

최 종
연구보고서

소 복제 수정란 생존율 및
복제소 생산율 향상을 위한 기술개발
Development technique for survival rate of
bovine cloned embryos and increase of
production cloned bovine

건 국 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “소 복제수정란 생존율 및 복제소 생산율 향상을 위한 기술개발”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 8 월 27일

주관연구기관명 : 건국대학교

총괄연구책임자 : 정병현

세부연구책임자 : 정병현

연 구 원 : 임상준

협동연구기관명 : 상지영서대학교

협동연구책임자 : 고대환

협동연구기관명 : 한경대학교

협동연구책임자 : 윤종택

요 약 문

I. 제 목

소 복제수정란 생존율 및 복제소 생산을 향상을 위한 기술개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

체세포 복제기술은 우수가축을 신속하게 증식 보급할 수 있는 최첨단의 기술로서 이 기술을 가축생산과 결부하면 가축 개량을 경이적으로 촉진하여 축산농가의 소득증대와 국가 경제의 경쟁력 향상에 크게 기여할 것으로 기대된다. 이러한 사회 경제적 중요성에도 불구하고 이 기술을 축산업 현장에 도입하기 위해서는 아직 해결하지 않으면 안되는 많은 문제점을 내포하고 있다. 따라서 이러한 문제점을 해결하지 않는 한, 이 기술을 가축생산과 직결시키는 것은 불가능하며 이 기술에 의하여 얻을 수 있는 사회경제적 이익은 기대할 수 없다. 본 연구의 필요성도 이러한 기술적, 사회경제적 측면에서 찾아볼 수 있다.

1) 기술적 측면

체세포 복제동물 생산기술의 산업화를 저해하는 기술적 장애 요인으로는 체세포 복제수정란의 안정적 생산을 보장하는 기술이 확립되어 있지 않다는 점, 체세포 복제수정란의 양부를 관별할 수 있는 객관적인 기술이 확립되어 있지 않아 이식하는 복제수정란의 장래를 예측할 수 없다는 점, 체세포 복제수정란의 생사를 정확하게 판단하거나, 이식 후에 있어서 생사를 예측할 수 있는 기술이 확립되어 있지 않다는 점, 복제 수정란의 체외, 체내에 있어서 생존율을 향상시킬 수 있는 배양기술이 확립되어 있지 않다는 점, 복제 수정란의 동결보존기술이 확립되지 않아 이 수정란의 산업적 이용에 관한 시간적 공간적 제약을 극복할 수 없다는 점, 복제수정란의 생산과 현장의 수요를 연계시킬 수 있는 체계가 확립되어 있지 않다는 점, 착상의 실패, 유산, 조산, 사산 및 난산과 출생 후 즉시 사망하거나 거대태아 생산 등 많은 문제점들에 의해 체세포 복제동물의 산자 생산은 이루어지고 있으나 체내, 체외 수정란의 이식 성적에 비하여 수태율이 매우 낮은 점

등을 들 수 있다. 다시 말해서 이상의 기술적 문제점들이 해결되지 않는 한 복제수정란을 축산업 현장에서 가축생산과 연계시키는 것은 불가능하다. 그러므로 복제수정란을 가축생산 및 개량과 연계시키기 위해서는 이상의 문제점들의 해결을 목적으로 하는 본 연구 과제의 수행이 필수적이다.

2) 경제·산업적 측면

세계화, 개방화 시대를 맞이하여 우리 축산업은 일찍이 없었던 위기에 직면하고 있다. 그것은 우리 축산업이 대외경쟁력이 지극히 취약하기 때문이다. 한편, 국민 경제수준의 향상에 수반되는 국민소득 수준의 보편적 증대는 고품질의 축산식품에 대한 수요를 증대시키고 있으나 상대적인 빈곤감에 허덕이는 축산농가는 날로 위축되어 축산 식품에 대한 수요증대를 충족시킬 수 있는 저력을 점차 상실하고 있어 국가적 사회적으로 심각한 문제를 야기시키고 있다. 이러한 문제점을 해결하는 첩경은 우리 축산업의 국제경쟁력을 강화시킬 수 있는 첨단기술을 개발하고 이를 축산농가에 보급하여 가축생산기술의 첨단화를 도모하는 것이다. 본 연구의 경제 사회적 측면에서의 중요성도 이러한 측면에서 찾아볼 수 있다.

3) 사회·문화적 측면

최근 전 세계적으로 생명공학과 그에 따른 여러 유사학문들이 각광을 받고 있다. 그러나, 이러한 세계적인 추세에 호응을 하는 것은 일부 인기 학문들 즉, 유전공학, 의학 등에 한해서 가능한 것으로 인식되어져 왔다. 만약, 이러한 우리의 시도가 성공을 거둔다면 농업분야에서도 세계첨단을 다투는 성과를 거두었다는 사회적인 쾌거를 이룰 수 있을 뿐만 아니라 우리 나라를 비롯한 농업후진국들에게 커다란 희망을 안겨 줄 수 있을 것이다. 또한, 농업을 비단 식품생산 위주의 산업에서 탈피시켜 고소득·기업형 산업으로 발전시킬 수 있다는 점에서 사회, 문화적으로 미치는 영향은 매우 클 것으로 생각된다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 소 복제 수정란 생존율 및 복제소 생산율 향상을 위하여 제 1세부과제인 ‘복제수정란의 제작과 생존율 향상’과 제 2세부과제인 ‘우량 복제수정란의 선별과

보존'과 세부과제를 수행하기 위하여 제 1협동과제인 '복제수정란의 현장이식'과 제 2협동과제인 '복제소의 생산을 향상을 위한 기술 개발'의 과제로 나누어 실시되었고, 각 세부과제별 연구개발 내용 및 범위는 다음과 같다.

제 1 세부과제 : 복제수정란의 제작과 생존율 향상

- 우수체세포 확보
 - 여러 체세포의 채취, 계대배양 및 배양조건 확립
 - 핵이식에 가능한 여러 체세포의 계대배양 범위선정

- 우수체세포 배양조건 정립
 - 체세포의 채취, 계대배양 및 배양조건 확립
 - 핵이식 가능한 체세포의 계대배양 범위선정

- 공여핵의 체세포 처리기술의 개발

- 다양한 체세포에 의한 복제수정란의 생산 조건 확립
 - 수핵란 다량확보의 조건확립
 - 체세포와 수핵란의 융합 조건확립
 - 체외성숙 시간에 따른 수란핵과 체세포와의 융합을 조사
 - 융합된 복제수정란의 난활성 조건확립
 - 체외성숙 시간에 따른 수란핵과 체세포와의 융합된 복제수정란의 난활성을 조사
 - 복제수정란의 분할율 및 발달율 조사 (단위발생란과 체외성숙란 비교)
 - 복제수정란의 배양조건 확립

- 복제수정란 생존조건정립
 - 여러 체세포 복제수정란 생산방법 조건 확립
 - 여러 체세포 생산된 복제수정란의 분할율 및 발달율 조사
 - 첨가물 첨가에 의한 복제수정란의 체외배양 조건조사
 - 체세포와 공배양에 의한 체외배양 조건조사

- 복제수정란 등급화기술개발
 - 체세포 노화에 따른 복제수정란의 발달능력 검증
 - 선별된 체세포에 의해서 생산된 복제수정란의 배반포 발달속도별 세포수 조사
 - 융성과 자성 체세포에 의해서 생산된 복제수정란의 분할율, 배발달율 및 세포수 조사
 - 선별된 우수 체세포에 의해서 생산된 복제수정란의 대량생산

제 2 세부과제 : 우량 복제수정란의 선별과 보존

- 복제수정란의 reprogramming 과정 규명
 - 복제수정란의 공여핵의 remodeling 과정 조사
 - 복제수정란의 미세소관 변화 조사
 - 복제수정란의 DNA 합성과정 조사
 - 복제수정란내의 체세포 mDNA 추적
- 복제수정란 배발생능 예측 기술 개발
 - 여러 체세포에 의해서 생산된 복제수정란의 초기배 유전자 발현 조사
 - 체세포 노화에 따른 복제수정란의 유전자 발현유무 조사
 - 융성과 자성 체세포에 의해서 생산된 복제수정란의 유전자 발현차이 조사
- 복제수정란의 동해방지를 위한 항동해제 개발
 - 유리화 동결보호제의 종류에 따른 동결보존 후 복제수정란의 생존성, 발달율 조사
 - 새로운 저장용기(Straw, Grid 및 MVC)에 따른 복제수정란의 생존성 및 배발달율 조사
 - 복제수정란의 bank system 여건조성
- 체세포 복제 상실배와 배반포의 동결
- 체세포 복제 상실배와 배반포의 융해
- 동결된 체세포 복제 상실배와 배반포의 융해후 배양조건 정립

- 체세포 복제수정란의 embryos bank system 정립
 - 체세포와 수핵란이 융합 후 다량의 동결된 복제수정란 확보
 - 유리화 동결법에 의한 다량의 복제수정란의 동결보존
 - 초자화 동결법에 의한 다량의 복제수정란의 동결보존
 - 복제수정란의 bank system 확립

제 1 협동과제 : 복제수정란의 현장이식

- 세부과제 연구 결과 확인을 위한 복제수정란 현장 이식 검증
 - 선별된 복제수정란의 이식여건 조성
 - 선별된 복제수정란과 체외수정란과 이식 성적 비교
 - 현장에서 동결된 복제수정란의 융해 후 생존성 조사
 - 복제수정란의 동결융해 후 생존성 평가에 따른 이식조건 개발 및 이식 (체외수정란과 복제수정란의 이식성적 비교)
 - 이식한 난자의 임신율 조사
- 선별된 복제수정란의 이식여건 조성
 - 여러 체세포에 의해서 생산된 복제수정란의 이식
 - 복제수정란의 체외배양 조건에 따른 현장이식전 생존율 조사
 - 동결융해된 복제수정란의 부위, 용기에 따른 이식
 - 이식한 난자의 임신율 조사
- 선별된 복제수정란과 체외수정란의 이식 성적 비교
 - 체세포 노화에 따라 생산된 복제수정란 이식
 - 복제수정란의 유리화동결법의 확립에 따른 이식
 - 이식한 난자의 임신율 조사
- 이식한 난자의 임신율 조사

제 2 협동과제 : 복제소의 생산을 향상을 위한 기술 개발

- 체세포 복제기술의 보완 및 확립방안 모색
 - 공여세포의 세포주기 조절
 - 세포의 융합 조건
 - 수정란의 활성화 조건
 - 공여 세포의 계대별 염색체 검사

- 체세포 복제 수정란의 생리학적 검사
 - 체세포 복제 수정란의 염색체 검사
 - 체세포 복제 수정란의 Apoptosis추적 검사
 - 배양방법에 따른 내부세포와 영양막세포 비교

- 수란우에서의 조기 배사멸의 시기와 발생을 조사
 - 체세포 복제 수정란 이식에 따른 수태율
 - 체세포 복제 수정란 이식후 시기별 혈액 및 내분비 조사
 - 수란우에 따른 수태율 조사
 - 배의 초기 사멸 발생 원인 분석

- 유산 발생시기와 발생을 조사

- 체세포 복제송아지 육성기 조사
 - 체세포 복제송아지 혈액화학치 검사
 - 체세포 복제송아지의 염색체 분석
 - 체세포 복제송아지의 생시체중과 이유시 체중조사
 - 체세포 복제송아지의 육성을

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 제 1 세부과제 : 복제수정란의 제작과 생존율 향상

○ 복제수정란 생산 확립

- 체외 성숙 시간이 가장 이른 18~21 시간째의 난자를 제핵 후 공여세포의 융합을 2.6 kv/cm의 전기자극을 두 번 주었을 때 가장 높은 융합율과 분할율을 보였다.
- 핵치환된 난자의 난활성에 있어서는 ionomycin과 6-DMAP을 공동 처리군한 군에서 가장 높은 분할율을 보였으며, 6-DMAP는 2 mM의 농도에 3시간 동안 처리를 한 군에서 가장 높은 분할율을 보였다.
- 핵치환된 난자의 극체 방출을 억제하기 위하여 cytochalasin B를 3시간이상 처리 한 결과 극체의 방출을 억제하였으며, 이 cytochalasin B의 난자의 처리가 복제수정란의 발달에 별다른 영향을 미치지 않았다.
- 이러한 융합조건과 난활성조건 하에서 생산된 복제수정란은 체외수정란과 단위발생란과의 분할율과 배반포로의 발달을 비교하였을 때 차이가 없었다.

○ 여러 체세포에 의한 복제수정란 생산조건 확립

- 난구세포를 배양하면 크기가 커지는데, 신선한 난구세포는 $9.46 \pm 1.66 \mu\text{m}$ 이고 체외배양한 난구세포의 크기는 $13.59 \pm 1.42 \mu\text{m}$ 였다. 그리고 냉동 해동시킨 난구세포를 이용한 핵치환은 가능하였지만, 배반포까지의 발달율은 떨어지는 것으로 관찰되었다.
- 난구세포와 공배양을 실시한 경우와 1 mM의 glutathion을 첨가한 배지에서 배양하였을 때 배반포까지의 발달률이 높아지는 효과를 보였다.
- 핵치환 후 배발달에 있어 태아세포, 난구세포, 귀 상피세포를 이용하여 핵치환된 복제수정란의 발달은 유의적인 차이를 보이지 않았다.
- 밀집 배양한 공여세포, 냉각한 공여세포와 공여세포를 동결 융해한 후 배양하는 과정없이 소의 핵치환기법에 이용하여 소 난자의 배발달율과 배반포단계에서 세포예정사를 조사한 결과, 체외에서 밀집하게 배양한 세포와 냉장처리한 세포는 발달율에서 유의적인 차이가 없었지만, 동결융해한 세포는 발달율이 낮았다. 하지만 체외에서 밀집하게 배양, 동결융해 그리고 냉장처리한 세포는 핵치환을 한 난자에서 세포예정사 비율을 높이지는 않았다.

나. 제 2 세부과제 : 우량 복제수정란의 선별과 보존

- 복제수정란 평가를 위한 형태학적 비교분석기술 개발
 - 체외 성숙시킨 소의 난자에 핵을 제거하고, 미세주입방법을 이용하여 난구세포 핵치환을 실시한 후 핵과 미세섬유 및 미세소관의 형성 및 변화를 조사한 결과, 핵치환 후 난자내 도입된 난구세포핵은 핵막파괴와 함께 난자 내 여러 요소에 노출됨으로써 premature chromosome condensation을 겪게 되는 것으로 보이며, 이후 다시 팽윤되며 잠시동안 재응축을 거친 후 전핵을 형성하고, 정상적으로 유사분열을 겪게 된다. 또한 이러한 핵의 변화에 따른 미세소관과 미세섬유의 변화도 관찰하였다. 난구세포핵의 도입 직후 핵 주위에 미세소관층이 밀집되어 있음이 관찰되었다. 전핵이 형성된 이후에는 두극의 방추사를 형성하여 정상적인 유사분열을 유도하는데, 이는 정상적인 체외수정, 난자내 정자직접주입, 난자내 정자두부주입 이후에서도 동일한 형태를 보였다. 그리고 전핵 주위로 형성되지 않는 비정상적인 형태의 미세섬유가 많이 관찰되었다. 이 연구 결과들은 소난자의 미세주입법을 이용한 핵치환 이후에 핵과 미세소관이 정상적으로 remodeling 될 수 있음을 보여주고 있다.
 - 핵치환 이후 착상 전 단계까지의 배 발달과정에서 공여세포에서 유래된 mitochondria 및 mitochondrial DNA(mtDNA)의 운명을 난구세포를 공여세포로 사용하여 공여세포의 mitochondria의 운명을 평가하기 위해 MitoTracker Green FM fluochrome 으로 염색된 난구세포를 핵이 제거된 성숙난자에 미세주입에 의해 핵치환을 실시하여 조사하였다. 그 결과 공여세포에 MitoTracker의 염색은 핵치환 이후 배 발달의 저해 효과는 나타나지 않았으며, 분할율은 69%(56/81), 배반포까지의 발달율은 6.2%(5/81)로 관찰되었다. 공여세포의 mitochondria의 핵치환 이후 세포질로 퍼져나가 분할 이후 각 할구에 무작위 적으로 분포되었다. 이 형광은 8에서 15-세포기 까지 관찰이 됐으며 이 사이의 형광을 관찰할 수 있는 난자의 수는 25%(5/20)였다. 그러나 16-세포기 이후에는 공여세포의 mitochondria를 감지할 수 없었다. 대조군으로 1-세포기에 발달 정지된 난자가 배반포가 형성되는 7일 쯤에도 형광을 나타내는 것으로 유추하면 형광의 퇴색에 의해 공여세포 mitochondria가 감지되지 못한 것이 아님을 알 수 있다.
 - 핵치환 이후의 공여세포의 mtDNA의 운명을 알아보기 위해 Allele-specific PCR(AS-PCR)방법과 직접 염기서열 분석, chromatography를 이용하여 분석한 결과, AS-PCR에 의해 공여세포의 mtDNA는 1-, 2-, 4-, 8-, 16-세포기와 상설기와 배반포까지도 유지됨을 알 수 있었으며, 직접염기서열에 위해서는 배반포

에서 hetroplasmy가 관찰되지 않았지만, AS-PCR product를 이용한 직접 염기 서열 분석을 한 결과 핵치환 유래의 배반포에서 얻어진 AS-PCR의 것파 일치하였다. 따라서 소에서의 핵치환 이후 공여세포 유래의 mtDNA는 적어도 배반포까지 유지되는 것으로 사료된다.

○ 복제수정란의 생사감별 및 등급판정

- 체외수정과 핵치환 유래 소 배반포에서 세포사멸 기전으로 알려진 apoptosis 조절 유전자로써 Bcl-2 와 Bax 유전자의 전사체 발현량을 비교 조사한 결과, 핵치환 유래 배반포에 있어 TUNEL 표식으로 확인된 비율은 체외수정된 배반포보다 유의하게 높다. 체외수정된 배반포의 Bcl-2의 발현양은 핵치환유래 배반포보다 높다. 반대로 체외수정된 배반포의 Bax 발현양은 핵치환 유래 소 배반포보다 낮았다.
- 핵치환된 소난자의 배발달 비교와 peri-implantation 단계에서 Oct4와 FGF4 유전자의 상관관계를 조사한 결과, 체외수정란의 경우 peri-implantation 단계에서는 Oct4의 발현이 증가되면서 FGF4의 발현이 비례적으로 증가되었다. 그러나 핵치환 유래된 부화 배반포에서는 Oct4의 발현이 IVF와 비교 했을때 높게 발현되는 양상을 보였으며, FGF4 또한 체외수정 유래의 부화 배반포와 outgrowth 단계보다 낮게 발현되는 비정상적인 양상을 확인하였다.

○ 복제수정란의 최적의 동결조건 확립

- 복제수정란과 체외수정란 유래 난자를 EM grid, straw와 cryo-loop를 이용하여 동결융해 후 발달율을 조사하였다. 그 결과 복제수정란이 체외수정란 유래 난자에 비교하여 현저하게 낮은 생존율을 보였으며, 단지 복제수정란은 cryo-loop에서만 생존하였다.
- 복제수정란의 동결보존을 위한 새로운 동결용기 개발을 위해서 체외수정란 유래 난자를 EM grid, straw와 paper를 이용하여 동결융해 후 발달율을 조사하였다. 그 결과 동결융해 후 paper를 동결용기로 이용하였을 경우 가장 높은 생존율을 보임으로써, 단지 난자동결을 위한 새로운 용기를 개발할 수 있었다.
- 융해후 Hsp 70의 위치와 발현량을 조사한 결과에 있어서는 동결 융해하기 전 2세포기, 8세포기 단계의 난자는 세포질 내에 Hsp 70의 발현이 분배되어 있지만, 동결융해 후는 세포질 내에 발현량이 일정한 곳에 집중되어 있음을 알 수

있었다. 그러나 배반포 단계에서는 동결 용해 후 Hsp 70의 발현이 분배되어 있음을 알 수 있었다.

다. 제 1 협동과제 : 복제수정란의 현장이식

○ 복제수정란 현장 이식 검증

- 공여세포로서 밀집 배양한 체세포, 냉각한 체세포와 공여세포를 동결 용해한 후 배양하는 과정없이 핵치환한 복제수정란 유래의 배반포를 수란우에 이식한 결과, 배양한 세포, 동결용해한 세포, 저온처리한 세포를 사용한 경우에 있어서, 각각 30일째 17, 1, 3마리에서 임신여부가 확인이 되었다. 이후의 발달에 있어서 90일 이후로 임신을 유지한 경우는 각각 6, 0, 1마리이며, 현재까지 배양된 세포를 공여세포로 이용한 경우 이후 180일째 까지 임신상태를 유지한 경우, 3마리 중 2마리는 240일경 유산 되었으며, 한마리는 태어났지만 사산이었다.

라. 제 2 협동과제 : 복제소의 생산을 향상을 위한 기술 개발

○ 전기자극의 융합조건에 따른 최소 핵이식배의 생산

- 융합조건에 따른 최소 핵이식배의 융합율 : 전압이나 전기자극 시간에 따른 융합율은 자극 시간이 길수록 낮은 경향을 보였으며, 또한 전압이 높은 경우에도 낮은 융합율을 보였다. 한편 전기자극 후 난자가 용해되는 비율은 전기자극 시간이 길수록 높았으며, 또한 높은 전압일수록 배가 용해되는 비율이 높아지는 경향을 보였다.
- 융합조건에 따른 최소 핵이식배의 발달율 : 전압이나 전기자극 시간에 따른 핵이식 배의 2세포기로의 발달율은 전기자극 시간이 낮을수록 다소 높은 경향을 보였으나 별다른 차이는 없었다. 하지만 배반포로의 발달은 2.1kV를 제외하고는 전기자극 시간이 길수록 높은 발달율을 보였다. 2.1kV의 경우에서만 짧은 전기자극 시간에서 높은 배반포기로의 발달율을 보였다.
- 융합조건에 따른 한우 핵이식배의 융합률 : 한우의 경우 전기자극 시간에 따른 융합율의 차이는 없는 것으로 나타났으나, 배의 용해율은 전기자극 시간이 긴 처리군에서 높은 것으로 나타났다.
- 융합조건에 따른 한우 핵이식배의 발달률 : 핵이식 배의 2세포기로의 발달율은

전기자극 시간이 짧은 처리군에서 다소 높은 경향을 보였으나, 배반포기로의 발달율은 두 처리군 간에 차이가 없었다.

○ 활성화 처리 후 핵이식배의 핵상 변화

- 소 태아섬유아세포를 이용한 핵이식배의 생산에서 활성화 처리 후 1시간이 경과하면서 55%의 난자에서 핵이 비대해지기 시작하였고, 이후 9시간이 경과하였을 때에는 90%의 핵이식배에서 전핵의 형성이 관찰되었다.

○ 배양체계에 따른 소 핵이식배의 발달율 비교

- 공배양에 따른 핵이식배의 발달율 : 단순배지를 사용하였을 때보다 cumulus cell 과의 공배양을 실시 하였을 경우, 2세포기로의 발달율은 단순배지 처리군에서 다소 높은 경향을 보였으나, 배반포기로의 발달은 공배양을 실시한 군에서 아주 높게 나타났으며, 또한 공배양군에서 배반포기의 세포수가 훨씬 많았다.
- 공여세포의 세포주기 동기화에 따른 핵이식배의 발달율 비교 : 세포주기 동기화에 따른 핵이식배의 발달율에서 처리군이나 비처리군에서 융합율, 2세포기로의 발달율 및 배반포기로의 발달율 모두에서 두 군간에 차이가 없었다.
- 체세포 핵이식배의 동결융해 후 생존성 : 배반포기로 발달한 핵이식배의 동결융해 후의 생존율은 단순배지에서 배양한 군에서보다 난구세포와 공배양 한 군에서 높은 생존율을 보였다.
- 동결융해한 배반포기 배의 부화율 : 동결융해 후 생존한 배반포 배의 부화율은 난구세포와 공배양 한 군이 단순배지에서 배양한 군보다 높은 부화율을 보였다.
- 동결전 배반포강의 제거가 동결보존 후 배반포 배의 생존에 미치는 영향 : 동결 직전에 인위적으로 배반포강을 제거해 준 처리군의 생존율이 비처리군에 비하여 높은 생존율을 보였다.

○ 핵이식배의 염색체 분석

- 계대배양의 회수에 따른 염색체 분석 : 10회 미만을 계대배양한 공여핵에서는 염색체 이상이 30%를 넘지 않았으나, 15회까지 계대배양한 공여핵을 사용한 핵이식배에서는 거의 절반의 난자에서 염색체 수의 이상이 확인되었다.
- 체외수정란과 핵이식배의 염색체 분석 비교 : 핵이식배에서 비정상적인 염색체 숫자를 가진 난자가 체외수정란 보다 다소 높은 경향을 보였으나 그 차이는 거의

없는 것으로 보였다.

- 핵이식배의 발달 단계에 따른 염색체 분석 : 8세포기의 핵이식배와 배반포기 핵이식배 간에 염색체 이상을 가진 난자는 두군 모두에서 10% 미만으로 차이가 없었다.

○ 공여세포의 계대수가 핵이식배의 발달에 미치는 영향

- 공여세포의 계대수에 따른 핵이식배의 발달율 : 5회 미만의 계대수를 가진 공여핵을 사용하였을 경우 2세포기로의 발달율은 6-10회까지 계대한 공여핵을 사용한 경우와 차이를 보이지 않았으나, 배반포기로의 발달은 6-10회까지 계대한 공여핵을 사용한 군에서 더 높은 발달율을 보였다.
- 공여세포의 계대수에 따른 배반포기의 세포수 비교 : 6-10회까지 계대한 공여핵을 사용한 배반포기 난자가 5회 미만의 계대수를 가진 공여핵을 사용하여 얻은 배반포기 난자보다 상당히 많은 세포수를 가지고 있음을 확인하였다.

○ 핵이식배의 apoptosis 연구

- 체외수정란과 핵이식배의 apoptosis 비교 분석 : Turnel 방법을 이용한 체외수정란과 핵이식배의 apoptosis를 비교한 결과 두군 간의 apoptosis 발생율은 차이가 없었다.

○ 소 핵이식배의 수태율

- 배양방법에 따른 수태율 비교 : 소의 난관상피세포와 함께 핵이식배를 공배양한 처리군에서 단순배지만을 사용하여 배양한 처리군 보다 높은 수태율을 보이는 경향이였다. 하지만 두 처리군 간에 큰 차이는 나타나지 않았다.
- 공여세포의 종류에 따른 수태율 비교 : 태아섬유아 세포 (fetal fibroblast cell)를 공여세포로 이용한 군에서 최초의 귀세포를 공여세포로 이용한 군보다 높은 수태율을 보였다.
- 핵이식배의 임신 후 유산 발생시기에 관한 조사 : 핵이식배를 임신한 7마리의 소에서 2마리가 90일 이전에 유산을 하였으며, 90-150일 사이에 유산한 소는 3마리였고, 150일 이후에 유산한 소는 1마리였다.
- P4 농도와 조기 배사멸 및 임신율과의 관계 : 체외수정란과 핵이식배간에 조기 배사멸의 유형이 전혀 다른 양상을 보였다. 체외수정란의 경우 P4 농도가 3 ng/

ml 이상일 때 배사멸율이 높았으나, 핵이식배의 경우는 1 ng/ml 미만일때 조기 배사멸율이 높았다.

- 임신우와 비임신우의 P4 농도 비교 : 비임신군의 경우 이식후 7일령에 P4의 농도가 2 ng/ml 이하로 나타난 반면, 임신군의 경우 P4의 농도가 2 ng/ml 이상으로 지속적으로 유지되었다.
- 임신우와 비임신우의 주기별 IGF-1 농도 비교 : 비임신우의 경우 이식일로부터 지속적으로 감소하는 경향을 보였으나, 임신우의 경우 이식일부터 감소하다가 40일령 이후 증가하는 추세를 보였다가 이후 다시 감소하는 추세를 나타내었다.

○ 복제송아지의 체중 비교

- 체외수정송아지와 복제송아지의 생시체중 비교 : 출생시의 체중을 비교하여보면 체외수정송아지와 복제송아지 사이에는 차이가 나타나지 않았다. 하지만 사산한 복제송아지의 경우에는 체외수정송아지나 복제송아지보다 다소 체중이 높은 것으로 나타났다.
- 복제송아지의 단태와 쌍태에 따른 생시체중 비교 : 쌍태의 경우, 단태와 비교하여 생시체중이 평균 10 kg 정도 낮게 태어났다.

○ 복제송아지의 혈액 분석

- 복제송아지의 일반적 혈액성분 분석 : 태어났을 당시의 혈액을 비교 분석한 결과, 복제송아지와 체외수정송아지 간에 유의한 차이를 보이지 않았으나, 사산한 복제송아지의 경우, 산자에 비하여 상대적으로 백혈구와 HCT의 수치가 매우 낮게 나타났다.
- 주기별 혈액성분 분석 : 복제송아지와 체외수정송아지의 혈액을 생시부터 생후 56까지 2주 간격으로 채취하여 성분을 분석한 결과, 두 군간에 혈액성분의 차이는 나타나지 않았다.
- 혈액내의 glucose와 insulin 농도 분석 : 복제송아지의 혈액내 glucose 농도를 일반한우송아지와 비교한 결과 전체적으로 수치가 다소 낮은 경향을 보였다. 또한 insulin의 경우 일반한우송아지에 비하여 변화의 폭이 크게 나타나는 경향을 나타내었다.

○ 체외수정란 및 핵이식 배에서 Dnmt1의 발현양상 비교

- Dnmt1은 난자의 초기성장에서 핵에 축적되지만 성숙된 난자의 세포질에 격리되며, 2-4세포기 수정란에서도 세포질에 고루 분포한다. 8세포기 수정란에서 특이하게 핵에 존재하다 배반포기에는 다시 세포질에서 Dnmt1을 관찰할 수 있다.

○ 복제송아지의 친자확인

- 공시된 3개의 시료로 13개의 microsatellites를 분석한 결과 13개의 microsatellite loci에서 모두 일치하는 유전자형을 갖는 것으로 분석되어 졌다. 이로써 대리모에서 태어난 송아지는 BFC의 체세포 핵이식에 의한 탄생된 송아지임을 확인할 수 있었다.

2. 연구개발 활용에 대한 건의

본 연구는 도출된 결과들과 개발된 신기술들을 다음과 같은 분야에서 폭넓게 활용될 것이므로 금후 학회를 비롯하여 다방면으로 공개하여 유사연구에서 이용토록 해야 한다고 본다.

- 고능력 소 복제수정란의 대량 생산 분야
- 우수 복제수정란의 선별적 이식에 의한 임신율 제고기술 분야
- 현장이식 최적 수정란 선별법 개선방안 마련
- 복제수정란의 대량공급을 위한 bank system 기술 분야
- 포유동물의 수정, 발생, 분화 및 생리기전에 관한 기초 연구분야
- 배사멸과 유산에 대한 조기진단 기술 분야
- 조기 배사멸과 embryo간의 연관성을 조사할 수 있는 연구분야
- 조기 배사멸과 유산시기를 고려하여 그 발생율을 최소화할 수 있는 기술
- 형질전환 수정란의 대량 복제생산 체계의 연구 및 산업분야
- 본 기술을 국내 여타기관 또는 산업체에 이전하여 관련 기술인력 교육자료

SUMMARY

I .Title

Development technique for survival rate of bovine cloned embryos and increase of production cloned bovine

II. Goal and significance of this research project

The somatic cell cloning technique the livestock which is excellent it is quick and multiplication it will be able to supply and this technique when most as technique of spearhead livestock production and it connects, it promotes a livestock improvement wonder and it will contribute a lot in competitive power improvement of income augmentation and national economy of the livestock raising farmhouse with the fact that. In spite of even in like this social economic importance, the hazard which introduces this technique in stock raising site it stands and it does not solve a many problem point when still and it contains. The grudge which does not solve consequently like this problem point, this technique livestock production and it is impossible to connect directly and, this by a technique the social economy profit which is the possibility of getting it will not be able to expect. There is a possibility of trying to search from the technical and social economy side where also the necessity of the research which it sees is like this.

1) Technical side

Somatic cell cloned animal technique exit the many technical obstacle factors for industrialization. Those are follow that; the technique which guarantees the stable production of the somatic cell cloned embryo is not established; the objectivity technique it will can discriminate the quality of the somatic cell reproduction fertilized egg is not established to be, it will not be able to predict

the future of cloned embryo which transfer; life and death of the somatic cell cloned embryo it is accurate and it judges, is it will can predict a life and death to after transfer and the technique is not established; the culture condition for survival improvement of cloned embryo from *in vitro* and *in vivo* is not being established; the freezing preservation technique of cloned embryo is not established not to be, it will not be able to overcome the hour space restriction regarding the industrial use of this cloned embryo; the system which is the possibility connection of making the production and an elder brother funeral demand of cloned embryo is not established; the failure of preimplantation, abortion, stillbirth, hard labor, birth of imbedding it dies immediately, and enormous offspring etc. By the many problem point back the mountain sleeping production of the somatic cell cloned animal is become accomplished internal, in transfer record of *in vitro* fertilized egg to compare and the conception ratio is low very. Otherwise when the technical problem points above are not solved, cloned embryo livestock production and connection it is impossible from stock raising site to make. It is like that cloned embryo livestock production and improvement and connection the hazard which it makes solves the problem points the above it stands and in objective the accomplishment of the research subject which sees is essential.

2) Economy and industrial side

In the world and opening time our livestock raising is confronting in the crisis where is not early. It our livestock raising extreme foreign competitive power, because is weak is. One side, the national income leveling instrument augmentation which it follows in citizen economic leveling instrument improvement it augmented the demand regarding the livestock raising foodstuffs of quality. But the livestock raising farmhouse which is poor relatively continuously is atrophied and the force it will be able to be sufficient the demand augmentation against the livestock raising foodstuffs the problem which is serious socially gradually it is losing national the mortar it makes. With the method which solves like this problem point, with development it is the spearhead of livestock production technique to supply the advanced technology it will be able to strengthen the

international competitive power of our livestock raising in the farmhouse which will reach and to make. There is a possibility of trying to search from the side where also the importance from the business community side of the research which it sees is like this.

2) Society and culture side

Recent whole world with life science with its multi the studies which are similar are receiving the attention. But responding like this world-wide tendency limited in the heredity engineering which is a part popular study and the medical back to be recognized with the fact that it is possible it came it came. If like this our effort becomes success, even from agriculture field social the possibility of accomplishing a huge result only it will be the bay it knows will be the possibility of decreasing a huge hope in the agriculture backward countries which begin our country. Also it escapes agriculture from industry of foodstuffs production putting first and it will be able to develop with a many income and an enterprise industry from point the society, the effect which goes mad culture is thought with the fact that it will grow very.

III. Contents and scope of the project

This research was performed for the development technique for survival rate of bovine cloned embryos and increase of production cloned bovine during 3 years. To accomplish the goal, the project was subdivided into four parts. The first detail subject, 2nd detail subject, 1st coordinated subject, and 2nd coordinated subject were 'Increase of survival rates and production of cloned embryo', 'Selection and conservation of superiority cloned embryo', 'Transfer of cloned embryo', and 'Development technique for increase of productive efficiency of cloned bovine', respectively. The detailed are described as follow.

A. 1st detail subject : Increase of survival rates and production of cloned

embryo

- Fine somatic cell security
 - Multi somatic cell picking, passage of generations cultivation and cultivation conditional establishment
 - Passage of generations cultivation scope selection the multi somatic cell which is possible in nuclear transfer

- Fine somatic cell cultivation conditional establishment
 - Somatic cell Picking, passage of generations cultivation and cultivation conditional establishment
 - Passage of generations cultivation scope selection of the somatic cell for nuclear transfer

- Development of somatic cell processor of donor nuclear

- Establishment of the Production conditional cloned embryo due to the various somatic cell
 - Conditional establishment of the vast recipient oocytes security
 - Fusion conditional establishment of the somatic cell and the recipient oocytes
 - Fusion ratio investigation of the recipient egg and somatic cell follows at *in vitro* maturation time
 - Establishment of the activation condition in the fused cloned embryos
 - Activation ratio investigation of the fused cloned embryos which the somatic cell and recipient oocytes following *in vitro* maturation time
 - Investigation of the cleave and development ration in cloned embryos (comparison of activated oocytes and *in vitro* matured oocytes)
 - Cultivation conditional establishment of cloned embryos

- Conditional establishment for survival of cloned embryo
 - Conditional establishment of the production method in the cloned embryos using various somatic cells

- Investigation of the cleavage and development ration in the cloned embryos which is produced using various somatic cells
 - Investigation of the *in vitro* culture condition in the cloned embryos due to an additive addition
 - The *in vitro* cultivation conditional investigation due to the coculture with somatic cell
- o Technical development of cloned embryos grade
 - Development ability verification of the cloned embryo which it follows in somatic cell aging
 - Investigation of the blastocysts cell number which is seperated by development speed that is produced cloned embryos by the select somatic cells
 - Investigation of the cleavage, developmental ratio and cell number of the cloned embryos which is produced by male and female somatic cells
 - Mass production of the cloned embryos which is produced by the select somatic cells

B. 2nd detail subject : Selection and conservation of superiority cloned embryo

- o Reprogramming process close examination of the cloned embryos
 - Remodeling process investigation of donor nuclear of cloned embryos
 - Microtubule change investigation of cloned embryos
 - DNA synthesis process investigation of cloned embryos
 - Somatic cell mDNA tracking in the cloned embryos
- o Development estimate technic of cloned embryos growth to the blastocysts
 - Investigate of gene expression in the early embryos of the cloned embryos produced by various somatic cells
 - Gene expression presence investigation of the cloned embryo which it follows

in somatic cell aging

- Gene expression difference investigation of the cloned embryos which is produced by male or female somatic cells
- Development anti frost damage for frost damage prevention of the cloned embryos
 - Survivability and advancement ratio investigation of the cloned embryos after freezing preserving which it follows in vitrification protection type
 - Survivability and embryo advancement ratio investigation of the cloned embryos which it follows in new store vessel (Straw, Grid and MVC)
 - Bank system circumstance creation of cloned embryos
- Freezing of morula and blastocysts derived from somatic cell cloned embryos
- Melting of morula and blastocysts derived from somatic cell cloned embryos
- Cultivation conditional establishment after melting of the somatic cell cloned morula and blastocysts which frozen
- Establishment embryos bank system of somatic cell cloned embryos
 - Security a vast amount of frozen cloned embryos after somatic cell and recipient oocytes are fused
 - Freezing preservation of the vast amount of cloned embryos follow to the vitrification
 - Bank system establishment of cloned embryos

C. 1st coordinated subject : Transfer of cloned embryo

- The cloned embryos field embryo transfer verification for a detail subject research result confirmation
 - Embryo transfer circumstance creation of the cloned embryo which is sorted

- Embryo transfer comparison cloned embryo with *in vitro* fertilized
 - After melting of the cloned embryo which frozen survivability investigation in the field
 - Following survivability evaluation after freezing melting of the cloned egg embryo transfer conditional development and embryo transfer (comparison embryo transfer record of the *in vitro* fertilization and cloned embryo)
 - Pregnancy ratio investigation of the embryo transferred embryo
- Embryo transfer circumstance creation of the cloned embryo which is sorted
 - Embryo transfer of the cloned embryo which is produced by the various somatic cell
 - Survival ratio investigation the before field embryo transfer which it follows *in vitro* cultivation condition of the cloned embryo
 - Embryo transfer which it follows in the region and courage of the cloned embryo which frozen and melted
 - Pregnancy ratio investigation of the embryo transferred embryo
- The comparison of cloned embryo which is sorted and the *in vitro* fertilized egg embryos transfer record
 - Cloned embryos transfer which is produced by follows in somatic cell aging
 - Embryo transfer which it follows in establishment vitrification of the cloned embryos
 - Pregnancy ratio investigation of the embryo transferred embryo
- Pregnancy ratio investigation of the embryo transferred embryo

D. 2nd coordinated subject : Development technique for increase of productive efficiency of cloned bovine

- Complement of somatic cell cloning technique and searching establishment plan
 - Cell phase control of donor cell

- Fusion condition of cell
- The activation condition of recipient oocytes
- Test chromosome of donor cell's Passage of generations

- Physiology examine of somatic cell cloned embryo
 - Chromosome examine of somatic cell cloned embryo
 - Apoptosis tracking examine of somatic cell cloned embryo
 - Comparison of the inner cell and trophectoderm cell which it's follows in cultivation method

- Investigation of the early embryo destruction time and occurrence ration in recipient cow
 - The conception ratio which it follows in somatic cell cloned embryo transfer
 - Investigation of the blood and internal secretion after somatic cell cloned embryo transfer
 - The conception ratio investigation which it follows on recipient cow
 - Initially extinction occurrence cause analysis of the embryos

- Investigation of the miscarriage occurrence time and occurrence ratio

- Investigation of the somatic cell cloned calf growth
 - Somatic cell cloned calf blood chemical inspection
 - Chromosome analysis of somatic cell cloned calf
 - Investigation of birth weight and weanling weight of the somatic cell cloned calf
 - Growth ratio of somatic cell cloned calf

IV. Results and Suggestions for Applications

1. Results

A. 1st detail subject : Increase of survival rates and production of cloned embryo

- Production of cloned embryo
 - Cloned embryos produced by enucleated oocytes 18-21 hour after *in vitro* maturation with somatic cells by electrofused by two pulse of 2.6 KV/cm were higher fusion and cleavage rates.
 - A significant in improvement of activation efficiency was observed after ionomycin followed by 2 mM 6-DMAP treatment for 3 hour which was enough time for the activation of reconstructed bovine embryos.
 - There was no formation of polar body in reconstructed oocytes after nuclear transfer both in control and CB treated groups. The effect of CB on development of bovine reconstructed embryo is negligible
 - There is no difference the development to blastocyst of cloned embryos comparison with *in vitro* fertilization embryos and parthenotes.

- Production of cloned embryos with various somatic cells
 - Dimeter of fresh and cultured cumulus cell was 9.46 ± 1.66 and 13.95 ± 1.42 μm , respectively, which showing the diameter of cumulus cells was enlarged by culture. Although frozen-thawed cumulus cells could be used as donor cell for nuclear transfer, the developmental potential of frozen-thawed cultured cell significantly depressed to the blastocyst stage compared to that of fresh cell.
 - Blastocyst formation rate was improved after culture in medium layered with cumulus cells and medium supplemented with 1 mM glutathione.
 - There is no difference in blastocyst formation rate following NT with fetal fibroblast cell, cumulus cell and ear cell.
 - This study was designed to investigate the *in vitro* developmental ability and apoptosis of bovine embryos nuclear transferred (NT) with frozen-thawed or cooled donor cells. Cultured adult bovine ear cells were used as donor cells

cultured to confluence (CC) or cooling to 4°C for 48 hrs, after confluent culture or after freezing–thawing (FT). The blastocysts rates of NT embryos derived from CC and FT cells were significantly different. However, interestingly the rate of apoptosis in NT blastocysts was not significantly different when produced by using FT cells than CC or cooled cells as donor cells. In conclusion, the use of CC and cooled cells as donor cells showed no significantly different developmental rate whereas FT cells resulted in significantly different developmental rate. CC, FT and cooled cells did not increase the apoptosis rate of NT embryos.

B. 2nd detail subject : Selection and conservation of superiority cloned embryo

- Morphological comparative analysis engineering development for valuation of cloned embryo
 - The nuclear remodeling patterns, microfilament and microtubule configurations in nuclear transfer embryos were examined after nuclear transplantation by cumulus cell. Within 1 h after the cumulus cell injection, enlarged nucleus in nuclear transfer embryos was observed and chromosomes were prematurely condensed at 2 h after injection. At 4 h after injection, pseudo–pronucleus firstly appeared. Dense microtubule network formed around the nucleus shortly after microinjection. At the pronucleus stage, the formation of microtubule network around pseudo–pronuclei was also observed. At mitosis, microtubule dynamics were similar to those obtained from normal fertilization. Once forming a pronucleus, the embryos reconstructed by nuclear transfer could induce changes in microtubules similar to those observed in IVF, ICSI and ICSHI. however, abnormal microfilament assembly was frequently observed in nuclear transfer bovine embryo. The present study examined the formation of pseudo–pronucleus, microfilament and microtubule formation around nuclei following nuclear transfer. These results indicate that the reconstructed embryos are effectively activated and have

developmental potential, and that the microtubule can be remodeled in association with donor nuclei within nuclear transferred bovine oocytes.

- The developmental potential of reconstructed embryos and the fate of donor mitochondria and mitochondrial DNA were examined during preimplantation development after nuclear transfer in cattle. To evaluate the fate of donor mitochondria, donor cells labelled with MitoTracker Green FM fluorochrome were injected into enucleated bovine MII oocytes and cultured *in vitro*. MitoTrackere labelling on donor cells did not have a detrimental effect on blastocyst formation following nuclear transfer. The cleavage rate was 69% (56/81) and blastocyst formation rate was 6.2% (5/8) at 7 days after nuclear transfer. The labelled mitochondria dispersed to the cytoplasm and became distributed between blastomeres and could be identified up to the 8 to 15 cell stage. Small patches of mitochondria were detected in some 8 to 15 cell stage embryos (5/20). However, donor mitochondria were not detected in embryos at the 16 cell stage and subsequent developmental stages. In the control group, mitochondria could be identified in arrested 1 cell embryos up to 7 days after nuclear transfer.
 - Mitochondrial DNA heteroplasmy in the nuclear transfer embryos were analysed by Allel-specific PCR (AS-PCR) and direct sequencing methods. AS-PCR analysis for detection of donor mitochondrial DNA was performed at the 1-cell, 2-cell, 4-cell, 8-cell, 16-cell, morula and blastocyst stages of embryo. The mitochondrial DNA from donor cells were detected in all of the developmental stages of nuclear transfer embryos. To confirm the mtDNA heteroplasmy in cloned embryos. AS-PCR product from nuclear transfer-derived blastocyst was analysed by DNA sequencing and DNA chromatography. These results indicates that foreign cytoplasmic genome from donor cells was not destroyed by cytoplasmic event during nuclear transfer.
- Evaluation of live or dead and decision of grade of cloned embryo
- This study was to investigate the apoptotic rates in bovine blastocyst

derived from *in vitro* fertilization (IVF) and nuclear transfer (NT). In addition, the expression levels of *Bcl-2* and *Bax* gene were investigated in the blastocyst to confirm their potential roles in the regulation of apoptosis during preimplantation embryonic development. The proportion of TUNEL positive signal in blastocyst derived from NT is significantly higher than that in blastocyst derived from IVF. *Bcl-2* expression level of blastocyst derived from IVF was higher than that of blastocyst derived from NT. However, High expression level of *Bax* was observed in blastocyst derived from NT.

- This study was carried out to investigate the developmental rates of embryo reconstructed with different cell type and to estimate correlation of transcriptional level of octamer-binding transcription factor4 (Oct4) and fibroblast growth factor4 (FGF4) gene on peri-implantation stage embryos. In peri-implantation of IVF result in a transient increased of FGF4 paralleled by an increased expression of Oct4. However, Oct4 gene was highly expressed in hatching blastocysts derived from NT compared to IVF. Also, FGF4 expression level in hatching blastocysts and outgrowth stage derived from NT was lower than that of IVF.
- Establishment of cryopreservation condition of cloned embryo
 - There were no differences in the survival rates of IVF using EM grid, cryo-loop. However, survival rates by straw were relatively lower than other containers. Only, nuclear transferred embryos survived by using cryo-loop.
 - This study was to establish an effective cryopreservation method and virus vitrification containers. However, according to their result, even if the thermal conductivity of paper is still less than grid, paper has a similar record compared with grid. The container for the vitrification plays an important part in freezing as a container for embryos, rather than it affects the survival of embryos.
 - Effects of elevated *in vitro* temperature on *in vitro* produced bovine embryos were analysed in order to determine its impact on the expression of heat

shock protein 70 (HSP70) by control and frozen-thawed after *in vitro* fertilization (IVF) or nuclear transfer (NT). Results revealed the expression of hsp 70 mRNA were higher thawed embryos than control embryos. Immunocytochemistry used to localize the hsp70 protein in embryos. Two, 8-cell embryos derived under control condition was evenly distributed in the cytoplasm but appeared as aggregates in some embryos exposed frozen-thawed. However, under control condition, blastocysts displayed aggregate signal while Hsp70 in frozen-thawed blastocysts appeared to be more uniform in distribution.

C. 1st coordinated subject : Transfer of cloned embryo

- Embryos transfer of cloned embryo
 - Bovine blastocysts derived from embryos nuclear transferred (NT) with confluent culture, frozen-thawed or cooled donor cells transferred into recipients. The pregnancy of each 17, 1, and 3 recipients became confirmation after 30 day. There is to advancement of after and the case which maintains a pregnancy with 90 day after each 6, 0, and 1 recipients. Until the case after 180 days which use the cell which is confluent cultivated cell the case which maintains a pregnancy condition, 2 middle-school 3 miscarried around 240 days, one was the stillbirth which is born but.

D. 2nd coordinated subject : Development technique for increase of productive efficiency of cloned bovine

- The production of cloned embryos produced from ear cell of brindle coated Hanwoo
 - The fusion rates of cloned embryos produced from ear cells of brindle coated Hanwoo according to stimulation conditions : The fusion rates were affected from voltage and stimulation time. Using higher voltage and longer stimulation time, it showed lower fusion rates. The increased lysis rate after

stimulation was higher in longer stimulation time and higher voltage groups, respectively.

- The development rates of cloned embryos produced from ear cells of brindles coated Hanwoo according to stimulation conditions : The cleavage rate of fused embryos increased when the stimulation time was longer, but the differences were not significant. However, the development rate of cloned embryos developed to blastocyst was increased significantly when the stimulation time was longer, except for 2.1 kV treated group. Only in 2.1 kV group, the group treated with short time showed higher development rates.
 - The fusion rates of cloned embryos produced from fetal fibroblast cells of Hanwoo according to stimulation conditions : The differences of fusion rates were not different in both stimulation time groups, however, the lysis rate was increased in longer stimulation time group.
 - The development rates of cloned embryos produced from fetal fibroblast cells of Hanwoo according to stimulation conditions : The higher cleavage rate of fused embryos showed in short stimulation time group. The development rate of cloned embryos developed to blastocyst showed no difference between two groups.
- Nuclear status of cloned embryos after activation
- 55% of the cloned embryos produced from bovine fetal fibroblast cells exchanged to enlarge and pronucleus (PN) 1hr after activation, and more than 90% of cloned embryos showed the formation of PN 9hr after activation.
- The development rate of cloned embryos according to culture systems
- The development rate of cloned embryos according to co-culture system : The cleavage rate of fused embryos was high in the group cultured with CR1aa medium, however, the developmental rate of cloned embryos developed to blastocyst was increased significantly in the group cultured with cumulus cells. The cell number of blastocyst in co-culture group was a higher than the group cultured with CR1aa medium.

- The development rate of cloned embryos according to cell cycle synchronization method : There were no differences among fusion, cleavage and developmental rates between confluent and starved cell cycle synchronization methods.
 - The survival rates of nuclear transferred blastocysts after frozen-thawing : It showed higher survival rates of frozen-thawed blastocysts in the group cultured with cumulus cells compared to the group cultured with CR1aa medium.
 - The hatching rates of nuclear transferred blastocysts after frozen-thawing : The hatching rates of the blastocyst cultured with cumulus cells were higher than the rates of the blastocyst cultured with CR1aa medium.
 - The survival rates of frozen-thawed blastocysts using assisted hatching : The survival rates of frozen-thawed blastocysts in the group induced to removal of blastocoele immediately before cryopreservation were significantly higher than the group without pretreatment.
- Chromosomal analysis of cloned embryos
- Chromosome analysis of donor fibroblast cells at different passages : The chromosomal abnormality of donor cells was increased after 15 passages compare to less than 10 passages. After 10 passages, it showed 45% of chromosomal abnormality.
 - Chromosome analysis of embryos produced by IVF or NT : The chromosomal abnormality was slightly higher in NT group than in IVF group. However, the difference was not significant.
 - Chromosome analysis of cloned embryos : There were no differences according to cell stages of cloned embryos.
- The development of cloned embryos according to different passages of donor cells
- Effects of passages of donor fibroblast cells on the development of cloned embryos : The cleavage rate of cloned embryos produced by fibroblast cells

was not different between 1-5 and 6-10 passages, and also the development rate of cloned embryos developed to blastocyst in 1-5 passages group was similar to those of 6-10 group.

- Effects of donor fibroblast cell passages on the cell number of blastocyst produced by NT : The cell number of blastocyst in 1-5 passages of donor cell group was lower than those of 6-10 passages group.

- Apoptosis of nuclear transferred embryos
 - TUNEL assay on embryos produced by IVF and NT : Apoptosis rate of cloned embryos was similar to that of embryos produced by IVF using TUNEL assay. Apoptosis rate was less than 6%.

- Pregnancy rate after transfer of cloned embryos
 - Effects of culture methods on the pregnancy : The higher pregnancy rate was obtained from the blastocyst cultured with bovine oviductal epithelial cells than the group cultured without co-culture cells. However, the difference was not significant.
 - Effects of donor cell types on the pregnancy : The pregnancy rate of the group using fetal fibroblast cells of Hanwoo as donor cells was significantly higher than those of the group using ear cells of brindle coated Hanwoo.
 - Abortion timing of cloned embryos or fetus produced by NT : Among 7 pregnant cows, 2 cows were aborted before 90 days, 3 of those were aborted between 91 to 150 days and 1 cow was aborted after 150 days.
 - Early embryonic death or pregnancy rates on the concentration of progesterone (P_4) : In IVF group, the early embryonic death was increased when the concentration of P_4 was over than 3ng/ml, however, it was increase when the concentration of P_4 was less than 1ng/ml in the early embryonic death of NT group.
 - Comparison of P_4 concentration between non-pregnant and pregnant cows : In non-pregnant group, the concentration of P_4 showed increasing pattern from embryo transfer to 28days after transfer, however, there was no

expression pattern of P₄ in pregnant group

- Comparison of a periodic IGF-1 concentration between pregnant and non-pregnant cows : The concentration of IGF-1 showed a decreasing tendency after embryo transfer and maintained lower levels in both pregnant and non-pregnant groups.
- Birth weight of cloned calf
- Comparison of birth weight between calves produced from IVF and NT : The birth weight of calves was not different between IVF and NT groups. However, the weight of calves dead at birth was higher than live birth calves.
 - Comparison of birth weight between single and twin cloned calves : The birth weight of twin group was 10kg less than that of single group.
- Blood analysis of cloned calves
- Blood compositions of calves produced from IVF and NT at birth : There were no differences between IVF and NT calves in blood compositions at birth, however, the level of WBC and HCT of cloned calves dead at birth showed lower level than those of live births.
 - Comparison of blood compositions according to time period : There were no differences between normal and cloned calves in the compositions of blood samples collected at every other week from birth to 56 days.
 - Analysis of the concentration of glucose and insulin in blood : The concentration of glucose in cloned calf group was lower than that of normal calf group. The variation of the insulin concentration in cloned calf group was bigger than that of normal calf group.
- Localization of Dnmt1 in embryos produced from IVF and NT
- In 2- to 4- cell stage embryos, Dnmt1 was expressed in cytoplasm, but at 8-cell stage, it was present only in the nucleus. By the blastocyst stage, Dnmt1 is found in the cytoplasm again.

- Microsatellite loci analysis
 - Genetic identity among the fibroblast cell and cloned calf was determined by microsatellite analysis, which also permitted the exclusion of the recipient as the genetic mother of the cloned calf. Based on these results, it showed that the donor fibroblast cells and cloned calf have an exactly same microsatellite DNA regions. It could be concluded that this is the cloned calf produced from donor fibroblast cells.

2. Proposition for Research, Developmental and Application of the Results

The results and the technologies derived from our study might be applied in the various following areas, and can be opened in public including scientific meetings and also should be followed in similar studies in the future.

- Mass production field of superiority cow cloned embryo
- The part of improve pregnancy ratio technic background due to the sort of the fine cloned egg
- Preparation of improvement program which is optimum fertilized egg sorting for embryos transfer at field
- The technical part of bank system background for the large quantity supply of the cloned egg
- The fundamental research area of regarding the fertilization, an development, a differentiation and a physiological principle of the mammalian
- The technical part of diagnosis at early stage about embryonic mortality and abortion
- The research part of investigation which is continuous with embryo and embryonic mortality at early stage
- The technical part of minimized outbreak considering the abortion times and embryonic mortality at early stage
- Research and industry part of massive clone production system of transgenic

embryo

- This technique transfer domestic other agency or industrial enterprise and about human skill training material

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	36
1. Objectives of research	36
2. Necessity of research	36
3. Range of research	38
Chapter 2. Current status of technology development	40
1. International/domestic status and the point at issue	40
2. Future prospect	42
Chapter 3. Research scopes and results	43
1. Research scope	43
2. Results	53
Chapter 4. Achievement and outward contribution	120
1. Achievement	120
2. Outward contribution	121
Chapter 5. Application plan	122
Chapter 6. References	124

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	36
제 1 절	연구개발의 목적	36
제 2 절	연구개발의 필요성	36
제 3 절	연구개발의 범위	38
제 2 장	국내외 기술개발 현황	40
제 1 절	국내·외 관련기술 현황	40
제 2 절	앞으로의 전망	42
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	43
제 1 절	연구개발 수행내용	43
제 2 절	연구결과	53
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	120
제 1 절	연구개발의 목표 달성도	120
제 2 절	대외 기여도	121
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	122
제 6 장	참고문헌	124

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발의 목적

본 연구의 목적은 크게 셋으로 나누어진다. 첫째는 체세포 복제수정란의 생존율을 높이고 장래성이 보장되는 우량 복제수정란을 선별하는 각종 기술을 개발함으로써 복제수정란 이식 성적을 경이적으로 높일 수 있는 기술적 기초를 정립이며, 둘째는 제조된 복제수정란을 체외에서 장기간 보존함으로써 복제수정란의 산업적 이용에 관한 시간적 공간적 제약을 극복함과 동시에 복제수정란에 대한 현장의 수요에 시의 적절하게 대응할 수 있는 복제수정란의 bank system을 수립하는 데에 필요한 기술적 기초를 확립하며, 셋째는 수태율 증진을 위한 이식기술 개발과 더불어 이식 후 임신 초기 배 사멸과 유산의 원인을 분석하여 이를 최소화하는 기술을 개발하여 체세포 복제 송아지 생산의 효율성을 제고시키며 체세포 복제소를 축산업현장에 보급함으로써 축산업의 경쟁력 제고와 농가소득 증대에 기여하는 것이다.

제 2 절. 연구개발의 필요성

체세포 복제기술은 우수가축을 신속하게 증식 보급할 수 있는 최첨단의 기술로서 이 기술을 가축생산과 결부하면 가축 개량을 경이적으로 촉진하여 축산농가의 소득증대와 국가 경제의 경쟁력 향상에 크게 기여할 것으로 기대된다. 이러한 사회 경제적 중요성에도 불구하고 이 기술을 축산업 현장에 도입하기 위해서는 아직 해결하지 않으면 안 될 많은 문제점을 내포하고 있다. 이러한 문제점을 해결하지 않는 한, 이 기술을 가축생산과 직결시키는 것은 불가능하며 이 기술에 의하여 얻을 수 있는 사회경제적 이익은 기대할 수 없다. 본 연구의 필요성도 이러한 기술적, 사회경제적 측면에서 찾아볼 수 있다.

1) 기술적 측면

체세포 복제동물 생산기술의 산업화를 저해하는 기술적 장애 요인으로는 체세포 복제수정란의 안정적 생산을 보장하는 기술이 확립되어 있지 않다는 점, 체세포 복제수정란의 양부를 판별할 수 있는 객관적인 기술이 확립되어 있지 않아 이식하는 복제수정란의 장래를 예측할 수 없다는 점, 체세포 복제수정란의 생사를 정확하게 판단하거나, 이식 후에 있어서 생사를 예측할 수 있는 기술이 확립되어있지 않다는 점, 복제 수정란

의 체외, 체내에 있어서 생존율을 향상시킬 수 있는 배양기술이 확립되어 있지 않다는 점, 복제 수정란의 동결보존기술이 확립되지 않아 이 수정란의 산업적 이용에 관한 시간적 공간적 제약을 극복할 수 없다는 점, 복제수정란의 생산과 형장의 수요를 연계시킬 수 있는 체계가 확립되어 있지 않다는 점, 착상의 실패, 유산, 조산, 사산 및 난산과 출생 후 즉시 사망하거나 거대태아 생산 등 많은 문제점들에 의해 체세포 복제동물의 산자 생산은 이루어지고 있으나 체내, 체외 수정란의 이식 성적에 비하여 수태율이 매우 낮은 점 등을 들 수 있다. 다시 말해서 이상의 기술적 문제점들이 해결되지 않는 한 복제수정란을 축산업 현장에서 가축생산과 연계시키는 것은 불가능하다. 그러므로 복제수정란을 가축생산 및 개량과 연계시키기 위해서는 이상의 문제점들의 해결을 목적으로 하는 본 연구 과제의 수행이 필수적이다.

2) 경제·산업적 측면

세계화, 개방화 시대를 맞이하여 우리 축산업은 일찍이 없었던 위기에 직면하고 있다. 그것은 우리 축산업이 대외경쟁력이 지극히 취약하기 때문이다. 한편, 국민 경제수준의 향상에 수반되는 국민소득 수준의 보편적 증대는 고품질의 축산식품에 대한 수요를 증대시키고 있으나 상대적인 빈곤감에 허덕이는 축산농가는 날로 위축되어 축산 식품에 대한 수요증대를 충족시킬 수 있는 저력을 점차 상실하고 있어 국가적 사회적으로 심각한 문제를 야기시키고 있다. 이러한 문제점을 해결하는 첩경은 우리 축산업의 국제경쟁력을 강화시킬 수 있는 첨단기술을 개발하고 이를 축산농가에 보급하여 가축생산기술의 첨단화를 도모하는 것이다. 본 연구의 경제 사회적 측면에서의 중요성도 이러한 측면에서 찾아볼 수 있다.

3) 사회·문화적 측면

최근 전 세계적으로 생명공학과 그에 따른 여러 유사학문들이 각광을 받고 있다. 그러나, 이러한 세계적인 추세에 호응을 하는 것은 일부 인기 학문들 즉, 유전공학, 의학 등에 한해서 가능한 것으로 인식되어져 왔다. 만약, 이러한 우리의 시도가 성공을 거둔다면 농업분야에서도 세계첨단을 다투는 성과를 거두었다는 사회적인 쾌거를 이룰 수 있을 뿐만 아니라 우리 나라를 비롯한 농업후진국들에게 커다란 희망을 안겨 줄 수 있을 것이다. 또한, 농업을 비단 식품생산 위주의 산업에서 탈피시켜 고소득·기업형 산업으로 발전시킬 수 있다는 점에서 사회, 문화적으로 미치는 영향은 매우 클 것으로 생각된다.

제 3 절. 연구개발의 범위

본 연구는 우수가축을 신속하게 증식 보급할 수 있는 체세포 복제기술을 이용하여 생산된 소 복제수정란 생존율 및 복제소 생산율 향상을 위한 기술개발을 하여 가축개량을 위한 형질전환 소를 대량생산하는 생명공학 기술을 산업적으로 개발 발전시키자 실시하였으며, 그 연구개발의 범위는 다음과 같다.

가. 복제수정란의 제작과 생존율 향상

- 1) 우수체세포 확보
- 2) 공여핵의 체세포 처리기술의 개발
- 3) 우수체세포 배양조건 정립
- 4) 다양한 체세포에 의한 복제수정란의 생산 조건 확립
- 5) 복제수정란 생존조건정립
- 6) 복제수정란 등급화기술개발

나. 우량 복제수정란의 선별과 보존

- 1) 복제수정란의 reprograming 과정 규명
- 2) 복제수정란 배발생능 예측 기술 개발
- 3) 복제수정란의 동해방지를 위한 항동해제 개발 및 복제수정란의 동결
- 4) 체세포 복제 상실배와 배반포의 동결
- 5) 체세포 복제 상실배와 배반포의 용해
- 6) 동결된 체세포 복제 상실배와 배반포의 용해후 배양조건 정립
- 7) 체세포 복제수정란의 embryos bank system 정립

다. 복제수정란의 현장이식

- 1) 세부과제 연구 결과 확인을 위한 복제수정란 현장 이식 검증
- 2) 선별된 복제수정란의 이식여건 조성
- 3) 선별된 복제수정란과 체외수정란과 이식 성적 비교
- 4) 현장에서 동결된 복제수정란의 용해 후 생존성 조사
- 5) 이식한 난자의 임신율 조사

라. 복제소의 생산율 향상을 위한 기술 개발

- 1) 체세포 복제기술의 보완 및 확립방안 모색
- 2) 체세포 복제 수정란의 생리학적 검사

- 3) 수란우에서의 조기 배사멸의 시기와 발생율 조사
- 4) 유산 발생시기와 발생율 조사
- 5) 체세포복제 송아지의 염색체 분석
- 6) 체세포복제 송아지 육성기 조사

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 국내·외 관련기술의 현황 및 문제점

가) 국외의 관련기술 현황

- 영국 Roslin 연구소는 면양의 유선 조직 상피세포를 핵치환하여 최초의 체세포 복제동물인 돌리(Wilmut 등,1997)를 개발하였고, 최근 자손들이 태어남으로써 이 체세포 복제면양이 정상적인 번식능력을 가지고 있는 것으로 입증되었다.
- 영국 PPL 사는 Roslin 연구소와 공동으로 혈액응고인자 IX 유전자를 면양 체세포에 도입한 다음 이를 핵치환하여, 체세포 복제기술로 최초의 형질전환 동물을 개발하는데 성공하였다.
- 핵이식은 지난 10년 동안의 많은 발달에도 불구하고 핵이식으로 얻어진 복제 수정란 이식으로 얻은 산자의 비율이 종에 관계없이 약 3%를 넘지 않는 정도로 효율성이 낮아 실용화를 제한하고 있다(Kuip와 den Daas, 1997).
- 문제를 해결하기 위하여 수핵란의 적절한 일령, 수핵란과 공여핵간의 세포주기 조절, 수핵란의 활성화, 공여핵의 종류, 수핵란과 공여핵과의 상호작용, 종특이성 및 기술적 문제 등에 대한 연구가 필요하다(Fulka등, 1998).
- 미국 메사츄세츠대 Cibelli 등(1998)은 외래유전자가 도입된 체세포를 핵치환하여 형질전환 젖소를 개발하였다고 보고하였다.
- 이러한 연구 성과들은 체세포 복제 기술이 형질전환 동물의 생산 효율을 높이는 데 이용될 수 있는 가능성을 한층 구체화하고 있다.
- 체세포 복제기술은 파킨슨병과 같이 태아성 조직이나 세포들을 필요로 하는 세포치료법에도 응용될 수 있음이 제안되었다 (Zawada 등, 1998).
- 일본의 긴기대학과 축산기술연구소에서는 난관상피세포 및 난구세포 유래의 복제송아지를 개발하였다고 보고하였는데 (Kato 등, 1998), 이는 다양한 체세포로부터 복제가 가능하다는 것을 제시하고 있다.
- Embryonic cell에 의해 핵치환 후 재구성 되어진 수정란을 이식하여 6마리의 양이 생산되었다고 보고하였다 (Wells DN, 1998).
- 뉴질랜드 연구팀에서는 Enderby섬에 마지막으로 살아있는 고유 계통의 젖소로부터 난소과립막세포들을 확보한 다음, 핵치환하여 10마리의 송아지를 생산하는데 성공하였다고 보고하였다 (Well 등, 1999). 이러한 결과는 체세포 복제기술이 멸종되거나 희귀동물의 계통 보존에도 유용하게 이용될 수 있다는 것을 보여주고 있다.

- 미국 Genzyme Transgenics 사에서는 형질전환 동물의 체세포를 복제하여 사람 안티트롬빈을 유증에서 대량 생산할 수 있는 형질전환 산양 개발에 성공하였다 (Baguisi 등, 1999)
- 근육세포를 핵치환 하여 재구성된 수정란이 배반포기의 세포로 발달하였고, 그 수정란을 이식하였다 (Shiga 등, 1999).
- 핵치환으로 인해 재구성된 수정란에 nocedazol 처리후 수정란은 수정란의 발달 능력과 할구분리 시간에 영향을 받는다고 보고하였다 (Tanaka 등, 1999).
- 미국 Yanagimachi 교수팀은 생쥐난구세포를 핵치환하여 복제생쥐 생산에 성공하였으며, 최근에는 수컷 생쥐의 꼬리로부터 채취한 체세포를 이용하여 복제생쥐를 개발하였다(Wakayama 와 Yanagimachi, 1999).
- 체외에서 발달된 소의 MII 단계의 난자에서 핵치환시 Ca^{++} inophore와 cytoheximide 처리 후 제 2극체를 유도하여 제핵을 하였을시, 제핵후 activation 을 가하였을때보다 제핵율이 높다고 보고하였다 (Nour 등, 1999).
- Mural granulosa cell을 사용하여 핵치환된 복제소수정란과 이들을 배양후 상실배의 할구를 다시 핵치환시킨 복제소수정란에 있어서 이식후 생존율을 알아본 결과, 재복제된 소수정란의 경우 이식후 100일째에 생존한 태아가 없음을 보고하였다 (Wells 등, 1999).
- 소 태아 생식세포를 핵치환하여 산자생산에 성공함으로써 소태아 생식세포의 핵이 성공적으로 reprogramming됨을 보여주었다 (Zakhartchenko 등, 1999).
- 성공적인 핵이식 결과는 수핵난자 세포질의 양/성숙, 제핵율, 공여핵원과 세포주기 단계, 융합율, 활성화과정, 핵이식란의 체외 배양과 같은 여러 가지 인자가 영향을 미친다(Campbell, 1999b).
- 특히 공여핵의 준비와 선발에 있어 세포주기를 휴지기로 유도하기 위한 혈청기아 배양, 세포의 크기와 종류 등 여러 요인이 관계하는 것으로 알려지고 있다 (Campbell, 1999a ; Tao 등, 1999).
- 유산, perinatal death와 large offspring syndrom(LOS)가 복제동물 생산 실패의 주요 원인이며, LOS는 genomic imprinting과 관련된 것으로 여겨지고 있다 (Young and Fair burn, 2000).
- Serum-starvation된 돼지의 형질전환된 태아섬유를 이용해 핵치환 한 후 DTT 와 thimerosol로 activation 후 생산된 배반포 난자가 형질전환 수정란임을 확인하였고, 생존 가능한 태어나 산자는 핵치환된 수정란으로부터 생산 될 수 있다고 보고하였다(Kuhholzer 등, 2000).
- Japanes Black bull의 ear skin 태아세포를 장기간 배양하여 핵치환하여 6마리의 태아를 얻었다. 이것으로 성숙된 동물의 태아세포는 복제능력을 가지고 있고 장기간 배양을 하여도 adult 체세포 공여핵의 클로닝 능력에 영향을 끼치지

못한다고 보고하였다 (Kubota 등, 2000).

- 새로운 핵치환 방법 즉, 체세포를 이용하여 핵치환된 돼지난자의 전핵을 다시 체내수정란에 핵치환함으로써 복제돼지를 생산하는데 성공하였다 (Polejaeva 등, 2000)
- 탈핵된 수핵란에 돼지태아세포의 핵을 미세주입방법으로 복제된 돼지수정란을 이식함으로써 복제돼지를 생산하는데 성공하였다 (Onishi 등, 2000).
- 체세포를 이용하여 핵치환 한후 체외배양시스템을 이용하여 복제돼지를 생산하는데 성공하였다 (Betthausser 등, 2000).

나) 국내의 관련기술 현황

- 서울대 수의과대학에서는 자궁 내막 세포와 귀조직 유래의 젖소 및 한우 체세포를 핵치환하여 복제송아지(영롱이 및 진이) 생산에 성공(1999)하였다.
- 생명공학연구소에서 유전자가 도입된 체세포를 이용하여 생산된 소 복제수정란을 이식하여 현재 다수의 임신이 보여주고 있음.
- 본 연구실에서도 유전자가 도입된 소 태아세포를 이용하여 생산된 복제수정란을 이식하여 사산된 산자를 얻은바 있으며, 또한 돼지의 난구세포와 섬유아세포를 이용하여 돼지에서 복제수정란 생산에 성공하였다 (2000).
- 그 외 축산기술연구소, 강원대학교 등 여러기관에서 복제소 생산을 진행 중에 있음.

그러나 이상의 연구보고들은 어느 것이나 실험적인 성공사례로서 본론에서 이미 기술한 바와 같이 많은 문제점들을 내포하고 있어, 이들 기술의 산업화를 위해서는 성공률을 높이면서도 안정적인 결과를 가져올 수 있는 보완적인 연구의 수행이 절실한 실정이다.

제 2 절. 앞으로의 전망

체세포의 복제에 의한 우량가축의 대량생산과 보급은 축산업의 경쟁력 제고에 크게 기여할 것이므로 이 기술의 산업화를 위한 기초 연구에 범세계적 노력이 집중될 것이며, 조만간 실용적 이용이 가능한 새로운 기술체계가 정립될 것으로 보인다. 따라서 어느 한 나라 축산업의 국제 경쟁력은 이 기술에 산업화를 위한 기초연구를 어느 나라가 먼저 완성하느냐에 따라 크게 영향을 받을 것으로 예상된다. 본 연구의 중요성과 시급성도 바로 여기에 있다고 하였다.

제 3장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 연구개발 수행내용

1. 난자의 회수 및 체외성숙 유도

체외성숙에 공시할 난자는 도축장에서 도살된 소의 난소를 회수하여 실험실로 운반한후 멸균 생리식염수로 난소의 이물질과 혈액을 세척하였다. 이 난소를 18 gauge의 주사침이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 2-6 mm 크기의 가시난포를 흡인한 후 이를 10 ml 원심분리관에 분주하고 10분간 정치시킨 후 원심분리관 하단의 침전물을 채취하여 TL-HEPES 배양액 하에서 난포란만을 회수하고, 난포란중 난구세포가 치밀하게 부착되고 난자의 세포질이 균일한 것만을 현미경 하에서 선별하여 실험에 공시하였다. 난포란의 체외성숙은 10% FBS, 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 Folltropin, 1 $\mu\text{g/ml}$ estradiol 17- β 가 첨가된 TCM-199 배양액에 침지하여 5% CO₂ 체외 배양기에서 22-24시간동안 체외성숙을 유도하였다.

2. 공핵세포의 준비

폭넓은 실험 재료의 공급을 위해 소 태아 유래, 성우 피부세포 유래 및 난자유래의 체세포를 채취하여 다음과 같이 계대배양을 실시하였다. 태아로부터 체세포를 떼어내어 0.9% 생리식염수에서 세척한 다음 PBS를 이용하여 2차례 세척하였다. 조직을 잘게 조각내어 약 1~3mm가 되도록 하여 이 조각들을 PBS에서 부유시킨 후 10% FBS, penicillin/streptomycin (100 IU/ml 100 $\mu\text{g/ml}$) 그리고 1.5 g/L sodium bicarbonate가 포함된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배양액이 담긴 60 Φ petri dish에 부착시킨 후 5% CO₂ 세포 배양기에서 배양하였다. 일주일간 primary culture가 된 세포를 dish 에서 떼어낸 후 계대배양하여 체세포 공여세포로 이용하였다.

성우 귀조직을 채취하여 HBSS로 2차례 세척하여 털과 더러운 오염물, 혈액을 watman paper를 사용하여 제거한 뒤 100% alcohol로 3분간 멸균한 뒤 HBSS로 다시 세척하였다. Collagenase sol (0.1%) w/ DNase 가 포함된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배양액이 담긴 60 Φ petri dish에서 멸균된 메스를 이용하여

잘게 분쇄하여 50 ml conical tube로 옮겼다. Shaking incubator에서 2시간 동안 배양한 뒤 15% FBS, penicillin/streptomycin (100 IU/ml 100 µg/ml) 그리고 1.5 g/L sodium bicarbonate가 포함된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배양액이 담긴 60mm petri dish에 부착시킨 후 5% CO₂ 세포 배양기에서 배양하였다. 15일간 primary culture가 된 세포를 dish 에서 떼어낸 후 계대배양을 하여 공여세포로 이용하였다.

난구세포는 난자를 0.1% hyaluronidase로 처리하여 성숙된 난자의 난구세포를 분리하여 PBS에서 부유시킨 후 1200rpm에서 2분간 원심분리를 실시한 뒤 그 펠렛을 10% FBS, penicillin/streptomycin (100 IU/ml/ 100 µg/ml) 그리고 1.5 g/L sodium bicarbonate가 포함된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배양액이 담긴 60mm petri dish에 부착시킨 후 5% CO₂ 세포 배양기에서 일주일간 primary culture 한 다음 dish 에서 떼어낸 후 계대배양을 실시, 공여세포로 이용하였다.

3. 소 난자의 핵치환

체외 성숙된 난자를 0.1%의 hyaluronidase가 포함된 PBS에서 난구세포를 제거한 후, 1% BSA가 포함된 PBS로 3회 세척하였다. 이 난자는 7.5 µg/ml의 cytochalasin B와 1% BSA가 첨가된 PBS에서 30 µm의 pipette을 이용하여 제 1극체와 그 주위의 세포질을 약 30%가량 흡입함으로써 난자내의 핵을 제거하였다. 핵이 제거된 난자는 Hoechst 33342로 염색하여 핵의 제거 여부를 확인한 후 제핵된 난자만을 0.3% BSA가 첨가된 CR1aa에서 약 1시간 동안 배양하였다. 핵치환을 위해 제핵된 난자에 계대배양한 체세포를 위관강 내에 주입하였다. 난자와 체세포의 융합은 융합 배양액 (0.3 M manitol, 0.1 mM CaCl₂ 와 0.1 mM MgSO₄) 내에서 0.5 mm platinum electrode chamber로 2.1 kV/cm, 30µsec, 2 pulse로 전기 자극으로 핵융합을 실시하였다. 세포의 융합이 이루어진 난자는 난자의 발달을 유도하기 위하여 난활성을 유도하였다.

4. 복제수정란의 난활성 및 체외배양

복제수정란의 난활성은 세포융합된 난자를 5.0 µM calcium ionophore A23187(Sigma)에 5 min 동안 처리하여 세포융합된 세포질내에 calcium 자극을 일으켜 난활성을 유도한 후 2.0 mM의 6-DMAP에서 4시간동안 처리하여 완전한 난활성을 유도하였다. 난활성이 유도된 복제수정란은 0.3% BSA가 첨가된 CR I aa의 배양액으로 48시간동안 배양시킨 후 분할이 이루어진 난자만을 선별하여 10% FBS가 첨가

된 CR I aa 에서 소 난관 상피세포와 공배양하여 5% CO₂ 배양기에서 체외발달 시켰다.

5. 세포수 산정을 위한 수정란의 염색

생산된 배반포의 핵 수를 산정하기 위해 TCM-washing배지에 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 희석된 Hoechst 33342 (Sigma, USA) 형광염색액에서 5분 동안 배양 후 형광현미경 하에서 발광하는 세포의 핵 수를 헤아려 배반포의 세포수를 산정하였다.

6. Immunolocalization 과 염색질, 미세섬유, 미세소관의 현미경검사

핵치환을 실시하기 위한 특정 시간에 이르러, 난자들은 modified Buffer M (Schatten et al., 1985; 25% (v/v) glycerol, 50 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂, 0.1 mM ethylenediamine-tetraacetic acid, 1 mM β -mercaptoethanol, 50 mM imidazol, PH 6.7, 3% Trotpm X-100, AND 25 μM phenylmethylsulfonyl fluoride) 15분 동안 permeablized 되었고 10분동안 -20°C 메탄올에 고정하였다. 그리고 0.02% sodium azide 와 0.1% BSA가 첨가된 PBS(phosphate buffered saline)에 4°C의 조건으로 2-7 일 동안 동결보존 하였다. 고정된 난자들은 PBS에서 1 : 200으로 희석된 monoclonal anti- α -tubulin antibody (sigma)가 첨가된 4-well dish(NUNC, Denmark)에 옮겨졌고, 39°C 에서 90분 동안 배양하였다. 난자들은 39°C 에서 30분동안 Blocking solution (Albertini et al, 1984; 0.1 M glycine, 1% goat serum, 0.01% Triton X-100, 1% powdered milk, 0.5% BSA, and 0.02% sodium azide)에 배양하였고, fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled anti-mouse-IgG(sigma)에 배양하였고, blocking을 실시하였다. Propidium iodide (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 는 1시간 동안 배양된 난자들의 DNA 탐지를 위해 사용되었고, 미세소관의 탐지를 위해 난자들은 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FICT-labeled phalloidin(Sigma)에 1시간 동안 배양되었다. 염색된 난자들은 0.5% BSA와 0.5% Triton X가 첨가된 PBS로 세척을 실시하였으며, retard photobleaching을 위해서 antifade mounting medium(universal mount; fisher scientific co., Pittsbrugh. PA)의 coverslip에 놓여졌다. 슬라이드는 관찰하기까지 4°C에서 보관하였다. Immunolocalized oocytes는 laser scanning confocal microscope(MRC-1024; Bio-Rad Corporation, Boston, MA)를 사용하여 관찰하였다. 이미지는 erasable magnetic optical dish에 기록, 보관되었다.

7. PCR and sequencing of mitochondrial D-loop region

첫번째 PCR은 mtDNA의 D-loop region에 사용되었다. mtDNA를 위한 PCR primers specific은 Holstein cow(Anderson et al., 1982)의 reference genotype에 기초하여 합성하였다. 본 연구에서는 mtDNA의 D-loop region sequence를 사용하였다. D-loop region sequence는 1에서 363 그리고 15792에서 16338이다. Forward primer KNCF1은 sequence 15767에서 15790에 반응하며, reverse primer KNCR2000은 sequence 365에서 388에 대해 상보적이다.

PCR은 thermo cycler(twinblock easycycler, eicomp, san Diego, ca)에서 단계별로 94°C에서 1분간 변성, 52°C에서 1분간 annealing 그리고 74°C에서 1분간 extension을 실시하였다. KNCF1 primer는 5'-gaagttctatctaaactattccct-3'이고 KNCR2000 Primer는 5'-ttgctttgggtaagctacatcaa-3'이다. Sequence analysis는 ABI 377 automated DNA sequencer를 이용하여 PCR amplified mtDNA hypervariable fragment에서 수행되었다.

8. AS-PCR and oligonucleotides

PCR 두번째 단계, AS-PCR은 주형으로 D-loop의 2 μ l first PCR mixture를 사용하였다. Allele-specific primer는 false mitochondrial allele의 가능한 증폭을 배제하기 위하여 제작되었다. 그러므로, additional mismatch가 발생하였다. PCR은 thermo cycler (Twinblock easycycler, Ericomp, san Diego, ca)에서 단계별로 94°C에서 1분간 denaturation, 44°C에서 30초간 annealing, 74°C에서 30초간 extension을 실시하였다. Reverse primer UNIVR은 5'-ttatcattatgctggtgc-3'이며 allele-specific primer Do1은 5'-agaatatactattatac-3'이다. Allele-specific primer의 design에 관한 세부사항은 Figure 13에 표시하였다. AS-PCR후에, reaction mixture 15 μ l는 ethidium bromide(0.1 μ g/ml)에 염색된 1% agarose gel에 분주하였고 0.5 X TBE buffer에서 전기영동을 실시하였다.

9. Direct PCR and AS-PCR product sequencing (DNA chromatography)

Mitochondrial genome의 D-loop region은 PCR을 사용하여 핵치환을 통해 얻은 배반포와 recipient와 donor로부터 증폭되었다. PCR amplified mtDNA fragments는 DNA chromatography와 direct DNA sequencing에 사용되었다. DNA sequencing을 위한 primer는 15855에서 15872(5'-caataactcaacacagaa-3')에 반응한다. 추가적인 PCR product sequencing은 AS-PCR의 결과를 확인하기 위하여 핵치환을 통해 얻은

배반포와 donor로부터 얻은 AS-PCR 의 sequencing을 수행하였다. 387-bp AS-PCR Product은 16142에서 16159; 5'-taccattagatcagcagc-3' primer를 사용하여 염시서열을 확인하였다. DNA chromatography와 direct PCR product DNA sequencing은 ABI 377 automated DNA sequencer (Retrogen)을 사용하여 AS-PCR amplified mtDNA fragment와 PCR을 수행하였다.

10. RNA 추출

총 RNA를 추출하기 위하여, 50 ml tissue culture flask에서 자란 세포들은 trypsin 처리하였고 TriZol(Gibco/BRL)의 1 ml이 포함된 50 ml 튜브에 옮겨졌다. Tissue tearer (Fisher Scientific, PA)와 Homogenization을 실시한 후, 상층액은 새로운 1.5 ml 튜브에 옮겨졌으며 12,000 × g에서 5분동안 원심분리를 실시하기 전에 상온에서 10분동안 배양하였다. 상층액은 0.2ml chloroform이 포함된 새로운 1.5 ml 튜브에 옮겨졌으며, 5분동안 상온에서 방치하였다. 다른 원심분리 조건 12,000 × g , 4°C에서 5분동안 실시한 후, upper phase는 0.6 ml의 sopropylalcohol이 첨가된 깨끗한 1.5ml 튜브에 옮겨졌다. 이어서, 상온에서 10분간 배양하고 혼합물은 4°C, 12,000 × g의 조건에서 10분동안 원심분리되었다. 상층액은 옮겨지고, 그 다음, 침전된 총 RNA는 70% 에탄올 1 ml으로 다시 침전시켰으며, diethylpyrocarbonate (DEPC)- treated water 20 μl에서 용해하였다. Genomic DNA에 발생할 수 있는 Contamination은 DNase I (Gibco/BRL)에 의한 처리로 제거하였다. 순도와 농도를 측정하기 위해서, A260/A280 의 비율은 Spectrophotometer(Beckmann, CA)로 측정하였다.

Embryo의 총 RNA는 다음과 같은과정에 의해 추출되었다. Blastocyst stage와 4-cell, 2-cell의 각각 10개의 embryo를 acid Tyrode solution으로 zona를 제거한 후 PBS에서 세척하였다. 그리고 embryo는 2 μl의 lysis buffer에서 0.5 ml tube에서 얼음에 꽂은채로 용해하였다 (0.5% NP40, 10Mm Tris <pH 8.0>, 10Mm NaCl, 3 Mm MgCl₂; Gilliland et a., 1990). Genomic DNA에 발생할 수 있는 Contamination은 DNase I 의 처리에 의해 제거되었다. 튜브는 cell debris와 nuclei를 제거하기 위해 2분동안 microcentrifuge를 실시하였다. 상층액은 70°C에서 2분간 가열하였고 얼음으로 재빨리 식혀주었다.

11. RT-PCR

First strand cDNA는 50 μl의 random hexamers primer와 200 μl superscript II

reverse transcriptase (Gibco/BRL), lysed embryo의 상층액과 total RNA 2 μg 으로부터 합성되었다. 역전사 후에, 용량은 조정되었다. PCR은 GeneAmp PCR system 2400 Thermal cycler (Perkin-Elmer, CT)를 사용하여 총 용량 50 μl 으로 실시하였다. 각각의 반응 물질은 2 μl cDNA solution, 50 pmol of each primer, 5 μl of 10 PCR buffer, 2 μl 5 μM dNTPs, water to 50 μl 이다. 혼합물은 Taq polymerase 1-2 units를 첨가하기 전에 94°C에서 5분동안 가열되었다. NEO gene의 증폭은 위한 40 cycles은 다음의 세가지 단계로 설명할 수 있다. 94°C에서 5분 (diassociation); 61°C에서 30초 (annealing); 그리고 72°C에서 30초(extension). EGFP gene의 amplification profile은 다음과 같은 30 cycles에 의해 수행되었다. Diassociation (94°C에서 1분), annealing (57.5°C에서 35초), 그리고 extension (72°C에서 35초). 40°C에서 30 cycle의 증폭 후 샘플은 complete strand extension을 위해서 72°C에서 5분간 유지하였다.

12. 핵이식란의 염색체 분석

핵이식란의 염색체분석을 위해 분열중인 morula 및 배반포단계인 수정란을 이용하였다. 분열중인 수정란으로부터 중기상의 유도를 위하여 상기 배양액 1 ml당 0.05 μg colcemid를 첨가하고, 동일조건으로 6-8시간 더 배양하였다. 이후 공시된 핵이식란들을 D-PBS로 씻고 0.05% protease에 1-3분 정도 정치시켜 투명대를 연화시켰다. 이어서 이들 수정란들의 세포 팽윤을 위하여 6% FBS가 함유된 1% sodium citrate 용액에 20분간 저장처리 하였다. 저장 처리된 수정란은 methanol 5 : acetic acid 1 : distilled water 4로 조성된 1차고정액으로 옮겨 4°C에서 약 20분간 고정 처리하였다. 다음 각 핵이식란들을 각각의 slide glass위에 조심스럽게 옮기고 methanol 3: acetic acid 1 로 조성된 2차 고정액으로 2-3방울 적하시킨 후 과습한 상태에서 건조시켰다. 완전히 건조시킨 slide는 다시 2차고정액으로 10분간 침지한 후 slide상에 남은 debris의 제거를 위해 methanol 4 : acetic acid 3 : distilled water 1의 3차고정액으로 1분간 재 침지시켰다. 고정 처리가 완료된 slide는 4% Giemsa용액으로 5분간 염색하고 수세한 후 자연건조시켜 광학현미경의 저배율($\times 100$)로서 중기상의 유무를 관찰하고, 다시 고배율($\times 1000$)하에서 핵형양상을 조사하였다.

13. Tunnel assay

Tunnel assay를 위해 in situ apoptosis detection kit(Takara, Japan)를 이용하였다. 체외수정 및 핵이식으로 생산된 배반포는 4°C에서 30분 동안 4%

paraformaldehyde가 희석된 PBS에서 고정되었다. PBS-Tw(PBS + 0.1% Tween20)으로 15분동안 shaker위에서 세정한 후 enzyme reaction mixture의 permeation을 위해 4°C/10분 동안 permeabilisation buffer에 놓았다. 다시 PBS-Tw(PBS + 0.1% Tween20)으로 15분동안 shaker위에서 세정한 후 labelling reaction mixture에서 90분 동안 37°C에서 배양하였다. PBS-Tw(PBS + 0.1% Tween20)으로 15분동안 shaker위에서 세정한 후 Anti-FITC HRP conjugate에서 37°C/2h동안 배양하였다. PBS-Tw(PBS + 0.1% Tween20)으로 15분 동안 shaker위에서 세정한 후, TUNEL labeled fluorescence의 비율을 평가하기 위해 전체 5 µg/ml PI로 30분 동안 전체 핵을 염색한 후 이것에 대한 양적인 비교를 하였다.

14. 난자의 핵성숙과 세포질 성숙의 확인

체외에서 성숙된 난자의 핵성숙은 Hoechst 33342염색 혹은 aceto-orcein염색을 실시하여 핵 성숙도를 조사하였다. 세포질 성숙도를 알아보기 위하여 세포질내의 Microtubule 움직임, Microfilament의 분포 및 Mitochondria의 활동 (Kimura 등, 1994)을 살펴보고자 면역 세포질 검사법 (Immunocyto-chemistry)을 사용하여 조사하였다. 즉, 난구세포가 제거된 난자를 Buffer M (Kim 등, 1995)과 냉동 metanol로 고정시킨 후, PBS용액에서 2-7일간 탈수시켰다. 탈수된 난자는 monoclonal α -tubulin 항체와 FITC가 표지된 제2차 항체로 microtubule을 관찰하며, rodamine이 표지된 phalloidin으로 microfilament를, ToTo-3으로 DNA를 염색하였다. Microtubule, microfilament, 및 DNA는 형광현미경이나 confocal 현미경으로 관찰하였다.

15. 복제수정란의 최적 동결·융해

1) Straw법

배반포기배 복제수정란의 유리화 동결은 수정란을 EFS (40% ethylene glycol, 18% ficoll, 0.3M sucrose) 혹은 EG(25% ethylene glycol, 25% glycerol, 0.5M sucrose)에 노출시킨 후 0.25 ml의 straw에 넣어 heat sealing 후 액체질소에 직접 침지하여 동결을 완료하였다. 일정시간 보관된 복제수정란은 37°C와 25°C water bath에서 융해한 후 실험 목적에 공시하였다.

2) EM-grid 법

배반포기배 복제수정란은 electron microscope grid(EM grid)와 동해제인 EFS40을

이용하여 유리화 동결하였다. 배반포기배 복제수정란은 DPBS에 20% ethylene glycol 과 10% FBS로 구성되어 있는 EG20에 1.5분간 평형시킨 후 DPBS에 40% ethylene glycol, 18% ficoll, 0.3 M sucrose, 10% FBS로 구성되어 있는 EFS40에 노출시킨 후 EM grid(GQ 400-C, 지름 3.05mm , 두께 0.037mm) 에 올리고, 곧바로 액체질소에 침지하여 동결을 완료하였다. EFS40에 노출 후 액체질소에 침지하는데 최소 20~30초가 소요되었다. 일정시간 후 동결된 배반포기배 복제수정란은 0.8 ml의 0.3M sucrose 용액에 직접 용해시킨 다음 신선한 0.8 ml의 0.3M sucrose에 재차 용해한 후 PBS 용액에 세척한 후 실험에 공시하였다. 혹은 EG(25% ethylene glycol, 25% glycerol, 0.5M sucrose)에 노출시킨 후 전자현미경 시료제작에 이용되는 copper grid mesh(GQ400-C, 3.05mm in diameter, 0.037mm thick)를 이용하여 유리화동결을 실시하였다. 일정시간 후 동결된 복제수정란은 37℃인 0.5M sucrose 용액에 직접 침지하여 용해한 후 0.25 M 와 0.125 M 농도의 sucrose 용액에 각각 1분 동안 노출시킨 후 신선한 PBS용액으로 세척한 뒤 실험에 공시하였다.

3) Paper 법

동결은 수정일로부터 8일 생산된 배반포를 CR1aa 50 μ l drop에 5-10개 배반포를 단계별로 선별한후 4-well dish에 E.G 5.5M를 1 ml을 넣어 37℃에서 30분간 데운 후 배반포를 20초간 침지하여 유리화된 배반포를 피펫을 이용해 paper에 올려놓은 후 LN₂에 침지하여 cryotube에 넣어서 컨테이너에 보관하였다.

4) cryo-loop법

Cryo-loop는 cryovial의 lid에 stainless steel pipe이 세워져 있고 nylon loop (20 μ m wide; 0.5 - 0.7 mm in diameter)로 되어 있다. 수정란을 1.0 M sucrose 가 첨가된 EG 5.5M 에서 30초 이내로 노출시킨 후 fine glass pipette을 사용하여 nylon loop 에 올려 놓은후 -196℃인 LN₂ 에 즉시 침지시켰다. 일정기간 보관된 수정란을 three step dilution을 통해 용해한후 실험 목적에 공시하였다.

16. 복제수정란의 이식 및 임신진단

복제수정란 이식은 Rowe 등(1980)의 방법에 의하여 실시하였다. 이 방법은 0.25 ml straw(I.M.V., France)에 보존용 배양액과 함께 수정란을 흡인하여 cassou gun(I.M.V., France)에 장착하여 질내 세균의 자궁내 오염을 막기 위하여 특별히 제조

된 vinyl cap을 썬 뒤 자궁경 입구에서 vinyl cap을 뒤로 당겨 제거한 후, 자궁경을 통하여 황체가 존재하는 자궁각에 수정란을 주입한다. 이때 발정발현 시간 및 수정란의 주입부위를 자궁각의 기저부와 선단을 구분하여 개체별로 기록하였다. 임신진단은 60일에 직장 검사법에 의한 태막낭 및 양막낭 촉진과 초음파 진단을 이용하여 수태 여부를 판정하였다.

17. 복제 송아지 친자 감별법

1) 공시동물 및 Genomic DNA의 추출

공여우 : KBF, BFC

수란우 : 104

체세포복제 송아지; 104자

확보된 혈액 및 세포에서 Genomic DNA 분리 추출은 MagExtractor Genome Kit (Toyobo, Japan)를 이용하였다.

2) Microsatellite markers 선정

체세포 복제생산 송아지에 대한 친자감별 여부는 국제동물유전학회(ISAG; International Society of Animal Genetics) 및 국제축산연구소에서 추천하는 개체식별용 microsatellite markers중에서 13개를 선정하여 사용하였다; ILSTS005, BM1824, TGLA122, TGLA227, TGLA126, ILSTS103, ETH10, ILSTS013, ILSTS023, ILSTS028, ILSTS006, MGTG4B, ILSTS050

3) PCR 증폭

PCR 증폭반응은 형광염색된 microsatellites의 색상과 대립유전자의 크기별 분포 등을 고려하여 주로 multiplex PCR을 수행하였고, 일부 microsatellites는 단일 marker로서 PCR을 수행하였다. GeneAmp 9700 (Applied Biosystems)에서 각 반응액의 총량을 10 μ l PCR reaction으로 하고, 약 50 ng template DNA, 20 ng each primer, 1.25 mM each of dNTP, 0.5 U of Taq DNA polymerase (Promega)과 1 μ l 10X PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 0.01% gelatin, 0.25% nonidet P40, and 20 mM MgCl₂). 95°C에서 5분간의 첫 반응을 시작으로 하여, 94°C에서 30초, microsatellite marker에 따라 53~55°C에서 1분, 72°C에서 1분으로 35회 반복 반응을 실시하고, 마지막으로 신장반응은 72°C에서 10분간 실시하여 종료하였다.

PCR이 종료된 증폭산물들은 2% agarose gel 전기영동을 실시하여 증폭여부 및 농도를 간접적으로 비교하여 유전자형 결정을 위한 실험에 공시하였다.

4) Microsatellite loci별 대립유전자들의 크기 결정

PCR 수행후, 증폭산물들을 deionized formamide, loading buffer 및 Genescan 350-TAMRA internal size standard와 잘 혼합하여, 5% polyacrylamide denaturing gel를 제조한 후, ABI PRISM 377 DNA sequencer (Applied Biosystems)를 사용하였다. Genescan analysis software (version 3.1)을 이용하여 각 PCR 단편들의 크기를 3차원 최소자승법 (third order least squares method)으로 분석하였고, Genotyper analysis software (version 2.0)를 이용하여 microsatellite loci별 대립유전자들의 정확한 크기를 결정하였다. 결정된 개체별 유전자형을 토대로 공여우, 수란우 및 생산우(송아지)간의 유전자형을 비교 분석하여 최종 체세포복제생산우의 여부를 결정하였다.

18. 통계처리

실험 결과는 Anova test에 의해 유의성을 검정하였다.

제 2 절 연구결과

1. 복제수정란의 제작과 생존율 향상 (제 1세부과제)

제 1세부 과제에서는 폭넓은 실험 재료의 공급을 위해 여러 종류의 체세포를 확보하여 핵치환을 실시하였으며, 또한 복제 수정란의 생존율을 높이는 쪽에 초점을 맞추어 연구를 수행하였다. 그 결과는 다음과 같다.

○ 복제수정란 생산 조건확립

최적의 체세포와 수핵란의 융합조건 확립을 위해 실험을 실시한 결과, 융합을 위한 전기자극의 전압은 2.2, 2.6과 3.5 kv/cm으로 한번 혹은 두번 전압을 주었을때, 2.6 kv/cm를 두 번 주었을 때의 융합율이 76.6 %로 가장 높게 나타났다 (Table 1). 또한 체외성숙 시간에 따른 수란핵과 체세포와의 융합율을 조사하기 위하여 도살된 소의 난소에서 회수된 난자의 체외 성숙시간을 각각 달리하여 핵치환을 실시한 후 융합율과 분할율을 비교하였다. 그 결과 체외 성숙 시간이 가장 이른 18~21 시간째 핵치환을 실시한 경우에서 융합율(79.1%)과 분할율(76.8%)이 가장 높은 것으로 확인되었다 (Table 2).

Table 1. Fusion rate of bovine embryo following nuclear transfer in various voltages

	Pulse of fusion	No. of oocytes	No. (%) of fused
2.2 kv/cm	one pulse	107	65 (60.7)
	two pulse	110	77 (70.0)
2.6 kv/cm	one pulse	128	80 (62.5)
	two pulse	120	92 (76.6)
3.6 kv/cm	one pulse	110	74 (67.2)
	two pulse	115	75 (65.2)

Table 2. Comparison of fusion rate following nuclear transfer in various maturation time

maturation time (hr)	No. of oocytes	No. (%) of fused	No. (%) of cleaved
18~21	120	95 (79.1)	73 (76.8)
21~24	128	93 (72.6)	63 (67.7)
24~27	118	73 (61.8)	50 (68.4)

융합된 복제수정란의 분할을 유도하기 위하여, 난활성 조건확립을 위해 cumulus cell을 donor cell로 사용하고 난활성을 ionomycin과 6-DMAP로 유도하여 비교하였다. 그 결과 융합된 난자의 난활율은 대조군(2.2%)이나 ionomycin만 처리한 군(24.4%)보다 ionomycin과 6-DMAP 처리군의 경우 분할율(75.6 %)이 높게 나타났다 (Table 3). 이러한 결과에 근거하여 난활성시 6-DMAP의 적정 농도를 확립하기 위한 실험으로 다양한 농도의 6-DMAP를 처리한 후 그 분할율을 비교하였다. 그 결과 분할율은 대조군 (19.0%), 0.5 (37.5%), 2 (78.4%), 5 (63.6%), 10 mM(44.0%)로써 2 mM의 6-DMAP을 처리하였을 경우 가장 높은 분할율을 나타내는 것으로 확인되었다 (Table 4). 또한 난활성시 2 mM의 6-DMAP의 적정 농도로 처리한 후 배양시간에 따른 그 분할율을 비교하였다. 그 결과 분할율은 대조군 (19.6%), 1 (36.5%), 3 (74.5%), 4 (77.6%), 5시간(75.5%)로써 2 mM의 6-DMAP을 3시간 처리하였을 경우 가장 높은 분할율을 나타내는 것으로 확인되었다 (Table 5).

Table 3. Effect of ionomycin and 6-DMAP on activation of reconstructed bovine embryos

Treatment	No. of nuclear transfer oocyte	No. (%) of oocytes cleaved
NT control	45	1 (2.2) ^a
Ionomycin alone	45	11 (24.4) ^b
Ionomycin/6-DMAP*	45	34 (75.6) ^c

^{a,b,c}Values with different superscript letters are significantly different (P<0.05).

Table 4. Effect of different concentrations of 6-DMAP on activation of reconstructed embryos*

Concentration (mM)	No. of oocyte nuclear transferred	No. (%) of oocytes cleaved
Control**	21	4 (19.0) ^a
0.5	24	9 (37.5) ^a
2	37	29 (78.4) ^b
5	38	24 (63.6) ^{bc}
10	25	11 (44.0) ^{bc}

*Embryos were incubated in each medium for 3 hours.

**Reconstructed embryos were treated with ionomycin alone.

^{a,b,c}Values with different superscript letters are significantly different (P<0.05).

Table 5. Effect of incubation time in medium supplemented with 6-DMAP on activation of reconstructed embryos*

Concentration (h)	No. of oocyte nuclear transferred	No. (%) of oocytes cleaved
Control**	51	10 (19.6) ^a
1	52	19 (36.5) ^a
3	51	38 (74.5) ^b
4	49	38 (77.6) ^b
5	53	40 (75.5) ^b

*Reconstructed embryos were treated with ionomycin alone.

**Oocytes were fixed at 18 h post NT, and stained with Hoechst 33342 and examined under fluorescence microscope.

^{a,b}Values with different superscript letters are significantly different (P<0.05).

극체방출에 미치는 Cytochalasin B의 효과를 실험에 보면, 핵치환배아는 활성화가 유도된 후에 CB가 포함된 배양액내에 3시간동안 배양되었다. 활성화된 배아는 핵치환 후 18시간에 고정하여 Hoechst 33342로 염색하였고 형광현미경하에서 관찰하였다. 그 결과 핵치환된 난자에서 대조군과 CB 처리군간 모두 극체형성을 관찰할 수 없었다 (Table 6). 더우기 CB는 배아의 발달에 영향을 미치는 것으로 보여지지 않는다 (Table 7). 이 결과는 소핵치환배아의 발달에 미치는 CB의 영향이 매우 적음을 암시한다.

이렇게 확립된 융합조건과 난활성의 조건을 사용하여 생산된 복제수정란의 분할율 및 발달율을 단위발생란과 체외성숙란 비교하여 조사하였다 (Table 8). 그 결과 단위 발생란의 경우 82.5와 36.3 %, 체외 수정란의 경우 84.3과 41.5 %, 핵치환 난자의 경우 74.4와 37.1 %의 차이가 없는 분할율과 발달율을 각각 나타내었다.

Table 6. Effects of cytochalasin B (CB) on the activation and *in vitro* development

Treatment	No. of oocytes examined	*No. (%) of oocytes polar body	
		extruded	not extruded
Control	57	0 (0)	57 (100)
CB	64	0 (0)	64 (100)

*Oocytes were fixed at 18 h post NT, and stained with Hoechst 33342 and examined under fluorescence microscope

The differences between two groups were not significant.

Table 7. Effects of cytochalasin B (CB) on *in vitro* development of nuclear transferred bovine embryos

Treatment	No. of oocytes examined	No. of oocytes cleaved	No. (%) of embryos develop to			
			2-4 cell	8-16 cell	Morula	Balstocyst*
Control	36	25 (69.4)	10 (27.7)	7 (19.4)	2 (5.6)	2 (5.6)
CB 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	41	28 (68.3)	12 (29.3)	9 (22.0)	2 (4.9)	2 (4.9)
CB 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	51	36 (70.6)	15 (29.4)	10 (19.6)	4 (7.8)	3 (5.9)
CB 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	40	21 (52.5)	10 (25.0)	5 (12.5)	1 (2.5)	1 (2.5)

*Blastocysts were examined at day 7.

The differences between two groups were not significant.

Table 8. *In vitro* development of nuclear -transfer embryo with ear cells

	No. of oocytes	No. (%) of fused	No. (%) of			
			2-4 cell	8-16 cell	Morula	Blastocysts
Activation	160	-	132 (82.5)	96 (72.7)	54 (40.9)	48 (36.3)
IVF	268	-	226 (84.3)	181 (80.0)	120 (53.1)	94 (41.5)
NT	260	198(72.3)	140 (74.4)	90 (64.2)	57 (40.7)	52 (37.1)

○ 여러 체세포에 의한 복제 수정란 생산 조건 확립

체세포를 이용한 핵치환의 주요한 장점중 하나는 공여세포의 풍부한 공급이다. 이 실험에서 동결 후 해동한 난구세포를 이용한 핵치환의 가능성을 측정하였다. 완만동결법은 급속동결법보다 높은 생존률을 나타내었다 (Table 9). 생존률은 동결한 난구세포를 해동한 후에 트립판 블루 추출법으로 측정하였다 (Fig. 1). 완만동결 과정(Tani 등., 2000)에서 냉각률 평균은 0°C에서-60°C까지 분당 2.1°C이고, -60°C에서 -70°C까지 0.6°C이다. 배양 후 6일후에 완만동결법에 의하여 동결되고 해동된 난구세포는 confluent 상태로 배양되었다 (Fig. 2).

배양기간 동안 난구세포의 지름은 증가하였다. 새로운 난구세포와 배양된 난구세포의 지름은 각각 9.46 ± 1.66 과 $13.59 \pm 1.42 \mu\text{m}$ 이다 (Fig. 3). 이러한 난구세포를 이용을 하여 동결-해동한 난구세포를 핵치환에 공여세포로 이용했을 때 복제난자의 배반포까지의 발달을 유의적으로 감소시켰다 (Table 10).

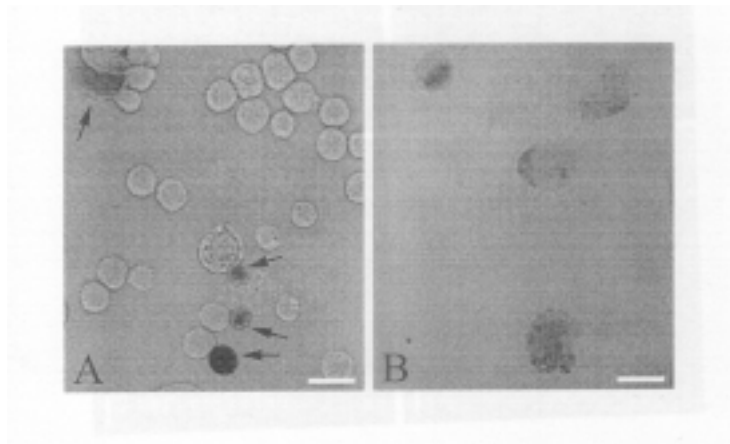


Fig. 1. Trypan blue exclusion test of frozen-thawed bovine cumulus cells. Bar= 20 μm . A. Slow freezing. Arrows indicate trypan blue positive cells. B. Rapid freezing. Most cumulus cells were dead.

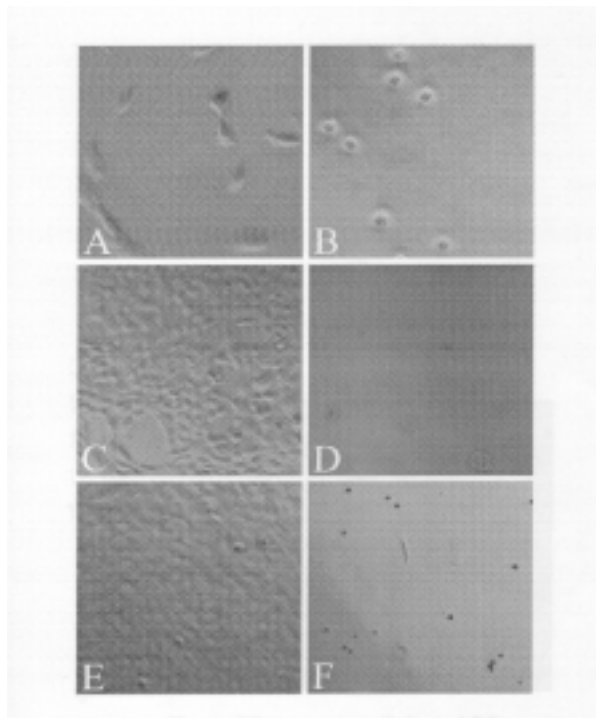


Fig. 2. Proliferation of cumulus cell after freezing-thawing (original magnification X 320). The proliferation potential was compared after slow (A, C, E) and rapid freezing (B, D, F). At day 1 (A, B), day 2 (C, D) and day 3 (E, F) after thawing-reculture.

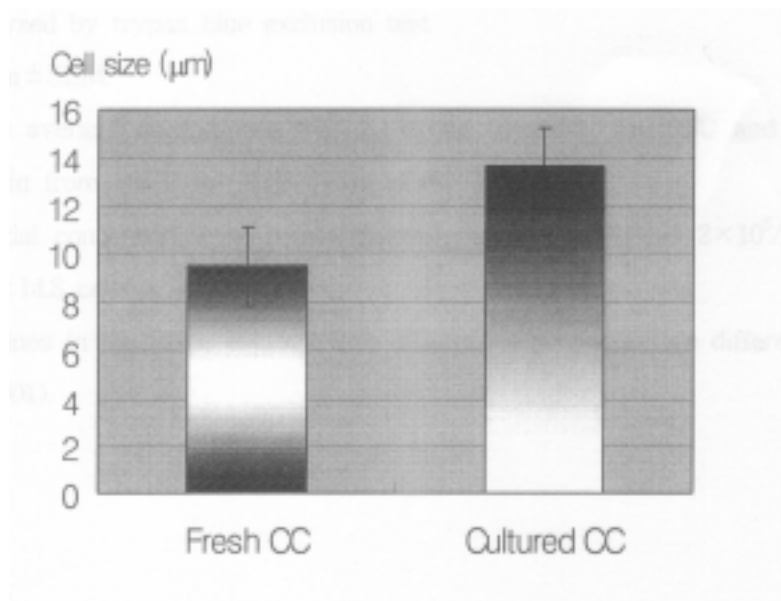


Fig. 3. Diameters of fresh and cultured bovine cumulus cells. CC, cumulus cells. Fresh CC = $9.46 \pm 1.66 \mu\text{m}$; cultured CC = $13.59 \pm 0.42 \mu\text{m}$.

Table 9. Survival and proliferation of frozen-thawed bovine cumulus cells

Freezing method	survival rate* (%)**	No. of proliferating cell after thawing**** (cells/mm ²)		
		day 1	day 3	day 6
Slow***	93.8 ± 2.5^a	62.5 ± 8.3^a	522.3 ± 93.6^a	701.3 ± 25.4^a
Rapid	35.3 ± 12.1^b	$< 1^b$	$< 1^b$	$< 1^b$

*Analyzed by trypan blue exclusion test

**Mean \pm SEM.

***The average cooling rate was $2.1^\circ\text{C}/\text{min}$ from 0°C to -60°C and $0.6^\circ\text{C}/\text{min}$ from -60°C to -70°C (Tani et al., 2000)

****Initial concentration of frozen-thawed cumulus cells was $2 \times 10^5/\text{ml}$ (52.7 ± 14.8 cells/mm²)

^{a,b}Values in the same column with different superscripts are different ($p < 0.001$).

Table 10. *In vitro* development of bovine embryos derived from nuclear transfer with frozen-thawed cumulus cell

Donor cell	No. of nuclear transfer oocyte	No. (%) of oocytes cleaved	No. (%) of oocytes develop to			
			8-cell	16-cell	Mo.	BL
Fresh CC	46	31 (67.4)	9 (29.0)	5 (16.1)	1 (3.2)	4 (12.9) ^a
Frozen-thawed CC	44	32 (72.7)	9 (28.1)	4 (12.5)	2 (6.3)	1 (3.1) ^b

CC, cumulus cell; M, morula; BL, blastocyst.

^{a,b}Values with different superscript letter are significantly different (P<0.05)

확보된 여러 체세포를 이용을 하여 각각 핵치환을 실시하고, 체외배양하여 배반포 단계까지 조사한 결과를 보면 Table 11에서 보는 바와 같다. 각각 태아세포(97개), 난구세포(121개), 귀세포(106개)의 난자를 이용해 핵치환을 실시하여 50, 49 그리고 52%의 분할율을 보였고, 각각 32.0, 32.6, 32.7%의 배반포까지의 발달률을 나타내었으며, 이 체세포의 종류에 따른 발달률에는 유의차가 나타나지 않았다.

Table 11. *In vitro* development of nuclear transferred bovine embryos by using various somatic cells

Treatment	No. of oocytes	No. (%) of		
		fused	cleaved	blastocysts
Fibroblast cell	97	72 (74.2)	50 (69.4)	16 (32.0)
Cumulus cell	121	83 (68.5)	49 (59.0)	16 (32.6)
Ear cell	106	73 (68.8)	52 (71.2)	17 (32.7)

또한 첨가물 첨가에 의한 복제 수정란의 체외 배양조건을 확립하기 위하여 다음과 같은 실험을 실시하였다. 복제 수정란은 CR1aa를 기본 배양액으로 하여 난구세포와 공배양한 것, 그리고 glutathion(GSH)을 첨가한 것의 발달율을 비교하였다. 이때 GSH

는 1 mM을 첨가하였다. 이 실험 결과 공배양한 것과 GSH를 첨가한 실험군에서 대조군보다 유의있게 높은 발달률을 나타내었다 (Table 12).

Table 12. *In vitro* development of nuclear transferred bovine embryos in various culture conditions

Treatment	No. of oocytes examined	No. of embryos cleaved	No.(%) of embryos developed to	
			Morula	Blastocyst
control	172	91 (52.9)	22 (24.2)	10 (11.0) ^a
co-culture	168	104 (61.9)	39 (37.5)	31 (29.8) ^b
GSH	154	95 (61.7)	42 (44.2)	28 (29.5) ^b

^{a, b} Values with different superscript letters are significantly different (P<0.05).

혈청 첨가가 복제 수정란의 발달율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험을 실시하였으며 (Table 13), 복제수정란에 난활성을 준 후 bovine serum albumin(BSA)나 estrus cow serum(ECS)를 첨가한 배양액에서 배양하였을 때 13.7%, 31.1%의 배반포까지 발달율을 보였으며, 총세포수에 있어서는 101.9 ± 11.8 , 121.2 ± 13.4 개로 ECS 첨가군에서 유의적으로 높은 발달율과 총세포수를 나타냈다. 이들 BSA와 ECS에서 배양한 복제수정란을 배반포 단계에서 apoptosis를 분석하였는데 (Table 14), 그 결과 apoptosis를 나타낸 배반포에서 총세포수는 100.8 ± 10.1 , 117.2 ± 11.5 이었고 apoptosis비율은 3.5 ± 1.3 , $2.6 \pm 1.5\%$ 로 ECS처리군이 총세포수가 유의적으로 많았으며 apoptosis비율은 두 처리군간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 이러한 결과로써 복제난자의 발달에 있어서 BSA의 첨가보다는 ECS의 첨가 복제난자의 발달을 향상시킴을 확인하였다.

Table 13. Comparison of developmental competence in bovine embryos after NT cultured by BSA or ECS

Treatments*	No. of oocytes Fused	No. (%) of cleaved embryos**	No. (%) of Blastocysts	No. of total cells
BSA	139	105 (75.5)	19 (13.7) ^b	101.9 ± 11.8 ^b
ECS	183	135 (73.8)	57 (31.1) ^a	121.2 ± 13.4 ^a

* Embryos treated at 3 day after NT

** Cleavage rates at 3 day after NT

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

Table 14. Comparison of apoptosis in bovine blastocysts by NT cultured by BSA or ECS

Treatment	No. of blastocysts	No. of total cell	Apoptotic cell/cell ratio
BSA	11	100.8 ± 10.1 ^b	3.5 ± 1.3 ^a
ECS	16	117.2 ± 11.5 ^a	2.6 ± 1.5 ^a

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

복제수정란 생산시 공여세포가 미치는 영향을 알고자 배양한 세포, 동결융해한 세포, 저온처리한 세포를 사용하였을 때 발달율을 조사하였다 (Table 15). 각 공여세포를 이용하였을 경우 융합율과 난할율은 유의적인 차이가 나타나지 않았지만, 8-16세포기는 44.9%, 30.7%, 44.3%였고, 배반포까지의 발달율은 29.9%, 13.7%, 29.6%로 동결융해한 세포를 사용하였을 때, 유의적으로 낮은 발달율을 나타내었다. 하지만 각각의 공여세포를 사용하여 얻은 배반포의 총세포수는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 또한 복제 수정란 생산시 배양한 세포, 동결융해한 세포, 저온처리한 세포를 사용하여 얻은 배반포에서 apoptosis를 분석하였다 (Table 16). 또한 복제수정란의 평가를 위해 apoptosis를 관찰하였다. 총세포수는 Hoechst 33342를 이용한 형광염색을 실시한 후 관찰하였고, apoptosis를 나타내는 세포는 TUNEL kit를 이용한 후, 형광현미경을 이용하여 관찰하였다 (Fig. 4). 그 결과 apoptosis가 나타난 배반포의 총세포수와 apoptosis 비율은 각각 2.8 ± 1.7 , 6.4 ± 1.9 와 $2.3 \pm 1.3\%$ 로써 처리군간에 유의적인 차

이가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 복제난자의 생산에 있어서 동결융해된 세포와 저온처리된 세포를 사용가능하다는 것을 확인할 수 있었다.

Table 15. *In vitro* development of bovine embryos after NT using CC, FT or cooled ear cells

Treatments	No. of oocytes	No. (%) of oocytes Fused	No.(%) of embryos			Mean No. of cell \pm SD
			cleaved	8-16 cell	blastocysts	
CC cells	242	167 (69.0)	115 (68.8)	75 (44.9) ^a	50 (29.9) ^a	120.9 \pm 16.7
FT cells	177	117 (66.1)	82 (70.1)	36 (30.7) ^b	16 (13.7) ^b	115.3 \pm 13.2
Cooled cells	125	88 (70.4)	61 (69.3)	39 (44.3) ^a	26 (29.6) ^a	114.5 \pm 9.2

CC : Culture to confluent, FT : Freezing-thawing,

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

Table 16. Apoptosis in bovine blastocyst by NT using CC, FT or Cooled ear cells

Treatments	No. of blastocysts	No. of total cell \pm SD	Apoptotic cell/cell ratio
CC	18	112.9 \pm 14.3	2.8 \pm 1.7
FT	8	116.5 \pm 6.6	6.4 \pm 1.9
Cooled	12	114.4 \pm 9.7	2.3 \pm 1.3

CC : Culture to confluent, FT : Freezing-thawing,

* Values with same superscripts do not differ significantly ($P > 0.05$).

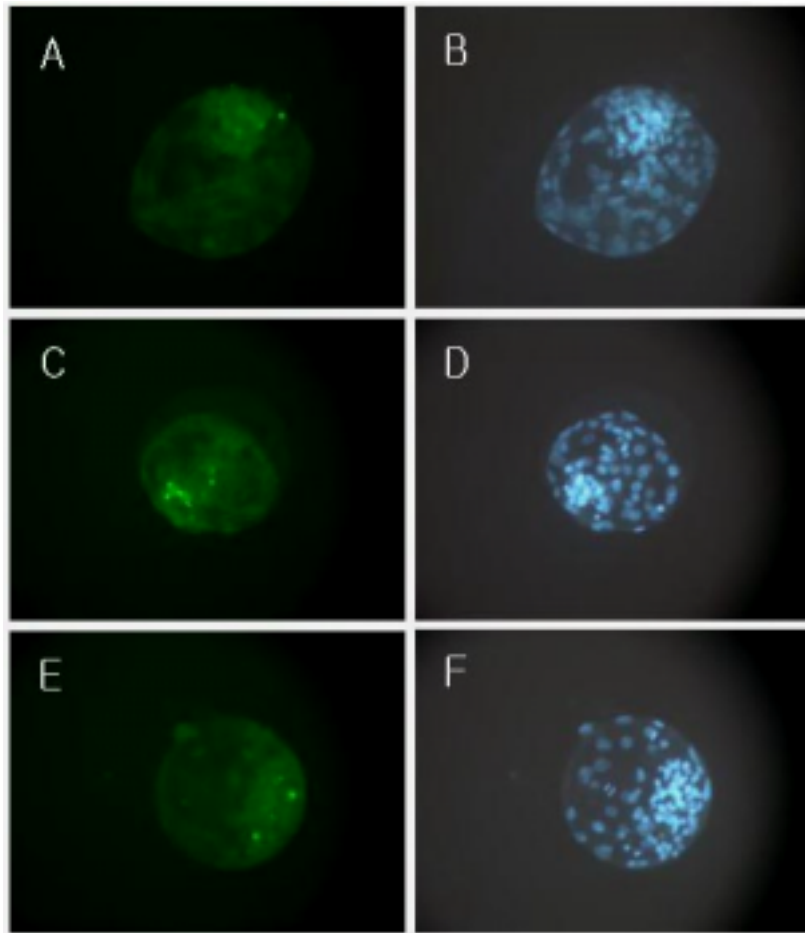


Fig. 4. TUNEL (green, A, C, E) and Hoechst 33342 (blue, B, D, F) staining for detection of apoptosis and cell nuclei of bovine NT blastocysts produced by using confluent cultured (A and B), frozen-thawed (C and D) or cooled (E and F) bovine ear cells. Magnification 200X

2. 우량 복제수정란의 선별과 보존 (제2세부과제)

○ 복제수정란 평가를 위한 형태학적 비교분석기술 개발

복제수정란 평가를 위한 형태학적 비교분석기술 개발을 위한 기초 연구로서 복제수정란의 공여핵의 remodeling 과정 및 미세소관의 변화를 조사하였다. 핵의 remodeling은 Hoechst 33342를 이용한 형광염색을 실시한 후 관찰하였고, 핵의 변화에 따른 미세소관의 움직임은 면역형광염색을 실시한 후, 공초점주사현미경을 이용하여 관찰하였다. 미세주입법으로 치환된 난구세포의 핵은 핵막파괴(nuclear envelope breakdown)와 함께 난자내 여러 요소에 노출됨으로서 premature chromosome condensation (PCC)을 거치는 것으로 관찰되었다. 이후 다시 팽윤되었으며 잠시동안의 재응축을 거친후 전핵을 형성한다음 정상적인 유사분열을 하는것으로 관찰되었다 (Fig. 1).

또한 난구세포를 미세주입하여 재구축된 소비아의 핵의 발달을 조사하였는데 (Table 1), 주입 8시간 후에 대부분의 대조군 배아가 조기 염색체응축(PCC)단계이지만, 인공적으로 활성화한 배아의 대부분은 가전핵(pseudo-PN)단계이었으며, 활성화 4시간후에 가전핵이 나타났다. 또한 ionophore/6-DMAP로 활성화 시킨 재구축배아는 가전핵의 형성을 더 쉽게 발견할 수 있었다. 이러한 경향은 핵치환 1시간과 2시간 후보다 핵치환후 4시간과 8시간에서 더 높게 나타났다.

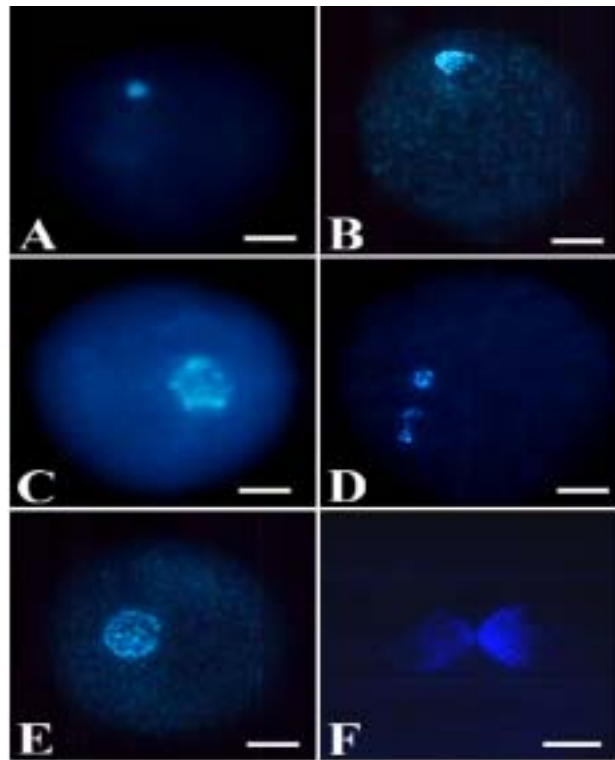


Fig. 1. Fluorescence staining of cloned bovine embryos produced by microinjection of cumulus cells. Bar = 25 μ m. A. Intact nucleus shortly after nuclear transfer. B. Nuclear envelop break down and premature chromosome condensation (1 h post-nuclear transfer). C. Swollen cumulus cell (2-4 h post-nuclear transfer). D. Recondensation of Chromosome (about 1 h after treatment of ionomycin). E. Formation of round pseudo-pronucleus (8 h post-activation). F. Some embryos form two pronuclei.

Table 1. Nuclear development of bovine embryos reconstructed by microinjection with cumulus cells

Development of reconstructed embryos	No. (%) of oocytes after			
	1 h of inj/act*	2 h of inj/act*	4 h of inj/act*	8 h of inj/act*
with intact or condensed nucleus	8 / - (80.0)	3 / - (27.3)	3 / 5 (21.4) (17.2)	1 / 2 (6.3) (5.7)
with swollen nucleus	2 / - (20.0)	7 / - (63.6)	8 / 18 (57.1) (62.1)	2 / 8 (12.5) (22.9)
with recondensed nuclei	0 / -	1 / - (9.1)	2 / 0- (14.3) (0.0)	10 / 0 (62.5) (0.0)
with pPN ^a	0 / -	0 / -	1 / 6 (7.1) (20.7)	3 / 25 (18.7) (71.4)
nuclear transferred	10 / -	11 / -	14 / 29	16 / 35

^apPN; pseudo pronucleus

*inj/act; post-injection/post-activation

핵치환된 난자의 미세소관의 변화를 조사하였는데, 난구세포핵의 도입 직후 핵 주위에 미세소관층이 형성되며 전핵이 형성되는 과정에서 역시 핵 주위에 미세소관이 밀집되어 있음이 관찰되었다. 전핵이 형성된 이후에는 두 극의 방추사를 형성하여 정상적인 유사 분열을 유도하는데, 이는 정상적인 체외수정, 난자내 정자주입, 난자내 정자 두부 주입 이후에서도 동일한 형태를 보였다. 그리고 전핵 주위로 형성되지 않는 비정상적인 형태의 미세섬유가 많이 관찰되었다 (Fig. 2). 결과적으로 이 결과들은 소 난자의 미세주입법을 이용한 핵치환 이후에 핵과 미세소관이 정상적으로 remodeling 될 수 있음을 확인하였다.

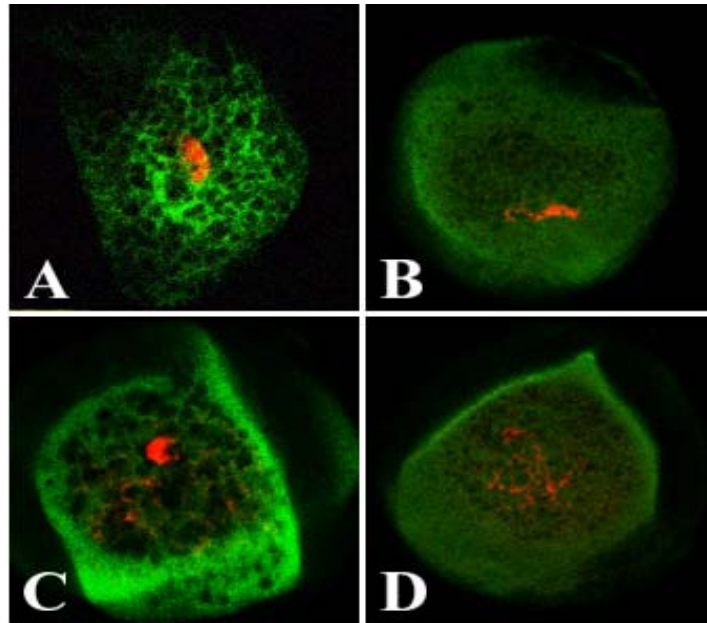


Fig. 2. Laser scanning confocal microscopic image of microfilament and chromatin in bovine oocytes following nuclear transfer by injection of cumulus cell. Green, microfilament; red, chromatin; yellow, overlapping image of microfilament and chromatin

미세섬유형성 경향은 IVF, ICSI, ICSHI와 핵치환된 소배를 우선 비교 실험하였다 (Fig. 3). 정자침입 후에 정자 성상체는 정자의 중부에서 보여졌다 (Fig. 3A). 전핵단계에서 성상체 미세소관은 전체 세포질을 채우고 (Fig. 3B), 배아는 양극에 방추사가 형성됨에 의해 유사분열을 겪었다 (Fig. 3C). ICSI후에, 미세소관 성상체는 주입된 정자 주위에 형성되었다 (Fig. 3A-i). 전핵단계에서, 난자는 미세소관으로 가득 채워졌다 (Fig. 3B-i). 그 후에 미세소관은 두극에 형성된 방추사 주위의 전핵 주위에 집중되었으며 (Fig. 3C-i), IVF와 ICSI와는 달리 ICSHI 후의 정자 두부는 미세소관상의 성상체를 형성하지 않았다 (Fig. 3A-h). 하지만 미세소관의 밀집한 망상조직은 자성전핵과 응성전핵사이에 형성(Fig. 3B-h)되었고 배아는 양극에 방추사가 형성되면서 유사분열을 하였다 (Fig. 3C-h). 이후 IVF 후에 양극의 방추사의 방향에 의해 유사분열은 완료되었다 (Fig. 3D-F). 이러한 양극 방추사에 의한 유사분열은 ICSI와 ICSHI에서 똑같이 관찰되었다.

또한 IVF, ICSI, ICSHI 배아의 미세소관 형성 경향을 핵치환배아와 비교하였다. Fig. 4은 난구세포를 주입하여 핵치환을 실시하였을 때 핵과 결합된 다양한 미세소관 형성 경향을 보여주었다. 밀집한 미세소관 망상조직은 미세주입후 즉시 핵 주위에 형성되었다 (Fig. 4A). PCC의 경우에, 최근에 논의된 바에 따르면, 미세소관은 응축된 염색체를 응집시키지 않으며 (Fig. 4D), 전핵단계에서 미세소관 망상조직은 가전핵 주위에서 똑같이 관찰되었다 (Fig. 4G와 I). 핵치환하여 재구축된 소 난자의 유사분열동안 미세소관 형성은 정상 IVF에서 관찰되어진 것과 비슷하였다 (Fig. 4J-L). 비정상적인 미세소관 형성 경향은 작은 전핵, 1개의 전핵 (Fig. 4E와 F), 2개의 전핵 (Fig. 4H) 단계로 묘사할 수 있다 (Fig. 4D). 한번 전핵이 형성된 후, IVF, ICSI, ICSHI에서 관찰된 것과 비슷한 양극 방추사와 관련된 유사분열이 재구축된 배아에서 유도되었다 (Fig. 4I-L). 미세소관의 배치는 핵치환 4시간과 20시간 후에 정상적인 미세소관 응집 비율을 측정하여 실험하였다 (Table 2). 핵치환 4시간 후에 핵치환배아의 63.6%가 주입된 난구세포가 작은 크기로 남아있었고, 약 25%의 배아는 작은 전핵주위에 미세소관 망상조직이 형성되었다. 핵치환 20시간 후에 그대로이거나 응축된 공여핵 주위에 미세소관 망상조직이 형성되었다. 재구축된 배아의 34%(21/59)가 적절히 활성화되지 않았고, 발달중지된 배아들의 핵 주위의 미세소관 망상조직은 붕괴되었다. 2개의 전핵을 가진 배아의 많은 비율이 전핵 주위에 미세소관 망상조직을 형성되었다. 하지만, 핵치환 얼마 후에 비정상적인 미세소관 배치를 한 배아의 많은 비율은 완전한 활성화를 유도과 정상적인 미세소관 구축을 하기가 어렵다.

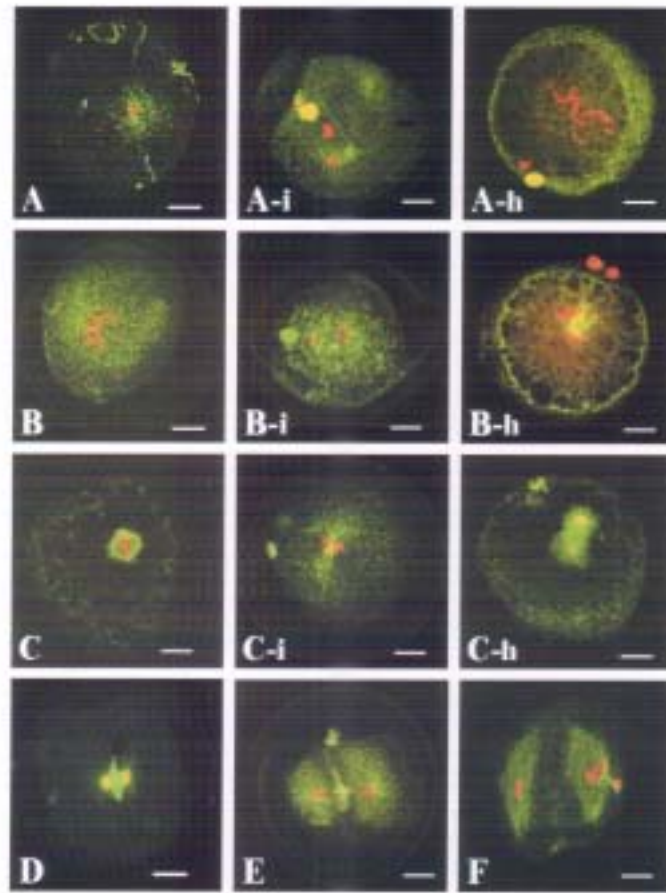


Fig. 3. Laser scanning confocal microscopic image of microtubules and chromatin in bovine oocytes following IVF, ICSI and ICSHI. Green, microtubules; red, chromatin; yellow, overlapping image of microtubule and chromatin ; f, female chromatin; t, sperm tail. Bar=25 μ m. A. Sperm aster formed from the midpiece of inseminated sperm. B. Astral microtubules dispersed to fill the cytoplasm at apposition stage. C. Mitotic metaphase stage. A-i. Sperm aster was formed around the injection sperm. B-i. Male and female pronuclei apposition. C-i. Bipolar spindle initiation. A-h. Sperm aster was not formed around the sperm head. B-h. Microtubules organized between male and female pronuclei. C-h. Anaphase stage following sperm head injection. D. Anaphase stage. E. Telophase. F. 2-cell stage embryo.

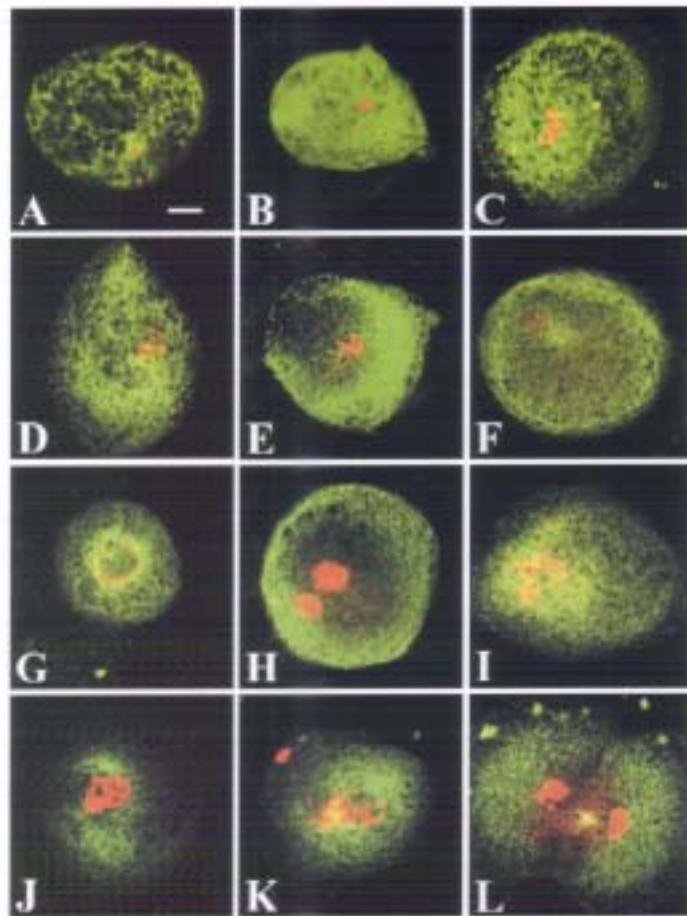


Fig. 4. Laser scanning confocal microscopic image of microtubules and chromatin in bovine oocytes following nuclear transfer by injection of cumulus cell. Green, microtubule; red, chromatin; yellow, overlapping image of microtubule and chromatin. Bar = $25\mu\text{m}$ (A-L). A. microtubule network concentrated to intact cumulus cell shortly after nuclear transfer. B. Microtubules are not nucleated to intact cumulus cell in some abnormal nuclear transfer embryos. C. Microtubules are nucleated around swollen cumulus cell. D. Premature chromosome condensation did not nucleate microtubules around chromosome. E. some nuclear transfer embryos failed to nucleate microtubules around pseudo-PN. F. Microtubules could be nucleated apart from pseudo-PN. G. Dense microtubules were nucleated around

enlarged pseudo-PN. H. nuclear transfer embryos forming two pseudo-PN did not nucleated microtubules in some cases. I. nuclear transfer embryos could nucleated microtubules around two pseudo-PN. J . Bipolar spindle was formed after PN stage. K . nuclear transfer embryos could induce bipolar spindle mediated mitosis. L. Mitotic telophase.

Table 2. Nuclear development and microtubule nucleation in nuclear transplanted bovine embryo by microinjection of cumulus cell

Nuclear remodeled	No. (%) of oocytes			
	4 h post-NT	microtubule nucleation	20 h post-NT	microtubule nucleation
sPN ^a or PCC	28 (63.6)	7 (25.0)	21 (35.6)	1 (4.8)
1PN	11 (25.0)	4 (36.4)	30 (50.8)	9 (30.0)
2PN	5 (11.4)	3 (60.0)	8 (13.6)	4 (50.0)
Total	44	13 (29.5)	59	14 (23.7)

^aSmall pronucleus including intact and condensed cumulus cell.

*Three cases of microtubule nucleation are all sPN cases.

복제난자의 경우 공여세포로 이용이 되는 세포내에 존재하는 미토콘드리아 및 DNA가 발달과정에 존재함으로써 복제난자에는 두가지의 미토콘드리아 및 DNA가 존재한다는 보고되어지고 있다. 본 연구에서는 핵치환 이후 착상 전 단계까지의 배발달 과정에서 공여세포에서 유래된 미토콘드리아 및 DNA(mtDNA)의 운명에 관한 실험에서 공여세포의 미토콘드리아의 운명을 평가하기 위하여 MitoTracker Green FM fluorochrome으로 염색된 난구세포를 핵이 제거된 성숙난자에 미세주입에 의해 핵치환을 실시하였다. 우선 mitotracker는 배발생에 있어 어떠한 역효과가 있는 알기위해, mitotracker-labeled나 intact cumulus cell과 embryo reconstruction에 따른 발생의 잠재성을 비교하였다 (Table 3). 제핵된 난자에 mitotracker가 표지된 난구세포를 microinjection을 한 후에, 배발달률은 차이를 보이지 않았다. 그러므로, 공여세포와 mitotracker은 배 발달률에 해로운 효과로 작용하는 것 같지는 않다.

Table 3. Effect of labeling with MitroTracker green FM on development of embryos after somatic cell nuclear transfer

Donor cell treatment	No. of embryos injected	No. (%) of embryos develop to			
		2-cell	-16-cell	-morula	blastocyst
Intact CC	45	15 (33.3)	26 (57.8)	2 (4.4)	2 (4.4)
Mito Tracker labelled CC	45	14 (31.1)	26 (57.8)	3 (6.7)	2 (4.4)

CC; cumulus cell

핵을 제거한 난자에 난구세포를 미세조작에 의해 삽입한 공여 mitochondria의 fate가 조사되었는데, 본 연구에서는 공여세포로부터 분리된 mitochondria의 fate는 Mitotracker green FM을 사용하여 동정되었다. Mitotracker green FM의 최종농도 400 n M 은 배 발생률에 있어서 불리한 작용을 할 것 같진 않다 (Table 4). 이 검사는 mitochondrial membrane potential과 관계없이 mitochondria상에서 모으기 위해 실시하였고, mitochondria mass를 결정하기 위한 중요한 도구로 만들었다. 공여세포로부터의 표지된 mitochondria는 핵치환에 따라 최고 7-세포기 단계까지 (19/25; 76%) 쉽게 동정되었다. 그러나, 배가 8-15세포기에 도달했을 때에 배의 25%(5/20)만이 그들의 세포질상에서 확인가능한 mitochondria를 가지고 있었다. 표지가 안 된 mitochondria는 26개의 배에서 확인 할 수 있었다 (Table 4).

또한 공여세포의 미토콘드리아 형광은 핵치환 이후 세포질내로 퍼져나가 분할이후 각 할구에 무작위로 분포되었다. 이 형광은 8에서 15세포기까지 관찰되었으며 16세포기 이후에는 공여세포의 미토콘드리아를 감지할수 없었다. 대조군으로 1세포기에 발달 정지된 난자가 배반포가 형성되는 7일째에도 형광을 나타내는 것으로 유추하면 형광의 퇴색에 의해 공여세포의 미토콘드리아가 감지되지 못한 것이 아님을 알 수 있었다 (Fig. 5).

Table 4. Persistence of labelled mitochondria in reconstructed bovine embryos following nuclear transfer

Developmental stage of embryos	No. (%) of oocytes mitochondria detectable/total
1-cell	44 / 45 (98)
2- and 3-cell	28 / 33 (85)
4- to 7-cell	19 / 25 (76)
8- to 15-cell	5 / 20 (25)
16-cell	0 / 14 (0)
Morula	0 / 6 (0)
Blastocyst	0 / 6 (0)

소 난자에 핵치환을 한 후에 착상전 배발생 동안에 공여 mitochondria DNA의 fate를 조사하기 위해, 핵치환을 실시한 배에서 mitochondria DNA(mt DNA) heteroplasmy는 direct sequencing method와 Allele-specific PCR(AS-PCR)방법에 의해 분석되었다. MtDNA의 D-loop region은 mtDNA heteroplasmy의 분석을 위해 사용되었다. 예비실험에서, D-loop region의 960 bp는 난소의 조직 (Holstein 소와 한우), 난구세포, 난자 (Fig. 6과 7)에서부터 증폭되었다. 그래서, D-loop의 증폭을 위한 primer는 극히 소량에서 mtDNA의 D-loop의 확인 하기에 충분할 정도의 특이성을 가지고 있었다. D-loop의 같은 region은 몇몇 추가된 소 난소의 DNA로부터 증폭되었다. 이 PCR로 증폭된 D-loop sample은 배열되고 비교되었다 (Fig. 8). mtDNA의 D-loop region상에서 sequence 비교는 Holstein 소와 한우 사이에서 특별한 차이점이 발견되지 않았다 (Fig. 8) D-loop sequence에서의 다양성은 개개의 특이성과 관련이 있는 것 같다. 난소 조직과 난자 그리고 재조합된 embryo에서부터 나온 D-loop 생산물은 AS-PCR을 위해 사용되었다.

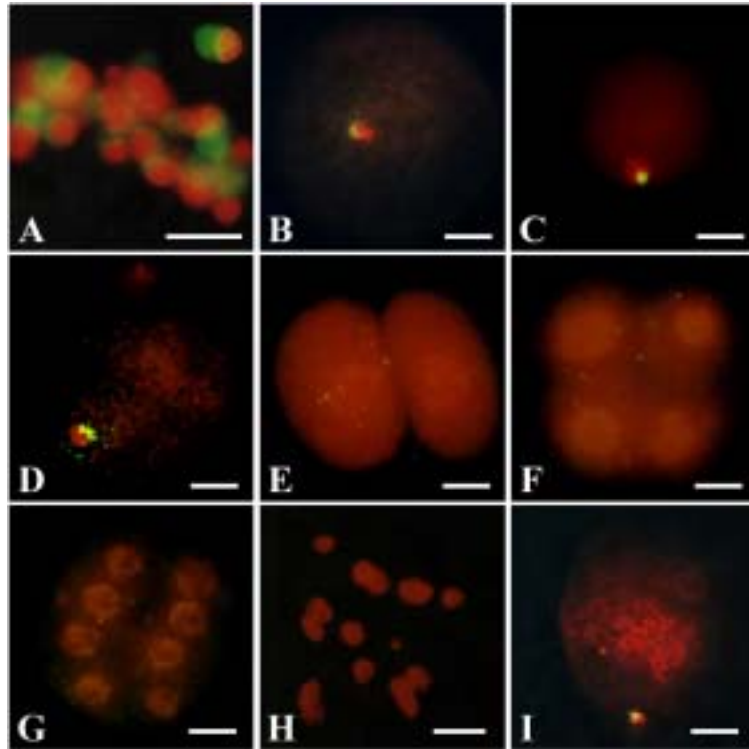


Fig. 5. Fluorescence microscopic images of mitochondria and chromatin in nuclear transfer bovine embryos. Green, mitochondria; red, chromatin; yellow, overlapping image of mitochondria and chromatin. Bar = 25 μm . A: Cumulus cell mass labelled with MitoTracker Green FM and Propidium iodide. B,C: Injected cumulus cell was enlarged and its mitochondria remained associated closely with the nucleus. D: Donor mitochondria were dispersed to the cytoplasm and randomly scattered. E: Donor mitochondria distributed between blastomeres in 2-cell stage embryo. F,G: By 4-cell to 8-cell stage, donor mitochondria were detectable but largely disappeared. H: By 16-cell stage, donor mitochondria could not identified. I: One cell-stage arrested embryo has persisted MitoTracker labelling of cumulus cell for 7 days post-NT.

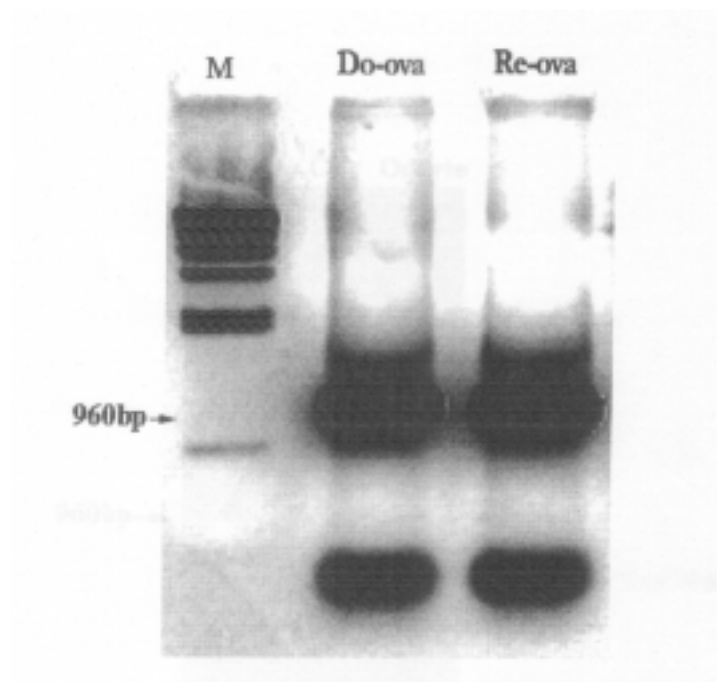


Fig. 6. Ethidium bromide-stained gel of the PCR-amplified D-loop fragment using the primer KNCF1 (gagttctatttaaactattccct) and KNCR2000 (ttgctttgggtaagctacatcaa). The product is 960 bp long. Do-ova, Holstein cattle ovary; Re-ova, Korean native cow ovary. Lanes marked M show a molecular size marker.

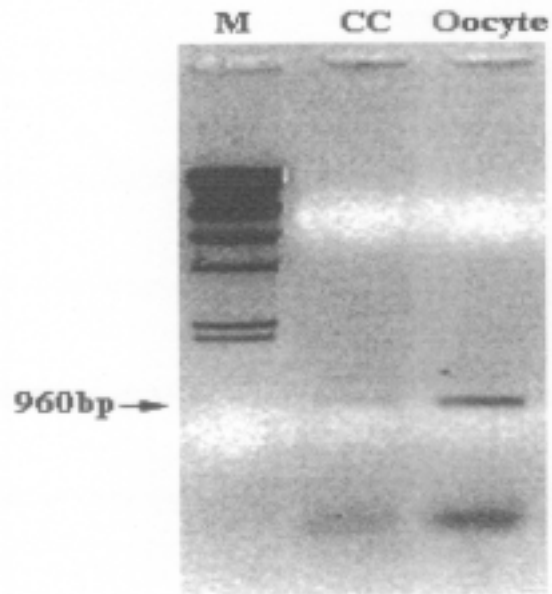


Fig. 7. Ethidium bromide-stained gel of the PCR-amplified D-loop fragment using the primer KNCF1 (gagttctatttaaactattccct) and KNCR2000 (ttgcttgggtaagctacatcaa). The product is 960 bp long. CC, cumulus cell; Oocyte, single oocyte. Lanes marked M show a molecular size marker.

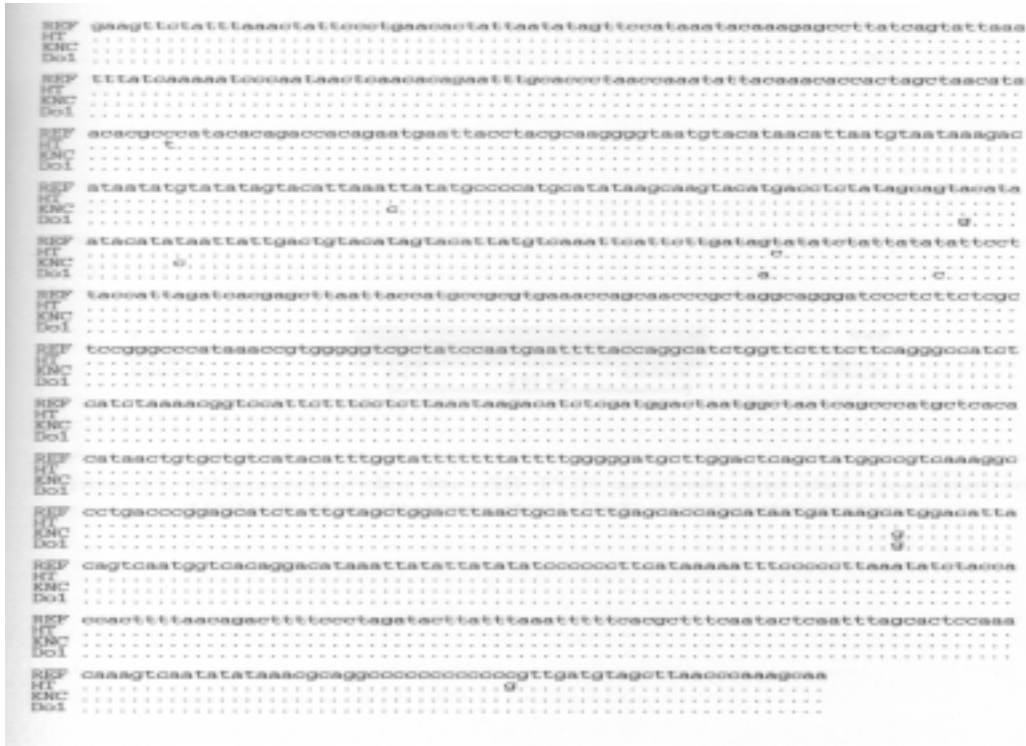


Fig. 8. D-loop region sequences of the three types of bovine mitochondrial DNA. Dots indicate identity with the REF. REF, Holstein cattle from gene bank; HT, Holstein cattle; KNC, Korean native cattle; Do1, donor Korean native cattle.

핵치환된 난자에 있어서 이식된 체세포 유래의 미토콘드리아 DNA의 fate는 allele-specific PCR(AS-PCR)에 의해 분석하였다. AS-PCR분석에 사용된 allele specific primer(DO1, UNIVR)는 Fig. 9에서 표시하였다. 이 공여-특이적인 PCR 증폭 산물은 길이가 387bp였다. 387bp의 공여 특이적인 산물은 오로지 positive control인 공여세포 D1에서만 확인될 수 있었다 (Fig. 10).

각각 여덟 개의 난소로부터 mtDNA의 유전자형을 제공받는 수핵난자는 공여세포의 mtDNA의 유전자형과 비교되었다. 모든 경우에서 유전자형은 달랐다 (Fig. 11). 이것은 만약 다른 난소로부터 387bp의 공여-특이적인 산물을 얻는다면, 난소에서 얻은 난자가 핵치환을 위한 수핵난자로 이용될 수 없음을 의미한다.

공여세포의 mtDNA는 1-, 2-, 4-, 8-, 16-세포기와 상실배와 배반포까지도 유지됨

을 알 수 있었다 (Fig. 12). 따라서 소에서 핵치환 이후의 공여세포 유래의 mtDNA는 적어도 배반포까지 유지되는 것으로 사료된다. 이후 미토콘드리아 D-loop 배열은 PCR 산물 배열과 DNA 크로마토그래피로 분석하였다. 배열은 자동 DNA 배열에서 말단에 형광표지 염색 화학물을 이용하여 수행하였다.

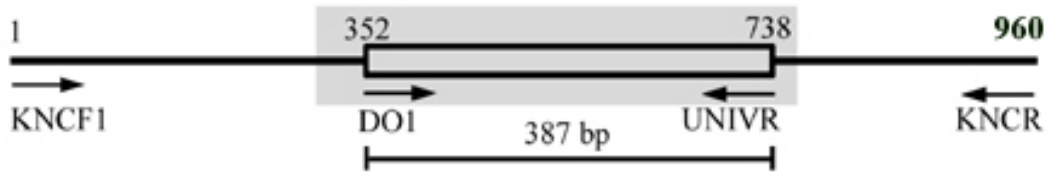


Fig. 9. Oligonucleotides for AS-PCR analysis and their localization. UNIVR: ttatcattatgctggtgc; Do1: agaatatatctattata_c

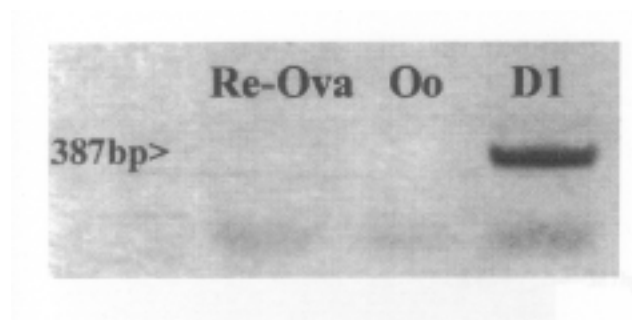


Fig. 10. Detection of donor mtDNA using donor specific primer. Re-Ova, recipient ovary tissue; Oo, recipient single oocyte; D1, donor ovary tissue. The D-loop products from ovary tissue, oocytes were used for AS-PCR.

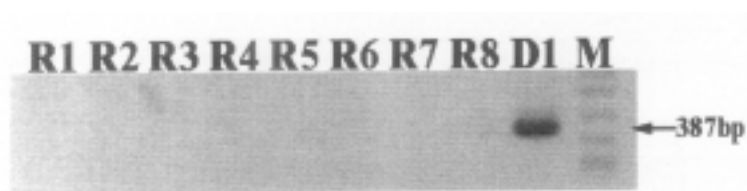


그림 11. Ethidium bromide-stained gel of the AS-PCR. M, molecular size marker; R1-R8, 8 ovaries supplying recipient oocytes; D1, positive control from donor ovary tissue. D-loop products from each ovary tissues were used for AS-PCR.

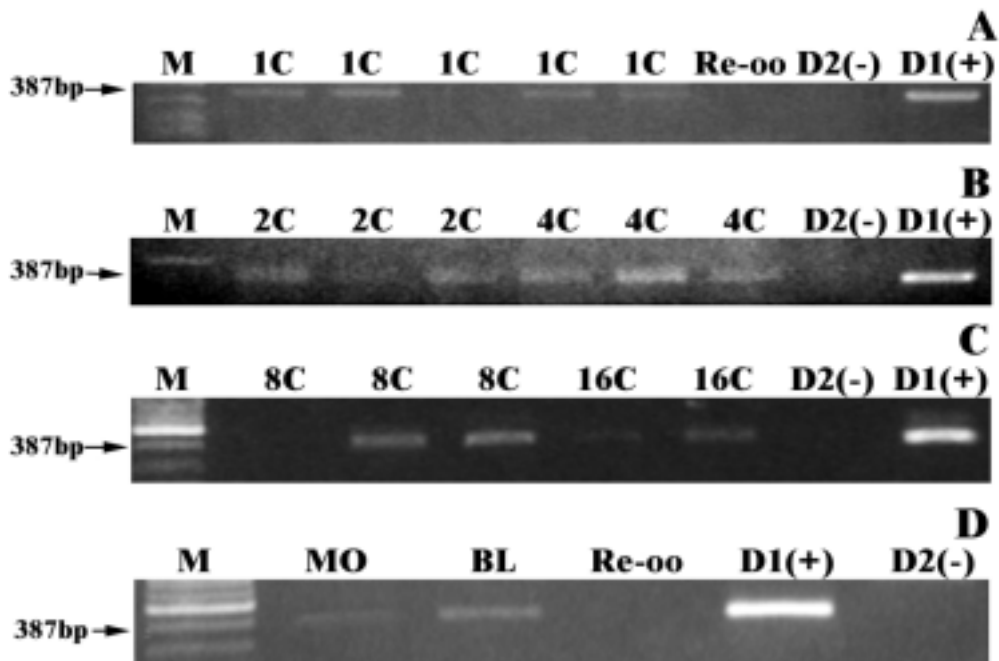


Fig. 12. Ethidium bromide-stained gel of AS-PCR in one cell (A), 2-cell and 4-cell (B), 8-cell and 16-cell (C), and morula and blastocyst (D) nuclear transfer embryos. Samples marked Re-oo, D2(-), and D1(+) represent recipient oocyte, negative control, and positive control, respectively. Lanes marked M show a molecular size marker.

핵치환을 통해 얻은 미토콘드리아 D-loop 지역의 배열을 공여세포와 수핵간에 비교를 하였다 (Fig. 13). Base-pair의 비교는 미토콘드리아 D-loop 지역의 16050, 16062와 16135 위치에서 하였다. 공여세포의 mtDNA의 nucleotide는 16050, 16062와 16135 각각 cytosin (C), guanine (G)과 C가 존재하였다. 이러한 뉴클레오타이드는 각각의 수핵란에서 thymine (T), adenine (A) 과 T 뉴클레오타이드와 비교하였다. 뜻밖에도, 수핵란과 핵치환을 통해 얻은 배반포사이에 mtDNA에서 차이는 DNA 크로마토그래피에서 명백하게 나타나지 않았다. 핵치환을 통해서 얻은 배반포에서 16050, 16062와 16135 base-pair의 위치는, 각각의 수핵란에서 mtDNA 배열이 T, A 그리고 T로 나타났다. C와 T가 16050과 16135 base-pair와 G와 A가 수핵란이 아닌 오직 핵치환을 통해 얻은 배반포의 16062 base-pair에 위치할 것이라고 예상되었다.

다행히도, 수핵란과 공여 난구세포사이에서 AS-PCR 산물 (106과 16255)의 387bp에서 두개의 다른 base-pair 위치가 있었다 (Fig. 14). 106과 16255 위치에서 공여세포의 mtDNA 뉴클레오타이드는 T로 확인되었고 수핵란은 C로 확인되었다. 106과 16255위치에서, 각각 구별된 뉴클레오타이드 T와 T는 핵치환을 통해 얻은 배반포에서 존재한다 (Fig. 15). 핵치환을 통해서 얻은 배반포의 뉴클레오타이드 T는 수핵란의 뉴클레오타이드와 일치하지는 않으나 오히려 공여세포와 일치하였다. 핵치환을 통해 얻은 배반포의 DNA 크로마토그래피 또한 각각의 base-pair에서 뉴클레오타이드 C와 T가 혼합되어 있는 것을 보이고, 106과 16255위치에서 공여 mtDNA가 우세하게 포함되었다 (Fig. 15).

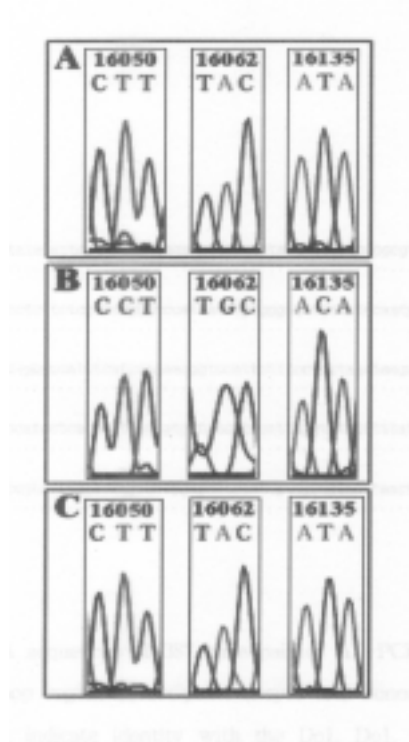


Fig. 13. Automated DNA chromatographs comparing mtDNA sequences at base pair positions 16050, 16062 and 16135. A, recipient. B, donor. C, nuclear transfer-derived blastocyst stage embryo.

```

Do1  ataatatatctattatacatttccttaccattagatcacgagcttaattaccatgcgcgctgaaaccagcaaccgg
Rec  .....

Do1  ctaggcagggatccctctctctgctccgggccataaaocgtgggggtcgctatccaatgaatcttaccaggcat
Rec  .....*16255

Do1  ctggttctttcttcaggggccatctcatctaaaacggtcattcttctctttaaataagacatctcgatggacta
Rec  .....16338**1

Do1  atggctaatacagcccatgctcacacataactgtgtgtcatacatttggatTTTTTTTATTTTGGGGGATGCTTG
Rec  .....

Do1  gactcagctatggccgtcaaaggccctgaccggagcactctattgtagctggacttaactgcactcttgagccca
Rec  .....*106

Do1  gcataatgataa
Rec  .....

```

Fig. 14. DNA sequences of 387 base pair of AS-PCR product from D-loop region of recipient oocyte and donor cumulus cell. Dots indicate identity with the Do1. Do1, donor cumulus cell; REC, recipient oocyte.

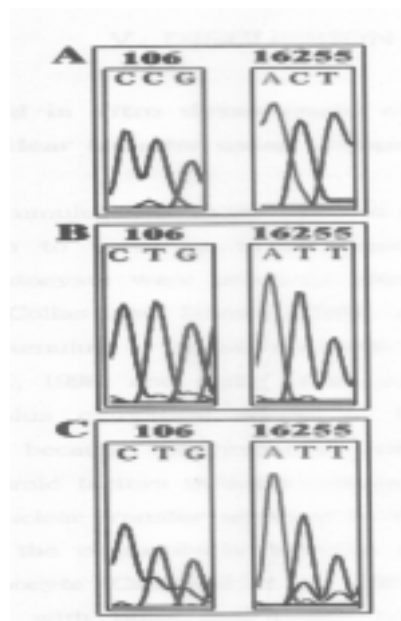


Fig. 15. Automated DNA chromatographs comparing mtDNA sequences at base pair position 106 and 16255. A, recipient . B, donor. C, nuclear transfer-derived blastocyst stage embryo.

○ 복제 수정란의 생사 감별 및 등급평가

세포의 사멸과 관련이 있는 *Bax*와 *Bcl-2* 유전자의 발현을 확인하기 위하여 조사를 하였다. 실험을 위해서 *Bax*와 *Bcl-2* 유전자가 소의 배반포에서 유전자를 감지하기 위해서 RT-PCR을 사용하여 실시하였으며. 핵치환과 체외 수정을 통해서 얻은 배반포에서 *Bax*와 *Bcl-2* 유전자의 RT-PCR 분석한 결과, 체외수정으로부터 얻은 배반포의 *Bcl-2*의 발현양은 NT를 통해서 얻은 배반포보다 높았다 (Fig. 16). 핵치환을 통해서 얻은 배반포에서 *Bax* 유전자의 과발현이 관찰되었다. Fig. 17은 RT-PCR의 결과를 정량적으로 비교한 결과이다. 따라서 이러한 결과는 체외수정보다 핵치환유래 소의 배반포에서 좀더 많은 과편화를 초래하는 apoptosis로 진행됨을 보여준다. 또한, 핵치환 유래 수정란의 발달 정지의 증가는 apoptosis와 같은 핵의 과편화로써 야기될 수 있다고 사료된다.

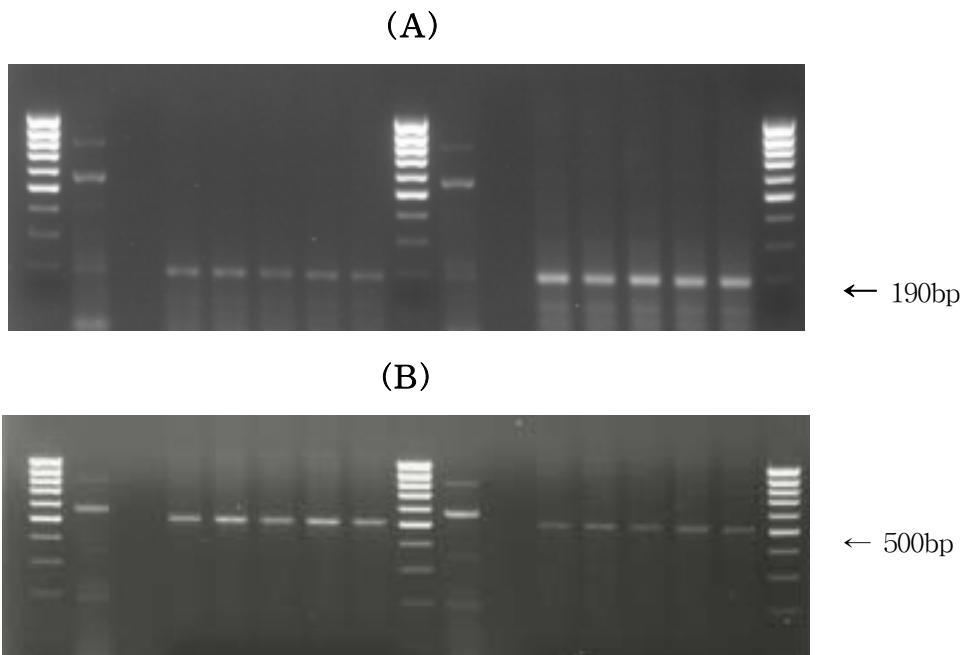


Fig. 16. RT-PCR analysis of *Bax* (A) and *Bcl-2* (B) in bovine blastocyst derived from IVF (Lane 1-4) and NT (Lane 5-8). M) size mark (100 bp ladder), P) positive control, N) negative control, C) GAPDH control.

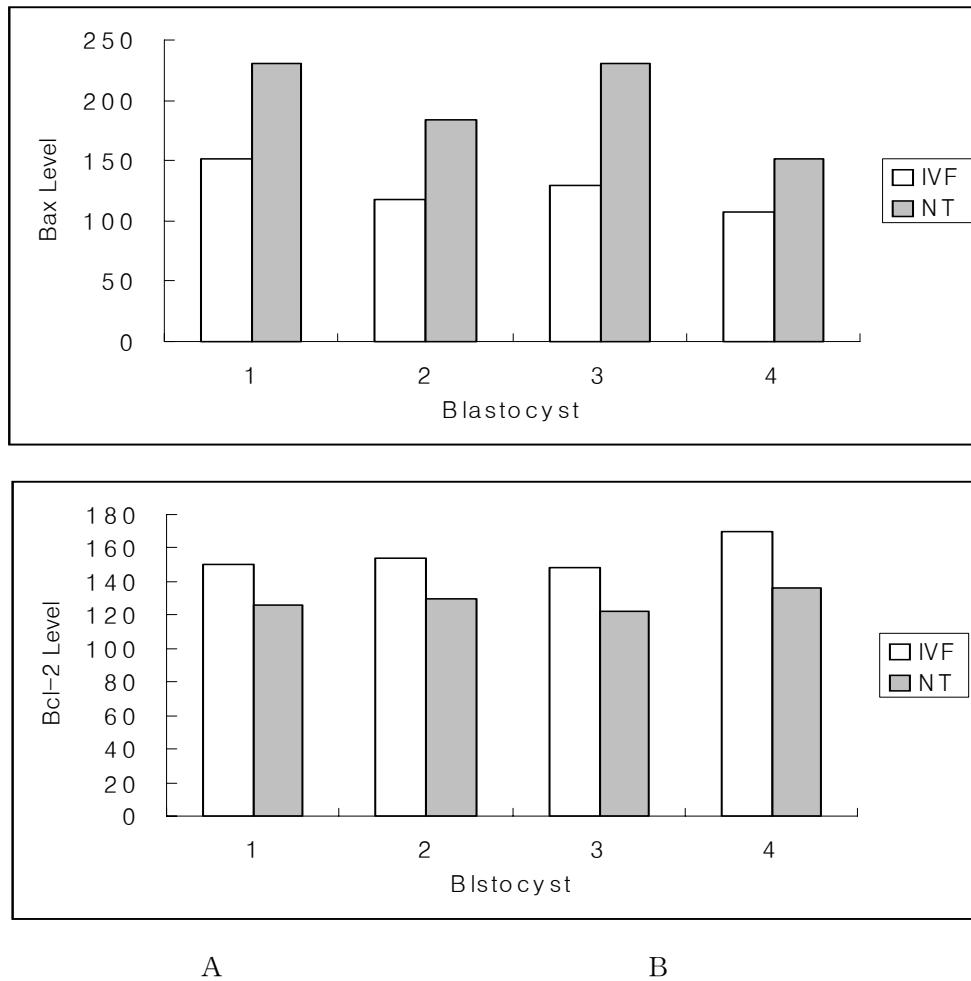


Fig. 17. Expression level of *Bax* (A) and *Bcl-2* (B) mRNA in blastocyst derived from IVF and NT ($P < 0.05$). Values are mean \pm SEM

또한 착상전 단계에서 필수적으로 발현이 되어야하는 유전자들이 존재를 하는데, 이 실험에서는 특히 유전자의 발현이 중요하다고 알려진 Oct4와 FGF4을 발현을 RT-PCR을 통하여 체외수정란과 복제난자에서 조사하였다. 그 결과 Fig. 18에서 보는 바와 같이 복제난자에서의 Oct4와 FGF4 발현이 체외수정란과 같은 양상으로 발현이 됨이 확인이 되었다.

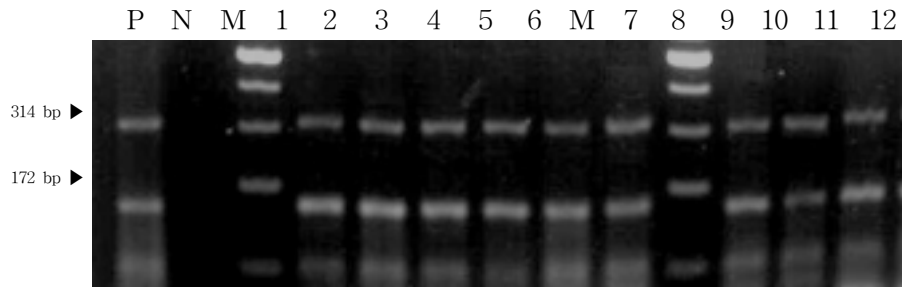


Fig. 18. The analysis of FGF4 (172 bp) and Oct4 (314 bp) transcripts in single bovine preimplantation stage embryos derived from IVF (1~6) and NT (7~12). M: size marker (100 bp ladder), P: positive control (liver tissue), N: negative control, Lane 1 and 7: 2 cell, Lane 2 and 8: 4 cell, Lane 3 and 9: 8 cell Lane 4 and 10: 16 cell, Lane 5 and 11: morula, Lane 6 and 12: blastocysts.

복제난자는 이식 후 체외수정란에 비교하여, 착상율과 임신율에서 많은 차이가 나는 것으로 알려져 있다. 따라서 난자의 발달에 있어서 implantation과 postimplantation을 위한 체외 모델로써 체외수정란과 복제난자의 배반포를 outgrowth formation을 조사하였다 (Fig. 19). 그 결과 복제난자가 체외수정란에 비교하여 outgrowth formation이 제한적임이 조사가 되었고, 이러한 현상이 복제난자를 이식 후 착상 후 발달에 저해적인 영향을 미칠 것으로 사료된다. 또한 early, hatching 배반포와 outgrowth된 배반포에서 Oct4와 FGF4 mRNA의 GAPDH mRNA와의 상관관계를 조사한 결과에 있어서는 (Fig. 20과 21), IVF의 peri-implantation 단계에서는 Oct4의 발현이 증가되면서 FGF4의 발현이 비례적으로 증가되었다. 그러나 핵치환에서 유래된 부화 배반포에서는 Oct4의 발현이 IVF와 비교 했을때 높게 발현되는 양상을 보였으며, FGF4 또한 IVF의 부화 배반포와 outgrowth 단계보다 낮게 발현되는 비정상적인 양상을 확인하였다. 핵치환에서 유래된 peri-implantation 단계에서 이러한 비정상적인 유전자의 발현은 배발달과 착상을 저하, 그 이후의 임신유지에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

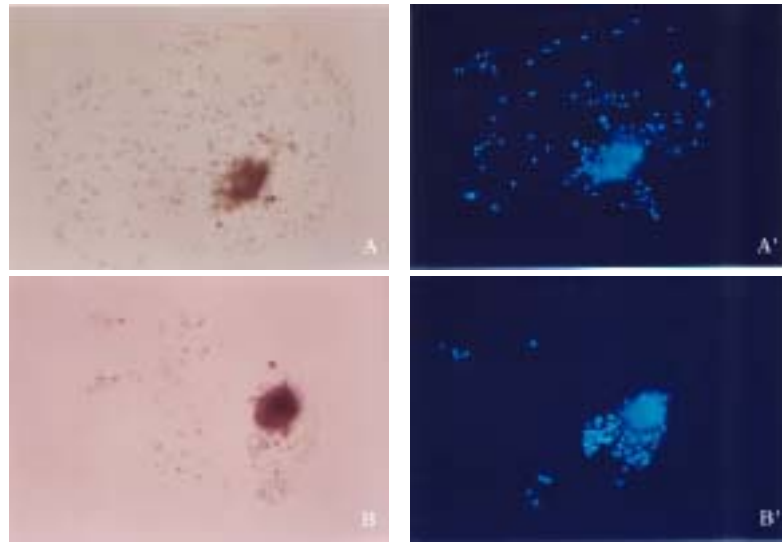


Fig. 19. Outgrowths from IVF (A, A') and NT (B, B'); A) the outgrowth at day 12 after IVF. B) the outgrowth at day 12 after NT. (A', B') the outgrowth were stained with Hoechst 33342.

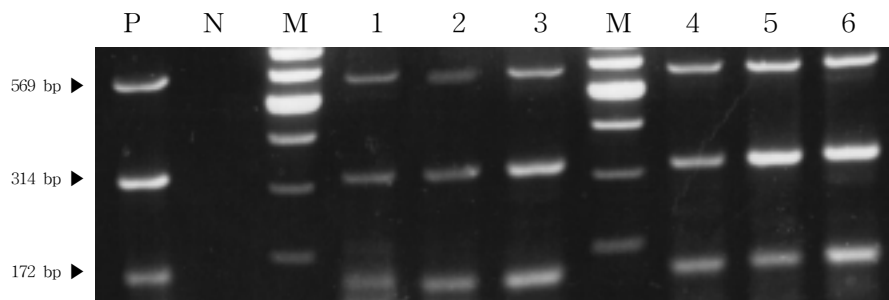


Fig. 20. The analysis of GAPDH (569 bp), Oct4 (314 bp) and FGF4 (172 bp) transcripts in single bovine peri-implantation stage embryos derived from IVF (1~3) and NT (4~6). M: size marker (100 bp ladder), P: positive control (liver tissue), N: negative control, Lane 1 and 4: early blastocyst, Lane 2 and 5: hatching blastocyst, Lane 3 and 6: outgrowth stage.

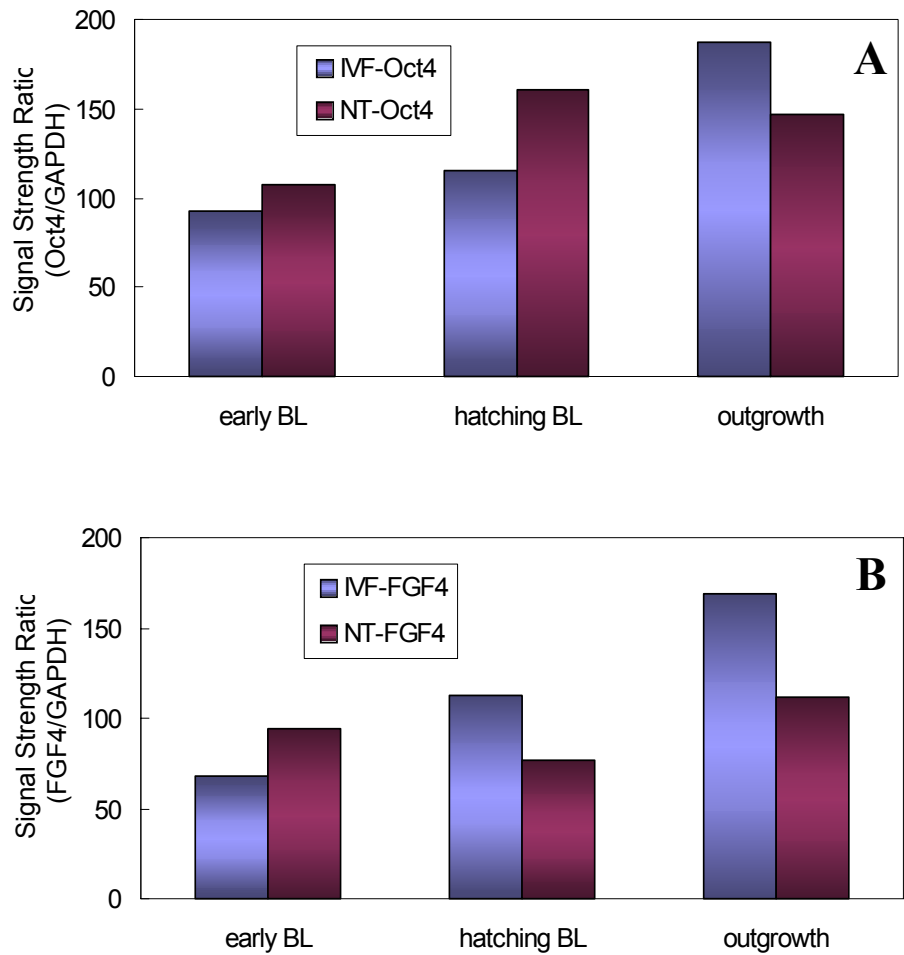


Fig. 21. Bar graph for signal strength ratios of Oct4 to GAPDH (A) and FGF4 to GAPDH (B) for early blastocyst, hatching blastocyst and outgrowth stage group.

○ 복제 수정란의 최적의 동결조건 확립

복제 수정란의 최적의 동결조건을 확립하기 위하여 체외 수정과 핵치환 후의 난자를 각각 48시간째에 2-세포기단계의 난자를, 72 시간째에 8-세포기의 난자를, 168시간째에 배반포 단계의 난자를 선택하여 동결에 사용하였다. Table 5은 체외 수정한 난자의 2세포기에서의 생존률 (81.3, 67.4, 60.4%), 8-세포기에서의 생존률 (75.0, 59.3, 53.1%), 그리고 배반포 단계에서의 생존률(86.2, 81.0, 79.3%)이 각각 관찰하였다. 또한, 핵치환 후에는 2-세포기 에서 43.7, 31.2, 31.2%를 보여주었고, 8-세포기에서는 38.8, 22.2, 11.1%가, 배반포 단계에서는 60.0, 53.3 그리고 53.3%의 결과를 보여주었다.

핵치환된 난자를 동결 보존함으로서 적절한 시기에 이식을 가능케하기 위하여 여러 container의 종류에 따른 복제수정란의 동결보존 후 생존성을 조사하였다. 본 연구에서는 3가지 container인 EM grid, Straw와 Cryo-loop를 사용하여 동결을 실시하였다. 체외수정란에서는 Straw보다 EM grid와 Cryo-loop를 사용하였을 경우 유의적으로 높게 생존하는 것으로 나타났으며 복제수정란의 경우 Cryo-loop를 사용하였을 때만 53.8 %가 생존하는 것으로 관찰되었다 (Table 6).

Table 5. Effect of embryo stage on the developmental of frozen-thawed using cryo-loop

Embryo stage		No. of embryos	No. of recovered	No. (%) of blastocysts	
				re-expanded	hatched
2-cell	IVF	43	35 (81.3)	29 (67.4)	26 (60.4)
	NT	16	7 (43.7)	5 (31.2)	5 (31.2)
8-cell	IVF	32	24 (75.0)	19 (59.3)	17 (53.1)
	NT	18	7 (38.8)	4 (22.2)	2 (11.1)
Blastocysts	IVF	58	50 (86.2)	47 (81.0)	46 (79.3)
	NT	15	9 (60.0)	8 (53.3)	8 (53.3)

Table 6. *In vitro* development of bovine embryos vitrified-thawed using various containers following IVF and NT

		No. of blastocysts	No. of blastocysts	
			re-expanded	hatched
EM-grid	IVF	164	144 (87.8)	118 (71.9)
	NT	74	-	-
straw	IVF	120	42 (52.5)	36 (45.0)
	NT	33	-	-
cryo-loop	IVF	100	80 (80.0)	80 (80.0)
	NT	52	28 (53.8)	-

위의 경우에는 각 보관용기 별로 결과에 유의차가 없었으나, 8일째 확장 배반포를 사용한 경우에는 EM grid가 78.1%, straw가 52.1%인 반면에 paper인 경우에는 77.1%의 생존율을 나타내어 종이의 경우가 다른 보관법보다 현저하게 높은 결과를 나타내고 있다 (Table 7). 현재 EM-grid가 vitrification 용기로써 우수하다고 생각되는 이론적 근거는 EM-grid가 열전도성이 높기 때문에 난의 손상을 최소화 하는 것으로 보고되고 있다, 그러나 본 연구의 결과에서 EM-grid보다 열전도율이 현저히 낮은 paper가 유사한 성적을 나타낸 것으로 추론 할 때, 동결 시 용기의 열전도율이 난자의 생존성에 큰 영향을 준다는 기존의 결과와는 차이가 있다. 따라서 초자화 동결에 사용되는 용기는 동결 시 난자 생존성에 영향을 미치기보다는 동결기간 중 난자를 보관하는 용기로써의 역할이 더 크다고 사료된다.

또한, 동결 후 복제수정란의 생존성을 평가할 수 있는 indicator 개발을 위한 기초 연구로서 재조합된 난자의 체외배양을 통해 획득한 배반포를 대상으로 동결 용해 후 double staining을 실시하여 live와 dead cell의 비율을 비동결군과 비교 조사하였다. 그 결과 유의적 차이는 관찰되지 않았으나 동결 용해군에서 죽은 세포의 수가 약간 많은 것으로 관찰되었다 (Table 8)

Table 7. The survival of blastocysts derived from *in vitro* fertilization frozen-thawed by various containers

Container Type	No. of examined	No. (%) of			
		recovered	lost	zona explosion	survived
EM grid	735	622 (84.6)	89 (12.1)	32 (4.4)	486 (78.1)
Straw	137	121 (88.3)	16 (11.7)	8 (5.8)	63 (52.1)
Paper	79	74 (93.7)	7 (8.9)	0	57 (77.1)

Table 8. Live and dead cell number of blastocysts after vitrification and thawing

Treatment	No. of blastocysts examined	Live : Dead cell ratio	Percentage of live cells
Control (Fresh cultured)	12	176 : 4	97.8
Vitrified group	24	172 : 6	96.6

또한 세포내에서 heat shock protein은 세포의 스트레스를 유발시키는 원인의 하나로 알려져 있는데, 동결융해된 난자내에 Hsp70 mRNA의 발현정도를 조사하였을 경우의 Fig. 22에서 보는 바와 같다. 그 결과 Hsp70 mRNA가 2-세포기, 8-세포기, 그리고 배반포기 체외수정과 복제난자 모두에서 확인이 되었다. 특히 동결전의 체외수정란 혹은 복제난자보다는 동결융해 후에 Hsp70 mRNA의 발현양이 체외수정란과 복제난자에서 증가됨이 되었다. 이러한 연구는 난자에서 Hsp 70 gene의 전사 단백질의 발현을 통해 환경적인 stress에서 보호하여 생존율을 증가시키는 것을 뒷받침 해준다. 따라서 Hsp 70의 연구는 미세조작 할 때나 동결·융해, 배양시에 환경적인 stress로부터 난자를 보호하여 발달향상에 영향을 미칠 것이라고 사료된다.

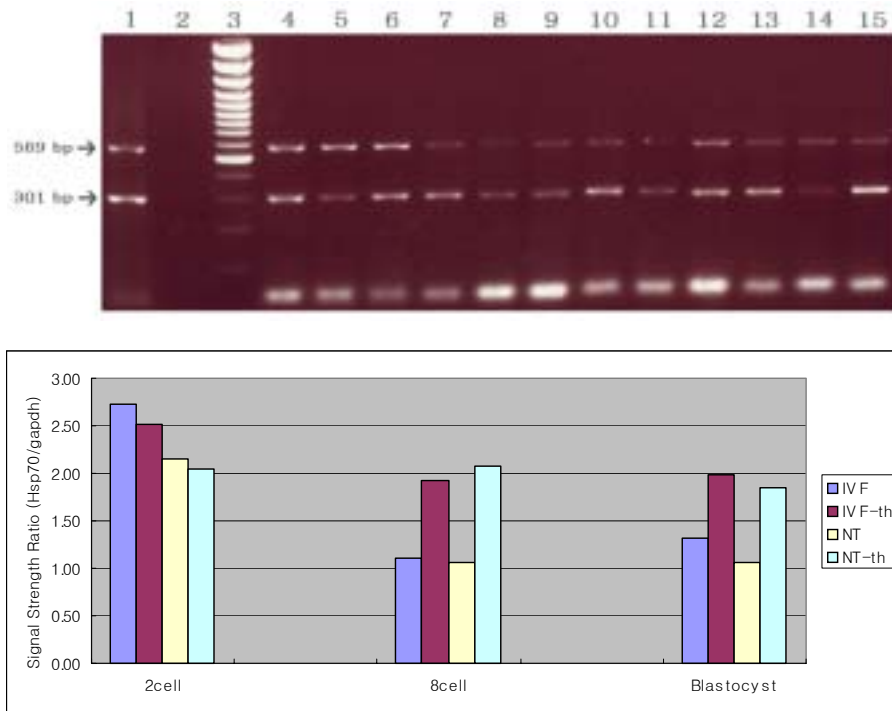


Fig. 22. Semiquantitative RT-PCR for Hsp70 and GAPDH *in vitro* bovine embryos. 2-cell, 8-cell and blastocysts, respectively. Amplicons were observed at the expected size for Hsp70 (301 bp) and the GAPDH (569 bp). Lane 1 represents the reverse transcriptase positive control and Lane 2 represents the reverse transcriptase negative control. Lane 3 represents the 100bp molecular ladder. Lane 4, 5, 6 represent IVF control (2, 8-cell and blastocyst, respectively) and Lane 7, 8, 9 represent frozen-thawed embryos, respectively. Lane 10, 11, 12 represent NT control (2, 8-cell and blastocyst, respectively) and Lane 13, 14, 15 represent frozen-thawed embryos, respectively. Below: Bar graph for signal strength ratios of Hsp70 to GAPDH amplicon for control and frozen-thawed group from *in vitro* bovine embryos (2, 8-cell and blastocyst, respectively).

3. 복제수정란의 현장이식 (제1협동과제)

○ 복제수정란 현장 이식 검증

체세포를 이용한 핵치환 후 체외배양을 실시하여 획득한 배반포를 수정란 이식기구를 사용하여 수란우에 이식을 실시하였다 (Table 1). 임신여부는 대략 20~30일 경과 후 1차적으로 황체 존재 유무를 축진을 통해 확인하고, 2차적으로 초음파 검사를 통해 판별을 실시하였다. 그 결과 배양한 세포, 동결융해한 세포, 저온처리한 세포를 사용한 경우에 있어서, 각각 30일째 17, 1, 3마리에서 임신여부가 확인이 되었다. 이후의 발달에 있어서 90일 이후로 임신을 유지한 경우는 각각 6, 0, 1마리이며, 현재까지 배양된 세포를 공여세포로 이용한 경우 이후 180일째 까지 임신상태를 유지한 경우, 3마리중 2마리는 240일경 유산 되었다. 유산된 송아지 중 한 마리는 수컷이었으며 거의 정상적인 형태를 띠었으나 목이 늘어난 상태였다. 다른 한 마리는 역시 수컷이었으며 거대송아지의 형태를 띠었고 두부 절개후 제왕절개를 통하여 체외로 배출시켰다. 남은 한 마리는 사산되었는데 송아지 분만시 요수는 양이 적었으며 태막은 수중태막이었다. 송아지 상태는 양 전지가 굴절된 상태였으며 혀는 부종 상태였고 폐사한 상태였다. 우측의 전지는 경증의 굴절증으로 완전히 신전되지는 않은 상태였다. 양전지와 두부를 로프로 걸어 조산기로 분만유도를 하였으나, 피부가 약하여 양전지와 두부가 제2 흉추부에서 절단되었다. 다음은 절태술로 송아지의 장기를 적출하고 양 후지를 절단하여 적출하였다. 송아지의 장기는 폐장이나 간장 근육 모두 부종상태였다. 피모는 1cm 이내로 짧았으며 피부가 몹시 위약하였다. 사견으로는 요수가 매우 적었던 것으로 보아 송아지의 신장기능에 이상이 있던 것으로 사료된다. Fig. 1는 임신중인 송아지의 초음파 사진이며, Fig. 2은 사산된 송아지의 사진이다. 또한 제2협동과제의 수행을 위해 주기적으로 채취한 혈액 샘플을 제공하였다.

Table 1. Embryo transfer of bovine embryo produced by nuclear transfer with various somatic cells.

Cell types	No. of embryos transferred	No. of recipients	No. (%) of pregnancy*			No. of offspring		
			30 days	90 day	180 day	total	live	dead
Cultured cell	82	41	17	6	3	1	-	1
Freezing cell	10	5	1	-	-	-	-	-
Colled cell	16	8	3	1	-	-	-	-

* Now ongoing.

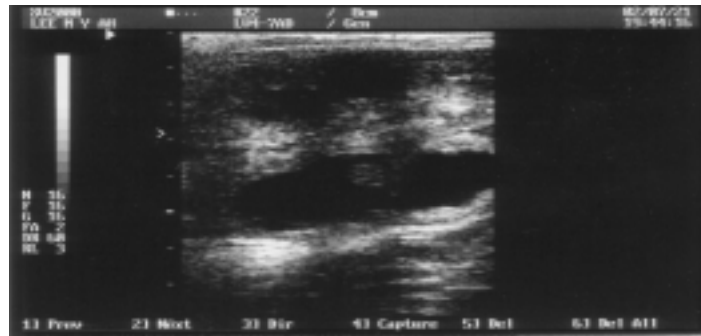


Fig. 1. Ultrasonic Photograph of cloned fetus.



Fig. 2 Dead cloned offspring calf derived from embryos nuclear transferred with somatic cell.

4. 복제소 생산을 향상을 위한 기술개발 (제2협동과제)

○ 전기 자극의 융합 조건에 따른 칩소 귀세포와 수핵세포질의 융합율

전기자극의 융합조건에 따른 칩소의 귀세포와 수핵난자 간의 융합율과 lysis율은 Table 1과 같다. 융합율은 각 전기자극조건에서 51-68%의 범위로 큰 차이가 없었으나, 난자 세포질의 lysis율에 있어서는 0 - 51.8%로 큰 차이가 있었다. 융합 후 난자의 lysis율은 1.9 kv/cm의 10 μ s과 20 μ s에서 각각 0.0 과 38.7%, 2.0 kv/cm의 10 μ s과 20 μ s에서 각각 2.9와 37.5%, 및 2.1 kv/cm의 10 μ s과 20 μ s에서 각각 21.2와 51.8%를 나타내었다. 핵이식 후 전기 자극 조건에 따른 난할율과 배반포 발생율은 Table 2와 같다. 난할율은 1.9kv/cm의 10 μ s과 20 μ s에서 각각 75.8과 69.8%, 2.0 kv/cm의 10 μ s과 20 μ s에서 각각 76.9와 68.8%, 2.1 kv/cm의 10 μ s과 20 μ s에서 각각 70.5와 68.5%로 큰 차이가 없었다. 그러나 배반포 발생율은 1.9 kv/cm의 10 μ s과 20 μ s에서 각각 19.5와 48.6%, 2.0 kv/cm의 10 μ s과 20 μ s에서 각각 20.0과 40.9%, 2.1 kv/cm의 10 μ s과 20 μ s에서 각각 44.2와 27.0%로 각 조건에서 시간에 따른 차이를 보였다. 칩소의 귀세포와 수핵난자와의 융합율은 1.9 kv/cm 전압에서 10 μ s 동안 전기자극 하였을 때 68.5%와 0% lysis를 나타내어 가장 좋은 결과를 보였다. 한편, 한우의 태아섬유아세포를 이용하였을 때 1.8 kv/cm상에서 15 μ s와 20 μ s에서 각각 2번씩 전기자극을 주었을 때, 15 μ s에서는 58.6%의 융합과 12.4%의 lysis율을 보였고, 20 μ s에서는 61.7%의 융합과 20.4%의 lysis를 보여 융합에는 별차이가 없었지만, lysis 면에서 20 μ s에서 다소 높은 비율을 보였다. 난할 및 배반포 발달율에서 15 μ s에서는 76.7%의 난할과 20.0%의 배반포 발달을 보였고, 20 μ s에서는 61.7%의 난할과 20.4%의 배반포 발달을 보여 두 groups간에 차이는 없었다. 체세포 핵이식에서 전기융합과정은 필수적인 과정이고, 융합율에 영향을 주는 인자 중 하나는 전압이다. 세포가 작을수록 더 높은 전압이 (Zimmermann and Vienken, 1982) 요구되지만 융합에 필요한 이상의 전압은 cell lysis의 원인이 될 수도 있다 (Zakharchenko 등, 1995). 세포사멸은 세포의 swelling에 의해 이루어지는데, 전압의 크기와 통전시간에 좌우된다. 소의 체세포 핵이식에서 융합율이 50-80%이다 (Goto 등, 1999 ; Kato 등, 1998 ; Wells 등, 1998 ; Zakhartchenko 등, 1999a,b). Li 등(2002)는 같은 크기의 전압 상태에서 통전 시간을 길게 하였을 때 융합율이 높음을 보였으나, 임 등(2000)은 난구세포로의 핵이식에서 70 V, 40 μ s, 두 번과 180 V, 15 μ s, 한 번의 전기 자극 조건을 비교하였을 때 180 V,

15 μ s, 한번의 전기자극에서 유의적으로 높은 융합율을 보였다. 본 결과에서 보면 1, 9~2.1 kv/cm의 전압에서 각각 10 또는 20 μ s 동안 전기자극을 주었을 때, 전압에 따른 융합율에는 차이가 없었으나, 각각의 전압에서 통전시간을 늘릴 경우 lysis율이 높아졌다. 따라서, 세포 융합을 위한 전기자극 조건에서 전압을 높이는 것이 통전시간을 길게하는 것 보다 수핵난자의 세포질에 상해를 줄이고 배반포 발생에 유리하였다.

Table 1. Effect of electric pulse conditions on the fusion rate of embryos produced by ear cell nuclear transfer in brindle coated Hanwoo

Fusion pulse		No. of		
		Fusing	Fused(%)	Lysis(%)
1.9kv/cm	10 μ s	54	37(68.5)	0(0.0)
	20 μ s	62	21(51.2)	24(38.7)
2.0kv/cm	10 μ s	68	43(65.1)	2(2.9)
	20 μ s	80	27(54.0)	30(37.5)
2.1kv/cm	10 μ s	66	28(53.8)	64(21.2)
	20 μ s	80	21(53.8)	42(51.8)

Table 2. Effect of electric pulse conditions on the development of embryos produced by ear cell nuclear transfer in brindle coated Hanwoo

Fusion pulse		No. of embryos		
		Fused couplets	\geq 2cells(%)	BL / 2-cell(%)
1.9kv/cm	10 μ s	54	41(75.9)	8(19.5)
	20 μ s	53	37(69.8)	18(48.6)
2.0kv/cm	10 μ s	65	50(76.9)	10(20.0)
	20 μ s	64	44(68.8)	18(40.9)
2.1kv/cm	10 μ s	61	43(70.5)	19(44.2)
	20 μ s	54	37(68.5)	10(27.0)

Table 3. Effect of electric pulse conditions on the development of embryos produced by fetal fibroblast cell nuclear transfer in Hanwoo

Fusion pulse			No. of		
			Fusing	Fused(%)	Lysis(%)
1.8kv/cm	20 μ s	2times	167	82(61.7)	34(20.4)
1.8kv/cm	15 μ s	2times	113	58(58.6)	14(12.4)

Table 4. Effect of electric pulse conditions on the development of embryos produced by fetal fibro cell nuclear transfer in Hanwoo

Fusion pulse			No. of		
			Fused couplets	≥ 2 cells(%)	BL / 2-cell(%)
1.8kv/cm	20 μ s	2times	103	70(68.0)	13(18.6)
1.8kv/cm	15 μ s	2times	149	115(76.7)	23(20.0)

○ 활성화 후 핵이식란의 핵상변화

소 태아섬유아세포의 융합으로 만들어진 핵이식란의 핵상변화결과는 Fig. 1과 같다. 활성화 처리 후 1시간에 55%가 enlarging 및 PN을 형성하여 6h이후에는 90%이상 이 모두 전핵을 형성하였다. PCC는 활성화후 1시간에 23%를 보였으나 시간이 지남에 따라 거의 없거나 극히 드물게 나타났다. 따라서 핵이식후 핵의 remodeling에 준한 DNA replication에는 차이가 없는 것으로 보인다. Dominko 등(1999)은 nuclear swelling이 활성화 과정이 끝난 후 일어나며 16과 24h 사이에 첫 번째 난할이 나타난다고 하였다. Prather와 Robl(1991)은 핵막붕괴, 염색질 응축, 핵막형성이 핵의 remodeling의 증거라고 하였다. Pinto-Correia 등(1993)은 이식된 핵이 융합 후 1.5h내에 응축되고 융합 후 8-9h에 커다란 전핵을 재형성하였다. 이러한 접근을 통해 DNA

의 전 구성요소가 핵이식 후 replicated됨을 알 수 있었다. 그러므로 핵이식란의 발달에 대한 문제는 DNA복제의 불완전한 replication의 결과로 나타난다고 할 수 있다 (Pinto-Correia 등, 1995).

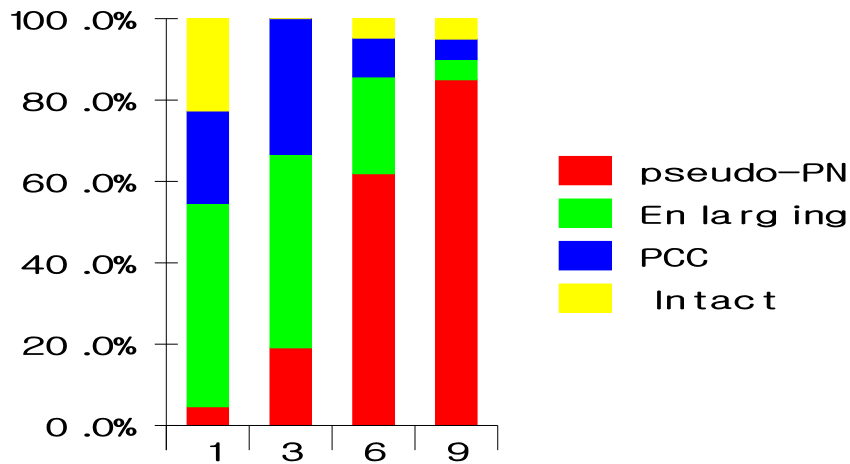


Fig. 1. Status of nucleus in bovine nuclear transferred embryos after activation

○ 배양 체계에 따른 소 핵이식란의 발달을 비교

핵이식란을 CR1aa와 CR2aa(CR1aa+5%FBS)에서 난구세포와의 공배양으로 배양한 결과는 Table 5과 같다. CR1aa와 CR2aa(CR1aa+5%FBS)에서 난구세포와 공배양한 후 난할율과 배반포 발달율은 각각 97.2%와 83.7%와 32.1%와 58.2%로 CR2aa에서 난구세포와 공배양한것에서 배반포 발달율이 높았으며, 배반포의 세포수 또한 평균 99.5 ± 6.17 , 126.5 ± 2.48 로 처리구에서 높게 나타났다. 이들 결과는 공배양의 유리한 효과를 보고한 이전의 연구들과 유사하다(Goto 등(1988), 양 등(1997)). 따라서 공배양이 핵이식란의 배양환경에 이로운 효과를 준다고 사료된다.

Table 5. Effect of culture systems on *in vitro* development of nuclear transferred embryos

Culture method	No. of oocytes	Fused(%)	No. of		
			2-cell(%)	Blasto/2-cell(%)	cells/blastocyst Mean±SD
CR1aa	330	282(85.0)	274(97.2)	88(32.1)	99.5±6.17
CR2aa with cumulus cell	310	263(84.8)	220(83.7)	128(58.2)	126.5±2.48

○ 공여세포의 세포주기 동기화에 따른 핵이식란의 발달

세포주기 동기화를 위하여 monolayer를 형성한 confluent cells와 혈청 농도를 0.5%로 낮춘 starved cells를 이용하여 핵이식 한 후 배발달율을 비교한 결과 난할율은 confluent 공여세포가 64.7%, starved 된 공여세포가 71.8%로 starved cells가 다소 높은 경향이었으나, 융합율(69.9% vs 65.1%)와 배반포 형성율(15.7% vs 15.5%)에는 유의적 차이가 없었다. 핵이식에 공여되는 세포들은 세포주기 단계가 차이가 있는데 confluent monolayer 세포들은 대부분의 세포주기가 G1기이고, 혈청기아세포의 대부분은 G0라고 알려져 있다 (Boquest 등, 1999; Prather등, 1999). 체세포 핵이식에 의해 최초 산자생산 보고이래 혈청기아 배양에 의해 세포주기를 휴지기(G0)기로 유도한 체세포가 공여핵으로 보편적으로 이용되고 있다(Wells 등, 1999 ; Zakharchenko 등, 1999 ; Tao 등, 1999). 이러한 휴지기 상태의 체세포가 세포주기를 진행중인 세포에 비하여 핵이식 후 reprogramming이 용이한 것으로 알려져 있다. 그러나 Zakhartchenko 등(1999)은 non-starved 와 starved공여세포의 배반포 발달율이 각각 20%와 39%로 starved 공여세포가 배반포 발달에 좋다고 하였으나 Cibelli 등(1998)은 non-starved transfected 태아섬유아세포를 이용한 핵이식으로 복제된 형질전환 송아지를 생산하여 휴지기 상태의 공여세포가 핵이식 후 수정란의 발달에 필수적이지 않음을 주장하였다. 본 실험에서도 두 groups간에 착상전 핵이식란 배의체외 발달능에는 차이가 없었지만, 수정란 이식후의 수태와 임신 능력이 조사되어야 한다고 사료된다.

Table 6. Effects of different cell cycle synchronization methods for donor fibroblast cells on the development of nuclear transferred embryos

Group	NT couplets	Fused(%)	No. of	
			2-cell(%)	BL / 2-cell(%)
confluent	73	51(69.9)	33(64.7)	8(15.7)
starved	109	71(65.1)	51(71.8)	11(15.5)

○ 체세포 핵이식배의 동결-융해 후 생존성

CR1aa으로 생산된 배반포는 15개를 동결-융해 한 후 5개가 생존함으로써 33.3%의 생존율을 보였고, CR2aa와 난구세포와 공배양하여 생산된 배반포는 15를 동결-융해 한 후 9개가 생존함으로써 60.0%의 생존율을 보였다. 생존 후 부화율은 각각 3/5 vs 6/9로 역시 CR2aa와 난구세포와 공배양한 배반포를 동결-융해 한 것이 높았다. 한편, 동결 전 배반포의 강 부분을 puncture하여 수분을 제거한 후 동결하였을때, 그대로 동결한 것과 비교하여 수치상으로 높은 생존율을 보였다 (81.8 vs 40.0). 이는 Abe 등 (1999)의 혈청첨가 배지와 혈청무첨가 배지에서 생산된 배반포의 동결-융해 후 생존성을 비교한 결과 74.7%VS 50.0%의 것과 대조적인 결과이지만, 이 등(1999)의 55.0%vs 27.3%의 것과는 유사한 결과였다. 혈청은 동결보존에 해로운 지방구(lipid droplet)의 축적을 돕는 것으로 보고되었다 (Abe 등 1999; 2002). 그러나, 난구/과립막 세포와의 공배양은 증가된 배반포 형성을 지지하고, 질적으로 단순배양에 비교하여 높은 것으로 보고 되었다 (Xu 등, 1992 ; Eystone 등, 1989). Rorie 등(1990)은 난관 상피세포와 자궁상피세포를 이용한 공배양이 수정란의 동결-융해 후 생존에 유리하다고 보고하였다.

따라서, 본 연구는 체세포를 이용한 핵이식란의 동결 융해 후 높은 수치의 생존율을 보고하고, 또한 CR2aa-5% FBS와 난구세포로 공배양한 2 step으로 배양이 핵이식란의 배반포 생산 및 동결 융해 후 생존에 유리함을 제안한다. 동결- 융해 후 생존율은 각각 33.3%와 60.0%로 공배양에서 유의적으로 높았다. 일반적으로 핵이식란은 체외수정란이나 체내 수정란에 비하여 동결-융해 후 생존율이 낮다. 이것은 배반포 당

낮은 세포수(Bordignon 등, 1998 ; Takano 등, 1997)나 제핵과 세포 주입동안 micromanipulation에 의한 투명대의 소실과 같은 그들의 특이사항 때문일 것이다. 체외수정란의 동결 연구에서 또한 배반포의 세포수는 동결 후 생존성에 영향을 미치는 것으로 보고 되어왔다 (Lee 등, 2000). 따라서 핵이식 유래 배반포의 동결성에 배양조건이 영향을 미치는 것으로 판단되며 이는 세포수에 기인한 것으로 사료된다. 또한, 동결에 영향을 주는 수분을 미리 제거함으로써 동결후 생존율을 높을 수 있을 것으로 사료된다.

Table 7. Survival rate of nuclear transferred blastocysts after frozen-thawing

Cultuer method	No. of blastocyst	
	Post-thawing	Survived(%)
CR1aa	15	5(33.3)
CR2aa with cumulus-cell	15	9(60.0)

Table 8. Hatching rate of nuclear transferred blastocysts after frozen-thawing

Cultuer method	No. of blastocyst	
	Survived	hatched(%)
CR1aa	5	2(40.0%)
CR2aa with cumulus-cell	9	6(66.7%)

Table 9. Survival rate of pretreated blastocysts after frozen-thawing

Treatment	No. of blastocyst	
	Post-thawing	Survived(%)
Pretreatment	11	9(81.8)
Normal	10	4(40.0)

○ 핵이식란의 염색체 분석

소의 체세포를 계대 배양한 후 각 계대별로 염색체 분석을 한 결과 5계대에서는 684개의 spreads를 검경한 결과 염색체 수는 72%가 정상으로 60개이었고, 24%가 60개 미만이었으며 4%가 60개 이상을 보였다. 10계대에서도 5계대에서와 비슷하게 71%가 정상, 26%가 60개미만, 3%가 60개 이상이였으나 15계대에서는 55%가 정상이었고 30%가 60개 미만, 15%가 60개 이상을 보였다 (Table 10). 따라서 10계대까지는 mixoploid의 비율의 변화가 없었으나 15계대에서 현저하게 늘어남을 볼 수 있었다. 따라서 계대에 따른 체세포의 염색체 이상의 비율이 상대적으로 증가함을 알 수 있었다.

소의 체외수정란과 핵이식란의 염색체 분석 결과는 Table 11과 같다. 체외수정란은 250개의 spreads를 검경한 결과 염색체 수는 95.6%가 정상으로 60개이었고, 2.0%가 60개 이하, 2.4%가 60개 이상이었다. 이와 비교하여, 핵이식란은 204개를 검경하여 88%가 정상이었고, 4.9%가 60개이하, 7.1%가 60개 이상을 보임으로써, 핵이식란이 체외수정란에 비하여 염색체 이상의 비율이 높았다. 핵이식란에서의 염색체 분석결과 8-cell 단계와 배반포 단계에서의 spreads를 검경한 결과 염색체의 숫적인 이상의 차이는 없었다. 각각 89%와 90%의 정상군과 11%와 10%의 mixoploid를 포함하였다. Bureau 등(2003)은 체세포와 핵이식란의 염색체 분석 비교에서 공여세포의 적절한 screening의 중요성을 제안하였고 또한 핵이식과정 자체가 핵이식란의 염색체이상에 영향을 미친다고 하였다. 그러나, Booth 등(2003)은 또한 핵이식란의 염색체 이상의 원인이 전체 배반포 세포수에 역관계에 있고 mixoploid상태가 수정란의 대부분에서 나타나며 100% polyploid NT 배반포가 존재가능하여 이러한 ploidy errors가 공여세포유래가 아님을 제안하였다. 따라서, 이후에 핵이식란의 염색체 이상의 원인 분석을 위한 실험이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

Table 10. Chromosome analysis of donor cells at different passages

Group	No.(%) of cells with chromosome			No. of spreads counted
	<60	60	>60	
5	170(24.9)	490(71.6)	24(3.5)	684
10	72(25.4)	204(71.8)	8(2.8)	284
15	88(29.8)	163(55.3)	44(14.9)	295

Table 11. Chromosome analysis of embryos by IVF or nuclear transfer

Group	No.(%) of cells with chromosome			No. of spreads counted
	<60	60	>60	
IVF	5(2.0)	239(95.6)	6(2.4)	250
NT	10(4.9)	180(88.0)	14(7.1)	204

Table 12. Chromosome analysis of embryos by nuclear transfer

Group	No.(%) of cells with chromosome			No. of spreads counted
	<60	60	>60	
8-cell	4(3.0)	120(89.0)	5(8.0)	134
blastocyst	8(5.0)	150(90.0)	9(5.0)	169

○ 공여세포의 계대수에 따른 핵이식배의 발달

핵이식에 사용되는 공여핵의 계대수가 핵이식 수정란의 발육에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 13과 같다. 1-5계대 후 공여핵으로 이용한 군에서 2세포기와 배반

포기로의 발달율이 각각 83.96 %와 38.43%로 나타났으며, 6-10계대 후 공여핵으로 이용한 군에서 2세포기와 배반포기로의 발달율이 각각 88.94%와 46.23%로 나타나 두 군간에 계대에 따른 발달율은 차이가 없는 것으로 나타났다. 핵이식에 사용되는 공여핵의 계대수가 핵이식 수정란의 핵수에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 14와 같다. 1-5계대 후 공여핵으로 이용한 군에서 세포수가 90 ± 17.53 개였으며, 6-10계대 후 공여핵으로 이용한 군에서 세포수가 120 ± 19.55 개였다. Kubota 등(2000)은 5-15 계대에서 성숙한 섬유아세포를 이용했을 때 핵이식란의 발달에 차이가 없음을 보고하였으나 이들 세포는 비교적 초기 계대의 것으로 계대 수가 두 배로 계속된다면 핵의 재프로그래밍에 영향하는 세포의 유전적 후성변화가 일어난다고 하였다 (Wakayama 등, 1999). 또한, 유전자의 조절이 cell line의 배양결과로 배아 및 태아 발달에 지장을 초래할 수있다고 하였다 (Walker 등, 1996). 이들 효과는 후기 단계 배양세포에서 나타나고, 살아서 태어난 양은 8-9계대 내 세포에서 생산되어 초기 계대 세포가 핵이식에 이용되었다 (Wells, 1997). Strelchenko 등(1996)은 소의 배아유래세포를 체외에서 배양했을 때, 비정상적인 핵형을 지닌 세포 비율이 후기 계대에서 증가함을 보고하였으나, Zakhartchanko 등(1999)은 후기 계대에서 유전적 변형이 자발적인 불멸화 과정인지 불분명하다고 하였다. 이러한 후기 계대의 세포를 공여핵으로 수핵 난자에 이식하는 것은 재구조화된 핵이식란의 발달을 저해하는 요인 중 하나라고 사료된다.

Table 13. Effects of different passages of donor fibroblast cells on the development of nuclear transferred embryos

Passage	No. of		
	Fused	≥ 2 -cell (%)	Blastocyst/2cell (%)
1 ~ 5	268	225(83.96)	103(38.43)
6 ~ 10	199	177(88.94)	92(46.23)

Table 14. Effects of different passages of donor fibroblast cells on the cell number of nuclear transferred blastocysts

Passage	No. of	
	Embryos	Cells
1 ~ 5	11	90±17.53
6 ~ 10	15	120±19.55

○ 핵이식배의 apoptosis rates

체외수정란과 핵이식 수정란의 세포사멸율을 비교한 결과는 Table 15과 같다. 체외생산 유래 수정란의 세포사멸율은 2.6%였으며, 핵이식 수정란의 세포사멸율은 5.7%로 나타나 체외수정란 보다 세포사멸율이 다소 높게 나타났다.

난할 및 배반포 단계에서 BCL-2 gene의 높은 표현을 지니지만, 좋은 형태의 난할 단계와 배반포 단계에서 BAX gene의 낮은 표현을 보이고 이러한 BAX 표현은 폭넓은 fragmentation을 지닌 배반포에서 증가됨을 보였다 (Yang 등, 2002). 이들 관찰은 착상전 수정란 발달 중 몇몇 apoptosis-관련 유전자를 표현하는 apoptosis 수정란을 확인하고, apoptosis가 활성화될 때 심한 변화를 겪음을 보였다.

핵이식란에서 apoptosis의 비율은 배양기간이 증가함에 따라 증가한다. cytoplasmic fragmentation, 발달중지 및 nuclear condensation은 apoptosis를 겪는 수정란의 특징이다. TUNEL assay는 배반포의 질을 평가하고 수정란의 다른 grade를 선택하는 방법이다. 착상전 핵이식란에서 핵 및 세포질에서 몇몇 특별한 변화가 apoptotic pathway를 야기할 수 있다. 특히 착상전 수정란 발달 단계 중에 apoptosis pathway의 활성화를 금함으로써 핵이식란의 발달능을 개선시킬 수 있을 것이다.

Table 15. TUNEL analysis of bovine embryos by IVF or NT

	No. of		
	Embryo	Total cells	Apoptosis(%)
IVF	10	1198	31(2.6)
NT	15	1512	86(5.7)

○ 소 핵이식배의 이식 후 수태율

핵이식 후 배양배지에 따른 수정란 이식 후 수태율을 비교한 결과는 Table 16과 같다. 핵이식 후 TCM-199 배지에 소 난관상피세포와 공배양하여 생산된 수정란을 이식한 군에서 수태율이 29.41%(5/17)로 나타났으며, 단순배양배지인 CR1, CR2배지에서 배양하여 생산된 수정란을 이식한 군에서도 22.22%(2/9)로 비슷한 결과를 나타내었다.

공여세포가 핵이식 후 생산된 복제 수정란의 수태율에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 17와 같다. 태아섬유아 유래 체세포를 이용하여 생산된 핵이식 수정란의 이식 후 수태율은 7두 중 4두가 임신이 확인되어 57.14%로 귀세포 유래 핵이식 수정란의 이식 후 수태율은 15.8%(3/19)보다 매우 높은 결과를 나타냈다.

체세포 핵이식란은 형태적으로 적어도 배반포 단계까지는 결함이 없는 성공적인 재프로그래밍을 보이지만, 할구 핵이식란에서 조차도 임신 중에 유산, 조산, 사산 및 거대산자의 출생등이 증가하는 것으로 보고되고 있다 (Wilson 등, 1995; Garry 등, 1996; Kruip와 den Daas, 1997). 체세포 핵이식에 의해 태어난 산자도 생시체중이 커지는 경향이 있는데, Zakhartchenko 등(1999a)은 이들 이상이 공여핵에 의한 것이라기 보다는 복제과정이나 체외배양체계의 결과일 것이라고 하였다. Young 등(1998)은 거대산자 증후군에 영향을 미치는 요인으로서 공여핵으로 제공되는 체세포의 크기나 형태적인 것이 영향한다고 하였다. 이런 거대산자 증후군은 핵이식 뿐만 아니라 대부분의 체외조작시 나타나는 현상으로 배반포의 elongation 과정시 내세포피에 비해서 영양막 세포가 우선적으로 증식하여 태반이 정상보다 커짐으로 말미암아 이후 태아의

성장에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 이러한 현상의 원인으로서는 착상전 수정란의 체외조작 혹은 체외배양시 성장에 관여하는 하나 또는 그 이상의 유전자 발현 이상, 탈핵시 세포질의 제거, 배양시 세포질의 fragmentation, 세포질내 미토콘드리아의 손상, 외래 progesterone의 투여 및 asynchronous embryo transfer등을 들 수 있는데 세포질의 부분적 제거 및 fragmentation은 핵과 세포질내 소기관의 정상성에 장애를 가져오고 착상 전후의 외래 progesterone의 투여는 영양막 세포의 조기 elongation을 유발하는 것으로 알려져 있다. 배양시 첨가하는 혈청 또한 genome 혹은 미토콘드리아와 같은 세포질내 소기관에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 혈청 대신 BSA 및 아미노산을 사용한 경우 미토콘드리아의 변성현상이 나타나지 않는 것으로 보고 되기도 하였다 (Dorland 등, 1994). 이와 같은 결함들은 배아, 태아 또는 태반 발달 동안 특히 임신유지에 중요한 단계에서 이들에 관계된 유전자의 발현이 부적절하기 때문인 것으로 사료된다.

Table 16. Effects of different culture methods on the pregnancy after transfer of blastocysts by NT

	No. of	
	Embryo transfer	Pregnancy (%)
TCM+ BOEC	17	5 (29.41)
CR1+CR2	9	2 (22.22)

Table 17. Effects of different donor fibroblast cells on the pregnancy after transfer of blastocysts by NT

Cell type	No. of	
	Recipients	Pregnancy(%)
Fetal fibroblast cell (Hanwoo)	7	4 (57.14)
Ear cell (Brindle coated Hanwoo)	19	3 (15.8)

○ 핵이식 유래 수정란의 이식 후 유산 발생시기 조사

핵이식 유래 수정란의 이식 후 유산 발생시기에 관한 조사결과는 table 18과 같다. 총 26두의 수란우에 수정란 이식을 실시하여 7두가 이식 후 45일령에 임신이 확인되었으며, 42 - 90일령에 유산된 이식우가 2두였다. 또한 90-150일령에 3두가 150일 이후에 1두가 유산되어 총 7두의 임신우중 5두가 유산되어 71.43%의 유산율을 나타내었다. Kato 등(2000)이 134두의 수란우에 다양한 세포를 이용하여 생산한 복제수정란을 이식하여 37.31%의 수태율과 수태두수 50두 중 27두의 유산을 보고하여 54%의 유산율을 보고한 결과와 같이 유사한 결과를 나타냈다

Table 18. The abortion timing of embryos or fetus produced by NT

Embryo transfer	No. of		Days of abortion (%)		
	Pregnant	Abortion(%)	42~90	90~150	150~
26	7	6(23.08)	2(40.0)	3(50.0)	1(16.67)

○ P₄ 농도에 의한 조기 배사멸과 임신율을 조사

P₄ 농도에 의한 조기 배사멸과 임신율을 조사한 결과는 Table 19과 같다. 체외생산 수정란과 복제수정란을 이식한 후 14일에 혈중 P₄ 농도를 조사한 결과 체외수정란을 이식한 군에서는 30두 중 19두가 비임신으로, 11두는 임신으로 판단되었으며, 복제수정란을 이식한 군에서는 12두 중 1두가 비임신으로, 11두가 임신으로 판명되었다. 그러나 60일에 임신진단을 실시한 결과 체외수정란 이식우군에서는 4두만이 임신이 확인되었으며, 복제수정란 이식우군에서는 5두가 임신으로 확인되어 복제수정란과 체외수정란 공히 50-60%의 조기 배사멸이 있음을 추정할 수 있었다.

Table 19. Early embryonic death and pregnant rates on the concentration of progesterone

Embryo	No. of recipient	P ₄ concentration(%)		Pregnancy
		≤1	≥3	
IVF	30	19 (63.33)	11(36.67)	4(36.36)
NT	12	1(8.33)	11(91.67)	5(45.45)

○ 수란우의 주기별 혈액내 호르몬 농도의 비교

복제 수정란을 이식 받은 수란우를 대상으로 7일 간격으로 혈액을 채취하여 혈액 내 P4 농도를 비교한 결과 Fig. 2와 같이 임신우에서 이식일과 14일령에 높은 P4 농도를 2 ng/ml 이상으로 유지하고 있는 반면 비임신군에서는 14일령에 대부분 P4 농도가 2 ng/ml 이하로 나타나 상반된 결과를 나타냈다. 비임신우와 임신우의 주기별 IGF1 농도는 유사한 결과치를 보였다 (Fig. 3). Niemann 등(1985)과 김 등(2000)은 임신 수란우와 비임신 수란우 사이에 progesteron 농도의 차이가 없다는 결과와 상반된 결과를 나타냈으나, 2 ~ 5 ng/ml 수란우 군이 2 ng/ml 미만의 수란우 군에 비해 수태율이 향상되었다는 결과와는 같은 결과를 나타내었다.

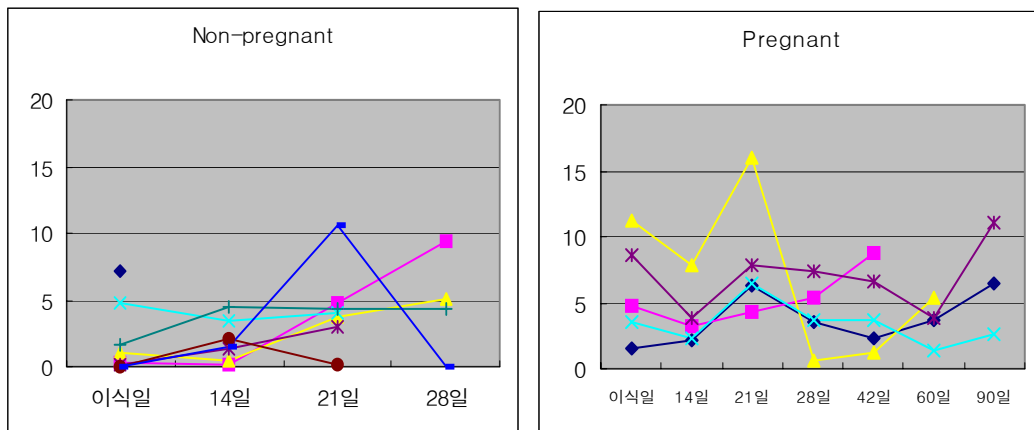


Fig. 2. Comparison of P4 concentration between pregnant and non-pregnant cows.

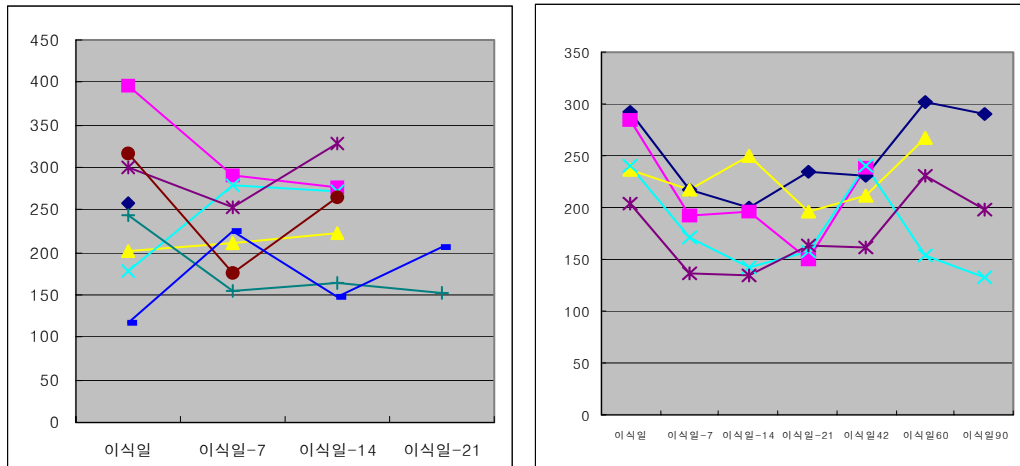


Fig. 3. Comparison of a periodic IGF-1 concentration between pregnant and non-pregnant cows

○ 복제 송아지의 유도분만

한우 태아섭유아세포 유래 체세포복제 수정란을 이식한 후 272일째에 dexamethason 20 mg을 근육주사하고 24시간 후 PGF_{2α} 25 mg과 estradiol 20 mg을 근육주사하여 분만을 유도하였다.

Dexamethason 투여후 48시간만에 분만징후를 나타냈으며, 50시간째에 40 kg의 수송아지를 견인에 의해 정상적으로 분만시켰다.

○ 복제 송아지의 생시체중 비교

복제 수정란 이식 후 태어난 복제 송아지의 생시체중을 조사한 결과 Table 20과 같다. 체외수정란 유래 한우 송아지의 생시체중은 21.4 - 38.4 kg으로 평균 27.8 kg이었으며, 복제송아지 중 분만직후 폐사한 송아지의 생시체중은 평균 36.8 kg으로 (18.0~46.8) 분만 후 생존한 복제송아지의 생시체중의, 32.0 kg 보다 (24.0 - 40.0) 4.8 kg이 더 나가는 것으로 조사되었으며, 체외수정란 유래 송아지 생시체중 보다는 각각

9.0과 4.2 kg이 더 나아가 체외수정 유래 송아지 보다 더 과체중으로 생산됨을 확인할 수 있었다.

복제한우의 단태와 쌍태에 의한 송아지 생시 체중을 비교한 결과 Table 21와 같이 단태일 때 34.0 kg(24.0~ 40.0)으로 쌍태의 25 kg (18.0~ 28.0) 보다 무려 9 kg이나 더 나가는 것으로 조사되었다. 상기의 결과는 Kato 등(2000)이 일본 육우의 암컷(27 kg) 과 수컷 (38 kg) 보다 높은 36.6 kg와 49.3 kg의 체세포 복제송아지의 생산을 보고한 결과와 매우 유사한 결과를 나타냈다. 또한 분만 후 폐사한 복제송아지의 병리해부학적 소견에서 2두는 분만 10일 전임에도 불구하고 다른 일반 송아지에 비하여 미성숙된 양상을 보였다. IBR, BVD, Akabane, Aino, Chuzan, Blucella에는 음성반응이 나타났으나, Neospora에 양성반응을 보였다.

Table 20. Comparison of birth weight between calves produced from IVF and NT

		No. of Calf	Weight (kg)
IVP	live	22	27.8(21.4~38.4)
Clone calf	dead	5	36.8(18.0~46.8)
Clone calf	live	8	32.0(24.0~40.0)

Table 21. Comparison of birth weight between single and twin cloned calves

	No. of Calf	Weight (kg)
Single	12	34.0(24.0~40.0)
Twin	4	25(18.0~28.0)

○ 복제 송아지의 혈액의 일반적 성분 조사

복제 송아지의 분만 후 혈액을 채취하여 혈액의 일반적 성분을 조사한 결과 Table 22과 같다. 복제수정란 유래 송아지 중 분만직후 폐사한 송아지의 일반적 혈액성분은 WBC 16.24, RBC 6.62, HB 8.08, HCT 30.58, MCV 43.6, MCH 12.3, MCHC 28.26으

로 나타났으며 분만직후 생존한 송아지의 일반적 혈액성분은 WBC 39.00, RBC 8.74, HB 13.0, HCT 45.0, MCV 35.0, MCH 10.0, MCHC 24.0으로 나타났다.

특히 분만 후 폐사한 송아지는 WBC, HCT의 수치가 체외수정란 유래 송아지와 생존한 복제송아지의 일반적 수치보다 매우 낮게 나타났다.

Table 22. Blood compositions of calves produced from IVF and NT at birth

		WBC	RBC	HB	HCT	MCV	MCH	MCHC
IVP	live	52	9	11	41	45	27	27
Clone calf	dead	16.24	6.62	8.08	30.58	43.6	12.3	28.26
Clone calf	live	39	8.74	13	45	35	10	24

○ 복제송아지의 주기별 혈액 일반성분

복제 송아지의 출생에서부터 분만 후 56일까지 14일 간격으로 혈액을 채취하여 분석한 결과 Fig. 4a 와 4b에서 보는바와 같이 일반 한우 송아지와 비슷한 양상을 보였다

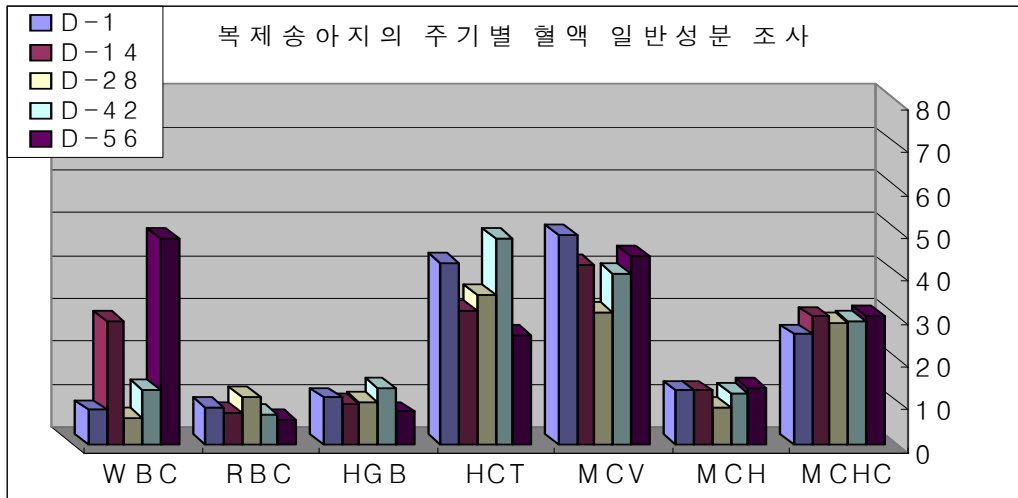


Fig. 4a. Comparison of blood compositions of cloned calves according to time period

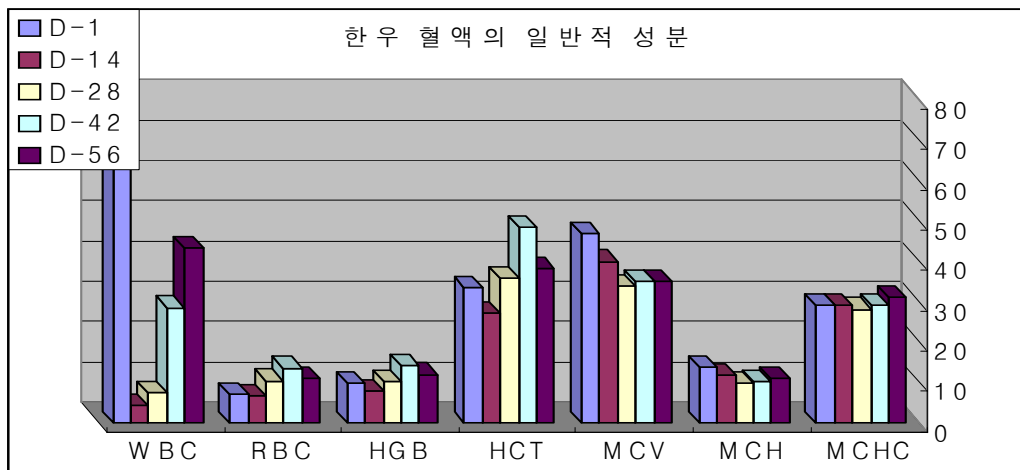


Fig. 4b. Comparison of blood compositions of normal Hanwoo according to time period

○ 복제 한우와 일반한우의 혈액내 Glucose와 Insulin의 농도

복제 한우와 일반한우의 혈액내 Glucose와 Insulin의 농도를 주기별로 조사한 결과 Fig 5와 같이 복제소의 생후 1일, 14일, 28, 48, 62, 92일에 혈액내 Glucose 농도가 각각 23, 5, 128, 55, 81, 55 mg/dl로 나타났으며, Insulin의 농도는 각각 nd, 2.3, 5.1, 1.2, 7.5, 0.5 mIU/ml로 나타났다. 일반한우의 생후 1일, 14일, 28, 48, 62, 92일에 혈액내 Glucose 농도가 각각 93, 75, 125, 28, 119, 109 mg/dl로 나타났으며, Insulin의 농도는 각각 7.4, 5.2, 11.9, 6.9, 13.0, 9.9 mIU/ml로 나타났다. 특히 복제송아지의 생후 14일 glucose 농도가 5 mg/dl로 일반한우의 같은 일령의 glucose 농도 75 mg/dl 보다 현저하게 낮게 나타났다.

또한 복제송아지의 혈액내 insulin 농도는 14일, 48일과 92일에 각각 2.3, 1.2와 0.5 mIU/ml로 일반한우의 5.2, 6.9와 9.9 mIU/ml 보다 매우 낮게 나타났다.

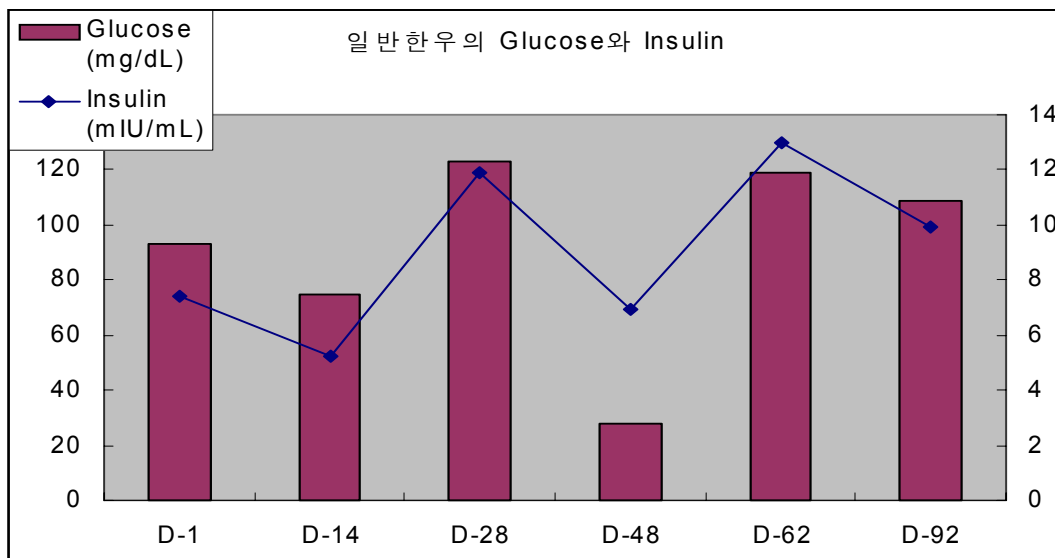


Fig. 5a. Analysis of the concentration of glucose and insulin in blood of normal calves

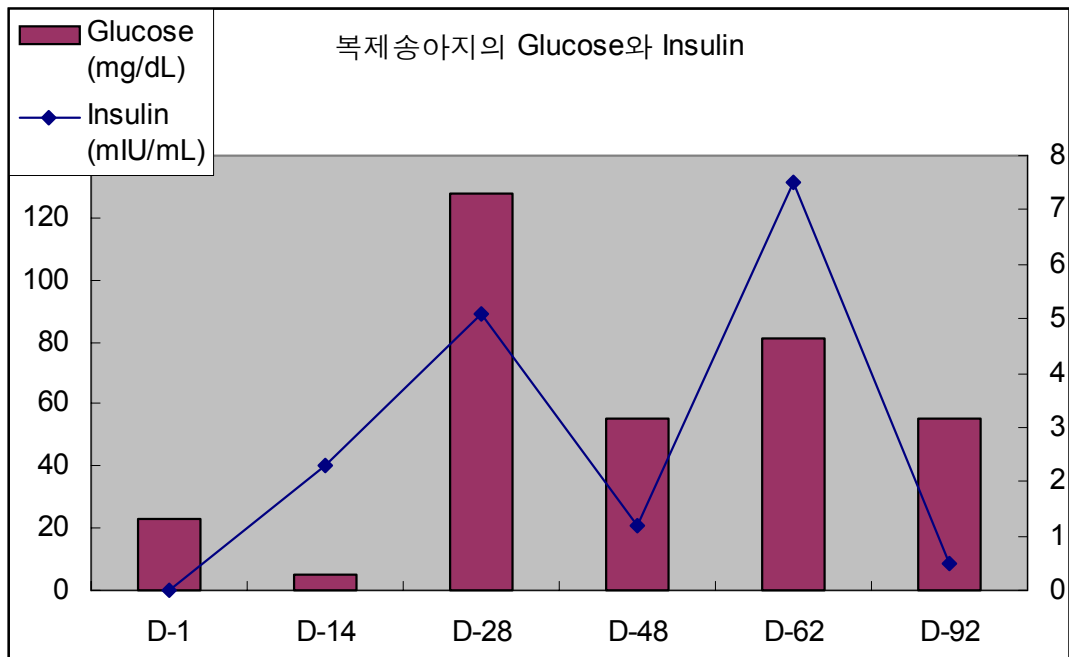


Fig. 5b. Analysis of the concentration of glucose and insulin in blood of cloned calves

○ 복제 수정란과 체외수정란의 Dnmt1 expression pattern

복제수정란과 체외수정란에서 methylation pattern을 분석하고자 Dnmt1 antibody를 이용하여 confocal microscope를 이용하여 관찰한 결과 Fig 6와 같다. Dnmt1은 난자의 초기성장에서 핵에 축적되지만 성숙된 난자의 세포질에 격리되며, 2-4세포기 수정란에서도 세포질에 고루 분포한다. 8세포기 수정란에서 특이하게 핵에 존재하다 배반포기에는 다시 세포질에서 Dnmt1을 관찰할 수 있다. 본 실험 결과 복제수정란과 체외수정란에서 동일한 발현양상을 관찰 할 수 있었다.

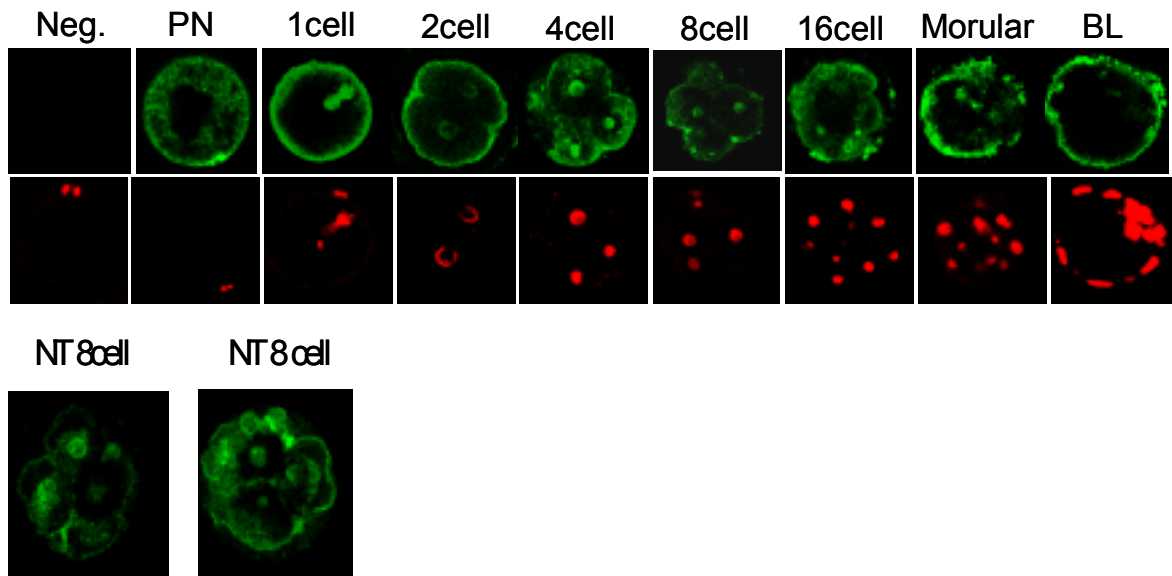


Fig. 6. Immunostaining of IVF or NT bovine embryos with the Dnmt1 antibody

○ 복제한우의 친자감별 결과

공시된 3개의 시료로 13개의 microsatellites로 분석된 최종결과가 Fig. 8에 나타내었다. 이표에서 공여우인 BFC와 대리모 104에서 생산된 송아지간에 분석되어진 13개의 microsatellite loci에서 모두 일치하는 유전자형을 갖는 것으로 분석되어 졌다. 이로써 대리모에서 태어난 송아지는 BFC의 체세포 핵이식에 의한 탄생된 송아지임을 확인할 수 있었다.



Fig. 7. Extraction of Genomic DNA from blood or cells

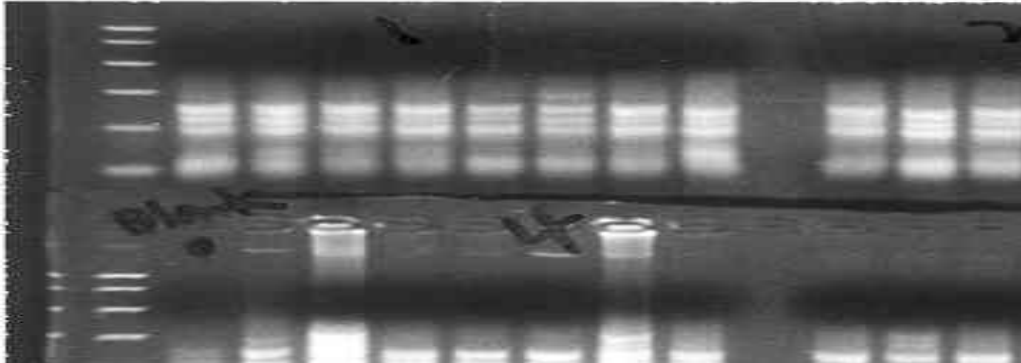


Fig. 8. Electrophoresis after multiplex PCR of cattle microsatellite

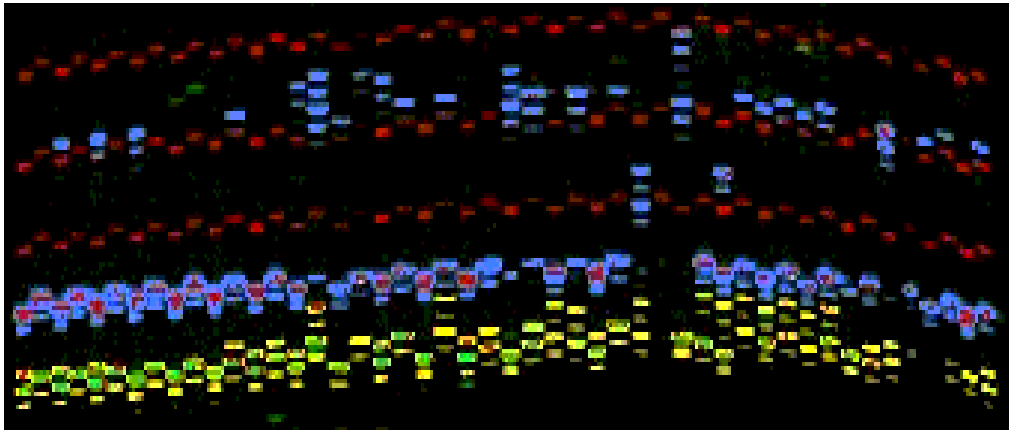


Fig. 9. Genescan pattern of microsatellite using ABI 377 DNA sequencer

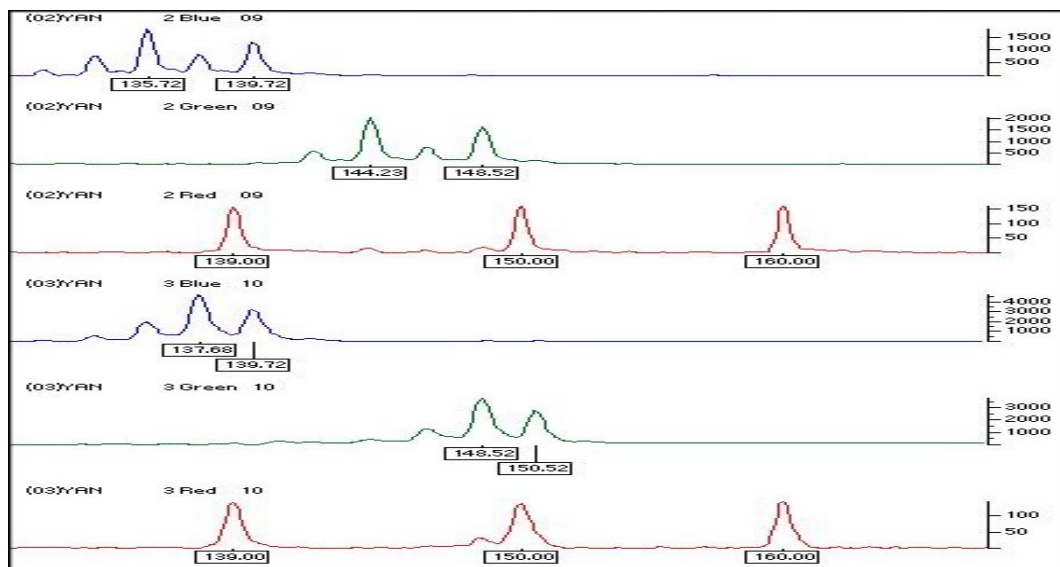


Fig. 10. Individual genotype using Genotyper program

Table 23. Confirmation of cloned calf using microsatellite loci method

	Primer																									
	A ^a	B		C		D		E		F		G		H		I		J		K		L		M		
Donor ^b	186	186	182	182	153	153	84	86	119	119	222	226	186	186	124	124	173	173	131	151	291	297	135	135	149	155
receptient	184	186	180	182	153	165	84	94	119	125	222	222	184	186	122	122	171	179	131	155	295	295	141	141	165	165
cloned calf	186	186	182	182	153	153	84	86	119	119	222	226	186	186	124	124	173	173	131	151	291	297	135	135	149	155

a; cattle microsatellite loci,

b; BFC

A; ILSTS005, B; BM1824, C; TGLA122, D; TGLA227, E; TGLA126, F; ILSTS103,

G; ETH10, H; ILSTS013, I; ILSTS023, J; ILSTS028, K; ILSTS006, L; MGTG4B,

M; ILSTS050

○ 복제한우의 육성

정상적으로 분만한 복제한우 중 3두를 대상으로 육성을 실시한 결과 생후 4개월령에 폐사되었으며, 병리진단 결과 다른 장기의 이상과 다른 세균 및 바이러스성 질병 소견은 나타나지 않았으나 소합포성폐렴(Bovine Respiratory Syncytial Virus; BRSV)와 아카노발테리아 폐렴으로 폐사되었다. 또한 2두의 송아지도 생후 6개월령에 급성 폐렴으로 폐사되었다.

따라서 본 연구 결과 복제 송아지는 해부학적 이상 보다는 폐렴과 같은 질병의 2차 감염에 취약하고 치료효과도 매우 저하되는 것으로 사료된다.



Fig. 11. The photographs of cloned Hanwoo calves. left: single, right: twin cloned calves.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절. 연구개발의 목표 달성도

본 연구는 3년간의 연구를 수행함에 있어서 1차년도는 복제수정란의 생존률 향상을 위하여 체세포 배양조건을 확립하여 이를 공여세포로 이용하여 복제 수정란의 생산 조건을 확립하였다. 복제 수정란을 이식하기 적합한지 평가하기 위하여 형태학적 분석기술을 개발하였다. 이렇게 생산된 복제 수정란을 적합한 시기에 이식하기 위하여 장기 보존할 수 있는 항동해제를 개발하여 복제 수정란을 동결 보존하였다. 이렇게 생산되고 보존한 복제수정란을 현장에 가서 이식 후 수태율 증진을 위한 이식 기술을 수행하였다. 2차년도에는 다양한 종류의 체세포를 확보하여 이용함으로써 우수 체세포를 확보하고 우수체세포를 확보하기 위해 준비한 여러 체세포를 복제 수정란 생산에 이용함으로써 여러 체세포에 의한 복제 수정란 생산 조건을 확립한다. 복제수정란의 보존을 위한 최적의 동결조건을 확립하였다. 또한 동결융해후 복제수정란의 생사감별과 등급을 평가하였다. 이러한 복제 수정란을 이식하였고, 임신 초기 배사멸과 유산최소화를 위한 기술을 개발하였다. 3차년도에는 이식하기에 적합한 복제수정란을 선별하기 위하여 생산된 복제수정란을 TUNEL의 방법을 이용하여 이식하기 적합한 등급을 결정하는 등급화 기술을 개발하였다. 배 발생능력을 예측하기 위해서 분석기술을 개발하였다. 배 발생능력이 우수한 복제수정란을 선별하여 이식을 하였고, 이를 통해 생산된 체세포 복제 송아지의 성장을 조사하였다.

따라서 이들 3년간의 걸친 연구의 결과는 보다 효율적으로 소 복제수정란 생존율 및 복제소 생산을 향상을 위한 연구에 귀중한 자료로 활용되리라 본다.

제 2 절. 대외 기여도

소 복제수정란 생존율 및 복제소 생산율 향상을 위한 기술개발을 위한 연구수행 과정에서 얻은 각종 결과들의 활용을 통해 다음과 같은 관련 분야의 기술 발전에 기여할 수 있는 학문적 기초를 갖추게 되었다.

- 포유동물의 수정, 발생, 분화 및 생리기전에 관한 기초 연구 자료를 제공하여 줌으로서 전반적인 동물 생명공학의 발전에 기여하였다.
- 핵이식기법을 응용한 형질전환 수정란 또는 내병성 수정란의 대량 복제생산이 가능해져 형질전환 소나 내병성 소의 창출을 가능하게 하였다.
- 첨단 기술의 국내개발 가능성을 제시하여 농업 분야에서의 첨단기술 개발의 기폭제로 작용할 것이다.
- 능력개량을 기존 인공수정기술 대비 3배이상 가속하는데 기여하였다.
- 복제수정란 이식기법을 이용한 고능력 소의 농가 보급으로 생산성 증대에 의한 농가 소득증대에 기여할 것이다.
- 개발된 기초기술은 학술지 논문을 통해 관련 연구진과 산업계에 보급함으로써 우수인력 양성을 가능케 했다.
- 연구과정에서 얻어질 다수의 특허를 산업화의 기초로 활용 가능하다.
- 형질전환 수정란의 대량 복제생산 체계에의 활용에 기여하였다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구는 체세포 복제수정란의 생존율을 높이고 장래성이 보장되는 우량 복제수정란을 선별하는 각종 기술을 개발함으로써 체세포 복제소를 축산현장에 보급함으로써 축산업이 경쟁력 제고와 농가소득 증대에 기여하고자 한다.

- 고능력 소 복제수정란의 대량 생산 체계 확립에 기초 연구에 활용
- 우수 복제수정란의 선별적 이식에 의한 임신율 제고기술 개선에 활용
- 현장이식 최적 수정란 선별법 개선방안 마련에 활용
- 복제수정란의 동결융해 기술 개발에 의한 우수 유전자의 시간적, 공간적 제약 극복에 활용
- 복제수정란의 대량공급을 위한 bank system 기틀 마련
- 소 복제수정란 이식 최적 모델 설정에 활용
- 배사멸과 유산에 대한 조기진단 기술의 개발에 활용
- 조기 배사멸의 복잡한 원인을 체계있게 구명할 수 있는 기술적 접근에 활용
- 조기 배사멸과 embryo간의 연관성을 조사할 수 있는 기술에 활용
- 조기 배사멸과 유산시기를 고려하여 그 발생율을 최소화할 수 있는 기술 개발에 활용
- 임신성립과 유지에 대한 생리적 기전 구명에 활용
- 임신우의 사양관리 기술개발에 활용
- 본 기술을 국내 여타기관 또는 산업체에 이전하여 관련 기술인력 양성에 활용
- 금후 형질전환 가축생산 등 기술적 기반 확보에 활용
- 가축생산기술의 첨단화에 의한 농가소득의 증대와 국내축산업의 국제경쟁력 강화에 크게 기여에 활용
- 농가에서 동결된 복제수정란을 직접 이식함으로써 현장 적용성 증진에 활용
- 고품질 우량형질의 브랜드화 달성(국제경쟁력 확보 및 수출 촉진)에 활용
- 복제수정란 이식기법을 이용한 고능력 소의 농가 보급으로 생산성 증대에 의한 농가 소득증대에 활용
- 체세포 복제기법을 통한 우량형질 수정란의 대량 복제 생산체계에의 활용
- 고급육 생산율 향상에 의한 브랜드화에 기여에 활용

- 개발된 기초기술은 학술지 논문을 통해 관련 연구진과 산업계에 보급에 활용
- 연구과정에서 얻어질 다수의 특허를 산업화의 기초로 활용
- 소 고급육과 수입육과의 차별화; 수입 개방에 대응한 경쟁력 구축에 활용
- 형질전환 수정란의 대량 복제생산 체계에의 활용

또한 본 연구는 지속적인 추가 연구를 통하여 기술체계 확립에 의한 연구결과를 국내 유사기관에 이전하여 공동으로 활용시 국제경쟁력이 있는 축산업의 산업화가 실현 될 수 있을 것이다.

제 6 장 참고문헌

- Annelies EP, Wouter G. Van Inzen, Tanja AE, Van Acheterberg, Kruip, Theo AM, DeLaat Siegfried. and Weima Sjerp M. 1993. Nuclear transfer and electrofusion in bovine *in vitro*-matured/*in vitro*-fertilized embryos; Effect of media and electrical fusion parameters. Mol Reprod Dev 36:307-312.
- Abe H, Yamashita S, Satoh T, and Hoshi H. 2002. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. Mole Re prod Dev 61:57-66.
- Abe H, Yamashita S, Satoh T, and Hoshi H.1999. Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro*-matured and -fertilized oocytes; comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free or in serum-supplemented medium. Mole Reprod Dev 53:325-335.
- Baguishi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempes MM, Gammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter GA, 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. Nature Biotechnology 17:456-451.
- Beththausen 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, Bishop M.(2000): Production of cloned pigs from *in vitro* systems. Nat Biotechnol. 18(10):1055-9.
- Booth PJ, Vajta G, Hoj A, Holm P, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. (1999): Full-term development of nuclear transfer calves produced from open-pulled straw (OPS) vitrified cytoplasts: work in progress. Theriogenology.

1:51(5):999-1006.

Bordignon V, Smith LS. 1998 Telophase enucleation; an improved method to prepare recipient cytoplasts for use in bovine nuclear transfer. *Mol Reprod Dev* 49; 29-36

Bureau WS, Bordignon V, Leveillee C, Smith LC, King WA. 2003. Assessment of chromosomal abnormalities in bovine nuclear transfer embryos and in their donor cells. *Cloning stem cells* 5(2); 123-132.

Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA, Robl JM. (1998): Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*. 22;280(5367):1256-8.

Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon, FA and Robl JM. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*. 280:1256-1258.

Diez C, LeBourhis D, Heyman Y, Renard JP. (1996): Effect of partial lipid removal from *in vitro* produced bovine zygotes on further development *in vitro* and on the freezing tolerance of blastocysts. *Theriogenology*,41:167.

Dinnyes A, Dai Y, Jiang S, Yang X. (2000): High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod*. 63(2):513-8.

Dinnyes A, Dai Y, Jiang S, Yang X. (2000): High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod*. 63(2):513-8.

Dominko T, Mitalpova M, Haley B, Beyhan Z, Memili E, McKusick B and First NL. 1999. Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian

- species. Biol Reprod. 60:1496-1502.
- Donnay I, Auquier P, Kaidi S, Carolan C, Lonergan P, Mermillod P, Massip A. (1998): Vitrification of *in vitro* produced bovine blastocysts: methodological studies and developmental capacity. Anim Reprod Sci. 21;52(2):93-104.
- Durnford R, Suubbings RB and Ainsworth L.1994. Evaluation of culture systems containing bovine oviduct epithelial cells or granulosa cells to mature and maintain the developmental competence of bovine oocytes *in vitro*. Theriogenology. 42; 261-272.
- Elbling L, Colot M. A method for analysing sister-chromatid exchange in mouse preimplantation embryos. (1985): Mutat Res. 147(1-2):23-8.
- Gary FB, Adams R, McCann JP and Odde KG. 1996. Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. Theriogenology. 45:141-152.
- Goto K, Iwai N, Takuma.Y and Nakanishi Y. 1992. Co-culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with different cell monolayers. J Anm Sci. 70; 1449-1453.
- Goto Y, Kaneyama K, Kobayashi S, Imaj K, Shin-Noh M, Tsujino T, Nakano T, Matsuda S and NaKane S. 1999. Birth of cloned calves derived from cultured oviductal epithelial cells of a dairy cow (Rapid comunication). J Anim Sci. 70:243-245.
- Gustafsson H, Jaakma U and Shansuddin M. 1994. Viability of fresh and frozen-thawed biopsied bovine embryos. Acta Vet Scand 35; 217-222.
- Hill JR, Roussel AJ, Cibelli JB, Edwards JF, Hooper NL, Miller MW, Thompson JA, Looney CR, Westhusin ME, Robl JM and Stice SL. 1999. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13case studies). Theriogenology. 51:1451-1465.

- Hurt AE, Landim-Alvarenga F, Seidel GE Jr, Squires EL. (2000): Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. *Theriogenology*. 1;54(1):119-28.
- Im GS, Yang BS, Park SJ, Chang WK and Park CS. 2000. Effect of fusion procedure on the development of embryos produced by somatic cell nuclear transfer in Hanwoo (Korean cattle). *Korean J. Animal Reprod.* 24(4):365-373.
- Ito K, Otake S, Hirabayashi M, Hochi S, Ueda M. (1998): Cryopreservation of *in vitro*-derived bovine blastocysts microinjected with foreign DNA at the pronuclear stage. *Theriogenology*. 50(7):1093-100.
- Iwata H, Akamatsu S, Minami N, Yamada M. (1999): Allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase, improves the development of IVM/IVF bovine embryos (>4 cell) *in vitro* under certain culture conditions. *Theriogenology*. 51(3):613-22.
- Kaidi S, Donnay I, Van Langendonck A, Dessy F, Massip A.(1998): Comparison of two co-culture systems to assess the survival of *in vitro* produced bovine blastocysts after vitrification. *Anim Reprod Sci.* 30;52(1):39-50.
- Kaidi S, Van Langendonck A, Massip A, Dessy F, Donnay I. (1999): Cellular alteration after dilution of cryoprotective solutions used for the vitrification of *in vitro*-produced bovine embryos. 52(3):515-25.
- Kato M, Yamnouchi K, Ikawa M, Okabe M, Naito K and Tojo H. 1999. Efficient selection of transgenic mice embryos using EGFP as a marker gene. *Mol Reprod Dev.* 54:43-48.
- Kato Y, tani T, Sotonaru 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 and Tsunoda Y. 2000. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 120, 231-237.
- Keskintepe L and Bracket. BG. 2000. Cryopreservation of bovine blastocysts obtained by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 53; 1041-1052.
- Khurana NK, Niemann H. (2000): Effects of cryopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts derived *in vitro* or *in vivo*. *Theriogenology*. 15;54(2):313-26.
- Koo DB, Choi YH, Park JS, Kim HN, Kang YK, Lee CS, Han YM, Park HD and Lee KK. 2000. *In vitro* development of bovine nuclear transfer embryos reconstructed with fetal fibroblasts. *Korean J. Animal Reprod.* 24(4):407-417.
- Kruger TF, Stander FS, Smith K, Van der Merwe JP and Lombard CJ. 1987. The effect of serum supplementation on the cleavage of human embryos. *J In vitro Fertil embryo Trans* 4:10-12.
- Kruip Th, AM and den. Daas JHG. 1997. *In vitro* produced and cloned embryos; effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology*. 47: 3-52.
- Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, Mizoshita K, Tabara N, Barber M, Yang X. (2000): Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1;97(3):990-5.
- Kuhholzer B, Tao T, Machaty Z, Hawley RJ, Greenstein JL, Day BN, Prather RS. (2000): Production of transgenic porcine blastocysts by nuclear transfer. *Mol Reprod Dev.* 56(2):145-8.
- Lavoit MC, Rumph N, Moens A, King WA, Plante Y, Johnson WH, Ding J and Betteridge KJ. 1997. Development of bovine nuclear transfer embryos made

- with oogonia. Biol Reprod. 56:194-199.
- Lazar L, Spak J, David V. (2000): The vitrification of *in vitro* fertilized cow blastocysts by the open pulled straw method. Theriogenology. 1;54(4):571-8.
- Le Gal F, Gasqui P, Renard JP. (1995): Evaluation of intracellular cryoprotectant concentration before freezing of goat oocyte. Cryobiology, 16:3-12.
- Li guang-peng, Chen da-yuan, Lian li, Han zhi-ming, Zhuzi-yu and Georgee Seidel Jr. 2002. Rabbit cloning ; Improved fusion rates using cytochalasin B in the fusion buffer. Mol Reprod Dev. 61:187-191.
- Lim JM, Okitsu O, Okuda K and Niwa K. 1994. Effect of fetal calf serum in culture medium on the development of bovine oocyte matured and fertilized *in vitro*. Theriogenology 41:1091-1098.
- Lim JM, Ko JJ, Hwang WS, Chung HM, Niwa K. (1999) Development of *in vitro* matured bovine oocytes after cryopreservation with different cryoprotectants. Theriogenology. 51(7):1303-10.
- Mahmoudzadeh AR, Van Soom A, Bols P, Ysebaert MT, de Kruif A.(1995): Optimization of a simple vitrification procedure for bovine embryos produced *in vitro*: effect of developmental stage, two-step addition of cryoprotectant and sucrose dilution on embryonic survival. J Reprod Fertil. 103(1):33-9.
- Martinez AG, de Matos DG, Furnus CC, Brogliatti GM. (1998): *In vitro* evaluation and pregnancy rates after vitrification of *in vitro* produced bovine embryos. Theriogenology. 1;50(5):757-67.
- Martino A, Songsasen N, Leibo SP.(1996): Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. Biol Reprod. 54(5):1059-69.

- Nguyen BX, Sotomaru Y, Tani T, Kato Y, Tsunoda Y. (2000) Efficient cryopreservation of bovine blastocysts derived from nuclear transfer with somatic cells using partial dehydration and vitrification. *Theriogenology*. 15:53(7):1439-48.
- Nguyen BX, Sotomaru Y, Tani T, Kato Y, Tsunoda Y. (2000): Efficient cryopreservation of bovine blastocysts derived from nuclear transfer with somatic cells using partial dehydration and vitrification. *Theriogenology*. 15:53(7):1439-48.
- Nimann H, sacher B and Elsaesser F. 1985. pregnancy rates relative to recipient plasma progesteron levels on the day of nonsurgical transfer of frozen/thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 23:631-639.
- Nour MS, Takahashi Y.(1999): Preparation of young preactivated oocytes with high enucleation efficiency for bovine nuclear transfer. *Theriogenology*. 51(3):661-6.
- Ogawa T and Marrs RP. 1987 The effect of protein supplementation on single-cell mouse embryos *in vitro*. *Fertil Steril*. 47:156-161.
- Ogawa T, Ono TN and Marrs RP. 1987. The effect of serum fractions on single-cell mouse embryos *in vitro*. *J In vitro Fertil embryo Trans*. 4:153-158.
- Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, Perry AC.(2000): Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*. 18:289(5482):1188-90.
- Otoi T, Koyama N, Yamamoto K, Horikita N, Tachikawa S, Suzuki T. (2000): Developmental competence of frozen-thawed blastocysts from fair-quality bovine embryos cultured with beta-mercaptoethanol. *Vet J*. 159(3):282-6.

- Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S, Suzuki T. (1998): Cryopreservation of mature bovine oocytes by vitrification in straws. *Cryobiology*. 37(1):77-85.
- Palasz AT, Thundathil J, De La Fuente J, Mapletoft RJ. (2000): Effect of reduced concentrations of glycerol and various macromolecules on the cryopreservation of mouse and cattle embryos. *Cryobiology*. 41(1):35-42.
- Paul JB, Dorthe V, Shijian T, Peter H, Torben G and Henrik C. 2003. Numerical chromosome errors in Day 7 somatic nuclear transfer bovine blastocysts. *Biol Reprod*. 68; 922-928.
- Paynter SJ, Cooper A, Fuller BJ, Shaw RW. (1999): Cryopreservation of bovine ovarian tissue: structural normality of follicles after thawing and culture *in vitro*. *Cryobiology*. 38(4):301-9.
- Pinyopummintr T and Bavister BD. 1991. *In vitro*-matured/*in vitro*- fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. *Biol Reprod*. 45:736-742.
- Pinyopummintr T and Bavister BD. 1994. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium; Effect of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology* 41: 1241-1249.
- Polejaeva IA, Campbell KH. (2000): New advances in somatic cell nuclear transfer: application in transgenesis. *Theriogenology*. 1;53(1):117-26. Review.
- Rexroad Cejr. 1989. Co-culture of domestic animal embryos. *Theriogenology*. 31; 105-114.
- Rorie R, Xu WKP and Betteridge KJ. 1990. Effect of culture on the post-thawed viability of cryopreserved, *in vitro* fertilized bovine embryos. *Theriogenology*.

33:311 (abstr.).

Rowe RF, Del Campo MR, Critser JK, Ginther OJ. (1999): Cryopreservation of bovine ovarian tissue: structural normality of follicles after thawing and culture *in vitro*. *Cryobiology*. 38(4):301-9.

Salamone DF, Valdez A and Baranao JB. 2002. Development of bovine IVF embryos in a CR1 culture medium supplemented with albumin or serum. *Thriogeneology*. 55; 312.

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(3):527-35.

Sommerfeld V, Niemann H. (1999): Cryopreservation of bovine *in vitro* produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology*. 38(2):95-105.

Takano H, Kozai C, Shimizu S, Kato Y and Tsunoda Y. 1997. Cloning of bovine embryos by multiple nuclear transfer. *Theriogenology*. 47; 1365-1373.

Tanaka H.(1999): Influence of the timing of blastomere isolation after the removal of nocodazole in bovine nuclear transfer. *Theriogenology*. 51(7):1225-37.

Tatham BG, Giliam KJ and Trounson AO. 1996. Electrofusion parameters for nuclear transfer predicted using isofusion contours produced with bovine embryonic cells. *Mol Reprod Dev*. 43:306-312.

Tominaga K, Hamada Y, Yabuue T, Ariyoshi T. (2000) Effect of linoleic acid - albumin on post-thaw survival of *in vitro*-produced bovine embryos at the 16-cell stage. *J Vet Med Sci*. 62(4):465-7.

- Tominaga K, Shimizu M, Ooyama S, Izaike Y. (2000): Effect of lipid polarization by centrifugation at different developmental stages on post-thaw survival of bovine *in vitro* produced 16-cell embryos. *Theriogenology*. 53(8):1669-80.
- Tsunda Y, Tokugawa T, Okubo Y and Sugie T. 1987. Beneficial effect of agar for the frozen storage of bisected goat embryos. *Theriogenology*. 28; 317-322.
- Ushijima H, Yamakawa H, Nagashima H. (1999): Cryopreservation of Bovine Pre-morula-stage *In Vitro* Matured/*In Vitro* Fertilized Embryos after Delipidation and before Use in Nucleus Transfer. *biol. reprod.*, 60:534-539.
- Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. (1996): Factors affecting survival rates of *in vitro* produced bovine embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. *Anim Reprod Sci*. 16;45(3):191-200.
- Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. (1998): Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev*. 51(1):53-8.
- Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR and Yanagamachi R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394; 369-374.
- Wakayama T, Yamagimachi R (1999): Cloned of male mice from adult tail-tip cells. *Nature Genet* 22:127-128.
- Well DN, Misica PM, 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, Day AM, Peterson AJ, Tervit HR. (1998): Cloning sheep from cultured embryonic cells. *Reprod Fertil Dev*. 10(7-8):615-26.

- Wells DN, Misica PM, Tervit HR.(1999): Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod.* 60(4):996-1005.
- Wells D, Palva M, Misica H, Robin T and William H, Vivanco. 1998. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby island cattle bree. *Reprod Fertil Dev.* 10:369-378.
- White Kenneth L, Thomas D, Bunch SM and William AR. 1999. Establishment of pregnancy after the transfer of nuclear transfer embryos produced from the fusion of argali (*Ovis ammon*) nuclei into Domestic sheep(*Ovis aries*) enucleated oocytes. *Cloning.* 1:47-54.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS (1997): Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813.
- Wilson JM, Williams JD, Bondiolo KR, Looney CR, Westhusin ME and McCalla DF. 1995. Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. *Anim Repro Sci.* 38:73-83.
- 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 re-cloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts. *J Reprod Fertil.* 115(2):325-31.
- Zakharchenko V, Scherthaner WP, Brem G and Wolf E. 1997. Karyoplast-cytoplasm volume ratio in bovine nuclear transfer embryos; effect on development potential. *Mol Reprod Dev.* 48:332-338.
- Zakhartchenko V, Scherthaner W, Prella K, Stojkovic P, Brem G and Wolf E. 1999a. Nuclear transfer in the bovine embryo: Developmental potential of

- cultured adult cells. *Theriogenology*. 51:218.
- Zakhartchenko V, Wolf E, Palma GA and Brem G. 1995. Effect of donor embryo cell number and cell size on the efficiency of bovine embryo cloning. *Mol Reprod Dev*. 42:53-57.
- Zawada WM, Cibelli JB, Choi PK, Clarkson ED, Golueke PJ, Witta SE, Bell KP, Kane J, Ponce de Leon FA, Jerry DJ, Robl JM, Freed CR, Stice SL.(1998): Somatic cell cloned transgenic bovine neurons for transplantation in parkinsonian rats. *Nat Med*. 4(5):569-74.
- Zimmermann U and Vienken J. 1982. Electric field-induced cell to cell fusion. *J. Membrane Bio*. 67:165-182.
- 김상근, 유상식, 김용섭.1998. 소 동결 미성숙난자의 생존율과 체외수정율에 관한연구. *한국가축번식학회지* 22:207-211.
- 김은영, 김남형, 이봉경, 윤산현, 박세필, 정길생, 임진호. 1998. 전자현미경 grid를 이용한 초급속 동결이 소 난포란의 발달능에 미치는 영향 II.체외성숙된 소 미수정란의 동결에 관한 연구. *한국가축번식학회지* 22:1-9.
- 김은영, 김덕임, 박노형, 원유석, 남화경, 이금실, 박세영, 윤산현, 박세필, 정길생, 임진호. 1999. 체외생산된 한우 배반포기로부터 송아지 생산을 위한체계 II.한우 배반포기배를 간편하면서 효율적이고 성공적으로 유리화 동결하는 방법. *한국번식학회지* 23:293-301.
- 김은영, 김덕임, 박노형, 원유석, 남화경, 이금실, 박세영, 윤산현, 박세필, 정길생, 임진호. 1999. 체외생산된 한우 배반포기로부터 송아지 생산을 위한체계 III. 한우 배반포기의 초자화 동결과1단계 융해. *한국가축번식학회지*. 23:303-311.
- 김은영, 박세필, 김덕임, 박노형, 원유석, 남화경, 이금실, 박세영, 박은미, 윤지연, 이훈택, 정길생, 임진호. 2001. Systems for Production of calves from

Hanwoo(Korean Cattle) IVM/IVF/IVC Blastocyst. Reproductive and Developmental Biology 1호.

김일화, 류일선, 서국현, 이동원, 박수봉, 김현중, 연성흙, 박성재, 허태영, 이충섭, 최선호, 손동수. 2000. 수란우의 초음파진단에 의한 난소 상태 및 혈청 progesteron 농도가 수정란 이식후 수태율에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지15(3); 263-270.

박세필, 김은영, 김덕임, 박노형, 원유석, 윤산현, 정길생, 임진호, 1998, 체외생산된 한우배반포기배로부터 송아지 생산을 위한 체계 I. 체외생산된 한우배반포기배의 초자화 동결보존. 한국번식학회지 22:349-358.

오성중, 양보석, 이명식, 백광수, 성환후, 정진관, 임경순. 1995. 직접이식을 위한 소 체외수정란의 동결 융해후 생존성 및 수태율에 미치는 영향. 한국가축번식학회지 19:49-54.

이금실, 김은영, 이봉경, 남화경, 윤산현, 박세필, 임진호. 1999. 체외생산된 소 완전탈출 배반포기배의 동결보존. 한국가축번식학회지 23:141-148

이명식, 오성중, 양보석, 백광수, 성환후, 정진관, 장원경, 박수봉. 1994. 소체외수정란의 초자화 동결에 관한연구. 한국가축번식학회지 18:251-256.

이호준, 윤종택, 노상호, 정연길, 박용습, 최은주, 이종완, 김용엽, 정혜영. 1999. 소 체외수정란의 배양조건이 동결-융해 배반포의 생존에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지14(3); 163-169.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.