uppsala, Sweden)을 이용하여 비중의 차이에 따라 좋은 정자를 선별한다. 30분 동안 DTT처리를 한 정자는 난자내정자주입술을 시행할 때, 5 μ l의 10% polyvinylpyrrolidone (PVP; mol.wt 360, 000) 이 포함되어있는 Ham's f-10미디에 넣는다.

정자의 평가

정자의 세포막은 vital stain(fertilight, Molecular Probes, Eugene, OR)을 통하여 하였고, 형태적인 검사는 uranyl acetate and lead citrate 로 염색하여 투과전자현미경(geol GEM 1010 electron microscope)을 통하여 하였다.

ICSI 방법

ICSI는 200배 현미경 아래에서 실시하였다. 난자를 6시나 12시 방향에 놓고, 제1극체를 잡아주는 미세피펫으로 잡고 넣어주는 미세피펫으로 정자의 꼬리를 잡고 난자의 3분의 2정도까지 집어 넣는다. 세포질을 약간 뺐다가 정자와 함께 다시 집어넣는다. 1시간 후에 난자를 검사하면 위관강 속에서 정자가 움직이는 것을 확인하였다.

난자의 활성화 및 수정란 발달

첫 번째 그룹은 어떠한 활성화 처리도 하지 않는 그룹이며, 두 번째는 정자없이 주입만 하는 그룹이며, 세 번째는 5 μ M의 ionomycin을 5분간 처리한 그룹이며 4번째 그룹은 ionomycin을 5분간 처리한 후 1.9mM의 DMAP이 들어있는 IVC 배양액에 3시간 두었다. 5번째 그룹은 ionomycin에 5분 처리한 후, IVC 배양액에 3시간 배양시킴에 따라 제 1극체의 방출을 유도 하였고, 그 후 DMAP 처리를 하였다 (Cheong et al., 2000). IVC는 소 난관상피세포와 함께 50 μ l의 배양액에 15개의 수정란을 8일 동안 배양하였다.

세포학적 검사

배양 후 16시간 후에 methanol:acetic (3:1)로 고정시킨 후, 1% aceto-orcein 으로 염색한 후, 전핵을 확인하였다. 활성화 시킨 후 196시간 후에 King et al (1979)의 방법에 준하여 염색체 분석을 실시하였다.

통계처리

One-way ANOVA를 이용하여 통계처리 하였고, P값이 0.05보다 컸을 때 유의적 차이를 인정하였다.

결과 및 고찰

1. 정자 형태에 대한 DTT의 영향

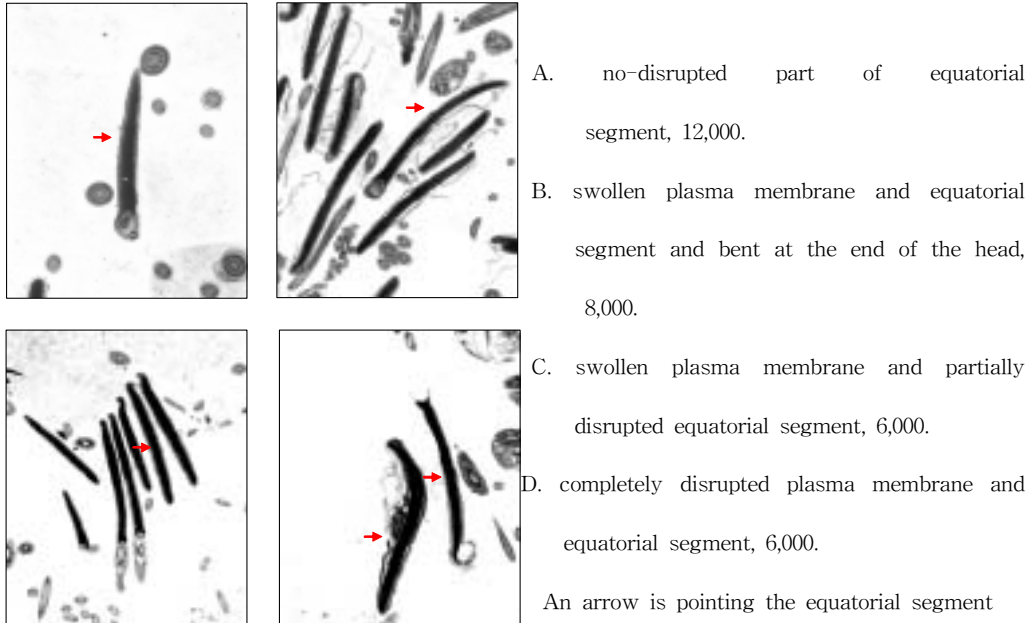


Figure 1. Ultrastructural changes of the bovine sperm head cultured with 0.5 mM DTT for 0 min (A); 15 min, (B); 30 min, (C); 1 hr, (D).

그림 1은 DTT 처리된 정자의 그림이며, 1시간 처리 후 정자막의 조밀도를 조사한 바 76%가 손상되지 않은 세포막을 보였다. DTT처리 후 시간의 경과에 따라 정자의 형태학적 조사를 한 바 처리 15, 30, 60분 후 일 때, 10%, 45-55% 그리고 70-85%의 형태적 변화가 인정되어 졌고, 다른 연구 결과와 일치하였다 (Qian et al,1996;Rho et al., 1998a; Chung et al., 2000).

2. 전핵 형성을

DTT처리를 한 정자를 난자 내 주입한 후, 전핵의 형성에 관한 표이다. 주입후 DTT 처리 유무에 따라 난자활성화 자극 후 전핵 형성을 조사한 결과는 다음 표 1과 같다. 활성화 처리 후 16시간째에 난자를 고정하고 전핵을 조사하였다. 정상적인 전핵형성, 즉 두개의 전핵을 가지는 경우, 에 정자가 DTT로 처리된 군에서 유의적으로 높게 나타났다. 이는 DTT 처리를 함에 따라 정자 핵 단백질을 구성하는 이중 S=S 결합이 S-H 결합으

로 변화되어 정자가 쉽게 진행으로 변하게 된다고 사료된다.

Table 1. Pronuclear formation of bovine oocytes following ICSI with and without DTT-treated

Sperm treatment	No. oocytes	Pronuclear formation (%)**			
		2PN	MII+ISP	MII+1PN	3PN
- DTT	75	23 (30.7)a	35 (46.6)a	9 (12.0)	8 (10.6)
+ DTT	75	39 (52.0)b	15 (20.0)b	12 (16.0)	9 (12.0)

a, b within column, percentages with different superscripts differ significantly, $P < 0.05$. * 5 replicates. ** 2PN, male + female PN; MII+ISP, MII oocyte + intact sperm; MII+1PN, MII oocyte + male PN and 3PN, more than 3PN.

3. 분할율 및 발달율

표 2는 DTT처리된 정자를 난자 내 직접 주입한 후 다양한 활성화 처리에 따른 수정란의 발달율을 조사한 결과이다. 활성화 자극을 가하지 않은 대조군인 1번과 2번의 경우 배반포로 발달한 단위발생란은 없었고, 이는 활성화를 처리한 3, 4군의 발달율 보다 유의적으로 낮음을 보여 주었다. Ionomycin 만 이용한 3번 군의 경우 17%의 분할율 및 1% 미만의 배반포기 발달율을 보였고, 반면 Iono,mycin과 DMAP 병용 군에서는 67%-70%의 분할율 및 15%-17%의 배반포기 발달율을 보여, 다른 군 보다 유의적으로 높은 발달율을 보였다. .

Table 2. Developmental capacity of bovine oocytes following ICSI

Group (treatment)	N oocytes	Development (%)	
		Cleavage	Blastocyst
1 (control)	150	5 (3.3)a	0
2 (handled control)	150	2 (1.3)a	0
3 (Ionomycin)	159	27 (17.0)b	1 (0.6)a
4 (Ionomycin+DMAP)	154	108 (70.1)c	28 (18.2)b
5 (Ionomycin+3h+DMAP)	158	106 (67.1)c	24 (15.2)b

*Percentages with different superscripts within a column differ significantly. $P < 0.05$.

4. 염색체 분석

4번군과 5번군의 방법, 즉 Ionomycin + DMAP 처리군으로 나온 52개의 배반포 에서 340개의 염색체를 확인하였다. 5번의 경우 정상염색체의 비율이 가장 많이 나왔다. 이는 ionomycine 만 이용할 경우 보다 ionomycine+DMAP을 함께 사용할 경우, 분할을 및 배반포기 발달율이 높았고, 정상핵형도 높았다.

Table 3. Ploidy of embryos produced by ICSI

Group (treatment)	No. blastocysts	Ploidy (%)			
		Diploid	Mixoploid	Polyploid	Unknown
4 (Ionomycin+DMAP)	28	9 (32.1)	10 (35.7)	7 (25.0)	2(7.1)
5 (Ionomycin+3h+DMAP)	24	13 (54.2)	6 (25.0)	4 (16.7)	1(4.2)

본 실험의 결과로부터 정자의 DTT처리와 ionomycine 과 DMAP 을 함께 사용할 경우 난자세포질내 정자의 주입술의 효과는 올라가다는 것을 확인할 수 있었다. 더 나아가 주입술을 시행한 수정란을 이식하여 산자를 조사해 볼 필요성이 있으며, 또한 DTT 처리된 정자에 외부 유전자를 삽입하여 형질전환 수정란 생산에도 응용 가능할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Chen SH, Seidel GE. Effects of oocytes activation and treatment of spermatozoa on embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in cattle. *Theriogenology* 1997;48:1265-1273.
- Chung JT, Keefer, C.L. & Downey, B.R, (2004). Activation of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection (ICSI) .
- Goto ,K., Kinoshita, A., Takuma, Y.&Ogawa,K.(1990). Fertilisation of bovine oocytes by the injection of immobilized, killed spermatozoam, *Vet. Rec.*127,517-20)
- Hamano, K., Li,X., Zian, X., Funauchi, K., Furudate, M.&Minato. Y.(1990). Gender preselection in cattle with intracytoplasmically injected flow cytometrically sorted sperm heads. *Boil. Reprod.* 60,1194-7
- Horiuchi, T., Emuta,C., yamauchi,Y.,Oikawa, T., Numabe, T.&Yanagimachi,R.(2002) Birth of normal calves after intracytoplasmic sperm injection of bovine oocytes: a methodological approach. *Theriogenology*

- Kaufman MH. Methodology: In vitro and in vivo techniques. In MH Kaufman (ed): "Early Mammalian Development: Parthenogenetic Studies". Cambridge University Press, 1983:20-26.
- King WA, Linares T, Gustavsson I, Bane AA. Method for preparation of chromosomes from bovine zygotes and blastocysts. *Vet Sci Comm* 1979;3:51-56.
- Perry AC, Wakayama T, Kishikawa H, Kasa T, Okabe M, Toyoda Y, Yanagimachi R. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science* 1999;284:1180-1183
- Powell JW, Barnes FL. The kinetic of oocytes activation and polar body formation in bovine embryo clones. *Mol Reprod Dev* 1992;33:53-58.
- Qian XQ, Inagaki H, Sasada H, Sugawara S. Decondensation and male pronuclear formation in bovine oocytes after microinjection of bovine sperm pretreated with disulfide bond reducing agent. *J Mammal Ova Res* 1996;13:118-121.
- Redgment CJ, Yang D, Tsigotis M, Yazdani N, al Shwaf T, Craft IL. Experience with assisted fertilization in severe male factor infertility and unexplained failed fertilization in vitro. *Hum Reprod* 1994;9:680-683.
- Rho GJ, Wu B, Kawarsky S, Leibo SP, Betteridge KJ. Activation regimens to prepare bovine oocytes for intracytoplasmic sperm injection. *Mol Reprod Dev* 1998; 50:485-492.
- Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Northey DL, Schultzkus V, First NL. Inhibition of protein kinase after induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. *Dev Biol* 1994;166:729-739.
- Suttner R, Zakhartchenko V, Stojkovic P, Miller S, Alberio R, Medjugorac I, Brem G, Wolf E, Stojkovic M. Intracytoplasmic sperm injection in bovine: effect of oocyte activation, sperm pretreatment and injection technique. *Theriogenology* 2000;54:935-945.
- Tombes RM, Simerely C, Borisy GG, Schatten G. Meiosis, egg activation, and nuclear envelope breakdown are differently reliant on Ca²⁺ independent in the mouse. *J Cell Biol* 1992;117:799-811.
- Ware C, Barnes F, Maiki-Lauria M, First NL. Age dependence of bovine oocyte activation. *Gamete Res* 1989;22:265-275.

3-7. 원형정세포가 체외생산 소난자의 재생에 미치는 영향

In vitro development of bovine oocytes reconstructed with round spermatids

Abstract

Sperm has been used as a vector to carry exogenous genes for producing transgenic animals. However, the success in cattle is low, due to deficiencies in oocyte activation and sperm decondensation. This study was carried out to develop an oocyte activation method for producing embryos reconstructed with round spermatids (RS). Embryos reconstructed by intracytoplasmic RS injection (ROSI) were compared with three activation treatments on their development and ploidy. RSs were isolated from bull testes by Percoll density gradients. Matured oocytes were divided into three activation groups. In Group 1, oocytes were activated with ionomycin (5 M, 5 min) prior to ROSI. In Group 2, oocytes were activated with ionomycin post ROSI. In Group 3, oocytes were activated twice with ionomycin before and after ROSI. All eggs were then incubated in cycloheximide (10 g/mL) for 5 h and cultured in CR1aa medium to day 8. In the rate of development of parthenotes, cleavage rates were significantly ($P < 0.05$) higher in Group 3 than in Group 1 and 2, but blastocyst rate did not differ among groups. In the rate of PN formation of ROSI eggs, 2PN rates were significantly ($P < 0.05$) higher in Group 3 than those in Group 1 and 2. In development rate of ROSI embryos, cleavage rates were significantly ($P < 0.05$) higher in Group 3 than in Groups 1 and 2. Blastocyst development rates were also significantly ($P < 0.05$) higher in Group 3 than in Group 1 and 2. Ploid analysis of ROSI blastocysts appeared all over 90% normal diploid. These results suggest that intracytoplasmic RS injection combined with repeated ionomycin activation and additionally CHX treatment is more efficient for producing developmentally competent embryos.

서론

수컷에서 발생하는 불임은 세포 내 정자주입 기술발달 이후로 사람(Palermo et al.1992), 토끼(Hosoi et al. 1988.), 소(Goto et al.1990), 양(Gomez et al.1998), 고양이(Pope et al.1998), 붉은 털 원숭이(Hewitson et al.1999), 돼지(Martin et al.2000, Lavitrano et al.2002)등에서 입증되었으며, 쥐(Maione et al.1998, Yamazaki et al.1998, Huang et al.2000)와 돼지(Lavitrano et al.2002, 2003)에서 핵 기증자로 정자와 원형정세포를 사용함으로써 형질전환 동물 생산을 시도하였다.

외부 DNA 삽입으로, 정자세포의 핵단백질이 히스톤과 DNA 복합체의 응축을 이끄는 이황화물 결합을 제거하기 때문에 원형정세포는 정자보다 더 효율적이라고 보고되어졌다.(Yamazaki et al.1998., Huang et al.2000) 그러나, 원형정세포를 이용한 배발달율은 여전히 낮다(Goto et al.1996). 원형정세포를 이용한 배의 재생산에는 두 가지 방법이 있다. Intracytoplasmic을 포함하여 난자세포질에 원형정세포를 주입하는 것(Goto et al.1996, Ogura et al.1993)과 난자의 난황주위에 원형정세포를 주입한 이후 전기자극을 주는 것이다(Ogura et al.1994). 쥐(Ogura et al.1994,1996), 토끼(Sofikitis et al.1994), 사람(Tesarik et al.1995)에서 두 가지 방법으로 모두 산자를 생산하였다. 비록 그것은 난자세포질내 정세포 주입과 세포질내 정자 직접주입을 직접적으로 비교하지는 않았지만, 난자세포질내 정세포 주입은 배 발달율과 대리모에 이식한 이후 임신율에서 낮은 결과를 보인다.(Goto et al.1996, Ogura et al.1994,1996)

포유 동물에서, 정세포확인의 어려움을 포함하여 난자세포질내 정세포를 주입한 이후 난자의 불규칙한 활성화, 중심체와 부계 유전자 각인의 불완전 등과 같은 정세포의 필수적인 구조의 미성숙이 난자세포질내 정세포 주입술의 낮은 효율에 영향을 준다고 본다(Ogura et al.1999, Lee et al.2002). 그리하여 몇몇 종에서 난자의 활성화는 다양한 화학적, 생리적, 효소적 자극을 이용하여 시도되었다. 활성화 과정은 정상 수정에 가깝게 모방하여 얼마간의 효과를 얻었다. 성숙 증진 요소(MPF)의 재축적을 막기 위해 정자의 유전적인 요인들을 포함하여 단백질 합성 저해제 (cycloheximide, CHX)의 결합과 phosphorylation (6-dimethylaminopurine, DMAP)이 사용되었다(Susko-Parrish et al.1994, Chen et al.1997, Rho et al.1998, Ock et al.2003)

소에서 칼슘 이온투과담체의 결합과 단백질 합성 저해제나 인산화 저해제는 배의 발

달에서 더 나은 결과를 낳는다(Ock et al.2003, Yoo et al.2003, Suttner et al.2000, Kimura et al.1995) 그러나 난자에 DMAP를 처리하는 것은 세포의 주기가 S-phase로 다시 돌아가게 하며 결국 염색체에 이상을 나타낸다(Suttner et al.2000, Ock et al.2004). DMAP를 이용한 세포질내 정자를 직접주입한 배는, 70% 이상에서 주로 배수성, 혼수성의 형성과 같은 비정상인 염색체 이상을 나타낸다(Suttner et al.2000). 단백질 합성 저해제와 결합할 때 재구성되는 배의 90%가 비정상적인 염색체를 가진다(King et al.1979).

또 다른 중요관점은 DNA와 세포 타입의 다른 염색질 응축 때문에 전기적 자극으로써 재구성이 일어날 때 난자와 정세포의 동기화에 있다. 쥐에서 난자가 정세포의 미세주입 후 30분 사이에 활성화될 필요로 한다고 보고되어진 바 있다(Ogura et al.1994, Kimura et al.1995). 소에서, 먼저 활성화된 난자에 정세포 주입을 위해 1~2시간 간격을 두는 것이 배 발달이 높게 나타남이 보고되어진다 있다(Koto et al.1996.). 그러나, 난자세포질내 정세포를 주입한 이전과 이후, 난자의 활성화와 이후의 배발달의 효과에 대한 비교는 없었다

이 실험의 목적은 정세포로 재구성되는 배발달에서 효과적인 활성화 방법의 연구이다. 난자의 활성화 처리의 효과는 전핵 형성의 측정, 발달율과 배수성의 형성 등으로 평가하였다.

재료 및 방법

1. 시약과 배양액

모든 화학용품은 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO)를 사용하였고, 배양액은 GIBCO (Invitrogen Corporation)를 사용하였다. 성숙은 난자-난구세포 복합체를 Earle's salts, 10% fetal bovine serum (FBS), 25mM hepes, 2.5mM Na-pyruvate, 1mM L-glutamine과 0.05% gentamycin (Biowhittaker)이 포함된 배양액 M199를 사용하였다. embryo의 배양은 0.15mg/mL L-glutamine, 0.55mg/mL L-lactate, 10 μ L/mL non-essential amino acids solution (MEMaa) (100), 20 μ L/mL essential amino acids solution (BMEaa) (50), 2.5mM sodium pyruvate와 3% bovine serum albumin (BSA, essential fatty acid free, Fraction V)이 포함된 CR1aa (114mM NaCl, 3.1mM KCl, 26.2mM NaHCO₃)배양액을 사용하였다. 3% BSA, 10mM Hepes 이 포함된 Tyrode's lactate hepes (114mM NaCl, 3.2mM KCl, 2mM NaHCO₃, 0.4mM NaH₂PO₄H₂O, 2mM CaCl₂ 2H₂O, 0.5mM MgCl₂6H₂O

와 10mM Na lactate, TL-hepes) medium는 정세포의 준비와 미세조작 배양액과 난자 wasing에 사용되었다. 모든 배양액의 pH는 7.4, 삼투압은 280 mOsm/kg을 사용하였다. .

2. 난자 준비

도축장 유래 난소에서 2~6mm의 난포에서 난자-난구세포 복합체를 채취하여 체외성숙 배양액을 사용하여 39C, 5% CO₂ 의 조건에서 20시간 체외성숙 하였다. 20시간 성숙 후, 확장된 난구세포를 3% sodium citrate solution로 제거하고, 제 1극체와 뾰뾰한 세포질을 가진 난자를 선택하였다

3. 정세포의 준비

정세포의 준비는 Ock et al.(2004)의 방법을 따랐다. 도축장 유래 정소의 정소상체 미부에서 조직을 채취하여 불연속적인 Percoll density gradient를 이용하여 수정능 획득이 된 정자를 분리하여 미세조작을 위해 TL-hepes drop에 옮겼다.

4. 미세조작

정세포는 형태학적인 방법으로 선택하였고, metaphase II 방추사가 손상 입은 난자는 피하였다. 주입 피펫으로 먼저 난자의 막을 뚫고 소량의 난자원형질을 흡입한다. 정세포와 흡입한 난자 원형질을 다시 난자 속으로 삽입한다. 주입 이후에 난자를 다시 조사하여, 난황막 주위에 삽입된 정세포를 제거한다.

5. 난자 활성화와 배양

단위발생란의 발달 비교를 위해, 난자는 3가지 처리군으로 활성화하였다. Group 1 (pre-activation)은 22시간 성숙시킨 난자를 5uM ionomycin(Ion)에 5분간 처리한 후 1시간 뒤에 10ug/mL cycloheximide (CHX)이 포함된 CR1aa에 5 시간 배양하였다. Group2 (post-activation)는 23시간 성숙시킨 난자를 Ion에 5분간 처리하고, CHX에 5시간 배양하였다. Group3 (pre+post activation)은 성숙 후 22시간과 23시간에 각각 5분씩 두 번 Ion에 처리한 후, 10 ug/mL CHX 에 5시간 배양하였다.

정세포를 주입한 난자도 3가지 처리군으로 활성화하였다. Group 1 (pre-activation)은

성숙 22시간 이후 난자를 Ion으로 5분간 먼저 활성화시켰으며, 난자세포질내 정세포를 주입한 이 후에 CHX에 5시간 배양하였다. Group 2 (post-activation)은 정세포를 주입한 난자를 Ion에 5분간 활성화 시킨 후, CHX에 5시간 배양하였다. Group 3 (pre+post activation)은 난자세포질내 정세포를 주입하기 전과 후에 Ion으로 각각 5분간 두 번 활성화 시킨 이 후에, CHX에 5시간 배양하였다. 모든 난자는 3일까지(0일 = 난자세포질내 정세포를 주입한 날) 3% BSA가 포함된 CR1aa 배양액에서 배양하였고 이후 8일 째까지는 10% FBS가 포함된 CR1aa 배양액에서 배양하였다..

6. Cytological procedure

활성화 처리 16시간 이 후에, 난자는 methanol: acetic acid (3:1, v:v)에 하루 고정하였으며, 전핵형성과 핵의 상태확인을 위해 10g/mL propidium iodide (PI)염색하여 620nm wavelength의 형광현미경에서 관찰하였다.(Narishige, Tokyo, Japan).

활성화 처리 196시간 이 후에, 배반포로의 배발달은 King et al.(1979)의 방법을 수정하여 배수체의 형성으로 측정하였다. 배는 M-phase로의 정지를 위해 0.05ug/mL democolcine(Gibco, colcemide)이 포함된 CR1aa 배양액에 3시간동안 배양하였다. 0.5% trypsin을 10분간 처리한 이후에, 배는 저장액(0.8% sodium citrate)에 5분간 처리하여, methanol: acetic acid (3:1)으로 하루정도 고정한다. 4% Giemsa solution로 5분간 염색하고, 배수체를 확인한다. 배는 반수체(haploid), 이수체(diploid), 다수체(polyploidy)로 분류한다.

7. Experimental design

Experiment 1은 세 가지 활성화 처리군에서 활성화 처리 48시간 후 단위발생란에서의 분할율과 활성화 처리 192시간 후에서의 배반포 발달율을 비교하였다. Experiment 2~4는 난자세포질내 정세포를 주입한 배를 각기 다른 활성화 처리하여 16시간 후에 전핵형성을 비교(Experiment 2)과 192시간 후에 분할율과 배반포 발달율 비교(Experiment 3), 배반포의 핵형을 비교하였다(Experiment 4).

8. 통계학적 처리

분할율, 발달율 비율 분석은 데이터를 arcsine transformation 한 후 SPSS의 one-way ANOVA를 사용하였다. 그룹간의 비교는 Duncan's 및 Tukey 다중 비교 분석을 실시하였다. 염색체 분석에서, 처리군간의 차이는 Student's t-test를 이용하였다. $P < 0.05$ 일 때 유의적인 차이를 인정하였다.

결과 및 토론

1. 단위발생란의 분할율과 발달율

2일 째 되는 날에 Group 3에서 다른 Group에 비해 유의적으로 높은 분할율을 나타내었으나, 배반포로의 발달에는 세 Group 에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 이러한 결과로서, 소의 난자는 칼슘 이온투과담체와 CHX의 결합으로 즉시 활성화되어 단위발생란화가 됨을 확인하였다. 그러나 보다 중요한 것은 활성화 처리화에 따른 다른 분할능력 확인이다. 칼슘 이온투과담체에 두 번 처리되고 난 후에 CHX (pre+post activation treatment) 을 처리한 난자의 대부분에서는 분할(80%)이 일어났으나, pre+ post 활성화 처리된 난자에서는 60%가 분할이 일어났다. Pre+post 활성화 처리한 난자에서의 배반포 발달은 5% 미만이었으며, 이와 유사하게 Suttner et al.(2000) 도 칼슘 이온투과담체와 CHX 복합 활성화 처리 이 후 40%의 분할율과 4%의 배반포 발달율을 보였다.

Table 1
Development of parthenotes produced by each different activation treatments

Group (treatments)*	Oocytes used	Development (%)	
		Cleavage	Blastocyst
1 (Pre-activation)	175	97 (55.4) a	6 (3.4)
2 (Post-activation)	196	119 (60.7) a	8 (4.1)
3 (Pre + post-activation)	180	144 (80.0) b	9 (5.0)

Percentages with different letters (a, b) within a column are significantly different ($P < 0.05$).

* Pre-activation, activated with 5 μ M Ionomycin (Ion) for 5 min + culture for an hour + 10 μ g/mL cycloheximide (CHX) for 5 h; post-activation, Ion + CHX; pre + post-activation, Ion + culture for an hour + Ion + CHX; five replicates.

2. 난자세포질내 정세포를 주입한 배의 전핵형성

활성화 처리 16시간 후에, 난자세포질내 정세포를 주입한 배에서 핵의 상태와 전핵형성을 측정하였다. Group 1, 2, 3 대부분에서 모계 전핵이 형성되었으며, Group 간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 그러나 부계 전핵 형성율은 Group 3 이 다른 Group 에 비

하여 유의적으로 높게 나타났다. 두 개의 전핵을 가진 난자는 정상적인 재생이 일어난 것이라고 간주했다. Group 3 에서 두 개의 전핵 형성율이 다른 Group 에 비해 유의적으로 높았으나, Group 1과 2사이에는 유의적으로 차이를 나타내지 않았다. Group 3에서 3개의 전핵을 가진 난자는 제 2극체의 방출에 실패한 것으로 간주했으며, Group 1과 2에서 유의적으로 낮음을 보였다. CHX와 칼슘 이온투과담체를 두 번 처리하는 것은 부계 전핵형성을 증가시키고, 난자세포질내 정세포를 주입한 배의 활성화 처리로써 적당하다고 생각된다.

Table 2
Pronuclei formations of eggs injected with round spermatid by different activation treatments

Group (treatments) ^a	Oocytes used	PN formation (%) ^{b,c}							Activation rates (%) ^d
		IPN	IPN + IRS	MII + IPN	MII + IRS	2PN	3PN	Unknown	
1 (Pre-activation)	64	6 (9.4)	15 (23.4)	5 (7.8)	7 (10.9)	18 (28.1) a	6 (9.4) a	7 (10.9)	45 (70.3)
2 (Post-activation)	67	7 (10.4)	16 (23.9)	6 (9.0)	6 (9.0)	22 (32.8) a	6 (9.0) a	4 (6.0)	51 (76.1)
3 (Pre + post-activation)	75	7 (9.3)	13 (17.3)	6 (8.0)	6 (8.0)	37 (49.3) b	2 (2.7) b	4 (5.3)	59 (78.7)

Percentages with different letters (a, b) within a column are significantly different ($P < 0.05$).

^a Pre-activation, activated with 5 μ M Ionomycin (Ion) for 5 min + ROSI + 10 μ g/mL cycloheximide (CHX) for 5 h; post-activation, ROSI + Ion + CHX; pre + post-activation, Ion + ROSI + Ion + CHX.

^{b,c} IPN, one female pronucleus; IPN + IRS, one female pronucleus and an intact round spermatid; MII + IPN, metaphase II and one male pronucleus; MII + IRS, metaphase II and intact round spermatid; 2PN, a male and a female pronucleus; 3PN, three pronucleus.

^d Total female PN formation rate; four replicates.

3. 난자세포질내 정세포를 주입한 배의 분할율과 발달율

분할율은 Group 3에서 유의적으로 높게 나타났으며, Group 1과 2에서는 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 배반포로의 발달도 Group 3에서 다른 Group에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 칼슘 이온투과 담체와 CHX를 두 번 처리하는 것은 분할율과 배반포 발달율에 아주 중요한 요인으로 작용한다. pre+post 활성화 처리는 분할율과 배반포 발달율을 증가시킨다. 확실하게 칼슘 이온투과담체를 두 번 처리하는 것은 난자세포질내 정세포를 주입한 배의 발달에 결정적인 영향을 미친다.

Table 3
Development of embryos injected with round spermatid by different activation treatments

Group (treatments) ^a	Oocytes used	Development (%)	
		Cleavage	Blastocyst
1 (Pre-activation)	121	65 (53.7) a	7 (5.8) a
2 (Post-activation)	120	77 (64.2) a	2 (1.7) a
3 (Pre + post-activation)	130	107 (82.3) b	17 (13.1) b

Percentages with different letters (a, b) within a column are significantly different ($P < 0.05$).

^a Pre-activation, activated with 5 μ M Ionomycin (Ion) for 5 min + ROSI + 10 μ g/mL cycloheximide (CHX) for 5 h; post-activation, ROSI + Ion + CHX; pre+post-activation, Ion + ROSI + Ion + CHX; five replicates.

4. 난자세포질내 정세포를 주입한 배의 염색체 분석

Group 1과 2에서 소량의 배가 배반포로 발달했기 때문에 직접적인 비교는 하지 않았으나, 배반포 분석은 하였다. Group 3에서 17개의 배반포 중에 2개에서 핵형이 손상되어진 것을 발견하였다. 그러나 15개의 배반포 중에서 14개는 이수체였고, 하나는 다수체였다. 특히, 칼슘 이온투과담체와 CHX 복합 활성화 처리하거나 DMAP 활성화 처리하여 핵이식과 세포질내 정자를 직접 주입한 배는 염색체적인 비정상이 빈번하게 발생함으로써 마지막 단계에 이르러 더디게 발달하게 된다. 그러므로, 정세포를 주입하고 각기 다른 활성화 처리를 시킨 배는 핵형의 확인이 꼭 필요하다. 이 실험에서, 난자세포질내 정세포를 주입한 배에 칼슘 이온투과담체와 CHX 복합 활성화 시킨 것은 이수체 염색체 쌍과 metaphase plates의 많은 부분이 관련되어 발견되는 것은 정세포로서 수정율이 증가하기 때문이다.

Table 4
Ploidy of embryos injected with round spermatid by different activation treatments

Group (treatments)*	Metaphase plates analyzed (embryos)	Ploidy (%)		
		n	2n	≥3n
1 (Pre-activation)	68 (7)	3 (4.4)	59 (86.8)	6 (8.8)
2 (Post-activation)	15 (2)	-	14 (93.3)	1 (6.7)
3 (Pre + post-activation)	153 (17)	5 (3.3)	136 (88.9)	12 (7.8)

* Pre-activation, activated with 5 μM Ionomycin (Ion) for 5 min + ROSI + 10 μg/mL cycloheximide (CHX) for 5 h; post-activation, ROSI + Ion + CHX; pre + post-activation, Ion + ROSI + Ion + CHX.

결론

난자세포질내 정세포 주입과 phosphorylation inhibitor, CHX 활성화 처리, 정세포 주입 전후에 두 번 칼슘 이온투과담체 처리한 난자의 활성은 이수체로서 정상적인 핵형을 구성하는 염색체의 정세포 재구성, 전핵형성, 배반포로의 발달을 촉진시키는데 유리하다.

참고문헌

- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992;340:17-18.
- Hosoi Y, Miyake M, Utsumi K, Iritani A. Development of rabbit oocytes after microinjection of spermatozoa. *Proc 11th Int. Congr. Anim. Reprod* 1988;331 abstr.
- Goto K, Kinoshita A, Takuma Y, Ogawa K. Fertilisation of bovine oocytes by the injection of immobilised,

- killed spermatozoa. *Vet Rec* 1990;24:517-520.
- Gomez MC, Catt JW, Evans G, Maxwell WM. Cleavage, development and competence of sheep embryos fertilized by intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *Theriogenology* 1998;15:1143-1154.
- Pope CE, Johnson CA, McRae MA, Keller GL, Dresser BL. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. *Anim Reprod Sci* 1998;53:221-236.
- Hewitson L, Dominko T, Takahashi D, Martinovich C, Ramalho-Santos J, Sutovsky P, Fanton J, Jacob D, Monteith D, Neuringer M, Battaglia D, Simerly C, Schatten G. Unique checkpoints during the first cell cycle of fertilization after
- Martin MJ. Development of in vivo-matured porcine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod* 2000;63:109-112.
- Lavitrano M, Bacci ML, Forni M, Lazzereschi D, Di Stefano C, Fioretti D, Giancotti P, Marfe G, Pucci L, Renzi L, Wang H, Stoppacciaro A, Stassi G, Sargiacomo M, Sinibaldi P, Turchi V, Giovannoni R, Della Casa G, Seren E, Rossi G. Efficient production by sperm-mediated gene transfer of human decay accelerating factor (hDAF) transgenic pigs for xenotransplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;29:14230-14235.
- Maione B, Lavitrano M, Spadafora C, Kiessling AA. Sperm-mediated gene transfer in mice. *Mol Reprod Dev* 1998;50:406-409.
- Yamazaki Y, Fujimoto H, Ando H, Ohyama T, Hirota Y, Noce T. In vivo gene transfer to mouse spermatogenic cells by deoxyribonucleic acid injection into seminiferous tubules and subsequent electroporation. *Biol Reprod* 1998;59:1439-1444.
- Huang Z, Tamura M, Sakurai T, Chuma S, Saito T, Nakatsuji N. In vivo transfection of testicular germ cells and transgenesis by using the mitochondrially localized jellyfish fluorescent protein gene. *FEBS Lett* 2000;29:248-251.
- Lavitrano M, Forni M, Bacci ML, Di Stefano C, Varzi V, Wang H, Seren E. Sperm mediated gene transfer in pig: Selection of donor boars and optimization of DNA uptake. *Mol Reprod Dev* 2003;64:284-291.
- Perry AC, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y, Yanagimachi R. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science* 1999;284:1180-1183.
- Goto K, Kinoshita A, Nakanishi Y, Ogawa K. Blastocyst formation following intracytoplasmic injection of

- in-vitro derived spermatids into bovine oocytes. *Hum Reprod* 199611:824-829.
- Ogura A, Yanagimachi R. Round spermatid nuclei injected into hamster oocytes from pronuclei and participate in syngamy. *Biol Reprod* 199348:219-225.
- Ogura A, Matsuda J, Yanagimachi R. Birth of normal young after electrofusion of mouse oocytes with round spermatids. *Proc Natl Acad Sci* 199491:7460-7462.
- Ogura A, Matsuda J, Asano T, Suzuki O, Yanagimachi R. Mouse oocytes injected with cryopreserved round spermatids can develop into normal offspring. *J Assist Reprod Genet* 199613:431-434.
- Sofikitis NV, Miyagawa I, Agapitos E, Pasyianos P, Toda T, Hellstrom WJ, Kawamura H. Reproductive capacity of the nucleus of the male gamete after completion of meiosis. *J Assist Reprod Genet* 199411:335-341.
- Tesarik J, Mendoza C, Testart J. Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes. *N Engl J Med* 1995333:525.
- Lee JW, Kim NH, Lee HT, Chung KS. Microtubule and chromatin organization during the first cell-cycle following intracytoplasmic injection of round spermatid into porcine oocytes. *Mol Reprod Dev* 199850:221-228.
- Lee JW, Wu SC, Tian XC, Barber M, Hoagland T, Riesen J, Lee KH, Tu CF, Cheng WT, Yang X. Production of cloned pigs by whole-cell intracytoplasmic microinjection. *Biol Reprod* 200369:995-1001.
- Ogura A, Inoue K, Ogonuki N, Suzuki O, Mochida K, Matsuda J, Sankai T. Recent advances in the microinsemination of laboratory animals. *Int J Androl*. 200023 Suppl 2:60-62.
- Ogura A, Yanagimachi R. Microinsemination using spermatogenic cells in mammals. In "Male Sterility for Motility Disorders" (S Hammamah, R. Miesusset F Olivennes and R Frydmam, eds.), 1999, pp. 189-202. Springer-Verlag, New York.
- Hayashi S, Yang J, Christenson L, Yanagimachi R, Hecht NB. Mouse preimplantation embryos developed from oocytes injected with round spermatids or spermatozoa have similar but distinct patterns of early messenger RNA expression. *Biol Reprod* 200369:1170-1176.
- Lee J, Inoue K, Ono R, Ogonuki N, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ogura A, Ishino F. Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development* 2002129:1807-1817.

- Stice SL and Robl JM. Activation of mammalian oocytes by a factor obtained from rabbit sperm. *Mol Reprod Dev* 1990;25:272-280.
- Fulka J Jr, Leibfried-Rutledge ML, First NL. Effect of 6-dimethylaminopurine on germinal vesicle breakdown of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 1991;29:379-384.
- Szollosi MS, Kubiak JZ, Debey P, de Pennart H, Szollosi D, Maro B. Inhibition of protein kinases by 6-dimethylaminopurine accelerates the transition to interphase in activated mouse oocytes. *J Cell Sci* 1993;104:861-872.
- Navara CS, First NL, Schatten G. Microtubule organization in the cow during fertilization, polyspermy, parthenogenesis, and nuclear transfer: the role of the sperm aster. *Dev Biol* 1994;162:29-40.
- Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Northey DL, Schutzkus V, First NL. Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. *Dev Biol* 1994;166:729-739.
- Chen SH, Seidel GE Jr. Effects of oocyte activation and treatment of spermatozoa on embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in cattle. *Theriogenology* 1997;48:1265-1273.
- Rho GJ, Wu B, Kawarsky S, Leibo SP, Betteridge KJ. Activation regimens to prepare bovine oocytes for intracytoplasmic sperm injection. *Mol Reprod Dev* 1998;50:485-492.
- Ock SA, Bhak JS, Balasubramanian S, Lee HJ, Choe SY, Rho GJ. Different activation treatments for successful development of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Zygote* 2003;11:69-76.
- Yoo JG, Choe SY, Rho GJ. Efficient production of cloned bovine embryos using cdc2 kinase inhibitor. *Reprod Domest Anim* 2003;38:444-450.
- Suttner R, Zakhartchenko V, Stojkovic P, Muller S, Alberio R, Medjugorac I, Brem G, Wolf E, Stojkovic M. Intracytoplasmic sperm injection in bovine: effects of oocyte activation, sperm pretreatment and injection technique. *Theriogenology* 2000;54:935-948.
- Kimura Y, Yanagimachi R. Development of normal mice from oocytes injected with secondary spermatocyte nuclei. *Biol Reprod* 1995;53:855-862.
- Ock SA, Kwack DO, Choe SY, Rho GJ. The use of round spermatids for producing reconstructed embryos. *Reproduction Fertility and Development* 2004;16:206 abstr.
- King WA, Linares T, Gustavsson I, Bane AA. Method for preparation of chromosomes from bovine zygotes

- and blastocysts. *Vet Sci Comm* 1979;3:51-56.
- Ogonuki N, Sankai T, Yagami K, Shikano T, Oda S, Miyazaki S, Ogura A. Activity of a sperm-borne oocyte-activating factor in spermatozoa and spermatogenic cells from cynomolgus monkeys and its localization after oocyte activation. *Biol Reprod* 2001;65:351-357.
- Yazawa H, Yanagida K, Sato A. Oocyte activation and Ca²⁺oscillation-inducing abilities of mouse round/elongated spermatids and the developmental capacities of embryos from spermatid injection. *Hum Reprod* 2001;16:1221-1228.
- Yu TE, Zhang Y, Unni E, Shirley CR, Deng JM, Russell LD, Weil MM, Behringer RR, Meistrich ML. Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:4683-4688.
- Catt SL, Catt JW, Gomez MC, Maxwell WM, Evans G. Birth of a male lamb derived from an in vitro matured oocyte fertilised by intracytoplasmic injection of a single presumptive male sperm. *Vet Rec* 1996;16:494-495.
- De La Fuente R, King WA. Developmental consequences of karyokinesis without cytokinesis during the first mitotic cell cycle of bovine parthenotes. *Biol Reprod* 1998;58: 952-962.
- Moses RM, Masui Y. Enhancement of mouse egg activation by the kinase inhibitor, 6-dimethylaminopurine (6-DMAP). *J Exp Zool* 1994;270:211-218.
- Liu L, Ju JC, Yang X. Parthenogenetic development and protein patterns of newly matured bovine oocytes after chemical activation. *Mol Reprod Dev* 1998;49:298-307.
- Slimane-Bureau WC, King WA. Chromosomal abnormalities: a potential quality issue for cloned cattle embryos. *Cloning Stem Cells* 2002;4:319-29.
- Chian RC, Sirard MA. Protein synthesis is not required for male pronuclear formation in bovine zygotes. *Zygote* 1996;4:41-48.

제4절 체세포 복제 한우 및 젓소 수정란 생산

4-1. 체세포 분석기를 이용한 체외 배양한 소 체세포의 세포주기 분석

Cell cycle analysis of bovine cultured somatic cells by flow cytometry

Abstract

This study was undertaken to examine the cell cycle characteristics of bovine fetal and adult somatic cells (fetal fibroblasts, adult skin and muscle cells, and cumulus cells) after culture under a variety of conditions; 1) growth to 60-70% confluency(cycling), 2) serum starvation, 3) culture to confluency. Cell-cycle phases were determined by flow cytometry with propidium iodide staining enabling the calculation of percentages of cells in G0/G1, S and G2/M. The majority was in G0/G1 regardless of cell type and treatment. Serum-starved or confluent cultures contained higher percentages of cells in G0/G1 (89.5-95.4%; $P < 0.05$). Percentages of cells in G0/G1 increased as cell size decreased regardless of the cell type and treatment. In the serum-starved and confluent cultures, about 98% of small cells were in G0/G1. Serum-starved cultures contained higher percentages of small cells (38.5-66.9%) than cycling and confluent cultures regardless of cell type ($P < 0.05$). After trypsinization of fetal fibroblasts and adult skin cells that were serum-starved and cultured to confluency, the percentages of cells in G0/G1 increased ($P < 0.05$) on incubation for 1.5 (95.7-99.5%) or 3 hr (95.9-98.6%). These results verify that serum starvation and culture to confluency are efficient means of synchronizing bovine somatic cells in G0/G1, and indicate that a more efficient synchronization of the cells in G0/G1 can be established by incubation for a limited time period after trypsinization of serum-starved or confluent cells.

서 론

핵이식을 위한 공여핵의 세포주기는 재구축배의 발달을 지배하는 중요한 요인이다. 포유동물 수정란세포 핵이식에 있어서는 재구축란의 정상적인 배수체를 유지하기 위해서는 탈핵된 성숙난자에 이식되는 세포의 핵이 G1기에 속해 있어야 한다(Cheong 등, 1993; Campbell 등, 1996a). G1기 핵의 이식은 핵이식란의 초기화를 유도하여 발육능을 증진시키는 것을 보고되고 있다(Collas 등, 1992; Cheong 등, 1993). 한편, 체세포 핵이식에 있어서는 G1기 세포 대신 휴면기인 G0기의 세포를 이용하여 산자생산에 성공하였다(Wilmut 등, 1997; Kato 등, 1998; Wells 등, 1999). 체세포의 G0기 유도는 세포의 혈청기아배양에 의하여 얻을 수 있으며(Campbell 등, 1996a,b; Boquest 등, 1999), Sertoli 세포나 신경세포처럼 자연적으로 휴지된 세포도 있다(Wakayama 등, 1998). G0기 세포는 유전자의 transcription 활성화와 염색질의 변화를 감소시켜 결과적으로 donor 세포의 초기화를 증진시키는 것으로 추측되고 있다(Whitfield 등, 1985).

한편, G0기 동조가 체세포 핵이식의 성공을 위한 필수요인은 아니라는 보고도 있다. Cibelli 등(1998)은 G0기가 아닌 증식 중인 G1기 체세포를 이용하여 복제소 생산에 성공함으로써 성공적으로 초기화될 수 있음을 보고하였다. 또한, G0/G1기에 속한 생쥐 난구 세포의 핵이식에 의해서도 산자가 생산되었으며(Wakayama 등, 1998), 증식 중인 돼지 태아섬유아세포의 핵이식에 의해서도 산자생산이 보고되었다(Lai 등, 2002).

체세포의 G0/G1기 동조를 위한 방법으로 serum starvation법과 confluent 배양법이 사용되고 있다(Bethhauser 등, 2000; Kubota 등, 2000). 또한 체세포의 세포주기 분석도 소와 돼지에서 보고되고 있다(Boquest 등, 1999; Hill 등, 2000; Kubota 등, 2000; Kasinathan 등, 2001). 그러나 이 들 연구는 단지 세포배양의 최종단계에서만 세포주기 분석이 이루어졌다.

본 연구는 핵이식을 하기 전 최적화된 공여 핵 처리를 위해 공여세포가 다양한 배양조건 하에서 배양되었을 때 소 태아섬유아세포와 성숙 체세포의 세포주기 특성과 trypsin처리 후 시간의 경과에 따른 세포주기 변화를 조사하기 위해 수행되었다.

재료 및 방법

1. 체세포 준비

태아섬유아세포는 100일령된 수컷 태아로부터 분리하였다. 태아로부터 머리, 심장, 내장을 적출한 후 남은 몸체부분을 작은 조각으로 분리하였다. 성체 피부와 근육 조직은 3년된 한우의 암컷 귀로부터 1mm² 크기의 작은 조직으로 절취하였다. 조직은 15ml 원심관에 옮겨 넣고 PBS+0.05% trypsin-EDTA액을 혼합하여 37°C에서 30분간 진탕한 후 5분간 정치하여 상층액을 회수하였다. 회수한 상층액은 500×g로 5분간 원심분리하여 세포를 회수하였다. 회수된 귀 조직세포는 10% FBS, 50µg/ml gentamycin이 함유된 3ml DMEM(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)에 재 부유시켜 50ml 배양병에 넣어 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 난구세포는 난구세포-난자 복합체를 0.1% hyarulonidase(Sigma)로 처리하여 분리하였고 DMEM으로 여러번 세척하였다. 그후 난구세포는 50ml 배양용기 내에서 3ml DMEM 으로 배양하였다. 대략 90% confluency에 이르렀을 때, 세포는 1:2 비율로 계대배양하였고, 4번 이상 계대배양 후 세포는 15% FBS와 10% DMSO가 함유된 DMEM액으로 액체질소에 동결하였다.

2. 체세포 처리

동결보존된 세포를 용해하여 Φ 35mm 배양접시 내에 1×10^5 cell/ml의 농도로 10% FBS가 함유된 DMEM 액에서 사용하기 전 monolayer를 형성하도록 배양되었다. 세포가 60-70% confluency 되는 배양 2일 후, 세포는 에탄올에 고정하기 전에 3가지 처리구중 한 가지 방법으로 처리되었다. 1) 즉시 고정(cycling cell); 2) 0.5% FBS가 함유된 DMEM 배양액으로 5일동안 추가배양(serum-starved cell); 3) 10% FBS가 함유된 DMEM 배양액으로 2-3일에 한번씩 배양액을 교체하면서 2주일간 추가배양(grown to confluency).

3. 세포의 고정과 염색

Trypsin 처리후 세포를 PBS에 재부유 시켜 500×g에서 5분 동안 원심분리 하였다. 원심분리된 세포는 1ml 70%(v/v) ethanol(4°C)에 재 부유시켜 하룻밤동안 고정하였고 분석시까지 -20°C로 유지시켰다. 실험을 위해 trypsin 처리된 태아 섬유아세포와 성 체세포는 15ml 원심관에 10% FBS가 함유된 1ml DMEM액에 재부유 시켰고 trypsin 처리 후

경과시간에 따른 세포주기를 결정하기 위해 ethanol 고정 전에 37°C에서 1.5, 3, 6시간동안 가끔 흔들어 주면서 배양하였다. ethanol 고정후에 pellet화된 세포는 PBS액으로 즉시 세척하였고 37°C에서 30분간 200 μ g/ml RNase A(Boeringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany)액으로 배양하였다. 세포는 실온에서 1시간동안 50 μ g/ml propidium iodide 액으로 염색되었다. 염색된 세포는 flow cytometry 분석하기 전에 50 μ m 구멍의 nylon filter를 통과시켜 세포덩어리를 제거하였다.

4. Flow cytometry

세포 개개의 DNA 함량 측정에 의한 세포주기 단계는 사전에 기술된 방법 (cheong et al., 2000)으로 flow cytometry(EPICS XL-MCL, Beckman coulter Inc., FL, USA)에 의해서 결정되었다. 다양한 세포주기는 세포의 크기를 small, medium, large($\leq 13 \mu$ m, 14-18 μ m, $\geq 19 \mu$ m, 각각; Fig 1.)로 나누어 전방산란광(Forward light scatter)으로 분석하였고, G0+G1, S기와 G2+M기의 연속적인 비율은 EPICS XL System II software(Fig. 2)를 이용하여 계산하였다. 세포크기는 현미경적으로 측정된 세포크기를 구분하는 histogram을 사용하여 만들어졌다.

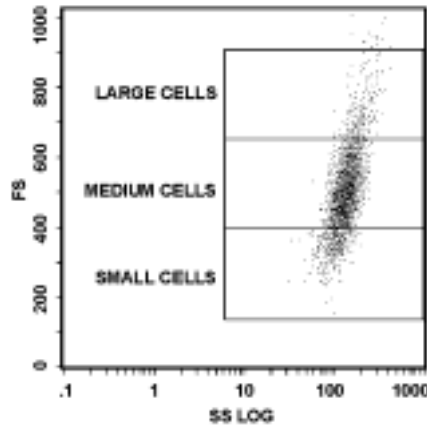


Fig 1. Scatterplot of forward light scatter (FS) versus side light scatter (SS) of cycling bovine adult skin cells allowing for gating of the viable cell population.

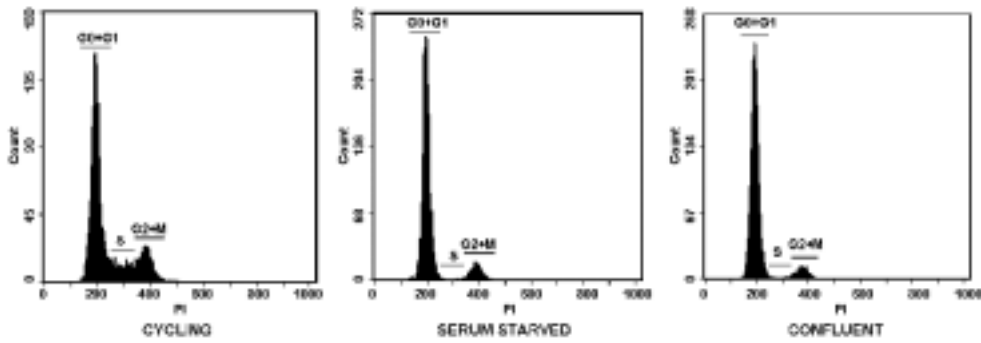


Fig 2. A typical histogram of DNA obtained using flow cytometry of bovine adult skin cells following various culture treatments.

5. 실험설계

실험 1) 배양조건과 세포의 크기가 세포주기에 미치는 영향을 검토하였다. 소 태아섬유아세포, 성숙 피부 와 근육세포 및 난구세포를 각각 cycling 배양, serum starvation 및 confluent 배양법으로 배양하여 그들의 세포주기를 분석하였다. 실험은 각 처리구당 2개의 표본을 3회씩 분석하였다.

실험 2) 세포 회수 후 배양시간에 따른 세포주기를 분석하였다. Trypsin 처리에 의해 수확된 세포는 1.5-6시간동안 배양하며 세포주기를 분석하였다. 실험은 각 처리구당 2개의 표본을 3회씩 분석하였다.

6. 통계 분석

통계분석은 SAS 프로그램에서 GLM을 사용하여 수행하였다. 처리구의 유의차 검정은 student's *t*-test를 이용하여 수행하였다.

결 과

1. 실험 1

DNA peaks (Fig. 2)에서 보이는 것과 같이, 세포의 기원에 상관없이 대부분의 세포들은 G0+G1기에 존재했다(Table 1). 그러나, 태아섬유아세포와 세 종류의 성숙 체세포를 혈청기아처리(89.5-95.4%) 하거나 confluency(89.3-95.4%) 배양했을 때 세포가

cycling 세포와 비교했을 때 유의적으로 ($P < 0.05$) 더 높은 G0+G1기 비율을 나타냈다. 반대로, cycling 세포는 세포기원에 상관없이 다른 처리구보다 S기(5.0-15.4%)와 G2+M기(11.7-17.4%)에 있어서 더 높은 비율을 나타냈다($P < 0.05$). 피부세포를 제외한 모든 세포기원에 있어서 혈청기아처리구와 confluency 구에 있어서는 세포주기의 차이가 없었다. 피부세포에서는 혈청기아처리구의 G0+G1기(93.3%)가 confluency구의 G0+G1기(90.3%)보다 근소하게 더 높은 비율을 나타냈다. trypsin 처리된 cycling 세포의 현미경 관찰에서는 세포의 직경이 $8\mu\text{m}$ 에서 $24\mu\text{m}$ 사이에 존재함을 나타냈다. 세포기원에 상관없이 small, medium, large 크기의 세포 비율을 비교했을 때 small크기의 세포비율이 혈청기아처리구가 38.5-66.9%로 cycling구(10.5-25.0%)와 confluent (25.3-46.5%)구 보다 더 높은 비율을 나타냈다(Table 2). Confluent구에서는 small 크기의 세포비율이 cycling구 보다 더 높게 나타났다.

Table 1. Percentages (\pm SD) of bovine somatic cells in the various phase of the cell cycle after a variety of culture treatments

Culture treatment	Cell cycle phase	Cell type*			
		FF	SC	MC	CC
Cycling	G0+ G1	73.3 \pm 0.9 ^a	75.3 \pm 0.7 ^a	82.9 \pm 1.5 ^a	70.5 \pm 1.7 ^a
	S	15.0 \pm 0.9 ^a	7.2 \pm 0.5 ^a	5.0 \pm 0.9 ^a	15.4 \pm 1.2 ^a
	G2+ M	11.7 \pm 1.7 ^a	17.4 \pm 1.0 ^a	12.1 \pm 0.7 ^a	14.1 \pm 0.5 ^a
Serum starvation	G0+ G1	95.4 \pm 0.3 ^b	93.3 \pm 0.3 ^b	89.5 \pm 0.9 ^b	91.1 \pm 0.4 ^b
	S	0.6 \pm 0.1 ^b	0.8 \pm 0.2 ^b	0.8 \pm 0.2 ^b	1.1 \pm 0.2 ^b
	G2+ M	4.0 \pm 0.3 ^b	6.2 \pm 0.5 ^b	9.7 \pm 1.1 ^b	7.8 \pm 0.5 ^b
Confluency	G0+ G1	95.4 \pm 0.3 ^b	90.3 \pm 2.2 ^c	89.3 \pm 0.6 ^b	92.6 \pm 0.4 ^b
	S	1.4 \pm 0.1 ^b	2.0 \pm 0.5 ^c	0.7 \pm 0.2 ^b	1.4 \pm 0.1 ^b
	G2+ M	3.2 \pm 0.3 ^b	7.8 \pm 1.9 ^b	10.0 \pm 0.6 ^b	6.1 \pm 0.3 ^b

*FF, fetal fibroblasts; SC, skin cells; MC, muscle cells; CC, cumulus cells

^{ab,c}Values with different superscripts in the same cell cycle phase and column significantly differ ($P < 0.05$)

2. 실험 2

혈청기아처리와 confluency 배양된 태아섬유아세포와 성체피부세포의 trypsin 처리 후, 1.5h(95.7-99.5%)과 3.0h(95.9-98.6%)으로 시간이 경과함에 따라 G0+G1기의 세포

비율이 유의적으로 증가했고(P<0.05) 6시간이 경과했을 때는 최초의 세포주기 수준과 유사하게 감소했다(Table 3).

Table 2. Percentages (\pm SD) of bovine cultured somatic cells in the various cell sizes after a variety of culture treatments

Cell type	Cell size	Serum		
		Cycling	starvation	Confluency
Fetal fibroblast	Small	14.0 \pm 2.9 ^a	57.2 \pm 1.2 ^b	38.3 \pm 3.3 ^c
	Medium	55.2 \pm 1.2 ^a	39.3 \pm 1.1 ^b	52.3 \pm 2.1 ^a
	Large	30.8 \pm 4.1 ^a	3.6 \pm 0.2 ^b	8.8 \pm 1.3 ^c
Adult skin	Small	25.0 \pm 2.2 ^a	62.4 \pm 1.2 ^b	34.1 \pm 0.8 ^c
	Medium	57.5 \pm 0.8 ^a	33.6 \pm 0.6 ^b	52.7 \pm 0.4 ^c
	Large	17.5 \pm 1.7 ^a	4.0 \pm 0.7 ^b	13.2 \pm 1.2 ^c
Adult muscle	Small	23.4 \pm 2.2 ^a	66.9 \pm 4.1 ^b	46.5 \pm 4.0 ^c
	Medium	62.1 \pm 0.5 ^a	28.3 \pm 3.2 ^b	48.3 \pm 3.2 ^c
	Large	14.6 \pm 0.8 ^a	4.7 \pm 0.8 ^b	5.2 \pm 0.9 ^b
Cumulus	Small	10.5 \pm 2.8 ^a	38.5 \pm 3.5 ^b	25.3 \pm 1.2 ^c
	Medium	60.5 \pm 0.6 ^a	53.3 \pm 2.6 ^b	60.6 \pm 0.7 ^a
	Large	28.9 \pm 2.2 ^a	8.2 \pm 1.0 ^b	14.1 \pm 0.6 ^c

^{a,b,c}Values with different superscripts in the same row significantly differ (P<0.05)

Table 3. Percentages (\pm SD) of bovine somatic cells in the various phase of the cell cycle at various times after release from the serum starvation or confluency

Cell type*	Culture treatment	Cell cycle phase	Time(h) after release from quiescent treatment				
			0.0	1.5	3.0	6.0	
FF	Serum starvation	G0+ G1	95.6 \pm 0.8 ^a	99.5 \pm 0.1 ^b	98.6 \pm 0.3 ^{bc}	97.5 \pm 0.2 ^{ac}	
		S	0.7 \pm 0.2 ^a	0.3 \pm 0.1 ^b	0.5 \pm 0.1 ^{ab}	0.8 \pm 0.3 ^{ab}	
	Confluency	G2+ M	3.8 \pm 0.6 ^a	0.2 \pm 0.1 ^b	0.9 \pm 0.3 ^b	1.7 \pm 0.3 ^c	
		G0+ G1	95.1 \pm 0.5 ^a	99.0 \pm 0.2 ^b	98.3 \pm 0.2 ^b	89.9 \pm 0.9 ^c	
	SC	Serum starvation	S	1.5 \pm 0.3 ^a	0.5 \pm 0.1 ^b	0.7 \pm 0.1 ^b	5.1 \pm 1.2 ^c
			G2+ M	3.3 \pm 0.3 ^a	0.5 \pm 0.1 ^b	1.1 \pm 0.2 ^b	4.9 \pm 0.4 ^c
Confluency		G0+ G1	93.3 \pm 0.5 ^a	96.4 \pm 0.5 ^b	96.0 \pm 0.5 ^b	94.2 \pm 0.1 ^a	
		S	0.8 \pm 0.1 ^a	0.7 \pm 0.2 ^a	0.7 \pm 0.2 ^a	0.7 \pm 0.1 ^a	
Confluency		G2+ M	5.9 \pm 0.4 ^b	2.8 \pm 0.6 ^b	3.3 \pm 0.6 ^b	5.1 \pm 0.1 ^a	
		G0+ G1	92.0 \pm 1.2 ^a	95.7 \pm 0.8 ^b	95.9 \pm 0.3 ^b	90.5 \pm 0.7 ^a	
Confluency	S	2.0 \pm 0.2 ^a	1.0 \pm 0.3 ^b	0.6 \pm 0.2 ^b	2.2 \pm 0.2 ^a		
	G2+ M	6.0 \pm 1.3 ^a	3.3 \pm 0.5 ^b	3.5 \pm 0.3 ^b	7.3 \pm 0.9 ^a		

*FF, fetal fibroblasts; SC, skin cells

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

고 찰

체세포를 2차 성숙분열 중기 난자의 세포질에 이식할 경우 핵이식란의 정상적인 배수성을 유지하기 위하여 donor 세포의 세포주기를 G0/G1에 동조해야 한다고 알려져 있다(Campbell 등, 1996). 그러나 G0기와 G1기 세포 중 어느 것이 더 적당한지는 알려져 있지 않다. 체세포 핵이식 연구에서 Campbell 등(1996a,b)과 Wilmut 등(1997)은 G0기 핵이 필수적이라고 한 반면, Cibelli 등(1998)과 Lai 등(2002)은 세포주기가 진행 중인 세포나 동결융해 후 비 배양세포를 사용하였다. 세포주기 진행 중인 세포의 대부분은 G1기 세포로 되어 있어 G1기 세포를 이용하여도 산자가 생산될 수 있음을 보여주었다(Cilelli 등, 1998).

돼지 태아섬유아세포(Boquest 등, 1999)와 유선세포(Prather 등, 1999)의 세포주기 분석 연구에서 G0 세포의 분포는 fluorescein isothiocyanate에 의한 단백질량의 측정에 의해 결정하였는데, 이는 G0 세포가 RNA 및 단백질량이 적을 것이라는 판단에 근거하였다(Wilmut 등, 1997). Acridine orange를 이용하여 RNA 및 DNA의 양을 측정하는 방법에

의해서도 G0기와 G1세포를 측정할 수 있다(Darzynkiewicz, 1993). 그러나, 본 연구에서는 propidium iodide염색에 기초한 유동분리방법을 사용하였기 때문에 DNA의 량에 기초하여 세포주기를 분석하였다(Darzynkiewicz, 1993).

비록 혈청기아처리법이 세포사멸을 유기할 수 있으나(Hu 등, 2001; Lee 와 Piedrahita, 2002), confluency 배양법과 함께 세포의 세포주기를 G0/G1기에 동조시키는 유용한 방법으로 활용되고 있다. 비슷한 결과가 소 피부세포(Kubota 등, 2000), 돼지 난구 세포(Cheong 등, 2000), 돼지 태아섬유아세포(Boquest 등, 1999) 및 돼지 유선세포(Prather 등, 1999)에서 보고되었다. Cycling 세포의 세포주기는 소(Kubota 등, 2000)와 돼지(Boquest 등, 1999; Prather 등, 1999)에서 G0/G1세포가 65-75%라고 한 보고와 비슷했다. 본 연구에서는 70%의 cycling 세포가 G0/G1에 속해 있었고, 특히 작은 세포(small size)의 경우는 cycling 세포라고 하더라도 90%이상이 G0/G1에 머물러 있었다. 따라서 혈청기아처리 세포나 confluent 세포뿐 아니라 cycling 세포 중 작은 세포를 사멸함으로써 핵이 식란의 발육이 증진될 수 있을 것으로 사료된다.

체세포 핵이식과정에서 trypsin 처리에 의해 수확된 세포는 핵이식 동안 일반적으로 배양 중에 두게 된다. 이 시간동안 donor 세포는 안정화되고 둥근 모양을 유지하며 세포주기가 진행된다. 휴면처리된 세포를 수확 후 1.5-3시간동안 배양할 경우 G0/G1세포의 비율이 증가하였는데, 이는 G2기나 M1의 세포가 세포주기를 진행하여 G1기로 들어간 반면, G1기에 있었던 세포는 G1기 세포주기가 길기 때문에 여전히 G1기에 남아있기 때문인 것으로 판단된다(Gadbois 등, 1992;Prather 등, 1999). 그러나 6시간까지 배양시간이 연장되면 세포주기가 계속 진행되어 S기나 G2/M기로 들어가는 세포의 비율이 증가하게 되는 것으로 판단된다.

결론적으로 본 연구의 결과는 핵이식 시 세포주기동조에 관한 적정 처리방법에 대한 정보를 제공하는 것으로, 혈청기아처리와 confluent 배양법이 소 체세포의 세포주기동조를 G0/G1기에 동조하는데 효과적이며, 핵이식을 위해서는 이 들 처리 후 세포를 제한된 시간 동안 배양하여 줌으로서 효과를 극대화 시킬 수 있다는 것을 보여준다.

요 약

본 연구는 flow cytometry를 이용하여 다양한 배양조건 하에서 배양된 소 태아 세포와 체세포의 세포주기 특성과 trypsin 처리 후 경과시간에 따른 세포주기의 변화를 검토하였다. 배양된 태아, 피부, 근육, 난구세포는 세종류의 배양조건으로 나누었다. ; 1) 70% confluency까지 배양(cycling), 2) 혈청기아처리, 3) confluency까지 배양. trypsin 처리된 세포를 70% ethanol로 고정하고 propidium iodide로 염색하였다. 실험을 위해 trypsin 처리된 세포는 DMEM+10%FBS 액으로 재부유시킨 후 ethanol로 고정하기 전 1.5, 3, 6시간 동안 가끔 흔들어주면서 배양하였다. 세포주기는 G0+G1, S, G2+M기의 비율을 계산할 수 있는 flow cytometry를 이용하여 검토하였다. 대부분의 세포가 세포기원에 관계없이 G0+G1기로 나타났다. 혈청기아 처리나 confluency까지 배양된 처리구에서 높은 비율의 G0+G1(89.5-95.4%)를 보였다. 모든 세포와 처리구에서 세포의 크기가 작아질수록 G0+G1비율이 높게 나타났다. 혈청기아처리구에서는 cycling이나 confluency 구에서보다 작은 크기의 세포(38.5-66.9%)가 많이 존재하였다($P < 0.05$). 혈청기아처리와 confluency까지 배양된 태아와 피부세포를 trypsin 처리 후에 1.5h(95.9-99.5%)와 3h(95.9-98.6%) 배양시 G0+G1기의 세포의 비율이 유의적으로 증가하였다. 그러므로 핵이식을 위한 효과적인 소 체세포의 G0+G1기 동조는 혈청기아나 confluency세포를 trypsin처리 후 제한된 시간동안 배양함으로써 이루어진다.

참고문헌

- Beththouser, J., Forsberg, E., Augenstein, M., Childs, L., Eilertsen, K., Enos, J., Forsythe, T., Golueke, P., Jurgella, G., Koppang, R., Lesmeister, T., Mallon, K., Mell, G., Misica, P., Pace, M., Pfister-Genskow, M., Strelchenko, N., Voelker, G., Watt, S., Thompson, S. and Bishop, M. 2000. Production of cloned pigs from in vitro systems. *Nat. Biotechnol.*, 18: 1055-1059.
- Boquest, A.C., Day, B.N. and Prather, R.S. 1999. Flow cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells. *Biol. Reprod.*, 60: 1013-1019.
- Campbell, K.H.S., Loi, P., Otaegui, P.J. and Wilmut, I. 1996a. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Rev. Reprod.*, 1: 40-46.
- Campbell, K.H.S., Mcwhir, J., Ritchie, W.A. and Wilmut, I. 1996b. Sheep cloned by nuclear transfer from a

- cultured cell line. *Nature*, 380: 64-66.
- Cheong, H.T., Ikeda, K., Martinez Diaz, M.A., Katagiri, S. and Takahashi, Y. 2000. Development of reconstituted pig embryos by nuclear transfer of cultured cumulus cells. *Reprod. Fertil. Dev.*, 12: 15-20.
- Cheong, H.T., Takahashi, Y. and Kanagawa, H. 1993. Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. *Biol. Reprod.*, 48: 958-963.
- Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Abel Ponce De Leon, F. and Robl, J.M. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 280: 1256-1258.
- Collas, P., Balise, J.J. and Robl, J.M. 1992. Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 46: 492-500.
- Darzynkiewicz, Z. 1993. Mammalian cell-cycle analysis. In: *The Cell Cycle: A Practical Approach*, pp. 45-68, Fantes, P. and Brooks, R. eds., Oxford University Press, New York.
- Gadbois, D.M., Crissman, H.A., Tobey, R.A. and Morton Bradbury, E. 1992. Multiple kinase arrest points in the G1 phase of nontransformed mammalian cells are absent in transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 8626-8630.
- Hill, J., Winger, Q., Jones, K., Keller, D., King, W.A. and Westhusin, M. 2000. The effect of donor cell serum starvation and oocyte activation compounds on the development of somatic cell cloned embryos. *Cloning*, 1: 201-208.
- Hu, C., Cowan, R.C., Harman, R.M., Porter, D.A. and Quirk, S.M. 2001. Apoptosis of bovine granulosa cells after serum withdrawal is mediated by Fas antigen (CD95) and Fas ligand. *Biol. Reprod.*, 64: 518-526.
- Kasinathan, P., Knott, J.G., Moreira, P.N., Burnside, A.S., Jerry, D.J. and Robl, J.M. 2001. Effect of fibroblast donor cell age and cell cycle on development of bovine nuclear transfer embryos in vitro. *Biol. Reprod.*, 64: 1487-1493.
- Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H. and Tsunoda, Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 282: 2095-2098.
- Kubota, C., Yamakuchi, H., Todoroki, J., Mizoshita, K., Tabara, N., Barber, M. and Yang X. 2000. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 990-995.

- Lai, L., Kolber-Simonds, D., Park, K.W., Cheong, H.T., Greenstein, J.L., Im, G.S., Samuel, M., Bonk, A., Rieke, A., Day, B.N., Murphy, C.N., Carter, D.B., Hawley, R.J. and Prather, R.S. 2002. Production of α -1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, 295: 1089-1092.
- Lee, C.-K. and Piedrahita, J.A. 2002. Inhibition of apoptosis in serum starved porcine embryonic fibroblasts. *Mol. Reprod. Dev.*, 62: 106-112
- Prather, R.S., Boquest, A.C. and Day, B.N. 1999. Cell cycle analysis of cultured porcine mammary cells. *Cloning*, 1: 17-24.
- 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: 369-374.
- Wells, D.N., Misica, P.M. and Tervit, H.R. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol. Reprod.*, 60: 996-1005.
- Whitfield, J.F., Boynton, A.L., Rixon, R.H. and Youdale, T. 1985. The control of cell proliferation by calcium, Ca^{2+} -calmodulin, and cyclic AMP. In: *Control of Animal Cell Proliferation*. Vol. 1, pp. 331-365, Boynton, A.L. and Leffert, H.L. eds., Academic Press, London.
- 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.
- Zakhartchenko, V., Durcova-Hills, G., Stojkovic, M., Scherthaner, W., Prella, K., Steinbor, R., Muller, M., Brem, G. and Wolf, E. 1999. Effects of serum starvation and re-cloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts. *J. Reprod. Fertil.*, 115: 325-331.

4-2. 소 체세포 핵이식기술의 효율 증진에 관한 연구

Study on the improvement of bovine somatic cell nuclear transfer technique

Abstract

This study was conducted to examine the efficiency of enucleation and effects of phytohemagglutinin-P (PHA-P) treatment and activation agent on the fusion, activation or in vitro development of bovine nuclear transfer embryos. Bovine oocytes were enucleated at 16-24 h of in vitro maturation (IVM). Adult ear skin cells treated or non-treated with PHA-P were transferred into enucleated oocytes. Reconstituted oocytes treated or non-treated with PHA-P were fused by a pulse of 1.5 kV/cm for 30 μ sec. Fused oocytes were activated with a combination of calcium ionophore (A23187) and cycloheximide (CHXM) or dimethylaminopurine (DMAP), and cultured in vitro for 7-9 days. Enucleation rate was significantly increased when oocytes were matured for 16-18 h (70.2-92.3%, $P<0.05$) compared to that of oocytes were matured for 20-24 h (44.3-53.4%). Enucleation efficiency was increased by using CB and UV light. The location of metaphase-II plate was far off from the 1st polar body as maturation time was increased. PHA-P treatment of donor cells or reconstituted oocytes significantly improved fusion rate ($P<0.05$). Cleavage and blastocyst formation rates were significantly increased after activation with a combination of A23187 and DMAP (78.6% and 32.9%, respectively) compared to those of embryos activated with a combination of A23187 and CHXM (48.5 and 15.2%, respectively). From the present result, it is suggested that high enucleation efficiency can be obtained by using oocytes matured for 18 h. It also shows that PHA-P treatment can improve the fusion rate, and activation with a combination of A23187 and DMAP can enhance the embryo development.

서 론

체세포 핵이식 기술의 효율에 영향을 주는 탈핵, 융합, 활성화와 같은 기술적인 요인들은 가장 근본적인 요인으로 인식되면서도 여전히 개선해야 할 부분이 남아 있다. 탈핵 효율을 개선하고자 하는 연구(Critser 등, 1986; Westhusin 등, 1992; Smith 등, 1993; Mohamed 등, 1999; Dominko 등, 2000; Liu 등, 2000, Yin 등, 2002)가 다양하게 시도되었으나, 현재로서는 UV 하에서 핵의 위치를 확인하면서 탈핵을 실시하는 방법(Critser 등, 1986; Westhusin 등, 1992; Smith 등, 1993; Dominko 등, 2000)이 높은 탈핵 효율을 얻을 수 있는 유일한 방법이라 해도 과언이 아니다. 그러나 이 방법은 난자에 치명적인 영향을 주어, 핵이식란의 발육저하를 가져올 수 있다는 단점이 있으므로, 제1극체를 기준으로 하여 주변의 세포질을 소량 흡입 제거하는 기존의 탈핵법을 개선하여 사용하는 것이 효과적일 수 있다.

체세포는 분할구 이식과 달리 donor 세포의 크기가 작아 전기융합 시 어려움이 따르므로 체세포 핵이식의 융합율을 높이기 위한 방법의 개선이 필요하다. Keefer 등(1994)과 Wells 등(1997)은 식물성 혈구 응집소인 PHA-P (Phytohemagglutinin-P)를 이용하거나, 재구축배의 dehydration/rehydration법을 이용하여 donor 세포와 수핵란 세포질간의 접착을 용이하게 하는 방법을 시도하기도 하였다. 반면에 체세포 핵을 수핵란의 세포질에 직접 주입하는 방법(Wakayama 등, 1998; Ogura 등, 2000)으로 낮은 융합율을 극복할 수 있으나, 융합 방법에 비해 조작이 어렵다는 단점이 있다. 일반적으로 많은 연구에서 전기융합방법이 사용되고 있다는 점을 고려할 때 세포간 접착을 유도하는 방법 등 융합율을 높이기 위한 방안이 고안되어야 한다.

수핵란의 활성화는 전기자극이나 ethanol, calcium ionophore (A23187), ionomycin 과 같은 화학적인 처리로 세포질 내 calcium 농도를 증가시켜 MPF (maturation promoting factor)의 활성을 감소시키고, 단백질합성 억제제인 cycloheximide (CHXM) (Presicce와 Yang, 1994, Liu 등, 1998b)나 Protein serine/threonin kinase (또는 인산화) 억제제인 6-dimethylaminopurine (DMAP)을 병용 처리하는 방법(Susko-Parrish 등, 1994)이 고안되었다. 그러나 CHXM과 DMAP의 작용 기작의 차이가 핵이식란의 활성화와 배 발달에 미치는 영향에 대해서는 명확하게 밝혀진 것이 없다.

본 연구에서는 수핵란의 체외성숙시간, 난구세포 제거방법, CB 처리 및 UV광원

유무에 따른 탈핵 효율, PHA-P처리에 의한 전기융합 효율 및 핵이식란의 활성화 방법을 검토함으로써 소 체세포 핵이식의 효율성을 개선하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 채취 및 성숙배양

도축장에서 회수된 난소의 난포로부터 미성숙 난자를 채취하여 난구세포가 균일하고 세포질이 균질한 것만을 선별하여 16~24시간 성숙배양하였다. 난포란의 성숙배양액은 TCM-199액 (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)에 10% FBS (Gibco-BRL), 0.2 mM Na-pyruvate, 0.02 U/ml FSH (Sigma, St. Louis, MO, USA), 1 $\mu\text{g/ml}$ 17 β -estradiol (Sigma) 및 50 $\mu\text{g/ml}$ gentamicin (Gibco-BRL)을 첨가한 것을 사용하였다.

2. 체세포의 준비

한우 암소의 귀 피부조직으로부터 체세포를 회수하여 10% FBS, 0.2 mM Na-pyruvate 및 50 $\mu\text{g/ml}$ gentamicin이 함유된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco-BRL)액 내에서 배양하여 4~6회 passage 후 동결보존 하였다가 핵이식에 사용하였다. 용해된 세포는 핵이식 전에 4-well dish에서 약 1주일간 배양하여 높은 세포 밀도(confluence 상태)를 만들어 줌으로서 G0/G1기에 동조를 유도하였다.

3. 미수정란의 탈핵

모든 미세조작은 실온에서 DIC optic과 Narishige 미세조작기가 갖춰진 도립현미경을 이용하여 cytochalasin B (CB)를 함유한 TCM-199 + 3 mg/ml BSA의 배양소적 내에서 실시하였다. 체외에서 16~24시간 체외 성숙시킨 난포란의 난구세포를 제거한 후, 세포질의 색조가 균일하고 제 1극체가 확인된 난자만을 선별하여 제 1극체와 주변의 세포질을 약 1/3정도 흡입하여 metaphase-II(M-II)기 염색체를 제거하는 방법으로 탈핵을 실시하였다. 탈핵 조작된 세포질은 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 Hoechst 33342 (Sigma)를 함유한 TCM-199액에 15분간 염색(Westhusin 등, 1992)하여 형광현미경으로 탈핵 여부를 검사하였다.

4. 핵이식, 전기융합 및 활성화

핵이식 조작은 Campbell 등(1996)의 방법에 준하여 실시하였다. 핵이식 전 일부 donor 세포 또는 융합 전 재구축배는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA-P (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)가 함유된 TCM-199 + 3 mg/ml BSA 배양액 내에서 15분간 배양한 후 이식하거나 전기융합에 공시하였다. 재구축배는 0.1 mM MgSO_4 , 0.05 mM CaCl_2 , 0.05 mg/ml BSA를 첨가한 0.3 M mannitol 용액을 넣은 wire chamber (0.5-mm 폭)에서 1.5 kV/cm의 직류 (DC) 전류를 BTX 200 세포융합장치 (BTX, San Diego, CA, USA)를 이용하여 30 μsec 간 1회 통전하여 융합을 유도하였다. 융합 후 1시간에 융합이 확인된 핵이식란은 10 μM 의 A23187 (Sigma)로 5분간 처리 후 즉시 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 CHXM (Sigma), 또는 2 mM의 DMAP (Sigma)을 함유한 체외배양액의 drop 내로 옮겨 4~5시간 동안 배양하여 활성화를 유도시켰다.

5. 핵이식란의 체외배양

활성화처리 후 핵이식란은 3 mg/ml BSA가 함유된 CR1aa 배양액의 50 μl drop으로 옮겨 5% CO_2 및 39°C의 조건 하에서 48시간 배양하면서 극체 방출 유무 및 분할율을 검사하였다. 분할된 핵이식란은 10% FBS를 함유한 CR1aa 내로 옮겨 5~7일간 추가 배양하여 배반포 형성율을 검사하였다.

6. 실험설계

실험 1) 성숙시간이 탈핵율에 미치는 영향을 검토하기 위해 미성숙란을 16, 18, 20, 22, 및 24시간 성숙 후 탈핵을 실시하였다. 또한 동일한 시간에 성숙난자를 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Hoechst 33342로 15분간 염색하여 염색체의 위치를 확인하였다. 아울러 난구세포 제거방법, CB 처리 유무, UV-light 사용 여부에 따른 탈핵율을 검토하였다. 실험 2) 융합 전 PHA-P 전처리 유무 및 처리방법이 융합율에 미치는 영향을 검토하기 위해 donor 세포 처리구와 재구축란 처리구 및 무처리구로 나누어, 각 처리구간 융합율 및 체외 발육율을 검토하였다. 실험 3) CHXM 과 6-DMAP 처리가 재구축란의 활성화와 체외발육율에 미치는 영향을 검토하였다.

7. 통계처리

실험의 결과는 Duncan 다중검정에 의해 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 난자의 성숙 시간이 탈핵효율에 미치는 영향

각 성숙시간별 염색체의 위치(Fig. 1)를 확인한 결과, 시간이 경과할수록 극체와의 거리가 떨어지는 현상을 보여, 성숙 후 16 및 18시간째는 M-II기 염색체가 각각 100% 와 65.6%(80/122)가 극체 주변(위치 1)에 존재한 반면, 20-24시간째는 11.2-15.6% 만이 극체 주변인 1번 위치에 존재하였다(Table 1). 극체 방출율은 난자의 성숙시간이 경과함에 따라 증가하여 성숙 후 24시간에 약 70%의 난자가 극체를 방출하였다. 한편, 탈핵율은 어린 난자의 경우에 유의적으로 높아, 성숙 후 16시간째 92.3%가 탈핵되었으나, 극체 방출율은 10.5%에 불과하였다($P < 0.05$). 성숙 후 18시간째는 48%(131/273)가 극체를 방출하였고, 그 중 70.2%(92/131)가 탈핵되었다(Table 2). 성숙 후 20-24시간째는 극체 방출율이 유의적으로 높은 반면, 탈핵율은 유의적으로 감소하였다($P < 0.05$).

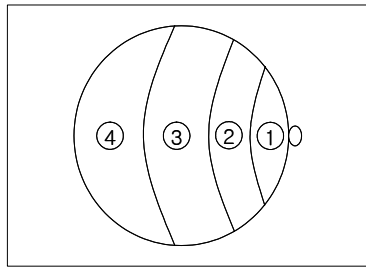


Figure 1. Diagrammatic representation of metaphase-II plate location as related to polar body (PB).

Table 1. Effect of in vitro maturation period on the location of metaphase-II (M-II) plate in bovine oocytes

Maturation period	No. of oocytes	No. (%) of oocytes with M-II plate in various location			
		1	2	3	4
16h	11	11(100.0) ^a	0(0.0) ^a	0(0.0) ^a	0(0.0) ^a
18h	122	80(65.6) ^b	30(24.6) ^b	6(4.9) ^a	6(4.9) ^a
20h	128	20(15.6) ^c	45(35.2) ^{bc}	40(31.2) ^b	23(18.0) ^b
22h	134	15(11.2) ^c	56(41.8) ^c	48(35.8) ^b	15(11.2) ^{ab}
24h	86	11(12.8) ^c	43(50.0) ^c	26(30.3) ^b	6(7) ^a

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

2. 난구세포 제거방법이 탈핵효율에 미치는 영향

탈핵 전 vortexing과 pipetting에 의한 난구세포 제거방법을 비교한 결과, pipetting에 의한 난구세포 제거 시 탈핵율이 78.8%로 vortexing법에 비하여 다소 높게 나타났으나 유의적인 차이가 없었다(Table 3). Vortexing방법이 핵의 위치를 변화시켜 탈핵율을 저하시키는 것으로 인식되고 있으나, 본 실험의 결과는 vortexing법과 pipetting법 모두 차이가 없음을 보여준다.

Table 2. Effect of in vitro maturation period on the 1st polar body extrusion and enucleation rates of bovine oocytes*

Maturation period	No. of oocytes	No. (%) of oocytes		No. (%) of total oocytes extruded 1st PB at 24 h
		Extruded 1st PB	Enucleated	
16h	124	13(10.5) ^a	12(92.3) ^a	91(73.4)
18h	273	131(48.0) ^b	92(70.2) ^b	188(68.8)
20h	226	140(61.9) ^c	62(44.3) ^c	159(70.3)
22h	225	148(65.8) ^c	62(41.0) ^c	162(72.0)
24h	171	118(70.1) ^c	62(52.0) ^c	118(70.1)

*PB: polar body

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

3. CB처리가 탈핵효율에 미치는 영향

탈핵용액 중에 CB의 존재는 난자의 탈핵율을 증진 시켜, CB-구(70.2%)에 비하여 유의적으로 높은 탈핵율(82.4%, P<0.05)을 나타내었다(Table 4). 이는 CB의 존재로 인하여 난자의 유연성이 증진되어 흡인하고자 하는 부분을 용이하게 흡인할 수 있었던 것에 기인하는 것으로 사료된다.

Table 3. Effect of the denuded method of cumulus cells on enucleation rate of bovine oocytes matured for 18 h.

Denuded method	No. of oocytes	No. (%) of oocytes enucleated
Vortexing	131	92 (70.2)
Pipetting	104	82 (78.8)

Table 4. Effect of cytochalasin B in manipulation medium on enucleation rate of bovine oocytes matured for 18 h.

Treatment	No. of oocytes	No. (%) of oocytes enucleated
+CB	108	89(82.4) ^a
-CB	110	77(70.0) ^b

^{a,b}Values with different superscripts differ (P<0.05).

4. 탈핵방법이 탈핵효율에 미치는 영향

난자를 기존의 blind 탈핵법과 UV-광원하에서 탈핵하는 방법을 비교한 결과, blind 탈핵법(70.2%)에 비하여 UV 광원 하에서의 탈핵이 난자의 탈핵율(96.4%)을 유의적으로 증가시켰다(Table 5). UV 광원 하에서는 핵의 위치를 확인하면서 탈핵 할 수 있으므로 거의 완벽하게 탈핵할 수 있으며, 핵이식 후 난자의 발육율에 영향을 주지 않는다면 핵이식 효율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

Table 5. Effect of the enucleation method on the enucleation rate of bovine oocytes matured for 18 h.

Enucleation method	No. of oocytes	No. (%) of oocytes enucleated
Blind	130	92(70.8) ^a
UV-mediated	138	133(96.4) ^b

^{a,b}Values with different superscripts differ (P<0.05).

5. PHA-P 처리가 융합율에 미치는 영향

Donor 세포 처리구(67.2%, 86/125)와 재구축란 처리구(64.5%, 78/121)간의 융합율은 유의적 차이를 보이지 않았지만 두 처리구 모두 무처리구(50.4%, 61/121)에 비해서는 유의적으로 높은 융합율을 나타내었다($P<0.05$). 배반포까지의 발육율은 21.4-25.4%로 각 처리구별 유의차는 인정되지 않았다(Table 6).

Table 6. Effect of PHA-P treatment on fusion rate and the development of nuclear transfer embryos*

Treatment	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes fused	No. (%) of embryos developed to		
			2-Cell	Morula	Blastocyst
Donor cells	125	84(67.2) ^a	50(59.5) ^a	22(26.2)	18(21.4)
Reconstituted eggs	121	78(64.5) ^a	59(75.6) ^b	22(28.2)	20(25.6)
Control	121	61(50.4) ^b	36(59.0) ^a	18(29.5)	15(24.6)

*PHA-P: Phytohemagglutinin-P

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

6. 융합 후 활성화 처리방법이 배 발달에 미치는 영향

융합 후 활성화 처리에 따른 핵이식란의 분할율 및 배반포 발육율은 A23187+DMAP 처리구가 78.6%(55/70)와 32.9%(23/70)로 A23187+CHXM 처리구(48.5%와 15.2%)에 비하여 유의적으로($P<0.05$) 높게 나타났다(Table 7).

Table 7. Effect of activation agent on the development of nuclear transfer embryos

Activation agents*	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to		
		2-Cell	Morula	Blastocyst
A23187+DMAP	70	55(78.6) ^a	26(37.1)	23(32.9) ^a
A23187+CHXM	66	32(48.5) ^b	16(24.2)	10(15.2) ^b

*DMAP: 6-dimethylaminopurine, CHXM: cycloheximide

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

고 찰

일반적으로 핵이식용 수핵란은 M-II기의 성숙난자를 이용하며 제 1 극체를 중심으로 주변의 일부 세포질을 흡입 제거하는 방법으로 탈핵을 실시한다. 수핵란의 체외성숙 시간은 탈핵 효율에 영향을 미치는 요인 중의 하나로 여겨지는데, 본 연구에서는 성숙 후 16-24 시간에 두 시간 간격으로 탈핵을 실시한 결과, 성숙시간이 20시간 이상 연장되면 탈핵 효율이 감소됨이 확인되었다. 이는 M-II기 염색체의 위치 변화와 관계가 있는 것으로 판단된다. 제 1 극체와 M-II기 염색체와의 거리는 성숙 후 시간이 경과됨에 따라 멀어진다는 보고가 있는데, 어린 난자의 경우 microfilament에 의해 감수분열 방추사와 염색체의 위치가 난자의 외곽에 유지되나, 노화된 난자의 경우 microfilament가 소실되어 염색체가 난자의 중앙으로 이동된다(Zernicka-Goetz 등, 1993). 또한, hGC 주사 후 배란된 생쥐 난자의 제 1 극체는 무작위적으로 이동하여, 단지 10%의 난자만이 제 1 극체 바로 아래 M-II기 핵이 위치한다고 보고되었다(Kono 등, 1991). 본 연구에서도 성숙시간별 제 1 극체를 기준으로 핵의 위치를 확인한 결과, 16~18시간 성숙된 난자의 염색체 위치는 제 1 극체와 근접하여 탈핵이 가장 용이 할 것으로 생각되는 1, 2번 위치에 90% 이상 존재하였으나, 성숙시간이 연장됨에 따라 제 1 극체와 염색체의 거리가 멀어졌다.

전기융합 시 수핵란 세포질과 donor 세포의 접착정도는 융합율에 영향을 미치는 것으로 여겨져, Keefer 등(1994)은 소에서 donor 세포로 ICM를 이용한 핵이식에서 탈핵된 수핵란에 ICM 세포를 삽입하기 전에 세포의 집합을 유도하는 PHA-P를 처리한 후 융합율을 비교한 결과 무처리구에 비해 융합율이 높게 나타났다. 본 실험에서는 PHA-P의 처리방법을 donor 세포 처리구와 재구축란 처리구로 나누어 융합율을 비교하였는데, 두 처리구간의 융합율에는 유의적 차이는 없었지만 무처리구에 비해서는 유의적으로 증가되었다. PHA-P 처리에 따른 핵이식란의 배반포기까지의 발육율은 유의적 차이가 없었으므로, PHA-P가 핵이식란의 배 발달에는 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다. PHA-P 이외에도 융합액 내 Ca^{2+} 농도를 1.0 mM로 높여 융합율을 높이기도 하였다(Cheong 등, 2002).

체세포 핵이식란의 활성화는 단위발생 활성화를 기초로 이루어지고 있는데, 전기 자극, ethanol 또는 A23187 등과 DMAP(Cibelli 등, 1998)이나 CHXM(Kato 등, 1998) 등의 병용처리 방법으로 체세포 핵이식에 의한 복제 소 생산에 성공하였다. 본 실험에서는 A23187 처리 후 CHXM과 DMAP 나누어 배 발달율을 비교한 결과, DMAP 처리구의 배

반포기까지의 발육율이 CHXM 처리구보다 유의적으로 높게 나타났다. 이와 같은 결과는 이전 연구자들의 보고(Liu 등, 1998; Rho 등, 1998; Lim 등, 2000)와도 일치한다. DMAP 처리가 염색체의 분리와 제 2 극체 방출을 방지하여 이배체(diploid) 활성화를 유도하는 반면(Susko-Parrish 등, 1994), CHXM은 염색체의 분리와 제 2 극체의 방출을 억제하지 못하는 것으로 여겨진다. 본 실험에서는 활성화 처리 후 염색체의 분리나 극체상 방출을 확인하지 않았지만, 소 수정란의 핵이식에서 donor 핵의 세포주기가 G1기에 동조되지 않은 경우는 활성화 후 극체상의 방출이 확인되었고(Cheong 등, 1999), 세포주기를 혈청기아 처리에 의해 G0/G1에 동조시킨 후 A23187+CHXM로 활성화 처리하였을 때도 24.5%의 극체상 방출이 확인되었다(Choi 등, 2000).

본 실험 결과는 성숙 후 18시간에 CB를 첨가한 배양액 내에서 UV-light를 이용하여 탈핵을 실시하는 것이 효과적이며, donor 세포 또는 융합 전 재구축란의 PHA-P 처리가 융합을 향상시킬 수 있고, 융합란을 A23187과 DMAP의 병용처리로 난자의 활성화 및 배반포 발육율을 향상시킬 수 있음을 나타낸다.

요 약

본 연구는 탈핵조건에 따른 탈핵효율을 검토하고, PHA-P 처리 또는 활성화방법이 소 재구축란의 융합, 활성화 또는 체외발육에 미치는 영향을 검토하였다. 미수정란은 성숙 후 16-24시간에 탈핵을 실시하고, PHA-P 처리 또는 무처리 된 귀 피부세포를 이식 후 전기융합을 실시하였다. 후자의 경우는 융합 전에 PHA-P로 15분간 배양하였다. 융합란은 A23187과 CHXM 혹은 DMAP의 병용처리에 의해 활성화를 유기하고, 7-9일간 체외 배양 하였다. 탈핵율은 성숙 후 16-18시간에 실시한 경우(70.2-92.3%)가 성숙 후 20-24시간(44.3-53.4%)에 비하여 유의적으로 높았다($P<0.05$). M-II기 염색체의 위치는 성숙배양 시간이 길어짐에 따라 제 1 극체와의 간격이 멀어졌다. 한편 탈핵효율은 CB처리 및 UV-light를 이용함으로써 향상되었다. Donor 세포 혹은 재구축란에 PHA-P를 처리한 경우는 무처리구에 비하여 융합율이 향상되었다($P<0.05$). 핵이식배의 분할율 및 배반포 발달율은 A23187+DMAP 처리구에서 78.6% 와 32.9%로, A23187+CHXM 처리구에 비하여 유의적으로 높았다($P<0.05$). 본 실험 결과는 성숙 후 18시간에 CB를 첨가한 배양액 내에서 UV-light를 이용하여 탈핵을 실시하는 것이 효과적이며, donor 세포 또는 융합 전 재구축

란의 PHA-P 처리가 융합율을 향상시킬 수 있고, 또한, 융합란을 A23187과 DMAP으로 병용처리 함으로써 난자의 활성화 및 배반포 발육율을 향상시켜, 결과적으로 핵이식기술의 효율성을 증진시킬 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- Campbell, K.H.S., McWhir, J., Ritchie, W.A. and Wilmut, I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380:64-66.
- Cheong, H.T., Park, C.K., Yang, B.K. and Kim, C.I. 1999. Cytogenetic properties of bovine reconstituted embryos by cell cycle-controlled nuclear transfer. *Korean J. Reprod.* 23:271-278.
- Cheong, H.T., Park, K.W., Im, G.S., Lai, L., Sun, Q.Y., Day, B.N., Prather, R.S. 2002. Effect of elevated Ca^{2+} concentration in fusion/activation medium on the fusion and development of porcine fetal fibroblast nuclear transfer embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 61:488-492.
- Choi, J.Y., Kwon, D.J., Kim, C.I., Park, C.K., Yang, B.K. and Cheong, H.T. 2000. Effect of quiescent treatment on nuclear remodeling and in vitro development of nuclear transfer embryos derived from bovine fetal fibroblast cells. *Korean J. Reprod.* 24:217-222.
- Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Abel Ponce de Leon, F. and Robl, J.M. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280:1256-1258.
- Critser, E.S., First, N.L. 1986. Use of a fluorescent stain for visualization of nuclear material in living oocytes and early embryos. *Stain. technol.* 61:1-5.
- Dominko, T., Chan, A., Simerly, C., Luetjens, C.M., Hewitson, L., Martinovich, C. and Schatten, G. 2000. Dynamic imaging of the metaphase II spindle and maternal chromosomes in bovine oocytes: implications for enucleation efficiency verification, avoidance of parthenogenesis, and successful embryogenesis. *Biol. Reprod.* 62:150-154.
- Im, G.S., Yang, B.S., Park, S.J., Yang, B.C., Chang, W.K. and Park, C.S.. 2000. Studies on activation regimen for nuclear transfer in Hanwoo. *Korean J. Anim. Reprod.* 24:281-288.
- Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H. and Tsunoda, Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282:2095 -2098.

- Keefe, C.L., Stice, S.L. and Matthews, D.L. 1994. Bovine inner cell mass as donor nuclei in the production of nuclear transfer embryos and calves. *Biol. Reprod.* 50:935-939.
- Kono, T., Kwon, O.Y. and Nakahara, T. 1991. Development of enucleated mouse oocytes reconstituted with embryonic nuclei. *J. Reprod. Fertil.* 93:165-172.
- Liu, L., Ju, J.C. and Yang, X. 1998. Parthenogenetic development and protein patterns of newly matured bovine oocytes following chemical activation. *Mol. Reprod. Dev.* 49:298-307.
- Liu, J.L., Wang, M.K., Sun, Q.Y., Xu, Z., Chen, D.Y. 2000. Effect of telophase enucleation on bovine somatic nuclear transfer. *Theriogenology* 54:989-998.
- Mohamed Nour, M.S. and Takahashi, Y. 1999. Preparation of young preactivated oocytes with high enucleation efficiency for bovine nuclear transfer. *Theriogenology* 51:661-666.
- Ogura, A., Inoue, K., Ogonuki, N., Nouchi, A., Takano, K., Nagano, R., Suzuki, O., Lee, J., Ishino, F. and Matsuda, J. 2000. Production of male cloned mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature Sertoli cells. *Biol. Reprod.* 62:1579-1584.
- Presicce, G.A. and Yang, X. 1994. Nuclear dynamics of parthenogenesis of bovine oocytes matured in vitro for 20 and 40 hours and activated with combined ethanol and cycloheximide treatment. *Mol. Reprod. Dev.* 37:61-68.
- Rho, G.J., Wu, B., Kawarsky, S., Leibo, S.P. and Betteridge, K.J.. 1998. Activation regimens to prepare bovine oocyte. *Mol. Reprod. Dev.* 50:485-492.
- Smith, L.C. 1993. Membrane and intracellular effects of ultraviolet irradiation with Hoechst 33342 on bovine secondary oocytes matured in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 99:39-44.
- Susko-Parrish, J.L., Leibfried-Rutledge, M.L., Northey, D.L., Schutzkus, V. and First, N.L. 1994. Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. *Dev Biol* 166:729-739.
- Wells, D.N., Misica, P.M. Day, A.M. and Tervit, H.R. 1997. Production of cloned lambs from an established embryonic cell line : A comparison between in vivo- and in vitro matured cytoplasts. *Biol. Reprod.* 57:385-393.
- Westhusin, M.W., Levanduski, M.J., Scarborough, R., Looney, C.R. and Bondioli, K.R. 1992. Viable embryos and normal calves after nuclear transfer into Hoechst stained enucleated demi-oocytes of cow. *J.*

Reprod. Fertil. 95:475-480.

Yin, X.J., Tani, T., Yonemura, I., Kawakami, M., Miyamoto, K., Hasegawa, R., Kato, Y. and Tsunoda, Y.

2002. Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes. Biol. Reprod. 67:442-446.

Zernicka-Goetz, M., Kubiak, J.Z., 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.

4-3. 세포 융합액 중의 Ca^{2+} 농도가 소 체세포 핵이식란의 융합, 핵형 및 체외발육에 미치는 영향

Effect of Ca^{2+} concentration in fusion medium on the fusion, nuclear morphology and development of bovine somatic cell nuclear transfer embryos

Abstract

This study was conducted to investigate the effect of Ca^{++} concentration in fusion medium on the fusion, nuclear morphology and the development of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. Bovine skin cells were transferred into an enucleated oocyte and fused with cytoplasm in the fusion medium containing with 0.05 to 1.0 mM $CaCl_2$. Nuclear transfer embryos were activated with a combination of A23187 and cycloheximide. Nuclear transfer embryos were fixed at 3 h after fusion or cultured for 7-8 days. Fusion rate was significantly ($P<0.01$) increased by increasing the Ca^{++} concentrations in the fusion medium from 0.05 mM (56.6%) to 0.5 mM (80.1%) and 1.0 mM (84.3%). More than 80% of reconstituted embryos underwent premature chromosome condensation (PCC) with 0.05, 0.1 mM $CaCl_2$, whereas 54.5% and 59.3% of embryos formed pronucleus (PN) directly without PCC in the 0.5 and 1.0 mM $CaCl_2$ groups. Blastocyst formation rates were significantly ($P<0.05$) different between 0.1 mM and 1.0 mM $CaCl_2$ groups. From the present result, it is suggested that the elevated Ca^{++} concentrations in fusion medium can enhance the fusion and blastocyst formation rates of bovine nuclear transfer embryos.

서 론

체세포 핵이식에 의한 복제동물 생산은 여러 가지 기술적인 요인에 의해 영향을 받을 수 있는데, 특히 핵이식과정 중, 핵과 세포질의 융합은 핵이식란의 제작에 필수적인 요소이다. 체세포 핵이식은 수정란 분할구 핵이식과 달리 donor 세포의 크기가 작기 때문에 체세포와 수핵란 세포질과의 융합에 어려움이 있다. 따라서 체세포 핵이식 시 융합을

을 높이기 위한 다양한 방법이 핵과 세포질의 전기융합 시에 적용되었다(Lavoir 등, 1997; Wells 등, 1997, 1999). Lavoir 등(1997)은 핵과 세포질간의 접촉력을 향상시키기 위해 핵이식용 배양액 내에 phytohemagglutinin-P를 첨가하였고, Wells 등(1997)은 핵을 삽입하는 동안 세포질을 dehydrate 시킨 후 융합하기 전 rehydrate 시켜 공여세포와 수핵란 세포질간의 접촉을 용이하게 하는 방법을 사용하기도 하였다. 그럼에도 불구하고 전기자극에 의한 소 체세포 핵과 세포질의 융합율은 수정란 핵의 융합율에 비하여 매우 낮아 체세포 핵이식의 효율을 저해하는 중요한 요인으로 작용하고 있다.

한편, 난자 활성화용액 내 Ca^{++} 수준이 난자의 활성화와 발달에 영향을 미치고, 부족하거나 과도한 Ca^{++} 자극은 소 단위발생란의 발달에 손상을 입힐 수 있다고 보고(Collas 등, 1993)하여, 소 체세포 핵이식 시 융합액 내 적절한 Ca^{++} 농도의 조절이 필요함을 시사하였다. 최근 돼지 핵이식 시 융합액 내 Ca^{++} 농도를 증가시켜 추가적인 활성화 처리 없이도 융합율과 배반포 형성율을 향상시킬 수 있음이 보고되었다(Cheong 등, 2002). 이는 높은 농도의 Ca^{++} 자극이 활성화를 향상 뿐 아니라 융합율 향상에도 효과적이며 핵이식란의 생산효율을 증진시킬 수 있음을 시사하는 것이다. Ca^{++} 은 핵이식란의 활성화를 유기하기 위해 대부분의 핵이식 기법에서 사용됨에도 불구하고, 단위발생란의 발달에 미치는 영향에 대해서는 많은 연구가 이루어졌으나 Ca^{++} 농도가 융합율과 핵이식란의 발달에 미치는 영향에 대한 연구는 거의 없다.

따라서, 본 연구는 소 체세포를 이용한 핵이식 시 융합액 내 Ca^{++} 농도가 소 체세포 핵이식란의 융합과 핵형의 변화, 체외발육에 미치는 영향을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 채취 및 성숙배양

도축장에서 난소를 회수하여 직경이 2-7 mm의 난포로부터 난포액을 흡입하여 미성숙 난자를 채취하여 난구세포가 균일하고 세포질이 균질한 것만을 선별하여 성숙배양에 이용하였다. 난포란의 성숙배양액은 TCM-199액(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)에 10% FBS (fetal bovine serum, Gibco-BRL), 0.2 mM Na-pyruvate, 0.02 U/ml FSH(Sigma, St. Louis, MO, USA), 1 $\mu\text{g/ml}$ 17 β -estradiol(Sigma) 및 50 $\mu\text{g/ml}$ gentamycin(Gibco-BRL)이 함유된 성숙배양액을 50 μl 의 소적으로 만들어 mineral oil로

피복하고 성숙배양 2-3 시간 전에 5% CO₂, 39°C의 조건하에서 평형 시킨 후, 각 소적 당 10개의 난포란을 넣어 18-20 시간 배양하였다.

2. 체세포의 분리, 배양 및 보존

체세포의 분리 및 배양은 Wilmut 등(1997)의 방법에 준하였다. 한우의 귀 피부조직을 안과용 가위로 잘게 썰어 15 ml 원심관에 옮겨 넣고 0.05% trypsin-EDTA (Gibco-BRL) 10 ml를 혼합하여 37°C에서 30 분간 진탕한 후 5 분간 정치하여 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액은 200 ×g로 5 분간 원심분리하여 세포를 회수하였다. 회수된 피부세포는 10% FBS, 0.2 mM Na-pyruvate 및 50 µg/ml gentamycin이 함유된 DMEM 액 3 ml에 재 부유시켜 25 ml 배양병 내에 넣어 5% CO₂ 및 39°C의 조건에서 배양하였다. 배양액은 매 3 일 간격으로 신선 배양액으로 교환하였으며, 세포가 약 90%정도 confluence 되었을 때 1:2 비율로 passage를 반복하였다. 약 4 회 정도 passage한 세포는 염색체분석에 의해 정상 염색체 수를 확인하였다. 회수된 세포는 10% DMSO 및 10% FBS를 함유한 DMEM 용액 중에 1 ×10⁵/ml 세포농도로 부유시켜 3 ml 냉동 vial에 1 ml 씩 넣어 -70°C 냉동고 내에서 overnight하여 동결한 후 LN₂용기 내에 보관하였다.

3. 체세포의 휴면처리

동결보존 된 체세포는 사용 전에 용해하여 7 ml의 세포배양액으로 200 ×g의 조건에서 5 분간 원심분리하여 세척한 다음 재 부유시켜 4-well dish에 0.5 ml씩 분주하여 5% CO₂ 및 39°C의 조건에서 배양하였다. 세포의 휴면처리는 생리적인 방법으로, 세포를 8-10 일간 장기 배양하여 높은 세포밀도(confluence 상태)를 만들어 줌으로서 G0/G1기에 동조 시킨 후 핵이식에 이용하였다.

4. 미수정란의 탈핵

체외에서 18-20 시간 체외 성숙시킨 난포란을 1 ml의 TCM-199액이 들어있는 원심관에 옮겨 vortex mixer로 5 분간 처리하여 난구세포를 제거한 후, 세포질의 색조가 균일하고 제 1 극체가 확인된 난자만을 수핵란용으로 사용하였다. 모든 미세조작은 실온에서 실시하였으며, 미수정란의 탈핵은 수정 PBS(modified phosphate buffered saline;

mPBS)액의 배양소적(50 μ l) 내에서 제 1 극체와 주변의 세포질을 약 1/3 정도 흡입하여 제 2 유사분열 중기 염색체를 제거하는 방법으로 실시하였다. 탈핵 조작된 세포질은 1 μ g/ml의 Hoechst 33342(Sigma)를 함유한 TCM-199액에 15 분간 염색(Westhusin 등, 1992)하여 형광현미경으로 탈핵 여부를 검사하였다.

5. 핵이식

핵이식 조작은 5 μ g/ml cytochalasin B(CB)가 함유된 mPBS액 내에서 Campbell 등(1996)의 방법에 준하여 실시하였다. Donor용 체세포는 위와 같은 방법으로 준비하여 0.05% trypsin-EDTA용액으로 1 분간 처리하여 pipetting에 의하여 배양접시의 저면에서 분리한 후, 200 \times g에서 5 분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 3 mg/ml BSA를 함유한 TCM-199액의 drop에 보관하여 사용하였다. Donor세포는 직접 injection pipette으로 흡입하여 탈핵을 실시한 구멍을 통하여 탈핵란 세포의 위란강 내로 주입하였다.

6. 재구축란의 전기융합 및 활성화

재구축란의 전기융합은 Cheong 등(1993)의 방법에 준하여 BTX 세포융합장치(BTX, San Diego, CA, USA) 및 0.5 mm폭의 wire chamber를 사용하여 실시하였다. 재구축란은 0.1 mM MgSO₄, 0.05, 0.1, 0.5 또는 1.0 mM CaCl₂, 0.05 mg/ml BSA를 첨가한 0.3 M mannitol 용액을 넣은 wire chamber의 양전극사이로 옮겨, pipette을 이용하여 체세포와 세포질의 접촉면이 양전극에 수평이 되도록 유도하고, 이어서 1.5 kV/cm의 직류(DC)전류를 30 μ sec 간 1 회 통전하였다. 통전 후 즉시 TCM-199 + 3 mg/ml BSA액 내에서 수회 세척 후 배지로 옮겨졌고, 융합 실시 후 30 분에 세포의 융합여부를 관찰하였다. 핵이식란의 활성화를 유기하기 위하여 융합이 확인 된 재구축란만을 융합 처리 1 시간 후에 10 μ M의 Ca⁺⁺-ionophore (A23187; Sigma)로 5 분간 처리 후 즉시 10 μ g/ml 농도의 cycloheximide(CHXM, Sigma)로 5시간 활성화를 유기 시켰으며, 핵이식란의 일부는 3 시간째 whole-mount에 공시하였다.

7. 핵이식란의 체외배양

활성화처리 후 핵이식란은 3 mg/ml BSA를 함유한 CR1aa액의 50 μ l drop으로 옮

겨 5% CO₂ 및 39°C의 조건하에서 40-42 시간 배양한 후, 분할율을 검사하였다. 핵이식란의 분할 후 10% FBS를 함유한 CR1aa 내에서 추가로 5-6 일간 배양하여 배반포 형성율을 검사하였다.

8. Whole-mount 표본의 제작

핵이식란의 PCC 여부 및 핵형을 검사하기 위하여 일부 핵이식란은 전기융합 3 시간 후에 고정하여 표본을 제작하였다. 핵이식란을 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 시간 고정한 후 aceto-orcein으로 5 분간 염색하고 25% aceto-glycerol로 세척하여 DIC가 장착된 위상차 현미경(×400)으로 핵의 형태를 관찰하였다.

9. 통계처리

실험의 결과는 LSD-test에 의하여 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 융합액 내 Ca⁺⁺농도가 재구축배의 융합에 미치는 영향

융합액 내 Ca⁺⁺ 농도(0.05-1.0 mM)에 따라 융합율을 검토한 결과, CaCl₂ 농도가 0.05 mM에서 0.5 및 1.0 mM로 증가함에 따라 융합율이 56.6%에서 80.5 및 84.3%로 유의적(P<0.01)으로 증가하였다(Fig. 1).

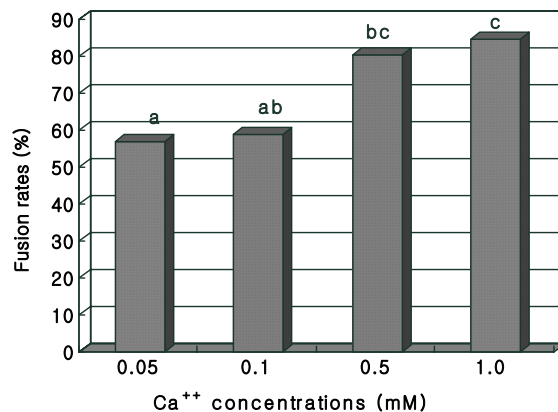


Figure 1. Effect of Ca⁺⁺ concentration in fusion medium on the fusion rate(a,b,c: P<0.01).

2. 융합액 내 Ca⁺⁺ 농도에 따른 핵형의 변화

융합액 내 Ca⁺⁺ 농도에 따른 재구축배의 핵형을 검토한 결과 CaCl₂ 농도 0.05와 0.1 mM에서는 염색체응축(premature chromosome condensation, PCC) 이후 염색질괴를 형성하는 난자의 비율이 88.4%와 84.0%로 나타난 반면, 0.5와 1.0 mM에서는 PCC 형태를 거치지 않고 융합 직후 전핵을 형성하는 난자의 비율이 54.5%와 59.3%로 나타나 융합액 내 Ca⁺⁺ 농도가 증가함에 따라 PCC 형태를 거치지 않고 전핵을 형성하는 난자의 비율이 증가하는 경향을 보였다(Table 1).

Table 1. Effect of Ca⁺⁺ concentration in fusion medium on nuclear morphology*

Ca ⁺⁺ con. (mM)	No. of NTs	Chromatin clumps (%)			NPCC (%)		Non-AC (%)
		1	2	≥3	1PN	2PN	
0.05	52	26(50.0) ^a	14(26.9) ^a	6(11.5)	4(7.7) ^b	0(0.0) ^b	2(3.8)
0.1	50	24(48.0) ^a	14(28.0) ^a	4(8.0)	5(10.0) ^b	0(0.0) ^b	3(6.0)
0.5	55	14(25.5) ^b	5(9.1) ^b	5(9.1)	29(52.7) ^a	1(1.8) ^b	1(1.8)
1.0	54	12(22.2) ^b	4(7.4) ^b	4(7.4)	28(51.9) ^a	4(7.4) ^a	2(3.7)

*NPCC, non-premature chromosome condensation; AC, activation; PN, pronucleus; NTs, nuclear transfer embryos

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

3. Ca⁺⁺ 농도에 따른 핵이식란의 발육능

융합액 내 Ca⁺⁺ 농도에 따른 상실배기 발육율에 있어서는 유의적인 차이가 나타나지 않았지만 배반포 형성율에 있어서 1.0mM CaCl₂ 에서는 배반포 발육율이 30.6%로 나타난 반면, 0.1 mM CaCl₂ 에서는 20.0%로 나타나 유의적(P<0.05)인 차이를 나타냈다 (Table 2).

Table 2. Effect of Ca^{++} concentration in fusion medium on the development of bovine nuclear transfer embryos

Ca^{++} con. (mM)	No. of NTs*	No. (%) of embryos developed to			
		2-Cell	8-Cell	Morula	Blastocyst
0.05	50	37(74.0)	24(48.0)	14(28.0)	11(22.0) ^{ab}
0.1	50	31(62.0)	19(38.0)	13(26.0)	10(20.0) ^b
0.5	50	35(70.0)	27(54.0)	16(32.0)	11(22.0) ^{ab}
1.0	49	25(51.0)	19(38.8)	16(32.7)	15(30.6) ^a

*NTs : nuclear transfer embryos

^{ab}Values with different superscripts differ ($P < 0.05$).

고찰

소 체세포를 탈핵 미수정란 세포질에 이식할 경우, 핵이식란의 발육에 영향을 주는 요인 중의 하나가 탈핵된 세포질의 활성화이다. 수핵란 세포질의 활성화를 위한 방법으로, 성숙직후의 난자에 전기자극, 에탄올처리 또는 Ca^{++} -ionophore 처리 후, 단백질 합성 억제제인 cycloheximide 나 6-DMAP(dimethylaminopurine)으로 추가 배양하여 주는 방법에 의하여 높은 활성화율을 얻을 수 있음이 확인되었으며(First 등, 1992; Presicce와 Yang, 1993), 이 조건에 의하여 난자를 이용한 핵이식에도 성공하였다(First 등, 1992; Aoyagi 와 Konish, 1994). 또한 최근 돼지 핵이식 시 융합액 내 Ca^{++} 농도를 증가시켜 추가적인 활성화 처리 없이도 융합율과 배반포 형성율을 향상시킬 수 있음이 보고되었는데(Cheong 등, 2002), 이것은 체세포 핵이식 시 융합액 내 적절한 Ca^{++} 농도의 조절이 필요하며, 비교적 높은 수준의 Ca^{++} 자극이 더 높은 융합과 활성화를 야기함으로써 핵이식란의 발달을 향상시킬 수 있음을 시사한다. 본 연구에서도 융합액 내 Ca^{++} 농도가 증가함에 따라 융합율이 증가하여 Ca^{++} 이 재구축배의 공여 체세포와 수핵란 세포질간의 접촉을 강하게 하여 융합율을 향상시킬 수 있음을 보여주었다.

본 연구에서 체세포 핵이식 후 고정 표본을 제작한 결과, 융합액 내 Ca^{++} 농도가 증가함에 따라 PCC형태를 거치지 않고 융합 직후 전핵을 형성하는 난자의 비율이 유의적으로 증가하였는데, Ca^{++} 농도의 증가가 활성화 강도를 증가시켜 세포의 융합 진행속도보다 활성화가 빠르게 진행된 결과로 보인다. 돼지 체세포 핵이식의 경우에도, Ca^{++} 농도가 증가함에 따라 PCC를 거치지 않고 직접 전핵을 형성하는 난자의 비율이 증가되었다는 비

슷한 보고가 있다(Cheong 등, 2002). 소의 핵이식의 경우, 어린 난자를 사용하므로 인해 비록 전기융합 후 추가적인 활성화 자극이 없으면 Ca^{++} 의 농도 증가에 관계없이 분할율이 저조했지만(자료 미 제시) 본 실험의 결과는 세포 외 Ca^{++} 농도의 증가가 전기자극 직후 세포 내 Ca^{++} 유입을 증가시켜 활성화를 증진시킨다는 보고(Sun 등, 1992)와 대체로 일치하는 것으로 판단된다.

본 연구에서는 소 체세포 핵이식 시 부족하거나 과도한 Ca^{++} 농도에 관해 직접적으로 실험한 바는 없으나, 1.0 mM의 $CaCl_2$ 를 융합액 내에 첨가했을 시 융합율이 유의적($P<0.01$)으로 증가했으며, 0.1과 1.0 mM에서 배반포 형성을 역시 유의적($P<0.05$)인 차이를 보여 융합액 내 1.0 mM의 Ca^{++} 농도가 소 체세포 핵이식 시 효과적이라 사료된다. 이러한 차이가 단순히 Ca^{++} 농도의 증가에 따른 활성화 강도의 증가에서 온 결과인지, 융합 후 핵형 변화의 차이에서 온 것인지는 명확하지 않다. 그러나 쥐의 경우, 활성화가 융합보다 빨리 진행되어 PCC를 거치지 않고 바로 전핵을 형성한 경우는 배반포 발육율은 증가된 반면, 염색체이상 등의 문제가 야기되는 것으로 보고되었다(Cheong 등, 1994). 반면, 소 체세포 핵이식의 경우, PCC가 일어난 일부 재구축란의 염색질이 활성화 이후 불규칙적으로 분열되어 극체상의 방출을 보이며 배반포 발육을 저해하는 것으로 나타났는데, 세포의 세포주기를 G0/G1에 동조하여도 PCC 이후 비정상적인 염색질분열 현상이 관찰되었다(최 등, 2000). 또한 생쥐에서와 달리 소 핵이식란의 초기화에 PCC가 필수적이 아닐 수 있음도 활성화 후 난자를 이용한 핵이식 실험에서 시사되었다 (Barnes 등, 1993).

결론적으로, 본 연구의 결과는 융합액 내 일정량의 Ca^{++} 농도의 증가는 소 체세포 핵이식란의 융합율을 증가시키고 융합 후 핵상 변화에 영향을 주며 핵이식란의 배반포 발육율을 향상시킬 수 있음을 시사한다.

요 약

소 체세포 핵이식 시 융합액 내 Ca^{++} 농도에 따른 융합율, 핵형의 변화, 배 발달율을 검토한 결과는 다음과 같다. 1. 융합액 내 Ca^{++} 농도를 0.05, 0.1, 0.5 및 1.0 mM로 각기 다르게 처리한 결과, 0.5 와 1.0 mM의 $CaCl_2$ 에서 융합율이 80.5 와 84.3%로 나타나 0.05 mM $CaCl_2$ 에서의 융합율 56.6%에 비하여 유의적($P<0.01$)으로 높았다. 2. 융합액 내 Ca^{++} 농도에 따른 재구축배의 핵형을 검토한 결과, $CaCl_2$ 농도 0.05와 0.1 mM 에서는

88.4와 84.0%의 난자가 PCC이후 염색질괴를 형성한 반면, 0.5와 1.0 mM 에서는 54.5와 59.3%가 PCC 형태를 거치지 않고 직접 전핵을 형성하여, Ca^{++} 농도가 증가함에 따라 PCC형태를 거치지 않고 직접 전핵을 형성하는 난자의 비율이 증가하였다. 3. 핵이식란의 체외 발육율을 검토한 결과, 1.0 mM $CaCl_2$ 에서는 배반포 발육율이 30.6%로 나타난 반면, 0.1 mM $CaCl_2$ 에서는 20.0%로 나타나 유의적($P<0.05$)인 차이를 나타냈다.

본 연구의 결과는 융합액 내 Ca^{++} 농도의 증가가 소 체세포 핵이식란의 융합율 및 배반포 발육율을 향상시킬 수 있음을 시사한다.

참고문헌

- Aoyagi, Y. and Konish, M. 1994. Studies on development into blastocyst of *in vitro* matured and artificial bovine oocytes-mixed activation method by use of electric pulse, Ca^{2+} -ionophore and cycloheximide. J. Reprod. Dev. 40:5-11.
- Barnes, F. L., Collas, P., Powell, R., King, W. A., Westhusin, M. and Shepherd, D. 1993. Influence of recipient oocytes cell cycle stage on DNA synthesis, nuclear envelop breakdown, chromosome constitution, and development in nuclear transplant bovine embryos. Mol. Reprod. Dev. 36:33-41.
- Campbell, K. H. S., Loi, P., Otaegui, P. J. and Wilmut, I. 1996. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. Rev. Reprod. 1:40-46.
- Cheong, H. T., Park, K. W., Im, G. S., Lai, L., Sun, Q. Y., Day, B. N., Prather, R. S. 2002 Effect of elevated Ca^{++} concentration in fusion/activation medium on the fusion and development of porcine fetal fibroblast nuclear transfer embryos. Mol. Reprod. Dev. in press.
- Cheong, H. T., Takahashi, Y. and Kanagawa, H. 1993. Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. Biol. Reprod. 48:958-963.
- Cheong, H. T., Takahashi, Y. and Kanagawa, H. 1994. Relationship between nuclear remodeling and subsequent development of mouse embryonic nuclei transferred to enucleated oocytes. Mol. Reprod. Dev. 37:138-145.
- Collas, P., Fissore, R., Robl, J. M., Sullivan, E. J. and Barnes, F. L. 1993. Electrically induced calcium elevation, activation, and parthenogenetic development of bovine oocytes. Mol. Reprod. Dev. 34:212-223.
- First, N. L., Leibfried-Rutledge, M. L., Northey, D. L. and Nuttleman, P. R. 1992. Use of *in vitro* matured

- oocytes 24hr of age in bovine nuclear transfer. *Theriogenology* 37:211(abstr.).
- Lavoit, M. C., Rumph, N., Moens, A., King, W. A., Plante, Y., Tohnson, W. H., Ding, J. and Betteridge, K. J. 1997. Development of bovine nuclear transfer embryos made with oogonia. *Biol. Reprod.* 56:194-199.
- Presicce, G. A. and Yang, X. 1993. Dynamics of activation of *in vitro* matured bovine follicular oocytes following combined ethanol and cycloheximide. *Mol. Reprod. Dev.* 38:380-385.
- Sun, F. Z., Hoyland, J., Huang, X., Mason, W. and Moor, R. M. 1992. A comparison of intracellular changes in porcine eggs after fertilization and electroactivation. *Development* 115:947-956.
- Wells, D. N., Misica, P. M., Day, A. M. and Tervit, H. R. 1997. Production of cloned lambs from an established embryonic cell line: A comparison between *in vivo*- and *in vitro*-matured cytoplasts. *Biol. Reprod.* 57 : 385-393.
- Wells, D. N., Misica, P. M. and Tervit, H. R. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol. Reprod.* 60:996-1005.
- Westhusin, M. E., Levanduski, M. J., Scarborough, R., Looney, C. R. and Bondioli, K. R. 1992. Viable embryos and normal calves after nuclear transfer into Hoechst stained enucleated demi-oocytes of cow. *J. Reprod. Fertil.* 95:475-480.
- 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.
- 최종엽, 권대진, 김정익, 박춘근, 양부근, 정희태. 2000. 세포의 휴면처리가 소 태아섬유아세포 유래 핵이식란의 핵상변화와 체외발육에 미치는 영향. *한국가축번식학회지* 24:217-222.

4-4. 소 체세포를 이용한 핵이식 수정란의 체외발달율과 난자 활성화 시간이 핵의 리모델링에 미치는 영향

Effect of activation time on the nuclear remodeling and *in vitro* development of nuclear transfer embryos derived from bovine somatic cells

Abstract

This study was conducted to investigate the effect of recipient activation time on the chromatin structure and development of bovine nuclear transfer embryos. Serum starved skin cells were electrofused to enucleated oocytes, activated 1-5 hr after fusion, and cultured *in vitro*. Some fused eggs were fixed at each time point after fusion without activation, or 3 h or 7 h after activation. Some nocodazole treated zygotes were fixed to analyze their chromosome constitutions. The proportion of eggs with a morphologically normal premature chromosome condensation (PCC) state increased 1-2 hr after fusion. Whereas eggs with elongated chromosome plate increased as activation time was prolonged to 3 hr, and 5 hr after fusion, 58.1% of eggs showed more than two scattered chromosome sets. The proportion of eggs with a single chromatin mass (40.6-56.7%) significantly increased when eggs were activated within 2.5 hr after fusion ($P<0.05$). Only 23.3% of reconstituted embryos activated 5 hr after fusion formed one pronucleus-like structure (PN), whereas, 64.5-78.3% of embryos activated 1-2.5 hr after fusion formed one PN. The proportion of embryos with normal chromosome constitutions decreased as activation time was prolonged. Development rates to the blastocyst stage were higher in eggs activated within 2 hr after fusion (17.3-21.7%) compared to those of others (0-8.6%, $P<0.05$). The result of the present study suggests that activation time can affect the chromatin structure and *in vitro* development of bovine nuclear transfer embryos.

서 론

유전적으로 동일한 복제동물은 대량 생산하기 위한 핵이식 기술은 초우량 가축의 대량 증식과 형질전환동물 생산을 통한 신 물질 개발, 장기이식 및 줄기세포를 이용한 세포치료에 매우 효과적인 기술로, 축산업과 의학 분야에서 산업적 이용가치가 매우 높은 기술이다. 포유동물에 있어 핵이식 기술에 의한 복제동물 생산은 Illmensee와 Hoppe(1981)가 처음으로 생쥐 수정란의 핵이식을 시도하여 산자 생산에 성공함으로써 가능성을 제시하였다. 그러나 이들의 방법은 재현이 불가능 한 것으로 판명되었고, 현재와 같은 핵이식 방법은 McGrath와 Solter(1983)가 Sendai virus를 이용한 세포융합으로 세포의 손상을 방지하여 생쥐 접합자(zygote)의 전핵치환을 통해 산자를 얻는데 성공함으로써 확립되었다. 그 후, 수정란 핵을 이식하는 방법으로 많은 동물에서 복제산자생산에 성공을 거두었고, 1997년에는 영국의 Wilmut등이 면양의 유선상피세포를 이용하여 모체와 유전형질이 동일한 복제 산자 'Dolly'를 생산함으로써, 최초로 체세포를 이용한 핵이식에 성공하였다. 이는 완전히 분화된 세포가 전능성(Totipotency)를 갖고 있으며 탈핵된 난자에 이식됨으로써 핵이 접합자와 같은 형태적, 시간적 발육양상으로 초기화(reprogramming)될 수 있음을 증명한 것이다. 그 후 태아 및 성체세포 핵이식을 이용한 복제 동물의 생산은 소(Cibelli 등, 1998; Kato 등, 1998; Wells 등, 1999), 생쥐(Wakayama 등, 1998), 산양(Baguisi 등, 1999), 돼지(Betthausen 등, 2000; Polejaeva 등, 2000) 등에서도 보고되었다. 하지만 핵이식에 의한 복제동물 생산은 높은 난산율, 유산율 및 출생 후 조기사망과 생후 조기 사망의 주 원인으로 생각되는 거대산자의 출산, 기형산자의 출산과 같은 문제들에 의해 그 효율성이 매우 저조한 실정이다.

핵이식에 의한 복제동물 생산 효율은 donor 세포의 기원, 세포주기, 활성화 처리 등과 같은 여러 가지 요인에 영향을 받는데, 특히 탈핵된 MII(Metaphase II)기 세포질에 이식된 세포의 핵은 다양한 형태적 변화를 거치게 되어, 핵이식란의 발육에 영향을 주는 것으로 여겨지고 있다(Cheong 등, 1993, 1994). 성숙촉진인자(maturation promoting factor; MPF)의 수준이 가장 높은 MII기 난자를 수핵란으로 사용했을 경우 이식된 donor의 핵막파괴(nuclear envelop break down; NEBD)가 일어난 후 미성숙 염색체 응축(premature chromosome condensation; PCC)이 일어나게 된다(Collas 등, 1992b; Cheong 등, 1994). PCC의 형태는 이식된 핵의 세포주기에 영향을 받아 궁극적으로 핵이식란의 발

육에 영향을 미치게 되는데, G1기의 핵을 이식하였을 경우에는 PCC 이후 정상적인 1개의 염색체구조를 나타내어 배반포기까지의 발육율도 향상되었으나, S기의 핵을 이식한 경우는 PCC이후 염색질의 분리 현상에 의해 비정상적인 염색체 구성을 보여 발육능이 현저히 저하된다고 보고하였다(Cheong 등, 1993). 그리고 융합 후 활성화 처리 전까지 시간, 즉 이식된 핵의 세포질 내 노출시간의 연장 또한 PCC의 형태에 영향을 미치는데, 핵이식 후 1~6시간에 활성화 처리를 하면 염색질의 분리현상이 나타나고 분리된 염색체들이 각각의 전핵(pseudo-pronuclei)으로 발달되어 배발달율이 향상된다고 보고하였다(Wakayama 등, 1998).

Metaphase에 정지된 난자의 세포질에 이식된 세포핵의 NEBD와 PCC가 일어나는 동안 이식된 핵과 수핵란의 세포질 사이에 단백질 교환이 일어나므로, 융합 후 너무 빨리 활성화 처리하는 것은 이식된 세포핵의 완벽한 remodeling을 방해하는 것으로 여겨지고 있다. 소 핵이식란의 경우 donor 세포와 MII기 난자 세포질간의 융합 후 4-8시간에 활성화 처리를 하여 이식된 핵의 세포질 내 노출시간을 연장시키면 배 발달율이 향상된다는 보고가 있고(Stice 등, 1996; Wells 등, 1998), 생쥐의 경우에도 융합 후 3~6시간에 활성화 처리를 하였을 때 배 발달율이 향상되었다(Wakayama 등, 1998). 반면, 돼지의 경우에는 이식된 핵의 세포질 내 노출시간을 4~6시간 정도로 지나치게 연장하는 것보다는 2시간 후에 활성화처리 할 때 배 발달율이 향상되었다(Koo 등, 2000). 그러나 핵 노출시간 연장에 따른 배 발달율 향상에 대한 명확한 근거를 제시한 보고가 없고, 각 실험에 이용된 동물 종과 donor 세포가 다르기 때문에 융합 후 어느 정도의 시간 연장이 핵이식란의 발육에 더 효과적인지에 대해서는 아직 명확하지 않다.

따라서, 본 연구는 체세포를 이용한 핵이식에 있어 이식된 핵의 세포질 내 노출시간이 소 체세포 유래 핵이식란의 PCC 형태와 활성화 후 염색질 구성 및 체외발육능으로 검토함으로써 수핵란의 적정 활성화 처리시간을 확립하기 위하여 수행되었다.

재료 및 방법

1. 난포란의 채취 및 성숙배양

도축장에서 도살된 암소의 난소를 회수하여 30-35℃의 생리식염수 용액에 넣어 실험실로 운반하여 직경이 2-7mm의 난포로부터 18 gauge 주사바늘이 부착된 주사기로 난

포액을 흡입하여 미성숙 난자를 채취하였다. 채취한 난자는 실체 현미경하에서 난구세포가 균일하고 세포질이 균질한 것만을 선별하여 난자성숙용 배양액(TCM-199)으로 수회 세척 후 성숙배양에 이용하였다. 난포란의 성숙배양액은 TCM-199액(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)에 10% 소태아혈청(fetal bovine serum; FBS, Gibco-BRL), 0.2mM Na-pyruvate, 0.02U/ml FSH(Sigma, St. Louis, MO, USA), 1 μ g/ml 17 β -estradiol(Sigma) 및 50 μ g/ml gentamycin(Gibco-BRL)이 함유된 성숙배양액을 50 μ l의 소적으로 만들어 mineral oil로 피복하고 성숙배양 2-3시간 전에 5% CO₂, 39 $^{\circ}$ C의 조건하에서 평형 시킨 후, 각 소적 당 10개의 난포란을 넣어 18~20시간 배양하였다.

2. 체세포의 분리, 배양 및 보존

체세포의 분리 및 배양은 Wilmut 등(1997)의 방법에 준하였다. 소에서 귀 조직을 절취하여 무균적으로 조직을 배양접시 내로 회수한 다음, 피부조직을 분리하였다. 피부조직을 안과용 가위로 잘게 썰어 15ml 원심관에 옮겨 넣고 0.05% trypsin-EDTA (Gibco-BRL) 10ml를 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 진탕한 후 5분간 정치하여 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액은 200 \times g로 5분간 원심분리하여 세포를 회수하였다. 회수된 피부세포는 10% FBS, 0.2mM Na-pyruvate 및 50 μ g/ml gentamycin이 함유된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco-BRL) 3ml에 재 부유시켜 25ml 배양병 내에 넣어 5% CO₂ 및 37 $^{\circ}$ C의 조건에서 배양하였다. 배양액은 매 3일 간격으로 신선 배양액으로 교환하였으며, 세포가 약 90%정도 confluence 되었을 때 1:2 비율로 passage를 반복하였다. 약 4회 정도 passage한 세포는 염색체분석에 의해 정상 염색체 수를 확인하였다. 세포는 4~6회 passage한 후 회수하여 10% DMSO 및 10% FBS를 함유한 DMEM 용액 중에 1 \times 10⁵/ml 세포농도로 부유시켜 3ml 냉동 vial에 1ml씩 넣어 -70 $^{\circ}$ C 냉동고에서 overnight 하여 동결한 후 LN₂용기 내에 보관하였다.

3. 체세포의 휴면처리

동결보존된 체세포는 사용 전에 용해하여 7ml의 세포배양액으로 200 \times g의 조건에서 5분간 원심분리하여 세척한 다음 재 부유시켜 4-well dish에 0.5ml씩 분주하여 5% CO₂ 및 37 $^{\circ}$ C의 조건에서 배양하였다. 세포의 휴면처리는 두 가지 방법을 사용하였다. 하

나는 혈청기아(serum starvation) 방법(Campbell 등, 1996b)으로, 세포를 세포배양액(위 2항 참조) 중에서 2~3일간 배양한 후, 0.5% FBS를 함유한 DMEM액으로 교체하여 5일간 추가 배양한 다음 핵이식에 이용하였고, 다른 하나는 생리적인 방법으로, 세포를 10일 이상 장기 배양하여 높은 세포밀도(confluence 상태)를 만들어 줌으로서 G0/G1기에 동조시킨 후 핵이식에 이용하였다.

4. 세포주기분석

Trypsin 처리 후 세포를 PBS에 재부유 시켜 500×g에서 5분 동안 원심분리하였다. 원심분리된 세포는 1ml 70%(v/v) ethanol(4℃)에 재 부유시켜 하룻밤동안 고정하였고 분석 시까지 -20℃로 유지시켰다. Ethanol 고정 후에 pellet화된 세포는 PBS액으로 즉시 세척하였고 37℃에서 30분간 200µg/ml RNase A(Boeringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany)액으로 배양하였다. 세포는 실온에서 1시간동안 50µg/ml propidium iodide 액으로 염색되었다. 염색된 세포는 flow cytometry 분석하기 전에 50µm 구멍의 nylon filter를 통과시켜 세포덩어리를 제거하였다.

세포 개개의 DNA 함량 측정에 의한 세포주기 단계는 사전에 기술된 방법(Cheong 등, 2000)으로 flow cytometry(EPICS XL-MCL, Beckman coulter Inc., FL, USA)에 의해서 결정하였다.

5. 핵이식

체외에서 18-20시간 체외 성숙시킨 난포란을 1ml의 TCM-199액이 들어있는 원심관에 옮겨 vortex mixer 로 5분간 처리하여 난구세포를 제거한 후, 세포질의 색조가 균일하고 제1극체가 확인된 난자만을 수핵란용으로 사용하였다. 모든 미세조작은 실온에서 DIC optic과 Narishige 미세조작기가 갖춰진 도립현미경을 이용하여 실시하였으며, 미수정란의 탈핵은 mineral oil로 피복된 TCM-199 + 3mg/ml BSA의 배양소적(50µl)내에서 실시하였다. 먼저 고정용 피펫(holding pipette: OD 150-200µm)으로 난자를 고정시키고, 주입용 피펫(injection pipette; ID 30µm)을 이용하여 제1극체와 주변의 세포질을 약 1/3정도 흡입하여 제2유사분열 중기 염색체를 제거하는 방법으로 탈핵을 실시하였다. 탈핵 조작된 세포질은 1µg/ml의 Hoechst 33342(Sigma)를 함유한 TCM-199액에 15분간 염색하여 형광현미

경으로 탈핵여부를 검사하여 탈핵이 확인된 미수정란만을 수핵란으로 사용하였다.

핵이식 조작은 $5\mu\text{g/ml}$ cytochalasin B(CB)가 함유된 수정 PBS(modified phosphate buffered saline; mPBS)액 내에서 Campbell 등(1996b)의 방법에 준하여 실시하였다. Donor용 체세포는 위와 같은 방법으로 준비하여 0.05% trypsin-EDTA용액으로 3분간 처리하여 pipetting에 의하여 배양접시의 저면에서 분리한 후, $200\times\text{g}$ 에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 3mg/ml BSA를 함유한 TCM-199액의 drop에 보관하여 사용하였다. Donor세포는 직접 injection pipette으로 흡입하여 탈핵을 실시한 구멍을 통하여 탈핵란 세포질의 위란강내로 주입하였다.

6. 재구축란의 전기융합 및 활성화

재구축란의 전기융합은 Cheong 등(1993)의 방법에 준하여BTX 세포융합장치(BTX, San Diego, CA, USA) 및 0.5mm폭의 wire chamber를 사용하여 전기융합을 실시하였다. 재구축란은 0.1mM MgSO_4 , 0.05mM CaCl_2 , 0.05mg/ml BSA를 첨가한 0.3M mannitol 용액을 넣은 wire chamber의 양전극사이로 옮겨, pipette을 이용하여 donor 세포와 수핵란 세포질의 접촉면이 양전극에 수평이 되도록 유도하고, 이어서 1.5kV/cm 의 직류(DC)전류를 $30\mu\text{sec}$ 간 1회 통전하였다. 통전 후 즉시 TCM-199 + 3mg/ml BSA액 내에서 수회 세척 후 배지 내에서 0.5~1시간 후에 세포의 융합여부를 관찰하였다. 융합이 확인된 핵이식란의 일부는 융합 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 5시간 후에 whole-mount에 공시하였고, 일부는 활성화를 유기하기 위해 $10\mu\text{M}$ 의 Ca^{++} -ionophore (A23187; Sigma)로 5분간 처리 후 즉시 $10\mu\text{g/ml}$ 농도의 cycloheximide(Sigma)를 함유한 체외배양액의 drop 내로 옮겨 5시간 동안 배양하여 활성화를 유기시켰으며, 핵이식란의 일부는 whole-mount에 공시하였다.

7. 핵이식란의 체외배양

활성화처리 후 핵이식란은 3mg/ml BSA가 함유된 CR1aa 배양액의 $50\mu\text{l}$ drop으로 옮겨 5% CO_2 및 39°C 의 조건하에서 72시간 배양하여, 극체방출 유무 및 분할율을 검사하였다. 핵이식란의 분할 후 10% FBS를 함유한 CR1aa내에서 5-7일간 배양하여 배반포 형성율을 검사하였다.

8. Whole-mount 표본의 제작

핵이식란의 PCC여부 및 핵상을 검사하기 위하여 일부 핵이식란은 전기융합 후 경과시간 및 CHXM처리 2.5시간 후에 고정하여 표본을 제작하였다. 핵이식란을 vaseline과 paraffin혼합물(9:1)로 사각에 소적을 배치한 slide glass 위에 소량의 배양액과 함께 옮겨 놓고 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 현미경($\times 400$)으로 핵의 형태를 관찰하였다.

9. 염색체 분석

활성화처리 후 핵이식란을 CR1aa 배양액에서 분열 전(24시간 전)까지 배양한 후 $0.5\mu\text{g/ml}$ nocodazole(Sigma)이 함유된 배양액으로 옮겨 8-12시간 배양 후 1% sodium citrate로 10분간 처리하였다. 처리된 핵이식란은 slide glass 위에 직경 1mm 이내의 소적과 함께 옮겨놓고 methanol과 acetic acid를 3:1로 혼합한 고정액으로 고정한 후, 4% Giemsa 용액으로 15분간 염색하고 immersion oil로 피복하여 위상차현미경($\times 1000$)으로 염색체의 수를 확인하였다.

10. 실험설계

실험 1) 체세포의 세포주기 분석 : 사용된 세포의 세포주기가 G0/G1기에 동조되었는지의 여부를 flow cytometry에 의해 검사하였다. **실험 2)** 융합 후 경과시간별 핵형 변화 검토 : 핵이식란을 융합 후 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 및 5시간에 whole-mount를 실시하여 융합 후 경과시간별 PCC 형태를 비교하였다. **실험 3)** 융합 후 활성화 처리 시간별 핵형 변화 검토 : 핵이식란을 융합 후 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 및 5시간에 활성화 처리 후 2.5시간째 극체방출 유무를 관찰한 후 whole-mount를 실시하여 활성화 처리 시간별 핵형변화를 비교하였다. **실험 4)** 융합 후 활성화 처리 시간별 발육율 검토 : 핵이식란을 융합 후 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 및 5시간에 활성화 처리 후 5-7일간 배양하여 융합 후 활성화 처리 시간별 분할율과 배반포 형성율을 검사하였다. **실험 5)** 핵이식란의 염색체 구성 검토 : 핵이식란을 활성화 처리시간에 따라 구분하여 1세포기 배의 염색체분석을 실시하여 활성화 처리시간이 염색체 구성에 미치는 영향을 검토하였다. **실험 6)** 융합 후 활성화 처리 시간별 핵이식란

의 전핵형성 및 형태 검토 : 핵이식란을 융합 후 2시간 및 5시간에 활성화 처리 후 6~7시간에 whole-mount를 실시하여 전핵형성 및 형태를 관찰한다.

11. 통계처리

험의 결과는 Duncan 다중검정에 의해 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 세포주기

Serum-starvation 배양 후 대부분의 세포(93.5%)가 G0/G1기에 동조되었고 S기 및 G2+M기에 존재하는 세포는 각각 1.1%와 5.4%에 불과했다(Fig. 1).

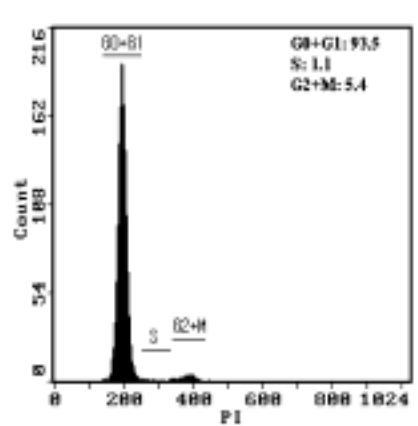


Figure 1. A typical histogram of DNA obtained using flow cytometry of serum-starved bovine ear skin cells. Histograms allow the discrimination of cell populations existing in G0+G1, S and G2+M phases of the cell cycle

2. 융합 후 시간경과가 핵이식란의 핵형변화에 미치는 영향

융합 후 시간경과에 따른 핵이식란의 핵형변화(Fig. 2)를 관찰한 결과(Table 1), 핵막이 붕괴되어 PCC가 진행 중인 I형의 발현율은 1시간 구가 58.1%로 유의적으로 가장 높게 나타났으며 시간이 경과함에 따라 점차 감소하였고, 5시간 구에서는 0%로 가장 낮은 발현율을 나타냈다($P < 0.05$). PCC가 완전히 일어나 응축된 염색체들이 한 덩어리로

뭉쳐있는 II형은 1.5시간 구에서 41.2%로 가장 높게 나타났으나 가장 낮은 발현율을 보인 5시간 구를 제외한 다른 처리구와는 유의적인 차이가 없었다($P<0.05$). PCC 후 염색체들이 넓게 흩어진 III형은 2.5시간 구(42.9%)와 3시간 구(58.8)에서 가장 높은 발현율을 나타내 다른 처리구들에 비해 유의적으로 높게 나타났고, 1시간 구에서 0.0%로 가장 유의적으로 낮게 나타났다($P<0.05$). 응축된 염색체들이 몇 개의 덩어리로 분리된 IV형은 유일하게 5시간 구에서만 58.1%의 발현율을 보이고 나머지 처리구에서는 나타나지 않았다. V형과 VI형은 각 처리구별 유의적 차이가 없었다.

Table 1. Nuclear remodeling type following time after fusion of bovine somatic cell nuclear transfer embryos*

Time post fusion(h)	No. of embryos fused	Nuclear remodeling types (%)					
		I	II	III	IV	V	VI
1	31	18(58.1) ^a	9(29.0) ^{ab}	0(0.0) ^a	0(0.0) ^a	1(3.2)	3(9.7)
1.5	34	11(32.4) ^b	14(41.2) ^a	3(8.8) ^{ab}	0(0.0) ^a	3(8.8)	3(8.8)
2	32	9(28.1) ^{bc}	11(34.4) ^{ab}	4(12.5) ^{ab}	0(0.0) ^a	2(6.3)	6(18.7)
2.5	31	4(12.9) ^{cd}	7(22.6) ^{ab}	13(41.9) ^{cd}	0(0.0) ^a	3(9.7)	4(12.9)
3	34	0(0.0) ^d	7(20.6) ^{ab}	20(58.8) ^d	0(0.0) ^a	4(11.8)	3(8.8)
5	31	0(0.0) ^d	3(9.7) ^b	9(29.0) ^{bc}	18(58.1) ^b	0(0.0)	1(3.2)

* I: condensing nucleus, II: condensed chromosome plate, III: elongated chromosome plate, IV: scattered chromosome plate, V: condensed chromatin clump following activation, VI: pronucleus-like nucleus (PN)

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

2. 융합 후 활성화 처리 시간이 핵이식란의 핵형변화에 미치는 영향

융합 1~5시간 후에 활성화를 유기한 후 2.5시간째 whole-mount를 실시하여 염색질 형태(Fig. 3) 및 전핵형성유무를 관찰한 결과(Table 2), 1개의 염색질괴(chromatin clump)를 갖는 핵이식란의 발현율은 1시간(56.7%), 1.5시간(51.6%), 2시간(48.3%), 2.5시간(40.%)이 3시간(22.3%)과 5시간(0.0%)에 비해 유의적으로 높게 나타났다($P<0.05$). 2개의 염색질괴를 보이는 핵이식란은 각 처리구별 유의적 차이가 없었고, 3개 이상의 염색질괴를 보이는 핵이식란은 5시간 구가 74.2%로 다른 처리구들에 비해 유의적으로 높게 나타났다($P<0.05$).

Table 2. Nuclear morphology of somatic cell nuclear transfer bovine embryos activated at various time after fusion*

AC time post-fusion (h)	No. of embryos fused	Nuclei morphologies (%)			
		1C	2C	≥3C	1PN
1	60	34(56.7) ^a	10(16.7)	0(0.0) ^a	16(26.7)
1.5	62	32(51.6) ^a	10(16.1)	4(6.5) ^a	16(25.8)
2	60	29(48.3) ^a	16(27.6)	0(0.0) ^a	15(25.0)
2.5	64	26(40.6) ^a	14(21.9)	6(9.4) ^a	18(28.1)
3	62	14(22.3) ^b	14(22.6)	18(29.0) ^a	16(25.8)
5	62	0(0.0) ^c	6(9.7)	46(74.2) ^b	10(16.1)

*Embryos were fixed at 3 h after initial activation (A23187 treatment). AC: activation, C: chromatin clump,

PN: pronucleus-like nucleus ^{a,b,c}Values with different superscripts in the same column differ(P<0.05).

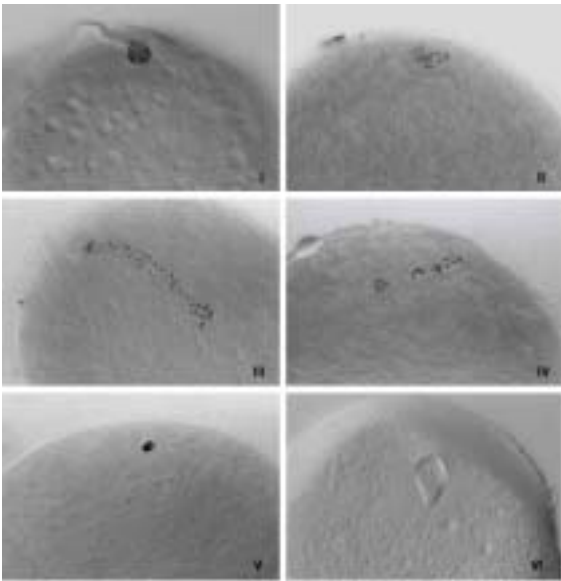


Figure 2. Nuclear remodeling types of nuclear transfer embryos. Type I: condensing chromosomes, Type II: condensed chromosome plate, Type III: elongated chromosome plate, Type IV: scattered chromosome plate, Type V: a condensed chromatin clump following activation, Type VI: pronucleus-like nucleus (400×).

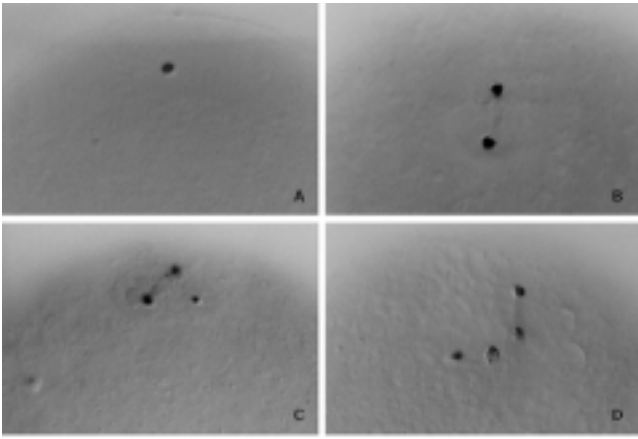


Figure 3. Nuclear morphologies of nuclear transfer bovine embryos. Embryos have one chromatin clump (A), two chromatin clumps (B), three chromatin clumps (C), or four chromatin clumps (D) in their cytoplasm, (400×).

3. 융합 후 활성화 처리 시간이 핵이식란의 전핵형성이 미치는 영향

융합 활성화 처리시간에 따른 핵이식란의 전핵형성을 관찰한 결과(Table 3), 2.5시간 이내 구에서는 정상적인 1PN 형성율이 높게 나타나는 경향을 보였으나, 3 및 5시간 구에서는 낮게 나타났으며, 특히 5시간 구에서는 전핵이 형성되지 못하고 염색질이 그대로 존재하는 것과, 전핵이 형성되었다고 극체가 방출되는 핵이식란의 비율이 높게 나타나는 경향을 보였다.

Table 3. Nuclear morphology of nuclear transfer embryos at 7h after activation treatment*

AC time Post Fusion (hr)	No. of oocytes activated	Chromatin clump		1PN (%)	1PN+ 1PB (%)	Other (%)
		(%)1PN 1C	(%) ≥2C			
1	60	3(5.0) ^a	2(3.3)	47(78.3) ^a	7(11.7) ^a	1(1.7)
1.5	63	3(4.8) ^a	3(4.8)	46(73.0) ^a	8(12.7) ^a	3(4.8)
2	62	2(3.2) ^a	6(9.7)	40(64.5) ^a	12(19.4) ^{ab}	2(3.2)
2.5	61	2(3.3) ^a	4(6.6)	40(65.6) ^a	11(18.0) ^{ab}	4(6.6)
3	60	5(8.3) ^a	4(6.7)	25(41.7) ^b	17(28.3) ^b	9(15.0)
5	60	18(30.0) ^b	4(6.7)	14(23.3) ^c	16(26.7) ^b	8(13.3)

*AC,activation; PN, pronucleus-like structure C, chromatin mass PB, polar body

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

4. 융합 후 활성화 처리 시간이 핵이식란의 염색체 구성에 미치는 영향

융합 1~5시간 후에 활성화 처리를 하여 핵이식란의 염색체 구성을 비교한 결과 (Table 4), 1, 1.5 및 2시간 구에서 정상적인 60개의 염색체를 갖는 핵이식란의 수가 높게 나타났고, 2.5시간 이후부터 60개의 염색체를 갖는 핵이식란의 수가 감소하는 경향을 보였다.

Table 4. Chromosome constitutions of nuclear transfer one cell embryos with various times of activation

AC time post-fusion (h)	No. of embryos analyzed	No. (%) of embryos with the following number of chromosomes		
		< 60	60	> 60
1	30	4(13.3) ^a	26(86.7) ^a	0(0.0)
1.5	30	6(20.0) ^a	22(73.3) ^a	2(6.7)
2	30	8(26.7) ^a	22(73.3) ^a	0(0.0)
2.5	30	12(40.0) ^{ab}	18(60.0) ^a	0(0.0)
3	30	14(46.7) ^{ab}	14(46.7) ^{ab}	2(6.7)
5	30	24(80.0) ^b	4(13.3) ^b	2(6.7)

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

5. 융합 후 활성화 처리 시간이 핵이식란의 배 발달에 미치는 영향

융합 1~5시간 후에 활성화 처리를 하여 핵이식란의 배 발달을 비교한 결과(Table 5), 분할율은 1시간 구가 86.8%로 유의적으로 가장 높게 나타났고 5시간 구에서 37.6%로 가장 낮은 분할율을 보였다(P<0.05). 배반포기까지 배 발달율은 1, 1.5, 및 2시간 구가 각각 21.7%, 17.3%, 및 19.4%로 유의적인 차이는 없었지만, 2.5, 3 및 5시간 구에 비해서는 유의적으로 높게 나타났다(P<0.05).

Table 5. In vitro development of nuclear transfer embryos activated at various times after fusion

AC* time post-fusion(h)	No. of embryos fused	No. (%) of embryos developed to		
		2-Cell	Morula	Blastocyst
1	106	92(86.8) ^a	32(30.2) ^a	23(21.7) ^a
1.5	104	80(76.9) ^{ab}	28(26.9) ^a	18(17.3) ^a
2	108	88(81.5) ^{ab}	34(31.5) ^a	21(19.4) ^a
2.5	111	83(74.8) ^{ab}	22(19.8) ^{ab}	15(7.2) ^{ab}
3	105	67(63.8) ^b	12(11.4) ^b	9(8.6) ^{bc}
5	101	38(37.6) ^c	0(0.0) ^c	0(0.0) ^c

*AC: activation

^{ab,c}Values with different superscripts in the same column differ(P<0.05).

고 찰

핵이식 과정에 있어, MPF 수준이 가장 높은 MII기 세포질에 이식된 세포핵은 다양한 형태적 변화를 거치게 되는데, 특히 NEBD와 PCC가 가장 특징적인 변화로 핵이식란의 발육에 영향을 주는 것으로 여겨지고 있다(Cheong 등, 1993, 1994). PCC의 형태는 이식된 핵의 세포주기에 의해 영향을 받게 되는데, 토끼(Collas 등, 1992b)의 경우, 탈핵된 미수정란에 이식된 G1기나 초기 S기 할구는 PCC 후 정상적인 염색체 구성을 가지나, 후기 S기 할구를 이식하면 비정상적인 염색체 구성에 의해 핵이식란의 발달율을 감소시킨다고 보고하였고, 생쥐(Cheong 등, 1993)에서도 G1기의 핵을 이식하였을 경우에는 PCC 이후 정상적인 1개의 염색체구조를 나타내어 배반포기까지의 발육율도 향상되었으나, S기의 핵을 이식한 경우는 PCC이후 염색질의 분리 현상에 의해 비정상적인 염색질 구성을 보여 발육능이 현저히 저하된다고 보고하였다. Tani 등(2001)은 활성화처리 하지 않은 탈핵된 미수정란에 난구세포를 이식한 결과 M기를 제외한 모든 세포주기의 핵들은 PCC 후 한 개나 두 개의 응축된 염색체 덩어리를 형성하고, 활성화 후 다양한 수의 전핵으로 발달되는데 형성된 전핵 수의 차이에 대한 이유는 명확하게 설명하고 있지 않다. 돼지에서 donor 세포에 따른 PCC 형태가 보고되었는데, 탈핵된 미수정란에 핵을 직접 이식한 후 1~2 시간 에 NEBD와 PCC가 완벽하게 이루어졌고, G0/G1기 핵을 이식하였을 때는 PCC 후 한 개의 염색체 덩어리가 관찰되나, G2/M기 핵을 이식하였을 때는 하나 또는 두

개의 분리된 염색체 덩어리가 관찰되었다(Lai 등, 2001).

활성화 처리 후 핵형의 변화는 donor 세포의 세포주기뿐 만 아니라 융합 후 활성화 처리 전까지 즉, 핵의 세포질 내 노출시간 또한 영향을 미치는데, 생쥐의 탈핵된 미수정란에 G1기 핵을 이식 후 1~6시간에 활성화 처리를 하면 염색질의 분리현상이 나타나고 분리된 염색질들이 극체로 방출되는 것을 방지하기 위해 CB를 처리한 결과 분리된 염색체들이 각각의 전핵(pseudo-pronuclei)으로 발달되어 배 발달율이 향상되었다는 보고가 있고(Wakayama 등, 1998), 소(Alberio 등, 2000)에서는 비록 M기의 핵을 사용하였지만 융합 3~9시간 후 PCC의 형태가 anaphase-telophase의 염색체 형태와 비슷한 응축된 염색체 두 개의 덩어리로 분리되는 것이 1~2시간에 비해 많이 나타났고, 융합 후 3~4시간, 6~7시간에 활성화 처리를 하면 극체방출에 상관없이 비정상적인 2개 이상의 염색질 피를 갖는 재구축배의 발현율이 높게 나타났다. 본 연구에서도 처리구에 따른 다양한 PCC 형태와 활성화 후 염색질의 분리 현상이 나타났는데, 실험에 사용한 donor 세포의 세포주기를 혈청기아 처리 또는 confluency 방법으로 G0/G1에 동조시켜 사용하기 때문에 이러한 현상이 세포주기에서 기인된 것이라기보다는 활성화 처리시간에서 기인된 것으로 보인다. 즉, 활성화 처리시간이 핵이식 후 핵의 형태적 변화에 영향을 미쳐, PCC 초기의 I, II형이 비교적 많은 처리구를 활성화 처리하면 1개의 염색질 피가 많이 관찰되는데 반해, 응축된 염색체가 넓게 퍼지거나 분리되는 III, IV형이 많은 처리구를 활성화 처리하면 2개 이상의 염색질 피를 갖는 핵이식란 발현율이 높게 나타나는 것으로 보아 융합 후 시간의 연장이 PCC의 형태에 영향을 주어 활성화 후 염색질의 구조에도 영향을 미치는 것으로 판단된다. 추가적으로 V(PCC followed by activation), VI(NPCC 1PN)형은 세포 휴면처리나 세포질의 활성화 시간에 관계없이 핵과 세포질간의 전기 융합 시 주어진 전기자극에 의해 융합이 진행되는 속도보다 먼저 활성화가 진행되었기 때문인 것으로 사료된다. 생쥐 핵이식의 경우, 1세포기 수정란의 탈핵 세포질에 이식한 경우 PCC가 일어나지 않고 이식된 핵이 그대로 팽화된 상태의 전핵구조를 나타내었다(Cheong 등, 1992).

핵과 세포질의 융합 후 핵의 세포질내 노출시간이 핵이식란의 발육에 영향을 미칠 수 있는 것으로 보고되었는데(Wakayama 등, 1998), 이식된 세포핵의 NEBD와 PCC가 일어나는 동안 이식된 세포와 수핵란의 세포질 사이에 단백질 교환이 일어나므로 융합 후 너무 빨리 활성화 처리하는 것은 이식된 세포핵의 완벽한 remodeling을 방해하는 것으로

여겨지고 있으며, Metaphase에 정지된 난자의 세포질에 존재하는 여러 가지 요소들은 이식된 세포핵의 remodeling과 reprogramming을 용이하게 한다는 보고(DiBerardion 등, 1984)들이 이것을 뒷받침해 주고 있다. 소 핵이식란의 경우 donor 세포와 MII기 난자의 세포질간의 융합 후 4~8시간에 활성화 처리를 하여 이식된 핵의 세포질 내 노출시간을 연장시키면 배 발달율이 향상된다는 보고가 있다(Stice 등, 1996; Wells 등, 1998). 또한 생쥐의 경우에도 핵이식과 동시에, 핵이식 후 1~3시간 내 및 3~6시간에 각각 활성화 처리한 결과, 핵이식 후 일정 시간이 경과된 후 활성화하는 것이 핵이식 즉시 실시한 경우에 비하여 높은 상실배 및 배반포기 발육율을 얻었다(Wakayama 등, 1998). 또한 Akagi 등 (2001)은 융합과 활성화 시간이 배 발달에 영향을 미친다고 보고하였는데 성숙 21시간 후에 융합하여 3시간 후에 활성화 처리한 것이 성숙 24시간 후에 융합하고 0, 3, 및 6시간 후에 활성화한 것에 비해 높은 배반포기 발육율을 얻었다. 그러나 돼지의 경우에는 이식된 핵의 세포질 내 노출시간을 4~6시간 정도로 지나치게 연장하는 것보다는 융합 2시간 후에 활성화처리 할 경우가 배 발달율이 향상되었다(Koo 등, 2000). 또한 융합 후 0~0.5와 1~2시간에 활성화한 것이 3~4시간에 활성화 처리한 것에 비해 전핵형성율은 낮게 나타났으나 이 후 배 발달에는 차이가 없어 핵의 세포질 내 노출시간의 연장이 배 발달율을 향상시키지 않는다는 보고도 있다(Park 등, 2001a).

본 연구에서도 활성화 처리시간별 분할율과 배반포 발육율에 차이가 나타났는데, 분할율은 1시간 구에서 가장 높게 나타났지만 1.5~2.5시간 구와 유의적 차이를 보이지 않았고 3시간 구부터 감소하기 시작하여 5시간 구에서는 급격하게 감소하였고, 배반포기 발육율은 1~2시간 구가 2.5~5시간 처리구에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 난자의 전핵 형성과 염색체 구성을 검사한 결과 5시간 구에서 전핵 형성이 되지 않고 염색질괴가 그대로 남아 있는 난자의 비율이 높았는데, 융합 후 지나친 시간의 연장이 전핵 형성을 제한시켜 분할율을 감소시키는 것으로 사료된다. 다양한 형태의 극체-전핵 구조는 이전에도 보고되었는데, 생쥐의 경우 G2기 핵이 이식되었을 때 PCC 후 1PN-PB의 구조를 갖는 핵이식란을 정상적인 2배체를 형성하였으나 PCC가 일어나지 않은 상태에서 1PN 형태를 취할 경우 4배체를 취한다는 보고가 있다(Cheong 등, 1994). 돼지에서도 G0/G1기를 이식한 핵이식란의 경우 1PN 구조가 많이 나타난 반면, 4C DNA를 갖고 있는 G2/M기 핵을 이식하였을 경우 정상적인 2배체의 전핵을 형성하기 위해 잔여 염색체들을 극체상으로 방출한다

는 보고가 있었다(Lai 등, 2001). 즉, G0기 또는 G1기 핵이 아닌, DNA 복제 중 또는 복제가 완료된 핵을 이식하므로 인해 이들 핵이 염색체 응축 후 분열되어 그 한편이 극체상으로 방출된 것으로 여겨진다. 하지만 본 연구에서 5시간 처리구에서 2개 이상으로 분리된 염색질들이 일부는 1개로 뭉쳐 1PN을 형성하지만 일부는 각각 1개 이상의 극체나 전핵으로 발달되는 것으로 보아 활성화 시간의 지연에 따른 염색질 분리현상이 극체 방출에 영향을 주는 것으로 사료되고 실제로, 2.5~5시간 구의 극체방출율(28.6~42.6%)이 1~2시간(22.6~27.8%)에 비해 높게 나타나는 경향을 보였다. 또한 극체방출은 염색체의 손실을 의미하는데, 각 처리구별 염색체 분석 결과 극체 방출율이 높은 2.5~5시간 처리구에서 비정상적인 염색체를 갖는 핵이식란의 비율이 높게 나타나는 경향을 보였다. 따라서 분할율과 배 발달율의 차이는 융합 후 활성화 처리까지의 시간지연이 활성화를 지연시키고 응축된 염색질들의 분리에 따른 극체방출로 인한 염색체 이상이 원인이 될 수 있음을 시사하고 있다.

요 약

본 연구는 체세포를 이용한 핵이식에 있어 이식된 핵의 세포질 내 노출시간이 소체세포 유래 핵이식란의 PCC 형태와 활성화 후 염색질 구성 및 체외발육능으로 검토함으로써 수핵란의 적정 활성화 처리시간을 확립하기 위하여 수행되었다.

정상 PCC형태는 융합 후 1-2시간이 융합 후 3시간과 5시간에 비하여 높았으며, 융합 후 5시간에는 핵이식란의 58%가 2개 이상의 흩어진 염색체상을 보였다. 활성화 후 하나의 염색질괴를 갖는 핵이식란은 융합 후 2.5시간 이내에 활성화 된 경우에 40.6~56.7%로 유의적으로 높았으며($P<0.05$), 융합 후 1-2.5시간에 활성화된 핵이식란의 64.5-78.3%가 하나의 전핵(PN)을 형성하였다. 정상적인 염색체구성을 갖는 핵이식란은 융합 후 활성화 시간이 지연됨에 따라 감소하였다. 융합 후 2시간에 활성화처리 된 핵이식란은 17.3-21.7%가 배반포로 발달하여 타 그룹(0-8.6%)에 비하여 유의적으로 높았다($P<0.05$). 본 연구의 결과를 종합해 보면, 소 체세포 유래 핵이식란의 PCC 형태는 융합 후 시간 연장에 의해 영향을 받아 다양한 형태적 변화를 거치고, 이러한 PCC의 형태는 활성화 처리 후 응축된 염색질 구조에 영향을 주게 된다. 따라서 융합 후 활성화 처리를 지연시킬 경우, 염색질 분리에 따른 극체 방출로 인해 염색체 손실이 일어나고 활성화 처리 후에도

전핵의 형성이 제한되어 분할율과 배 발달율이 떨어지는 것으로 사료된다. 따라서 융합 후 1~2시간 동안 PCC를 유도한 후 활성화 처리하여 정상적인 염색질 구조를 갖도록 함으로써 핵이식란의 배반포기까지의 발달율을 향상시킬 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- Akagi S, Yokota M, Noguchi T, Taniyama A, Fuchimoto D and Izaile Y (2001) The timing of fusion and chemical activation in nuclear transfer affects development potential of bovine embryos. *Theriogenology* 55 : 252(abstr.).
- Alberio R, Motlik J, Stojkovic M, Wolf E and Zakhartchenko V (2000) Behavior of M-phase synchronized blastomeres after nuclear transfer in cattle. *Mol. Reprod. Dev.* 57 : 37-47.
- Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempes MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overstrom EW and Echelard Y (1999) Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotech.* 17 : 456-461.
- Bethhauser J, Forsberg E, Augenstein M, Childs L, Eilertsen K, Enos J, Forsythe T, Golueke P, Jurgella G, Koppang R, Lesmeister T, Mallon K, Mell G, Misica P, Pace M, Genskow MP, Strelchenko N, Voelker G, Watt S, Thompson S and Bishop M (2000) Production of cloned pigs from in vitro systems. *Nature Biotech.* 18 : 1055-1059.
- Cheong HT, Takahashi Y and Kanagawa H (1992) Development of mouse embryonic nuclei transferred to enucleated oocytes. *Jpn. J. Vet. Res.* 40 149-159.
- Cheong HT, Takahashi Y and Kanagawa H (1993) Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. *Biol. Reprod.* 48 : 958-963.
- Cheong HT, Takahashi Y and Kanagawa H (1994) Relationship between nuclear remodeling and subsequent development of mouse embryonic nuclei transferred to enucleated oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 37 : 138-145.
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Abel Ponce de Leon F and Robl JM (1998) Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280 : 1256-1258.
- Collas P, Pinto-Correia C, Ponce De Leon FA and Robl JM (1992) Effect of donor cell cycle stage on

- chromatin and spindle morphology in nuclear transplant rabbit embryo. *Biol. Reprod.* 46 : 510-511.
- DiBerardino MA, Hoffner NJ, Etkin LD (1984) Activation of dormant genes in specialized cells. *Science* 224 : 945-952.
- Fissore RA, He CL, Vande Woude GF (1996) Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 55 : 1261-1270.
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H and Tsunoda Y (1998) Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282 : 209 -2098.
- Koo DB, Kang YK, Choi YH, Park JS, Han SK, Park IY, Kim SU, Lee KK, Son DS, Chang WK and Han YM (2000) In vitro development of recombination porcine oocyte after somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 63 : 986-992.
- Illmensee K and Hoppe PC Y (1981) Nuclear transplantation in musculus: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell* 23 : 9-18.
- Lai L, Tao T, Machaty Z, Kuhholzer B, Sun QY, Park KW, Day BN and Prather RS (2001) Feasibility of producing porcine nuclear transfer embryos by using G2/M-stage fetal fibroblasts as donors. *Biol. Reprod.* 65 : 1558 - 1564.
- McGrath J and Solter D (1983) Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science* 220 : 1300-1302.
- Park KW, Lai L, Cheong HT, Im SG, Sun QY, Wu G, Day BN and Prather RS (2000) Developmental potential nuclear transfer embryos derived from transgenic fetal fibroblasts infected with the gene for green fluorescent protein: Comparison of different fusion/activation conditions. *Biol. Reprod.* 65 : 1681-1685.
- Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A and Campbell KHS (2000) Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cell. *Nature* 407 : 86-90.
- Stice SL, Strelchenko NS, Keefer CL and Matthews L (1996) Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 54 : 100-110.
- Tani T, Kato Y and Tsunoda Y (2001) Direct exposure of chromosome to nonactivated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming. *Biol. Reprod.* 64 : 324-330.

- Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR and Yanagimachi R (1998) Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394 : 369-374.
- Wells DN, Misica PM and Tervit HR (1999) Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol. Reprod.* 60 : 996-1005.
- Wells DN, Misica PM, Tervit HR and Vivanco WH (1998) Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. *Reprod. Fertil. Dev.* 10 : 369-378
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ and Campbell KHS (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385 : 810-813.

4-5. Donor 세포의 종류 및 세포처리에 따른 소 체세포 핵이식란의 체외발육

Development of somatic cell nuclear transfer embryos following donor cell type and cell treatment in cattle

Abstract

This study was conducted to investigate the effects of donor cell type, individual, passage number and trypsinization time on the *in vitro* development of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. Three cell types (skin, muscle and cumulus cells) and cells from 3 individuals were used for nuclear transfer. Cell were passaged by 5, 15 or 30 times, and cell were trypsinized for 1 or 3 min before injection. Nuclear transfer were performed by conventional fusion method. Development rates to the blastocyst stage were not significantly different among three cell types (16.5~23.9%) and individuals (16.4~19.5%). Blastocyst formation rate of cloned embryos reconstituted with cells at passage 30 (5.8%) was significantly lower than those of embryos reconstituted with 5- and 15-passaged cells (25.3 and 23.5%, respectively, $P<0.05$). The rate of embryos developed to the blastocyst stage was higher in embryos reconstituted with cells trypsinized for 1 min (30.7%) compared to embryos reconstituted with cells trypsinized for 3min ($P<0.05$). The result of the present study indicates that different donor cell types and individuals used in this study did not affect the development of cloned bovine embryos. However, passage number and trypsinization time of donor cells affect the *in vitro* development of cloned bovine embryos.

서 론

체세포 핵이식 기술은 유전적으로 동일한 복제동물을 대량 생산하기 위한 기술로서 이미 분화가 이루어진 체세포를 탈핵된 미수정란에 이식하여 핵을 초기화 (reprogramming) 시킴으로써 새로운 수정란 및 개체로 발생시키는 기법이다. 1997년 영국의 Wilmut 등이 면양에서 최초로 체세포를 이용한 핵이식에 성공한 이 후, 면양(Schnieke

등, 1997), 소(Cibelli 등, 1998; Kato 등, 1998; Wells 등, 1999; Kubota 등, 2000), 산양(Baguisi 등, 1999) 및 돼지(Bettehauser 등, 2000; Onishi 등, 2000; Polejaeva 등, 2000; Lai 등, 2002)등 가축에서 체세포 복제에 성공하였다. 하지만 핵이식에 의한 복제동물 생산은 높은 난산율과 유산율 및 출생 후 조기사망과 생후 조기 사망의 주 원인으로 생각되는 거대산자 증후군(large offspring syndrome)등의 문제점이 미해결 상태로 남아있고 기술의 효율성도 낮은 수준에 머물러 있어 산업적 이용이 어려운 실정이다.

체세포 핵이식에 의한 복제동물 생산에서 핵이식 기술의 효율에 영향을 주는 요인에는 탈핵, 융합 및 활성화와 같은 기술적인 요인과 공여세포(donor cell)의 기원, 배양상태, 세포주기 등 세포학적 요인과, 이식된 핵의 초기화와 관련된 핵-세포질 상호작용 등을 들 수 있다. 특히, donor세포의 종류에 따라서도 복제란의 발육이 영향을 받을 수 있는 것으로 보고 되고 있다. 면양의 경우, 성숙의 유선세포 유래 복제란의 발육능이 태아세포유래 복제란에 비하여 체외발육율이 저조하였으며(Wilmot 등, 1997), 소 체세포의 경우, 난구세포 유래 복제란의 발육능이 난관상피세포 유래 복제란에 비하여 유의적으로 높은 것으로 나타났다(Kato 등, 1998). 그러나 개체의 연령에 따라서는 40일령의 태아 유래 세포와 21년령의 성숙 유래 세포를 이용한 비교 실험에서 배반포까지의 발육율에 차이가 없는 것으로 보고 되었다(Hill 등, 2000).

한편, Donor 세포의 passage 수에 따른 영향을 검토한 보고는 많지 않으나, Campbell 등(1996)은 면양의 수정란 유래 배양세포를 6-13회 passage하여 핵이식 한 결과, passage 간 발육율의 차이를 보이지 않았다. 토끼 태아세포 핵이식에서도 복제란의 분할율은 passage 수 (2-8회)에 영향을 받지 않는 것으로 나타났다(Galat 등, 1999). 그러나 donor 세포의 passage를 수십 회 이상 반복할 경우 세포의 형태 및 분할능력에 나쁜 영향을 미칠 것으로 예상되며, 그에 따른 핵이식란의 발육도 영향을 받을 것으로 사료된다. 이 외에도 핵이식 전 배양된 체세포의 회수를 위해 이용되는 trypsin 처리 시간 등에 따라서도 핵이식 후 복제란의 발달에 영향을 받을 수 있을 것으로 사료된다. 따라서, 본 연구는 체세포의 종류, 세포 제공 개체, passage 수 및 trypsinization 시간에 따른 소 체세포 핵이식란의 체외발육능을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 채취 및 성숙배양

도축장에서 회수된 난포의 난소로부터 미성숙 난자를 채취하여 난구세포가 균일하고 세포질이 균질한 것만을 선별하여 5% CO₂, 39°C의 조건하에서 18~20시간 성숙배양하였다. 난포란의 성숙배양액은 TCM-199액(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)에 10% FBS(Gibco-BRL), 0.2 mM Na-pyruvate, 0.02 U/ml FSH(Sigma, St. Louis, MO, USA), 1 µg/ml 17β-estradiol(Sigma) 및 50 µg/ml gentamicin(Gibco-BRL)을 첨가한 것을 사용하였다.

2. 체세포의 준비

피부 및 근육세포는 한우 암소의 귀 조직으로부터 회수하였고, 난구세포는 동일개체 유래의 성숙된 난자-난구세포 복합체로부터 회수하였다. 회수된 세포는 10% FBS, 0.2 mM Na-pyruvate 및 50 µg/ml gentamicin이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco-BRL)액 내에서 배양하여 약 4회 정도 passage 한 후 동결보존하였다가 핵이식에 사용하였다. 용해된 세포는 핵이식 전에 4-well dish에서 약 1주일간 배양하여 confluency 상태를 만들어 줌으로써 G0/G1기에 동조를 유도하였다.

3. 미수정란의 탈핵

모든 미세조작은 실온에서 DIC 장치와 Narishige 미세조작기가 갖춰진 도립현미경을 이용하여 mineral oil로 피복된 cytochalasin B(CB)를 함유한 TCM-199 + 3 mg/ml BSA의 배양소적(50 µl) 내에서 실시하였다. 체외에서 18~20시간 성숙시킨 난포란의 난구세포를 제거한 후, 세포질의 색조가 균일하고 제 1극체가 확인된 난자만을 선별하여 제 1극체와 주변의 세포질을 약 1/3정도 흡입하여 제 2 유사분열 중기 염색체를 제거하는 방법으로 탈핵을 실시하였다. 탈핵 조작된 세포질은 1 µg/ml의 Hoechst 33342(Sigma)를 함유한 TCM-199액에 15분간 염색(Westhusin 등, 1992)하여 형광현미경으로 탈핵여부를 검사하였다.

4. 핵이식, 전기융합 및 활성화

핵이식 조작은 Campbell 등(1996)의 방법에 준하여 실시하였다. 배양 체세포는 0.05% trypsin-EDTA용액으로 1~3분간 처리하여 pipetting에 의하여 배양접시의 저면에서 분리하여 3 mg/ml BSA를 함유한 TCM-199액의 drop에 보관하며 사용하였다. Donor 세포는 직접 injection pipette으로 흡입하여 탈핵을 실시한 구멍을 통하여 탈핵란 세포질의 위란강 내로 주입하였다.

재구축란의 전기융합은 BTX 세포융합장치(BTX, San Diego, CA, USA) 및 0.5-mm폭의 wire chamber를 이용하여 실시하였다. 재구축란은 0.1 mM MgSO₄, 0.05 mM CaCl₂, 0.05 mg/ml BSA를 첨가한 0.3 M mannitol 용액을 넣은 wire chamber의 양전극 사이로 옮겨, 1.5 kV/cm의 직류(DC)전류를 30 μ s 간 1회 통전하여 융합을 유도하였다. 융합이 확인된 핵이식란은 융합 1시간 후 10 μ M의 Ca⁺⁺-ionophore(A23187; Sigma)로 5분간 처리 후 즉시 10 μ g/ml 농도의 2 mM의 6-dimethylaminopurine (6-DMAP, Sigma)을 함유한 체외배양액의 drop 내로 옮겨 4시간 동안 배양하여 활성화를 유도하였다.

5. 핵이식란의 체외배양

활성화처리 후 핵이식란은 3 mg/ml BSA가 함유된 CR1aa 배양액의 50 μ l drop으로 옮겨 5% CO₂ 및 39°C의 조건하에서 48시간 배양하여, 극체 방출 유무 및 분할율을 검사하였다. 분할된 핵이식란은 10% FBS를 함유한 CR1aa 내로 옮겨 5~7일간 추가 배양하여 배반포 형성을 검사하였다.

6. 실험설계

실험 1) 성체 피부세포, 난구세포 및 근육세포를 이용하여 핵이식 후 세포형태별 복제란의 체외 발육능을 검토하였다. **실험 2)** 한우 3개체의 피부세포를 이용하여 핵이식 후 복제란의 개체별 체외 발육능을 검토하였다. **실험 3)** 동일 개체로부터 얻어진 피부세포를 각각 5, 15 및 30 passage 별로 나누어 핵이식하여 passage 수에 따른 복제란의 발육능을 검토하였다. **실험 4)** Donor 세포를 0.05% trypsin-EDTA용액에 각각 1분 과 3분 처리 후 핵이식하여 trypsin처리 시간에 따른 복제란의 발육능을 검토하였다.

7. 통계처리

실험의 결과는 Duncan의 다중검정 및 LSD 검정에 의해 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 체세포 종류별 핵이식

소의 피부세포, 난구세포 및 근육세포를 이용하여 핵이식 한 결과, 난구세포를 이용한 경우 2세포기(84.8%) 및 상실배(38.0%)의 발육율이 피부세포를 이용한 경우보다 유의적으로 높게 나타났으나($P < 0.05$), 배반포 발육율에서는 각각 17.9%, 23.9% 및 16.5%로 유의적인 차이가 인정되지 않았다(Table 1).

Table 1. Development of cloned bovine embryos reconstituted with different donor cell types

Type of cells*	No. of eggs fused	No. (%) of embryos developed to		
		2-Cell	Molura	Blastocyst
Skin	111	7(71.2) ^a	28(25.2) ^a	25(17.9)
Cumulus	92	78(84.8) ^b	35(38.0) ^b	22(23.9)
Muscle	115	89(77.4) ^{ab}	36(31.3) ^{ab}	19(16.5)

*Skin and muscle cells were derived from same individual, but cumulus cells were derived from another individual.

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

2. 체세포 개체별 핵이식

한우 3개체(YS, TW 및 Kuk)에서 피부세포를 회수하여 핵이식한 결과, 분할율에서는 Kuk(84.8%)으로부터 회수한 피부세포를 이용한 경우 YS(74.8%)보다 유의적으로 높은 비율을 나타냈다($P < 0.05$). 그러나 상실배기 발육율은 21.9~24.4%, 배반포 발육율은 16.4~19.5%로, 3개체 간에 유의적인 차이가 인정되지 않았다(Table 2).

Table 2. Development of cloned bovine embryos reconstituted with donor cells derived from different individuals*

Individuals	No. of eggs fused	No. (%) of embryos developed to		
		2-Cell	Molura	Blastocyst
YS	151	113(74.8) ^a	33(21.9)	27(17.9)
TW	256	207(80.8) ^{ab}	62(24.2)	50(19.5)
Kuk	269	228(84.8) ^b	62(23.0)	44(16.4)

*Skin cells derived from each individuals were used for nuclear transfer.

^{ab}Values with different superscripts differ (P<0.05).

3. Passage 수에 따른 핵이식

Donor 세포의 passage 수를 5회(P5) 와 15회(P15)까지 반복한 경우, 핵이식 후 배반포 형성율(23.5~25.3%)이 저하되지 않았으나, 30회(P30)까지 반복 하였을 경우에는 P5 및 P15에 비하여 유의적(P<0.05)으로 낮은 배반포 형성율(5.8%)을 나타내었다(Table 3). 또한 passage를 오래 반복할 경우에는 세포의 doubling time 및 형태에 나쁜 영향을 미치는 것으로 나타났다(미제시).

Table 3. Effect of passage number of donor cells on the development of cloned bovine embryos*

No. of Passage	No. of eggs fused	No. (%) of embryos developed to		
		2-Cell	Molura	Blastocyst
P 5	142	125(88.0)	53(37.3) ^a	36(25.3) ^a
P15	136	116(85.3)	46(33.8) ^{ab}	32(23.5) ^a
P30	138	112(81.2)	28(20.3) ^b	8(5.8) ^b

*Skin cells derived from same individual were used for nuclear transfer.

^{ab}Values with different superscripts in the same column differ (P<0.05).

4. 체세포의 trypsinization 시간에 따른 핵이식

동일개체의 체세포를 0.05% trypsin-EDTA 용액으로 각각 1분과 3분간 처리 한 결과, 1분간 처리 하였을 때(30.7%)가 3분간 처리 하였을 때(19.2%) 보다 배반포 형성율이

유의적으로 높게 나타났다($P < 0.05$). 한편, trypsin으로 1분간 처리 하였을 때의 융합율 (43.8%) 보다 3분간 처리 하였을 때가 51.7%로 다소 높은 융합율을 나타냈지만 유의적인 차이는 없었다(Table 4).

Table 4. Effect of trypsinization time of donor cells on the development of cloned bovine embryos*

Trypsinization time	No. of eggs manipulated	No. (%) of eggs fused	No. (%) of embryos developed to		
			2-Cell	Molura	Blastocyst
1 min	255	127(49.8)	115(90.6)	53(41.7) ^a	39(30.7) ^a
3 min	292	151(51.7)	126(83.4)	46(30.5) ^b	29(19.2) ^b

*Skin cells derived from same individual were used for nuclear transfer.

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

고 찰

체세포를 이용한 복제동물 생산 연구에서 배유래 세포, 섬유아세포, 유선세포, 난구 세포, 백혈구, 과립 세포, 생식세포, 간세포와 같이 다양한 형태의 세포가 donor세포로 이용되어져 왔다(Brem 등, 2002). 그러나 이러한 세포 중 어떤 것이 핵이식에 이용 시 가장 높은 성공률을 보이는지는 아직 명확하지 않다. Kato 등 (2000)은 소의 성체, 신생아와 암수 태아 유래의 다양한 체세포를 이용한 핵이식 실험에서 배반포 발육율은 태아 근육세포와 성체 간세포의 극단적인 경우를 제외하고는 유의적인 차이가 없음을 보고하였다. 이와 유사한 결과가 생쥐의 다른 종, 성별 및 나이에 따른 다양한 형태의 세포를 이용하였을 때 나타났다(Wakayama 등, 2001). 그러나 Kato 등 (1998)이 진행한 최초의 체세포 복제 소 생산 연구에서 난구세포가 난관세포에 비하여 배반포 발육율이 높은 것으로 보고하고 있어 세포의 종류에 따른 발육능의 차이가 어느 정도 인정된다고 판단된다. 다만, 본 연구에서는 체세포의 종류에 따른 복제 수정란의 생산에서 피부세포, 난구세포 및 근육세포의 핵이식 결과, 유의적인 차이를 나타내지 않았으며 타 세포에 대한 난구세포의 비교 우위도 확인할 수 없었다. 한편, 본 연구에서는 개체간의 비교에 있어서도 동일한 종류의 세포를 사용할 경우에는 핵이식란의 발육율에 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나 Kato 등 (1998)의 연구 결과에서 보듯이 동일개체의 세포 line 간에도 발육능에 차이가 있는 점

으로 볼 때 개체 간 차이도 존재할 수 있는 것으로 판단된다.

Donor 세포의 유전적 손상은 체외에서 계대 배양하는 동안에 발생 할 수 있다. 그래서 신선 세포 또는 단기간 배양(<10 passage)한 donor 세포가 복제동물 생산을 위해 주로 사용되어 왔다(Wilmut 등, 1997; Cibelli 등, 1998; Chesne 등, 2002). 그러나 Kubota 등 (2000)은 10회 또는 15회 계대 배양한 소 체세포 유래 핵이식란이 5회 계대 배양된 세포 유래 난자보다 배반포 형성율이 더 높았다고 보고하였다. Arat 등 (2001)도 소의 과립 세포를 15회 계대 배양한 경우 10~13회 계대 배양된 경우 보다 복제란의 발육율이 더 높았다고 보고하였다. 본 연구에서는 Donor 세포의 passage 수가 15회까지는 발육능에 차이가 없어 위의 연구들과 다소 다른 결과를 보였다. 또한, passage를 30회 까지 반복할 경우에는 발육능이 유의적으로 저하되었고, 세포의 형태에도 악 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 본 연구에서 판단 지표로 삼은 passage 수는 세포의 population doubling(PD)과는 일치하지 않으며, 실제 PD 수는 passage 수의 2~3배에 이를 것으로 추산된다. 따라서 P30의 경우는 이미 세포의 수명이 한계에 이른 것으로 판단되며, 이러한 이유로 핵이식 후 복제란의 발육능이 저하된 것으로 사료된다.

배양 중인 세포에 trypsin 처리시간의 영향을 검토한 연구 결과는 아직 보고 되지 않았다. 세포의 trypsin 감수성이 똑같고 모든 세포가 똑같은 시간의 trypsin 처리로 분리가 된다면 문제는 없지만, 동일한 세포 주에서도 개개의 세포에 따라 trypsin 감수성에 차이가 있을 수 있기 때문에 trypsin 처리가 불충분하면 비교적 접착력이 강한 세포집단은 회수가 어렵고 접착력이 약한 세포만 회수가 가능하다. 반대로, 강하게 접착한 세포가 완전히 분리되기까지 trypsin 처리를 지속한다면 trypsin 감수성이 높아, 이미 떨어져 나온 세포는 trypsin에 의해 세포막의 소화가 진행될 것이다. 따라서 trypsin 처리 시간을 연장하여 대부분의 세포를 회수하려고 할 경우 오히려 핵이식란의 발육에 나쁜 영향을 미칠 수 있는 것으로 사료된다.

결론적으로, 본 연구의 결과는 소 체세포 핵이식란의 발육이 체세포의 종류 및 세포 제공 개체에 따라서는 영향을 받지 않으나, passage 수 및 체세포의 trypsinization 시간에 따라서는 영향을 받을 수 있음을 시사한다. 따라서 donor 세포는 passage 수가 15회를 넘지 않는 체세포를 되도록 짧은 시간 동안 trypsin 처리하여 회수한 후 사용하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 체세포의 종류, 세포 제공 개체, 계대배양 수 및 세포의 trypsin 처리시간이 소 체세포 핵이식란의 체외발육에 미치는 영향을 검토하였다. 세 종류의 체세포(피부, 근육 및 난구세포)와 암소 3 개체를 실험에 공시하였으며, 한 개체 유래의 피부세포는 5-30회 계대배양 하였고, 핵이식 전에 1-3분간 trypsin 처리하여 핵이식에 사용하였다. 핵이식과정은 상법에 따라 전기융합법을 이용하였다. 핵이식란의 배반포 발육율은 세포의 종류(16.5~23.9%)나 개체 간(16.4~19.5%)에 차이가 없으나, 30회 계대 배양한 세포를 사용한 경우(5.8%)에는 5회(25.3%) 또는 15회(23.5%) 계대 배양한 세포를 사용한 경우에 비해 유의적으로 낮았다($P < 0.05$). 또한, 1분간 trypsinization 한 세포를 사용한 경우(30.7%)는 3분간 trypsinization 한 경우에 비해 배반포 발육율이 유의적으로 높게 나타났다($P < 0.05$). 본 연구의 결과는 소 체세포 핵이식란의 발육이 체세포의 종류 및 세포 제공 개체에 따라서는 영향을 받지 않으나, passage 수 및 체세포의 trypsinization 시간에 따라서는 영향을 받을 수 있음을 시사한다.

참고문헌

- Arat, S., Rzuclidlo, S. J., Gibbons, J., Miyoshi, K. and Stice, S. L. 2001. Production of transgenic bovine embryos by transfer of transfected granulosa cells into enucleated oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 60:20-26.
- Baguisi, A., Behboodi, E., Melican, D. T., Pollock, J. S., Destrempe, M. M., Cammuso, C., Williams, J. L., Nims, S. D., Porter, C. A., Midura, P., Palacios, M. J., Ayres, S. L., Denniston, R. S., Hayes, M. L., Ziomek, C. A., Meade, H. M., Godke, R. A., Gavin, W. G., Overstrom, E. W. and Echelard, Y. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotech.* 17:456-461.
- Bethhauser, J., Forsberg, E., Augenstein, M., Childs, L., Eilertsen, K., Enos, J., Forsythe, T., Golueke, P., Jurgella, G., Koppang, R., Lesmeister, T., Mallon, K., Mell, G., Misica, P., Pace, M., Genskow, M. P., Strelchenko, N., Voelker, G., Watt, S., Thompson, S. and Bishop, M. 2000. Production of cloned pigs from *in vitro* systems. *Nature Biotech.* 18:1055-1059.
- Brem, G. and Kuhholzer, B. 2002. The recent history of somatic cloning in mammals. *Cloning Stem Cells* 4:57-63.

- Campbell, K. H. S., McWhir, J., Ritchie, W. A. and Wilmut, I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380:64-66.
- Chesne, P., Adenot, P. G., Vigilietta C., Baratte, M., Boulanger, L. and Renard, J. P. 2002. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature Biotech.* 20:366-369.
- Cibelli, J. B., Stice, S. L., Golueke, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C., Abel Ponce de Leon, F. and Robl, J. M. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280:1256-1258.
- Galat, V. V., Lagutina, I. S., Mesina, M. N., Chernech, V. J. and Prokofiev, M. I. 1999. Developmental potential of rabbit nuclear transfer embryos derived from donor fetal fibroblast. *Theriogenology* 51:203 (abstr.).
- 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 embryos derived from adult and fetal cells. *Biol. Reprod.* 62:1135-1140.
- Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H. and Tsunoda, Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282:2095-2098.
- Kato, Y., Tani, T. and Tsumoda, 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.
- Kubota, C., Yamakuchi, H., Todoroki, J., Mizoshita, K., Tabara, N., Barber, M. and Yang, X. 2000. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:990-995.
- Lai, L., Kolber-Simonds, D., Park, K. W., Cheong, H. T., Greenstein, J. L., Im, G. S., Samuel, M., Bonk, A., Rieke, A., Day, B. N., Murphy, C. N., Carter, D. B., Hawley, R. J. and Prather, R. S. 2002. Production of α -1,3- galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295:1089-1092.
- 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.
- Polejaeva, I. A., Chen, S. H., Vaught, T. D., Page, R. L., Mullins, J., Ball, S., Dai, Y., Boone, J., Walker, S., Ayares, D. L., Colman, A. and Campbell, K. H. S. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407:86-90.

- Schnieke, A. E., Kind, A. J., Ritchie, W. A., Mycock, K., Scoot, A. R., Ritchie, M., Wilmut, I., Colman, A. and Campbell, K. H. S. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 278:2130-2133.
- Wakayama, T. and Yanagimachi, R. 2001. Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type. *Mol. Reprod. Dev.* 58:376-383.
- Westhusin, M. E., Levanduski, M. J., Scarborough, R., Looney, C. R. and Bonodioli, K. R. 1992. Viable embryos and normal calves after nuclear transfer into Hoechst stained enucleated demi-oocytes of cow. *J. Reprod. Fertil.* 95:475-480.
- 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.
- Wells, D. N., Misica, P. M. and Tervit, H. R. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cell. *Biol. Reprod.* 60:996-1005.

4-6. Demecolcine 처리에 의한 탈핵과 수핵란 세포질의 세포주기가 소 핵이식란의 발육에 미치는 영향

Effects of demecolcine-assisted enucleation and recipient cell cycle stage on the development of nuclear transfer bovine embryos

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 $\mu\text{l/ml}$ 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 can use for NT

서 론

체세포 핵이식에 의한 복제동물 생산 효율은 donor핵과 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(Tsunoda 와 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 세포주기를 Telophase II 기로 유도하고 세포막으로 돌출된 핵을 확인하면서 탈핵하는 방법을 이용하였다. 그러나 활성화 처리된 난자는 세포질 내 성숙 촉진인자 (maturation promoting factor; MPF)의 활성이 감소되며 체세포를 이식 하였을 경우 donor세포의 세포주기에 관계없이 재구축란의 발육이 제한된다(Tani 등, 2001). 최근 Yin 등(2002a,b)은 돼지와 토끼의 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, Gasparini 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 복제동물의 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 donor핵의 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). 그러나 체세포 핵이식에 있어서 활성화 처리 후, MPF 활성이 낮은 상태의 세포질에 donor핵이 이식되었을 때에는 이러한 변화가 일어나지 않으며, 이 후 발육율도 감소되는 것으로 보고되었다(Tani 등, 2001). 따라서 핵과 세포질간의 상호작용에 있어 수핵란의 세포주기가 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 활성에 노출되므로 효과적인 핵의 초기화가 가능 할 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 이용 할 수 있는 가능성이 확인 되었다.

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

재료 및 방법

1. 난포란의 채취 및 성숙배양

도축장에서 도살된 암소의 난소를 회수하여 30-35℃의 생리식염수 용액에 넣어 실험실로 운반하여 직경 2-7 mm의 난포로부터 18 gauge 주사바늘이 부착된 주사기로 난포액을 흡입하여 미성숙 난자를 채취하였다. 채취된 난자는 실제 현미경하에서 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 $\mu\text{g/ml}$ 17 β -estradiol(Sigma) 및 50 $\mu\text{g/ml}$ gentamicin(Gibco-BRL)이 함유된 성숙배양액을 50 μl 의 소적으로 만들어 paraffin oil로 피복하고 성숙배양 2-3시간 전에 5% CO₂, 39℃의 조건하에서 평형 시킨 후, 각 소적 당 10개의 난포란을 넣어 16-20시간 배양하였다.

2. 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 세포 주기를 판단하였다.

3. 체세포의 준비

소 귀 피부세포는 Choi 등(2004)의 방법에 따라 준비하여 배양 후 동결보존 하였다. 동결보존 된 체세포는 사용 전에 용해하여 10% FBS, 0.2 mM Na-pyruvate 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicin이 함유된 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM, Gibco-BRL) 으로 200 $\times\text{g}$ 의 조건에서 5분간 원심 분리하여 세척한 다음 신선한 세포배양액에 재 부유시켜 4-well dish에 0.5ml씩 분주하여 5% CO₂ 및 37°C의 조건에서 10일 이상 장기 배양하여 높은 세포밀도(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).

4. Demecolcine 처리

체외에서 16-20시간 체외 성숙시킨 난포란을 1 ml의 TCM-199액과 1 ml hyaluronidase(300 IU/ml)가 들어있는 원심관에 옮겨 vortex mixer로 5분간 처리하여 난구 세포를 제거한 후, 세포질의 색조가 균일한 난자를 실험에 따라 제 1극체가 확인된 난자와 확인되지 않은 난자를 분리하여 이용하였다. 난구세포가 제거된 난자는 0.4 $\mu\text{l}/\text{ml}$ demecolcine으로 40분간 처리 하고, 3 mg/ml BSA를 함유한 TCM-199액의 drop으로 옮겨 15분간 정치시킨 후 chromosome mass의 돌출이 확인된 난자를 실험에 이용하였다.

5. 핵이식

모든 미세조작은 실온에서 DIC 장치와 Narishige 미세조작기가 갖춰진 도립현미경

을 이용하여 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cytochalasin B가 함유된 수정 TCM-199 + 3 mg/ml BSA 액의 배양 소적(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 1/3정도 흡입하여 제 2 성숙분열중기 염색체를 제거하는 방법으로 탈핵을 실시하였다. Demecolcine을 처리 한 난자는 chromosome mass의 돌출을 확인하고(Fig. 1) 돌출된 chromosome mass를 제거하는 방법으로 탈핵을 실시하였다. 이때 제 1극체가 방출된 난자는 제 1극체를 함께 제거하였다. 탈핵 된 세포질은 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Hoechst 33342(Sigma)를 함유한 TCM-199액에 15분간 염색하여 형광현미경으로 탈핵여부를 검사하여 탈핵이 확인된 미수정란만을 수핵란으로 사용하였다. 배양된 체세포는 0.05% trypsin-EDTA용액으로 1-3분간 처리하여 pipetting에 의하여 배양접시의 저면에서 분리하였다. 분리된 체세포는 200 $\times\text{g}$ 에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 3 mg/ml BSA를 함유한 TCM-199액의 drop에 보관하여 사용하였다. Donor세포는 직접 injection pipette으로 흡입하여 탈핵을 실시한 구멍을 통하여 탈핵란 세포질의 위란강 내로 주입하였다.

6. 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 MgSO_4 , 0.1 mM CaCl_2 , 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 전극에 수평이 되도록 유도하고, 이어서 1.5 kV/cm의 직류(DC)전류를 30 μs 간 1회 통전하였다. 통전 후 즉시 TCM-199 + 3 mg/ml BSA액 내에서 수회 세척 후 배지 내에서 0.5-1시간 후에 세포의 융합여부를 관찰하였다. 융합이 확인된 핵이식란은 융합 1시간 후 활성화를 유기하기 위해 10 μM 의 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. 활성화처리 후 핵이식란은 3 mg/ml BSA가 함유된 CR1aa 배양액의 50 μl drop으로 옮겨 5% CO_2 및 39 $^\circ\text{C}$ 의 조건하에서 48시간 배양하여 분할율을 검사하였다. 분할된 핵이식란은 10% FBS를 함유한 CR1aa 내로 옮겨 4~6일간 추

가 배양하여 배반포 형성을 검사하였다.

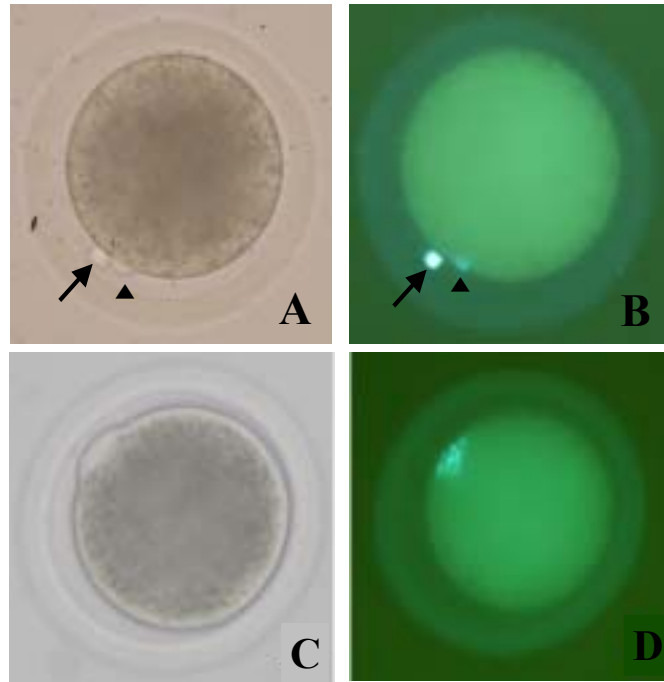


Figure 1. MII(A, B) and MI(C, D) oocytes with membrane protrusion 40 min after demecolcine treatment. Arrow indicates the 1st polar body, and arrowhead indicates the membrane protrusion.

7. 면역 형광 검사

Microtubules 과 핵의 변화는 Kim 등(1996)의 방법에 준하여 확인하였다. 난자는 modified buffer M (Simerly 와 Schatten, 1993, 25% glycerol, 50mM KCl, 0.5mM MgCl₂, 0.1mM ethylenediaminetetraacetic acid, 1mM β-mercaptoethanol, 50mM imidazol, 3% Triton X-100, 25mM phenylmethylsulfonyl fluoride)에서 10분 동안 처리하고, -20℃의 Methanol 에서 10분 동안 고정한 후, 0.02% sodium azide 와 0.1% BSA 가 첨가된 PBS액에 난자를 넣어 2~7일 동안 4℃에서 보관하였다. Microtubules의 위치 측정을 위해 0.5% Triton X-100와 0.5% BSA가 첨가된 PBS에서 난자를 여러 번 세척 후, 1:100 비율의 PBS로 희석된 Monoclonal Anti-α-tubulin (1st antibody)으로 39℃에서 90분 동안 처리하였다. 처리된 난자는 Blocking solution (0.1 M glycine, 1% calf serum, 0.01% Triton X-100,

0.5% BSA, 0.02% sodium azide)으로 39℃에서 1시간 동안 처리하였다. Blocking 된 난자는 Anti mouse IgG-FITC antibody (2nd antibody)에서 1시간 동안 처리 후 다시 Blocking solution으로 30분간 처리 되었다. DNA 확인을 위하여 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ propidium iodide에 1시간 동안 염색하였다. 염색된 난자를 슬라이드 글라스에 부착 시키고 anti-fade mounting solution으로 피복하여 형광이 발하는 것을 억제 하고 공초점 레이저 현미경 (confocal laser microscope) 하에서 microtubules와 핵상을 확인하였다.

8. 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 검토 하였다. **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 검토 하였다. **실험 3)** 난자의 세포주기별 핵이식 : 16시간 체외 성숙 시킨 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. **실험 4)** 난자의 세포주기에 따른 핵 및 microtubules의 변화 : MI, MII 난자를 이용하여 핵이식 전에 각각 demecolcine 처리를 하고 chromosome mass의 방출을 유도한 뒤 demecolcine의 처리 전과 후의 microtubules의 변화를 관찰하였고, 핵이식 후 융합 1.5시간째와 활성화 처리 후에 핵 및 microtubules의 변화를 관찰하였다.

9. 통계처리

실험의 결과는 Duncan 다중검정에 의해 유의성을 검정하였다.

결 과

1. Demecolcine 처리에 따른 핵이식

Demecolcine 처리 후, 제 1극체와 돌출된 핵(Fig. 1)을 제거하여 탈핵을 실시한 결

과 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).

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($P<0.01$).

2. 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).

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($P<0.05$).

3. 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 확인 한 결과(Fig. 1), 돌출율이 각각 79.0%와 88.8%로 MII기 난자의 염색체 돌출율이 유의적으로 높게 나타났으며($P < 0.05$), 탈핵 후 핵이식 한 결과, 분할율과 배반포 발육을 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).

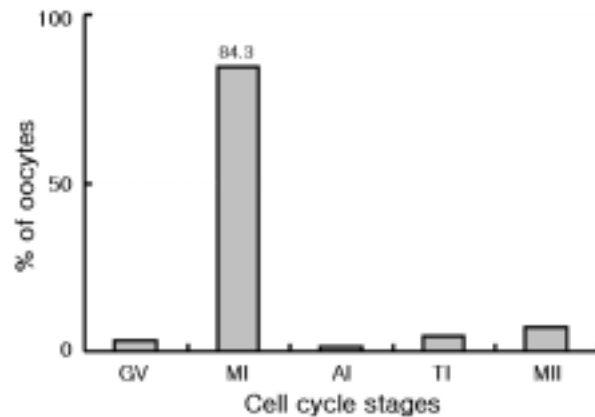


Figure 2. Cell cycle stage of oocytes matured for 16h. GV, germinal vesicle; MI, metaphase I; AI, anaphase I; TI, telophase I; MII, metaphase II

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($P < 0.05$).

4. 난자의 세포주기에 따른 핵 및 microtubules의 변화

MI기 난자와 MII기 난자의 핵이식 후 microtubules을 관찰 한 결과(Fig. 3), MI기와 MII기 난자 모두에서 융합 후 PCC 가 관찰되고 microtubules이 약하게 관찰되었으나 활성화 처리 후에는 microtubules을 관찰 할 수 없었다.

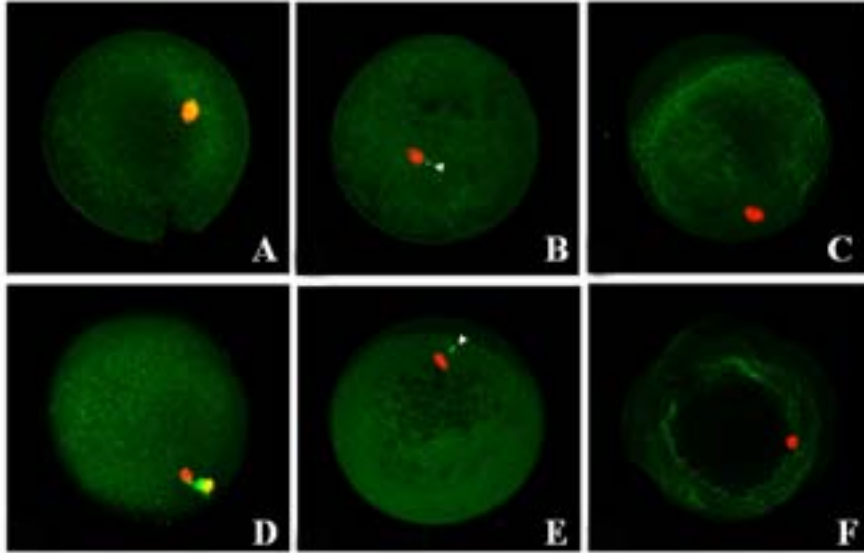


Figure 3. Immunofluorescence localization of microtubule (green) and chromosomes (red). A-C: MI oocytes, D-F: MII oocytes. (A, D) Oocytes before enucleation. (B, E) Nuclear transfer embryos before activation. (C, F) Nuclear transfer embryos shortly after activation.

고 찰

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 방법에 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 탈핵 방법으로 화학적으로 유도된 탈핵방법이 이용되었다. Fulka 와 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 미세소관의 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 혼용 한 탈핵 방법을 이용하였다. 비록 Gasparrini 등(2003)의 보고에서와 같이 demecolcine에 의해 난자로부터 핵 물질이 자발적으로 완벽하게 분리되는 탈핵 방법이 아닌 물리적인 방법이 혼용 된 것이었지만, 제1극체와 돌출된 핵만을 제거하였기 때문에 과다한 세포질의 손실을 막아 물리적인 손상은 받지 않았을 것으로 생각되며, 핵이식 후 발육율에 있어서 대조구와 유의적인 차이를 보이지 않아 demecolcine이 소의 체세포 핵이식란의 발육에 있어서 유해한 영향을 보이지 않음이 확인 되었다.

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 종에 적당한 수핵란의 세포질을 규명하고 찾아냄으로써 양질의 세포질을 제공하는 것이 매우 중요하다. MPF 활성이 높은 상태의 세포질에 donor 핵을 주입 시 발생하는 핵의 구조적 변화는 핵과 세포질간의 단백질 상호교환의 결과로 추정되며 이러한 변화는 이식된 핵의 초기화 과정에 있어서 필수적이다(Collas와 Robl, 1991). MPF가 존재 시 핵막이 소실되어 단백질 교환이 용이하기 때문에 높은 수준의 MPF가 존재하는 난자를 수핵란으로 이용하는 것이 적합할 것이다. Campbell 등(1996)은 난자의 성숙 과정동안 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 전

후에 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 확인 되어, MI기 난자를 수핵란으로 이용 시 핵의 초기화를 개시할 수 있다는 것을 증명하였다. 본 연구에서도 핵을 이식받은 소의 MI기 난자가 배반포기로 발육되어 MI기 난자를 수핵란으로 이용할 수 있음이 확인 되었다. 하지만 이론적인 배경에도 불구하고 Zhang 등(2004)과 Miyoshi 등 (2001)의 보고에서와 마찬가지로 본 연구에서도 MI기 난자를 이용한 핵이식란의 발육율이 MII기 난자를 이용하였을 경우보다 매우 낮게 나타났다. 하지만 비록 낮은 효율일지라도 배반포가 형성되었다는 것은 MI기 난자를 이용한 재구축란에서 이식된 핵의 초기화가 이루어 질 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 존재 하여 탈핵 시 MI기 염색체와 함께 제거 되었거나 또는 MII기 단계에만 그 미지인자가 존재하여 MI기 난자 내에서는 활성화 되지 않거나 아예 존재 하지 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 향상 시켜 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 발육 될 수 있음이 확인 되었다.

요 약

본 연구는 demecolcine 처리에 의한 탈핵과 수핵란 세포질의 세포주기가 소 체세포 핵이식란의 발육에 미치는 영향을 검토하였다. 체외에서 16-20시간 성숙배양된 난자를 극체 방출 유무 및 MI, MII기 난자로 구분하여 0.4 $\mu\text{l/ml}$ demecolcine으로 40분간 처리 후 염색체부위가 돌출된 난자는 탈핵 후 핵이식에 공시하였다. 소의 귀 피부세포를 탈핵란에 이식하여 전기융합 과 활성화처리(Ca-ionophore+DMAP)를 거쳐 체외 배양하였다.

Demecolcine 처리 후 86.2%의 난자가 염색체부위의 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 demecolcine처리가 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.

참고문헌

- Barnes, F., Endebrock, M., Looney, C., Powell, R., Westhusin, M. and Bondioli, K. 1993. Embryos cloning in cattle the use of in vitro matured oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 97:317-320.
- Campbell, K.H.S., Loi, P., Otaegui, P. and Wilmut, I. 1996. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Rev. Reprod.* 1:40-45.
- Cheong, H.T., Takahashi, Y. and Kanagawa, H. 1993. Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. *Biol. Reprod.* 48:958-963.
- Cheong, H.T., Takahashi, Y. and Kanagawa, H. 1994. Relationship between nuclear remodeling and subsequent development of mouse embryonic nuclei transferred to enucleated oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 37:138-145.
- Cheong, H.T., Park, T.M., Ikeda, K. and Takahashi, Y. 2003. Cell cycle analysis of bovine cultured somatic cells by flow cytometry. *Jpn. J. Vet. Res.* 51:95-103.
- Choi, J.B., Kim, C.I., Park, C.K., Yang, B.K. and Cheong, H.T. 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.
- Collas, P. and Robl, J.M. 1991. Relationship between nuclear remodeling and development in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 45:455-465.
- Elsheikh, A.S., Takahashi, Y., Katagiri, S. and 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.

- Fulka, J. Jr. and Moor, R.M. 1993. Noninvasive chemical enucleation of mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 34:427-430.
- Gao, S., Gasparrini, B., McGarry, M., Ferrier, T., Fletcher, J. and Harkness, L. 2002. Germinal vesicle material is essential for nucleus remodeling after nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 67:928-934.
- Gasparrini, B., Gao, S., Ainslie, A., Fletcher, J., McGarry, M., Ritchie, W.A., Springbett, A.J., Overstrom, E.W., Wilmut, I. and De Sousa P.A. 2003. Cloned mice derived from embryonic stem cell karyoplasts and activated cytoplasts prepared by induced enucleation. *Biol. Reprod.* 68:1259-1266.
- Ibanez, E., Albertini, D.F. and Overstrom, E.W. 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.
- Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H. and Tsunoda, Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282:2095-2098.
- Kim NH, Funahashi H, Prather RS, Schatten G, Day BN. 1996. Microtubule and microfilament dynamics in porcine oocytes during meiotic maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 43:248-255.
- Liu, J.L., Sung, L.Y., Barber, M. and Yang, X. 2002. Hypertonic medium treatment for localization of nuclear material in bovine metaphase II oocytes. *Biol. Reprod.* 67:1853-1863.
- Miyoshi, K., Rzucidlo, S.J., Gibbons, J.R., Arat, S. and Stice, S.L. 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.
- Mohamed Nour, M.S. and Takahashi, Y. 1999. Preparation of young preactivated oocytes with high enucleation efficiency for bovine nuclear transfer. *Theriogenology* 51:661-666.
- Polejaeva, I.A., Chen, S.H., Vaught, T.D., Page, R.L., Mullins, J., Ball, S., Dai, Y., Boone, J., Walke, S., Ayares, D.L., Colman, A. and Campbell, K.H.S. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407:505-509.
- Savard, C., Novak, S., Saint-Cyr, A., Moreau, M., Pothier, F. and Sirard, M.A. 2004. Comparison of bulk enucleation methods for porcine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 67:70-76.
- Simerly, C. and Schatten, G. 1993. Techniques for localization of specific molecules in oocytes and embryos. *Methods Emzymol.* 225:516-552.

- Smith, L.C. 1993. Membrane and intracellular effects of ultraviolet irradiation with Hoechst 33342 on bovine secondary oocytes matured in vitro. *J Reprod. Fertil.* 99:39-44.
- Tani, T., Kato, Y. and Tsunoda, Y. 2001. Direct exposure of chromosomes to nonactivated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming. *Biol. Reprod.* 64:324-330.
- Tsunoda, Y. and Kato, Y. 2000. The recent progress on nuclear transfer in mammals. *Zool. Sci.* 17:1177-1184.
- Wehrend, A. and 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.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhirl, J., Kind, A.J. and Campbell, K.H.S. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813.
- Yang, X., Zhang, L., Kovacs, A., Tobback, C. and Foote, R.H. 1990. Potential of hypertonic medium treatment for embryo micromanipulation: II. Assessment of nuclear transplantation methodology, isolation, sub-zona insertion and electrofusion of blastomeres to intact or functionally enucleated oocytes in rabbits. *Mol. Reprod. Dev.* 27:118-129.
- Yin, X.J., Tani, T., Yonemura, I., Kawakami, M., Miyamoto, K., Hasegawa, R., Kato, Y. and Tsunoda, Y. 2002a. Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes. *Biol. Reprod.* 67:442-446.
- Yin, X.J., Kato, Y. and 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.
- Zernicka-Goetz, M., Kubiak, J., Antony, C. and 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.
- Zhang, L.S., Zhang, K.Y., Yao, L.J., Liu, S.Z., Yang, C.X., Zhong, Z.S., Zheng, Y.L., Sun, Q.Y. and Chen, D.Y. 2004. Somatic nucleus remodelling in immature and mature Rhesus oocyte cytoplasm. *Zygote* 12:179-184.

4-7. 수핵란의 활성화시간에 따른 소 체세포 핵이식란의 발육

Development of Somatic Cell Nuclear Transfer Bovine Embryos following Activation Time of Recipient Cytoplasm

Abstract

This study was conducted to examine the effects of pre activation treatment and activation time of recipient cytoplasm on the development of bovine somatic cell nuclear transfer(NT) embryos. Donor cells were transferred and electrofused to enucleated oocytes before(pre-AC) or after activation(post-AC). Activation was induced with a combination of Ca^{++} -ionophore(A23187) and DMAP. NT embryos were cultured in CR1aa containing 3 mg/ml BSA for 9 days. Some NT embryos were fixed at 0.5 to 2.5 h after fusion (for post-AC) or activation(for pre-AC) for whole-mounting or confocal microscopy. Developmental rate to the blastocyst stage was slightly high in the post-AC group(20.6%) compared to that of pre-AC group (15.3%). However, developmental speed of embryos in the pre-AC group was faster than that of embryos in the post-AC group. Development rates to the blastocyst stage were similar among different activation time before fusion (0.5, 2 and 4 h). Embryos in pre-AC group, but not post-AC group, underwent NEBD and PCC. Microtubules derived from donor cells were remained at 1.5 and 2.5 h after fusion in the post-AC group, but disappeared in the pre-AC group at the same time. The result of the present study suggests that development and nuclear morphology are affected by the activation status of the recipient cytoplasm before fusion.

서 론

체세포 핵이식에 의해 유전적으로 동일한 복제 동물의 생산은 면양(Wilmot 등, 1997), 소(Cibelli 등, 1998), 마우스(Wakayama 등, 1998), 산양(Baguisi 등, 1999), 돼지(Onishi 등, 2000), 고양이(Shin 등, 2002), 토끼(Chesne 등, 2002), 노새(Woods 등, 2003), 말(Galli 등, 2003) 및 랫 (Zhou 등, 2003)에서 보고되고 있다. 그러나 전체적인 복제과정

의 낮은 효율과 수정란 단계와 태아 발육단계에서의 높은 손실 등을 고려할 때, 핵이식에 의해 생산된 수정란의 착상 전 초기 발육을 조절하는 메카니즘에 대한 연구가 필요하다. 재구축란의 발육에 영향을 미치는 요인으로는 공여핵의 기원, 공여핵과 탈핵된 수핵란의 세포주기와 세포질의 활성화 등을 들 수 있다. 그 중에서 세포질의 활성화는 핵이식 과정의 필수적인 요소이다.

난자의 성숙 과정에서 가장 중요한 것은 MPF(maturation promoting factor; 성숙 촉진인자)라고 불리는 세포질 활성화(Matsui 와 Markert, 1971). MPF는 cyclin B와 P34cdc2라는 두 개의 단백질 복합체로서 알려져 있고, kinase 활성화는 단백질 kinase의 인산화 상태에서의 변화와 cyclin B와의 관련에 의해서 조절된다. 세포분열 주기 동안 P34cdc2의 농도는 일정하게 남아 있지만 cyclin의 농도는 다양하다. P34cdc2 kinase의 활성화는 세포가 유사분열 또는 감수분열 재개를 촉진시키고, 핵막붕괴(nuclear envelop break down, NEBD), 염색체 응축, 세포골격의 재구성 그리고 세포형태의 변화를 가져온다(Nurse, 1990). Cyclin B의 proteolytic degradation은 MPF의 불활성화를 유도하고 난자가 metaphase기로부터 감수분열이 재개될 수 있도록 한다(Lorca 등, 1993).

난자 성숙 시 MPF 활성화는 제 1차와 제 2차 감수분열 중기(metaphase)에서 최고조에 달한다. 난자가 MII기에 정지되었을 때, MPF 활성화는 높게 남아 있지만, 수정 또는 활성화 시에 MPF 활성화는 신속하게 감소한다(Campbell 등, 1993). 활성화되지 않은 난자에 이식된 핵은 수핵란 세포질의 높은 MPF 활성화에 의하여 핵막붕괴(nuclear envelop break down, NEBD)가 일어나고 미성숙염색체응축(premature chromosome condensation, PCC)이 일어난다. 그 후 활성화에 의하여 핵막이 다시 형성되고 DNA합성이 시작된다. 이 과정에서 정상적인 염색체구성을 가지는 재구축란은 정상적으로 분할하여 배반포까지 발육하고 이식 후 산자로 발달된다. 반면에 수핵란으로 활성화된 난자를 사용할 경우 이식된 핵의 NEBD와 PCC는 일어나지 않으나 핵이식 시 공여 세포의 세포주기와 상관없이 DNA합성이 일어난다(Campbell 등, 1996). 이것은 핵이 팽창되는 동안 NEBD와 PCC 없이도 이식된 핵의 초기화가 가능함을 시사한다.

본 연구는 융합 전 수핵란의 활성화처리 유무와 활성화처리 시간이 소 체세포 유래 핵이식란의 체외 발육능에 미치는 영향을 검토하기 위해 수행하였다.

재료 및 방법

1. 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 현미경하에서 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% 소태아혈청(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 gentamycin(Gibco-BRL)이 함유된 성숙배양액을 50 µl의 소적으로 만들어 paraffin oil로 피복하고 성숙배양 2~3시간 전에 5% CO₂, 39°C의 조건하에서 평형 시킨 후, 각 소적 당 10개의 난포란을 넣어 18~20시간 배양하였다.

2. 체세포의 준비

체세포는 Wilmut 등 (1997)의 방법에 준하여 소의 귀 피부세포를 배양하여 약 4회 정도 passage한 다음 동결하여 LN₂용기 내에 보관하며 사용하였다. 동결보존된 체세포는 사용 전에 용해하여 7 ml의 세포배양액(DMEM+10% FBS)으로 200×g의 조건에서 5분간 원심분리하여 세척한 다음 신선한 세포배양액에 재 부유시켜 4-well dish에 0.8 ml씩 분주하여 5% CO₂ 및 39°C의 조건에서 10일 이상 장기 배양하여 높은 세포밀도(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).

3. Demecolcine 처리

체외에서 18~20시간 성숙시킨 난포란을 1 ml의 TCM-199액과 1% hyaluronidase가 들어있는 원심관에 옮겨 vortex mixer로 5분간 처리하여 난구세포를 제거한 후, 세포질의 색조가 균일한 난자를 실험에 따라 제 1극체가 확인된 난자를 이용하였다. 난구세포가 제거된 난자는 0.4 µl/ml demecolcine으로 40분간 처리 하고, 3 mg/ml BSA를 함유한

TCM-199액의 drop으로 옮겨 15분간 정치시킨 후 chromosome mass의 돌출이 확인된 난자를 실험에 이용하였다(Yin 등, 2002).

4. 미세조작

모든 미세조작은 실온에서 DIC 장치와 Narishige 미세조작기가 갖춰진 도립현미경을 이용하여 실시하였다. 탈핵은 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cytochalasin B(CB)가 함유된 수정 PBS(modified phosphate buffered saline; mPBS)액의 배양소적(50 μl)내에서 제 1극체와 주변의 세포질을 약 1/3정도 흡입하여 제 2 유사분열 중기 염색체를 제거하는 방법으로 실시하였다. 탈핵된 세포질은 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Hoechst 33342(Sigma)를 함유한 TCM-199액에 15분간 염색하여 형광현미경으로 탈핵여부를 검사하였다. 핵이식 조작은 TCM-199 + 3 mg/ml BSA 내에서 실시하였다. Donor용 체세포는 위 2항과 같은 방법으로 준비하여 0.05% trypsin-EDTA용액으로 1-3분간 처리하여 pipetting에 의하여 배양접시의 저면에서 분리하였다. 분리된 체세포는 200 \times g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 3 mg/ml BSA를 함유한 TCM-199액의 drop에 보관하여 사용하였다. Donor세포는 직접 injection pipette으로 흡입하여 탈핵을 실시한 구멍을 통하여 탈핵란 세포질의 위란강 내로 주입하였다.

5. 재구축란의 전기융합 및 활성화

재구축란의 전기융합은 BTX 세포융합장치(BTX, San Diego, CA, USA) 및 1 mm 폭의 wire chamber를 사용하여 실시하였다. 재구축란은 0.1 mM MgSO_4 , 0.1 mM CaCl_2 , 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 전극에 수평이 되도록 유도하고, 이어서 1.5 kV/cm의 직류(DC)전류를 30 μsec 간 1회 통전하였다. 통전 후 즉시 TCM-199 + 3 mg/ml BSA액 내에서 수회 세척 후 배지 내에서 0.5~1시간 후에 세포의 융합여부를 관찰하였다. Post-activation(post-AC) 처리구는 융합 전에 10 μM 의 Ca^{++} -ionophore (A23187; Sigma)로 5분간 처리한 후 2 mM의 6-dimethylaminopurine (6-DMAP; Sigma)을 함유한 체외배양액(아래 6항 참조)액의 drop 내로 옮겨 4시간 동안 배양하며 배양 중 0.5 및 2시간 또는 배양종료 후(A23187 처리 후 4시간)에 융합을 실시

하였다. 한편, pre-activation(pre-AC)처리구는 융합 확인 후 10 μ M의 A23187로 5분간 처리 후 즉시 2mM의 6-DMAP을 함유한 체외배양액의 drop 내로 옮겨 4시간 동안 배양하여 활성화율을 유기하였다. 일부 핵이식란은 융합 후 0.5, 1.5 및 2.5시간 에 whole-mount 및 면역형광검사에 공시하였다.

6. 핵이식란의 체외배양

활성화처리 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 핵이식란을 10% FBS를 함유한 CR1aa 내로 옮겨 7일간 추가 배양하여 배반포 형성율을 검사하였다.

7. Whole-mount 표본의 제작

핵이식란을 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 핵의 형태를 판단하였다.

8. 면역 형광 검사

Microtubules 과 핵의 변화는 Kim 등(1996)의 방법에 준하여 확인하였다. 난자는 modified buffer M (Simerly 와 Schatten, 1993, 25% glycerol, 50mM KCl, 0.5mM MgCl₂, 0.1mM etylenediaminetetraactic acid, 1mM β -mercaptoethanol, 50mM imidazol, 3% Triton X-100, 25mM phenylmethylsulfonyl fluoride)에서 10분 동안 처리하고, -20°C의 Methanol에서 10분 동안 고정한 후, 0.02% sodium azide 와 0.1% BSA 가 첨가된 PBS액에 난자를 넣어 2~7일 동안 4°C에서 보관하였다. Micotubules의 위치 측정을 위해 0.5% Triton X-100와 0.5% BSA가 첨가된 PBS에서 난자를 여러 번 세척 후, 1:100 비율의 PBS로 희석된 monoclonal Anti- α -tubulin (1st antibody)으로 39°C에서 90분 동안 처리하였다. 처리된 난자는 blocking solution (0.1 M glycine, 1% calf serum, 0.01% Triton

X-100, 0.5% BSA, 0.02% sodium azide)으로 39°C에서 1시간 동안 처리하였다. Blocking 된 난자는 Anti mouse IgG-FITC antibody (2nd antibody)에서 1시간 동안 처리 후 다시 blocking solution으로 30분간 처리 되었다. DNA 확인을 위하여 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ propidium iodide에 1시간 동안 염색하였다. 염색된 난자를 슬라이드 글라스에 부착 시키고 anti-fade mounting solution으로 피복하여 형광이 발하는 것을 억제 하고 공초점 레이저 현미경(laser scanning confocal microscopy) 하에서 microtubules와 핵상을 확인하였다.

9. MPF kinase assay

MPF kinase assay는 Anas 등(1999)의 방법에 따라 MESACUP cdc2 kinase assay kit (MBL, Nagoya, Japan)으로 catalytic subunit인 cdc2 kinase의 활성을 측정하였다. 모든 화학 약품은 Sigma사로부터 구입하였다. 요약하면, 난구세포를 제거한 20개의 난자는 cdc2 kinase sample buffer (50 mM Tris HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0.01 % Brij 35, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride, 0.05 mg/ml leupeptin, 50 mM 2-mercaptoethanol, 25 mM β -glycerophosphate 및 1 mM Na-orthovanadate)에서 두 번 세척한 다음 5 μl buffer의 microtube에 옮겨 -80°C에서 동결 저장하였다가 용해하여 측정하였다. 난자추출액(5 μl)은 25 mM Hepes buffer(MBL), 10 mM MgCl_2 (MBL), 0.1 mM ATP, 10 % biotinylated MV 펩티드(Ser-Lue-Tyr-Ser-Ser-Ser-Pro-Gly-Gly-Ala-Tyr-Cys ; MBL)가 함유된 45 μl kinase assay buffer와 혼합하여, 30°C에서 30분 동안 배양하였다. 인산화 반응은 200 μl 의 stop reagent(50 mM EDTA을 포함하는 PBS ; MBL)로 정지시켜 13,000 \times g에서 15초 동안 원심분리하였다. Cdc2 kinase 활성은 ELISA법에 의해 측정하였는데, 각각 100 μl 의 반응액을 biotinylated MV peptide의 인산화형태를 인식하는 monoclonal antibody가 깔린 각각의 microwell로 옮겨 25°C에서 60분 동안 배양하여 PBS로 5번 세척하였다. 그 후 100 μl 의 horseradish peroxidase conjugated streptavidin solution을 각각 첨가하여 25°C에서 30분을 동안 배양한 후 세척하여 100 μl 의 POD substrate solution을 넣어 추가적으로 5분 동안 배양하였다. 최종적으로 100 μl 의 stop solution(20% H_3PO_4)을 각각의 well에 넣고, microplate를 이용하여 492nm로 흡광도를 측정하였다.

10. 실험설계

실험 1) 융합 전후 활성화처리에 따른 발육율 검토: 핵이식란을 융합 전(post-AC구) 혹은 융합 후(pre-AC구)에 활성화 처리한 다음 9일간 배양하여 분할율과 배반포 형성율을 검사하였다. **실험 2)** 융합 전후 활성화처리에 따른 발육속도 검토: 핵이식란을 실험 1과 같이 구분하여 융합 후 9일간 배양하며 상실배와 배반포기까지의 발육속도를 검사하였다. **실험 3)** 융합 전 활성화처리 시간에 따른 발육율 검토: 핵이식란을 융합 전 0.5, 2, 4시간에 활성화처리(post-AC구)를 하여 9일간 배양하여 융합 전 활성화처리 시간별 분할율과 배반포 형성율을 검사하였다. **실험 4)** 활성화처리 후 시간별 MPF 수준 변화 검토: MII기 난자의 활성화처리 후 0.5, 2, 4시간에 각각 난자의 MPF 수준을 검사하였다. **실험 5)** 융합 전후 활성화처리별 핵이식란의 핵 및 microtubules의 변화: 핵이식란을 융합 직전과 융합 후(post-AC구) 또는 활성화처리(pre-AC구)하여 1.5 및 2.5시간에 공초점 레이저 현미경을 이용하여 microtubules의 변화를 관찰하였다.

실험 6) 융합 전후 활성화처리별 핵이식란의 핵형변화 검토: 핵이식란을 post-AC구와 pre-AC구로 나누어 융합 후(post-AC구) 또는 활성화 후(pre-AC구) 1.5 및 2.5시간에 whole-mount 를 실시하여 활성화 처리 시간별 핵형변화를 비교하였다.

결 과

1. 융합 전후 활성화처리에 따른 발육율

핵이식란의 융합 전 활성화 처리구(post-AC구)와 융합 후 활성화 처리구(pre-AC구)의 배반포기 발달율을 검토한 결과, post-AC구가 20.6%로 15.3%인 pre-AC구보다 다소 높게 나타났으나 유의차는 없었다(Table 1).

Table 1. Effect of activation time on the development of nuclear transfer oocytes.

Treatments*	No. of embryos fused(%)	No.(%) of embryos developed to		
		2-Cell	Morula	Blastocyst
pre-AC	124/178(69.7) ^a	114(91.9)	26(21.0)	19(15.3)
post-AC	141/180(78.3) ^b	131(92.9)	35(24.8)	29(20.6)

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

2. 융합 전후 활성화처리에 따른 발육속도 검토

핵이식란의 상실배기 혹은 배반포기 까지의 발육속도를 검토한 결과, pre-AC구는 핵이식 후 6일차에 상실배로 발달하여 7일차에 배반포가 주로 관찰된 반면 post-AC구는 7일차부터 상실배로 발달하여 8일차 이후에 배반포가 관찰되었다. 그러나 전체적인 배 발달율에는 차이가 없었다(Fig. 1).

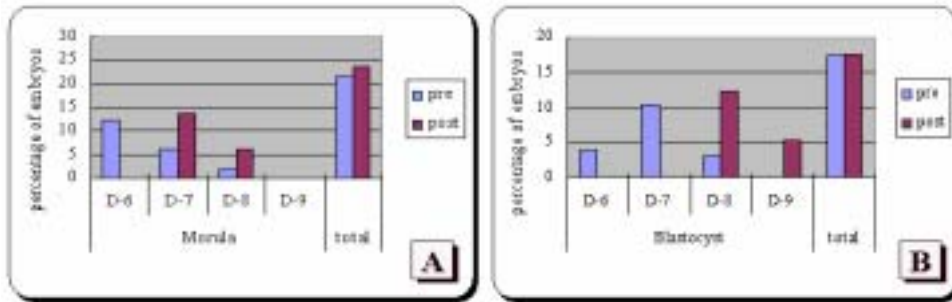


Figure 1. The developmental patterns of nuclear transfer embryos. The proportion of NT embryos that reached the morula (A) and blastocyst (B) stage by Days 6~9. About 40 fused embryos were tested for the developmental patterns of each pre- and post-AC group.

3. 융합 전 활성화처리 시간에 따른 발육율 검토

post-AC구의 경우 융합 전 활성화처리 시간이 핵이식란의 발육에 미치는 영향을 검토한 결과(Table 2), 배반포 발육율은 핵이식 후 0.5, 2 및 4시간에 융합한 시험구간에 유의적인 차이가 없었다(20.5, 19.6 및 17.2%).

Table 2. In vitro development of nuclear transfer embryos activated at various times before fusion.

Time post-activation (h)	No. of embryos fused(%)	No.(%) of embryos developed to		
		2-Cell	Morula	Blastocyst
0.5	88/115(76.5)	81(92.0)	21(23.9)	18(20.5)
2	56/74(75.7)	47(83.9)	13(23.2)	11(19.6)
4	58/76(76.3)	48(82.8)	12(20.7)	10(17.2)

4. 활성화처리 후 시간별 MPF 수준 변화 검토

MII기 난자의 MPF 수준을 100으로 보았을때, 활성화 처리 후 0.5, 2 및 4시간째의 MPF 수준은 각각 32.5, 26.2, 19로 현저히 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 2).

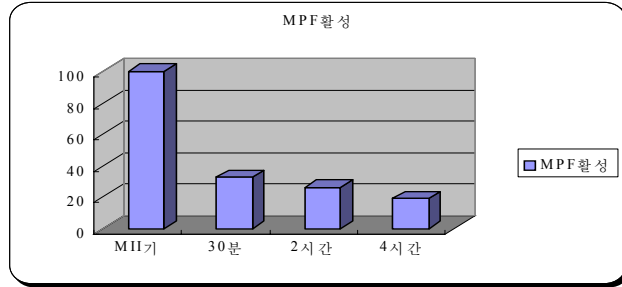


Figure 2. The cdc2 kinase activity of bovine oocytes following time post-activation. The activity level in MII oocytes is defined as 100%. Data are expressed as relative percentage of the level of p34^{cdc2} activity in bovine oocytes.

5. 융합 전후 활성화처리별 핵이식란의 핵 및 microtubules의 변화

핵이식란을 post- 및 pre-AC구로 나누어 핵 및 microtubule의 변화를 분석한 결과, 융합 전에는 donor 체세포의 핵과 microtubule이 관찰되었지만 융합 후에는 post-AC구에서는 융합 후 2.5시간까지 microtubule이 관찰된 반면, pre-AC구의 경우는 활성화 처리 후 1.5 과 2.5시간에 microtubule이 관찰되지 않았다(Fig. 3).

6. 융합 전후 활성화처리별 핵이식란의 핵형변화 검토

핵이식란의 핵형변화를 분석한 결과, pre-AC구에서는 융합 후 1.5시간에 NEBD 및 PCC 가 관찰되었으나 post-AC구에서는 NEBD가 관찰되지 않았다. 융합 혹은 활성화 후 2.5시간에는 두 시험구 모두 전핵형성이 관찰되었다(Fig. 4).

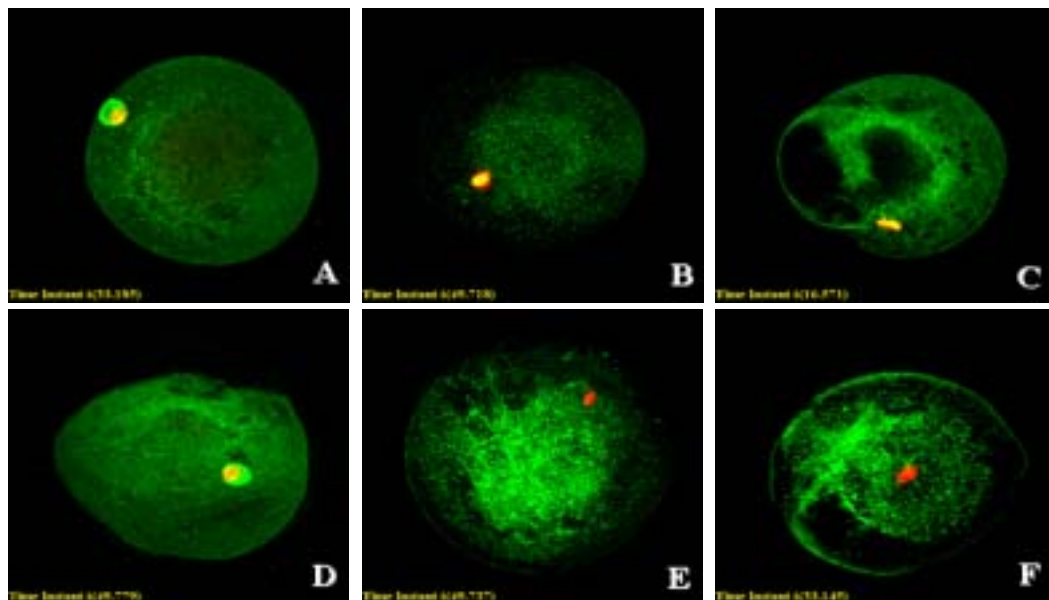


Figure 3. Distribution of microtubules (green) and chromosomes (red) in nuclear transfer embryos reconstituted with Post-AC (A-C) and Pre-AC recipients (D-F). (A and D) Oocytes after injection. (B and E) Nuclear transfer embryos 1.5 h after fusion or activation. (C and F) Nuclear transfer embryos 2.5 h after fusion or activation.

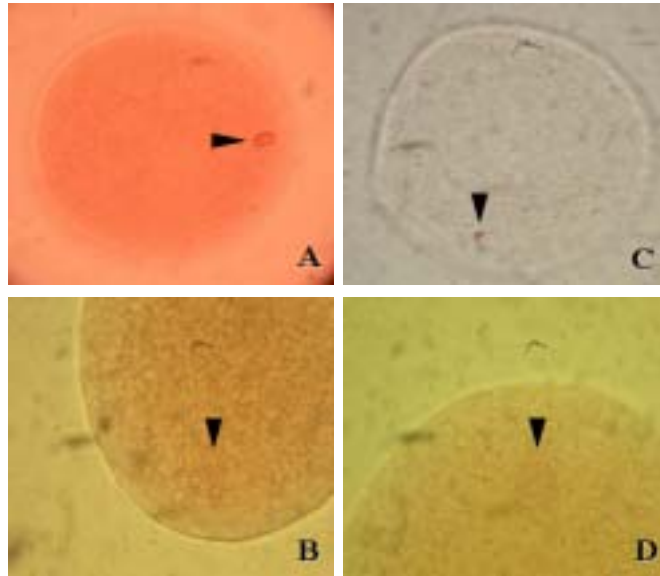


Fig. 4. Nuclear morphologies of bovine nuclear transfer embryos resonctituted with post-AC (A and B) and pre-AC recipients (C and D). (A and C) 1.5h after fusion or activation. Arrow heads show a donor nucleus (B and D) 2.5h after fusion or activation. Arrow heads show a pronucleus.

고 찰

소 수정란의 핵을 탈핵 미수정란 세포질에 이식할 경우, 핵이식란의 발육에 영향을 주는 요소 중의 하나가 탈핵란 세포질의 활성화이다. 미수정란의 경우는 수정 시에 일어나는 세포질의 활성화 과정을 거치지 않은 상태이므로 핵이식 과정에서 반드시 활성화 되어야 한다. 수핵란의 불충분한 활성화는 복제 효율을 낮추는 주요한 요인으로 작용한다. 일반적인 핵이식 연구에서는 활성화 되지 않은 난자를 체세포 핵이식의 수핵세포질로 이용하였다(Shiga 등, 1999; Tani 등; 2001). 그러나 소(Bordignon 과 Smith, 1998)에서 활성화 후 telophase의 염색체를 제거하거나 생쥐(Baguisi 와 Overstrom, 2000)에서 활성화 후 demecolcine으로 화학적 탈핵하여 준비한 세포질이 체세포 복제 동물을 생산하는데 유용하다고 보고되어, 융합 전에 활성화된 세포질도 체세포 핵의 reprogramming을 지지하는 것으로 판단된다. 본 연구에서는 활성화된 세포질(post-AC)이 비활성화된 세포질(pre-AC)보다 다소 높은 배발달율을 나타내었는데, 핵의 염색체가 감수분열 중기의 활성

화 되지 않은 세포질에 노출되었을 때 나타나는 다양한 리모델링 형태 때문으로 판단된다 (Cheong 등, 1994). 한편, 배아의 발육속도에 있어서는 post-AC구에서 더 늦은 발육속도를 보였는데 이는 전핵기 시간이 pre-AC구에 비하여 길어지는 것에 기인하는 것으로 판단된다(미제시).

핵이식배의 발생능은 핵과 세포질간의 융합시간 및 세포질의 활성화 시기(Collas와 Robl, 1990)에 의해서도 영향을 받는다. 핵이 비활성화된 난자에 주입하였을 때는 빠르게 핵막붕괴가 일어나고, 염색체는 난세포질에 노출되어 초기화된다. 이식된 핵의 난세포질 내 노출시간 연장은 핵의 초기화와 재구성을 촉진한다고 보고되었다(Ware 등, 1989). Wakayama 등(1998)은 생쥐 체세포 핵이식에서 핵이식과 동시에, 핵이식 후 1~3시간 내 및 3~6시간에 각각 활성화 처리한 결과, 핵이식 후 일정 시간이 경과된 후 활성화하는 것이 핵이식 즉시 실시한 경우에 비하여 높은 상실배기 및 배반포기 발육율을 얻었다. 반대로 활성화된 난자에 주입하였을 때는 핵막이 붕괴되지 않으며, 공여 염색체는 난세포질에 직접적으로 노출되지 않는다. 난자의 MPF 활성화는 제 1차와 2차 감수분열 중기(metaphase)에서 최고조에 달하는데, 난자가 MII기에 정지되었을 때, MPF 활성화는 높게 남아 있지만 수정 또는 활성화 시에 MPF 활성화는 신속하게 감소한다(Campbell 등, 1993). Vignon 등(1998)은 탈핵된 난자를 노화와 냉각으로 수핵세포질의 낮은 MPF를 유도하고 송아지나 태아세포를 공여세포로 이용하여 재구성된 핵이식란이 배반포기와 산자까지 발육하였다고 보고하였다. 이 결과는 수핵세포질 내 높은 MPF 활성화가 체세포 핵이식란의 발육에 필수적인 것이 아니며, 체세포 핵의 reprogramming을 위한 다른 필수적인 요인이 수핵세포질 내에 존재한다는 것을 나타낸다. 본 연구에서는 핵이식 후 0.5, 2 및 4시간에 활성화 처리를 한 결과, 처리구 간에 유의적인 차이가 없었다. 이는 일단 활성화된 이후의 세포질은 다소 시간이 경과하여도 세포질적 요인의 변화가 크지 않음을 시사한다.

탈핵 미수정란 세포질에 이식된 핵은 다양한 형태적 변화를 거치는데, 그 중에서도 가장 특징적인 변화가 이식된 핵의 미성숙 염색체 응축(premature chromosome condensation; PCC)이다(Collas 등, 1992). 활성화 되지 않은 수핵란의 경우 M기를 제외한 모든 세포주기의 핵이 이식되었을 때 1개나 2개의 응축된 염색체덩어리를 형성하고 이어서 전핵을 형성하였다. 만약 수핵란 세포질이 활성화되었고 세포질적 kinase 활성화가 공여핵의 이식 전에 감소된다면, 핵막붕괴와 미성숙염색체응축은 발생하지 않는다

(Cheong 등, 1994). 생쥐 핵이식의 경우, 1세포기 수정란의 탈핵 세포질에 이식한 경우는 PCC가 일어나지 않고 이식된 핵이 그대로 팽화된 상태의 전핵구조를 나타내며(Cheong 등 1992), 미수정란 세포질에 이식한 경우도 세포질 활성화가 먼저 진행된 핵이식란의 경우는 이와 동일한 현상이 확인되었다(Cheong 등, 1994).

이식된 핵의 완벽한 초기화와 후기 배의 정상적인 발육을 위해서는 각 동물 종에 적당한 수핵란의 세포질을 규명하고 찾아냄으로써 양질의 세포질을 제공하는 것이 매우 중요하다. 또한 핵의 reprogramming과 관련된 구체적인 핵-세포질 상호작용의 기전을 밝히기 위해서는 활성화시간 뿐 아니라 활성화 형태, 세포주기와의 관계 등 세포학적 특성에 관한 연구가 필요하다고 판단된다.

요 약

본 연구는 융합 전 수핵란의 활성화처리 유무와 활성화처리 시간이 소 체세포 유래 핵이식란의 체외 발육능에 미치는 영향을 검토하기 위해 수행하였다. 소 체외성숙란의 탈핵 후 체세포 핵을 이식하고 일부는 전기 융합 후 활성화를 유기하였고(pre-AC), 일부는 먼저 활성화 처리 후 융합을 실시(post-AC)하였다. 난자의 활성화는 Ca^{2+} -ionophore (A23187)로 처리 후 DMAP로 4시간 배양하는 방법으로 유기하였다. 핵이식란은 CR1aa 액에서 9일간 배양하여 발육율을 검토하였으며, 활성화 후 30분~2.5시간에 고정하여 위상차현미경 혹은 confocal microscope 하에서 핵형변화를 검사하였다. 배반포기까지 발육율은 post-AC군(20.6%)가 pre-AC(15.3%)보다 다소 높게 나타났다. 또한 활성화 처리를 하여 핵이식란의 배발달을 비교한 결과 post-AC군이 더 늦은 배발달 속도를 나타내었다. Post-AC군을 활성화 후 30분, 2시간, 4시간으로 나누어 융합하여 발육율을 검토한 결과 발육율에 차이가 없었다. 핵이식란의 핵형변화를 분석한 결과는 pre-AC군에서는 융합 후 NEBD가 유기되고 PCC가 일어났으나 post-AC의 경우는 NEBD 없이 전핵형태를 유지하였다. Post-AC군의 경우는 융합 후에도 핵 주변에 donor 체세포 유래의 microtubulin이 관찰되었지만 pre-AC군의 경우는 융합 및 활성화 후 1.5 및 2.5시간에 microtubulin이 사라지는 것이 관찰되었다. 본 연구의 결과는 수핵란의 활성화 시간에 따라 핵이식란의 발육 및 핵형이 영향을 받을 수 있음을 시사한다.

참고문헌

- Anas, M.K., Shoho, A., Shimada, M. and Terada, T. 2000. Effects of wortmannin on the kinetics of GVBD and the activities of the maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase during bovine oocyte maturation in vitro. *Theriogenology* 53:1797-1806.
- Baguisi, A. and Overstrom, E.W. 2000. Induced enucleation in nuclear transfer procedures to produce cloned animals. *Theriogenology* 53:209
- Baguisi, A., Behboodi, E., Melican, D.T., Pollock, J.S., Destrempes, M.M., Cammuso, C., Williams, J.L., Nims, S.D., Porter, C.A., Midura, P., Palacios, M.J., Ayres, S.L., Denniston, R.S., Hayes, M.L., Ziomek, C.A., Meade, H.M., Godke, R.A., Gavin, W.G., Overstrom, E.W. and Echelard, Y. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotech.* 17:456-461.
- 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.
- Campbell, K.H.S., Ritchie, W.A. and Wilmut, I. 1993. Disappearance of maturation promoting factor and the formation of pronuclei in electrically activated in vitro matured bovine oocytes. *Theriogenology* 39:199
- Campbell K.H.S., Loi, P., Otaegui, P.J. and Wilmut, I. 1996. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Rev. Reprod.* 1:40-46.
- Cheong, H.T., Takahashi, Y. and Kanagawa, H. 1992. Development of mouse embryonic nuclei transferred to enucleated oocytes. *Jpn. J. Vet. Res.* 40:149-159.
- Cheong, H.T., Takahashi, Y. and Kanagawa, H. 1993. Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. *Biol. Reprod.* 48:958-963.
- Cheong, H.T., Takahashi, Y. and Kanagawa, H. 1994. Relationship between nuclear remodeling and subsequent development of mouse embryonic nuclei transferred to enucleated oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 37:138-145.
- Cheong, H.T., Park, T.M., Ikeda, K. and Takahashi, Y. 2003. Cell cycle analysis of bovine cultured somatic cells by flow cytometry. *Jpn. J. Vet. Res.* 51:95-103.
- Chesne, P., Adenot, P.G., Viglietta, C., Baratte, M., Boulanger, L. and Renard, J.P. 2002. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature Biotech.* 20:366-369.
- Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., León, A.P. and Robl, J.M. 1998.

- Cloned transgenic calves produced from non-quiescent fetal fibroblasts. *Science* 280:1256-1258.
- Collas, P. and Robl, J.M. 1990. Factors affecting efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. *Biol. Reprod.* 43:877-884.
- Collas, P., Balise, J.J. and Robl J.M. 1992 Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 46:492-500.
- Galli, C., Lagutina, I., Crotti, G., Colleoni, S., Turini, P., Ponderato, N., Duchi, R. and Lazzari, G. 2003. A cloned foal born to its dam twin. *Nature* 424: 635.
- Kim, N.H., Funahashi, H., Prather, R.S., Schatten, G., Day, B.N. 1996. Microtubule and microfilament dynamics in porcine oocytes during meiotic maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 43:248-255.
- Lorca, T., Cruzalegui, F.H., Fesquet, D., Cavadore, J.C., Mery, J., Means, A. and Doree, M. 1993. Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature* 366:270-273.
- Matsui, Y. and Markert, C.L. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. *Journal of Exp. Zool.* 177:129-145.
- Nurse, P. 1990. Universal control mechanism regulating the onset of M-phase. *Nature* 344:503-507.
- Onishi, A., Iwamoto, M., Akita, T., Mikawa, S., Takeda, K., Awata, T., Hanada, H. and Perry, A.C.F. 2002. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 289:1188-1190.
- Shiga, K., Fujita, T., Hirose, K., Sasae, Y. and Nagai, T. 1999. Production of calves by transfer of nuclei from cultured somatic cells obtained from Japanese black bulls. *Theriogenology* 53:527-535.
- Shin, T., Kraemer, K., Pryor, J., Liu, L., Rugila, J., Howe, L., Buck, S., Murphy, K., Yons, L.L. and Westhusin, M.W. 2002. Cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 415:859.
- Simerly, C. and Schatten, G. 1993. Techniques for localization of specific molecules in oocytes and embryos. *Methods Emzymol.* 225:516-552.
- Tani, T., Kato, Y. and Tsunoda, Y. 2001. Direct exposure of chromosomes to nonactivated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming. *Biol. Reprod.* 64:324-330.
- Vignon, X., Chesne, P., Le Bourhis, D., Flechon, J.E., Heyman, Y. and Renard, J.P. 1998. Developmental potential of bovine embryos reconstructed from enucleated matured oocytes fused with cultured somatic cells. *C.R. Acad. Sci. III* 321:735-745.

- Wakayama, T., Perry, A.C.F., Zuccoti, M., Johnson, K.R. and Yanagimach, R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394:369-394.
- Ware, C.B., Barnes, F.L., Maili-Laurila, M. and First, N.L. 1989. Age dependence of bovine oocyte activation. *Gamete Res.* 22:265 - 275.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J. and Campbell, K.H. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813.
- Woods, G.L., White, K.L., Vanderwall, D.K., Li, G.P., Aston, K.I., Bunch, T.D., Meerdo, L.N. and Pate, B.J. 2003. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science* 301:1063.
- Yin, X.J., Tani, T., Yonemura, I., Kawakami, M., Miyamoto, K., Hasegawa, R., Kato, Y. and Tsunoda, Y. 2002. Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes. *Biol. Reprod.* 67:442-446.
- Zhou, Q., Renard, J. P., Le Friec, G., Brochard, V., Beaujean, V., Cherifi, Y., Fraichard, A. and Cozzi, J. 2003. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science* 302:1179.

4-8. 혈청기아처리와 roscovitin처리, confluent처리가 소태아 섬유아세포의 세포동기화에 미치는 영향

EFFECTS OF CONFLUENT, ROSCOVITINE TREATMENT AND SERUM STARVATION ON THE CELL CYCLE SYNCHRONIZATION OF BOVINE FOETAL FIBROBLASTS

Abstract

The present study was designed to examine the effects of cell cycle synchronization protocols, such as confluent, roscovitine treatment and serum starvation, in bovine fetal fibroblasts on synchronization accuracy at G0/G1, viability, apoptosis, necrosis and ploidy for the use as a nuclei donor. The cells in 5-10 passages were randomly allocated into 3 treated groups. Cells were cultured either in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) + 10% FBS until 90% confluent (Group 1, confluent), in DMEM +10% FBS + 30 μ M roscovitine for 12 h (Group 2, roscovitine), or in DMEM + 0.5% FBS for 5 days (Group 3, serum starvation). Most of the cells (>80%) in all groups were arrested at G0/G1 stage. Although the rates did not differ, cells in Group 1 showed an increased cell population arrested at G0/G1 phase. Significantly ($P<0.05$) higher rates of apoptosis occurred in Group 3 than in Group 1 and 2 (10% vs. 6 and 6%, respectively). No differences in chromosomal abnormality were observed among groups. However, by increasing the cell culture passage up to 15, significantly ($P<0.05$) higher chromosomal abnormality was observed than in 5 and 10 passages (38% vs. 28 and 23%, respectively) in Group 1. The results clearly indicated that bovine fetal fibroblasts could be effectively synchronized at G0/G1 stages by all the three different treatments, confluent, roscovitine and serum-starvation. However, cells in confluent with passage 5-10 exhibited higher donor cell cycle synchronization efficiency along with reduced apoptosis and necrosis, and stable chromosome diversity and hence, could be used as nuclear donor.

서론

체세포 복제 기술을 이용한 형질 전환 동물을 생산하여 기초 연구, 의학 및 농업에 응용할 수 있다. 체세포 복제 기술을 이용하여 생산한 복제동물은 면양 (Schnieke et al., 1997; Wilmut et al., 1997), 염소 (Baguisi et al., 1999), 쥐 (Wakayama et al., 1998), 돼지 (Polejaeva et al., 2000), 소 (Cibelli et al., 1998; Kato et al., 1998; Wells et al., 1999) 등이 있다.

공여 세포와 세포의 발달단계 등과 같은 많은 인자들이 체세포 복제 동물 생산에 영향을 미친다. 부동한 세포 핵형가운데서, 태아 섬유아세포를 공여 세포로 많이 사용하고 있으며, 그 원인은 빠른 성장과 세포노화 전에 가능한 많은 세포를 분할할 수 있다 (Wilmut et al., 1997; Cibelli et al., 1998; Baguisi et al., 1999).

핵의 재구성과 재조합한 수정란의 발달에 있어서 공여 세포로서 세포주기가 G0 단계 세포가 사용되어 지고 있다.. (Wilmut et al., 1997; Kato et al., 1998; Baguisi et al., 1999; Kato et al., 2000). 하지만, 세포주기가 G1 단계인 공여 세포를 사용한 복제 수정란 역시 전 단계로 발달시켰다 (Cibelli et al., 1998; Kasinathan et al., 2001).

일반적으로 혈청을 결핍하는 방법을 사용하여 세포 주기를 G0/G1 단계에 정지하게 한다. (Wilmut et al., 1997; Kues et al., 2000). 다른 하나 방법은 세포를 집합하는 방법으로 세포를 G0/G1 단계로 바꾸어 놓는다. (Zetterberg and Skold, 1969). 이 단계에 세포 발달을 정지하기 위한 방법으로 세포 주기 반응 억제제를 사용하여 조사하였다 (Alessi et al., 1998 Kues et al., 2000). Roscovitine은 Cdk 2와 성숙 촉진 인자 (MPF)와 관련한 강력한 억제제로써 효과적으로 인간 섬유아세포를 G0/G1 단계에 정지하였으며 이를 제거할 때 G0/G1 단계에서 세포 주기가 다시 시작하여 S 단계로 넘어갔으며 (Alessi et al., 1998), 이는 전 세포 주기를 역으로 하는 효과가 있음을 표시한다. 본 실험에서 roscovitine을 혈청 결핍과 세포를 집합한 섬유아세포에 첨가하여 세포 주기를 G0/G1 단계에 정지하였다. 이런 세포를 체세포 복제 수정란의 공여 세포로 사용할 때, 타고난 배형성에 이상, 이수체, 모자이크 현상 증가, 배수성 광범위하게 분열이 발생한다.

체세포 핵이식에 사용할 공여세포를 동기화 하는 효과적인 방법을 확립하기 위하여 공여세포 배양 시 roscovitine과 serum starvation 방법을 사용하여 G0/G1기와, 생존성, 세포사멸과 세포괴사율을 확인하였다. 또한 passage에 따른 결과도 함께 확인하였다.

재료 및 방법

세포 준비 와 처리

도축장 유래 임신 2개월 소 태아를 얻어서 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS)에 씻는다. 조직을 1-3mm 크기로 찢르고 칼슘과 마그네슘이 없는 D-PBS에 씻고 나서 0.25% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 용액에서 37°C에서 15분 처리한 후에, 100 μ l micropipette으로 pipetting하여 단일 세포를 부유시켜 400 \times g에 10분간 원심분리 후에 DMEM 배양액에 10% FBS 첨가하여 배양하였다.

세포주기 분석

Cell cycle 분석은 CYSTAIN DNA 2 steps kit (PARTEC, Germany)를 이용한 flow cytometry (PARTEC. PA-1)로 실시하였다. 2 x 10⁶cells/mL 세포를 70% ethanol (4C)에 18시간 고정하였고, 고정액 제거를 위해서 200 Xg 10 분간 원심분리 시켰다. 세포를 DNA flurochrome 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)로 2분간 염색한 후 (Boquest et al., 1999), 분석하였다.

자가 사멸 분석

Apoptosis 조사는 In Situ Cell Death Detection Kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) 와 propidium iodide (PI, Molecular Probes, Eugene, OR)의 대조 염색에 의한 TUNEL 방법으로 실시하였다.

염색체 분석

염색체 분석은 5, 10, 15 passages의 태아 섬유아 세포를 Williams et al. (2003) 방법에 준하였다. 0.05 g/mL democolcine (Gibco, colcemide)이 첨가된 MEM에 itlrks 배양한 후, 0.075 mM KCl에 5분, 0.8% sodium citrate에 30분간 처리 한 다음, spread 하고 methanol : acetic acid (3:1, v/v)에 고정하였다. 4% Giemsa 액으로 5분간 염색한 후 light microscope (Nikon)에서 검경하였다.

실험 디자인

실험1, 부동한 조건을 처리한 태아 섬유아세포의 세포 주기를 분석하였다. 실험2, 부동한 조건을 처리한 태아 섬유아세포의 자가 사멸, 괴사 분석하였다. 실험3, 부동한 조건을 처리한 태아 섬유아세포의 염색체 분석하였다. 실험4, 부동한 passage의 태아 섬유아세포의 염색체 분석하였다.

통계처리

부동한 그룹간의 분석은 one-way ANOVA 로 실시하였고, 비교분석은 Duncan's and Tukey multiple comparisons test를 이용하였다. Chromosome analysis은 Student's t-test를 이용하였으며, $P < 0.05$ 일EO 유의적 차이를 인정하였다.

결과 및 고찰

Experiment 1: Analysis of cell cycle

Table 1. Cell-cycle synchronization of foetal fibroblasts cultured in different conditions

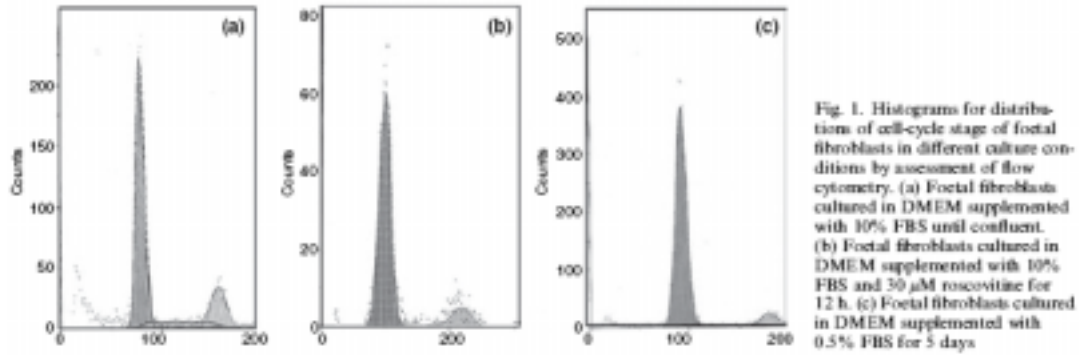
Group (culture conditions)	% cell cycle (mean \pm SEM)		
	G0/G1	S	G2/M
Group 1 (confluent)	86.9 \pm 0.0	5.8 \pm 0.3	7.3 \pm 0.0
Group 2 (roscovitine)	82.8 \pm 0.1	7.8 \pm 0.1	9.4 \pm 0.0
Group 3 (serum starvation)	82.9 \pm 1.2	9.7 \pm 1.0	7.4 \pm 0.5

Confluent, foetal fibroblasts cultured in DMEM supplemented with 10% FBS until confluent. Roscovitine, foetal fibroblasts cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and 30 μ M roscovitine for 12 h. Serum-starvation, foetal fibroblasts cultured in DMEM supplemented with 0.5% FBS for 5 days. Passage 6-8. Five replicates.

표 1의 결과는 부동한 배양 조건, 세포 집합, roscovitine을 처리, 혈청 결핍 조건에서의 태아 섬유아세포의 세포 주기를 flow cytometer를 사용하여 분석한 결과이다. 부동한 처리군에서 유의적 차이는 없다. 하지만 세포 집합하는 처리 군이 roscovitine와 혈청 결핍 처리군보다 G0/G1 단계 세포가 조금 많았다 (87% vs. 83% & 83%). 그림 1은 6-8 passage 태아 섬유아세포의 세포 집합했을 때 세포 주기를 막대 그래프로 나타낸 것이다. 본 실험의 결과를 통하여, 부동한 세포 배양 조건, 즉 세포 집합, roscovitine 처리, 혈청 결핍하는 방법으로 태아 섬유아세포를 G0/G1 단계에 정지할 수 있다. 동기화 방법과 세포의 passage가 공여세포의 세포사멸과 염색체 기형에 큰 영향을 미친다는 것을 알수

있었다.

그림1은 confluence 에 도달한 후 6-8 passage되는 세포를 채취하여 세포주기를 히스토그램으로 나타내었다. Flow cytometer를 사용하였다.



Experiment 2: Rates of apoptosis and survivability

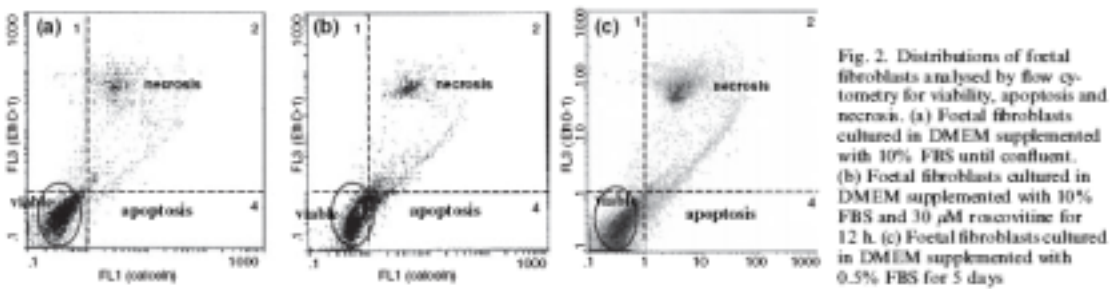


표 2와 그림 2는 6-8 passage의 태아 섬유아세포를 부동한 배양 조건에서 자가 사멸을 조사한 결과이다. 자가 사멸율은 그룹 3인혈청 결핍 처리 군이 그룹 1과 그룹2 세포 집합과 roscovitine을 처리 군보다 유의적으로 높았다 (10% vs 6% & 6%). 하지만, 세포 생존율은 각 처리 군에서 유의적 차이는 없었다. 모든 그룹의 80% 이상 되는 세포가 G0/G1기에 도달해 있었다. Boquest et al. (1999)은 confluent된 fetal fibroblasts cells의 85%이상이 G0/G1이었다고 발표하였다. Stice et al. (2000)은 핵이식에 사용할 G0/G1기의 세포를 만들기 위하여 가장 이상적이라고 생각되어온 serum starvation이 DNA에 손상을

Table 2. Rates of apoptosis and survivability of foetal fibroblasts cultured in different conditions

Groups (culture conditions)	% cells (mean \pm SEM)		
	Live	Necrotic	Apoptotic
Group 1 (confluent)	76.6 \pm 10.3	17.7 \pm 5.6	5.7 \pm 3.1 ^a
Group 2 (roscovitine)	74.6 \pm 8.6	19.4 \pm 3.8	6.0 \pm 2.8 ^a
Group 3 (serum starvation)	70.5 \pm 8.5	19.1 \pm 4.5	10.4 \pm 3.8 ^b

Confluent, foetal fibroblasts cultured in DMEM supplemented with 10% FBS until confluent. Roscovitine, foetal fibroblasts cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and 30 μ M roscovitine for 12 h. Serum-starvation, foetal fibroblasts cultured in DMEM supplemented with 0.5% FBS for 5 days. Passage 6-8.

*Percentage with different superscripts within columns indicate significant differences ($p < 0.05$).

Five replicates.

주어 공여세포의 세포사멸과 세포괴사를 높인다고 발표하였다. Gibbons et al. (2002)은 소의 granulosa cell을 동기화 시킬 때 roscovitine을 사용한 방법이 serum-starvation 방법보다 효과적이었다고 발표하였다. 더 나아가 roscovitine을 사용한 공여세포가 핵이식 시 핵의 reprogramming을 높여, 복제 후의 생존율을 높였다

Experiment 3: Chromosome analysis of fetal fibroblasts at 6-8 passages cultured in different conditions

Table 3. Chromosome analysis of foetal fibroblasts cultured in different conditions

Group (culture conditions)	No. of cells counted	No. (%) of cells with chromosomes		
		> 60	60	< 60
Group 1 (confluent)	107	15 (14.0)	74 (69.2)	18 (16.8)
Group 2 (roscovitine)	104	18 (17.3)	72 (69.2)	14 (13.5)
Group 3 (serum starvation)	107	18 (16.8)	65 (60.7)	24 (22.4)

Confluent, foetal fibroblasts cultured in DMEM supplemented with 10% FBS until confluent. Roscovitine, foetal fibroblasts cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and 30 μ M roscovitine for 12 h. Serum-starvation, foetal fibroblasts cultured in DMEM supplemented with 0.5% FBS for 5 days. Passage 6-8.

표3은 다른 조건하에서 배양 시킨 6-8 passage 의 foetal fibroblasts의 염색체를 분석한 표이다. serums tarvation 방법을 이용한 3번그룹이 confluent방법과, roscovitine방법에 비하여 60개 이하나 60개 이상의 비정상적인 염색체 이상율이 높았다.

serum-starved group 은 DNA 손상율이 높았다. 비교적으로 confluent group 과 roscovitine group은 DNA손상이 덜하여 세포주기 동기화에 더 효과적이었고, DNA correction 메카니즘이 더 효과적으로 발현되었다. 하지만 confluent group 과 roscovitine group 보다 serums tarvation group이 염색체 이상율이 높았지만 유의적 차이는 인정되지 않았다.

Experiment 4: Chromosome analysis of fetal fibroblasts in confluent at different cell passages

표 4는 소태아 섬유아 세포를 배양할 때 passage에 따른 염색체 분석이다. 5와 10 passge는 각각 72 and 77%의 정상적인 염색체율이 나왔고 유의적인 차이는 보이지 않았다. 그러나 15passge의 경우 5와 10passge에 비하여 높은 비정상적인 염색체율 (39% vs 28% and 23%)이 나왔다. Jaenisch (1997)는 노화되었거나, 많이 분화된 공여세포의 경우 체세포복제시에 비정상적인 리프로그래밍을 한다고 보고하였다.

Table 4. Chromosome analysis of foetal fibroblasts in confluent at different passages

No. of cell passage	No. of cells counted	No. (%) of cells with chromosomes		
		> 60	60	< 60
5	104	14 (13.6) ^a	75 (72.1) ^a	15 (14.4) ^a
10	119	12 (10.1) ^a	92 (77.3) ^a	15 (12.6) ^a
15	111	22 (19.8) ^b	68 (61.3) ^b	21 (18.9) ^b

Percentage with different superscripts within columns indicate significant differences ($p < 0.05$).
Three replicates.

결론적으로 다른 보고에서는 소태아 섬유아 세포를 G0/G1으로 세포주기를 동기화시킬 때 confluent, roscovitine and serum-starvation 방법 모두 효과가 있었다. 하지만, confluent 방법이 세포의 정상적인 염색체율이 가장 높았으며, 세포사멸과 세포괴사율이 낮았다. 따라서 핵이식을 할 경우 공여세포의 세포동기화를 시킬 때 confluent방법이 가장 효과적이다.

참고문헌

- Alessi F, Quarta S, Savio M, Riva F, Rossi L, Stivala LA, Scovassi AI, Meijer L, Prosperi E, 1998: The cyclin-dependent kinase inhibitors olomoucine and roscovitine arrest human fibroblasts in G1 phase by specific inhibition of CDK2 kinase activity. *Exp Cell Res* 245, 8 - 18.
- Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempe MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overstrom EW, Echelard Y, 1999: Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotech* 17, 456-461.
- Boquest AC, Day BN, Prather RS, 1999: Flow cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblasts cells. *Biol Reprod* 60, 1013 - 1019.
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Blackwell C, 1998: Cloned transgene calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280, 1256-1258.
- Gibbons J, Arat S, Rzucidlo J, Miyoshi K, Waltenburg R, Respass D, Venable A, Stice S, 2002: Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. *Biol Reprod* 66, 895-900.
- Jaenisch R, 1997: DNA methylation and imprinting: why bother? *Trends Genet* 13, 323-329.
- Kasinathan P, Knott JG, Wang Z, Jerry DJ, Robl JM, 2001: Production of calves from G1 fibroblasts. *Nat Biotechnol* 19, 1176-1178.
- 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.
- Kato Y, Tani T, 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.
- Kues WA, Anger M, Carnwarth JW, Motlik J, Nieman H, 2000: Cell cycle synchronization of porcine fibroblasts: effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors. *Biol Reprod* 62, 412 - 419.
- Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KHS, 2000: Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407, 505 - 509.
- Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A, Campbell KHS,

- 1997: Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 19, 278, 2130-2133.
- Stice SL, Gibbons J, Rzuclidlo JR, Baile CA, 2000: Improvements in nuclear transfer procedures will increase commercial utilization of animal cloning. *Asian Aust J Anim Sci* 13, 856 - 860.
- Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R, 1998: Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394,369 - 374.
- Wells DN, Misica PM, Tervit HR, 1999: Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod* 60, 996 - 1005.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS, 1997: Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385,810 - 813.
- Zetterberg A, Skold O, 1969: The effect of serum starvation on DNA, RNA and protein synthesis during interphase in L-cells. *Exp Cell Res.* 57, 114-118.

4-9. CDC2 Kinase Inhibitor를 사용하여 복제소를 생산 했을 때의 효과

EFFICIENT PRODUCTION OF CLONED BOVINE EMBRYOS USING CDC2 KINASE INHIBITOR

Abstract

This study was carried out to compare the effects of the combination of ionomycin with a H1-histone kinase inhibitor (dimethylaminopurine, DMAP) or cdc2 kinase inhibitor (sodium pyrophosphate, SPP) on the development of reconstituted bovine eggs.

For this study, the enucleated bovine oocytes were injected with a presumptive primordial germ cell (PGC) pre-treated with 1% sodium citrate, and randomly allocated into three activation groups: Group 1 (ionomycin 5 M, 5 min), Group 2 (ionomycin + DMAP 1.9 mM, 3 h), and Group 3 (ionomycin + SPP 2 mM, 3 h). The reconstituted eggs were compared the rates of cleavage and development to the blastocyst stage, and the ploidy of embryos at 96 h post-activation. Cleavage rates and blastocyst development in Groups 1, 2 and 3 were 7 and 0%, 63 and 17%, 53 and 14%, respectively. The chromosomal composition differed significantly ($p < 0.05$) among treatments. Although the embryos in Group 1 had significantly lower developments, 60% of embryos evaluated had diploid chromosomal sets. In contrast, ~60% of embryos in Group 2 had abnormal ploidy (21%, polyploid and 38%, mixoploid). In Group 3, the appearance of abnormal chromosome sets was reduced with the proportion of diploid embryos being increased to 86% (19/22), significantly higher ($p < 0.05$) than in Group 2.

It can be concluded that the use of SPP with ionomycin reduces greatly the incidence of chromosomal abnormalities, and may be applicable for the activation of nuclear transplant bovine embryos.

서론

성공적인 핵이식에는 핵 난자의 상태와, 수핵 제거 방법, 배양조건, 공여세포의 세포 주기 등, 무수히 많은 요인들이 관여한다. (Fulka et al., 1998 Korfiatis et al., 2001; Kasinathan et al., 2001; Du et al., 2002). 여러 논문에서 핵이식을 위한 조건에 대하여 연구하였지만, 여전히 체세포 핵이식의 효율은 아주 낮은 상태이다. 소의 경우 산자생산율이 3%가 넘지 않는다. (Wilmut et al., 1997; Wakayama et al., 1998). 많은 노력에도 불구하고 핵이식의 성공률이 낮은 이유는 세포 분화에 있어서의 유전적인 문제와 난자의 activation과 깊이 관련이 있을 것이다. (Susko-Parrish et al., 1994; Alberio et al., 2000, 2001; Motlik et al., 2002).

수핵난자에 공여세포를 주입하거나, fusion 시, 수정란의 재구성을 유도하기 위해서는 반드시 난자의 maturation promoting factor(MPF)를 낮은 상태로 유지시키는 활성화를 시켜야 한다. 수핵난자의 활성화는 체세포 핵이식의 성공에 결정적인 역할을 하는 열쇠라고 주장된다(Stice and Robl, 1988 Yang et al., 1994). 소의 단위생식과 체세포핵이식에서의 수정란의 재구성에 필수적인 인공적인 활성화를 유도하는 물질로, Ca^{2+} ionophore (Ware et al., 1989; Liu et al., 1998ab), ethanol (Nagai, 1987 1992; Presicce et al., 1994), electrical stimulation (Ware et al., 1989), inhibitors of protein synthesis (Presicce et al., 1994 Ledda et al., 1996; Liu et al., 1998ab) and phosphorylation inhibitors (Ledda et al., 1996; Liu et al., 1998ab) 등이 쓰여지고 있다. 그러나 단지 이러한 화학 물질로는 종종 난자의 노화를 촉진시키고, 하나 혹은 2번의 분할만을 유도하기 때문에 배 발달에는 제한적일 수 있다. 이것에 대한 이유는 아직 까지 밝혀지지 않고 있으며, 비정상적인 염색체 배수성이나, 부계유래 지놈의 부재에 의하여 일것이라 추측되어진다(De La Fuente and King 1998). 따라서 일반적으로 소 난자를 단위발생시킬 경우 Ca^{2+} ionophore와 cycloheximide 혹은 6-dimethylaminopurine (DMAP)을 병용 사용함으로써 세포주기의 재개와 배반포 발달율을 향상시킬 수 있다 (Susko-Parrish et al., 1994). 소난자의 활성화 후 DMAP으로 처리하는 것은 전핵형성이나, 감수분열을 재개하는 것에 유리하다고 알려져 있다 (Susko-Parrish et al., 1994). 그러나 단위발생 후 빈번히 일어나는 염색체의 이상은 발달 지연에 중요한 요인이라고 한다 (King et al., 1988, Winger et al., 1997).

Ionomycin 이나, protein phosphorylation inhibitor에 의한 활성화 후, 첫 세포 주기 동안 핵분열에 이상이 일어난다는 것을 발견하였다 (De La Fuente and King, 1998). 이와 유사하게, cycloheximide 뿐만 아니라, DNA복제 제한을 조절하는 세포질의 단백질들 또한 MPF 유지 단백질을 유도한다 (Soloy et al., 1997). 소 난자의 활성화법을 사용한 체세포 핵이식이나, 난자내정자 주입술은 비정상적인 수정란을 생산 할 확률이 높다.

Butyrolactone I 과 bohemin, sodium pyrophosphate (SPP)는 cdc2 kinase inhibitor 를 합성하는 물질로 사용되었다 (Doree et al., 1993). 그러나 이것을 사용하여 단위발생이나, 체세포핵이식을 하여 그 물질의 효과를 알아본 연구는 전무하다. 따라서 본 연구는 난자의 활성화에 DMAP와 SPP를 처리한 군을 각각 비교하여 난자의 발달율을 비교하였고, 체세포 핵이식시 소의 원시생식 세포를 사용하여 그 효용성을 검증하고자 실시하였다.

재료 및 방법

배양액

Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)에서 구입된 시약 및 배양액을 본 실험에 공시하였다. 난자성숙 배양액 (IVM)은 2.5 mM sodium pyruvate, 1 mM L-glutamine, 1.0% (v/v) penicillin-streptomycin (10,000 IU and 10,000 g/mL, respectively; Pen-Strep; GIBCO), 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL), 10 g/mL FSH, 10 g/mL LH, and 1 g/mL estradiol 17 함유된 TCM199를 이용하였다. Albumin, lactate, pyruvate 가 함유된 Tyrode's medium으로 Hepes-TALP 및 IVF-TALP)를 만들었고, 수정란 배양액으로는 modified Eagle medium (MEM) non-essential amino acids, 0.4 mM sodium pyruvate, 1 mM L-glutamine 및 50 g/mL gentamycin이 함유된 synthetic oviduct fluid medium (SOF) 배양액을 이용하였다. 모든 배양액은 pH 7.4 그리고 삼투압 280 mOsm/kg로 보정하여 사용하였다.

난자의 준비

난자 난구 복합체를 50 μ l 체외성숙 배양액에 24시간 둔다. 난구세포를 벗기고, 세포질이 충실한 것만을 골라 실험에 공시한다.

체외수정

체외성숙 후 난자 주변의 난구세포를 제거한 다음 IVF-TALP 미디어 드랍에 옮겨놓는다. 동결 정액을 ml당 2106 개가 되도록 넣고 20-24시간 수정시킨다. 이때 소 난관상피 세포 (이하 BOEC)와 공배양한다. BOEC 회수법은 Rieger et al (1995)의 방법을 따랐다

원시생식세포로 추정되는 세포의 준비 (PGCs)

CRL을 측정하여 2달령의 도축장 유래 소 태아에서 절제술을 사용하여 생식선을 채취하였다. 생식선은 percoll gradient(25, 30, 45% fraction, v/v)를 사용하여 30% percoll층의 상부에 있는 원시생식세포추정세포를 회수하였다. 원심분리기의 800g에서 10분 간 원심분리하여, washing하였다. 원시생식세포로 추정되는 세포는 15% FBS, 10 mM non-essential amino acid (Gibco), 2 mM essential amino acid (Gibco), 1000 units/ml human leukemia inhibitory factor, 1-2 ng/ml human basic fibroblast factor, 60 ng/ml human stem cell factor, 10 mM forskolin and 0.5% (v/v) Pen-Strep가 들어있는 DMEM에서 20-22시간 배양시킨다(Zakhartchenko et al., 1999). 그리고 10% FCS와 10% DMSO가 들어있는 동결용액을 사용하여 동결시킨다.

핵이식

19시간 동안 성숙시킨 난자에서 난구 세포를 제거한 다음 5 ug/ml cytochalasin B가 들어있는 HEPES-TALP에 10분간 전 처리 후, 제 1극체 및 주위의 세포질을 제거함으로써 탈핵을 시켰다. 원시생식세포를 탈핵된 난자의 위란강내에 주입하였다. 그 후 mannitol 용액에서 전기자극을 가하여 세포질과 공핵의 융합을 유도하였다 (Collas and Barnes, 1994; Do et al., 2002)

활성화와 배양

융합된 난자를 5 uM ionomycin 이 함유된 HEPES-TALP에 5분간 처리하고, 활성화를 멈추기 위하여, 30 mg/ml의 bovine serum albumin (BSA)이 함유된 배양액에 5분간

처리 후 (Group 1). 그 중 일부는 1.9 mM DMAP이 들어있는 배양액에 3시간 (Group 2), 또는 DMAP 대신 2 mM SPP이 들어있는 배양액에 3시간 배양시켰다 (Group 3). 모든 핵이식 란은 소 난관상피세포와 공배양하였다 (Rho et al. 2001).

Cytological Procedures

난자는 10 ug/mL propidium iodide (PI)에 염색하여 전핵 형성을 관찰하였다. 96시간 째에 cytogenetic composition을 관찰하였다 (King and Basrur 1979)

Experimental Design

실험 1에서는 각기 다른 세가지의 활성화방법을 사용하여 전핵형성과 핵의 상태를 관찰하였고, 실험 2에서는 체외수정란을 control로 하여 세가지의 활성화 방법 간 분할율과 배반포율을 48시간과 192시간에 각각 측정하였다. 또한 염색체의 배수성 확인하였다. 실험 4에서는, 세가지의 활성화방법을 사용한 체세포핵이식 수정란의 전핵형성과 핵의 상태를 관찰하였다. 마지막으로 실험 5에서는 세가지의 활성화방법을 사용한 핵이식 수정란의 분할율과 배반포율을 48시간과 192시간에 각각 측정하였다. 또한 염색체의 배수성 역시 확인하였다.

통계처리

전핵 형성과 분할율, 발달율, 이수성은 one-way analysis of variance (ANOVA)를 사용하여 통계처리 하였다. P값이 0.05보다 작을 때 유의성을 인정하였다.

결과 및 고찰

Pronuclear formation of oocytes produced by different 활성화 treatments

표1은 실험 1의 결과를 보여주고 있다. 첫 번째 그룹 2와 3은 88%이상 전핵형성 시기 까지 발전하였지만, 그룹 3이 2보다 높은 전핵 형성 비율을 보였다. 그룹 1은 22% 만인 전핵형성을 하였다.

Table 1. Nuclear observations of bovine oocytes at 18 h after various activation procedures

Groups (treatment)	Oocytes used	Nuclear configuration (%)				
		MII	AII-TII	1PN	2PN	>3PN
1. Ionomycin	64	10 (15.6) ^a	40 (62.5) ^a	14 (21.9) ^a	0	0
2. Ionomycin + DMAP	72	3 (4.2) ^b	7 (9.7) ^b	40 (55.6) ^b	12 (16.7) ^a	10 (13.9) ^a
3. Ionomycin + SPP	68	3 (4.4) ^b	5 (7.4) ^b	58 (85.3) ^c	1 (1.5) ^b	1 (1.5) ^b

*Percentages with different superscripts within columns indicate significant differences (p<0.05).

DMAP: dimethylaminopurine, SPP: sodium pyrophosphate.

MII: metaphase II, AII: anaphase II, TII: telophase II, PN: pronucleus

Cleavage and development of parthenotes produced by different activation treatments

표2는 실험2의 결과이다. 그룹 1의 10%만이 분할하였으며, 배반포로는 발달하지 못하였다. 그룹 2와 3은 분할율은 45%이상으로 좋은 결과를 보였지만. 배반포로의 발달율은 control군이 체외수정 난자가 가장 높았다(23.2%,0%,12.1%,7.3%).

Table 2. The rates of cleavage and development of oocytes after various activation procedures

Groups (treatment)	Oocytes used	Development to (%)	
		Cleavage	Blastocyst
IVF control	250	147 (58.8) ^a	58 (23.2) ^a
1. Ionomycin	247	24 (9.7) ^b	0
2. Ionomycin + DMAP	239	122 (51.0) ^a	29 (12.1) ^b
3. Ionomycin + SPP	234	105 (44.9) ^a	17 (7.3) ^c

*Percentages with different superscripts within columns indicate significant differences (p<0.05).

DMAP: dimethylaminopurine, SPP: sodium pyrophosphate.

Ploidy of parthenotes produced by different activation treatments

표3은 실험 3의 결과이다. 50개의 단위발생란을 사용하여 96시간에 염색체분석을 실시하였다. Ionomycin을 단독 처리한 1번 그룹의 경우 80%의 반수성 염색체가 나왔다. 그러나ionomycin처리후 바로 DMAP을 처리한 그룹 2의 경우 20%만이 반수성이었으며, 배수성은 10% 다수성은 60%였다. spp를 사용한 그룹 3의 경우 염색체의 이수성이 줄어들었으며, 20개중의 18개가 반수성을 보였다.

Table 3. Ploidy in the parthenotes produced by various activation procedures

Groups (treatment)	Embryos used	Chromosomal status (%)			
		Haploid	Diploid	Polyploid	Mixoploid
1. Ionomycin	10	8 (80) ^b	0 (0)	2 (20) ^a	0 (0)
2. Ionomycin + DMAP	20	4 (20) ^a	2 (10)	12 (60) ^b	2 (10)
3. Ionomycin + SPP	20	18 (90) ^b	1 (5)	1 (5) ^a	0 (0)

*Percentages with different superscripts within columns indicate significant differences ($p < 0.05$).

DMAP: dimethylaminopurine, SPP: sodium pyrophosphate.

Pronuclear formation of NT eggs produced by different activation treatments

실험 4의 결과인 표4는 그룹 2와 3이 94%의 전핵 형성을 보였으며, 그룹 3이 2보다 높은 유의성을 보였다.

Table 4. Pronuclear formation of bovine embryos reconstituted with primordial germ cells at 18 h after various activation procedures

Groups (treatment)	Oocytes used	Nuclear status (%)			
		No PN	1PN	2PN	>3 PN
1. Ionomycin	69	47 (68.1) ^a	22 (31.9) ^a	0	0
2. Ionomycin + DMAP	78	4 (5.1) ^b	23 (29.5) ^a	28 (35.9) ^a	23 (29.5)
3. Ionomycin + SPP	76	6 (7.9) ^b	61 (80.3) ^b	9 (11.8) ^b	0

*Percentages with different superscripts within columns indicate significant differences ($p < 0.05$).

DMAP: dimethylaminopurine, SPP: sodium pyrophosphate PN: pronucleus

Cleavage and development of NT embryos produced by different activation treatments

표 5는 실험 5의 결과 이다. 그룹 1은 7%의 분할율을 보였고 배반포로 발달하지 못하였다., 이와 비교해 그룹 2와 3의 경우 급격히 분할율이 증가하였다. 이와 유사하게 배반포 율도 역시 2와 3에서 증가하였다. 그룹 2와3의 경우 유의적 차이는 없었다.

Table 5. The rates of cleavage and development of bovine embryos reconstituted with primordial germ cells after various activation procedures

Groups (treatment)	Oocytes used	Development to (%)	
		Cleavage	Blastocyst
1. Ionomycin	144	10 (6.9) ^a	0
2. Ionomycin + DMAP	186	118 (63.4) ^b	32 (17.2)
3. Ionomycin + SPP	160	84 (52.5) ^b	22 (13.9)

*Percentages with different superscripts within columns indicate significant differences (p<0.05).

DMAP: dimethylaminopurine, SPP: sodium pyrophosphate.

Ploidy of NT embryos produced by different activation treatments

표6은 실험 6의 결과 이다. 그룹1의 69%가 이수성을 보였고, 그룹 3의 조금 더 높은 이수성을 보였다. 그러나 Ionomycin + DMAP의 경우 42%가 이수성을 보였가 나머지는 배수성을 보였다.

Table 6. Ploidy of bovine embryos reconstituted with primordial germ cells after various activation procedures

Groups (treatment)	Embryos used	Chromosomal status (%)			
		Haploid	Diploid	Polyploid	Mixoploid
1. Ionomycin	13	1 (7.7)	9 (69.2) ^a	3 (23.1) ^a	0
2. Ionomycin + DMAP	24	0 (0)	10 (41.7) ^b	5 (20.8) ^a	9 (37.5) ^a
3. Ionomycin + SPP	22	1 (4.5)	19 (86.4) ^a	1 (4.5) ^b	1 (4.5) ^b

*Percentages with different superscripts within columns indicate significant differences (p<0.05).

DMAP: dimethylaminopurine, SPP: sodium pyrophosphate.

결론적으로 본 연구에서는 cdc2 kinase inhibitor를 사용하여 체외 성숙 시킨 난자와 핵이식한 난자를 성공적으로 activation 시킬 수 있다는 것을 증명하였다. 이 연구 결과는 SPP를 사용하여 단위발생란과 체세포 핵이식란을 생산한 첫 번째 논문으로 그 가치

참고문헌

- Alberio R, Kubelka M, Zakhartchenko V, Hajduch M, Wolf E, Motlik J, 2000: Activation of bovine oocytes by specific inhibition of cyclin-dependent kinases . *Mol Reprod Dev* 55, 422-432.
- Collas P, Barnes FL, 1994: Nuclear transplantation by micromanipulation of inner cell mass and granulose cell nuclei. *Mol Reprod Dev* 38, 264-267.
- De La Fuente R, King WA, 1998: Developmental consequences of karyokinesis without cytokinesis during the first mitotic cell cycle of bovine parthenotes. *Biol Reprod* 58, 952-962.
- Doree M, Lorca T, Picard A, 1993: Maturation-promoting factor and cyclin-dependent protein kinase. In: Rickwood D and Hames BD (ed). *The cell cycle - A practical approach*. Oxford University Press New York, pp. 285-309.
- Do JT, Lee JW, Lee BY, Kim SB, Ryoo ZY, Lee HT, Chung KS, 2002: Fate of donor mitochondrial DNA in cloned bovine embryos produced by microinjection of cumulus cells. *Biol Reprod* 67, 555-560.
- Du F, Sung LY, Tian XC, Yang X, 2002: Differential cytoplasm requirement for embryonic and somatic cell nuclear transfer in cattle. *Mol Reprod Dev* 63, 183-191.
- Fulka JJr, First NL, Loi P, Moor RM, 1998: Cloning by somatic cell nuclear transfer. *BioEssays* 20, 847-851.
- Kasinathan P, Knott JG, Wang Z, Jerry DJ, Robl JM, 2001: Production of calves from G1 fibroblasts. *Nature Biotech* 19, 1176-1178.
- King WA, Basur PK, 1979: Ultrastructural changes in hereditary muscular hypertrophy in cattle. *Acta Vet Scand* 20, 245-257.
- King WA, Xu KP, Sirard MA, Greve T, Leclerc P, Lambert RD, Jacques P, 1988: Cytogenetic study of parthenogenetically activated bovine oocytes matured in vivo and in vitro. *Gamete Res* 20, 265-274
- Korfiatis N, Trounson A, Lacham-Kaplan O, 2001: Cell synchronization for the purposes of nuclear transfer

- in the bovine. *Cloning Stem Cells* 3, 125-138.
- Ledda S, Loi P, Bogliolo L, Moor RM, Fulka J Jr, 1996: The effect of 6-dimethylaminopurine (DMAP) on DNA synthesis in activated mammalian oocytes. *Zygote* 4, 7-9.
- Liu L, Ju JC, Yang X, 1998b: Parthenogenetic development and protein patterns of newly matured bovine oocytes after chemical activation. *Mol Reprod Dev* 49, 298-307.
- Motlik J Alberio R, Zakhartchenko V, Stojkovic M, Kubelka M, Wolf E, 2002: The effect of activation of Mammalian oocytes on remodeling of donor nuclei after nuclear transfer. *Cloning Stem Cells* 4, 245-252.
- Nagai T, 1987: Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes in vitro with ethanol. *Gamete Res* 16, 243-249.
- Presicce GA, Yang X, 1994: Parthenogenetic development of bovine oocytes matured in vitro for 24 hr and activated by ethanol and cycloheximide. *Mol Reprod Dev* 38, 380-385.
- Rho GJ, Wu B, Kawarsky S, Leibo SP, Betteridge KJ, 1998: Activation regimens to prepare bovine oocytes for intracytoplasmic sperm injection. *Mol Reprod Dev* 50, 485-492.
- Soloy E, Kanka J, Viuff D, Smith SD, Callesen H, Greve T, 1997: Time course of pronuclear deoxyribonucleic acid synthesis in parthenogenetically activated bovine oocytes. *Biol Reprod* 57, 27-35.
- Stice SL, Robl JM, 1988: Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod* 39, 657-664.
- Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Northey DL, Schultkus V, First NL, 1994: Inhibition of protein kinases induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. *Dev Biol* 166, 729-739.
- Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R, 1998: Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394, 369-374.
- Ware CB, Barnes FL, Maiki-Laurila M, First NL, 1989: Age dependence of bovine oocyte activation. *Gamete Res* 22, 265-275.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS, 1997: Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-813.
- Winger QA, De La Fuente R, King WA, Armstrong DT, Watson AJ, 1997: Bovine parthenogenesis is characterized by abnormal chromosomal complements: implications for maternal and paternal

co-dependence during early bovine development. *Dev Genetics* 21, 160-166.

Yang X, Presicce GA, Moraghan L, Jianf S, Foote RH, 1994: Synergistic effect of ethanol and cycloheximide on activation of freshly matured bovine oocytes. *Theriogenology* 41, 395-403.

4-10. 다양한 활성화 처리방법이 핵이식 후 소수정란의 발달율과 배수성에 미치는 영향

DEVELOPMENTAL RATE AND PLOIDY OF EMBRYOS PRODUCED BY NUCLEAR TRANSFER WITH DIFFERENT ACTIVATION TREATMENTS IN CATTLE

Abstract

Bovine oocyte activation is one of the essential elements that determine the success of nuclear transfer and the subsequent development of cloned embryos. Three methods for oocyte activation, including 5 M ionomycin (5 min, Group 1) alone, ionomycin + 1.9 mM 6-dimethylaminopurine (DMAP, 3 h, Group 2), and ionomycin + 10 g/ml cycloheximide (CHX, 3 h, Group 3) were compared for the development of embryos produced by somatic nuclear transfer (SCNT) to parthenotes and IVF counterparts. At 19 h post-activation/insemination (hpa/hpi), 27.5% of oocytes in Group 2 cleaved and this rate was greater ($P<0.05$) than other groups (Group 1, 2.1%; Group 3, 3.0%). None of the oocytes in the IVF control group cleaved at 19 to 22 hpi. At 24 hpa, the rates of cleavage of oocytes in Group 2 (52.1%) were greater ($P<0.05$) than those in Group 1 and 3 (7 and 38.3%, respectively). Only 6 oocytes (3.3%) in the IVF control group cleaved at 24 hpi. The overall cleavage rates of oocytes in Group 2 (85.5%) at 48 hpa were greater ($P<0.05$) than other treatments, but it did not show any difference when compared with the IVF control group (75.0%). The development rate to two-cell stage embryos of Group 2 was consistently greater at all observation points followed by Group 3 and Group 1. Similar results were obtained in SCNT embryos, but the rates of cleavage at 48 hpi and blastocyst development in Group 2 (68.4 and 16.3%, respectively) did not differ from Group 3 (63.0 and 13.1% respectively). The chromosomal composition in the parthenotes and SCNT embryos differed ($P<0.05$) among treatments. In Groups 1 and 3, greater percentages of haploid parthenotes (86 and 71%, respectively) were observed.

In contrast, 84% of parthenotes in Group 2 had abnormal ploidy (44% polyploid and 40% mixoploid). In the case of SCNT embryos, Group 1 and Group 3 had greater percentages of diploid chromosomal sets (77 and 70%, respectively), whereas 54% in Group 2 were polyploid or mixoploid. These results indicate that DMAP treatment after ionomycin greatly increases the developmental rates of parthenotes, but did not differ in blastocyst development compared with CHX treatment. However, DMAP treatment increased the time-dependent cleavage rate to two-cell stage embryos. Further, it greatly enhanced the incidence of chromosomal abnormalities in parthenotes and SCNT embryos. Hence, it is concluded that CHX combined with ionomycin is more desirable than DMAP for oocyte activation during nuclear transfer in cattle.

서론

Somatic cell nuclear transfer (SCNT)을 이용한 동물 복제는 엄청난 가치를 가진 가축의 생산 증가의 가능성을 가지고 있으며, 마침내는 일반적인 생산법보다 더 많은 경제적인 가치를 증명할 것이다 (Cibelli et al., 1998; Wells et al., 1999). 그것은 또한 therapeutic use를 위한 배반포 유래 줄기세포의 생산을 위한 가능성과 의학에서 많은 양의 사람 단백질을 생산해 내는 형질전환 동물 생산에 유용하다 (Hwang et al., 2004; Keefer, 2004). 게다가, 그것은 유전자 발현, 세포 내 기능에서 nuclear-cytoplasmic의 기여와 발달과 노화 등의 성장에서의 각각의 역할의 이해를 도울 수가 있다(Cibelli et al., 1998; McCreath et al., 2000). 그러나, SCNT procedure의 효율과 대리모에 embryos를 이식함으로써 얻어지는 산자 생산 비율은 여전히 낮다(Wilmut et al., 1997).

SCNT techniques의 성공은 reconstruction process, 배양 조건, 공여세포와 이식세포의 세포 주기를 포함하는 많은 요인들에 의존한다(Wilmut et al., 1997; Lanza et al., 2000; Du et al., 2002). 게다가, 난자의 활성화는 chromatin configuration, histone composition, methylation과 acetylation patterns, 그리고 이후의 embryo 발달에서 유전자 각인 등을 포함하는 정확한 reprogramming에서 중요한 구성성분으로 보인다(De Sousa et al., 2002).

초기 분할 단계에서의 kinetics은 embryo의 발달에 결정적이며, 여러 연구자에 의해

많이 연구되어졌다(Langendonck et al., 1997; Lonergan et al., 1999, 2000; Gutierrez-Adan et al., 2001, 2004). 그들은 소에서 체외수정 이후 보다 이른 시간에 분할이 일어난 난자가 늦게 분할이 일어난 난자에 비해 배반포로 이르는 수가 더 많은, post insemination in vitro 의 첫 분할 시간과 발달 능력을 명확하게 증명하였다. (Lonergan et al., 1999). 그 후에 발달 능력과 접합자의 초기-후기 분할을 사이의 성비에서 차이를 반영하는 초기 배에서의 다른 유전자의 발현을 증명하였다(Lonergan et al., 2000).

cytoplasts의 활성화나 reconstructed bovine SCNT embryos 을 위한 protocol은 세포 내 calcium 변화의 시작(Ware et al., 1989)에서 일어나는 첫 번째 처리, cycloheximide(CHX) (Zakhartchenko et al., 1999)이나 6-dimethylaminopurine (DMAP) (Wells et al., 1999)을 사용한 두 번째 처리로써 calcium ionophore나 전기적 자극을 포함하는 연속적인 처리는 일반적으로 사용된다. 이러한 연속적인 처리는 MPF (Mitosis Promoting Factor)불활성(Susko-Parrish et al., 1994)과/이나 감수분열의 재시작을 이끄는 CSF (cytostatic factor)을 유도하고, 첫 번째 embryonic 세포주기에 들어가도록 유도한다. DMAP와 CHX는 난자에서 몇몇 metabolic pathways에서 broad-spectrum inhibitors으로 비특이적으로 활동하고 결과적으로 배발달에 악화시킬 수도 있다(Susko-Parrish et al., 1994). 그러나, 화학물로써 활성화되는 소의 난자는 비정상적인 염색체를 형성하는 특징이 있다(Rho et al., 1998).

본 연구의 목적은 소에서 SCNT를 위한 효율적인 protocol 확립과 발달율, 단위발생란의 ploidy와 다른 활성화 처리에 따른 SCNT embryos의 효율을 각기 비교 분석하여 최적의 방법을 구축하고자 하였다.

재료 및 방법

1. Chemicals

모든 시약은 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)의 것을 사용하였고, 배양액은 Gibco (Life Technologies, Rockville, MD, USA)을 사용하였다.

2. 배양액

난자 성숙 배양액은 2.5 mM Na pyruvate, 1 mM L-glutamine, 1.0% (v/v)

penicillin-streptomycin (10,000 IU and 10,000 g/ml respectively; Pen-Strep; GIBCO), 10% (v/v) FCS, 10 g/ml FSH, 10 g/ml LH and 1 g/ml estradiol-17이 포함된 TCM199 을 사용하였다. 체외 배양액은 modified Eagle medium (MEM), nonessential amino acids (Gibco BRL, Burlington, ON, Canada), 0.4 mM pyruvic acid, 1 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich), and 50 g/ml gentamicin (Sigma-Aldrich)이 포함된 synthetic oviduct fluid medium (SOF)을 사용하였다. 6 mg/ml bovine serum albumin (BSA, essentially fatty acid free), 10 mM sodium lactate이 포함된 Tyrode's mediu와, supplemented with 10 mM HEPES (HEPES-TALP)이 포함된 1 mM sodium pyruvate (IVF-TALP)는 ionomycin의 5 uM solutions준비와 oocyte micromanipulation에 사용되었다. 체외배양액은 10 g/ml solution of cycloheximide (CHX) 와 1.9 mM 6-dimethylaminopurine (DMAP)에 이용되었다. 모든 배양액의 pH는 7.4, 삼투압은 280 mOsm/Kg으로 사용하였다.

3. 난자 준비

도축장 유래 난소의 2~7mm 직경의 난포에서 난자-난구세포 복합체를 채취하여 체외 성숙 배양액에 39C, 5% CO₂ 의 조건에서 성숙시켰다..

4. 체외 수정

단위발생란과 SCNT embryos 을 비교하기 위해, embryos은 Parrish et al (1986)에 기초를 둔 기본적인 체외수정 protocol을 이용하여 생산하였다.

동결 정액을 용해하고 손상 없는 정자를 Rosenkrans et al. (1993)이 기술한 Percoll-density gradient method을 사용하여 분리시켰다. 22h 성숙시킨 난자에서 난구세포를 부분적으로 벗기고, 15개의 난자에 최종 정자 농도가 2X10⁶ sperm/ml 되게 하여 39C, 5% CO₂에서 16시간 체외수정 시킨 후 체외배양액 (IVC) 에 옮겨, 배양하였다.

5. 공여세포 준비

도축장에서 채집한 태아(crown-rump length, ~3 cm)에서 fetal fibroblasts을 분리시켰다. 분리된 세포를 DMEM 배양액에서 5~6 passages까지 계대배양시켰고, confluent 상

태로 자란 세포를 핵이식 바로 직전에 0.25% trypsin - 0.04% EDTA solution을 사용하여 군집에서 분리시킨다.

6. 핵이식

성숙19시간 후, expanded cumulus cells을 3% (v/v) sodium citrate solution으로 제거하고 제 1극체가 방출된 난자와 세포질이 충분한 난자를 선택하여 SCNT과정에 사용하였다. 제1극체와 소량의 metaphase II plate 을 세포질 주변에서 제거한 이후 0.5 mg/ml bisbenzimidazole (Hoechst-33342)으로 염색하여 핵이 확실하게 제거되었는지 확인한다. 공여세포를 선택하여 탈핵 때 난 구멍으로 난황주위로 주입한다. oocyte-nucleus complexes는 200 BTX cell fusion machine (BTX, USA)을 사용하여 single DC pulse at 1.6 kV/cm에 융합하고, 0.01% BSA, 100 M MgCl₂ 와 50 M CaCl₂ 든 0.28 M mannitol solution에 60초 둔다. 1시간 이후에 eggs의 융합을 확인한다.

7. 활성화와 배양

핵이식란을 5 uM ionomycin에 5 분간 처리하여 활성화 자극을 가한 후, 활성화를 정지시키기 위해 30 mg/ml BSA에 4 분간 둔었다. 그 후 maturation promoting factors (MPF)의 낮은 level을 유지하기 위해, 난자를 10 ug/ml CHX 이나 1.9 mM DMAP이 포함된 IVC 배양액에서 5시간 배양하였다. 단위발생란의 생산은, 22 시간 체외성숙 된 난자에서 제 1극체가 출현하고 세포질이 충분한 것을 선택하여, 복제란 생산과 동일한 방법으로 활성화 처리를 하였다.

IVF, 단위발생란, 복제란은 EDTA와 8 mg/ml BSA이 포함된 IVC 배양액에 39, 5% CO₂, 5%O₂, 90% N₂에 3일간 배양하였고, 그 후, 8 mg/ml BSA와 MEM essential amino acids이 포함된 IVC 배양액에 5일간 더 배양하였다. 6일 째에 10 ul의 새로운 IVC medium 을 "fed" 하였다. 분할율과 배반포로의 발달은 각각 2일 째와 7일째에 측정하였다.

8. Cytological procedure

체외배양 96 시간에 수정란을 King and Basrur (1979)의 방법에 준하여 핵형을 조사하였다. 0.05 ug/ml democolcine (KaryoMAX Colcemid, GIBCO BRL, USA)으로 6시간

처리하여 모든 할구를 M phase에 arrest 시켰고, hypotonic solution (0.8% Na-citrate, w/v)에 옮겨 4 분간 두어 세포의 swelling을 유도하였다. 그 후 수정란을 slide위에 두고, 0.5 ul hypotonic solution과 1.5 ul 의methanol: acetic acid (1:1, v/v)을 수정란 위에 떨어 뜨리고 불면서 염색체를 분사시켰다. Slides를 methanol: acetic acid (3:1, v/v)에서 overnight 고정시키고 4% (v/v) Giemsa 염색액으로 10 분간 염색하였다. 염색체와 핵의 구성을 200 X의 현미경에서 관찰하였으며, 수정란의 구분은 haploid, diploid, polyploidy, mixoploid로 분류하였다.

9. Experimental design

각기 다른 활성화 처리에 따른 배발달율을 관찰하기 위해서 세가지 처리군으로 나누었다. Group 1 (Ionomycin)은 난자와 복제란을 5 uM ionomycin에 5분간 처리 후, 30 mg/ml BSA에 4 분간 두어 활성화를 억제시켰으며, Group 2 (Ionomycin+DMAP)에서는 난자와 복제란을 ionomycin으로 활성화시키 후 1.9 mM DMAP에 5시간 배양하였다. Group 3 (Ionomycin+CHX)에서는 Ionomycin으로 활성화 후 10 ug/ml CHX에 5시간 배양하였다.

10. Statistical analysis

분할율, 발달율 및 핵형의 비율 분석은 데이터를 arcsine transformation 한 후 SPSS 의 one-way ANOVA를 사용하였다. 그룹간의 비교는 Duncan's 및 Tukey 다중 비교 분석을 실시하였다. $P < 0.05$ 일 때 유의적인 차이를 인정하였다.

결과 및 토론

1. 활성화 처리 후 각기 다른 시간대 별 단위 발생란의 발달율

Table 1
Developmental rates of parthenotes at various times produced by different activation treatments

Group ^a (treatment)	Number of oocytes used	Cleavage (%; mean \pm S.E.M.)				Blastocyst (%; mean \pm S.E.M.)
		19 (h)	22 (h)	24 (h)	48 (h)	
Control (JVF)	180	–	–	6 (3.3 \pm 1.6) ^a	135 (75.0 \pm 2.7) ^a	37 (20.6 \pm 3.2) ^a
1 (Ien)	142	3 (2.1 \pm 1.1) ^a	8 (5.6 \pm 2.0) ^a	10 (7.0 \pm 1.9) ^a	43 (30.3 \pm 3.2) ^a	1 (0.7 \pm 1.0) ^b
2 (Ien + DMAP)	138	38 (27.5 \pm 3.5) ^b	59 (42.7 \pm 3.1) ^b	72 (52.1 \pm 3.7) ^b	118 (85.5 \pm 4.8) ^a	17 (12.3 \pm 2.4) ^a
3 (Ien + CHX)	133	4 (3.0 \pm 1.8) ^a	20 (15.0 \pm 2.2) ^a	51 (38.3 \pm 2.9) ^a	77 (57.9 \pm 5.8) ^b	7 (5.3 \pm 2.1) ^b

Percentages with different superscripts (a-d) within columns indicate significant differences ($P < 0.05$). (a) Ien, ionomycin; DMAP, 6-dimethylaminopurine; CHX, cycloheximide; four replicates.

단위발생란의 분할율 조사는 활성화 및 수정 후 19시간에 Group 2에서 다른 Group에 비해 유의적으로 높은 분할율을 나타내었다 (표 1). 반면 대조군으로서 사용한 체외수정란에서는 수정 후 19-22시간에 분할된 수정란은 관찰되지 않았다. 수정 후 24시간에 Group 2에서 분할율이 다른 Group에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 또한 수정 후 24시간에 대조군으로 사용한 체외수정란에서는 3.3%만이 분할되었다. 수정 후 48시간에 Ionomycin+DMAP으로 활성화 처리된 난자에서는 모두 분할이 일어났으며 이는 다른 Group에 비해 유의적으로 높음을 보이지만, 대조군인 체외수정란과 비교에서는 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

수정 후 7일째에 단위수정란의 배반포로의 발달율은 Group 2에서 다른 Group에 비해 유의적으로 높은 결과가 나타났다. Group 3에서의 분할율은 Group 2 보다는 유의적인 감소를 보였지만, Group 1에 비해서는 유의적으로 높았다. 그러나, 배반포 발달율은 대조군인 체외수정란이 다른 활성화 처리군 보다 유의적인 상승을 보였다.

이러한 결론을 토대로 난자에의 DMAP처리는 단위발생란의 발달을 촉진시키는 결과를 얻는다고 추측할 수 있다. 이와 비슷한 결과가 Yang et al. (1994)등의 보고에 의하면, ethanol과 CHX로 활성화시킨 난자는 활성화 처리 후 24시간 쯤 45%의 분할율을 보였다. 그러나 DMAP과 CHX로 활성화 처리된 복제란의 경우, 두 군간 분할율은 유의적인 차이를 보이지 않았다.

2. 활성화 처리 후 각기 다른 시간대 별 복제란의 발달율

Table 2
Developmental rates of SCNT embryos at various times produced by different activation treatments

Group ^d (treatment)	Number of oocytes used	Cleavage (%; mean \pm S.E.M.)				Blastocyst (%; mean \pm S.E.M.)
		19 (h)	22 (h)	24 (h)	48 (h)	
Control (IVF)	161	-	-	6 (3.7 \pm 1.1) ^a	122 (75.8 \pm 4.3) ^a	49 (24.8 \pm 2.1) ^a
1 (Ion)	80	-	-	8 (10.0 \pm 1.4) ^a	12 (15.0 \pm 3.1) ^b	-
2 (Ion + DMAP)	190	57 (30.0 \pm 1.5) ^b	78 (41.0 \pm 2.3) ^b	101 (53.2 \pm 4.6) ^b	130 (68.4 \pm 4.2) ^b	31 (16.3 \pm 2.0) ^b
3 (Ion + CHX)	148	-	12 (7.1 \pm 1.4) ^b	54 (32.1 \pm 2.5) ^b	106 (63.0 \pm 3.5) ^b	22 (13.1 \pm 1.3) ^b

Percentages with different superscripts (a-c) within columns indicate significant differences ($P < 0.05$). (d) Ion, ionomycin; DMAP, 6-dimethylaminopurine; CHX, cycloheximide; six replicates.

수정 및 활성화 처리 후 19시간에 체외수정란과 Group 1,3에서는 분할된 난자가 없었던 반면 Group 2에서는 30.0%의 높은 분할율을 보였다.

수정 및 활성화 처리된 복제란의 초기 단계에서의 분할율은 Group 2에서 다른 실험군에 비해 유의적으로 높은 결과를 보인 반면, 수정 및 활성화 처리 후 48시간에서는

Group 2와 3에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 배반포로의 발달율에 있어 Group 2와 3에서는 비슷했으나 대조군인 체외수정란과 비교했을 때는 유의적으로 낮은 발달율을 보였다.

정상적인 체외수정과정으로 생산된 배는 빨리 성숙 분할하여, 배반포로의 단계로 이르게 된다(Lonergan et al., 1999). 그래서 배의 발달율은 체외 생산된 배의 질을 평가하는 바람직한 표준으로 제안된다(Van Soom et al., 2004). 빨리 성숙, 분할하는 배들이 높은 발달율을 가지고 다양한 환경에 보다 잘 적응하는 것이 첫 분할의 시기와 연관되는 것은 분명하나, 배양 조건 또한 초기 배 발달에서 Kinetics에 영향을 주고(Langendonck et al., 1997) 초기 분할율을 통한 빠른 발달율 유지에 영향을 미친다(Rizos et al., 2003).

3.3. 단위발생란과 SCNT embryos의 Ploidy

표 3에서 Group 1은 86%의 단위발생란에서 반수체 염색체 쌍이 관찰되었다. 그러나 Group 2에서는, 오직 4%의 단위발생란이 반수체였고, 나머지는 이수체(diploid), 다수체(polyploidy), 혼합체(mixoploid)였다. Group 3에서, 비정상적인 염색체의 출현은 줄어들었고, 반수체 단위발생란의 비율도 Group 2보다 유의적으로 높았다.

Table 3
Ploidy in the parthenotes produced by different activation treatments

Groups ^c (treatment)	Embryos used	Chromosomal status (%; mean \pm S.E.M.)			
		Haploid	Diploid	Polyploid	Mixoploid
1 (Ion)	14	12 (85.7 \pm 3.7) ^b	-	2 (14.3 \pm 2.8) ^a	-
2 (Ion+DMAP)	25	1 (4.0 \pm 0.6) ^a	3 (12.0 \pm 1.3)	11 (44.0 \pm 3.2) ^b	10 (40.0 \pm 3.1)
3 (Ion+CHX)	24	17 (70.8 \pm 3.3) ^b	2 (8.3 \pm 1.1)	1 (4.1 \pm 0.7) ^a	4 (16.7 \pm 1.4)

Percentages with different superscripts (a, b) within columns indicate significant differences ($P < 0.05$). (c) Ion, ionomycin; DMAP, 6-dimethylaminopurine; CHX, cycloheximide; three replicates.

표 4에서는 총 62개의 복제란의 핵형이 조사되었다. ionomycin처리군에서는 77%의 이수체 배가 생산되었다. ionomycin 과 CHX의 복합 처리군에서는 ionomycin을 혼자 처리한 군과 비교했을 때 낮은 이수체율을 보였다. 그러나, ionomycin과 DMAP의 복합 처리군에서는 46%의 배에서 이수체와 다수체, 혼합체를 나타냈다.

쥐의 난자에서, DMAP은 제 2극체의 방출을 방해한다. 그 결과로서 이수체 단위발생란이 형성되고, 반수체 단위발생란보다 더 높은 발달 능력을 가지게 된다(Szollósi et al.,

1993).

Table 4
Ploidy in SCNT embryos produced by different activation treatments

Groups ^c (treatment)	Embryos used	Chromosomal status (%; mean ± S.E.M.)			
		Haploid	Diploid	Polyloid	Mixoploid
1 (Ion)	17	1 (5.9 ± 1.1)	13 (76.5 ± 3.8) ^a	1 (5.9 ± 1.2) ^a	2 (11.7 ± 1.6) ^a
2 (Ion + DMAP)	22	–	10 (45.5 ± 2.8) ^b	4 (18.1 ± 1.7) ^b	8 (36.4 ± 2.4) ^b
3 (Ion + CHX)	23	1 (4.3 ± 0.5)	16 (69.6 ± 3.1) ^a	1 (4.3 ± 0.4) ^a	5 (21.7 ± 1.9) ^a

Percentages with different superscripts (a, b) within columns indicate significant differences ($P < 0.05$). (c) Ion, ionomycin; DMAP, 6-dimethylaminopurine; CHX, cycloheximide; three replicates.

소에서 DMAP 처리는 제 2극체 방출의 실패와 metaphase 단계없이 세포주기가 S-phase에 들어감으로서, 세포주기 동안에 karyokinesis가 변화하여 난자의 활성화가 지연된다(De La Fuente and King, 1998). Slimane-Bureau and King (2002) 과 Yoo et al., (2003)의 보고에 따르면 소의 핵이식에서 DMAP를 이용하는 것은 염색체의 비정상적으로 선천적인 기형을 빈번히 나타내기 때문에 배의 죽음에 많이 관련한다고 보고하였다. 이러한 것에 기초하여 배에 DMAP를 처리하는 것은 발달을 뿐만 아니라 염색체의 비정상을 증가시킨다는 결론을 얻을 수 있다.

결론

ionomycin을 이용한 활성화 처리군과 DMAP를 이용한 활성화 처리군은 ionomycin 과 CHX복합 활성화처리군과 비교하였을 때, 복제란과 단위발생란의 발달율을 높이나 배 반포로의 형성에서는 두 Group 간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 그러나 DMAP의 처리는 2-세포기에서 비정상적인 발달에 영향을 주며, 단위발생란과 복제란에서 극심한 염색체 이상의 결과를 나타낸다. 그러므로 성공적인 핵이식을 위해 난자에 ionomycin과 CHX 복합 활성화 처리하는 것이 DMAP을 사용하여 활성화 처리하는 것 보다 좋다..

참고문헌

- Avery, B., Hay-schmidt, A., Hyttel, P., Greve, T.,1998. Embryo development, oocyte morphology, and kinetics of meiotic maturation in bovine oocytes exposed to 6-dimethylaminopurine prior to in vitro

- maturation. *Mol. Prod. Dev.* 50, 334-344.
- Cibelli, J. B., Stice, S. L., Golueke, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F. A., Robl, J. M., 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280, 12561258.
- De La Fuente, R., King, W. A., 1998. Developmental consequences of karyokinesis without cytokinesis during the first mitotic cell cycle of bovine parthenotes. *Biol. Reprod.* 58, 952962.
- De Sousa, P. A., Dobrinsky, J. R., Zhu, J., Archibald, A. L., Ainslie, A., Bosma, W., Bowering, J., Bracken, J., Ferrier, P. M., Fletcher, J., Gasparrini, B., Harkness, L., Johnston, P., Ritchie, M., Ritchie, W. A., Travers, A., Albertini, D., Dinnyes, A., King, T. J., Wilmot, I., 2002. Somatic cell nuclear transfer in the pig: control of pronuclear formation and integration with improved methods for activation and maintenance of pregnancy. *Biol. Reprod.* 66, 642-650.
- Du, F., Sung, L. Y., Tian, X. C., Yang, X., 2002. Differential cytoplasm requirement for embryonic and somatic cell nuclear transfer in cattle. *Mol. Reprod. Dev.* 63, 183-191.
- Fissore, R. A., Robl, J. M., 1992. Intracellular Ca²⁺ response of rabbit oocytes to electrical stimulation. *Mol. Reprod. Dev.* 32, 9-16.
- Gibbons, J., Arat, S., Rzucidlo, J., Miyoshi, K., Waltenburg, R., Respass, D., Venable, A., Stice, S., 2002. Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. *Biol. Reprod.* 66, 895900.
- Gutierrez-Adan, A., Lonergan, P., Rizos, D., Ward, F. A., Boland, M. P., Pintado, B., De la Fuente, J., 2001. Effect of the in vitro culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* 55, 1117-1126.
- Gutierrez-Adan, A., Rizos, D., Fair, T., Moreira, P. N., Pintado, B., De la Fuente, J., Boland, M. P., Lonergan, P., 2004. Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured in vivo and in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 68, 441-448.
- Hwang, W. S., Ryu, Y. J., Park, J. H., Park, E. S., Lee, E. G., Koo, J. M., Jeon, H. Y., Lee, B. C., Kang, S. K., Kim, S. J., Ahn, C., Hwang, J. H., Park, K. Y., Cibelli, J. B., Moon, S. Y., 2004. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science* 303, 1669-1674.
- Keefer, C. L., 2004. Production of bioproducts through the use of transgenic animal models. *Anim. Reprod. Sci.* 83, 5-12.

- King, W. A., Basrur, P. K., 1979. Ultrastructural changes in hereditary muscular hypertrophy in cattle. *Acta. Vet. Scand.* 20, 245-257.
- Langendonckt, A. V., Donnay, I., Schuurbiens, N., Auquier, P., Carolan, C., Massip, A., Dessy, F., 1997. Effect of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. *J. Reprod. Fertil.* 109, 87-93.
- Lanza, R. P., Cibelli, J. B., Blackwell, C., Cristofalo, V. J., Francis, M. K., Baerlocher, G. M., Mak, J., Schertzer, M., Chavez, E. A., Sawyer, N., Lansdorp, P. M., West, M. D., 2000. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science* 288, 665669.
- Leal, C. L., Liu, L., 1998. Differential effects of kinase inhibitor and electrical stimulus on activation and histone H1 kinase activity in pig oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 30, 51-61.
- Liu, L., Ju, J. C., Yang, X., 1998. Differential inactivation of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase following parthenogenetic activation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 59, 537-545.
- Lonergan, P., Khatir, H., Piumi, F., Rieger, D., Humblot, P., Boland, M. P., 1999. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.* 117, 159-167.
- Lonergan, P., Gutierrez-Adan, A., Pintado, B., Fair, T., Ward, F., Fuente, J. D., Boland, M., 2000. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 57, 146-152.
- McCreath, K. J., Howcroft, J., Campbell, K. H. S., Colman, A., Schnieke, A. E., Kind, A. J., 2000. Homologous recombination in ovine somatic cells enables the production of gene targeted sheep by nuclear transfer. *Nature*, 405, 10661069.
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., Leibfriedge-Ruthedge, M. L., Critser, E. S., Yestone, W. H., First, N. L., 1986. Bovine in-vitro fertilization with frozen thawed semen. *Theriogenology* 25, 591-600.
- Rho, G. J., Wu, B., Kawarsky, S., Leibo, S. P., Betteridge, K. J., 1998. Activation regimens to prepare bovine oocytes for intracytoplasmic sperm injection. *Mol. Reprod. Dev.* 50, 485-492.
- Rizos, D., Lonergan, P., Boland, M. P., Arroyo-Garcia, R., Pintado, B., de la Fuente, J., Gutierrez-Adan, A.,

2002. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biol. Reprod.* 66, 589-595.
- Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Perez-Garnelo, S., De La Fuente, J., Boland, M. P., Lonergan, P., 2003. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.* 68, 236-243.
- Rosenkrans, C. F. Jr., Zeng, G. Q., Mc Namara, G. T., Schoff, P. K., First, N. L., 1993. Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biol. Reprod.* 49, 459-462.
- Slimane-Bureau, W. C., King, W. A., 2002. Chromosomal abnormalities: a potential quality issue for cloned cattle embryos. *Cloning Stem Cells* 4, 319-329.
- Susko-Parrish, J. L., Leibfried Rutledge, M. L., Northey, D. L., Schutzkus, V., First, N. L., 1994. Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. *Dev. Biol.* 166, 729739.
- Szollosi, M. S., Kubiak, J. Z., Debey, P., de Pennart, H., Szollosi, D., Maro, B., 1993. Inhibition of protein kinases by 6-dimethylaminopurine accelerates the transition to interphase in activated mouse oocytes. *J. Cell Sci.* 104, 861-872.
- Van Soom, A., Ysebaert, M.T., de Kruif, A., 1997. Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro-produced bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 47, 47-56.
- Ware, C. B., Barnes, F. L., Maiki-Laurila, M., First, N. L., 1989. Age dependence of bovine oocyte activation. *Gamete Res.* 22, 265-275.
- Wells, D. N., Misica, P. M., Tervit, H. R., 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol. Reprod.* 60, 9961005.
- Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., Campbell, K. H. S., 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810813.
- Yang, X., Presicce, G. I., Moraghan, L., Jiang, S., Foote, R. H., 1994. Synergistic effect of ethanol and cycloheximide on activation of freshly matured bovine oocytes. *Theriogenology* 41, 395-403.
- Yoo, J. G., Choe, S. Y., Rho, G. J., 2003. Efficient production of cloned bovine embryos using cdc2 kinase inhibitor. *Reprod. Dom. Anim.* 38, 444-450.

Zakhartchenko, V., Durcova-Hills, G., Stojkovic, M., Scherthaner, W., Prella, K., Steinborn, R., Muller, M., Brem, G., Wolf, E., 1999. Effects of serum starvation and recloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts. J. Reprod.Fertil.115,325331.

4-11. 형질전환된 소 체세포를 사용하여 복제하였을 때, 세포막조성과 생존성에 미치는 영향

CELLULAR COMPOSITION AND VIABILITY OF CLONED BOVINE EMBRYOS USING EXOGENE TRANSFECTED SOMATIC CELLS

Abstract

The present study compared the efficiency of transgenic cloned embryo (TG) production by somatic cell nuclear transfer (SCNT) with fetal derived fibroblasts (FFCs) which were transfected with pEGFP-N1 to in vitro fertilized (IVF), parthenotes (PAT) and SCNT counterparts by evaluating the rates of cleavage and blastocyst formation, apoptosis rate at different developmental stages, cell number, ploidy and gene expression in blastocysts.

In SCNT and TG embryos, the rates of cleavage and blastocyst formation were significantly lower ($P < 0.05$) than those of IVF controls, but it did not differ between SCNT and TG embryos. In IVF control, 86.7% embryos displayed diploid chromosomal complements and the rates were significantly ($P < 0.05$) higher than those of SCNT and TG embryos. Most TG embryos (79%) with FFCs expressed the gene by both PCR and under fluorescence microscopy. The expression of apoptosis by TUNEL was first detected at 6-8 cell stages in all embryos of IVF, SCNT and TG groups, but the expression rate at each developmental stages was significantly higher ($P < 0.05$) in SCNT and TG embryos than in IVF counterparts. The expression rate in inner cell mass (ICM) of TG embryos was significantly higher ($P < 0.05$) than in SCNT and IVF embryos. These results indicate that the high occurrence of apoptosis observed in SCNT and TG embryos compared to IVF counterparts might influence the developmental competence. Moreover, the SCNT embryos derived using non transfected donor cells exhibited a lower apoptosis expression in ICM cells than in TG embryos derived using pEGFP-N1 transfected donor cells suggesting a possible role of negative gene effect in TG embryos.

서론

SCNT에 의해서 많은 산자 보고가 있었지만, 낮은 발달율 및 높은 폐사율 등에 대한 문제 해결을 위해서는 유전자 검증 등에 대한 많은 연구가 요구된다. 형질전환 동물은 pharmaceutical products (Wilmut et al., 1990; Wall et al., 1997), organ donors (Stice et al., 1998; Bondioli et al., 2001), 그리고 질병 치료 모델 등의 연구에 접목할 수 있다. 그러나 생산 효율이 극히 저조하기 때문에 적당한 공핵세포의 선별이 요구된다.

최근 연구에 의하면 정상적으로 발달되는 수정란에 있어서는 cell death가 나타나지 않지만 (Raff et al., 1993), 발달 과정 중에 수정란 및 태아의 사멸은 apoptosis에 주로 의존된다고 한다 (Fahrudin et al., 2002). 수정란 발달에는 apoptosis (Brison and Schultz 1997, Levy et al., 2001) 뿐만 아니라 ICM cell의 비율도 중요한 요인이 된다.

따라서 본 연구에서는 형질전환 복제 수정란 생산 효율을 향상 시키기 위해서 in vitro fertilized (IVF), parthenogenetic (PAT), SCNT 및 transgenic (TG) 수정란을 발달율, 전체세포수, 핵형, apoptosis의 발현 빈도를 비교 분석하고자 실시하였다.

재료 및 방법

배양액

Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)에서 구입된 시약 및 배양액을 본 실험에 공시하였다. 난자성숙 배양액 (IVM)은 2.5 mM sodium pyruvate, 1 mM L-glutamine, 1.0% (v/v) penicillin-streptomycin (10,000 IU and 10,000 g/mL, respectively; Pen-Strep; GIBCO), 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL), 10 g/mL FSH, 10 g/mL LH, and 1 g/mL estradiol 17 함유된 TCM199를 이용하였다. Albumin, lactate, pyruvate 가 함유된 Tyrode's medium으로 Hepes-TALP 및 IVF-TALP)를 만들었고, 수정란 배양액으로는 modified Eagle medium (MEM) non-essential amino acids, 0.4 mM sodium pyruvate, 1 mM L-glutamine 및 50 g/mL gentamycin이 함유된 synthetic oviduct fluid medium (SOF) 배양액을 이용하였다. 모든 배양액은 pH 7.4 그리고 삼투압 280 mOsm/kg로 보정하여 사용하였다.

세포배양

세 종류의 세포, fetal-derived fibroblast cells (FFC), cumulus-derived fibroblast cells (CFC) 및 adult ear skin-derived fibroblast cells (AEFC)를 사용하였다. 임신 35일령의 태아로부터 FFC, 두 살 된 암소의 귀로부터 AEFC, 그리고 2-7 mm follicles로부터 CFC를 각각 분리하였다. 태아 조직 및 귀조직은 0.25% trypsin-0.04% EDTA 용액에 39C 10분간 처리한 후 7% (v/v) FBS가 함유된 modified Eagle medium (MEM)에서 disperse시켰다. 난자-난구세포 복합체를 0.5 mg/mL hyaluronidase로 처리하여 난구세포를 분리하였다. 분리된 세포를 300 Xg 10분간 원심한 후 10% (v/v) FCS, 1.0% (v/v) Pen-Strep가 함유된 MEM배양액에서 39C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

80-90% confluence 상태에서 0.25% Trypsin-0.04% EDTA 로 5분간 처리한 후 다음 passage로 옮기고, 일부 세포는 10% dimethyl sulfoxide (DMSO)로 동결 보존 하였다 (Lee et al., 2005).

체외수정란 생산

도축장 유래 난포란을 수집하였고, 15개의 COCs를 IVM 배양액 50 uL drops에 넣고 39C, 5% CO₂ 배양기에서 배양시켰다. SCNT 방법은 Wells et al., (1999)의 방법에 따라 실시하였다. 배양 18시간째에, 난구세포를 3% (v/v) sodium citrate 용액에서 2분간 vortexing 하여 제거시켰고, 탈핵을 위해서 5 ug/mL Hoechst 33342에 2-3분간 염색하였다. Trypsin 처리된 공핵세포를 탈핵된 난자의 위란강에 주입하고, 전기 융합은 10 uM MgCl₂, CaCl₂가 첨가된 0.28 M mannitol 용액에서 1.6 kV/cm, 30 usec 의 조건을 두 번 실시하였다. 융합된 SCNT 수정란을 5 uM ionomycin에서 5분, 10 g/mL CHX에서 3시간 배양하였다.

대조구로써 체외수정란 생산은 Ali and Sirard, (2002) 방법을 이용하였고, 정자의 준비는 Rosenkrans et al. (1993)의 방법대로 하였다. 30개의 수정란을 SOF 30 uL drops에서 8일간 39C, 5% CO₂, 5% O₂ 및 90% N₂ 조건 하에서 배양하였고, 2일 째 및 8일 째에 수정란 분할율 및 배반포기 발달율을 조사하였으며, 전체 핵의 수도 비교 조사하였다.

염색체 분석

염색체 분석은 King et al.(1979) 방법에 준하였다. 0.05 g/mL democolcine (Gibco, colcemide)이 첨가된 MEM에 itlrks 배양한 후, 0.075 mM KCl에 5분, 0.8% sodium citrate에 30분간 처리 한 다음, spread 하고 methanol : acetic acid (3:1, v/v)에 고정하였다. 4% Giemsa 액으로 5분간 염색한 후 light microscope (Nikon)에서 검경하였다. 수정란은 haploid (n), diploid (2n), polyploid (3n) 및 mixoploid로 평가하였다.

Apoptosis 조사

Apoptosis 조사는 In Situ Cell Death Detection Kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) 와 propidium iodide (PI, Molecular Probes, Eugene, OR)의 대조 염색에 의한 TUNEL 방법으로 실시하였다. 12-14 시간 (zygote), 20-22 시간 (2-cell), 36-38 시간 (4-cell), 42-44 시간 (8-cell), 52-56 시간 (16-cell), 120-130 시간 (morula) 및 192-198 시간 (blastocyst)의 수정란을 분석에 이용하였다.

Apoptotic index는 다음과 같이 계산하였다. Apoptotic index = (number of TUNEL-positive nuclei / total number of nuclei blastocyst) X 100.

통계처리

Gene expression, apoptosis, cleavage 및 development는 arc-sine transformation 후 one-way ANOVA 로 실시하였고, 비교분석은 Duncan's and Tukey multiple comparisons test를 이용하였다. Chromosome analysis은 Student's t-test를 이용하였으며, P<0.05 일때 유의적 차이를 인정하였다.

결과 및 고찰

Development and Total Cell Number of Various Embryos

FFC, CFC 및 AEFC로 복제된 수정란 및 형질전환 수정란의 발달율 및 전체세포수를 체외수정란 및 단위발생란과 비교 분석한 결과는 표 1에서 보는 바와 같다. 전 군의 분할율은 73% 이상으로 높았으며, 군간 유의적 차이는 인정되지 않았으나, 8일째 배반포기 수정란의 발달율은 IVF에서 31.81%로 SCNT 및 TG 군의 19.8-23.3% 보다 유의적으로

($P < 0.05$) 높았다. 그러나 SCNT 및 TG 군간의 분할율과 배반포기 발달율은 유의적 차이가 없었다.

전체세포수에 있어서도 IVF 군이 다른 SCNT 및 TG 군 보다 유의적으로 높은 수를 보였으나, SCNT 및 TG 군간에는 유의적 차이가 없었다. 그러나 단위발생란에 있어서 분할율 및 배반포기 발달율은 50% 및 7.6%로 다른 군 보다 유의적으로 낮았고, 전체세포수에 있었어도 85개로 다른 군 보다 유의적인 감소를 보였다.

Table 1. Development rate of embryos produced *in vitro* by different methods^a

Embryo sources ^a	Eggs used ^a	% of development (mean±SEM) ^a		total cells (mean±SEM) ^a	
		cleavage ^a	blastocyst ^a		
IVF ^a	311 ^a	74.9±8.3 ^a	31.8±3.1 ^a	135.8±11.1 ^a	
PAT ^a	327 ^a	50.2±5.5 ^b	7.6±2.0 ^b	85.3±7.2 ^b	
SCNT ^a	FFC ^a	201 ^a	78.3±8.3 ^a	23.3±5.2 ^b	110.5±11.8 ^b
	CFC ^a	158 ^a	76.5±7.1 ^a	21.8±6.0 ^b	105.2±13.5 ^b
	AEFC ^a	173 ^a	74.7±6.0 ^a	22.1±4.8 ^b	108.5±10.5 ^b
TG ^a	FFC ^a	172 ^a	76.2±6.2 ^a	21.5±5.0 ^b	109.8±14.5 ^b
	CFC ^a	151 ^a	73.0±5.4 ^a	19.8±3.1 ^b	111.3±10.2 ^b
	AEFC ^a	155 ^a	74.4±7.1 ^a	20.0±3.6 ^b	102.5±10.5 ^b

IVF: *in vitro* fertilization, PAT: parthenogenetic embryos, SCNT: cloned embryos, TG: transgenic cloned embryos, FFC: fetal-derived fibroblast cells, CFC: cumulus-derived fibroblast cells, and AEFC: adult ear skin-derived fibroblast. ^a

^{a, b, c} Percentages with different superscripts within columns indicate significant differences ($P < 0.05$ and $P < 0.01$).^a

염색체 분석

IVF, SCNT 및 TG 배반포기 수정란의 염색체 분석 결과는 표 2에서 보는 바와 같다. 150개 수정란으로부터 1833개의 spreads를 비교 분석하였고, IVF에서는 대부분(26/30, 86.7%)이 2n이었으며, 이는 다른 군의 수정란 보다 유의적으로 높은 배수체율을 보였다. 염색체 비정상을 보인 SCNT 및 TG 수정란에서는 13-22%가 mixoploidy 보였으며, 주로 2n/4n combination이 많았다. 그러나 polyploid율은 군간 차이가 없었다.

Table 2. Chromosomal composition of day 8 blastocysts produced *in vitro* by different methods[↵]

Embryo source [↵]	Spreads (Blastocysts) [↵]	No. (%) ploidy [↵]				
		Haploid [↵]	Diploid [↵]	Polyploid [↵]	Mixoploid [↵]	
IVF [↵]	412 (30) [↵]	0 [↵]	26 (86.7) ^{a↵}	3 (10.0) [↵]	1 (3.3) ^{a↵}	
SCNT [↵]	FFC [↵]	258 (23) [↵]	1 (4.4) [↵]	17 (73.9) ^{b↵}	2 (8.7) [↵]	3 (13.0) ^{b↵}
	CFC [↵]	264 (20) [↵]	1 (5.0) [↵]	15 (75.0) ^{b↵}	1 (5.0) [↵]	3 (15.0) ^{b↵}
	AEFC [↵]	247 (22) [↵]	0 [↵]	17 (77.3) ^{b↵}	1 (4.6) [↵]	4 (18.2) ^{b↵}
TG [↵]	FFC [↵]	233 (18) [↵]	0 [↵]	13 (72.2) ^{b↵}	1 (5.6) [↵]	4 (22.2) ^{b↵}
	CFC [↵]	201 (18) [↵]	1 (5.6) [↵]	13 (72.2) ^{b↵}	1 (5.6) [↵]	3 (16.7) ^{b↵}
	AEFC [↵]	218 (19) [↵]	0 [↵]	14 (73.7) ^{b↵}	2 (10.5) [↵]	3 (15.8) ^{b↵}

IVF: *in vitro* fertilization, SCNT: cloned embryos, TG: transgenic cloned embryos, FFC: fetal-derived fibroblast cells, CFC: cumulus-derived fibroblast cells, and AEFC: adult ear skin-derived fibroblast. [↵]

^{a, b} Percentages with different superscripts within columns indicate significant differences ($P < 0.05$).[↵]

유전자 발현

pEGFP-N1 gene로 transfection된 세포와 형질전환 복제 수정란을 생산 한 후 유전자 발현율을 조사한 결과는 표 3과 그림 1에서 보는 바와 같다. 72%이상의 수정란에서 2-세포기에서 유전자 발현 POSITIVE를 보였고, 배반포기로 발달한 수정란에서도 70% 이상이 positive로 나타내었다. 그러나 배반포기로 발달한 positive 수정란에서 mosaicism은 관찰되지 않았다. 유전자 발현을 confirm 하기 위해서 pEGFP-N1의 확인을 PCR 분석한 바 모두 positive로 나타내었다.

Table 3. Efficiency of transgenic cloned embryos on the expression as determined by a fluorescent microscopy[†]

Embryo source [‡]	Eggs used [‡]	No. (%) of embryos expressed [‡]	
		cleavage [‡]	blastocyst [‡]
TG [‡]	FFC [‡]	112 [‡]	70/89 (78.7) ^{a,‡} 19/23 (82.6) ^{a,‡}
	CFC [‡]	116 [‡]	66/87 (75.9) ^{a,b,‡} 17/22 (77.3) ^{a,b,‡}
	AEFC [‡]	111 [‡]	59/82 (72.0) ^{b,‡} 13/18 (72.2) ^{b,‡}

TG; transgenic embryos, FFC; Fetal-derived fibroblast cells, CFC; cumulus-derived fibroblast cells, and AEFC; adult ear skin-derived fibroblast.[‡]

^{a, b} Percentages with different superscripts within columns indicate significant differences ($P < 0.05$).[‡]

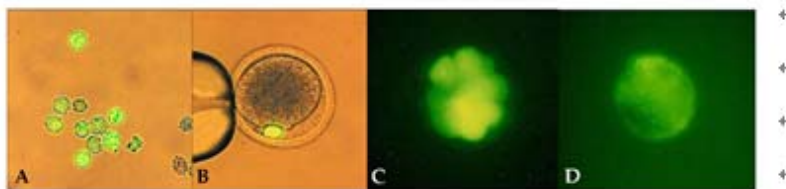


Figure 1. Transgenic embryos derived from transfected FFC with pEGFP-N1 under the green fluorescence under inverted epifluorescence microscope (Nicon, Japan) equipped with a UV source and a filter for FITC, $\times 400$. A; pEGFP-N1 transfected FFC for nuclear transfer, **맞춤법 추천 단어를 표시하려면 마우스 오** enucleated oocyte, C; morula and D; blastocyst stage of transgenic cloned embryo. [‡]

Apoptosis 발현

TUNEL 방법에 의해서 apoptosis를 관찰한 결과는 그림 2-4에서 나타내는 바와 같다. 6-8세포기의 IVF, SCNT PAT 및 TG 수정란의 apoptotic 발현을 관찰한 바 유의적 차이는 없었다 (그림 2). 수정란의 발달 단계가 후기로 가면서 apoptotic 발현은 유의적으로 증가됨을 보였다.

Apoptotic index는 TG에서 다른 군 보다 유의적으로 높은 결과를 보였다. 이와 유사하게 전체 apoptotic cells 의 수도 TG에서 다른 군 보다 높은 결과를 보였다.

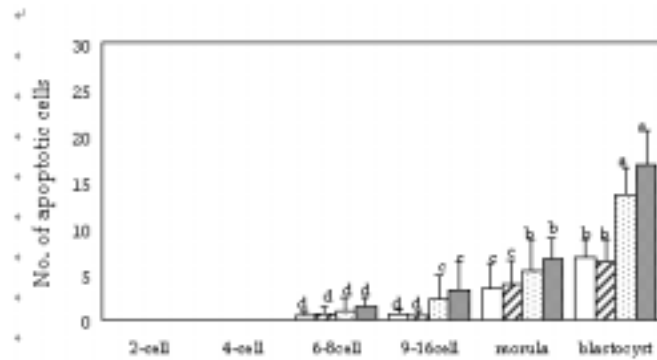


Figure 2. Apoptosis at different developmental stage of embryos produced by IVF, PAT, SCNT and TG. Open bars indicate IVF embryos, hatched bars parthenote embryos, spotted bars SCNT embryos and solid bars TG embryos. *^a Percentages with different superscripts within columns indicate significant differences ($P < 0.05$ and $P < 0.01$).

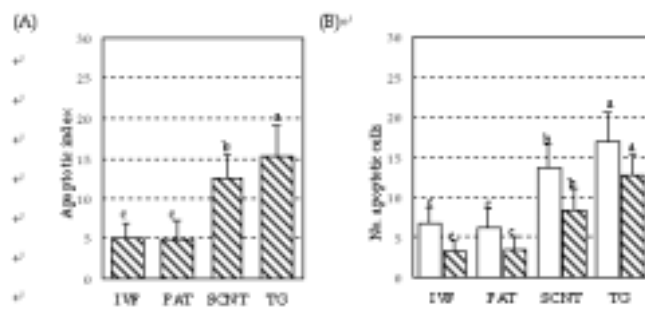


Figure 3. A: Apoptosis at blastocyst stage of embryos produced by IVF, PAT, SCNT and TG. Apoptotic index: no. apoptotic cell/no. total cell in blastocyst. B: Allocation of apoptotic cells in ICM of day 8 blastocysts. Open bars indicate number of total apoptotic cells in blastocysts, hatched bars apoptotic cells in ICM of blastocysts. * Percentages with different superscripts within columns indicate significant differences ($P < 0.05$ and $P < 0.01$).

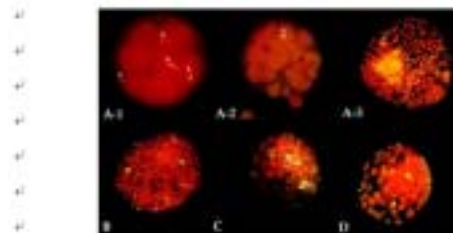


Figure 4. Fluorescent microscopy images illustrating the frequency of apoptotic nuclei in TG (A), IVF (B), PAT (C) and SCNT (D) embryos subjected to TUNEL analysis. Embryos were labeled with fluorescein isothiocyanate-conjugated dUTP (yellow) and propidium iodide (red). Each panel is a display of a single embryo, $\times 400$. A-1, 8-cell stage, A-2, morula and A-3, blastocyst of TG embryos, B, IVF, C, PAT, D, SCNT blastocyst on day 8 after IVF. Arrowhead point to apoptotic nuclei.

이상의 결과로 형질전환 수정란을 생산할 경우 높은 apoptosis 발현을 보이며, 따라서 배 발달율이 저하되고 전체세포수가 감소하게 된다. 이는 수정란 이식 후에서 태아의 유산율 상승과 밀접한 영향을 갖는 것으로 사료된다.

참고문헌

- Ali A, Sirard MA, 2002: Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. *Biol Reprod* 66,901-905.
- Brison DR, Schultz RM, 1997: Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival
- Bondioli K, Ramsoondar J, Williams B, Costa C, Fodor W, 2001: Cloned pigs generated from cultured skin fibroblasts derived from a H-Transferase transgenic boar. *Mol Reprod Dev* 60, 189-195.
- Fahrudin M, Otoi T, Karja NWK, Mori M, Murakami M, Suzuki T, 2002: Analysis of DNA fragmentation in bovine somatic nuclear transfer embryos using TUNEL. *Reproduction* 124, 813-819.
- King WA, Linares T, Gustavsson I, Bane AA, 1979: Method for preparation of chromosomes from bovine zygotes and blastocysts. *Vet Sci Commun* 3, 51-56.
- Levy RR, Cordonier H, Czyba JC, Goerin JF, 2001: Apoptosis in preimplantation mammalian embryo and genetics. *IT J Anat Embryol* 106, 101108.
- Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD, 1993: Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 262, 695-700.
- Stice SL, Robl JM, Ponce de Leon FA, Jerry J, Golaeke PG, Cibelli JB, Kane JJ, 1998: Cloning: New breakthroughs leading to commercial opportunities. *Theriogenology* 49, 129-138.
- Wall RJ, Kerr DE, Bondioli KR, 1997: Transgenic dairy cattle: Genetic engineering on a large scale. *J Dairy Sci* 80, 2213-2224.
- Wilmut I, Archibald AL, harris S, McClenaghan M, Simons JP, Whitelaw CBA, Clark AJ, 1990: Modification of milk composition. *J Reprod Fertil Suppl* 41, 199-208.

제 5절. 수정란 이식 효율 향상

5-1. Polyethylene Glycol이 용해된 FSH를 피하주사하였을 때의 과배란 반응성과 이 때 회수한 난자의 특성

Superovulation Response and Quality of Embryos Recovered from Cattle after a Single Subcutaneous Injection of FSH dissolved in Polyethylene Glycol

Abstract

This study was carried out to assess the effect of superovulation response and quality of embryos recovered from cattle after a single subcutaneous injection of FSH dissolved in polyethylene glycol (PEG) in cattle. Cattle were allocated into control and 3 experimental treatment groups. In control, cattle were injected intramuscularly 50 mg FSH twice daily for 4 days. Group 1 were injected subcutaneously with a single dose of 400 mg FSH dissolved in 30% PEG solution. Group 2 were injected subcutaneously with a single dose of 200 mg FSH dissolved in 30% PEG solution. Finally in group 3, cattle were injected twice 200 mg FSH dissolved in 30% PEG solution by subcutaneous. Superovulation was initiated by injection of FSH between Day 8 and 14 of the estrus cycle (Day 0, the day of estrus), and followed by injection of 25 mg PGF_{2α} at 48 h after first FSH injection. Cows were then artificially inseminated (AI) with semen twice at 48 and 60 h after PGF_{2α} injection. At 7 days after the second AI, embryos collected non-surgically by flushing the uterine horns and were counted and compared morphologically as being transferable and degenerated among different superovulation treatments. Furthermore, plasma concentrations of progesterone and estradiol-17β were measured by radioimmunoassay following different treatments at given days. All of cattle were observed in estrus in all treated groups, but 77.8% of cattle in control. Superovulation response was observed as 77.8, 87.5, 88.9, and 100% in control and Groups 1, 2 and 3. The mean numbers of corpus lutea (CL) detected in

Group 1 were 19.6, which was significantly ($P < 0.05$) higher than those in control, Group 2 and Group 3 (11.1, 13.4 and 9.6, respectively). However, there did not differ on the mean numbers of total embryos recovered and of transferable embryos between control and treated groups. Higher rates of embryos classified as excellent were revealed in Group 3 than in others. In Group 2, only 4% of recovered ova remained in being unfertilized, whereas 29.7, 15.8 and 18.7% in control, Group 1 and Group 3, respectively. No difference in the pregnancy rate by transfer of recovered embryos was observed in control and treated groups (37.0 vs. 30-38%). Similar were the observations with the secretory patterns of blood progesterone and estradiol-17 β in control and treated groups. In conclusion, a single subcutaneous injection with FSH dissolved in polyethylene glycol to induce superovulation in cattle did not differ from multiple intramuscular injection protocol on the rates of recovery, transferable and pregnancy rate. However, a single injection is more practical for superovulation treatments than frequent injection because of reduction of stress in cattle and decreases of cost and labor.

서 론

소의 번식과 개량을 위하여 인공수정이 널리 이용되고 있으나 이는 종모우의 유전형질만이 획득되어진 것으로 종빈우의 형질은 고려되지 않았다. 이를 보완하기 위해 1970대 초기부터 수정란이식 기법이 유전적인 능력개량의 수단으로 널리 활용되어져 왔다. 즉 능력이 우수한 공란우를 과배란 처리 후 수정란을 회수하여 능력이 낮은 우군에 이식한 후 일시에 다수의 고능력우를 생산하여 우군의 능력을 조기에 개량하는 MOET (Multiple Ovulation Embryo Transfer) 방법이 이용되고 있다.

현재 미국 홀스타인 협회에 등록된 종모우 상위 100두 중 70%정도가 과배란 처리를 통한 수정란 이식으로 태어난 종모우이다. 국내에서는 최근 2두가 수정란 이식에 의해 한우 종모우로 등록되었는데 종모우의 효율적 선발 및 국내 우수유전자 확보와 개량기간 단축을 위해 MOET Program을 국내 실정에 맞게 구체적으로 적용시키는 사업이 활성화되어야 할 것으로 사료된다.

수정란 이식기술을 산업화하기 위해서는 근본적으로 과배란 처리방법이 확립되어야 한다. 과배란 처리 방법은 소 수정란이식에 있어서 가장 핵심적인 기술이지만 아직까지는 이식 가능 한 수정란을 안정적이고 효과적으로 생산하는 데 많은 문제점이 남아 있다. 현재 사용되는 소의 과배란 처리 호르몬으로 PMSG와 뇌하수체에서 추출한 FSH를 주로 사용하고 있다. PMSG는 sialic acid가 함유된 복합당단백질로 투여 후 2차 난포를 자극시킴으로써 난포란의 발육을 촉진시키게 한다. 회수된 수정란의 양적인 면에서는 좋은 결과를 보이지만, 수정란의 질은 저하되고, 또한 난포의 배란지연이나 난포낭종 발생으로 다음 발정주기에 영향을 미치게 된다 (Monnians 등, 1983). 이와 반대로 과배란 처리시 FSH를 사용하는 경우 회수되는 수정란의 질은 PMSG 보다 우수하나 4~5시간의 짧은 반감기로 인해 하루에 2회 씩, 4~5일간 연속해서 투여해야 하는 단점이 있다 (Demoustier 등, 1998; Walsh 등, 1993). 또한 동일 공란우에서도 발정주기 중 호르몬처리 개시일과 투여량 (Nasser 등, 1993; Akbar 등, 1974; Bo 등, 1991, 1994), 주위 환경의 온도 stress (Lucy 등, 1992; Wolfenson 등, 1997), 공란우의 호르몬 감수성 저하 (Shea 등, 1984), FSH 제제에 함유되어 있는 LH의 성분비율(Gonzalez 등, 1990; Lindsell 등, 1986; Muphy 등, 1984; Tribulo 등, 1993; Willmott 등, 1990) 등도 문제점으로 인지되고 있다.

FSH를 여러 번 투여할 경우 수정란 생산에 영향을 주는 요인으로는 빈번한 주사로 인한 소의 직접적인 스트레스 및 12시간 간격으로 투여해야 하는 번거로움, 이에 따른 노동력과 수정란 생산경비의 증가가 수정란 이식의 산업화에 제한요인으로 작용되고 있다. 이러한 투여법의 문제점을 해결하기 위해 FSH의 생리적 반감기를 인위적으로 연장시킬 수 있도록 고분자 유기물질인 PVP (polyvinylpyrrolidone), CMC (carboxymethyl cellulose), propylene glycol, PEG (polyethylene glycol)등을 사용하여 호르몬의 투여 횟수를 줄이는 방법이 연구되어 왔다 (Takedomi 등, 1994; Suzuki, 1993; Lopez-Sebastian 등, 1993; 임 등 1998). 국내에서는 실험동물인 토끼에서 최 등 (1996)이 Folltropin-V를 25% PVP에 녹여 과배란 유기를 하여 1회 투여가 다회 투여와 유사한 효과를 나타내어 간편하고 실용적인 방법이라고 보고하였다. 또한 산업동물인 한우에서도 임 등 (1998)에 의해서 공란우의 스트레스를 방지하고 정상수정란을 안정적으로 생산할 수 있는 1회 투여시 FSH의 용해제의 종류와 농도를 선정하기 위하여 1%와 5% CMC, 30%와 50% PVP, 30%와 50% PEG에 용해시킨 FSH의 1회 주사와 기존의 다회 주사에 의한 난소반응을 비교 검토

한 결과 다회투여와 1회 투여 중 30% PEG에서 발정 유기율, 체란수와 정상수정란 수 및 FSH의 주사 후 7일째 혈중 Progesterone 농도 등이 다른 용매제에 비해서 높게 나타났다고 보고되었다. 그러나 한우에서 1회 주사에 의한 과배란 유기성적은 임 등 (1998) 외에는 보고자료가 거의 없는 실정이고, 임 등의 보고에서도 과배란 유기효과의 변이성이 크고 한우와 외국 품종간의 체중 차이에 의한 FSH의 난소반응이 고려되지 않았다.

따라서 본 실험에서는 FSH의 체내에서 흡수 지연을 유발하는 고분자 유기물질 중 30% PEG을 이용하여 한우에서 FSH의 투여량과 1회 또는 2회 투여시 Progesterone 및 Estradiol-17 β 의 농도 변화를 측정하고, 공란우의 발정유기, 난소반응, 이식 가능한 수정란 수 그리고 이식 후 수태율 조사를 위한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물

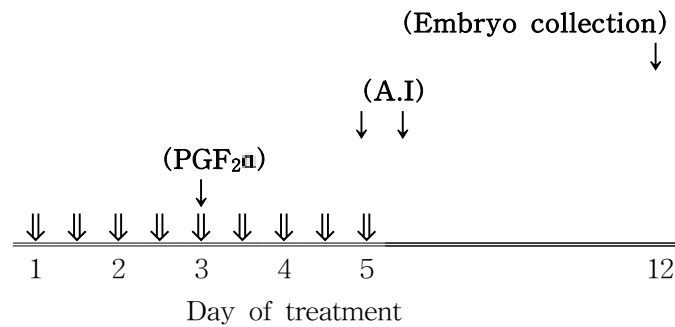
본 실험에 공시된 공란우는 경북축산기술연구소에서 사육중인 종빈우 33두로서 외모 및 생식기의 건강상태가 양호하고 정상 발정주기가 2회 이상 확인된 개체로서 평균체중은 432 kg이었으며 신체충실도(1~5기준)는 평균 2.83 인 것을 공시하였다. 또한 아까바네병, 전염성비기관염, 소 바이러성 하리 등에 대한 예방접종을 정기적으로 실시하였으며, 결핵, 부루셀라병, 요네병, 백혈병 등 각종 전염병의 발생이 없는 개체를 선발하였으며, 수정란이식을 위한 수란우의 선별도 건강상태가 양호하고 수태성, 체형 등에서 이상이 없는 정상적인 개체로 확인된 경산시 축산농가에서 사육중인 초산 및 2산차 홀스타인 55두를 공시하였다.

2. 과배란 처리 및 인공수정

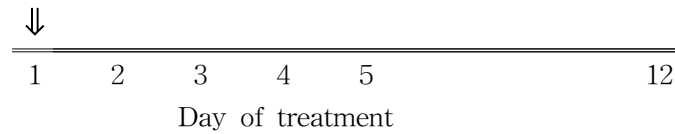
공란우가 발정을 보이는 날을 0일로 하여 8~14일째 FSH (Falltropin-V, Vetrepharm, Canada)로 과배란 처리를 개시하였다. 표 1에서 보는 바와 같이 대조구의 과배란 처리는 12시간 간격으로 1일 2회, 4일간 50 mg의 FSH를 근육주사 하였고 (Gonzalez 등 1990), 처리구 1은 30% PEG에 용해시킨 400 mg의 FSH를, 처리구 2는 30% PEG에 용해시킨 200 mg의 FSH를 각각 1회 견갑부에 피하주사 하였으며, 처리구 3은 30% PEG에 용해시킨 200 mg의 FSH를 2회 견갑부에 피하주사 하였다 (FSH의 2차 투여

는 1차 주사후 48시간에 실시하였다). 황체를 퇴행시켜 발정을 유도하기 위해 PGF_{2α} (Lutalyse, Upjohn)를 25 mg을 FSH 처리 개시 후 48시간에 근육주사 하였으며, 48시간 후 육안적 발정 관찰 없이 인공수정을 2회 실시하였다 (Bo 등, 1994). 인공수정 (Artificial Insemination, A.I)은 PGF_{2α} 투여 후 48시간째 1차 수정을 실시하고 2차 수정은 12시간 후 실시하였다 (Callesen 등, 1986). 인공수정에 사용된 정액은 축협에서 생산된 한우 동결 정액 (KPN 243)을 사용하였다.

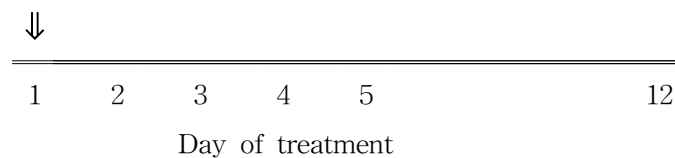
a. Control : FSH 50 mg, 8회 (I.M.)



b. Group 1 : FSH 400 mg, 1회 (S.C.)



c. Group 2 : FSH 200 mg, 1회 (S.C.)



d. Group 3 : FSH 200 mg, 2회 (S.C.)

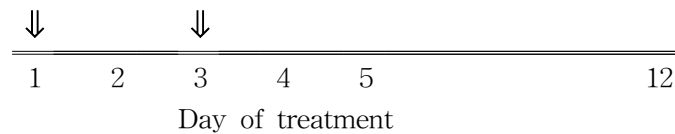


Figure 1. Treatment schedules for superovulation and embryo collection.

3. 난소반응 검사 및 수정란 회수

인공수정 후 7일째 직장 검사 또는 초음파 검사를 통해 과배란 처리된 공란우의 난소를 촉진하여 황체의 수를 조사하고 수정란을 회수하였다. 수정란 회수는 non-surgical flushing 방법으로 2% Lidocaine (광명약품)을 제 1~3미추 사이에 6~10 ml 주사하여 경막 외 마취를 실시하였고, 자궁각에 Foley catheter (FHK, Nipro)를 완전하게 고정시킨 후 2% FBS (Fetal Bovine Serum, Sigma, U.S.A)가 첨가된 D-PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, Sigma, U.S.A)를 관류액으로 사용하여 수정란을 회수하였다. 자궁내 수정란의 관류방법은 50 ml주사기를 이용하여 주입과 흡입을 2~3회씩 반복하면서 한 자궁각에 500 ml씩의 관류액을 이용하였으며, 채란용 필터는 Embryo collection filter (FHK, Nipro)를 사용하였다.

4. 수정란 검사

회수된 수정란의 발육단계와 등급을 Linder와 Wright (1983)의 기준에 따라 형태학적으로 평가하였다. 발육단계는 상실배기, 배반포기로 구분하였으며, 수정란의 등급은 다음과 같이 분류하였다.

'Excellent': 발육이 정상적이고 결손이 보이지 않는 것

'Good': 위란강 (perivitelline space)내에 약간 변성된 할구(blastomeres)를 가진 것

'Fair': 중간정도의 불규칙적 변형이 일어난 것

'Poor': 정상적인 할구가 거의 없는 변성란 및 미수정란.

'Excellent', 'Good'으로 확인된 수정란을 이식 가능한 수정란으로 평가하였다.

5. 수정란 이식 및 임신 진단

수정란이식은 발정 후 6-7일째 직장질법에 의한 자궁경관 경유법 (비외과적 이식방법)으로 수란우의 자궁 내에 이식하였으며, 임신진단은 이식 후 2 개월에 직장검사에 의하여 실시하였다.

6. 혈액 채취 및 혈청분리·보존

공란우의 혈액은 과배란 처리 개시일 부터 인공수정일까지 12시간 간격 (7:00, 19:00 시)으로 채혈하였으며, 그리고 수정란 회수 시 각각 경정맥으로부터 채취하였다. 채취한 혈액은 실온에서 약 2-3 시간 보관 후 717×g에서 10 분간 원심분리하여 혈청을 분리한 후 호르몬 분석 전까지 -20℃에서 보존하였다.

7. 혈중 Estradiol-17β 및 Progesterone 분석

혈청 estradiol-17β 및 progesterone 농도는 Coat-A-Count estradiol (DPC사, U.S.A) 와 Coat-A-Count progesterone (DPC사, U.S.A)를 이용하여 RIA방법에 따라 COBRA II (PACKARD, U.S.A)로 측정하였다.

8 통계학적 분석

실험결과의 통계적 분석은 ANOVA (분산분석)를 이용하여 실시하였으며, Student-Newman-Keuls test를 적용하여 각 처리구간의 유의성을 검정하였다. P<0.05일 때 각 군간의 유의성을 인정하였다.

결과 및 고찰

1. 공란우의 발정 및 과배란 유기

공란우 33두로부터 각기 다른 과배란 방법에 따른 발정과 과배란 유기 빈도를 조사한 결과는 표 1에서 보는 바와 같다. 과배란 처리 후 난자 또는 수정란이 1개 이상 회수된 개체를 발정이 발현된 것으로 간주하였으며, 대조구에서는 9두 중 2두가 발정이 발현되지 않았고 나머지 처리구에서는 모두 100% 발정이 발현되었다. 과배란이 유기된 소는 2개 이상의 난자 또는 수정란이 회수된 개체로 간주하였고, 대조구에 있어서는 77.8%, 처리구 1은 87.5%, 처리구 2는 88.9% 그리고 처리구 3은 100% 과배란이 유기 되었다. 발정은 유기 되었으나 과배란이 유기 되지 않은 4두는 배란된 황체수가 3개 이하였다.

과배란 처리에 의한 발정 유기는 다회 투여 시 77.8%, 1회 투여시 100% 나타났는데, Bo 등 (1994)에 의하면 다회 투여 및 1회 투여 시 각각 77.8%, 100% 발정이 유기 되었고, 1994년 Dattenna 등, 1998년 임 등도 1회 피하주사로 100% 발정이 유기 되었다고

보고하였다. 이러한 결과는 본 실험의 발정유기와 동일한 결과를 보였다. 그러나 1993년 Walsh 등은 p-FSH를 이용하여 4일간 호르몬 처리 후 81.3%의 발정유기율을 나타냈다고 보고하였는데 본 실험에서는 다소 낮은 77.8%로 나타났다. 이러한 결과들을 살펴보면 고분자 유기물질에 용해시킨 FSH의 1회 및 2회 투여와 다회 투여를 비교하였을 때 과배란 처리의 발정유기에서는 각 처리군 간에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

Table 1. Number of cows detected in estrus and of recovered embryos by different superovulation treatment

	Treatment Groups*			
	Control	1	2	3
Treated Cows	9	8	9	7
Cows of estrus induction ¹	7 (77.8%)	8 (100%)	9 (100%)	7 (100%)
Cows of superovulation ²	7	7	8	7

*Control : Cows administered total 400 mg FSH injected intramuscularly twice daily for 4 days.

Group 1 : Cows administered a single subcutaneous injection of 400 mg FSH dissolved in 30% PEG.

Group 2 : Cows administered a single subcutaneous injection of 200 mg FSH dissolved in 30% PEG.

Group 3 : Cows administered 200 mg FSH dissolved in 30% PEG injected subcutaneously twice in an interval of 48 hrs.

¹Ova/embryos found in recovery

²Only the cows giving more than 2 ova/embryos in recovery were included

2. 공란우의 난소 반응 및 수정란 생산

과배란 처리에 따른 공란우의 난소반응 조사 및 수정란회수 결과는 표 2에서 보는 바와 같다. 대조구와 각 처리구 1, 2, 3의 평균 황체수는 11.1 ± 1.3 , 19.6 ± 3.0 , 13.4 ± 1.9 그리고 9.6 ± 2.0 개로 각각 나타났다. 30% PEG에 용해시킨 400 mg의 FSH를 1회 피하주사를 투여한 처리구 1이 다른 처리군들에 비해 유의적 ($P < 0.05$)으로 높게 나타났다, 이러한 결과는 400 mg FSH 다회 투여와 1회 투여 시 황체수는 20.7과 26.8개로 유의적 차이가 없다고 한 Bo 등(1994)의 보고와, 30% PVP 용액에 용해시킨 p-FSH 16 mg을 1회 투여 및

다회 투여 시 8.6 및 7.8개로 보고한 Dattena 등(1994)의 실험결과와 다소 차이를 보이고 있으나, FSH의 다회 투여와 30% PEG에 용해한 FSH의 1회 투여 시 황체수는 12.6과 24.8개로 보고한 임 등 (1998)의 보고와 유사한 결과를 보여 서로다른 과배란 처리방법이 난소의 반응에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 그러나 회수된 난자 또는 수정란 수에 있어서는 대조구와 각 처리구 1, 2, 3에서 9.1 ± 1.3 , 10.9 ± 3.2 , 9.4 ± 1.6 그리고 9.4 ± 1.6 개의 비슷한 회수로 각 군간의 유의적 차이 ($P < 0.05$)는 나타나지 않았다. 회수율은 회수된 난자 또는 수정란 수를 황체수로 나눈 값의 백분율로 대조구가 각 처리구에 비해 높은 결과 (82.1%)를 나타내었고, 처리구 1의 회수율은 55.5%로 가장 낮은 결과를 나타내어 황체수 조사결과와는 상반된 결과를 나타내었다.

채란 후 이식 가능한 수정란은 수정란 검사에서 'Excellent', 'Good'로 평가된 수정란으로 간주하였으며, 대조구와 각 처리구 1, 2, 3의 수가 각각 5.1 ± 1.3 , 5.9 ± 1.5 , 7.3 ± 1.8 그리고 4.6 ± 1.6 개로 유사한 결과를 보였으며, 회수된 수정란에 대한 이식 가능한 수정란의 비율은 FSH 50 mg씩 8회 투여 시 56.2%를 보였고, 처리구 2와 3에서는 비교적 높은 77.3%와 66.7%, 처리구 1에서는 53.9%로 가장 낮은 결과를 나타내어 각처리군간 유의적 차이는 나타나되지 않았다. 이러한 결과는 일시에 FSH의 혈중 농도가 높은 수준에서 유지됨으로써 난소의 미성숙 난포의 과자극으로 인해 상대적으로 다수의 난포가 발육하여 배란되므로 회수되는 수정란의 수는 증가되었으나 등급은 저하되는 경향을 나타낸 것으로 사료된다. Yamamoto 등 (1995)은 젖소에 30% PVP에 용해시킨 20~50 mg의 FSH 1회 근육주사가 효율적이라 하였고, 임 등 (1998)에 의하면 30% PEG에 용해시킨 400 mg FSH의 1회 투여와 다회 투여시 총회수란 수는 19.5와 8.8개이고 이식가능한 수정란 수는 9.9와 5.4개로 1회 투여가 좋은 성적을 나타냈다는 보고와 유사한 결과를 보였다.

Table 2. Ovary response and embryo production by different superovulation treatment

Items	Treatment Groups*			
	Control	1	2	3
No. of cows recovered embryos	7	7	8	7
No. of corpus luteum	11.1±1.3 ^b	19.6±3.0 ^a	13.4±1.9 ^b	9.6±2.0 ^b
No. of recovered ova/embryos	9.1±1.3	10.9±3.2	9.4±1.6	6.9±1.5
Proportion recovery (%) ¹	82.1	55.5	70.1	71.6
No. of transferable embryos	5.1±1.3	5.9±1.5	7.3±1.8	4.6±1.6
Proportion transferable (%) ²	56.2	53.9	77.3	66.7

a,b Value with different superscripts in the row were significantly different (P<0.05)

*Control : Cows administered total 400 mg FSH injected intramuscularly twice daily for 4 days.

Group 1 : Cows administered a single subcutaneous injection of 400 mg FSH dissolved in 30% PEG.

Group 2 : Cows administered a single subcutaneous injection of 200 mg FSH dissolved in 30% PEG.

Group 3 : Cows administered 200 mg FSH dissolved in 30% PEG injected subcutaneously twice in an interval of 48 hrs.

¹Proportion data of recovered ova/embryos out of total number of corpus luteum

²Proportion data of transferable embryos out of total number of recovered ova/embryos

3. 수정란 평가

공란우에서 회수된 난자 또는 수정란의 질은 Linder와 Wright (1983)의 평가 기준에 따른 등급분류(A~E)는 Table 3과 같다. A등급 (Excellent)은 각 처리구별로 39.1, 30.3, 49.3, 52.1%로 각각 나타났는데, 처리구 3에서 A등급의 난자 또는 수정란을 가장 많이 회수 하였으며, 처리구 1에서는 30.3%로 가장 적은 회수율을 나타내었다. 가장 낮은 등급인 E등급 (Unfertilized)은 각 처리구에서 29.7, 15.8, 4.0, 18.7%로 대조구에서 29.7%로 가장 많은 비율로 나타났으며, 30% PEG에 용해시킨 200 mg의 FSH를 1회 피하주사를 투여한 처리구 2에서 4.0%로 가장 낮게 나타났다. Dattena 등 (1994)은 양질의 이식 가능한 수정란의 비율은 FSH 다회 투여에서는 68.2%, FSH-PVP 1회 투여에서는 84.0%로 나타나 1회 투여가 더 효과적이라고 보고하였다. 이러한 결과는 200 mg 1회 및 2회 투여시에는 본

연구 결과와 유사하였으나 400 mg 1회 투여에서는 다회 투여보다 다소 낮은 53.9%를 나타내었다. 따라서 본 실험의 결과로 보아 400 mg 다회투여한 대조군에서 우수한 등급의 수정란을 회수할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 3. Quality of embryos recovered by different superovulation treatment

Treatment Groups*	No. of cows	% of ova/embryos by quality**				
		A	B	C	D	E
Control	7	39.1	10.9	6.2	14.1	29.7
1	7	30.3	22.3	1.3	30.3	15.8
2	8	49.3	20.0	8.0	18.7	4.0
3	7	52.1	14.6	0.0	14.6	18.7

*Control : Cows administered total 400 mg FSH injected intramuscularly twice daily for 4 days.

Group 1 : Cows administered a single subcutaneous injection of 400 mg FSH dissolved in 30% PEG.

Group 2 : Cows administered a single subcutaneous injection of 200 mg FSH dissolved in 30% PEG.

Group 3 : Cows administered 200 mg FSH dissolved in 30% PEG injected subcutaneously twice in an interval of 48 hrs.

**Classification of ova/embryo quality

A : Excellent, B : Good, C : Fair, D : Degenerated, E : Unfertilized ova

4. 이식 후 수태율

공란우에서 회수된 수정란 중 'Excellent', 'Good' 의 이식가능 수정란을 각 처리구별 1~2개를 발정동기화 된 수란우에 이식한 결과 표 4와 같은 결과를 얻었다.

대조구는 8두에 우수한 수정란을 이식하여 3두가 수태되어 37.0%의 수태율을 보였으며, 각 처리구별 수태율은 30.0%, 36.8% 그리고 37.7%로 나타나 전반적으로 대조구와 비슷한 결과를 나타내었는데 이러한 결과는 다양한 과배란 반응에 의해서 회수되는 수정란의 수 및 질적인 면에서는 다소 상이한 결과를 보이지만, 회수된 수정란 중에서 이식 가능한 수정란만을 선별하여 수란우에 이식한다면 서로 다른 과배란 처리간에도 수태율에 차이가 없을 것으로 사료된다.

Table 4. Pregnancy rates after transfer of embryos recovered by different superovulation treatment

	Treatment Groups*			
	Control	1	2	3
No. of recipients	8	10	19	14
No. of transferred embryos	8	15	26	15
No. of pregnant recipients	3	3	7	5
Pregnancy rate(%)	37.0	30.0	36.8	37.7

*Control : Cows administered total 400 mg FSH injected intramuscularly twice daily for 4 days.

Group 1 : Cows administered a single subcutaneous injection of 400 mg FSH dissolved in 30% PEG.

Group 2 : Cows administered a single subcutaneous injection of 200 mg FSH dissolved in 30% PEG.

Group 3 : Cows administered 200 mg FSH dissolved in 30% PEG injected subcutaneously twice in an interval of 48 hrs.

5. 혈중 progesterone 및 estradiol-17 β 의 농도 분석

과배란 처리 개시일부터 인공수정일 까지 12시간 간격으로 공란우의 경정맥에서 채취한 혈액과 채란 직전 채취한 혈액의 혈중 progesterone 및 estradiol-17 β 농도분석 결과는 그림 2, 3에서 보는 바와 같이 대조구를 비롯한 각 처리구의 혈중 호르몬 분비는 유사한 결과를 나타내었다. Yamamoto 등 (1994)은 인공수정 후 혈청 내 progesterone의 농도는 FSH 투여 후 240시간까지 계속적으로 증가되며 또한 인공수정 후 7일째 관찰되는 황체수와 회수되는 난자 그리고 이식 가능한 수정란 수와 관련이 있는 것으로 보고하였다. 본 실험의 결과에서는 황체수에서 유의적($P < 0.05$)으로 높게 나타난 처리 1구에서 가장 높은 progesterone의 농도를 나타내었다. 또한 1995년 Takedomi 등도 p-FSH를 생리식염수에 용해하여 Holstein 처녀우에 다회 투여 (총 30 mg)하고 25%와 50% PVP에 30 mg을 용해시켜 1회 투여에 따른 progesterone 농도는 FSH 투여 후 48시간째 PGF2 α 를 투여 후 72시간이내에 유의적($P < 0.05$)으로 낮게 나타났으며, FSH 투여 후 96시간까지 낮은 수준의 Progesterone 농도를 유지했다고 보고하였다. 본 실험에서도 PGF2 α 를 투여 후 72시간이내의 Progesteron 농도와 동일한 결과를 보였다. FSH 투여 후 낮은 수준으로 유지된

Progesterone의 농도 지속 시간은 96시간보다 다소 긴 108시간으로 나타났다. Estradiol-17 β 의 혈중 농도에서는 Takedomi 등(1995)은 다회 투여(총 30 mg)와 25%와 50% PVP에 30 mg을 용해시켜 1회 투여한 처리군에서 FSH 투여 후 48시간에서 72시간 사이에 농도증가가 시작되어 96시간까지 증가되었다고 보고하였다. 본 실험에서도 처리 1구외에 대조구와 처리 2·3구에서 96시간까지의 농도 증가는 일치하였다. Estradiol-17 β 의 혈중 농도는 대조구와 처리구에서 FSH 투여 후 60시간에서 84시간 사이에 농도증가가 시작되어 처리 1구는 84시간째 가장 높은 수준을 유지했고, 대조구와 처리 2·3구에서는 96시간째 가장 높은 수준을 유지했다. 1995년 Takedomi 등이 p-FSH를 Holstein 처녀우에 다회 투여(총 30 mg)함으로써 혈중 p-FSH 농도를 40~80 ng/ml 수준으로 3~66시간동안 지속된 결과를 보였고, 25%와 50% PVP에 용해시킨 30 mg pFSH 1회 피하투여에 있어서도 40~80 ng/ml 범위를 3~60 시간 동안 혈중농도를 유지한다고 보고하여 고분자 유기물질이 다회 투여시와 유사하게 혈중 FSH의 농도를 유지한다는 것을 알 수 있다.

본 실험에서는 400 mg 및 200 mg FSH를 각각 1회 투여와 200 mg FSH 2회 투여 시에도 혈중 progesterone 및 estradiol-17 β 호르몬 분비가 400 mg FSH 다회 투여시와 유사하게 분비된 것으로 나타나 투여회수와 투여량에는 중요한 영향이 나타나지 않은 것으로 사료되며, PEG에 용해시킨 FSH의 혈중 농도를 측정하지 못하였으나 계속되는 연구에 있어서는 내분비적인 변화를 명확히 구명할 필요가 있을 것으로 사료된다.

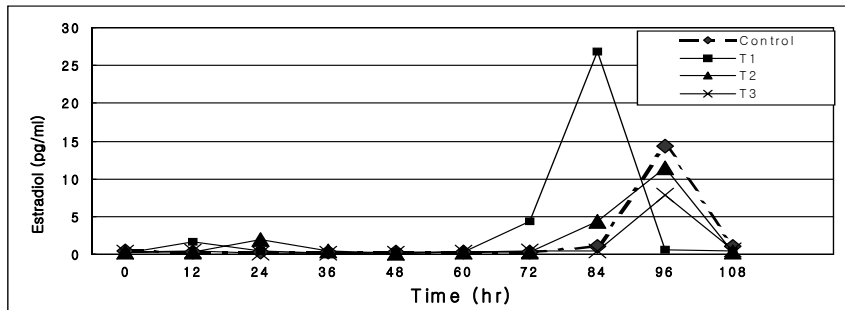


Figure 2. Comparisons of plasma E2 concentration in cows treated by different superovulation regimens

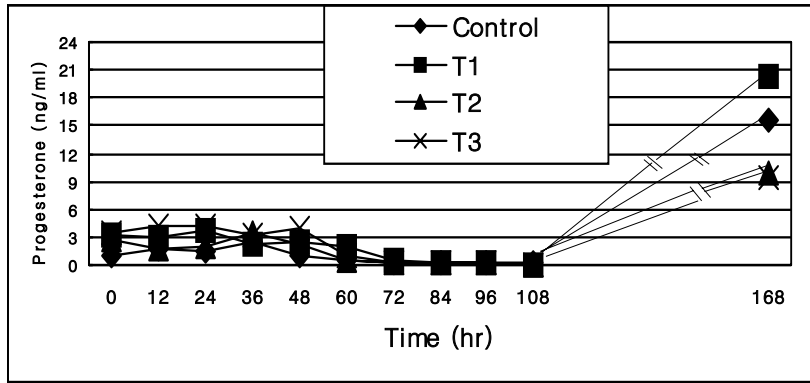


Figure 3. Comparisons of plasma P4 concentration in cows treated by different superovulation regimens

결론적으로 본 실험에서는 PEG에 용해시킨 FSH 투여 시 난소반응과 회수되는 수정란의 수와 질, 과배란 처리시 호르몬의 변화를 관찰하였을 때, 1·2회 피하투여가 다회 근육투여와 비교하여 큰 차이가 없었으나, 1·2회 투여는 다회 투여보다 공란우에 스트레스를 훨씬 적게 주고 과배란 처리 비용과 노동력을 줄일 수 있어 실용적인 방법이라고 사료된다.

참고자료

- Akbar AM, Nett TM and Niswendwr GD. 1974. Metabolic clearance and secretion rates of gonadotrophins at different stages of the oestrus cycle in ewes. *Endocrinology* 94:1318-1324.
- Bo GA, Hockley D, Tribulo H, Jofre F, Tribulo R, Busso N, Barth AD and Mapletoft RJ. 1991. The effect of dose schedule and route of administration on superovulatory response to Folltropin-V in the cow. *Theriogenology* 35:186.
- Bo GA, Hockley DK, Nasser LF and Mapletoft RJ. 1994. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of Folltropin-V in beef cattle. *Theriogenology* 42:963-975.
- Callessen H, Greve T and Hyttel P. 1986. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. *Theriogenology* 25:71-86.
- Dattena M, Vespignani S, Branca A, Gallus M, Ledda S, Naitana S and Cappai P. 1994. Superovulatory

- response and quality of embryos recovered from anestus ewes after a single injection of porcine FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 42:235-239.
- Demoustier MM, Becker J-F, Van Der Zwalm P, Closset J, Gillard J-L and Ectors F. 1998. Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment in cows. *Theriogenology* 30:379-386.
- Edward LM, Rahe CH, Griffin JL, Wolfe DF, Marple DN, Cummins KA and Pitchett JF. 1987. Effect of transportation stress on ovarian function in superovulated hereford heifers. *Theriogenology* 28:291-299.
- Gonzalez A, Lussier JG, Caruthers TD, Murphy BD and Mapletoft RJ. 1990. Superovulation of beef heifer with Follitropin-V: a new FSH preparation containing reduced LH activity. *Theriogenology* 33:519.
- Gwazdauskas FSW. 1972 Adrenocorticotropin alteration of bovine peripheral plasma concentration of cortisol, corticosterone and progesterone. *J. Dairy Sci.* 55:1165-1169.
- Hansen PJ, Drost RM, Rivera FF, Paula-Lopes, AI-Katanani YM, Krininger CE and Chase CC. 2001. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology* 55:91-103.
- Lindsell CE, Rajkumar K, Manning AW, Emery SK, Mapletoft RJ and Murphy BD. 1986. Variability in FSH-LH ratios among batches of commercially available gonadotrophins. *Theriogenology* 25:167.
- Lindner GM and Wright RW Jr. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20:407-416.
- Lopez-Sebastian A, Gomez-Brunet A, Lishman AW, Johnson SK and Inskeep EK. 1993. Modification by propylene glycol of ovulation rate in ewes in response to a single injection of FSH. *J. Reprod Fert.* 99:437-442.
- Monniaux D, Chupin D and Saummande J. 1983. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology* 19:55-81.
- Murphy DB, Mapletoft R, Manns J and Humphrey WD. 1984. Variability in gonadotrophin preparations as a factor in superovulatory response. *Theriogenology* 21:117-125.
- Nasser LF, Adams GP, Bo GA and Mapletoft RJ. 1993. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology* 40:713-724.
- Shea BF, Janzen RE and McDermand DF. 1984. Seasonal variation in response to stimulation and related

- embryo transfer procedures in Alberta over a nine year period. *Theriogenology* 21:186-195.
- Stoebel DP and Moberg GP. 1982. Repeated acute stress during the follicular phase and luteinizing hormone surge of dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 65:92-96.
- Suzuki T. 1993. Bovine embryo transfer and related techniques. *Mol. Reprod. Dev.* 36:236-237.
- Takedomi T, Aogagi Y, Konish M, Kishi H, Taya K, Watanabe G and Sasamoto S. 1993. Superovulation in Holstein heifers by a single injection of porcine FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 39:327.
- Takedomi T, Aogagi Y, Konish M, Kishi H, Taya K, Watanabe G and Sasamoto S. 1995. Superovulation in Holstein heifers by a single subcutaneous injection of porcine FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 43:1259-1268.
- Tibier M. 2000. The IETS statistics of embryo transfers in livestock in the world for the year 1999: A new record for bovine in vivo-derived embryos transferred. A report of the IETS data retrieval committee 24-28.
- Tribulo H, Jofre F, Carcedo J, Alonso A, Tribulo R and Bo GA. 1993. Superovulation in *Bos-indicus* cattle with a single subcutaneous injection of commercial pituitary extracts. *Theriogenology* 39:331. abstr.
- Walsh JH, Mantovani R, Dudy RT, Overstrom EW, Dobrinsky JR, Enright WJ, Roche JF and Boland MP. 1993. The effects of once or twice daily injections of p-FSH on superovulatory response in heifers. *Theriogenology* 40:313-321.
- Willmott N, Saunders J, Bo GA, Palasz A, Pierson RA and Mapletoft RJ. 1990. The effect of FSH/LH ratio in pituitary extracts on superovulatory response in the cow. *Theriogenology* 33:347.
- Wolfenson D, Lew BJ, Thatcher WW, Graber Y and Meidan R. 1997. Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. *Anim. Reprod. Sci.* 47:9-19.
- Yamamoto M, Ooe M, Kawaguchi M and Suzuki T. 1994. Superovulation in the cow with a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 41:747-755.
- 손동수, 류일선, 박성재. 2001. 소 수정란이식(제 7판) 12-13.
- 임석기, 우재석, 전기준, 장선식, 강수원, 윤상기, 손동수. 1998(a). 한우에 있어서 PEG에 용해시킨 Folltropin-V의 1회 피하주사에 의한 다배란 유기. *한국수정란이식학회지* 13:207-212.

임석기, 전기준, 우계석, 최계관, 양보석, 오성종, 윤상보. 1998(b). 한우에 있어서 다양한 용매에 용해시킨 FSH
의 1회 주사에 의한 난소반응. 한국수정란이식학회지 13(3):213-217.

최상용, 노규진, 최창용, 강태영, 윤희준, 손우진, 이효중, 박충생. 1996. 토끼에서 FSH제의 Single Injection에 따
른 과배란 유도 효과. 한국수정란이식학회지 11:211-216.

5-2. 한우 체세포 복제수정란의 이식 후 생존성

Viability of somatic cell nuclear transfer embryos following embryo transfer in Hanwoo

Abstract

This study was conducted to examine the viability of bovine clone embryos after embryo transfer. Fresh or vitrified blastocysts derived from somatic cell nuclear transfer (SCNT) were transferred into the uterine horn of recipient cows. Twenty-four of total 73 recipients were pregnant at Day 50 and 4 recipients were maintained to term. Each 2 calves derived from IVF and SCNT embryos were born. Pregnancy rate was higher when fresh embryos were transferred to recipients compared to vitrified embryos, but development to term was not different between both groups. One female clone calf died at 5 days after birth due to the fullness of amniotic fluid in rumen and the infection of umbilical cord. The result of the present study shows that clone calves can be produced from embryo transfer of SCNT embryos, however, solution of abortion problem is necessary to improve the cloning efficiency.

서론

체세포 핵이식 기술은 유전적으로 동일한 복제동물을 대량 생산하는 기술로서 지금까지 면양을 비롯하여 다양한 동물에서 복제동물 생산이 보고되고 있는데(Wilmot 등, 1997; Kato 등, 1998; Wakayama 등, 1998; Baguisi 등, 1999; Wells 등, 1999; Polejaeva 등, 2000; Shin 등, 2002; Galli 등, 2003; Woods 등, 2003; Lee 등, 2005), 최근에는 형질전환동물을 생산하는 수단으로도 유용하게 활용되고 있다(Schnieke 등, 1997; Cibelli 등, 1998; Lai 등, 2002). 그러나 여전히 핵이식기술에 의한 복제 효율성은 매우 저조하며 복제동물의 높은 유산 및 사산율, 기형 및 거대산자의 출생, 생후 조기사망 등의 문제점이 심각하게 대두되고 있다(Shiga 등, 1999; Wells 등, 1999; Zakhartchenko 등, 1999; Kubota 등, 2000). 이러한 원인은 이식된 체세포 핵의 reprogramming과 밀접한 관련이 있을 것으로 추측되고 있는데 핵이식 복제란의 발달 과정에 비정상적인 DNA

methylation (Kang 등, 2002) 등 유전자 발현 및 기능이상(Smith and Murphy, 2004), 비정상적인 X-염색체 불활성화(Xue 등, 2002) 등이 나타나는 것으로 보고되었다.

핵이식기술에 의한 복제동물 생산이 실용화되기 위해서는 생산된 복제란을 수란우에 이식하여 임신을 유지시키고, 정상적인 복제개체를 생산해내는 일이 가장 중요한 관건이다. 일차적으로는 복제란의 임신율을 높이고 둘째로는 출생 시까지 안전하게 임신을 유지하는 일과, 출생 후 개체의 생존성을 높이는 일이 핵이식 기술의 실용화를 위한 목표가 될 것이다. 아울러 복제란의 동결보존 후 이를 융해하여 이식하는 기술도 중요하다.

본 연구에서는 복제란의 이식 후 난자의 상태 및 이식형태에 따른 임신율과 생존율을 검토하고, 복제 송아지의 유전자 분석 및 사망원인 분석을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 채취 및 성숙배양

도축장에서 회수된 난포의 난소로부터 미성숙 난자를 채취하여 난구세포가 균일하고 세포질이 균질한 것만을 선별하여 5% CO₂, 39°C의 조건하에서 18~20시간 성숙배양하였다. 난포란의 성숙배양액은 TCM-199액(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)에 10% FBS(Gibco-BRL), 0.2 mM Na-pyruvate, 0.02 U/ml FSH(Sigma, St. Louis, MO, USA), 1 µg/ml 17β-estradiol(Sigma) 및 50 µg/ml gentamicin(Gibco-BRL)을 첨가한 것을 사용하였다.

2. 체외수정란의 생산

체외수정은 한우의 동결정액을 사용하였다. 성숙 난포란은 5mM caffeine(Sigma), 10µg/ml heparin(Sigma), 3µg/ml BSA 및 2×10⁶ 정자/ml 가 함유된 BO액(Brackett 와 Oliphant, 1975)의 50µl 소적 내에 난구세포가 둘러싸인 채로 10여개씩 투입하여 5% CO₂, 39°C의 조건하에서 12~20시간 배양하였다. 수정 후 난자는 난구세포가 붙어있는 채로 3µg/ml BSA를 함유한 TCM-199액의 소적으로 옮겨 32-40시간 배양 후 난구세포를 제거하고 2 세포기 이상으로 발육된 수정란은 10% FBS를 함유한 CR1aa내에서 5-7일간 추가 배양하여 배반포로 발육된 수정란 중 난자의 질이 우수하다고 판정되는 난자만을 초자화동결 실험에 공시하였다.

3. 핵이식란의 생산

핵이식은 Campbell 등(1996)의 방법에 준하여 한우의 피부세포를 동결 용해하였다가 배양한 후 사용하였다. 난자의 탈핵은 cytochalasin B(CB)를 함유한 TCM-199 + 3 mg/ml BSA의 배양소적(50 μ l) 내에서 제 1극체와 주변의 세포질을 약 1/3정도 흡입하여 제 2 유사분열 중기 염색체를 제거하는 방법으로 탈핵을 실시하였다. Donor 세포는 직접 injection pipette으로 흡입하여 탈핵란 세포질의 위란강 내로 주입하였다. 재구축란의 전기융합은 BTX 세포융합장치(BTX, San Diego, CA, USA) 및 0.5-mm폭의 wire chamber를 이용하여 실시하였다. 재구축란은 0.1 mM MgSO₄, 0.05 mM CaCl₂, 0.05 mg/ml BSA를 첨가한 0.3 M mannitol 용액을 넣은 wire chamber의 양 전극 사이로 옮겨, 1.5 kV/cm의 직류(DC)전류를 30 μ s 간 1회 통전하여 융합을 유기하였다. 융합이 확인된 핵이식란은 융합 1시간 후 10 μ M의 Ca⁺⁺-ionophore(A23187; Sigma)로 5분간 처리 후 즉시 10 μ g/ml 농도의 2 mM의 6-dimethylaminopurine (6-DMAP, Sigma)을 함유한 체외 배양액의 drop 내로 옮겨 4시간 동안 배양하여 활성화를 유기하였다. 활성화처리 후 핵이식란은 3 mg/ml BSA가 함유된 CR1aa 배양액의 50 μ l drop으로 옮겨 5% CO₂ 및 39°C의 조건하에서 48시간 배양하여 분할된 핵이식란은 10% FBS를 함유한 CR1aa 내로 옮겨 5~7일간 추가 배양하였다. 생산된 배반포 복제란 중 난자의 질이 우수하다고 판단되는 수정란만을 초자화동결 실험에 공시하였다.

4. 초자화동결액 및 희석액의 준비

초자화동결액(vitrification solution; VS)은 Saito 등(1994)이 사용한 GESD를 수정하여 사용하였다. 동결액의 구성은 20% FBS(Gibco)가 첨가된 D-PBS(Dulbecco's PBS)를 기본액으로 하여, 20% glycerol, 20% ethylene glycol, 3/8 M sucrose 및 3/8 M dextrose가 함유되도록 조정하였다(VS3). 초자화동결액 조제 시, 먼저 동해방지제 및 sugar를 D-PBS액에 최종농도의 1.25배 농도로 용해하여 사용 전에 FBS와 4:1의 비율로 혼합하여 조제하였다. 또한, 동결 전 평형을 위하여 20% FBS가 함유된 D-PBS를 이용하여 VS3액을 각각 50% 및 25%로 희석하여 VS2 및 VS1을 만들었다. 한편, 용해 후 동해방지제의 희석액으로는 20% FBS를 함유한 D-PBS액에 1/2 M sucrose를 첨가하여

(S-PBS) 사용하였으며, 단계적 희석을 위하여 1/4 M sucrose액도 같은 방법으로 준비하였다.

5. 수정란의 초자화동결

동결 전 배반포는 VS1, VS2 및 VS3에 각각 5분, 5분 및 1분간씩 평형 시켰으며 (E1), 둘째는 VS2 및 VS3에 각각 5분 및 1분간 실온에서 평형 시켰다. 수정란은 VS3액에 평형하는 1분 이내에 0.25-ml 플라스틱 straw(FHK, Japan) 내로 봉입하였다. 봉입방법은 우선 straw내에 S-PBS 2층(~10 및 ~70 mm), VS3 2층(~3 및 10 mm)을 각각 0.5 mm의 공기 층으로 분리하여 흡인한 뒤 수평으로 유지하였다. 1-3개의 체외수정 및 핵이식란 유래 배반포를 VS3액에 세척한 후 바로 10 mm의 VS3층에 옮겨 넣고 이어서 VS3 1층(~3 mm) 과 S-PBS(~15 mm) 1층을 만든 후 straw의 끝을 불에 달군 검자를 이용하여 봉인하였다(김 등, 1998). 수정란이 함유된 straw는 즉시 열 봉인한 쪽부터 LN2내로 침지하였다. 처음 1/2정도는 빠르게 침지하고, 나머지 1/2 부분은 서서히 침지하였으며, VS3에 평형개시부터 1분 이내에 수정란의 straw내 봉인 및 LN2내 침지 과정이 끝나도록 하였다. 동결 straw는 용해 시까지 LN2 용기 내에 보관하였다.

6. 동결란의 용해, 희석 및 배양

수정란 용해 후 동해방지제의 희석을 위하여 0.25 및 0.5M sucrose를 사용하였다. 동결 straw는 LN2 내에서 꺼내어 20℃ 수조에서 약 10초간 용해 후 1 ml의 0.5M sucrose가 들어있는 배양접시 내로 내용물을 배출시켜 혼합시켰다. 수정란은 즉시 0.5M sucrose액 내로 옮겨 실온에서 5분간 유지 후 다시 0.25M sucrose 액 내로 옮겨 5분간 유지한 다음 20% FBS를 함유한 D-PBS로 세척 후 10% FBS가 첨가된 CR1aa 배지로 옮겨 5% CO₂ 39℃의 조건하에서 6-8시간 배양하였다.

7. 수란우의 준비

수란우는 자연발정우 및 발정유기우를 사용하였다. 수란우의 발정유기를 위하여 발정주기 6-16일째의 암소에 GnRH를 투여한 후 7일째에 PGF_{2α} 30mg을 투여하였다. PG 투여 48시간 뒤 발정이 유기된 수란우에 GnRH를 1회 재 투여 후 7-8일째에 수정란이식

을 실시하였다. 한편, 자연발정우의 경우는 발정 후 7~8일에 수정란이식을 실시하였다. 수란우는 수정란이식 전에 직장검사를 실시하여 황체의 상태를 확인하여 정상적인 황체를 유지하고 있는 수란우를 이식에 공시하였다.

8. 수정란이식 및 임신감정

정상적인 형태를 가진 배반포를 1~2개 씩 20% FBS를 함유한 DPBS 액과 함께 0.25 ml straw 에 봉입하여 이식 시까지 37°C straw 배양기에 보관하였다. 수란우의 한쪽 자궁각에 복제란을 단독으로 혹은 체외수정란과 함께 1-2개씩 이식하였다. 일부 수란우의 경우는 자연발정에 맞추어 AI를 실시한 다음 7일차에 배란이 일어난 반대쪽 자궁각에 복제란을 추가로 이식하였다. 이식 후 발정재귀를 관찰하여 50일 이후까지 발정이 재귀되지 않은 소의 경우는 직장검사 및 초음파 검사로 임신여부를 확인하였다.

9. Microsatellite assay

태어난 개체의 복제여부를 검사하기 위하여 수란우 및 송아지의 혈액을 채취하여 DNA를 회수하고 공여 체세포에서도 DNA를 회수하여 3개(INRA035, INRA023, ABS011) 혹은 5개(BM1824, TGLA122, ETH225, INRA023, ETH10)의 bovine satellite markers를 이용하여 microsatellite assay를 실시하였다(Vaiman 등, 1994; Pfister Genskow 등, 1995).

10. 해부검사

사망한 복제소의 사망원인을 검토하기 위하여 해부학적 검사를 실시하여 장기조직의 상태, 병원성 감염여부, 기형여부 등을 검사하였다.

11. 통계처리

수정란 이식 실험의 결과는 Chi-square test에 의하여 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 이식 후 생존율

3개 목장의 총 73두의 대리모에 복제란을 이식(신선란 혹은 동결란) 한 결과, 이 중 24두(32.9%)가 이식 후 50일에 임신이 확인 되었다 (Table 1). 이식한 대리모 중 20두 (83.3%)는 임신 57-246일령에 유산되었으며 4두는 임신 284-291일에 자연분만 또는 제왕 절개에 의해 송아지를 생산하였다. 태어난 4두의 송아지 중 2두는 IVF 유래 송아지로 판 명되었으나 나머지 2두는 DNA 분석결과 NT란 유래로 판명되었다(수컷 1두, 암컷 1두, Fig. 1). NT란 유래 암컷 송아지는 발정 후 291일에 제왕절개하여 분만시켰으나 출생 후 5일 만에 사망하였다. 신선란의 경우는 동결란에 비하여 임신 50일 이후 임신율이 다소 높았으나 산자 생산율에는 차이가 없었다(Table 2). 한편, NT란만 이식한 경우에는 높은 유산율을 보인 반면, IVF란과 함께 이식한 경우에는 임신한 3두가 모두 분만하였고 이 중 NT란 유래 복제 송아지도 1두가 생산되었다(Table 3). 인공수정 후 이식한 2두는 모 두 임신하였으나 2두 모두 5~7개월 령에 유산하였다.

Table 1. Embryo transfer results of bovine NT embryos

Farm	No. Recipients	No.(%) of pregnant at D50	No.(%) of Abortion	No. (%) of Parturition	Note
A	30	9(30.0)	9(100) ^a	0 ^a	
B	21	6(28.6)	3(50.0) ^b	3(50.0) ^b	IVF 2, NT 1
C	22	9(40.9)	8(88.9) ^{ab}	1(11.1) ^{ab}	Died 5d after born
Total	73	24(32.9)	20(83.3)	4(16.7)	IVF 2, NT 2

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

Table 2. Embryo transfer results of fresh and vitrified bovine NT embryos

Treatment	No. Recipients	No.(%) of pregnant at D50	No.(%) of Abortion	No. (%) of Parturition	Note
Fresh	34	14(41.2)	12(85.7)	2(14.3)	1(IVF-derived)
Vitrified	39	10(25.6)	8(80.0)	2(20.0)	1(IVF-derived)
Total	73	24(32.9)	20(83.3)	4(16.7)	IVF 2, NT 2

Table 3. Embryo transfer results following transfer methods

Treatment	No. Recipients	No.(%) of pregnant at D50	No.(%) of Abortion	No. (%) of Parturition	Note
NT	62	19(30.6)	18(94.7)	1(5.3)	NT 1
NT+IVF	9	3(33.3)	0	3(100.0)	IVF 2, NT 1
AI+ET	2	2(100.0)	2(100.0)	0	

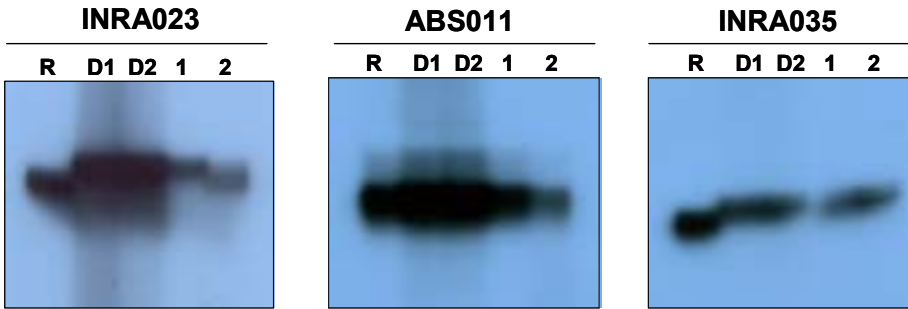


Figure 1. Clone calves. Left front is male (D287, 34kg) and right is female (D291, 46kg).

2. Microsatellite assay

IVF란과 함께 이식하여 태어난 송아지 2두의 microsatellite 분석결과, maker INRA023과 INRA035에서 cattle 1이 donor 세포가 DNA가 일치하여 복제송아지로 판명되었다(Fig. 2). 한편, IVF란과 함께 이식하여 태어난 송아지 중, 성별이 donor cell과 다른 암송아지에 대해서는 DNA 분석을 실시하지 않았다. 복제란만을 이식하여 태어난 송아지 1두에 대한 microsatellite 분석결과는 사용한 5개의 makers 중 모두에서 donor 세포 및 donor 개체의 혈액 DNA 와 genotype이 일치하였다(Table 4).

Microsatellite assay



R : recipient
 D1: donor cells(7/19:W.P)
 D2: donor cells(7/19:Dew)
 1 : cattle1
 2 : cattle2

Figure 2. Microsatellite assay of cloned and IVF cattles

Table 4. Microsatellite analysis of donor cells, recipient and offspring

Marker	Donor	Donor	Donor	Calf	Recipient
	Cell 1	Cell 2	blood	blood	blood
BM1824	181/183	181/183	181/183	181/183	181/181
TGLA122	151/181	151/181	151/181	151/181	141/181
ETH225	141/141	141/141	141/141	141/141	141/145
INRA023	203/203	203/203	203/203	203/203	185/211
ETH10	218/223	218/223	218/223	218/223	218/223

3. 복제소의사망원인분석

자연분만으로 태어난 수컷 복제송아지 1두는 출생 시 및 출생 후 별다른 이상이 나타나지 않았으나, 임신 291일 만에 제왕절개에 의해 태어난 암컷 복제송아지는 출생 시 양수를 과다하게 흡입한 것으로 보였고, 기립능력이 떨어지는 증상을 보였고, 젖을 제대로 빨지 못하여 인공포유를 실시하였으나 출생 후 5일째 사망하였다. 사망한 송아지를 부검한 결과, 제 1위내에 2L 정도의 양수와 우유덩어리 등이 차 있었으며 배꼽동맥부근이 감염으로 인해 검붉게 변색되어 있었고, 그로 인한 패혈증세가 심장부근 및 기타 조직

에서 확인되었다(Fig. 3). 또한 폐의 일부는 폐렴 증세로 보이는 검붉은 조직이 확인되었으나 직접적인 사망원인은 아닌 것으로 판단되었다. 이러한 증상을 종합하여 볼 때 복제송아지의 직접적인 사망원인은 제 1위내 양수 과다 흡입으로 인해 우유 섭취가 불가능하였고 이로 인한 영양결핍과 탈수증이 유발되었을 가능성과 배꼽동맥을 통한 감염이 주원인일 것으로 판단되었다.

한편 임신 246일에 조기 사산한 복제송아지(Fig. 4)의 부검 결과는 특별한 소견은 발견되지 않았으며, 유산 전 약 일주일간 대리모가 거의 운동력을 보이지 않았다.

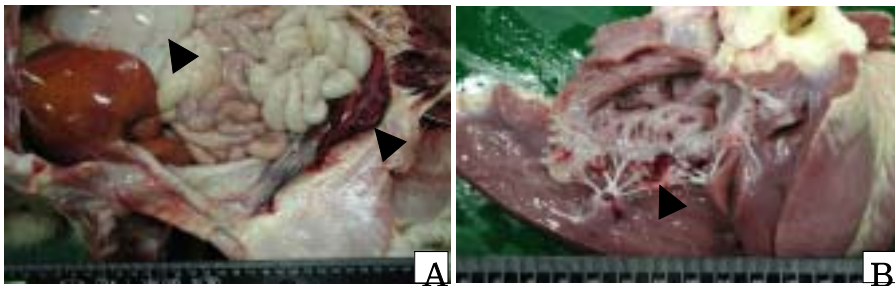


Figure 3. Internal organs showing fluid-filled rumen, infected umbilical blood vessel(A) and bleeding in heart valve(B) of a died clone cattle.



Figure 4. An absorbed clone fetus at D246.

고 찰

본 연구의 결과는 한우 체세포 유래 복제송아지의 생산 가능성과 동결융해된 난자의 이식에 의해서도 산자가 생산될 수 있음을 확인하였으나 생산효율을 높이기 위해서는 수정란이식 상의 기술적인 문제보다는 유산의 원인을 규명하여 배아생존율을 높이는 것

이 중요한 과제임을 보여준다. 또한 출생 후 생존율을 높이기 위하여 분만시기 조절, 산자관리시스템 확립 등 대책이 필요할 것으로 판단된다.

체세포 복제란의 이식 후 임신기 특징은 임신율은 그리 낮지 않은 반면 배아 조기 사망율이 높다는 것이다. 암양의 유선상피세포를 이용한 “Dolly”의 경우 8%의 저조한 임신율과 3%의 산자발생율을 보인 반면(Wilmut 등, 1997), 생쥐에서는 50% 이상의 높은 착상율을 보이고도 산자발생율은 2-3%에 불과하였다(Wakayama 등, 1998). 한편, 소의 태아 및 성체세포 복제란의 경우는 대부분 15-55%의 임신율과 3-25%의 산자발생율을 기록하였으나(Cibelli 등, 1998; Vignon 등, 1998; Wells 등, 1999), 유일하게 Kato 등(1998)은 100%의 임신율과 100%의 분만율, 75-83%의 산자발생율, 그리고 60%의 쌍자생 산율을 보고 함으로서 체세포를 이용한 동물의 대량복제의 가능성을 시사하였다. 본 연구에서는 30% 정도의 임신율을 얻었지만 이 중 17%만이 출산하여 산자발생율은 5.5%에 불과하며 IVF 산자를 제외하고 나면 순수한 복제소 생산율은 2.7%(2/73)에 불과하다.

핵이식에 의하여 생산된 복제동물의 출생 시 또는 출생 후에 나타나는 특징적인 현상은 그것이 배아세포 유래인지 체세포 유래인지에 관계없이 1)높은 생시체중, 2)낮은 생존율, 3)높은 기형발생율의 세 가지로 요약할 수 있다. 배아세포 핵이식에 의한 복제 송아지에서 나타난 현상들을 살펴보면, 먼저 Willadsen 등(1991)은 Holstein종을 포함한 100두의 복제 송아지 중 10두가 출생 시나 출생 직후 사망하였으며, 이들 중 일부는 정상 임신기간에도 불구하고 생시체중이 130lbs(59kg) 이상이었다고 보고하였다. Wilson 등(1995)은 418두의 복제 송아지를 조사한 결과, 수정란이식 또는 인공수정/자연교배에 의해 생산된 송아지보다 생시체중이 평균 20%이상 컸고, 개체 간 생시체중의 격차도 정상의 4-12배나 크게 나타났다고 보고하였다. 또한, Garry 등(1996)은 40두의 복제송아지를 생산하였는데, 이들의 생시체중범위는 26.4-67.3kg(평균48.5kg)으로 상당수가 거대산자였고, 34두는 출생 직후에 하나 이상의 비정상성을 나타내었으며, 8두는 세균감염, 척추기형 및 심장기능이상으로 사망하였다고 보고하였다.

한편, 체세포 복제동물의 경우도 거대산자의 출현빈도가 높은 것으로 나타났으며, 사망률은 배아복제 개체에 비하여 더 높은 것으로 나타났다. 면양에서는 임신기간이 132-161일로, 생시체중은 3.0-8.7kg으로 보고 되었고(Schnieke 등, 1997), 산자의 25-58%가 기형으로 인해 사산되거나, 심장이상 등으로 인해 조기 사망한 것으로 보고되었다

(Wilmut 등, 1997; Schnieke 등, 1997). 한편 복제송아지의 경우는 쌍태인 경우(Kato 등, 1998)를 제외하고는 생시체중이 큰 경향이 있었고 일부는 거대체중(53kg)과 폐의 부종, 거대한 배꼽정맥 등의 이상으로 임신후기에 유산된 경우도 보고되었다(Cibelli 등, 1998). 본 연구에서도 복제송아지의 생시체중이 34kg과 46kg으로 태어났으며 후자는 제왕절개에 의해 태어났다.

복제송아지의 사망률도 매우 높아(25-100%), Cibelli 등(1998)은 4두 중 1두가 거대한 폐동맥 및 배꼽정맥으로 인하여 사망하였다고 보고하였고, Well 등(1999)은 2두 중 1두가 급성 출혈성위염으로 안락사 되었으며, Kato 등(1998)의 경우도 8두 중 4두가 난산, 폐렴 등의 환경적 요인으로 인하여 사망하였다고 보고하였다. 배꼽부위로부터의 세균감염, 배꼽부위로부터의 복강내 출혈 등으로 인하여 출생 직후에 사망한 것으로 보고되었다(Vignone 등, 1999; Shiga 등, 1999). 본 연구에서 태어난 복제 암소의 경우에서도 배꼽혈관의 감염이 사망의 한 원인으로 판명되었다.

요 약

본 연구에서는 복제란의 이식 후 난자의 상태 및 이식형태에 따른 임신율과 생존율을 검토하고, 복제 송아지의 유전자 분석 및 사망원인 분석을 실시하였다. 배반포로 발육된 한우 체세포 복제란은 신선 또는 동결 융해하여 발정 7-8일령의 수란우 자궁각에 1-2개씩 이식하였다. 일부는 IVF란과 함께 이식하거나 인공수정 후 7일차에 추가로 복제란을 이식하였다. 총 73두의 대리모에 복제란을 이식한 결과, 24두(32.9%)가 임신되었고 이 중 4두가 임신 284-291일에 2두의 IVF 유래 송아지와 2두의 복제송아지를 생산하였다. 복제송아지 1두는 발정 후 291일에 제왕절개하여 분만시켰으나 출생 후 5일 만에 사망하였다. 신선란의 경우는 동결란에 비하여 임신 50일 이후 임신율이 다소 높았으나 산자 생산율에는 차이가 없었다. 복제소의 사망원인을 분석한 결과 1위내 양수과다 흡입과 배꼽혈관의 감염에 의한 것으로 확인되었다. 본 연구의 결과는 한우 체세포 유래 복제송아지의 생산 가능성과 동결 융해된 난자의 이식에 의해서도 산자가 생산될 수 있음을 확인하였으나 생산효율을 높이기 위해서는 수정란이식 상의 기술적인 문제보다는 유산의 원인을 규명하여 배아생존율을 높이는 것이 중요할 것으로 판단된다.

참고문헌

- Baguisi, A., Behboodi, E., Melican, D.T., Pollock, J.S., Destrempes, M.M., Cammuso, C., Williams, J.L., Nims, S.D., Porter, C. A., Midura, P., Palacios, M.J., Ayres, S.L., Denniston, R.S., Hayes, M.L., Ziomek, C.A., Meade, H.M., Godke, R.A., Gavin, W.G., Overstrom, E.W. and Echelard, Y. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Biotechnol.* 17:456-461.
- Campbell, K.H.S., McWhir, J., Ritchie, W.A. and Wilmut, I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380:64-66.
- Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Abel Ponce de Leon, F. and Robl, J.M. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280:1256-1258.
- Galli, C., Lagutina, I., Crotti, G., Colleoni, S., Turini, P., Ponderato, N., Duchi, R. and Lazzari G. 2003. Pregnancy: A cloned horse born to its dam twin. *Nature* 424:635.
- Garry, F.B., Adams, R., McCann, J.P. and Odde, K.G. 1996. Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. *Theriogenology* 45:141-152.
- Kang, Y.K., Koo, D.B., Park, J.S., Choi, Y.H., Chung, A.S., Lee, K.K. and Han, Y.M. 2001. Aberrant DNA methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nature Gen.* 28:173-177.
- Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H. and Tsunoda, Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282:2095-2098
- Kubota, C., Yamakuchi, H., Todoroki, J., Mizoshita, K., Tabara, N., Barber, M. and Yang, X. 2000. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:990-995.
- Lai, L., Kolber-Simonds, D., Park, K.W., Cheong, H.T., Greenstein, J.L., Im, G.S., Samuel, M., Bonk, A., Rieke, A., Day, B.N., Murphy, C.N., Carter, D.B., Hawley, R.J. and Prather, R.S. 2002. Production of α -1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295:1089-1092.
- Lee, B.C., Kim, M.K., Jang, G., Oh, H.J., Yuda, F., Kim, H.J., Hossein Shamim, M., Kim, J.J., Kang, S.K., Schatten, G. and Hwang, W.S. 2005. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature* 436:641.
- Pfister Genskow, M.A., Hawkins, G.A., Doud, L.K., Jurgella, G.L. Murkve, B.T., Werth, L.A. and Bishop, M.D. 1995. Bovine Dinucleotide Repeat Polymorphisms ABS010, ABS011, ABS012, ABS013, and

ABS014. *J. Anim. Sci.* 73:3189.

- Polejaeva, I.A., Chen, S.H., Vaught, T.D., Page, R.L., Mullins, J., Ball, S., Dai, Y., Boone, J., Walker, S., Ayares, D.L., Colman, A. and Campbell, K.H.S. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407:86–90.
- Saito, N., Imai, K. and Tomizawa, M. 1994. Effect of sugars-addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro. *Theriogenology*, 41:1053–1060.
- Schnieke, A.E., Kind, A.J., Ritchie, W.A., Mycock, K., Scoot, A.R., Ritchie, M., Wilmut, I., Colman, A., Campbell, K.H.S. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 278:2130–2133.
- Shiga, K., Fujja, T., Hirose, Y., Sasue, Y. and Nagai, T. 1999. Production of calves by transfer of nuclei from culture somatic cells obtained from japaness black bulls. *Theriogenology* 52 : 527–535.
- Shin, T., Kraemer, D., Pryor, J., Liu, L., Rugila, J., Howe, L., Buck, S., Murphy, K., Lyons, L. and Westhusin, M. 2002. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 415:859.
- Smith, L.C. and Murphy, B.D. 2004. Genetic and epigenetic aspects of cloning and potential effects on offspring of cloned mammals. *Cloning Stem Cells* 6:126–132.
- Vaiman, D., Mercier, D. et al. 1994. A set of 99 cattle microsatellites: characterisation, synteny mapping, and polymorphism. *Mammalian Genome* 5 288–297.
- Vignon, X., Chesne, P., LeBourhis, D., J., Heyman, Y., Renard, J.P. 1998. Developmental potential of bovine embryos reconstructed with somatic nuclei from cultured skin and muscle fetal cells. *Theriogenology* 49:392(abstr).
- Wakayama, T., Perry, A.C.F., Zuccotti, M., Johnson, K.R., Yanagimachi, R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394:369–374.
- Wells, D.N., Misica, P.M. Day, A.M. and Tervit, H.R. 1997. Production of cloned lambs from an established embryonic cell line : A comparison between in vivo- and in vitro matured cytoplasts. *Biol. Reprod.* 57:385–393.
- Willadsen, S.M., Janzen, R.E., McAlister, R.J., Shea, B.F., Hamilton, G., McDermand, D. 1991. The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. *Theriogenology* 35:161–170

- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., Campbell, K.H.S. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813
- Wilson, J.M., Williams, J.D., Bondioli, K.R., Looney, C.R., Westhusin, M.E., McCalla, D.F. 1995. Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer(cloning), embryo transfer and natural mating. *Anim. Reprod. Sci.* 38:73-83
- Woods, G.L., White, K.L., Vanderwall, D.K., Li, G.P., Aston, K.I., Bunch, T.D., Meerdo, L.N., and Pate, B.J. 2003. A Mule Cloned from Fetal Cells by Nuclear Transfer. *Science* 301:1063.
- Xue, F., Tian, X.C., Cubota, C., Du, F., Taneja, M., Dinnyes, A., Dai, Y., Levine, H., Pereira, L.V., Yang, X. 2002. Aberrent X-chromosome inactivation in deceased cattle derived from somatic cloning. *Nature Gen.* 31:216-220.
- Zakhartchenko, V., Scherthaner, W., prelle, K., Stojkovic, P., Brem, G., Wolf, E. 1999. Nuclear transfer in the bovine embryo: developmental potential of cultured adult cells. *Theriogenology* 51:218(abstr)
- 김정익, 유재원, 박춘근, 양부근, 정희태. 1998. 동결액의 평형방법과 회석방법이 초자화 동결된 소 체외수정란의 생존성에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지* 13:313-321.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연구개발 목표의 달성도

구분	연구개발 목표	연구개발 내용	달성도
1차 년도 (2000)	<ul style="list-style-type: none"> ● 유전자 및 발현 프로모터 크로닝 ● Cell line 구축, 유전자 도입 및 형질전환 수정란이식 ● 체세포 복제기술에 의한 형질전환 복제수정란 생산 (주관연구기관 : 경상대) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유전자 크로닝 <ul style="list-style-type: none"> - hSA 유전자 크로닝 - 유선훈이적 발현 프로모트의 크로닝 ○ 원시생식세포 및 태아체세포 cell line 확보 ○ Cell line 배양체계 구축 ○ 난포란의 체외성숙 및 수정란의 배양체계 확립 ○ 난자의 활성화 방법 확립 	<p>100%</p> <p>100%</p> <p>100%</p> <p>100%</p> <p>100%</p>
	<ul style="list-style-type: none"> ● 체세포 복제 한우와 젖소 수정란 생산 (제1협동연구기관 : 강원대) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 체세포 cell line 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 한우 및 젖소 체세포 회수 - 체세포의 계대배양 체계 확립(3-6세대) - 배양 체세포의 염색체 분석, 동결보존 ○ 배양 체세포의 세포주기 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 세포의 휴면처리 유무 및 방법에 따른 세포주기 분석 - 세포의 종류별, 크기별 세포주기 분석 ○ 수핵란의 효율적인 탈핵기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 적정 탈핵 시간(성숙배양시간 기준) 결정 - 탈핵 조작시 배양액 검토(조성) - 탈핵 전 적정 난자 처리방법 개발 	<p>100%</p> <p>100%</p> <p>100%</p>
	<ul style="list-style-type: none"> ● 체세포 복제 수정란 및 형질전환 수정란 이식 (제2협동연구기관 : 동신대) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 수란우 확보체계 구축 및 선발기준 설정 ○ 수란우 발정동기화에 의한 최적이식 조건 확립 <ul style="list-style-type: none"> - GnRH 및 PGF_{2α}를 이용한 발정동기화와 이식 후 수태율 향상 ○ 체외수정란 이식 <ul style="list-style-type: none"> - 체외수정란 생산 	<p>100%</p> <p>100%</p> <p>100%</p>

2차 년도 (2001)	<ul style="list-style-type: none"> ● 유전자 및 발현 프로모터 크로닝 ● Cell line 구축, 유전자 도입 및 형질전환 수정란 이식 ● 체세포 복제기술에 의한 형질전환 복제수정란 생산 (주관연구기관 : 경상대) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Enhancer 영역의 크로닝 ○ 발현 벡터 크로닝 ○ Cell line에 hSA 유전자 도입 및 선별 ○ 체세포를 이용한 핵이식 수정란 생산 ○ 체세포를 이용한 형질전환 수정란 생산 체계 확립 	<p>100%</p> <p>100%</p> <p>100%</p> <p>100%</p>
	<ul style="list-style-type: none"> ● 체세포 복제 한우와 젖소 수정란 생산 (제1협동연구기관 : 강원대) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 한우 및 젖소 체세포 복제수정란의 생산 <ul style="list-style-type: none"> - 융합조건 확립 - 세포 융합시 PHA처리 효과 구명 - 핵이식 후 융합까지의 적정시간 간격설정 - 핵이식란의 최적 활성화 방법 설정 - 융합 후 적정 활성화시간 평가 - 세포 휴면처리 방법에 따른 효율 검정 - 체세포를 핵이식에 의한 복제수정란 생산 기술 확립 - 전기융합조건 확립, 세포주기 동조 확립 ○ 복제수정란의 동결법 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 동결보호제간의 생존성 규명 - 직접동결법 확립 	<p>100%</p> <p>100%</p>
	<ul style="list-style-type: none"> ● 체세포 복제 수정란 및 형질전환 수정란 이식 (제2협동연구기관 : 동신대) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 한우 복제수정란 이식 <ul style="list-style-type: none"> - 수란우의 발정동기화 확립 - 신선란과 동결란의 이식에 의한 수태율 	<p>100%</p>
3차 년도 (2002)	<ul style="list-style-type: none"> ● 유전자 및 발현 프로모터 크로닝 ● Cell line 구축, 유전자 도입 및 형질전환 수정란 이식 ● 체세포 복제기술에 의한 형질전환 복제수정란 생산 (주관연구기관 : 경상대) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 형질전환 수정란 발현율 ○ Cell line 구축 및 유전자 도입 ○ 형질전환 수정란 자체 이식 ○ 형질전환복제수정란 생산 <ul style="list-style-type: none"> - 형질전환 수정란 생산 - 형질전환 수정란 동결보존 	<p>100%</p> <p>100%</p> <p>100%</p> <p>100%</p>
	<ul style="list-style-type: none"> ● 체세포 복제 한우와 젖소 수정란 생산 (제1협동연구기관 : 강원대) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 복제수정란 생산 <ul style="list-style-type: none"> - 복제에 적합한 세포종류 확인 - Passage별 복제수정란의 발육능 검토 - 적정 계대배양 및 doubling 간격 확인 ○ 복제수정란 동결 및 이식 <ul style="list-style-type: none"> - 한우 체세포 복제수정란의 이식 	<p>100%</p> <p>100%</p>
	<ul style="list-style-type: none"> ● 체세포 복제 수정란 및 형질전환 수정란 이식 (제2협동연구기관 : 동신대) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 복제 및 형질전환 수정란 이식 ○ 이식기법 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 복제수정란 및 형질전환수정란의 이식 수태율 비교 - 영양막세포와 공이식법 확립 	<p>100%</p> <p>100%</p>

4차 년도 (2003)	<ul style="list-style-type: none"> ●유전자 및 발현 프로모터 크로닝 ●Cell line 구축, 유전자 도입 및 형질전환 수정란이식 ●체세포 복제기술에 의한 형질전환 복제수정란 생산 (주관연구기관 : 경상대) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 형질전환 수정란 분석 ○ Cell line 구축 및 유전자 도입 ○ 형질전환 수정란 자체 이식 ○ 형질전환복제수정란 생산 <ul style="list-style-type: none"> - 형질전환 수정란 생산 - 형질전환수정란 동결 	100% 100% 100% 100%
	<ul style="list-style-type: none"> ●체세포 복제 한우와 젖소 수정란 생산 (제1협동연구기관 : 강원대) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 한우 체세포 복제수정란의 대량생산 체계 구축 <ul style="list-style-type: none"> - 한우 체세포 복제수정란의 대량생산 - 체세포 종류 별 복제수정란 생산 ○ 한우 체세포 복제수정란의 이식 및 공급 <ul style="list-style-type: none"> - 복제수정란의 동결보존 - 신선, 동결된 체세포 복제수정란의 이식 	100% 100%
	<ul style="list-style-type: none"> ●체세포 복제 수정란 및 형질전환 수정란 이식 (제2협동연구기관 : 동신대) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 복제수정란 및 형질전환 수정란 이식 <ul style="list-style-type: none"> - 신선, 동결융해 복제 및 형질전환 복제수정란 이식 - 초음파 임신감정에 의한 수태율 확인 	100%
5차 년도 (2005)	<ul style="list-style-type: none"> ●유전자 및 발현 프로모터 크로닝 ●Cell line 구축, 유전자 도입 및 형질전환 수정란이식 ●체세포 복제기술에 의한 형질전환 복제수정란 생산 (주관연구기관 : 경상대) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 형질전환 복제수정란 분석 ○ 형질전환 복제수정란 유전자 분석 ○ 형질전환 수정란 자체 이식 ○ 형질전환 복제수정란 생산 ○ 형질전환 수정란 착상관련 유전자 발현분석 및 검증 	100% 100% 100% 100% 100%
	<ul style="list-style-type: none"> ●체세포 복제 한우와 젖소 수정란 생산 (협동연구기관 : 강원대) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 한우 체세포 복제수정란의 이식 및 공급 <ul style="list-style-type: none"> - 신선, 동결융해 복제수정란 이식 - 한우 체세포 복제 송아지 생산 ○ 체세포 복제송아지의 유전자 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 복제소의 혈액 채취 - Donor 및 복제송아지 혈액의 DNA 검출 - DNA 분석에 의한 복제확인 (주관협조) 	100% 100%

Human serum albumin을 효과적으로 cloning하여 생명공학의 산업적 측면에서 효용가치가 큰 형질전환 동물 생산의 기반을 마련하였다는데 의의를 둘 수 있겠으며, 또한 복제 및 형질전환 수정란 생산의 제반 기술 확립과 이식 후, 수정란과 태아의 높은 조기 사멸율을 다양한 접근 방법으로 근본적인 원인 분석을 하였다.

뿐만 아니라, 이론 및 실험에만 그치지 않고, 축산 농가에서 직접 활용 가능한 발정시기 확인, 발정 동기화, 영양학적 관리 및 불임 관리 등의 기술을 보급, 축주들을 계몽하기 위한 노력을 하였다. 그러나 체외 수정란의 상업적 목적에 따른 난소 확보 부족 및 임신율 저조, 유산율 상승, 기업체 대응 자금의 부족으로 인한 연구기간 공백 등의 요인으로 당초 계획했던 목표를 완벽히 달성하지는 못한데는 유감스

러운 면이 있다.

또한 협동연구기관에서는 복제 수정란생산기술을 확립하는 것을 통하여 최종적으로 복제 한우 생산을 목표로 하였는바, 2두의 복제송아지를 생산하는데 성공하여 목표를 성공적으로 달성한 것으로 평가한다. 다만 복제소 생산효율은 수정란이식 이후 높은 유산율로 인해 여전히 낮고 태어난 송아지가 조기에 폐사하는 등의 문제가 노출되었다. 그러나 유산율을 감소시킬 수 있는 방안만 마련된다면 복제수정란생산의 기술적인 부분은 거의 확립되었다고 할 수 있다.

1년차에서 3년차까지는 복제수정란 생산기술의 확립을 위한 연구를 목표로 하였는데 ① 우량 한우 3-4두로부터 체세포를 확보하고, 계대배양 및 동결보존을 통해 cell line을 확립하였으며, 각 세포의 세포주기분석과 최적 세포주기 동조방법을 개발하였고, ② 체세포 핵이식에 의한 복제수정란 생산기술을 확립할 목적으로 수핵란의 탈핵기술 개선 및 활성화기술을 개선하고, 체세포 핵과 수핵란 세포질의 최적 전기융합조건을 검토하였으며, 체세포 핵과 수핵란 세포질의 세포주기동조 핵이식의 최적조건을 검토하였으며, 세포의 배양방법 및 passage, 세포처리방법, 세포의 종류에 따른 핵이식란의 발육능 검토하여 복제에 적합한 세포를 검정하였으며, 복제수정란의 동결방법을 확립하였다.

4, 5년차에는 개발된 핵이식기술을 토대로 추가적인 효율성 제고 연구를 수행하여 당초연구계획 내용에는 없었지만 수핵란세포질의 영향을 추가로 검토하여 핵이식에 적정한 수핵란의 상태를 검토하였으며, 융합 전 세포질의 활성화처리유무에 따른 복제란의 발육능 등을 추가로 검토하였다. 4, 5년차의 연구 중점은 본 연구의 최종 목표인 복제송아지 생산에 두고 전력을 기울인 결과, 복제란을 신선 또는 동결융해한 상태로 수정란이식을 실시하여 최종적으로 2두의 복제소를 생산하는데 성공하였다. 또한 태어난 복제소의 복제여부를 확인하기 위하여 유전자분석을 실시하여 2두 모두 체세포복제송아지임을 확인하였다. 또한 사망한 1두의 해부학적 검사를 실시하여 사망원인의 분석을 실시하였다.

결론적으로 당초 연구계획을 100% 달성하였을 뿐 아니라 복제의 효율제고를 위한 추가적인 연구 성과도 얻을 수 있었다. 아울러, 본 연구과제와 직접 연관은 없지만 본 연구를 수행하는 과정에서 소의 수정란배양 및 이식관련 연구, 돼지 복제연구 등에서도 많은 결과를 얻을 수 있었다.

본 연구진은 국외 저명한 학술잡지(SCI에 등재된 학술잡지)에 총 21편, 국내 학회지에도 총 18편의 논문을 투고 및 발표하였으며, 각종 학술대회에 참가하여 연구 성과를 발표하는 등 활발한 활동을 하였다.

제2절 관련분야의 기술발전예의 기여도

소 체세포 핵이식에 의한 복제수정란 생산에 관한 협동연구 결과는 복제수정란 생산의 효율성을 높이기 위한 기본적인 기술의 검토에서부터 최종적으로는 복제소 생산에 관한 연구를 수행하여 2두의 복제송아지를 생산하는데 성공하였다. 이 과정에서 개발된 연구 성과들은 전문학술지에 발표하여 동물복제연구에 많은 기여를 하였다. 그동안 여러 연구기관에 의해 연구되어 오던 소 체세포 핵이식에 의한 체세포 복제 연구가 최근 들어 돼지 등 다른 동물의 연구로 관심이 집중되면서 소외되고 있는 것이 사실이다. 이러한 점에서 볼 때 본 연구의 결과는 소의 체세포 핵이식에 의한 체세포 복제에 관한 다양한 연구를 수행하여 노하우를 축적하였으므로 추후 소 체세포 핵이식에 의한 복제동물 연구에 크게 기여할 것으로 보인다. 비록 2두의 복제송아지 생산에 그쳐 생산성이 매우 낮았지만 복제소 생산 연구에 상당한 기여를 한 것으로 판단된다. 아울러 이러한 기술들은 소의 체세포 복제에 국한되지 않고 다양한 동물의 체세포 복제연구에 유용한 정보를 제공하게 될 것으로 기대한다. 또한 체세포 복제기술을 이용한 형질전환동물 생산연구에도 기술적인 면에서 기여를 한 것으로 판단된다. 주관연구기관에서 형질전환 복제소 생산을 시도하는 과정에서 협동연구기관의 복제소 생산연구 결과를 중요한 정보로 활용하였다.

다음은 학술잡지에 발표된 논문 현황이다.

<국외 학술 잡지(SCI)>

Balasubramanian S, Dong-Sik Kim, Woo-Jin Son, Yang-Seok Choi, Sang-Yong Choe and Gyu-Jin Rho. Influence of in vitro oxygen concentrations on preimplantation embryo development, gene expression and production of Hanwoo calves following embryo transfer. **Reproduction** 2005 11 (submitted)

Sung-Lim Lee, B. Mohana kumar, Sun-A Ock, Beong-Geun Jeon, S. Balasubramanian, Sang-Yong Choe and Gyu-Jin Rho. Cellular composition and viability of bovine embryos cloned with exogene transfected cells. **Reprod Dev Anim** 2005 11 (submitted)

B. Mohana kumar, Hai-Feng Jin, Jung-Gon Kim, Hye-Jin Song, Yong-Geun Hong, S. Balasubramanian, Sang-Yong Choe and Gyu-Jin Rho. DNA methylation levels in porcine fetal fibroblasts induced by demethylating agent, 5-azacytidine. **Cell and Tissue Research** (accepted)

S. Balasubramanian and Gyu-Jin Rho. Effect of cysteamine supplementation of in vitro matured bovine oocytes on chilling sensitivity and development of embryos. **Anim Reprod Sci.** 2005 (accepted)

S. Balasubramanian and Gyu-Jhin Rho. Effect on Development of Chilling In vitro produced bovine embryos at various cleavage stages. **J Assisted Reprod Gen** 2005 (accepted)

SR Cho, SA Ock, JG Yoo, Mohana kumar B, SY Choe, GJ Rho. (2005). Apoptosis and Development of Bovine Embryos Cloned with Fetal Fibroblast. **J Assisted Reprod and Genetics.** (accepted)

SA Ock, SL Lee, DO Kwack, SY Choe, GJ Rho. (2005). Isolation and viability of presumptive round spermatids collected from bull testis by percoll density gradient. **Anim.Reprod.Sci.** Aug 25. (published in online).

SA Ock, DO Kwack, SL Lee, SR Cho, BG Jeon, SY Choe, GJ Rho. (2005). In vitro development of bovine oocytes reconstructed with round spermatids. **Theriogenology.** Sep 12 (published in online)

JS Bhak, SL Lee, SA Ock, Mohana kumar B, SY Choe, GJ Rho. (2005). Developmental speed and ploidy of embryos produced by nuclear transfer with different activation treatments in cattle. **Anim Reprod Sci.** 87. (published in online)

SL Lee, SA Ock, JG Yoo, Mohana kumar B, SY Choe, GJ Rho. (2005). Efficiency of gene transfection into donor cells for nuclear transfer of bovine embryos. **Mol Reprod Dev** June 21. (Published in online).

SR Cho, SA Ock, JG Yoo, Mohana kumar B, SY Choe, GJ Rho. (2005). Effects of confluent, roscovitine treatment and serum starvation on the cell cycle synchronization of bovine fetal fibroblasts. **Reprod Dom Anim** 40, 171-176.

YS Kim, SL Lee, SA Ock, S Balasubramanian, SY Choe, GJ Rho. (2005). Development of cloned pig embryos by nuclear transfer following different activation treatments. **Mol Reprod Dev** 70: 308-313

GJ Rho, SL Lee, YS Kim, HJ Yeo, SA Ock, S Balasubramanian, SY Choe. (2004). Intracytoplasmic sperm injection of frozen-thawed bovine oocytes and subsequent embryo development. **Mol Reprod Dev** 68:449-455.

JG Yoo, SY Choe, GJ Rho. (2003). Efficient production of cloned bovine embryos using CDC2 kinase inhibitor. **Reprod Dom Anim** 38:444-450.

SA Ock, JS Bhak, HJ Lee, SY Choe, S Balasubramanian, GJ Rho. (2003). Different activation treatments for successful development of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection (ICSI). **ZYGOTE** 11:69-76.

GJ Rho, S Kim, JG Yoo, S Balasubramanian, HJ Lee, SY Choe (2002). Microtubulin configuration and mitochondrial distribution after ultra-rapid cooling of bovine oocytes. Cryopreservation of bovine oocytes using a rapid freezing methods. **Mol Reprod Dev** 63:464-470.

SR Cho, SK Cho, SL Lee, HJ Lee, SY Choe, GJ Rho (2002). Enhanced cryosurvival of bovine blastocysts produced in vitro in serum free medium. **J Assisted Reprod and Genetics** 19(10):487-492.

Park, C.K., Hwang, I.S., Cheong, H.T., Yang, B.K. Kim, C.I. 2002. Effect of a fertilization-promoting peptide on the fertilizing ability and glycosidase activity in vitro of frozen-thawed spermatozoa in the pig. **Anim. Reprod. Sci.** 72:83-94(*SCI*)

Cheong, H.T., Park, T.M., Ikeda, K, Takahashi, Y. 2003. Cell cycle analysis of bovine cultured somatic cells by flow cytometry. **Jpn. J. Vet. Res.** 51:95-103(*SCI*)

Choi, J.Y., Lee, E.Y., Cheong, H.T., Yoon, B.K., Bae, D.S., Choi, D.S. 2004. Effects of activation timing on the fertilization rate and early embryo development in bovine rosi procedure. **J. Assisted Reprod. Gen.** 21:329-334.(*SCI*)

Choi, J.Y., Kim, C.I., Park, C.K., Yang, B.K., Cheong, H.T. 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.(*SCI*)

<국내 학술 잡지>

SY Choe, YG Hwang, SL Lee, SR Cho, SA Ock and GJ Rho. (2003). Effect of progesterone implant and follicular rupture on estrus induction and fertility in anestrous cows. *Korean J. Emb. Trans.* 18: 115-124.

CS Kim, CK Won, GH Cho, KW Cho, JS Park, GJ Rho. A case of fuse throacic vertebrae, and lumbar vertebrae, sacrum and ilium of African elephant (*Loxodonta africana*) were fused one another partially. *Korean J Vet Res.* 2002 .42(2):131-136.

JG Yoo, SR Cho, SL Lee, SA Ock, GJ Rho, DS Son, HJ Lee, SY Choe. Activation of Bovine Oocytes by Combined Treatment with Ionomycin and cdc2 Kinase Inhibitor. *Korean J. Emb. Trans.*, 2001. 16(3): 223-231.

SA Ock, DO Kwack, SR Cho, SK Cho, EH Yeao, JG Yoo, YR Lee, HJ Lee, SY Choe, GJ Rho. Development of Bovine Embryos Produced by Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI). *Korean J. Emb. Trans.*, 2002. 17(1): 13-21.

SH Choi, YS Park, SR Cho, TY Kang, SH Sin, SS Kang. GJ Rho, SY Choe. Superovulation Response and Quality of Embryos Recovered from Cattle After a Single Subcutaneous Injection of FSH Dissolved in Polyethylene Glycol. *Korean J. Emb. Trans.*, 2002. 17(1): 67-77.

SL Lee, TY Kang, JG Yoo, HJ Yeo, SN Kim, SA Ock, GJ Rho, SY Choe.. Development of parthenotes produced by various treatments in bovine. *Korean J Emb Trans.* 2001. 16:107-115.

SK Cho, GJ Rho, JG Lee, HJ Lee, SY Choe, CS Park. Effect of different culture conditions on in vitro production of bovine embryos. Korean J Emb Trans. 2000. 15:271-277.

조재원, 김정익, 박춘근, 양부근, 정희태. 2002. 세포 융합액 중의 Ca^{++} 농도가 소 체세포 핵이식란의 융합, 핵형 및 체외발육에 미치는 영향. **한국가축번식학회지** 26:33-39

Jang, H.Y., Park, K.E., Kim, C.I., Park, C.K., Cheong, H.T., Yang, B.K. 2002. Effects of aesculetin and O_2 concentrations on in vitro development of preimplantation embryos in Hanwoo (Korean native cattle). **Korean J. Anim. Reprod.** 26:61-68

황환섭, 최재관, 박동현, 김종복, 박춘근, 정희태, 김정익, 양부근. 2003. Se와 Vit. E 투여가 한우 종빈우의 번식기능과 송아지의 발육성적에 미치는 효과. **한국가축번식학회지** 27:135-142

황환섭, 전기준, 박동현, 김종복, 박춘근, 정희태, 김정익, 양부근. 2003. 임신말기에 Se과 Vit. E 투여 후 태어난 한우 송아지의 혈액성분과 Vit. E 농도의 변화. **한국가축번식학회지** 27:143-152

양윤희, 최종엽, 이상영, 박춘근, 양부근, 김정익, 정희태. 2003. 소 체세포 핵이식기술의 효율 증진에 관한 연구. **한국가축번식학회지** 27:233-240

손준규, 박정준, 박춘근, 양부근, 김정익, 정희태. 2004. Donor 세포의 종류 및 세포처리에 따른 소 체세포 핵이식란의 체외발육. **Reprod. Dev. Biol.** 28:1-6

Kwon, D.J., Park, C.K., Yang, B.K., Kim, C.I., Cheong, H.T. 2004. Culture of clonal lines in porcine fetal fibroblast cells. **Reprod. Dev. Biol.** 28:7-12

황환섭, 장현용, 김성곤, 김종택, 박춘근, 정희태, 김정익, 양부근. 2004. 한우 체외성숙, 체외수정란의 수정란이식에 관한 연구. **한국수정란이식학회지** 19:1-10

장현용, 김종택, 박춘근, 정희태, 김정익, 양부근. 2004. Nitric oxide 화합물 첨가가 소 체외 수정란의 체외발육에 미치는 효과. **Reprod. Dev. Biol.** 28:161-166.

권대진, 박선영, 박춘근, 양부근, 김정익, 정희태. 2004. Catalase와 β -mercaptoethanol이 소 태아섬유아세포 clonal lines의 배양에 미치는 영향. **한국수정란이식학회지** 19:201-208.

백진주, 박춘근, 양부근, 김정익, 정희태. 2005. Demicolcine 처리에 의한 탈핵과 수핵란 세포질의 세포주기가 소 핵이식란의 발육에 미치는 영향. **Reprod. Dev. Biol.** 29(3):175-180.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제1절 추가연구의 필요성

체세포 핵이식에 의한 소 복제기술은 많은 연구에도 불구하고 여전히 그 효율이 낮고 많은 문제점들을 내포하고 있다. 그러나 국내의 경우 체세포 핵이식에 의한 소 복제 연구는 난자수급 문제, 긴 번식기간, 수란우 수급 곤란, 농가의 협조부재 등으로 담보상태에 머물러 있고 돼지 등 다른 동물의 복제 연구로 방향을 선회하고 있어 연구의 진척이 미비하다. 본 연구의 경우도 마찬가지로 이유로 많은 어려움이 있었던 것이 사실이다. 소 체세포 핵이식에 관한 연구는 아직도 해결해야 할 과제들이 산적해 있다. 효율성이 떨어진다는 이유만으로 이 연구에 대한 지원을 줄일 경우 그동안 쌓아올린 연구 성과들이 사장될 수 밖에 없을 것이다. 이러한 문제들의 해결을 위해서는 당장의 성과를 조급하게 기대하고 그 결과가 미비하다고 지원을 축소하지 말고 오히려 정책적인 차원에서 더욱 장려하여야 한다고 본다.

그동안 정부는 체세포 복제에 의한 가축의 생산에서 나타나는 문제들을 이유로 복제관련 연구비 지원을 축소해 왔으나 문제가 있다고 연구를 하지 않으면 영원히 이러한 문제들은 해결될 수가 없다. 본 연구과제의 정한 기한 중 연구의 최종목표인 형질전환 소의 생산에 실패하였지만 기간을 좀 더 주고 연구비지원이 이루어진다면 지금까지의 연구결과를 바탕으로 목표달성이 가능할 것으로 판단된다.

제2절 타 연구에의 응용

- 형질전환 복제소의 생산을 위하여 주관연구기관과 협조하여 체세포 복제기술에 의한 형질전환 복제소의 생산을 도모한다. 핵이식 전에 체세포에 유용 유전자를 도입하게 되면, 고 효율적으로 형질전환 복제 생산이 가능하게 되므로 개발된 기술을 개발이 진행되는 시점에서 즉시 활용할 수 있다.
- 우량 한우 및 젃소를 이용해서 복제함으로써 가축개량에 활용할 수 있다. 우량 한우 및 젃소의 체세포를 회수하여 배양하고, 이를 핵이식하여 생산된 수정란을 농가에 보급함으로써 우수한 형질의 가축을 보급할 수 있다.
- 소 뿐 아니라 돼지 체세포복제연구 및 다른 동물의 체세포복제 연구에 응용할 수 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 미국 California 소재 벤처회사 Robl 박사 팀 광우병 유전자제거 복제소 생산 성공(미 발표)