

GOVP1199904587

636.2
L2930

최 종
연구보고서

유전자전환 한우 수정란의 복제기법 개발에 관한 연구

Cloning of Transgenic Embryos by Nuclear
Transplantation in Korean Native Cattle

연구기관
경 상 대 학 교

농 립 부

최 종 보 고 서

1995년도 농림수산기술개발사업에 의하여 완료한 유전자전환 한우 수정란의 복제기법 개발에 관한 연구 과제의 최종보고서를 붙임과 같이 제출합니다.

- 붙임 : 1. 최종보고서 8 부
2. 최종보고서 디스켓 1매

1998. 12. 21.

주관연구기관 : 경상대학교

총괄연구책임자 : 이 효 종 (인)

주관연구기관장 : 경상대학교 총장

직 인

농 립 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “유전자전환 한우 수정란의 복제기법 개발에 관한 연구”

과제의 최종보고서로 제출합니다.

1998 . 12 . 21

주관연구기관명 : 경상대학교

총괄연구책임자 : 이효종

연 구 원 : 박충생

” : 최상용

” : 최민철

” : 이경광

협동연구기관명 : 서울대학교

협동연구책임자 : 이 항

요 약 문

I. 제목 : 유전자전환 한우 수정란의 복제기법 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

근년에 국민소득이 높아짐에 따라 쇠고기의 소비가 급격히 증가하였을 뿐만 아니라 고급육의 수요가 증가하고 있는 추세이나 WTO 체제 출범으로 세계적으로 무역장벽이 무너지고 무한경쟁의 시대에 직면하여 경쟁력이 낮은 우리나라 축산업도 가축의 품종개량, 생산성 향상, 생산비 절감방안 등을 시급히 수립해야할 처지에 이르렀다. 한우는 우리 기호에 맞는 재래가축이지만, 증체량과 육질면에 있어서는 개량이 더욱 되어야 농가소득 증대와 경쟁력이 향상될 것으로 본다. 최근 선진국에서는 생명공학기술의 개발로 이를 해결해 나가고 있다. 특히, 수정란이식기술과 유전자재조합기술은 괄목할 만한 발전을 거듭하여 일부 실용화단계에 이르렀다. 우리나라에서도 한우의 성장과 육질개선을 위한 형질전환 기술과 번식효율 향상을 위한 복제기술의 개발이 절실하다고 본다.

근래에 유전자재조합기술과 미세조작기술의 발달로 포유동물 수정란에 외래유전자를 도입하고 이를 대리모에 이식하여 후대에 발현시킬 수 있게 됨으로써 형질전환동물(transgenic animal)의 생산이 가능하게 되었다. 이러한 형질전환동물생산기술은 (1) 가축에서 육질개선과 성장속도의 조절 등 생산성향상을 통한 더욱 효율적이고 질 좋은 축산식품의 생산, (2) 희귀한 단백질이나 약물을 양이나 소의 유선에서 생산하는 분야에의 이용, (3) 동물의 질병에 대한 저항성의 증가, (4) 질병과 생체기작에 관한 연구에 있어서 매우 독특하고 유용한 질환모델동물의 생산 등에 있어서 획기적인 기여를 할 가능성이 있기 때문에 세계 각국은 이 기술의 산업화를 위하여 막대한 투자를 하고 있다. (Reviews; Pursel 과 Rexroad, 1993; Brem, 1993; Grosveld 와 Kollias, 1992)

한편, 핵이식기술(nuclear transplanted technique)은 유전적으로 동일한 복제동물을 대량 생산하는데 가장 효율적인 방법일 뿐만 아니라 경제적으로 유익한 가축에서 수정란에 주입된 외래유전자나 고능력 동물에서의 우수한 유전자를 복제하고 선발하는데

매우 유리하므로 종축의 선발강도를 극대화하는 데에도 가장 효율적인 방법이다. 축산에서 고능력 가축을 복제생산함으로써 얻을 수 있는 효과가 매우 크기 때문에 선진각국에서는 이에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 또한, 본 연구에서 개발하고자 하는 PCR분석 및 GFP검색에 의한 유전자의 조기분석과 핵이식기법을 병용하면 형질전환된 수정란을 다량 확대 보급할 수 있으므로써 형질전환동물의 생산효율을 향상시키고 아울러 가축의 번식과 개량에 있어서 종래에 사용되어 오던 교배법이나 인공수정법에서 탈피하여 번식효율을 증진시키는데 새로운 전기를 마련할 수 있을 것이다. 형질전환 동물은 미국을 위시한 선진국에서 특허로 등록되어 오고 있어서 이의 도입에 따른 기술적 어려움과 외화지불을 절감하기 위하여서는 국내에서의 기술개발이 필요하다. 그리고 복제동물 생산기법은 특히 우리나라와 같이 우량 종축의 자원이 부족한 실정에서는 외국에서 값비싼 종축을 다량 수입하지 않고서도 짧은 기간에 종축을 증식 및 확보하는데 매우 효과적인 방법이다. 또한 복제동물은 정교한 동물실험에서 개체간의 차이를 줄일 수 있어서 정확한 실험성적을 얻는데 매우 유익하게 사용될 수 있을 뿐만 아니라 실험에 사용될 동물의 수도 줄일 수 있어서 적은 반복수로 정확한 정보를 얻는데 유익하며, 복제동물은 서로 간에 거부반응이 적으므로 장기이식 연구 등에도 이용될 수 있는 등 이용가치가 매우 높다.

본 연구에서는 그간 익혀온 경험과 축적된 기술을 바탕으로 하여 체외배양-체외수정된 한우 수정란을 사용하여 이미 그 발현이 확인된 바 있는 사람성장호르몬 유전자(hGH fusion gene) 또는 GFP gene을 외래유전자로 사용하여 이를 한우 수정란에 미세주입(microinjection)을 실시하고 8-세포기에서 상실배기까지 체외발달시켜 이들을 핵공급원(nuclear donor)로 이용하여 핵이식을 실시하며 핵이식된 수정란을 다시 체외에서 배양발달시킴으로써 다수의 형질전환된 복제수정란을 창출하는 기법을 개발하고자 하며, 분석기법을 활용하여 복제수정란에서의 유전자의 통합과 발현을 조기감별함으로써 형질전환 동물의 생산효율을 향상시킬 수 있는 기법을 개발하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 한우에서 초음파유래 및 도축 난소유래 난포란 체란기술의 개발과 체외 수정란의 다량 생산

본 연구에서는 한우에서 초음파 유도로서 우수한 수정란을 체외에서 생산하는 기술을 개발하고, 또한 도축 한우의 난소로부터 다량의 난자를 체란하여 체외수정란을 다량 생산하는 기술을 개발함으로써 본 연구에서 추구하는 유전자전환 수정란의 생산과 조기선별 및 핵이식에 의한 이들 유전자전환 수정란의 복제에 관한 기술개발에 사용하고자 하였다. 본 연구를 수행하는 과정에 난포란의 체란을 위한 FSH 전처리의 효과를 조사하고, 소에서 과배란을 유도하기 위하여 종래에는 FSH를 12시간 간격으로 6회 반복 투여하여야 하는 번거로움을 개선하기 위하여 이 호르몬을 polyvinylpyrrolidone 용매에 녹혀 단일투여로서 과배란을 유도하는 기법을 활용하여 난포란의 성숙효과를 조사하였으며, 초음파체란을 위한 한우의 마취방법을 개선하고자 하였다. 또한 초음파 유도 및 도축 난소에서 난포란의 체란률과 체외발달율을 비교조사하여 체외 수정란 생산효율을 알아 보고자 하였다.

2. 외래유전자의 준비와 유전자 전환 수정란의 생산

본 연구에서는 외래유전자가 들어있는 plasmid를 *E. Coli*에 transformation 시켜 대량생산하고 이 plasmid를 restriction enzyme으로 필요한 부분만큼의 외래유전자를 절단하고 이를 토끼와 한우 수정란내에 미세주입하여 유전자전환 수정란을 작출하였다. 이 수정란을 체외에서 배양하여 이들의 체외발생능과 유전자 주입에 따른 생존력에 미치는 영향을 조사하였고, 이들 수정란이 8-세포기에서 상실배기까지 자라면서 PCR 및 GFP 분석을 통하여 분리된 각 할구세포 또는 수정란에서의 외래유전자의 integration 효율을 비교조사하였다. 또한 수정란에 주입된 유전자의 조기 확인과 선별을 통한 형질전환동물생산기술을 향상시키기 위한 한 방법으로 수정란 할구세포에서 주입된 유전자의 존재 또는 발현을 확인하기 위하여 PCR 및 GFP 분석기법을 개발하고자 하였다.

3. 핵이식에 의한 유전자전환 수정란의 복제생산

핵이식 기법을 이용하는 데는 수핵난자의 활성화와 탈핵의 확인여부 및 핵-세포질간의 상호작용이 필수적으로 선행되어야 핵이식 수정란의 체외발달률 및 산자생산효율이 향상될 것으로 사려된다. 또한 이러한 유전자의 조기분석과 핵이식기법을 병용하여 형질전환된 수정란을 다량 생산하면 형질전환동물의 생산효율을 향상시킬 수 있을 것이다.

본 연구에서는 예비실험으로 토끼를 사용하여 유전자전환 수정란의 체외생산과 핵이식기법을 사용하여 이를 복제하는 기술을 익힌 다음 한우를 대상으로 본실험을 수행하였다. 토끼와 소에서 GFP유전자를 이용하여 형질전환 수정란을 생산한 보고와 이 유전자를 이용하여 핵이식으로 복제한 예가 보고된 문헌을 접하지 못하여 토끼를 모델동물로 사용하여 MT-hGH 또는 GFP gene을 외래유전자로 사용하여 옹성전핵 내에 미세주입하고, 이들 수정란의 체외배양체계를 구축하고자 하였으며, MT-hGH gene을 주입한 토끼 수정란의 분할세포기에 따른 유전자의 존재여부를 PCR과 형광현미경으로 검색하고 유전자가 주입된 수정란을 이용하여 복제수정란의 생산효율과 8-16 세포기의 까지 체외발달시켜 이들에서의 gene integration 을 PCR 분석 및 GFP의 형광현미경검정으로 확인한 다음 이들을 미세조작기법과 전기핵융합법을 활용하여 핵이식을 실시하여 복제된 형질전환 수정란을 생산하고자 하였다. 나아가서 이를 토대로 하여 한우에서 유전자전환 수정란의 생산과 복제에 관한 일련의 실험을 수행하였다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 한우에서 초음파유래 및 도축 난소유래 난포란 채란기술의 개발과 체외수정란의 다량 생산

본 연구는 한우에서 초음파 유도로 우수한 난포란을 채란하는 기술개발과 도축난소로부터 난포란을 채란하여 다량의 수정란을 생산하기 위한 배양체계를 구축하기 위하여 한우에서 초음파채란을 위한 마취방법의 개선, FSH 처리시의 단일주사법(single-dose technique), 초음파 유도 및 도축 난소에서의 난포란의 채란기술 및 체외성숙, 체외수정 및 체외배양체계를 구축하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1) 한우 수정란의 인공생산 및 핵이식을 위한 공핵 수정란과 수핵 난자의 다량확보를 위한 도축한우의 난소로부터 난포란을 채란하여 체외성숙기법 및 체외수정기법을 활용하여 체외유래 난자 및 수정란을 생산하는 실험은, 난소 하나당 평균 8.7개의 난포란을 채집하였고, Grade I 인 난자를 사용하였을 때 83.5%의 체외수정율을 얻어 비교적 높고 안정된 성적을 얻었다.

2) 우수한 한우로부터 발생능이 좋은 다수의 난자를 직접 채란하기 위하여, 초음파기기를 이용하여 난자의 채란기술 개발과 이들을 이용한 체외수정란 생산을 시도하였다. 한우에 FSH를 투여하여 한 마리당 평균 22.9개의 난포란을 발달시켰으며, 이들로부터 초음파로서 평균 12.7개의 난포란을 채집하였다.

3) 한우에서 다량의 난포란 성숙을 유도하기 위한 FSH의 single dose 기법을 개발하기 위하여 FSH를 PVP 용액에 희석하여 1회 주사하였던 바, 이를 생리식염수에 희석하여 12시간 간격으로 6회 주사하였던 바와 같은 수준으로 난포란의 성숙이 촉진되었고, 채란효율도 유의적 차이가 없었으므로 이 기법의 활용이 노력과 동물의 스트레스를 줄이고 시간적 및 경제적 절약에 도움이 된다고 본다.

4) 한우에서 초음파채란을 하기 위하여서 xylazine 제제로 진정시키고, Monzal로서 평활근 이완을 일으킨 다음, lidocaine 으로 미추 경막외마취를 실시하여 통증자각 없이 초음파 채란이 용이하였다.

5) 도축장유래 또는 초음파유래 체외수정란의 다량 확보와 핵이식후 체외발달을 향상을 위하여 수정란의 체외배양체계를 구축하고자 난관상피세포와 공배양을 실시하여 괄목할만한 체외배양 성적을 얻었다. 체외수정란의 배반포기까지의 발달율은 39.2%로 매우 향상되었다.

6) 초음파 유도과 도축장 유래 난소에서 채란된 난포란의 체외 수정률 및 배발달률의 결과는 두 군간에 유의적 차이를 나타내지 않았으므로 초음파 유도에 의한 난포란 채란과 체외수정란 생산기술은 실용성이 있다고 본다.

2. 외래유전자의 준비와 유전자전환 수정란의 생산 및 유전자 검색

토끼 및 한우 수정란의 응성전핵 내에 MT-hGH 유전자와 GFP 유전자를 미세주입하여 유전자전환 수정란을 작출하고, PCR-screening 및 GFP-screening으로 주입된 유전자의 존재여부 및 발현을 조기에 확인하여 유전자전환 수정란의 선별기술을 개발하고자 그리고 앞으로 이들 선별된 수정란의 할구를 이용하여 핵이식기법으로 형질전환된 수정란을 다량 복제를 실시함으로써 형질전환동물 생산기술을 향상시키고자 일련의 실험을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MT-hGH 유전자를 토끼 수정란에 미세주입하고 체외배양기법으로 배반포까지 발달을 시킴으로써 체외에서 유전자전환 수정란 생산기술을 확립하였다. 배반포기까지의 발달율은 60.9%로서 매우 안정적이고 비교적 높은 수준이다.

2. 소 수정란에 MT-hGH 유전자를 주입하여 이들의 분할율을 조사함으로써 주입성공율을 확인하였던 바, 총 72개의 주입된 수정란 중 48개가 분할하여 66.7%의 주입성공율을 보였고, buffer만 주입하였던 대조군에서도 57.5%의 분할율을 보여 유전자 주입이 50%이상 성공적으로 일어났음을 확인하였다.

3. 유전자 주입시기에 따른 토끼수정란의 배반포까지의 체외발달능력과 배반포에서 PCR 로 유전자 검출율을 조사한 바, 주입시기에 따른 배반포기까지의 체외발달률과 PCR 검출률은 유의적 차이를 나타내지 않았다.

4. MT-hGH 유전자를 주입한 토끼 수정란을 체외배양하여 배반포로 발달한 것에서 PCR screening한 결과, 25% 만이 양성반응을 보여 발생도중 많이 소실됨을 확인하였고 아울러 조기선별이 유효함을 확인하였다. 그리고 할구별 PCR-screening에서도 2- 및 4-세포기 할구에서 각각 84, 77%의 양성반응을 보였으나 8- 및 16-세포기 할구에서는 유의적($P < 0.05$)으로 낮은 25%의 양성반응을 보여 단일 할구에서도 PCR 검색에 의한 양성판정이 가능함을 확인하였다.

6. 유전자가 주입된 소 수정란을 난관상피세포와 공배양을 실시하였던 바, 48개중 9개가 배반포기로 발달하여 18.7%의 발달율을 보였다.

7. 토끼수정란에 GFP 유전자를 주입한 후 체외배양한 결과, 배반포기까지의 발달률은 67.6%였다. 이들 배반포 중에서 형광현미경으로 확인된 GFP 유전자의 발현율은 30.6%였다. 그리고 형광현미경 상에서 음성으로 나타난 8개의 배반포는 PCR screening에서도 모두 음성으로 나타났다.

8. 한우 수정란에 GFP 유전자를 주입한 후 체외배양한 결과, 배반포기까지의 발달률은 17.0 %였다. 이들 배반포중에서 형광현미경으로 확인된 GFP 유전자의 발현율은 11.8 % 였다.

3. 핵이식기법의 개발과 토끼 및 한우 수정란의 복제생산

1. 미세조작한 난자를 Ionomycin과 6-DMAP로 활성화 처리시 탈핵되지 않은 난자중 98.87%가 돌기모양의 제 2극체를 돌출하는 것을 확인하였다.

2. 핵이식기법을 개선하여 새방법(new method)을 사용할 때 96.8% 의 탈핵률 보여 탈핵효율이 향상되었다.

3. 기존탈핵법과 새로운 탈핵법을 사용하여 핵이식시 핵이식 수정란에서 핵융합률과 배반포까지의 발달률은 각각 80.4%와 39.3% 및 88.2%와 33.3%로서 유의적 차이를 나타내지 않아 실용성이 있다고 본다.

5. 한우에서 체외배양 24시간에 탈핵된 수핵난자의 성숙도에 따른 융합율 및 발달율을 조사한 바, 24, 28 및 32시간의 융합율은 64.8, 71.0 및 87.3% 로써 체외배양 32시간의 수핵난자에서 높게 나타났고, 상실배기와 배반포기까지의 발달율에 있어서도 체외배양 32시간의 난자에서 12.7%로 가장 높았고, 28 시간은 9.1%였다.

6. 한우 핵이식배의 융합율은 preactivation(85.8%)이 non-preactivation(71.7%) 보다 좋은 성적이었고, 상실배기 및 배반포기로의 발달율은 preactivation(24.2%)과 non-preactivation (12.8%)에서 유의적($P < 0.05$) 차이가 인정되었다. 따라서 핵이식수정란의 융합과 발달율을 상승시키기 위해서 탈핵 후 활성화자극을 가하고 핵이식과 전기 융합을 실시하는 것이 효과적임을 알 수 있었다.

4. 핵이식에 의한 유전자전환 수정란의 복제생산

토끼 및 한우 수정란의 응성전핵 내에 MT-hGH 유전자와 GFP 유전자를 미세주입하여 유전자전환 수정란을 작출하고, PCR-screening 및 GFP-screening으로 주입된 유전자의 존재여부 및 발현을 조기에 확인하여 유전자전환 수정란의 선별기술을 개발함과 아울러 선별된 수정란의 할구를 이용하여 핵이식기법으로 형질전환된 수정란을 다량 복제를 실시함으로써 형질전환동물 생산기술을 향상시키고자 일련의 실험을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) MT-hGH 유전자를 주입하여 8- 및 16-세포기로 자란 수정란을 공핵란으로 사용하여 핵이식을 실시하였던 바, 세포융합률은 각각 60.0%, 62.8%로 비슷하였으나 정상수정란을 공급핵으로 사용한 80.4%보다 유의적으로 낮은 융합률을 보였다. 그러나 이들 복제수정란의 체외발달률은 처리군간에 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

2) 유전자 주입 후 8- 및 16-세포기로 자란 수정란의 할구를 이용하여 핵이식으로 복제하고 체외에서 배반포까지 자란 수정란을 PCR-screening 으로 유전자를 검출한 결과, 각각 23%와 33%의 유전자 양성 수정란을 감별하였다.

3) 토끼수정란에 GFP 유전자를 주입한 후 체외배양한 결과, 배반포기까지의 발달률은 67.6%였다. 이들 배반포중에서 형광현미경으로 확인된 GFP 유전자의 발현율은 30.6%였다. 이들 GFP 양성반응 11개의 배반포를 PCR screening한 결과, 45.5%가 양성으로 검출되었다. 그러나 형광현미경 상에서 음성으로 나타난 8개의 배반포는 PCR screening에서도 모두 음성으로 나타났다.

4) 형광현미경으로 GFP 유전자가 양성으로 판정된 상실배기의 수정란에서 할구를 분

리하여 공핵란으로 사용하여 핵이식한 결과, 핵이식란의 세포융합률은 78.2%였고, 배반포기까지의 체외발달률은 21.3%로 나타났다. 그리고 이들 복제된 13개의 배반포를 형광현미경으로 조사하였더니 GFP 유전자의 발현률은 100% 양성을 나타내었으므로 유전자전환 수정란의 복제효율이 우수함을 확인하였다.

5. 연구개발 결과의 활용방안

가) 한우에서 초음파 유도로 난포란을 채란하는 기술을 개발함으로써 고능력 한우로부터 우수한 수정란을 실험실에서 다량 생산이 가능하여 한우의 개량 및 번식에 매우 유익하게 활용할 수 있다.

나) 도축된 한우의 난소로부터 난포란을 채란하여 다량의 수정란을 생산하기 위한 체외조작과 배양체계를 구축함으로써 체외수정란의 다량생산과 적은 비용으로 확보하는데 활용 가능하다. 이는 앞으로 국내 수정란이식을 통한 한우의 번식에 있어서 그 효과가 크다고 사려되며 이의 실용화를 앞당기는데 도움이 될 것이다. 나아가서 핵이식에 의한 유량 한우의 복제생산과 형질전환 한우의 생산에 크게 도움이 된다.

다) 소에서 FSH 처리시의 단일주사법(single-dose technique)을 개발함으로써 수정란이식 및 체외수정란 생산에 있어서 경비 및 노력의 절감 효과를 얻을 수 있다(6회에서 1회로 절감).

라) 한우 수정란에 유용한 유전자를 주입하고 이들을 상실배기 또는 배반포기까지 발달시켜 PCR 또는 GFP 분석을 통하여 유전자전환 수정란의 조기선별 기법을 개발하였다. PCR 분석법으로는 75% 이상 음성인 수정란을 가려낼 수 있으며, 한우 수정란에서 GFP 분석법으로는 88% 이상 음성인 수정란을 선별하였다. 이러한 기법을 이용함으로써 형질전환 동물의 생산에 있어서 수란우의 수를 경감시키고 형질전환 한우 송아지 생산효률을 크게 향상시킬 수 있을 것을 사려된다.

마) 한우 수정란에서 이식전단계에서 PCR 기법으로 성감별하는 기법을 동시에 개발함으로써 수컷과 암컷 중 원하는 성의 송아지 생산이 가능하게 되었다. 이는 농가소득 증대에도 도움이 되지만 우유나 노를 통하여 유용물질을 생산하는 유전자전환 젖소 및 한우를 생산하는 데에도 유익한 기술이 된다.

바) 수정란의 할구세포 하나에서도 주입된 유전자의 존재/발현을 확인하는 기술이 개발되었다. 이는 앞으로 유전자전환 수정란의 다량 복제 및 조기감별에 유익한 기술이다.

사) 동물의 핵이식에 있어서 수핵난자의 탈핵방법을 개선함과 아울러 전환성화를 시키는 방법을 개발.활용함으로써 복제수정란 및 복제동물의 작출효과가 향상될 것으로 본다. 핵이식에 의한 복제동물 생산효율 향상은 앞으로 우량 한우의 번식과 개량에 매우 효과적으로 활용될 것으로 기대되며, 수정란 복제기술은 본 연구가 추구하는 형질전환 수정란의 조기 복제 및 산자생산 효율 향상에 매우 유익하게 활용될 것이다.

아) 앞으로 GFP 유전자를 reporter gene으로 활용하면 형질전환 수정란의 복제효율이 높아질 것으로 보며, 나아가 이들을 이식 전에 용이하게 선별할 수 있으므로 형질전환 동물의 복제생산에도 유익하게 활용될 수 있을 것으로 사려된다.

자) 핵이식기술로서 형질전환동물의 번식효율을 향상시킴으로써 하나의 수정란으로 부터 많은 복제된 형질전환 수정란을 작출할 수 있으며 이를 대리모에 이식하여 복제된 많은 수의 형질전환 동물을 생산함으로써 이용 효율을 극대화할 수 있고 나아가서 국내 축산업의 발전에 이바지할 것이다.

SUMMARY

(영문 요약문)

The technology of creating transgenic animals has a potential value in improving productivity and disease resistance of animals, gene therapy, drug pharming and production of model animals for certain diseases.

Up to date, Many techniques in gene transfer, beside microinjection, have been introduced and explored thus to improve the production efficiency of transgenic animals. But fairly low success rate of production of transgenic animals and a pronounced variability with respect to the expression of transgenes have been much observed. The mechanisms how to integrate the injected genes with a certain part of the genomes are unknown yet.

The present study was conducted to improve the efficiency of transgenic animal production by nuclear-transfer of foreign gene-injected embryos and to test the effectiveness of polymerase chain reaction(PCR) analysis and green fluorescent protein (GFP) expression in embryos as screening methods for the integration of injected gene in Korean native cattle and rabbits.

For the comparative study on the collection of bovine follicular oocytes by ultrasound-guided ovum pick-up(OPU) and slaughterhouse-derived(SHD) ovary aspiration and *in vitro* production of bovine embryos with the collected follicular oocytes in Korean native cows. Following follicle stimulating hormone(FSH) treatment in Korean native cows, the mean number of visible follicles(≥ 4 mm) was significantly($P < 0.05$) higher in the FSH treatment group(22.1 ± 5.8) than in the non-treatment group(7.0 ± 2.4). The total number and usable number of recovered oocytes per cow was significantly($P < 0.05$) higher in the FSH treated cows(14.0 & 6.3) than the non-treatment cows(3.7 & 1.3), respectively. The *in vitro* developmental rates to the blastocyst was not significantly different between the oocytes obtained via OPU(37.1%) and SHD(29.3%).

Therefore, the ultrasound-guided OPU technique can be applied to the production of excellent embryos from the high-quality cows, and for the large scale production

of *in vitro* bovine oocytes and embryos, also the SHD ovary aspiration method is valuable for mass production of bovine oocytes and embryos.

The rabbit zygotes were collected from the oviducts of mature female New Zealand White rabbits superovulated with eCG and hCG treatment and they were injected with two to three picoliters of MT-hGH or GFP gene into male pronucleus. The foreign gene-injected zygotes were cultured in TCM-199 or RD medium containing 10% FCS with a monolayer of rabbit oviductal epithelial cells in a 5% CO₂ incubator. The presence of injected DNA was detected by a nested PCR analysis and the expression of GFP was detected by observing green fluorescence in embryos under a fluorescent microscope.

The rate of *in vitro* development of the MT-hGH gene-injected rabbit and bovine zygotes to blastocyst was significantly lower than that of non-injected zygotes or buffer-injected controls. The rate of MT-hGH-positive embryos detected by the PCR analysis decreased significantly as the gene-injected zygotes developed to blastocysts. However, the rate of *in vitro* development to blastocyst was not significantly different whether the donor embryos were gene-injected or not.

Of the 43 blastocysts developed from the gene-injected and nuclear transferred embryos, twelve (28%) were MT-hGH gene-positive by PCR analysis.

We developed a new method of nuclear transplantation by preactivating the nuclear transplanted zygotes with ionomycin and 6-dimethylaminopurine in rabbits and bovine embryos. The preactivated nuclear transplanted bovine embryos developed to blastocyst at the rate of 23%.

Seventy three (67.6%) out of 108 GFP gene-injected rabbit embryos developed to blastocyst stage, among them 33 (45.2%) were fluorescence-positive. When the fluorescence-positive blastocysts were analyzed for the presence of GFP gene by PCR, 5(45.5%) out of 11 blastocysts were positive, and all of the 8 fluorescence-negative blastocysts were also negative by PCR.

Following nuclear transplantation of fluorescence-positive morula stage blastomeres, 13 (21.3%) out of 61 fused oocytes developed to blastocyst stage and all of them were fluorescence-positive.

These experimental results showed that the early screening and selection of

integration of the injected gene with embryonic genome by PCR and GFP-screening were promising methods. Further, the application of nuclear transplantation technology to cloning and multiplication of the positively integrated genes in the cleaving embryos and embryonic cells will be beneficially used for the mass production of transgenic embryos and consequently improving the production efficiency in transgenic animals.

CONTENTS
(영 문 목 차)

Abstract	3
Summary	13
Contents(English)	16
Contents	17
Chapter 1. Introduction	20
Chapter 2. Development of OPU techniques by ultrasound-guided aspiration and slaughter-house ovary aspiration in Korean native cows	28
Chapter 3. Preparation of MT-hGH and GFP genes, production of transgenic embryos and its screening by PCR	49
Chapter 4. Development of nuclear transplantation for the production of cloned embryos.....	72
Chapter 5. Cloning of transgenic embryos by nuclear transplantation	89
Chapter 6. Practical application of research works	106
Chapter 7. Expectation effects	108

목 차

제1장. 서론

제1절. 연구개발의 목적	20
제2절. 연구개발의 중요성.....	22
제3절. 연구개발의 목표 및 내용	25
제4절. 연구개발 추진체계	27

제2장. 한우에서 초음파유래 및 도축 난소유래 난포

란 채란기술의 개발과 체외수정란의 다량 생산

제1절. 서론	28
제2절. 재료 및 방법	29
제3절. 연구의 결과	35
제4절. 연구결과의 고찰	43
제5절. 연구의 결론	45
제6절. 참고문헌	46

제3장. 외래유전자의 준비와 유전자전환 수정란의 생

산 및 유전자 검색

제1절. 서론	49
---------------	----

제2절. 재료 및 방법	50
제3절. 연구의 결과	57
제4절. 연구결과의 고찰	65
제5절. 연구의 결론	67
제6절. 참고문헌	69

제4장. 복제수정란 생산을 위한 핵이식기법의 개발

제1절. 서론	72
제2절. 재료 및 방법	73
제3절. 연구의 결과	77
제4절. 연구결과의 고찰	82
제5절. 연구의 결론	85
제6절. 참고문헌	86

제5장. 유전자전환 수정란의 핵이식에 의한 복제

제1절. 서론	89
제2절. 재료 및 방법	90
제3절. 연구의 결과	95
제4절. 연구결과의 고찰	99
제5절. 연구의 결론	102
제6절. 참고문헌	103

제6장. 연구개발 결과의 활용방안	106
제7장. 기대효과	108

제1장. 서론

제1절. 연구개발의 목적

근래에 국민소득이 높아짐에 따라 육류의 소비가 급격히 증가하고 있을 뿐만 아니라 우리 기호에 맞는 고급육의 수요가 증가하고 있는 추세이다. 그러나 WTO 체제 출범으로 세계적으로 무한경쟁의 시대에 직면하여 우리나라 축산업도 가축의 품종개량, 생산성 향상, 생산비 절감방안 등을 시급히 수립해야할 처지에 이르렀으나 한우 비육사업에 있어서는 저렴한 고품질 쇠고기 생산이 수월하지 못 할 뿐만 아니라 값싼 쇠고기의 수입으로 농가에서 한우사육에 많은 어려움을 겪고 있다. 이에 대처하기 위한 한 방안으로 한우의 육질개선, 생산성 향상 및 번식효율 향상을 위한 기술개발이 절실하게 되었다. 최근 선진국에서는 생명공학기술의 개발로 이를 해결해 나가고 있다. 특히, 수정란이식기술과 유전자재조합기술은 괄목할 만한 발전을 거듭하여 일부 실용화단계에 이르렀다. 우리나라에서도 한우의 성장과 육질개선을 위한 형질전환과 번식효율 향상을 위한 복제기술의 개발이 절실하다고 본다.

근래에 유전자재조합기술(recombinant DNA technique)과 미세조작기술(micromanipulation technique)의 발달로 포유동물 수정란에 외래유전자를 도입하고 이를 대리모에 이식하여 후대에 발현시킬 수 있게 됨으로써 형질전환동물(transgenic animal)의 생산이 가능하게 되었다. 1980년 Gordon 등은 생쥐 수정란의 응성전핵내에 recombinant DNA를 주입하여 포유동물에서는 최초로 형질전환동물을 생산하는데 성공하였다. 그 이후 수많은 과학자들이 인류에 유익한 유전자를 재조합하고 이를 여러 동물에 도입시켜 왔으며, 생쥐 이외에도 소, 양, 돼지, 산양, 닭, 토끼, 물고기 등 많은 동물종에서 형질전환동물이 생산되었다. 이러한 형질전환동물생산기술(transgenic animal technology)은 (1) 가축에서 육질개선과 성장속도의 조절 등 생산성향상을 통한 더욱 효율적이고 질 좋은 축산식품의 생산, (2) 희귀한 단백질이나 약물을 양이나 소의 유선에서 생산하는 분야에의 이용(Pharming), (3) 동물의 질병에 대한 저항성의 증가, (4) 질병과 생체기작에 관한 연구에 있어서 매우 독특하고 유용한 질환모델동물의 생산 등에 있어서 획기적인 기여를 할 가능성이 있기 때문에 세계 각국은 이 기술의 산업화를 위하여 막대한 투자를 하고 있다. (Reviews; Pursel 과 Rexroad, 1993; Brem, 1993; Grosveld 와 Kollias, 1992)

한편, 핵이식기술(nuclear transplantation technique)은 유전적으로 동일한 복제동물

을 대량 생산하는데 가장 효율적인 방법일 뿐만 아니라 경제적으로 유익한 가축에서 수정란에 주입된 외래유전자나 고능력 동물에서의 우수한 유전자를 복제하고 선발하는데 매우 유리하므로 종축의 선발강도를 극대화하는 데에도 가장 효율적인 방법이다. 축산에서 고능력 가축을 복제생산함으로써 얻을 수 있는 효과가 매우 크기 때문에 선진 각국에서는 이에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

또한, 본 연구에서 개발하고자 하는 PCR분석 및 GFP검색에 의한 유전자의 조기분석과 핵이식기법을 병용하면 형질전환된 수정란을 다량 확대 보급할 수 있으므로써 형질전환동물의 생산효율을 향상시킴과 아울러 가축의 번식과 개량에 있어서 종래에 사용되어 오던 교배법이나 인공수정법에서 탈피하여 번식효율을 증진시키는데 새로운 전기를 마련할 수 있을 것이다. 형질전환 동물은 미국을 위시한 선진국에서 특히 등록되어 오고 있어서 이의 도입에 따른 기술적 어려움과 외화지불을 절감하기 위하여서는 국내에서의 기술개발이 필요하다. 또한 복제동물 생산기법은 특히 우리나라와 같이 우량 종축의 자원이 부족한 실정에서는 외국에서 값비싼 종축을 다량 수입하지 않고서도 짧은 기간에 종축을 증식 및 확보하는데 매우 효과적인 방법이다. 또한 복제동물은 정교한 동물 실험에서 개체간의 차이를 줄일 수 있어서 정확한 실험성적을 얻는데 매우 유익하게 사용될 수 있을 뿐만 아니라 실험에 사용될 동물의 수도 줄일 수 있어서 적은 반복수로 정확한 정보를 얻는데 유익하며, 복제동물은 서로 간에 거부반응이 적으므로 장기이식 연구 등에도 이용될 수 있는 등 이용가치가 매우 높다.

따라서 PCR 분석과 GFP검색을 통하여 수정란에 주입된 재조합 유전자(recombinant DNA)의 통합(integration)을 조기에 판별하고 여기에서 선별된 수정란을 핵이식기법으로 복제하여 많은 수의 복제된 형질전환수정란을 작출한 다음 이들을 대리모에 이식하여 형질전환동물을 생산한다면 이는 transgenic animal technology의 발전에 커다란 전기를 마련할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 그간 익혀온 경험과 축적된 기술을 바탕으로 하여 체외배양-체외수정된 한우 수정란을 사용하여 이미 그 발현이 확인된 바 있는 사람성장호르몬 유전자(hGH fusion gene) 또는 GFP gene을 외래유전자로 사용하여 이를 한우 수정란에 미세주입(microinjection)을 실시하고 8-세포기에서 상실배기까지 체외발달시켜 이들을 핵공급원(nuclear donor)로 이용하여 핵이식을 실시하며 핵이식된 수정란을 다시 체외에서 배양발달시킴으로써 다수의 형질전환된 복제수정란을 창출하는 기법을 개발하고자 하며, 분석기법을 활용하여 복제수정란에서의 유전자의 통합과 발현을 조기감별함으로써 형질전환동물의 생산효율을 향상시킬 수 있는 기법을 개발하고자 한다.

제2절. 연구개발의 중요성

1) 기술적 측면

①. 현재까지 형질전환동물을 생산하기 위하여 recombinant DNA를 수정란의 게놈(genome)에 삽입하였을 때, 주입된 유전자의 후대에의 발현율이 매우 저조한 편이다. 주입된 수정란을 기준으로 할 때 산자에서의 이의 발현율은 생쥐같은 실험동물에서는 1 - 5% 정도이고 토끼에서는 0.75%이며 가축인 소에서는 0.7%, 산양에서는 0.99%, 면양에서는 0.88%, 돼지에서는 0.91% 등 1%에 미치지 못하고 있다(Pursel 과 Rexroad; 1993, Riego 등; 1993, Thomas 등; 1993). 그 이유는 외래유전자의 크기와 성상, 주입방법과 시기, 주입된 유전자의 통합(integration), 주입된 수정란의 체외발생, 이식후의 생존성 및 모자이크현상(mosaicism) 등 많은 요인이 개재되어 있는 것으로 밝혀지고 있지만 그 주된 이유는 동물 수정란에 주입된 유전자가 genome의 적당한 부위에로의 통합(integration)이 무작위적으로 일어나기 때문이다(Pursel 과 Rexroad; 1993). 핵내에 주입된 유전자가 어떻게 하여 recipient genome에 통합되는가에 대한 기전은 아직 불명하다. 그러므로 형질전환동물 생산의 효율을 향상시키기 위하여서는 수정란에서 주입된 유전자의 통합을 확인한 다음 이를 선별적으로 대리모에 이식하는 것이 매우 효과적이다.

②. 동물의 수정란 내에 주입된 유전자를 조기에 판별할 수 있는 방법은 유전자가 주입된 수정란을 배양시킨 다음 할구세포를 하나 또는 일부분 분리하여 취하고 여기에 PCR기법을 사용하여 유전자를 증폭시켜 검색하는 것이다. Thomas(1993)는 소의 수정란에서 주입된 외래유전자의 integration rate를 조사하였던 바 299개의 수정란 중 단지 2개(0.7%)에서만 통합이 확인되었다고 하며, Bowen 등(1993)은 PCR-screened embryo transfer에 의하여 transgenic cattle을 생산하였고 533개의 수정란 중 421개의 transgenic negative(-)를 가려냄으로써 수란우의 수를 79%나 줄일 수 있었다고 한다. 이렇게 PCR 분석으로 수정란을 대리모에 이식하기 전에 유전자의 통합을 조기에 판정함으로써 형질전환동물 생산효율을 향상시키는데 매우 유익하게 활용될 수 있다. 이 외에도 PCR을 이용한 유전자분석은 사람과 동물의 유전성질병의 조기진단과 성감별 등에 응용되고 있다(Brem 등; 1993, Dziadek 와 Bakker; 1993).

③. 핵이식기술은 동물의 우량 유전자를 복제하고 선발하는데 매우 유리하며 수정란 이식기술과 복제동물생산기술을 병용하여 유전적 소질이 극히 우수한 개체(한우)에서 우수한 수정란을 다량 확대보급하는데 매우 유익한 기술이다. 핵이식에 의한 복제동물생산 기법은 가축의 번식에 있어서 종래에 사용되어 오던 교배법이나 인공수정법에서 탈피하여 번식효율을 증진시키는데 새로운 전기를 마련할 수 있을 것이다.

유전적으로 동일한 동물을 생산하기 위한 하나의 수단으로서 수정란(배)의 양분에 의한 일란성 쌍태 생산기법이 연구되어 왔으나, 이러한 기법으로서는 하나의 배로부터 최대한 복제 생산할 수 있는 산자의 수는 2 내지 4 마리 밖에 되지 않는 한계점이 있다.

핵이식기술은 전능한(totipotent) 시기에 있는 배의 핵을 다수의 할구세포로부터 얻어서 이를 탈핵된 다른 접합체 또는 초기 배에 이식시키는 기술로서 하나의 배로부터 20개의 동일한 성과 유전형질을 가진 복제 배를 작출할 수가 있으며, 나아가서 이들 핵이식 배를 체내 또는 체외에서 배양하여 상실배 혹은 포배로 발달시킨 다음 이를 핵의 공급원으로 재이용하는 반복핵이식(recycling nuclear transplantation) 기법을 응용하면 그 수를 기하급수적으로 증가시킬 수 있다.

2) 경제 . 산업적 측면

①. 현재의 기술 수준으로 소에서 유전전환동물 생산 성공율이 0.7%로서 1% 미만이다. 그러므로 한마리의 유전자전환 소를 생산하기 위하여서는 적어도 100 마리 이상의 대리모가 필요하다. 그러나 PCR 분석기법을 응용하여 이식전의 수정란에서 주입된 유전자의 발현 여부를 조기에 가려냄으로써 수란우의 수를 80% 정도 줄일 수 있으므로(Bowen 등, 1993) 그 경제적 시간적 절약은 막대하다. PCR 분석기법으로 조기감별을 실시하면 유전자전환 한우 한마리를 생산하는데 80두의 암소를 절감할 수 있고, 이를 금액으로 환산하면 약 2억원이 절감된다(80두×250만원 = 2억원).

②. 유전자가 주입된 수정란에서 PCR 분석기법으로 유전자의 통합을 조기에 확인함으로써 형질전환 송아지의 생산 성공율을 10배 이상(0.75%→7%) 향상시킬 수 있다.

③. 핵이식 기법으로 형질전환된 수정란만 가려서 복제함으로써 하나의 수정란으로부터 많은 복제수정란을 작출할 수 있으므로 형질전환 수정란의 생산비를 절감할 수 있다. (Krisner 등 1995)

④. 체외성숙, 체외수정 및 체외배양기법을 개발 확립하므로서 도축장에서 도살된 소로부터 대량의 난자와 수정란을 체외에서 생산하여 형질전환 및 복제된 우수한 송아지 생산에 소요되는 비용을 현저히 절감할 수 있게 되어 결과적으로 우수한 송아지를 저렴한 가격으로 농가에 보급할 수 있게 된다.

⑤. 핵이식 기술이 국내에 산업적으로 확대 보급되면 한우의 쌍자생산, 성비조절, Free martin 의 방지, 수정란의 저가 보급, 한우의 번식효율 향상 등에 기여할 것이다.

3) 사회 . 문화적 측면

①. 한우의 생산성 향상, 번식을 개선 및 형질개선을 촉진함으로써 농가의 소득증대 및 사기양양을 촉발하며 수입 쇠고기에 대한 경쟁력이 향상되어 WTO 체제에 대비할 수 있다.

②. 미국에는 연간 약 20만두의 소가 수정란 이식기술로 생산되고 있어 이미 실용화 단계에 있고 핵이식기술에 의한 복제동물 생산과 특정 유전자 도입을 위한 형질전환 동물 생산에 많은 노력과 연구비를 투자하고 있으며 일부는 이러한 기술이 산업화 단계에 들어가 있다. 그러므로 이러한 기술이 국내에서는 개발되어 실용화 산업화되면 가축의 번식 및 육종방법에 대전환이 올 것이다.

③. 이식전 수정란 단계에서 외부 유전자 통합을 조기에 판정하고 특정유전자 주입에 의한 형질전환동물의 효율적 생산은 우군의 개량에 가장 유효한 방법이며 특히 전체 인류의 생명공학 분야에 큰 밑거름이 될 것이다.

④. 형질전환동물 생산기법을 활용하여 동물의 질병에 대한 저항력을 증강시킬 수 있을 것이며, 유즙을 통한 whey acidic protein 을 위시한 수싯종의 유익한 단백질 및 약물의 생산(Pharming) 등 많은 분야에서 유익하게 활용될 수 있다.

⑤. 선진각국에서는 형질전환동물이 특허로 보호되어 있어서 이를 외국으로부터 도입할 경우 특허도입비 및 고가의 수입비용이 앞으로 부가될 것이며, WTO 체제에 대비하여 의학적 및 산업적으로 유익하며 무량한 가축 및 질환모델 동물을 국내에서 생산할 수

있는 기술을 갖추어야 한다.

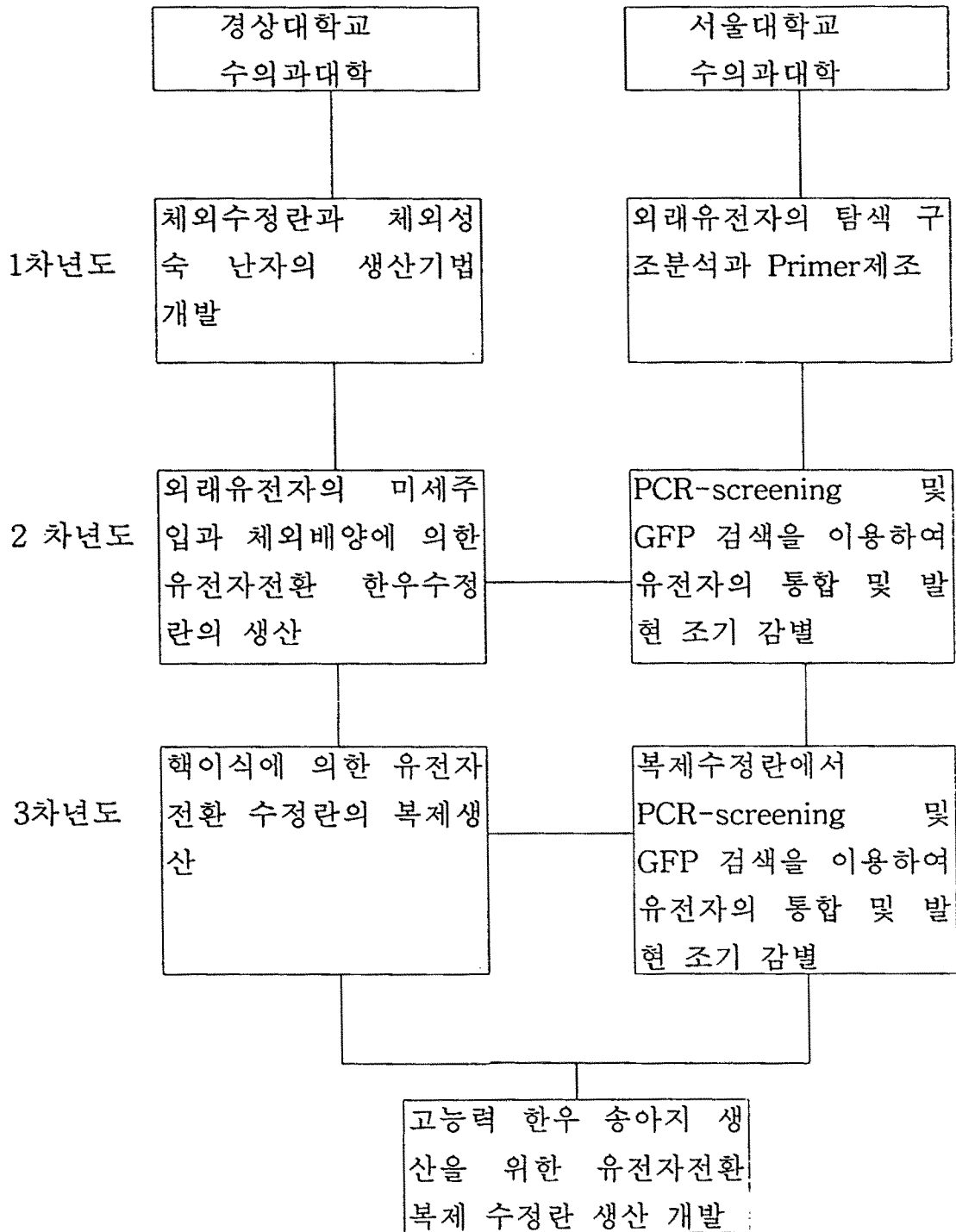
제3절. 연구개발의 목표 및 내용

- 1) 한우에서 초음파유도 난포란을 채집하는 기술을 활용하여 발생능이 우수한 한우 수정란을 체외에서 생산하는 기법을 개발하고, 또한 도축한우의 난소로부터 체외수정란을 다량생산하는 기술을 개발하며,
- 2) PCR 및 GFP 분석기법을 이용하여 이미 발현이 확인된 외래유전자의 수정란내 통합을 조기에 확인함으로써 형질전환동물의 생산효율을 향상시키는데 이바지하며,
- 3) 핵이식기법을 응용하여 유전자 전환 수정란의 복제기법을 개발함으로써 한우에서의 우수한 유전자 도입과 생산성 향상에 이바지 한다.

연차별 연구개발목표 와 내용

구 분	연구개발 목표	연구개발내용 및 범위
1차년도 (1996)	핵이식 및 유전자 주입을 위한 초음파유도 및 도축장난소유래 난포란 채란기법개발과 체외수정란 생산기법개발 및 외래유전자의 준비	<ul style="list-style-type: none"> ○ 도축한우의 난소에서 난포란을 채란하여 체외성숙 및 체외수정란 생산(이효중, 박충생) ○ 초음파 유도로 채란된 난자의 체외수정에 의한 체외수정란 생산 (이효중, 박충생) ○ 체외수정란의 배발달을 조사 및 배양체계 구축(이효중, 박충생) ○ 외래유전자 및 primer의 준비(이항, 이경광)
2차년도 (1997)	외래유전자의 주입에 의한 유전자전환 한우수정란의 생산 및 PCR-screening과 GFP검색을 이용한 유전자의 조기 감별	<ul style="list-style-type: none"> ○ 미세주입에 의한 외래유전자의 한우수정란내 주입(이효중, 최민철, 최상용) ○ 유전자전환 수정란의 체외배양 (이효중, 박충생) ○ 발달단계별 수정란 할구세포에서의 유전자 통합에 대한 PCR-screening 및 GFP 검색(이항)
3차년도 (1998)	핵이식에 의한 유전자 전환 수정란의 복제생산	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유전자 전환 한우 수정란의 핵이식과 유전자전환 복제수정란 생산 (이효중, 박충생, 최상용, 최민철) ○ 복제된 수정란에서의 유전자 발현에 대한 PCR-screening 및 GFP 검색(이항)

제4절. 연구개발 추진체계



제2장. 한우에서 초음파유래 및 도축 난소유래 난포란 채란기술의 개발과 체외수정란의 다량 생산

제1절. 서론

수정란의 생산기술과 이식기술은 동물의 번식효율 향상, 생산성 증대 및 개량 등을 목적으로 초기에는 체내 수정란의 회수방법을 연구 개발하여 왔으나, 근래에는 도축장 난소를 이용한 체외 수정란의 생산기법 개발과 응용에 많은 관심을 보이고 있다. 특히, 체외 수정란의 생산에 관한 연구는 활발히 진행되어 실용화 단계에 이르렀으며 형질전환동물 및 핵이식 동물의 생산연구 등을 위하여서도 필수적으로 선행되어야 할 부분이라 하겠다. 그러나 도축 난소를 이용한 체외 수정란의 생산은 종축의 개량에는 크게 활용되고 있지 않으며, 체내 수정란 이식은 유전적 능력이 우수한 암소의 선발강도를 높혀 유전적 개량 효과를 높이고자 함에 그 주된 목적을 두고 있으나, 이식 가능한 체내 수정란의 생산 효율면에서는 한계가 있다. 그 대안의 하나로서 최근 우수한 암소로부터 가급적 많은 수의 난포란을 채취하여 체외 수정란을 생산하고 이용해 보려는 연구가 활발히 수행되어지고 있다(Pieterse 등, 1988; Walton 등, 1993; Meintjes 등, 1995; Stubbings 와 Walton, 1995).

소에서 난포란의 회수방법은 주로 도축 난소를 이용한 난포절개(Moor 와 Trounson, 1977)와 needle aspiration(Stubbings 등, 1990)방법을 이용하여 다수의 수정란을 저렴하게 생산하여 왔으나, Sirad 등(1985)은 생체 소로부터 외과적 방법으로 배란직전의 난포란을 채란하는데 성공하였으며, 소의 체외 수정란 생산은 Sreenan(1970)이 처음으로 체외 성숙 난자의 체내 수정을 시도한 이후 Brackett 등(1977)과 Iritani 등(1977)은 소 난포란의 체외 성숙 및 체외수정의 성공을 보고하였다. Lu 등(1988)과 Goto 등(1988)은 체외 수정란에 의한 산자생산을 보고하였고, 국내에서도 체외수정란에 의한 산자를 생산하기에 이르렀다(황 등, 1993; 박 등, 1994; 한 등, 1994). 그러나 도축 난소로부터의 채란방법은 다수의 난포란을 회수하는 장점은 있으나, 동일한 소로부터 반복적 채란의 불가능, 도축 난소 유래 수란우의 유전적 형질과 개체 정보의 불명확 등의 단점을 가지고 있으며, 외과적 방법에 의한 난포란 채란은 지속적인 수술과 마취로 인한 동물의 stress 와 수술부위의 창상과 유착으

로 반복회수의 기회가 제한되어 양질의 수정란을 생산하기가 힘들다고 한다(Holland 등, 1981). 현재 이러한 단점들을 보완한 초음파 장치를 이용한 생체소에서의 채란 방법이 개발되어 활발한 연구가 이루어지고 있다. Pieterse 등(1988)이 소에서 초음파 유도 난포란의 채취와 이를 이용한 체외수정란 생산에 관하여 처음으로 보고한 이후, 이에 관한 연구가 다양한 방향으로 활발하게 진행되어 왔다.

본 연구에서는 한우에서 초음파 유도로서 우수한 수정란을 체외에서 생산하는 기술을 개발하고, 또한 도축 한우의 난소로부터 다량의 난자를 채란하여 체외수정란을 다량 생산하는 기술을 개발함으로써 본 연구에서 추구하는 유전자전환 수정란의 생산과 조기선별 및 핵이식에 의한 이들 유전자전환 수정란의 복제에 관한 기술개발에 사용하고자 하였다. 본 연구를 수행하는 과정에 난포란의 채란을 위한 FSH 전처리의 효과를 조사하고, 소에서 과배란을 유도하기 위하여 종래에는 FSH를 12시간 간격으로 6회 반복 투여하여야 하는 번거로움을 개선하기 위하여 이 호르몬을 polyvinylpyrrolidone 용매에 녹히 단일투여로서 과배란을 유도하는 기법을 활용하여 난포란의 성숙효과를 조사하였으며, 초음파채란을 위한 한우의 마취방법을 개선하였다. 또한 초음파 유도 및 도축 난소에서의 난포란의 채란률과 체외발달율을 비교조사하여 체외 수정란 생산효율을 알아 보고자 하였다.

제2절. 재료 및 방법

가. 초음파 유도에 의한 한우 난포란의 채란

1) 공시동물

본 실험에서는 임상적으로 건강하고 번식장애가 없으며 연령 14~22개월령, 체중 350~400 kg의 한우 암소를 사용하였다. 한우를 구입하여 경상남도 산청군 신안면 하정리 셋별 목장에서 사양표준에 준하여 위탁사양관리하면서 채란 실험을 실시하였다.

2) 실험설계와 FSH처리

본 실험에 공시된 한우는 (1) FSH-decreasing dose 처리군, (2) FSH-single dose 처리군 및 (3) 대조군으로 무작위 배치하였으며, FSH-decreasing dose 처리군의 한우는 FSH-p (Folltropin-V[®], Vetrepharm Co., Australia)를 400 mg을 생리식염수 20 ml에 용해하여 12시간 간격으로 3일간 6회 근육주사 하였고(6, 6, 5, 5, 4, 4 ml), FSH-single

dose 처리군의 한우는 FSH-p 400 mg을 polyvinylpyrrolidone (PVP)용액에 용해하여 20 ml을 1회 근육주사 하였고, 대조군은 FSH를 처리하지 않고 정상적인 상태의 한우를 사용 하였으며, 처리후 48시간에 난소반응을 초음파로 조사하고 채란하였다.

3) 초음파기기와 채란 기구

난포발육의 초음파상 관찰은 SONOACE-1500[®] 및 SONOVET- 600[®](Medison Co., Korea)을 사용하였으며, 탐촉자는 6.5 MHz convex scanner를 사용하였고, 채란은 17-gauge, 55 cm needle(Cook Co., Australia)을 탐촉자에 장착하여 실시하였다.

4) 초음파상 관찰 및 채란을 위한 한우의 마취

난포발육의 초음파상 관찰 및 채란을 용이하게 하기 위하여 공시동물을 보경틀에 고정 시킨 후 진정제로서 체중 100 kg 당 1 mg 의 detomidine hydrochloride (Dormosedan[®], Canada)를 미정맥에 주사하거나 xylazine HCl(Rompun[®], Pfizer Co. Korea) 0.7 ml을 미 정맥에 주사하였고, 직장벽의 이완을 위해서 Monzal[®]()을 근육주사하여 이들의 효과를 확인하였다. 아울러 미추마취를 위하여 2% lidocaine 용액 4~6 ml 을 미근부의 제 1 미추간에 주사하여 경막의 마취를 유도한 후 사용하였다.

5) 난포발육의 초음파상 관찰 및 채란 방법

마취된 한우는 직장 내의 분을 제거하고 회음부와 외음부의 오물을 세척하고 소독제로 깨끗하게 닦아낸 다음 탐촉자를 질내에 넣어 한 손으로 고정하고, 다른 손은 직장으로 넣어 난소를 견인하여 질 내에 있는 탐촉자 위에 올려 초음파의 모니터 상에 나타나는 난포를 조사하였다. 초음파상에 나타난 난포의 크기별로 11 mm 이상인 난포를 대난포로, 4-10 mm 인 것을 중난포로 분류하였으며, 본 실험에서는 4 mm 이하인 소난포는 관찰이 용이하지 않아 제외시켰으며, 초음파 유도에 의한 난포란의 채란은 위와 같은 방법으로 한우를 보정시킨 후, 난포의 발육상태를 조사한 후, 채란용 needle의 내강에 0.2% heparin 이 첨가된 PBS를 채운 다음 탐촉자에 장착된 needle guide 에 장착하였다. 탐촉자를 질을 통해서 질벽 가까이에 위치시킨 후 난소와 탐촉자의 위치를 가능한 가까이 밀착시키고 모니터를 통해서 채란 가능한 난포가 모니터상으로 나타나면 puncture line 부위로 난포를 이동시키고 needle의 끝부분이 모니터 상에 약간 비치도록 위치한 후 난포내로 needle을 진입시킴과 동시에 vacuum pump의 압력을 75~85 mm Hg(분당 흡입량: 27~29 ml)로 유지하여 조심스럽게 회수하였다(Gibbons 등, 1994). 모니터상에서 난포가 완전히 흡입되는

것을 확인하고 needle을 다음 난소로 이동시켜 반복적인 방법으로 채란하였다.(Fig. 1과 2)

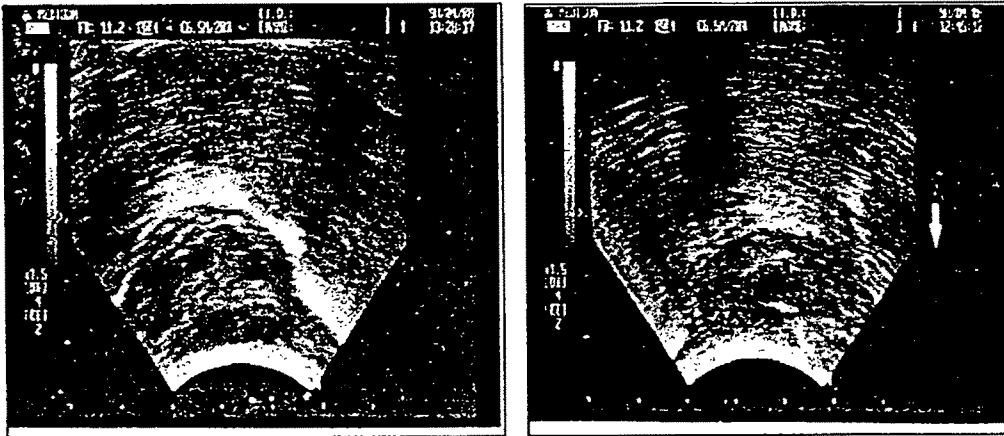


Fig. 1. Ultrasonogram scan of follicles in Korean native cows using a 6.5 MHz transvaginal probe. Echogenic tip of the needle (arrow) was seen within a follicle.

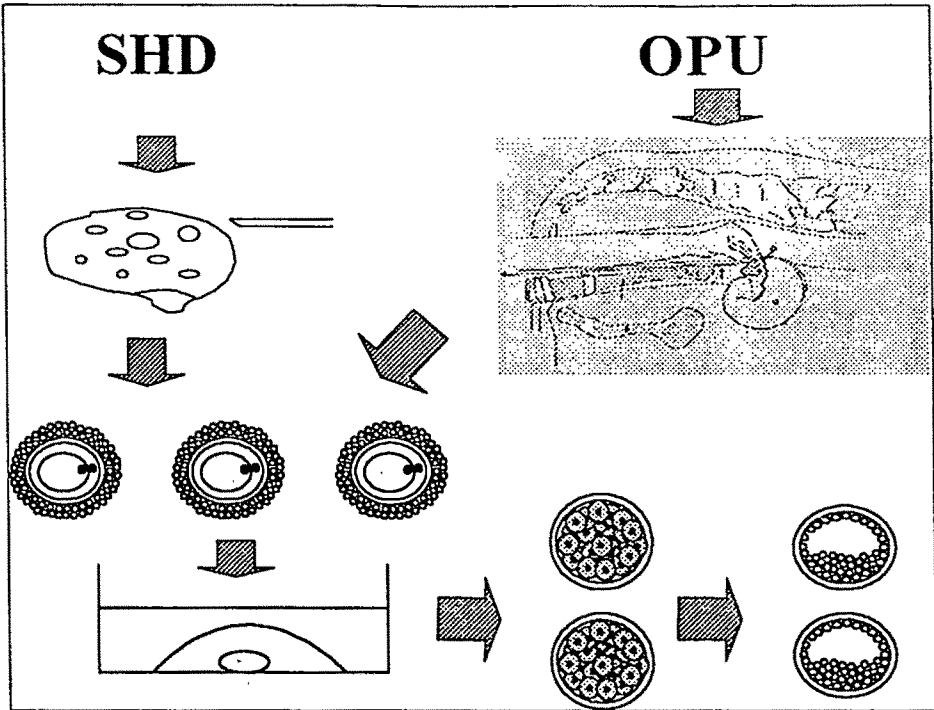


Fig. 2. Diagrammatic representation of follicular oocytes collection by slaughterhouse-derived(SHD) ovary aspiration and ultrasound-guided ovum pick-up(OPU) and *in vitro* embryo production in Korean native cows.

나. 도축 한우의 난소로부터 난포란의 채란

본 실험에 공시된 난소는 도축장에서 도살된 한우 암소에서 즉시 적출하여 penicillin G(100 units/ml)와 streptomycin(100 μ g/ml)이 함유된 생리식염수(25~30 $^{\circ}$ C)가 들어 있는 보온병에 담아 3~4 시간 내에 실험실로 운반하였고, 미성숙 난포란을 채란하기 전 난소주위의 지방과 결합조직을 제거하고, penicillin G(100 units/ml)와 streptomycin (100 μ g/ml)이 함유된 생리식염수(25~30 $^{\circ}$ C)로 3 회 세척한 후, 18-gauge needle이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 2-7 mm 의 난포에서 음압을 이용하여 난포란을 채란하였다. 난포란의 채취시 사용한 배양액은 5% FBS가 첨가된 Ham's F-10을 사용하였다. 흡입된 난포액은 13 ml의 시험관에 담아 5~10 분간 정치시킨 후 침전된 하부액을 5 ml의 피펫으로 흡입하여 직경 60 mm 배양 접시에 옮기고 40 \times 배율의 도립현미경(Olympus Co., Japan)에서 난포란을 수집한 후 기본 배양액(Ham's F-10 + 10% FBS)으로 4~5 회 세척하면서 선발하였다. 난포란의 선발은 난

구세포의 부착정도와 세포질의 충실도에 따라 Wiemer 등(1991)의 방법에 준하여 실시하였으며, 최소한 3층이상의 난구세포층으로 되어 있고, 세포질이 충실한 것을 선발하여 실험에 공시하였다.

다. 난포란의 등급분류

회수한 난포란의 등급분류는 난구세포와 세포질의 충실도에 따라서 아래와 같이 4등급으로 분류하였으며, Grade I, II 만을 선발하여 공시하였다.(Fig. 3)

- 1) Grade I: 4층 이상의 난구세포층이 충만하고 균일한 세포질을 가진 것.
- 2) Grade II: 1~3층의 난구세포층을 가진 것.
- 3) Grade III: 부분적으로 또는 완전히 나화된 것.
- 4) Grade IV: 난구세포층이 팽화되었거나 세포질이 불충실한 것.

라. 체외 수정란의 생산

1) 난포란의 체외성숙

난포란의 체외성숙은 초순수를 사용하여 제조한 10% FBS 첨가된 Ham's F-10 배양액을 pH 7.4로 조정후 0.2 μ m filter(Gelman Sci., USA)로 여과한 것을 culture-dish(Nunc Co., Denmark) 에 100 μ l 소적을 만들고 소적당 15~20 개의 난포란을 넣고 39°C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간 동안 체외성숙을 실시하였다.

2) 체외수정용 정자의 준비

난포란의 체외수정을 위한 정자의 준비는 도축장에서 2~3 마리의 한우로부터 도살 직후 각각 정소상체 미부를 적출하여 항생제가 첨가된 25°C 전후의 생리식염수에 담가 30분 이내에 실험실로 운반하였다. 운반된 정소상체 미부는 penicillin G (100 units/ml)와 streptomycin(100 μ g/ml)이 첨가된 생리식염수로 2~3 회 세척한 후 멸균된 종이로 표면을 깨끗이 닦고 멸균된 가위로 조직을 절개하고 일부분을 채취하여 m-TALP 배양액이 들어있는 dish에서 세척하여 농후정자를 채취하였다. 채취된 정자는 heparin(5 units/ml)이 첨가된 m-TALP 배양액으로 활력이 높은 정자를 선별하기 위하여 39°C, 5% CO₂ incubator에서 swimming-up을 실시하였다. Swimming-up의 유도는 농후 정자와

m-TALP 배양액이 층을 이루도록 각각의 배양액을 조심스럽게 분주한 후 45° 의 각도로 눕혀서 1 시간 동안 정치하였다. Swimming-up을 유도하여 부유된 상층의 정자만을 채취하여 500×g 에서 5분간 2회 원심분리한 후, 수정능획득을 위하여 BSA(6 $\mu\text{g}/\text{ml}$), caffein(5 mM) 및 glucose(5 mM)가 첨가된 m-TALP 배양액을 각각 5 ml 첨가하여 다시 500×g 에서 5 분간 원심분리한 후, 약 1 ml의 수정용 m-TALP 배양액을 각각 첨가하여 CO₂ incubator에서 10~15분간 정치하여 수정능획득을 유도하였다.

3) 체외성숙 난포란의 체외수정

난포란의 체외수정을 위하여 m-TALP 배양액을 사용 하였으며, 체외수정은 체외성숙된 난포란을 수정용 m-TALP 배양액으로 3~4 회 세척하고, 수정용 배양액에 100 μl 소적당 10~15 개의 난자를 옮긴 다음, $1-2 \times 10^6$ sperms/ml 농도의 수정능이 획득된 활력도가 높은 정자를 첨가 하여 24 시간 동안 39°C, 5% CO₂ incubator에서 수정을 유도하였다. 정자의 최종농도는 hemocytometer로 정자의 수를 계산하였다.

4) 체외 수정란의 체외배양을 위한 난관 상피세포의 준비

도축장에서 채취한 난관의 오염을 방지하기 위하여 penicillin G (500 units/ml)와 streptomycin(500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)가 첨가된 4°C의 생리식염수에 담아 3~4 시간 이내에 실험실로 운반하였다. 위의 생리식염수로 세척한 다음 멸균된 휴지로 난관표면을 닦고 멸균된 가위와 핀셋으로 결합조직과 지방덩어리를 완전히 제거하였다. 70% alcohol 용액에서 20 초간 소독하고, 항생제가 첨가된 생리식염수로 2~3 회 세척한 다음 오염 가능성이 있는 난관의 양끝부분을 제거한 후, 일회용 주사기를 이용하여 TCM-199 배양액으로 난관협부에서 누두부쪽으로 관류시킨 다음 핀셋으로 난관을 압착하면서 난관상피세포를 채취하였다. 채취한 난관상피세포는 500×g 에서 5 분간 원심분리시켜 상층액은 제거하고 나머지 pellet 부분을 2 회 이상 원심분리기로 세척하여 $1-2 \times 10^6$ cells/ml의 최종농도로 조절한 후 10% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 배양시켜 monolayer cells의 형성을 유도하였으며, 배양액은 48 시간마다 교환하였다.

5) 체외 수정란의 체외배양

체외수정 24시간 후에 수정란을 10% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 4~5 회 세척하여 난구세포와 정자를 제거시킨 후, 10% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액 내에서 monolayer cells이 형성된 난관 상피세포와 공배양을 시키면서 48 시간마다 신선한 배양액

으로 교환했으며, 5 일이 경과한 monolayer cells은 신선한 monolayer cells로 교환하였다. 각각의 배양액으로 배양하면서 수정 후 48시간에는 2-세포기 이상으로 발달한 수정란의 수정률을 조사하였으며, 7~10 일 동안에는 배반포기로의 발달률을 조사하였다.(Fig. 4)

마. 통계학적 분석

실험결과의 통계학적 분석은 SAS(Statistical Analysis System) package를 사용하여 Chi-square test를 실시하여 각 처리군간의 유의적 차이를 검정하였다.

제3절. 연구의 결과

1) 도축한우의 난소에서 채란된 난포란의 체외성숙 및 체외수정에 의한 한우 체외수정란 생산 및 배양체계 구축

본 연구에서는 난포란의 체외성숙은 Wiemer 등 (1991)의 방법에 준하여 실시하고, 체외수정은 체외성숙된 난포란을 수정용 B.O. medium으로 수정시켰으며, 체외배양기법으로 이식전단계인 배반포기의 수정란을 다량 생산하기 위하여 체외수정된 수정란의 체외배양은 TCM-199 배양액으로 난관상피세포에서 공배양법으로 배양체계를 구축하였다.

도축우의 난소에서 미성숙 난자를 채란한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다. 86개의 난소에서 1877개의 난포를 천자하여 752개의 난포란을 채집하여 40.1%의 채집율을 보였고 난소 하나당 평균 8.74개의 난포란을 회수하였다. 이 중 Grade I 및 II 인 것만을 체외성숙시킨 다음 체외수정하여 각기 다른 조건의 배양액에서 발달율을 조사한 결과 Table 2에 나타난 바와 같이 평균 73.9%의 수정율을 보였다. 이들을 체외에서 배양하여 그 발달율을 향상시키기 위하여 TCM-199액 혹은 이 배양액에서 단층을 이루고 있는 난관상피세포와 같이 공배양을 실시하였던 바, 배반포기까지의 배발달율에 있어서는 TCM-199에서는 8.9%를 보인 반면, 공배양에서는 39.1%까지 향상되어 체외배양체계에 있어서는 공배양에서 좋은 성적을 얻었다(Table 3).

Table 1. Recovery of follicular oocytes from slaughtered bovine ovaries by grade

No. of ovaries used	No. of follicles punctured	No. of oocytes recovered(%)					Mean no. of recovered oocytes / ovary
		Grade I	Grade II	Grade III	Grade IV	Total	
86	1,877	226(30.1)	192(25.6)	206(27.5)	126(16.8)	752(40.1)	8.74

Table 2. Cleavage rates of *in vitro* matured bovine oocytes following *in vitro* fertilization with spermatozoa from cauda epididymis

Quality of oocytes	No. of oocytes used	No. of embryos cleaved(%)
Grade I	218	182(83.5)
Grade II	184	115(62.5)
Total	402	297(73.9)

Table 3. *In vitro* developmental capacity of IVM-IVF bovine embryos in different culture system

Co-culture system	No. of embryos used	No. of embryos developed to		
		Morula	Blastocyst	Mor. & Blasto.
TCM-199	124	9	2	11(8.9)
BOEC*	161	38	25	63(39.1)

* BOEC : Co-cultured with monolayer of bovine oviductal epithelial cells in TCM-199.

2) 한우에서 FSH 처리에 의한 난포발육에 대한 초음파 관찰

FSH 400 mg을 근육주사한 처리군과 FSH를 주사하지 않은 대조군에 속한 한우에서 6.5 MHz 초음파로 난소반응을 조사한 결과는 Table 4에 나타난 바와 같다.

FSH 처리군 및 대조군에서의 한우 1두당 채란 가능한 초음파 상의 가시 난포수는 각각 22.1 ± 6.5 (mean \pm S.D.) 및 7.0 ± 2.4 개로서 FSH 처리군이 대조군에 대하여 유의적 ($P < 0.05$)으로 높게 나타났다. FSH 처리군 및 대조군에서의 가시 난포의 크기(diameter) 별 분포는 대난포(≥ 11 mm)는 5.1% 와 35.7% 의 분포를 보였고, 중난포(4-10 mm)는 94.9% 와 64.3% 의 분포를 보였다.

Table 4. Ovarian response in ultrasonography with or without hormonal treatment in Korean native cows

Treatment groups	Replication no. of cows used	No. of ovaris observed	No. of follicles by size in diameter(%)			No. of visible follicles /cow*
			Large (≥ 11 mm)	Medium (4~10 mm)	Total	
Non-treatment	10	20	25(35.7)	45(64.3)	70	7.0 ± 2.4^b
FSH-treatment	14	28	15(5.1)	281(94.9)	296	22.1 ± 6.5^a

Non-treatment Group : Non-hormonal treatment.

FSH treatment Group : Injection with the FSH(Folltropin-V®) 400 mg I.M.

* Mean \pm S.D.

The different superscripts within the column denote significant ($P < 0.05$) difference.

3) 난포란의 성숙촉진을 위한 FSH-single dose 기법의 개발과 채란효율 개선

한우에서 난포란의 다량채란을 위한 한 방안으로서 우선 난포란의 성숙을 촉진하기 위하여 FSH 제제를 사용하여 최근에 개발된 single dose법을 적용하고 이를 종래에 사용하여 왔던 decreasing dose법과 비교분석하였다. 난소의 반응과 초음파 유도 채란 성적을 비교한 결과는 Table 5 와 Table 6에 나타난 바와 같다. single dose 법에서 한 마리당 평균 21.1개의 난포란 성장을 보였다. 초음파로 채란한 성적은 decreasing dose 법을 사용하였을 때 평균 12.7개의 난포란을 채란하였고, single dose 법을 사용하였을 때에는 평

균 14개의 난포란을 채란하여 대조군의 3.7개와는 유의적으로 많은 난포란을 채란하였다.

Table 5. Ovarian response in ultrasonography to the hormonal treatments in Korean native cow

Hormonal treatments	Replication no. of cows used	No. of follicles by size		Total no. of follicle	Mean no. of follicles /cow
		Large(>11mm)	Medium(6~10mm)		
Control	10	25	45	70	7.0
FSH-decreasing dose	15	2	342	344	22.9
FSH-single dose	14	15	281	296	21.1

Control : No hormonal treatment.

FSH-decreasing dose : FSH(Folltropin®) 40mg was given twice a day for three days.

FSH-single dose : FSH(Folltropin®) 40mg in PVP was given in single dose.

Table 6. Recovery of follicular oocytes under ultrasonography guide from the Korean native cows treated with different hormonal regimes

Hormone treatments	No. of cows aspirated	No. of oocytes recovered(%)					Mean no. of oocytes recovered/cow
		Grade I	Grade II	Grade III	Grade IV	Total(%)	
Control	10	9(24)	17(46)	4(11)	7(19)	37	3.7
FSH-decreasing dose	15	36(19)	40(21)	50(31)	56(29)	191	12.7
FSH-single dose	14	22(11)	45(23)	98(50)	31(16)	196	14.0

Control : No hormonal treatment.

FSH-decreasing dose : FSH(Folltropin®) 40mg was given twice a day for three days.
 FSH-single dose : FSH(Folltropin®) 40mg in PVP was given in single dose.

4) 마취방법의 개선

소에서 초음파체란을 하기 위하여서는 보정후 진정 및 국소마취가 필수적이다. 젖소에서는 xylazine 또는 detomidine 제제로서 진정시킨 다음, lidocaine 으로 미추 경막외 마취를 실시하면 젖소에서는 통증자각 없이 무난히 작업을 수행할 수 있다. 그러나 본 연구에서 한우를 위와 같이 진정 및 마취를 실시하여 보았던 바, 작업 중 동물이 통증을 나타내어 초음파관찰 및 체란에 어려움이 있었으며, 아울러 진정 목적으로 xylazine을 사용하면 자궁 평활근의 수축이 일어나 조작이 원활하지 못 하였다. 이를 개선하기 위하여 평활근 이완제인 Monzal을 사용하여 보았던 바, 직장 및 자궁의 수축이 방지되어 조작이 용이하였다(Table 7).

Table 7. Effect of vaious anesthetic methods on transvaginal ultrasound-guided OPU in Korean native cows

Anesthetic methods	No. of replication	General narcosis	Epidural analgesia	Loosen- ing of rectum	Pain reduction	Total score
Rompun + Lidocaine	20	+++	+++	+	++	9
Domosedan + Lidocaine	25	+++	+++	++	++	10
Rompun + Lidocaine + Monzal	10	+++	+++	+++	+++	12

5) 초음파 유도과 도축장 유래 한우난소에서 난포란 채란성적 비교

FSH 처리의 유무에 따른 초음파 유도에 의한 난포란의 채란 결과 및 도축장 유래 난소에서 난포란 채란 결과는 Table 8과 같다.

난포란의 채란률은 FSH 처리에 의한 초음파 유도 채란군이 66.2%로서 FSH 무처리에 의한 초음파 유도군의 52.8%와 도축장 유래 난소군의 41.7%보다 높게 나타났다. 각 군에서의 한우 1 두당 채란된 난포란의 수는, FSH 처리에 의한 초음파 유도군과 도축장 유래 난소군은 각각 14.0 ± 11.54 및 17.1 ± 6.21 개로 유의적 차이를 보이지 않았으나, FSH 무처리에 의한 초음파 유도군의 3.7 ± 1.57 개에 비하여 유의적으로 높게 나타났다($P < 0.05$).

Table 8. Recovery rates of follicular oocytes recovered by OPU and SHD aspiration from the Korean native cows

Treatment groups	Replication no. of cows used	No. of ovaries aspirated	No. of follicles aspirated	No. of oocytes recovered(%)	No. of oocytes per cow*
Non-treatment-OPU	10	20	70	37(52.8)	3.7 ± 1.57^b
FSH-OPU	14	28	296	196(66.2)	14.0 ± 11.54^c
SHD	20	40	820	342(41.7)	17.1 ± 6.21^a

Non-treatment-OPU Group : Non-hormonal treatment. Follicular oocytes were collected by OPU aspiration.

FSH-OPU Group : Injection with the FSH(Folltropin -V®) 400mg.

Follicular oocytes were collected by OPU aspiration.

SHD group : Slaughterhouse-derived(SHD) ovaries.

* Mean \pm S.D.

The different superscripts within the column denote significant($P < 0.05$) difference.

6) 초음파 유도과 도축장 유래 한우 난소에서 채란된 난포란의 등급별 분포

FSH 처리의 유무에 따른 초음파 유도에 의한 난포란의 채란 결과 및 도축장 유래 난소에서 채란된 난포란의 등급별 분포는 Table 9와 같다.

정상 한우에서 초음파 유도로 채란된 난포란에서 GI, GII 및 GIII/IV의 분포는 24.3, 45.9 및 29.8%를 나타내었고, FSH 처리한 한우에서 초음파 유도로 채란된 난포란에서 GI, GII 및 GIII/IV의 분포는 11.2, 23.0 및 65.8%를 나타내었다. 도축장 유래 난소에서 채란된 난포란의 등급별 GI, GII 및 GIII/IV의 분포는 27.3, 45.3 및 26.9%를 나타 내었다. 채란된 난포란의 분포중 FSH 무처리에 의한 초음파 유도군에서는 GII 가, FSH 처리에 의한 초 음파 유도군 에서는 GIII/VI 가, 도축장 유래 난소군에서는 GII 가 가장 높은 비율을 나타 내었다.

Table 9. Grade of follicular oocytes recovered by OPU and SHD from the Korean native cows

Treatment groups	No. of oocytes recovered	No. (%) of oocytes by grade		
		GI	GI I	GIII/IV
Non-treatment- OPU	37	9(24.3)	17(45.9)	11(29.8)
FSH- OPU	196	22(11.2)	45(23.0)	129(65.8)
SHD	342	95(27.3)	155(45.3)	92(26.9)

Non-treatment-OPU Group : Non-hormonal treatment. Follicular oocytes were collected by OPU.

FSH-treatment Group : Injection with the FSH(Folltropin -V[®]) 400 mg. Follicular oocytes were collected by OPU.

SHD Group : Slaughterhouse-derived(SHD) ovaries.

초음파 유도와 도축장 유래 난소에서 채란된 난포란 중 배양 가능한 GI/II 의 분포는 Table 10과 같다. 정상 한우에서 초음파 유도군과 도축장 유래 난소군에서 GI/II 의 비율 은 각각 70.2와 72.6%로 FSH 처리에 의한 초음파 유도군의 34.2% 에 비하여 다소 높게 나타났으며, 각 군에서의 한우 1 두당 채란된 GI/II 의 수는 정상 한우에서 초음파 유도군, FSH 처리에 의한 초음파 유도군 및 도축장 유래 난소군에서 각각 1.3, 4.8 및 6.3 개를 나 타내었다.

Table 10. Collection efficiency of follicular oocytes in good quality by OPU and SHD from the Korean native cows

Treatment groups	No. of ovaries used	No. of collected oocytes in GI, GII/Total(%)	No. of usable oocytes per ovary
Non-treatment	20	26/37(70.2)	1.3
FSH-treatment	14	67/196(34.2)	4.8
SHD	40	250/342(72.6)	6.3

Non-treatment Group : Non-hormonal treatment. Follicular oocytes were collected by OPU.

FSH-treatment Group : Injection with the FSH(Folltropin -V[®]) 400 mg. Follicular oocytes were collected by OPU.

SHD Group : Slaughterhouse-derived(SHD) ovaries.

7) 초음파유도와 도축장유래 한우 난소에서 채란된 난포란의 체외 수정률 및 배반포 발달률

초음파 유도와 도축장 유래 난소에서 채란된 난포란의 수정률 및 배반포 발달률은 Table 11과 같다. 초음파 유도와 도축장 유래 난소군에서의 체외 수정률은 각각 86.4와 76.2%를 나타내었고, 배반포 발달률은 37.1와 29.3%로서 두 군간에 유의적 차이를 나타내지는 않았다.

Table 11. *In vitro* developmental rates of bovine follicular oocytes collected by OPU and SHD following IVM, IVF and IVC

Groups	No. of oocytes used	No. of oocytes cleaved(%)	No. of blastocysts(%)
OPU	81	70(86.4) ^a	26(37.1) ^a
SHD	130	99(76.2) ^a	29(29.3) ^a

OPU Group : Injection with the FSH(Folltropin -V[®]) 400 mg. Follicular oocytes were collected by OPU.

SHD Group : Slaughterhouse-derived(SHD) ovaries.

The values with same superscripts in the column denote no significant difference.

제4절. 연구결과의 고찰

한우에서 체외 수정란의 생산 효율을 비교 검토하기 위하여 FSH를 투여한 후 48시간에 초음파로 난포의 발달을 확인하고 채란하였으며, 채란된 난포란의 채란률과 체외 발달을 조사하였고, 이의 성적을 FSH를 투여하지 않은 정상 한우에서의 성적 및 도축장 유래 난소에서의 성적과 비교 검토하였다.

FSH 투여 한우에서 초음파로 관찰된 채란 가능한 직경 4 mm 이상의 가시 난포수는 평균 22.1개로서 FSH 비처리군의 7.0 개에 비하여 유의적으로($P < 0.05$) 높게 나타나, FSH에 의하여 난포의 발육이 촉진 되었다고 보며, Brogliatti 와 Adams(1996)의 과배란 처리군과 대조군에서의 가시 난포수가 각각 21.6 ± 0.2 개와 2.0 ± 0.4 였다는 보고와, Bungartz 등(1995)의 과배란 처리시 대조군에 비하여 다소 많은 난포수(10.6 ± 0.7 vs. 8.9 ± 0.5)를 나타내었다는 보고와 일치하였고, Meintjes 등(1995)의 임신한 성우와 임신하지 않은 성우의 과배란 처리시 가시 난포의 수는 25.3 ± 11.2 개와 31 ± 4.9 개 나타났다는 보고와도 비슷한 경향을 나타내었다. 과배란 처리군 및 대조군에서의 가시 난포의 크기(diameter)별 분포에서 대난포(≥ 11 mm)는 5.1%와 35.7%의 분포를 보였고, 중난포(4-10 mm)는 94.9%와 64.3%의 분포를 보였다.

초음파 유도 및 도축 난소에서의 채란률은 FSH 처리에 의한 초음파 유도 채란군이 66.2%로서 대조군의 52.8%와 도축장 유래 난소군의 41.7%보다 다소 높게 나타났으며, Bungartz 등(1995)도 과배란 처리군이 대조군보다 채란된 난자의 수가 높게 나타났다고 하였으며, Bols 등(1995)의 채란률은 42%로 보고되었고, 미성숙 송아지에서의 과배란 처리군과 대조군의 채란률은 48%와 46%로 보고하였다(Brogliatti 와 Adams, 1996). 이러한 결과는 Pieterse 등(1992), Kruip 등(1993), Fry 등(1994), Gibbons 등(1994), Bols 등(1995) 및 Becker 등(1997)들의 초음파유도 채란률과 비슷한 수준이었으나, Van der Schans 등(1991)과 Looney 등(1994)의 채란률 60~70%보다는 약간 낮은 성적을 나타내었다.

각 군에서의 한우 1 두당 채란된 난포란의 수는, FSH 처리에 의한 초음파 유도군과 도축장 유래 난소군은 각각 14.0 ± 11.5 및 17.1 ± 6.2 개로 유의적 차이를 보이지 않았으나, 비과배란 처리에 의한 초음파 유도군의 3.7 ± 1.5 개에 대해서는 유의적($P < 0.05$)으로 높게 나타났으며, Gibbons 등(1994)은 6.2 ± 1.1 개, Looney 등(1994)은 8.6개, Goodhand 등(1996)은 5.7~6.2개의 난포란을 채란하여 본 연구의 FSH 처리군에서의 난포란 수보다는 약간 낮은 경향이었으나, Bungartz 등(1995)은 10.6 ± 0.7 개의 난포란을 얻어 본 연구의 FSH 처리군과 비슷한 결과를 보고하였다.

본 연구에서의 초음파 유도 채란 난포란중 체외 배양 가능한 난포란은 대조군에서는 70.2%를 나타내어, Gibbons 등(1994)의 75.8~91.5%, Looney 등(1994)의 83.7%, Bungartz 등(1995)의 65.2%, Hasler 등(1995)의 82.0%와는 비슷한 수준을 나타내었으나, 과배란 처리군에서는 34.2%를 나타내어 다소 낮은 채란율을 나타내었다. 이러한 차이는 FSH의 처리 방법이나 반응정도, 초음파 채란시의 시간이나 음압의 정도, 적용한 등급기준, 채란기술의 숙련도 및 공시 동물의 보정의 차이 등에 의하여 영향을 받을수 있을 것으로 생각되며, FSH의 처리시 난포액이 많이 존재하는 중난포 이상의 난포가 대조군 보다 많아, 초음파 채란시 음압에 의한 소용돌이 현상등으로 난구세포층의 손실이 더 많을 것으로 생각된다.

본 연구에서 초음파 유도 난포란의 체외 수정률과 배반포 발달률은 각각 86.4%와 37.1%을 나타내었으며, Looney(1994)등은 44.7%의 수정률과 30.3%의 배반포 발달률을 보고하였으며, Kruip(1994)등은 69%의 수정률과 16%의 배반포 발달률을 보고하여 다소간의 차이를 보였다. 이들이 보고한 배반포 발달률은 이식 가능한 체외발달 배반포를 기준으로 하였기 때문에, 본 연구의 결과보다 발달률이 낮았다고 여겨진다.

이상의 결과로 효율적인 초음파 유도 채란을 위하여서는 FSH 처리를 하는 것이 보다 채란 난자수를 많이 확보할 수는 있으나, FSH 투여에 소요되는 경비와 인력 및 시간에 대하여는 불리한 점이 있다. 그러나, 초음파 유도 체외 수정란의 생산 효율은 도축 난소 유래 체외 수정란의 생산 효율과 같은 수준을 보여, 그 효율성이 높은 것으로 생각되며, 초음파 유도에 의한 체외 수정란의 생산 기법은 도축 난소 유래의 체외 수정란에서는 기대하기 어려운 고능력우나 반복적 채란에 의한 양질의 체외 수정란의 생산에 유리할 것으로 기대된다. 다량의 체외 수정란의 생산을 위하여서는 도축 난소를 이용한 체외 수정란의 생산 방법이 보다 유리할 것으로 본다. 초음파 유도 체외 수정란의 생산 기술과 수정란 이식 기술을 같이 활용하면 유전적 특이성 또는 번식 장애의 요인이 있는 공란우로부터의 부가적인 생산성을 확보 할 수 있을 것으로 사려된다.

제5절. 연구의 결론

본 연구는 한우에서 초음파 유도로 우수한 난포란을 채란하는 기술개발과 도축난소로부터 난포란을 채란하여 다량의 수정란을 생산하기 위한 배양체계를 구축하기 위하여 한우에서 초음파채란을 위한 마취방법의 개선, FSH 처리시의 단일주사법(single-dose technique), 초음파 유도 및 도축 난소에서 난포란의 채란기술 및 체외성숙, 체외수정 및 체외배양체계를 구축하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1) 한우 수정란의 인공생산 및 핵이식을 위한 공핵 수정란과 수핵 난자의 다량확보를 위한 도축한우의 난소로부터 난포란을 채란하여 체외성숙기법 및 체외수정기법을 활용하여 체외유래 난자 및 수정란을 생산하는 실험은, 난소 하나당 평균 8.7개의 난포란을 채집하였고, Grade I 인 난자를 사용하였을 때 83.5%의 체외수정율을 얻어 비교적 높고 안정된 성적을 얻었다.

2) 우수한 한우로부터 발생능이 좋은 다수의 난자를 직접 채란하기 위하여, 초음파기기를 이용하여 난자의 채란기술 개발과 이들을 이용한 체외수정란 생산을 시도하였다. 한우에 FSH를 투여하여 한 마리당 평균 22.9개의 난포란을 발달시켰으며, 이들로부터 초음파로서 평균 12.7개의 난포란을 채집하였다.

3) 한우에서 다량의 난포란 성숙을 유도하기 위한 FSH의 single dose 기법을 개발하기 위하여 FSH를 PVP 용액에 희석하여 1회 주사하였던 바, 이를 생리식염수에 희석하여 12시간 간격으로 6회 주사하였던 바와 같은 수준으로 난포란의 성숙이 촉진되었고, 채란효율도 유의적 차이가 없었으므로 이 기법의 활용이 노력과 동물의 스트레스를 줄이고 시간적 및 경제적 절약에 도움이 된다고 본다.

4) 한우에서 초음파채란을 하기 위하여서 xylazine 제제로 진정시키고, Monzal로서 평활근 이완을 일으킨 다음, lidocaine 으로 미추 경막외마취를 실시하여 통증자각 없이 초음파 채란이 가능하였다.

5) 도축장유래 또는 초음파유래 체외수정란의 다량 확보와 핵이식후 체외발달을 향상을 위하여 수정란의 체외배양체계를 구축하고자 난관상피세포와 공배양을 실시하여 괄목할 만한 체외배양 성적을 얻었다. 체외수정란의 배반포기까지의 발달율은 39.2%로 매우 향상되었다.

6) 초음파 유도과 도축장 유래 난소에서 채란된 난포란의 체외 수정률 및 배발달률의 결과는 두 군간에 유의적 차이를 나타내지 않았으므로 초음파 유도에 의한 난포란 채란과 체외수정란 생산기술은 실용성이 있다고 본다.

제6절. 참고문헌

Adams, G.P., Matteri, R.L., Kastelic, J.P., Ko, J.C.H. and Ginther, O.J. 1992. Association between surges of follicles-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod. Fert.* 94 : 177-188.

Bols, P.E.J., Vandenheeds, J.M.M., Van Soom, A. and de Kruif, A. 1995. Transvaginal ovum pick-up(OPU) in the cow : A new disposable needle guidance system. *Theriogenology.* 43 : 677-687.

Bols, P.E.J., Van Soom, A., Vanroose, G. and de Kruif, A. 1996. Transvaginal ovum pick-up in infertile Belgian Blue donor cows : preliminary results. *Theriogenology.* 45 : 359, abstr.

Brogliatti, G.M. and Adams, G.P. 1996. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. *Theriogenology.* 45 : 1163-1176.

Broussard, J.R., Rocha, A., Lim, J.M., Blair, R.M., Roussel, J.D. and Hansel, W. 1996. The effect of environmental temperature and humidity on the quality and developmental competence of bovine oocytes obtained by transvaginal ultrasound-guided aspiration. *Theriogenology.* 45 : 351. abstr.

Bungartz, L., Lucas-Hahn, D., Rath, D. and Niemann, H. 1995. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasono with or without gonadotrpín pretreatment and different reproductive stages. *Theriogenology.* 43 : 667-675.

Duby, R.T., Damiani, P., Looney, C.R., Fissore, R.A. and Robl, J.M. 1996. Prepuberal calves as oocyte donors : Promises and problems. *Theriogenology.* 45 : 121-130.

Fry, R.C., Simpson, T.L., Squires, T.J., Parr, R.A. and Damanik, R.M. 1994. Factors affecting transvaginal oocyte pick-up in heifers. *Theriogenology.* 41 : 197. abstr.

Gibbons, J.R., Beal, W.E., Krisher, R.L., Faber, E.G., Pearson, R.E. and Gwazdauskas, F.C. 1994. Effect of one versus twice weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology.* 2 : 405-419.

Gibbons, J.R., Krisher, R.L., Carlin, S.K., Pearson, R.E. and Gwazdauskas, F.C. 1995.

In vitro embryo production after microinjection and ovarian dynamics following transvaginal follicular oocyte aspiration. *Theriogenology*. 43 : 1129-1139.

Goodhand, K.L., Broadbent, P.J., Hutchinson, J.S.M., Watt, R.G., Staines, M.E. and Higgins, L.C. 1996. *In-vivo* oocyte recovery and *in-vitro* embryo production in cattle pre-treated with FSH, progesterone and estradiol. *Theriogenology*. 45 : 355. abstr.

Goto, K., 1988. Pregnancies after Co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.* 83 : 753-758.

Hasler, J.F., Henderson, W.B., Hurtgen, P.J., Jin, Z.Q., McCauley, A.D., Mower, S.A., Neely, B., Shuey, L.S., Stokes, J.E. and Trimmer, S.A. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*. 43 : 141-159.

Holland, E.J., Bindon, B.M., Piper, L.R., Thimonier, J., Cornish, K.A. and Radford, H.M. 1981. Endoscopy in cattle: techniques for ovarian examination by the paralumbar and mid-ventral routes. *Anim. Reprod. Sci.* 4 : 127-135.

Kruip, Th.A.M., R. Boni, M.W.M. Roelofsen, Y.A. Wurth and M.C. Pieterse. 1993. Application of OPU for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology* 39:251. abstr.

Kruip, Th.A.M., Boni, R., Wurth, Y.A., Roelofsen, M.W.M. and Pieterse, M.C. 1994. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology*. 42:675-684.

Looney, C.R., Lindsey, B.R., Gonseth, C.L. and Johnson, D.L. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*. 41 : 67-72.

Lu, K. 1987. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. *Vet. Res.* 121 : 259-260.

Meintjes, M., Bellow, M.S., Broussard, J.R., Paul, J.B. and Godke, R.A. 1995. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for *in vitro* fertilization. *J. Anim. Sci.* 73 : 967-974.

Moor, R.M. and Trounson, A.O. 1977. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in vitro* and their subsequent developmental capacity. *J. Reprod. Fertil.* 49 : 101-109.

Pieterse, M.C. and Kappen, E.A. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*. 30 : 751-762.

Pieterse, M.C., Vos, P.L.A.M., Kruip, Th.A.M., Wurth, Y.A., van Beneden, T.H., Willemse, A.M. and Taverne, M.A.M. 1991a. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*. 35 : 19-24.

Pieterse, M.C., Vos, P.L.A.M., Kruip, Th.A.M., Willemse, A.M. and Taverne, M.A.M. 1991b. Characteristics of bovine estrus cycles during repeated transvaginal, ultrasound-guided puncturing of follicles from ovum pick-up. *Theriogenology*. 35 : 401-413.

Pieterse, M.C., Vos, P.L.A.M., Kruip, Th.A.M., Wurth, Y.A., van Beneden, T.H., Willemse, A.M. and Taverne, M.A.M. 1992. Repeated transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in eCG-treated cows. *Theriogenology*. 37 : 273. abstr.

Presicce, G.A., Jiang, S., Simken, M., Zhang, L., Looney, C.R., Godke, R.A. and Yang, X. 1997. Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. *Biol. Reprod.* 56 : 386-392.

Sirard, M.A., Lambert, R.D., Beland, R. and Bernard, C. 1985. The effects of repeated laparoscopic surgery used for ovarian examination and follicular aspiration in cows. *Anim. Reprod. Sci.* 9 : 25-30.

Stubbings, R.B. and Walton, J.S. 1995. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in holstein cows. *Theriogenology.* 43 : 705-712.

Van der Schans, A., Van der Westerlaken, L.A.J., de Wit, A.A.C., Eyestone, W.H. and de Boer, H.A. 1991. Ultrasound guided transvaginal collection in the cow. *Theriogenology.* 35 : 288. abstr.

Walton, J.S., Christie, K.A. and Stubbings, R.B. 1993. Evaluation of frequency of ultrasonically guided follicle aspiration on ovarian dynamics. *Theriogenology.* 39 : 336. abstr.

Wiemer, K.E., 1991. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 30 : 330-338.

박충생, 공일근, 노규진, 주영국, 송상현, 황영균, 박준규, 조성근, 전병균, 이경미, 윤희준, 최민철, 광대오, 이효종, 최상용. 1994. 체외성숙·수정 및 배양된 한우 체외 수정란의 유우의 이식에 의한 산자의 생산. *한국가축번식학회지.* 18 : 47-54.

이병천, 이강남, 김남렬, 황우석. 1996. 송아지 난소에서 초음파유도에 의한 한우의 미성숙 난자 채취시에 bST-FSH 처리효과에 관한 연구. *한국수정란이식학회지.* 11 : 103-109.

정언승, 권오경, 이병천, 황우석, 中尾, 森好, 中田. 1996. Ultrasonic characteristics of morphological structure on bovine ovaries. *한국수정란이식학회지.* 11 : 51-69.

한용만, 이철상, 이정호, 김선정, 신상태, 김동훈, 이훈택, 정병현, 정길생, 김영수, 김 영훈, 이곤세, 김교국, 황윤식, 이경광. 1994. 체외수정란 유래의 송아지 생산. *한국가축번식학회지.* 18 : 7-13.

황우석, 조충호, 이병천, 신태영, 노상호, 김성기, 전병준, 이강남, 신언익, 임홍순. 1993. 한우정액 유래 체외수정 송아지 생산에 관한 연구. *한국수정란이식학회지.* 8 : 143-149.

제3장. 외래유전자의 준비와 유전자전환 수정란의 생산 및 유전자 검색

제1절. 서론

형질전환동물을 생산하기 위하여 재조합 유전자를 수정란의 genome에 삽입하는 방법에는 microinjection technique(Krimpenfort 등, 1991; Hill 등, 1992; Wall 등, 1992; Sharma 등) 과 retroviral-vector technique(Haskell과 Bowen, 1995; Kubisch 등, 1997), embryonic stem cell insertion technique(Shaw-White 등, 1993; Camper 등, 1995), 그리고 sperm-mediated gene transfer technique(Lavitrano 등, 1989; Kim 등, 1997) 등이 개발되어 오고 있다.

현재까지 형질전환동물생산 방법 중 가장 많이 사용하고 있는 microinjection technique는 미세주입 후 수정란의 사멸률 증가(Roschlau등, 1989; Krimpenfort 등, 1991), 유전자의 삽입빈도와 발현률의 저하(Brinster 등, 1985; Biery 등, 1988; Roschlau등, 1989) 그리고 미세주입된 수정란의 무분별한 이식으로 인한 많은 경비와 시간이 소요된다(McEvoy와 Sreenan, 1990). 그러므로 형질전환동물 생산의 효율을 향상시키기 위하여서는 수정란에서 주입된 유전자의 통합을 확인한 다음 이를 선별적으로 대리모에 이식함으로써 많은 경비, 시간 및 노력을 줄일 수 있을 것이다. 이를 실행하기 위하여 많은 연구자들은 reporter 유전자를 사용하여 초기 수정란단계에서 유전자의 발현여부를 조사하고자 하였으나 이러한 방법들은 검사 후 효소반응에 의하여 수정란의 사멸이 불가피하여 형질전환동물 생산에는 사용이 불가능하였다. 그러나 PCR 기법을 이용하여 수정란을 사멸시키지 않고 King과 Wall(1988) 은 소의 배반포에서 주입된 유전자를 확인하였고, Ninomiya 등(1989)은 생쥐의 상실배를 양분하여 나머지 반의 상실배에서 유전자를 증폭시켜 검색하였다. Thomas 등(1993)은 소의 수정란에서 주입된 외래유전자의 integration rate를 조사하였던 바 299개의 수정란 중 단지 2개(0.7%)에서만 통합이 확인되었다고 하며, Bowen 등(1993)은 PCR로 검색된 수정란의 이식에 의하여 형질전환 소를 생산하였고 533개의 수정란 중 421개의 transgenic negative 를 가려냄으로써 수란우의 수를 79%나 줄일 수 있었다고 한다. 이렇게 PCR 분석으로 수정란을 대리모에 이식하기 전에 유전자의 통합을 조기에 판정함으로써 형질전환동물 생산효율을 향상시키는데 매우 유익하게 활용될 수 있다.

최근에는 해파리의 일종인 *Aequorea victoria*에서 자발적으로 형광을 띄는 특성을 가

진 GFP(Green fluorescent protein) gene를 추출하여 reporter gene으로 사용함으로써 살아있는 식물이나 동물에서 유전자의 역동학을 조사할 수 있게 되어 수정란의 조기감별과 확인이 더욱 용이하게 되었다(Chalfie 등, 1994; Amsterdam 등, 1995; Prasher 등, 1995; Huang 등, 1997). 이 GFP 유전자를 이용하면 해로운 효소를 사용하지 않아도 되며, PCR을 이용할 경우 불필요한 biopsy로 인한 수정란의 손상도 줄일 수 있으며, 짧은 시간에 쉽게 유전자의 발현을 확인하고 대리모에 이식하여 형질전환동물을 효과적으로 생산할 수 있을 것이다. Ikawa 등(1995)은 이를 응용하여 형광빛을 띤 양성의 수정란 82개를 선별하여 대리모에 이식하여 32마리의 산자중 32마리의 GFP-transgenic mice를 생산하였고 Takada 등(1997)은 양성 수정란 55개를 이식하여 태어난 12마리의 산자중 11마리의 형질전환 생쥐를 생산함으로써 예전의 방법에 의한 형질전환생쥐의 생산률보다는 엄청난 효율 향상을 이루게 되었다.

본 연구에서는 외래유전자가 들어있는 plasmid를 *E. Coli*에 transformation 시켜 대량 생산하고 이 plasmid를 restriction enzyme으로 필요한 부분만큼의 외래유전자를 절단하고 이를 토끼와 한우수정란내에 미세주입하여 유전자전환 수정란을 작출하였다. 이 수정란을 체외에서 배양하여 이들의 체외발생능과 유전자 주입에 따른 생존력에 미치는 영향을 조사하였고, 이들 수정란이 8-세포기에서 상실배기로 자라면 nested PCR 및 GFP 분석을 통하여 분리된 각 할구세포 또는 수정란에서의 외래유전자의 integration 효율을 비교조사하였다. 또한 수정란에 주입된 유전자의 조기 확인과 선별을 통한 형질전환동물생산기술을 향상시키기 위한 한 방법으로 수정란 할구세포에서 주입된 유전자의 존재 또는 발현을 확인하기 위하여 nested PCR 및 GFP 분석기법을 개발하고자 하였다.

제2절. 재료 및 방법

가. 수정란의 전핵내에 주입될 MT-hGH 유전자와 primer의 제작

1) 유전자전환 수정란 (transgenic embryo)의 생산을 위한 외래유전자의 준비

본 실험에 사용한 유전자는 mouse metallothionein promoter-human growth hormone fusion gene(MT-hGH, Fig. 3. A)과 green fluorescent protein gene(GFP, Fig. 3. B)를 사용하였다. MT-hGH 유전자는 KAIST의 이경광 박사와 University of

Washington의 Dr. Palmiter로부터 분양받았으며, GFP 유전자는 일본 National Children's Medical Reserch Center 의 Dr. Takada로부터 분양받은 것을 사용하였다. Plasmid는 electroporation 방법으로 DH5a methylase-defective strain CPLK-17에(Polites와 Pinkert, 1994) transform시켜 배양하여 통상적인 분자생물학적 방법으로 대량의 plasmid를 준비하였다(Sambrook 등, 1989). 이 plasmid를 제한효소로 digestion하고 agarose gel로 전기영동하여 fusion gene이 들어있는 fragment를 확인한 후(Palmiter 등, 1983) 잘라내어 Qualex II kit(Quagen)를 이용하여 정제, 농축하고 microinjection buffer(10mM Tris, pH 7.4; 0.1mM EDTA)에 용해시켜 최종 2 ng/μl 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 미세주입 수정란에서 유전자 통합 PCR 검색을 위한 primer의 설계 및 합성

MT-hGH는 mouse의 metallothionein promoter 부분과 human growth hormone의 structural gene이 fusion 된 construct이다. 두 개의 forward primer(P1, P3)는 fusion gene의 metallothionein promoter 부분에서 설계하였고, 두 개의 reverse primer(P2, P4)는 human growth hormone gene 부분에서 설계하여 embryo에 주입된 외래유전자에서만 두 쌍의 primer가 서로 가까운 위치에 결합하여 증폭이 가능하도록 하였다. Primer를 설계할 때는 Oligo primer design computer program(NBI)을 이용하였고 설계한 primer는 (주)Bioneer에 합성을 의뢰하였다.

두 쌍의 primer들은 다음과 같은 염기순서를 가지고 있다.

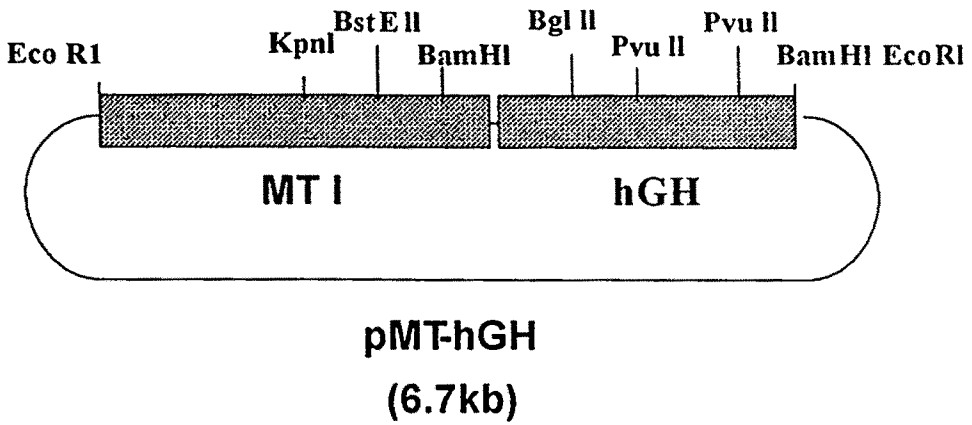
P1 (forward), 22-mer,
5' -CGTAATATCGGGGAAAGCACTA- 3'
P2 (reverse), 21-mer,
5' -TCATTCAGAAGCCCCAAACCT- 3'
P3 (forward), 22-mer,
5' -GCTCTGCACTCCGCCCGAAAAG- 3'
P4 (reverse), 22-mer,
5' -GGTTAGTGCCCCCGTCCCATCT- 3'

Primer 3-4쌍은 primer 1-2쌍에 의한 product 의 내부에 위치하여 nested PCR에 의한 확실한 판정이 가능하도록 하였다. 이들 primer 쌍에 의하여 PCR을 수행했을 때 예상되는 생성물의 크기는 다음과 같다.

Primer 1(f) - Primer 2(r) 쌍 : 508bp

Primer 3(f) - Primer 4(r) 쌍 : 367bp

A)



B)

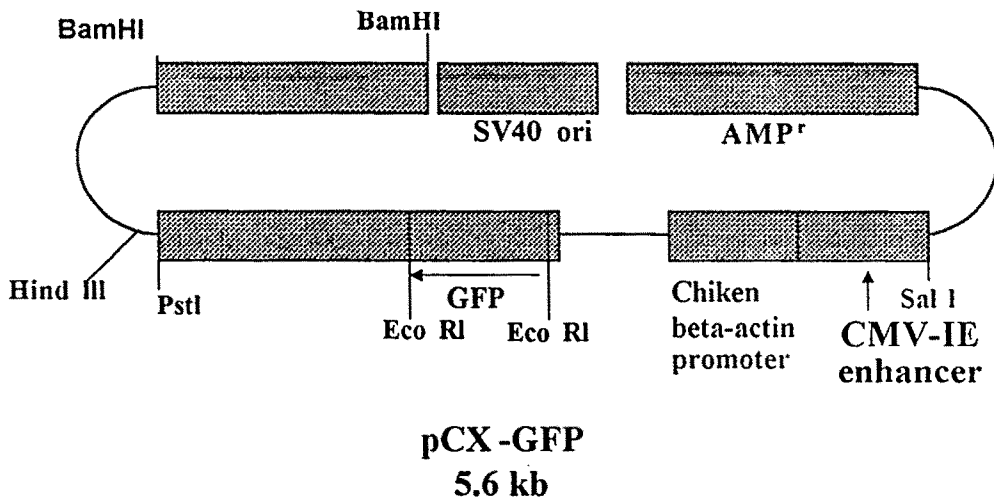


Figure 3. Restriction maps of metallothionein-human growth hormone(MT-hGH) plasmid(A) and green fluoresescent protein(GFP) plasmid(B).

3) 외래유전자의 수정란 전핵 내 주입과 체외배양

외래유전자의 미세주입은 미세조작기가 장착된 DIC(Differential Interference Contrast) 도립현미경하에서 실시하였다. 토끼와 한우 수정란의 응성전핵에 준비된 2.6 kb 의 MT-hGH 와 2.7 kb 의 GFP 유전자를 약 2-3 μ l 정도 조심스럽게 주입하여 핵막이 약간 부풀어 오를 정도에서 미세피펫을 후진하였다(Fig. 4). 수정란의 체외배양은 미세주입이 끝난 후 세포질이 파괴되지 않은 것만 골라 TCM-199과 RD 배양으로 옮겨 토끼 및 한우의 난관상피세포와 같이 5% CO₂ 배양기내에서 공배양하였다.

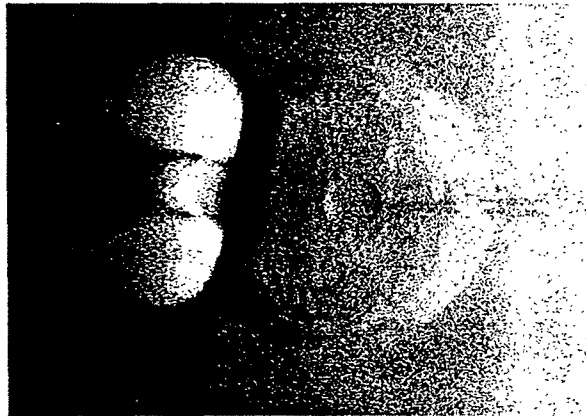


Fig. 4. Microinjection of a gene into the male pronucleus of a bovine zygote. The pronucleus is swollen from injected DNA.

4) 수정란의 체외배양

수정란의 체외배양을 위하여 먼저 도살된 토끼의 난관으로부터 난관상피세포를 무균적으로 회수하여 최종 농도 $1 \sim 2 \times 10^6$ cells/ml로 조절한 다음 10% fetal calf serum(FCS, Sigma, USA)을 첨가한 TCM-199 배양액으로 배양시켜 사용하였다.

수정란의 체외배양은 10% FCS를 첨가한 TCM-199 배양액과 D-MEM(GibcoBRL, USA)와 RPMI 1640(GibcoBRL, USA)을 1 : 1 로 희석하여 만든 RD 배양액을 토끼의 난관 상피세포와 같이 39°C의 5% CO₂ 배양기내에서 공배양하였다.

나. 미세주입 수정란에서 유전자 통합의 PCR 검색

1) Nested PCR primer의 설계 및 합성

위 가 - 2), 3)의 방법에 의하여 primer를 설계하였다.

2) 할구분리 및 세포 lysate 준비

Gene injection 후 8-cell 혹은 16-cell stage로 자란 embryo를 pronase 처리로 투명대를 제거하고 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺-free D-PBS에서 할구를 분리하였다(이 등, 1994). 분석될 세포는 D-PBS로 여러번 세척 후 200µg/ml의 proteinase K가 들어있는 1x PCR buffer 1µl에 옮겨서 58°C에서 1시간 배양한 후 94°C에서 10분간 가열하여 효소의 활성을 없앴다.

3) Nested PCR 반응

Nested PCR 반응은 Dziadek과 Bakker(1993)의 방법에 따라 실시하였다. 즉, Tris, (NH₄)₂SO₄, Triton X-100, gelatin, MgCl₂, dNTPs, primer, Taq polymerase 등을 포함하는 PCR reaction stock solution을 만들어 분주하여 -20°C에 보관하였다가 PCR 분석 직전에 녹여 cell lysate가 들어있는 각 tube에 18µl씩 mineral oil 층을 통하여 더한 후 PCR cycle을 시작하였다. 첫 primer 쌍을 사용하여 20 cycle의 PCR 반응을 실시한 후 첫 반응물에서 1µl를 취하여 두번째 PCR를 35 cycle 실시하였다.

4) PCR 생성물 분석

2차 PCR 반응 생성물 중 약 10µl를 agarose gel에서 전기영동하여 ethidium bromide stain후 UV transilluminator로 증폭된 DNA를 확인하였다.

다. GFP 유전자의 PCR-screening

1) GFP 유전자 증폭을 위한 Primer 설계 및 합성

GFP 유전자를 검출하기 위하여 다음 네가지의 primer를 설계하였다.

GFP-1 (forward), 22mer,

5'-TTGCACTACTGGAAAACCTACCT-3'

GFP-2Mu (forward), 22mer

5'-ACACTTGTCACTACTTTCACTT-3'

GFP-3 (forward), 22mer

5'-TTAACTTTGATTCCATTCTTTT-3'

GFP-4(revers),

5'-TTTTGTTGATAATGGTCTGCTA-3'

GFP 1-4쌍에 의하여 PCR을 수행했을 때 예상되는 생성물의 크기는 414bp이며 GFP-1, 4 product의 내부에 위치한 GFP-2Mu, 3쌍에 의한 product는 317bp이다. 이와 동시에 성감별을 위하여 Y chromosome에 특이적 primer와 PCR의 성공여부를 알기 위한 internal control로 SMC gene을 증폭할 수 있는 primer를 사용하여 multiplex PCR을 시행하였다.

라. 한우 수정란에서 PCR-screening에 의한 성감별

1) 성감별을 위한 primer의 설계

한우 수정란에서 성감별을 하기위해 Y chromosome 특이적인 primer를 다음과 같이 설계하였다.

337BY(forward), 25mer,

5'-CACGCTGCAATTCCAATACACAGAG-3'

338BY(revers), 26mer,

5'-CAAGCTAATCGATCCATCCTATAGTC-3'

PCR product의 크기는 287bp이다.

PCR 성공여부를 알기위한 primer로 SMC gene을 증폭하기 위해 다음과 같이

primer를 설계하였다.

SMCX-1(forward), 18mer,

5'-CCGCTGCCAATTCTTTGG-3'

SMC4-1(revers), 19mer

5'-TGAAGCTTTTGGCTTTGAG-3'

PCR product의 크기는 300bp이다.

2) PCR 반응

위 나 - 2와 같은 방법으로 할구 및 세포 lysate를 준비하여 PCR 반응에 이용하였다. GFP gene의 존재여부와 성감별 및 PCR 반응의 성공여부를 동시에 확인하기 위하여 반응에 들어가는 세가지 종류의 primer를 넣고 multiplex PCR을 하기 위하여 각각의 primer 농도 및 annealing 온도를 정교하게 조절하였다. PCR 반응은 처음 45 cycles는 GFP를 증폭하기 위한 primer와 internal control을 위한 primer를 넣고 성감별을 위한 primer는 소량 넣어 반응시켰다. 반응이 끝난후 1.5% agarose gel에 전기영동하여 GFP gene의 존재여부를 확인한 후 GFP gene이 확인되면 1차 PCR product 1 μ l를 template로 이용하여 성감별을 위한 primer쌍 및 GFP-2Mu, 3 쌍의 primer를 넣어 성감별 및 GFP nested의 multiplex PCR를 실시하였다. PCR product는 2% agarose gel에 전기영동하여 band를 확인하였다.

제3절. 연구의 결과

1) 유전자전환 토끼 수정란의 생산과 유전자 검색

근래에는 동물의 수정란 내에 주입된 유전자를 조기에 판별할 수 있는 방법으로 유전자가 주입된 수정란을 배양시킨 다음 할구세포를 하나 또는 일부분 분리하여 취하고 여기에서 PCR기법을 사용하여 유전자를 증폭시켜 검색하는 방법과 GFP 유전자를 reporter gene 으로 사용하여 이를 수정란에 주입하고 이의 발현을 형광현미경으로 조기에 확인하는 방법이다. 이를 응용하여 토끼와 소의 수정란내에 이들 유전자를 주입하고

검색하였다.

가) 토끼 수정란에서 외래유전자의 검색

(1) PCR-screening

본 연구진은 MT-hGH 유전자 및 GFP 유전자를 토끼 수정란의 응성전핵내에 미세주입하고 이를 체외배양하여 발달과정별로 이들에서의 유전자 존재와 소멸을 PCR 분석을 통하여 확인하여 보았다. (Table 12) 토끼에서는 배반포기에서 주입된 MT-hGH 유전자가 25% 만 양성으로 나타나 발달과정에서 75%가 소실되었다.

Table 12. Detection of MT-hGh gene by PCR-screening in gene-injected rabbit embryos at various developmental stages

Cell stage	No. of embryos analyzed	PCR-screening	
		Positive(%)	Negative(%)
2-cell	51	30(59) ^a	21(41)
4-cell	43	28(65) ^a	15(35)
8-cell	43	27(63) ^a	16(37)
Blastocyst	132	33(25) ^b	99(75)

* The values with different superscripts within column were significantly different (P<0.05).

외래유전자를 미세주입한 후 각 세포단계에서 할구에서의 PCR 검출 가능성을 보기 위하여 2-, 4-, 8-, 16-세포기의 주입 embryo를 할구분리하여 각각 20, 22, 6, 23 개의 할구를 얻어 PCR검색을 하였다. 2-, 4-, 8-, 16-세포기의 embryo 할구에서 각각 15, 13, 5, 10개의 양성할구를 얻었다. 그러므로 단일 할구에서도 PCR 검색에 의한 양성판정이 가능함을 확인하였다(Table 13).

Table 13. PCR analysis of the presence of transgene in individual blastomeres from 2-, 4-, 8-, 16-cell embryos microinjected with transgene at zygote stage

Developmental stage	No. assayed(%)	No. positive(%)
2-cell	20	15 (75)
4-cell	22	13 (59)
8-cell	6	5 (83)
16-cell	23	10 (43)

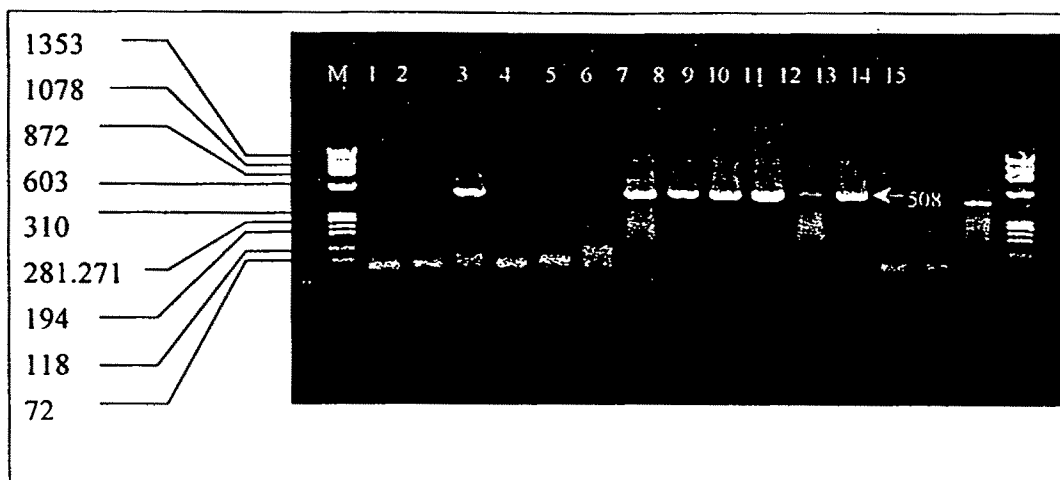


Fig. 5. Detection of MT-hGH gene in rabbit embryos by PCR (508 bp). M; marker(phix 174/HaeIII), Lane 1-3; 2-cell, Lane 4-6; 4-cell, Lane 7-9; 8-cell, Lane 10-12; blastocyst, Lane 13-14; negative control, Lane 15; positive control.

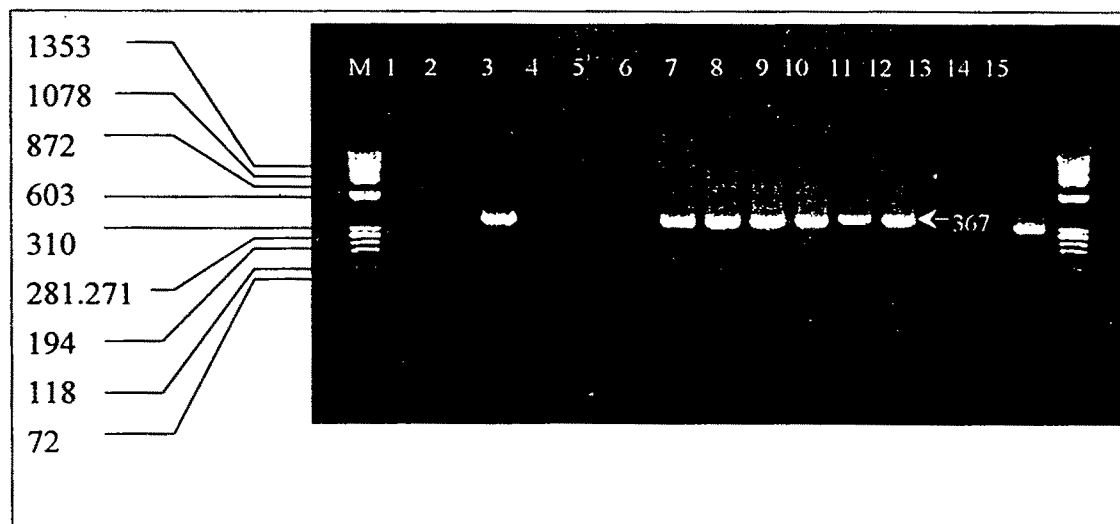


Fig. 6. Detection of MT-hGH gene in rabbit embryos by nested PCR(367 bp). M; marker(phix 174/HaeIII), Lane 1-3; 2-cell, Lane 4-6; 4-cell, Lane 7-9; 8-cell, Lane 10-12; blastocyst, lane 13-14; negative control, Lane 15; positive control.

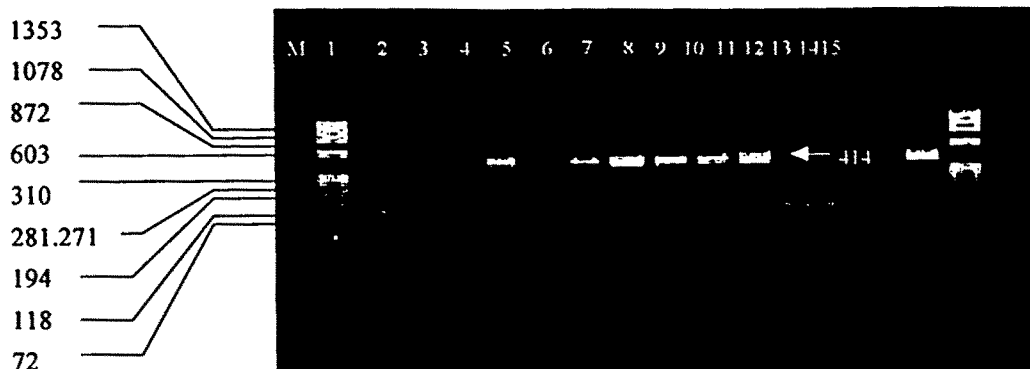


Fig. 7 Detection of GFP gene(414 bp) in rabbit embryos by PCR. M; marker(phix 174/HaeIII), Lane 1-11; blastocyst, Lane 12-13; negative control, Lane 14; positive control.

(2) GFP-screening

토끼 수정란에 GFP 유전자를 주입하고 체외에서 배양하였던 바, 배반포로의 발달율은 67.6%이었으며, 이들을 형광현미경으로 유전자 발현을 검사하였더니 30.6%가 양성을 보였다.(Table 14 및 Figure 8참조) GFP유전자는 핵내에서 발현이 일어나지 않으면 녹색을 나타내지 않는 특성을 가지고 있어서 상실배기 이후에야 형광현미경으로 발현을 확인할 수 있다. 또한 이들 수정란을 PCR-screening 하였던 바, GFP 양성을 보인 11개의 수정란에서 5개(45.5%)는 역시 PCR-screening에서도 양성을 보였고, 6개(54.5%)는 음성을 보였다. GFP 음성인 수정란은 모두 PCR-screening에서도 음성을 보였다(Figure 12).

Table 14. Effect of GFP gene microinjection on *in vitro* development and GFP expression in rabbit embryos

No. of zygotes injected	No. of embryos developed to blastocyst(%)	No. of GFP positive blastocysts(%)
108	73(67.6)	33(30.6)

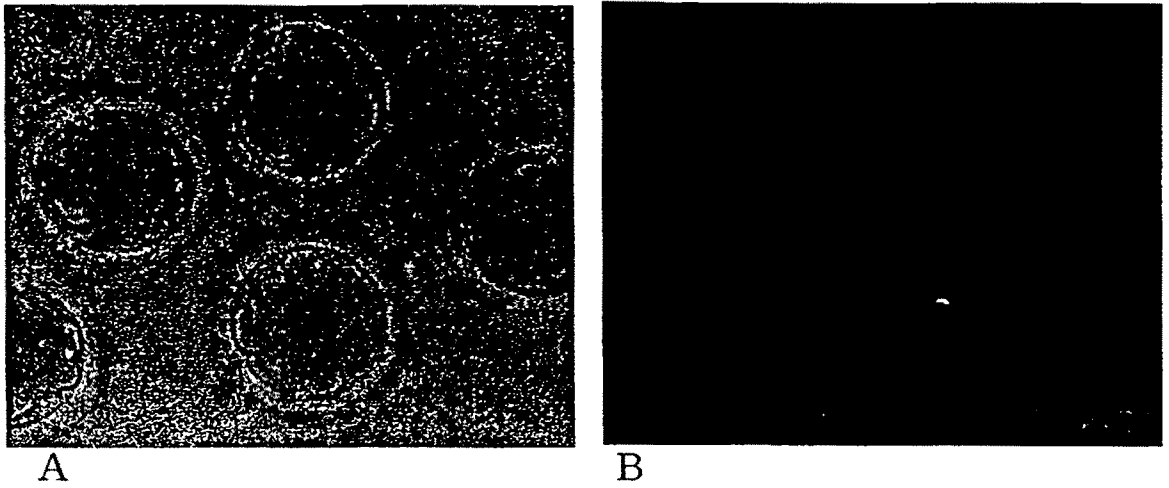


Fig. 8. GFP expression at morular stage under a phase contrast microscope(A) and under a fluorescent microscope(B). 200 ×.

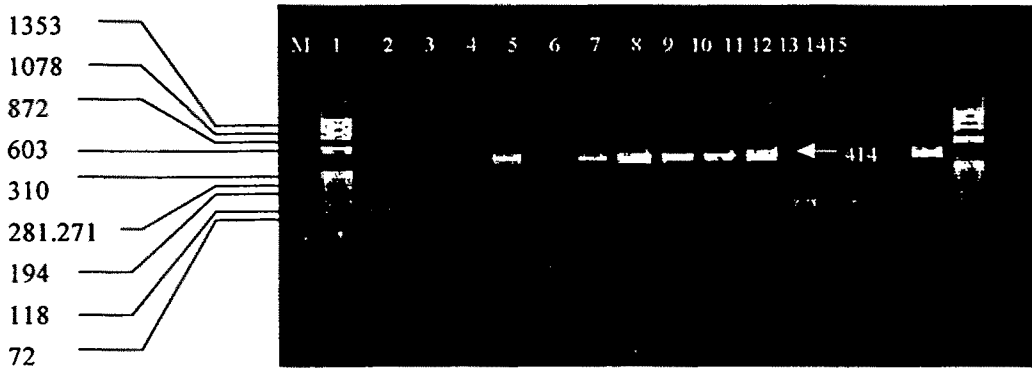


Fig. 9. Detection of GFP gene(414 bp) in rabbit embryos by PCR. M; marker(phix 174/HaeIII), Lane 1-11; blastocyst, Lane 12-13; negative control, Lane 14; positive control.

2) 유전자전환 한우 수정란의 생산과 확인

(1) 미세주입에 의한 외래유전자의 한우 수정란내 주입과 체외발달능력 조사

소 수정란에 외래유전자를 주입하여 수정란의 분할율과 배발달율을 조사한 성적은 Table 15에서 보는 바와 같다. 미세주입하지 않은 수정란의 분할율은 80.3% 이고 MT-hGH gene 및 GFP gene을 미세주입한 수정란의 분할율은 66.7% 와 73.5% 를 보였다. 그리고 배반포기까지의 발달율은 미세주입하지 않은 수정란에서는 31.1%를 보였고, MT-hGH gene 및 GFP gene을 미세주입한 수정란에서는 16.7%와 17.0% 로 나타났다. 두 유전자간에는 유의적 차이가 없었다. 이러한 결과는 최근 선진국에서의 성적과 비슷한 수준이다.

Table 15. *In Vitro* development of bovine embryos co-cultured with bovine oviductal epithelial cells after microinjection with MT-hGH gene or GFP gene

Group	No. of embryos	No. of embryos cleaved(%)	No. of blastocyst (%)
Control	132	106(80.3)	33(31.1)
Buffer-injection	73	42(57.5)	7(16.7)
MT-hGH gene-injection	72	48(66.7)	9(18.7)
GFP gene-injection	136	100(73.5)	17(17.0)

Table 16. *In vitro* embryo development rates from ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration-derived(TVFAD) or slaughterhouse-derived(SHD) matured oocytes microinjected with MT-hGH gene

Treatment groups	No. of zygotes injected	No. of blastocysts(%)
TVFAD	98	23(23.5)
SHD	158	32(20.3)

(2) 외래유전자 주입 한우 수정란내 유전자의 식별과 선별

GFP 유전자를 한우 수정란에 주입하고 체외에서 발달시켜 세포기별로 유전자를 PCR-screening을 통하여 확인함과 아울러 성감별을 동시에 실시하여 보았던 바, 12개의 수정란 중 8개가 양성반응을 보였고 4개가 음성반응을 보였으며, 성감별한 결과 암컷이 7개였고 수컷이 5개였다.(Table 17) 수정란 단계에서 유전자의 조기탐별과 식별을 용이하게 하기 위하여 한우 수정란 136개에 GFP 유전자를 주입하고 이들을 체외배양하면서 배반포까지의 발달과 이들에서의 유전자 발현을 조사하였던 바, 이중 17(17%)개가 배반포로 자랐으며, 이들 중 2개(11.8%)에서 GFP 유전자 발현을 형광현미경으로 확인하였다 (Table 18). 이의 결과로 보아, 이식전단계에서 GFP 유전자를 활용하여 90% 이상의 유전자 음성인 수정란을 가려낼 수 있었다. 이와 같이 외래유전자를 수정란에 주입하고 체외 배양을 통하여 유전자전환 수정란을 생산하며 PCR- 및 GFP-screening을 통하여 주입된 유전자의 존재/발현을 조기에 확인함으로써 조기선별이 가능하다고 생각되며 또한 성감별을 동시에 실시함으로써 산자에서의 성조절이 가능함을 확인하였다(Fig. 10).

Table 17. PCR analysis of GFP gene and sexing of bovine embryos at various cell stages following gene injection

No. of embryos	Cell stage of embryos	PCR analysis	
		GFP-gene	Sexing
1	2-cell	+	female
2	2-cell	-	male
3	2-cell	+	female
4	4-cell	-	male
5	4-cell	-	female
6	4-cell	+	male
7	8-cell	+	male
8	8-cell	+	female
9	morula	+	female
10	blastocyst	+	female
11	blastocyst	-	male
12	balstocyst	+	female
Total	12	+, 8, -, 4	female;7, male;5

Table 18. Effect of GFP gene microinjection on *in vitro* development and GFP expression in bovine embryos

No. of zygotes injected	No. of embryos developed to blastocyst(%)	No. of GFP positive blastocysts(%)
136	17(17.0)	2(11.8)

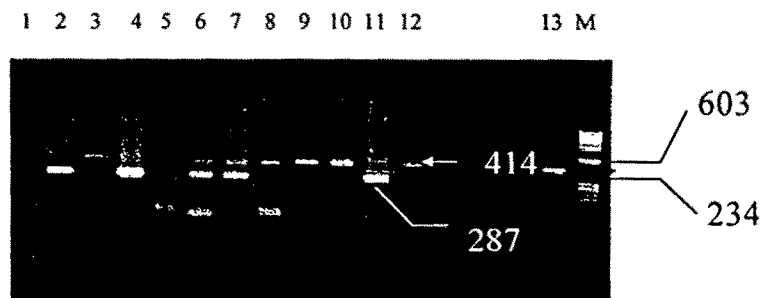


Fig. 10. Detection of GFP gene(414 bp) and Y chromosome(287 bp) in bovine embryos at various cell stages by PCR.

M; marker, Lane 1-3; 2-cell, Lane 4-6; 4-cell, Lane 7, 8; 8-cell, Lane 9; morula, Lane 10-12; blastocyst, Lane 13; positive control

제4절. 연구결과의 고찰

형질전환동물을 생산하기 위하여 외래유전자를 수정란의 개체에 삽입하는 방법은 응성전핵에 미세주입하는 방법, 레트로바이러스 벡터를 이용하는 방법 및 embryonic stem cell을 활용하는 방법 등이 주로 사용되고 있다. 본 연구에서는 이들 방법들 중 유전자를 응성전핵에 직접 미세주입하는 방법을 이용하여 형질전환 수정란을 생산하고, PCR-screening 및 GFP 발현을 조사하여 조기감별하고자 하였다.

형질전환 동물 또는 태아의 조직에서 유전자의 발현을 검출하는 여러 가지 방법이 연구되어 왔다. Chloramphenicol acetyl transferase(CAT)(Gorman 등, 1982; Shaw 등, 1975), Firefly luciferase(Crenshaw 등, 1989; Morrey 등, 1992), Puromycin N-acetyltransferase(Lahoz 등, 1991; Lahoz 등, 1992), Growth hormone gene(Swift 등, 1989; Palmiter 등, 1991; Ting 등, 1992), 그리고 *lac Z* gene(Hughes and Balu, 1990; Weis 등, 1991)과 같은 reporter 유전자를 이용하여 유전자의 발현을 조사하였다. 그러나 reporter 유전자를 이용하여 수정란 단계에서 유전자의 발현여부를 조사하고자 하면 이들 유전자들의 검출방법이 효소반응을 하거나 luminometer를 이용하기 때문에 발현된 수정란은 사멸이 불가피하게 되어 살아있는 상태에서 조기선별법으로는 활용이 부적합하다. King과 Wall(1988)은 PCR분석법을 이용하여 소의 배반포에서 유전자검출을 하였으며, 미세조작기법을 이용하여 수정란의 일부를 biopsy하여 할구에서 유전자의 발현여부를 조사할 수 있어 수정란을 사멸시키지 않고 선별이 가능하고 나머지 할구는 핵이식에 사용하면 다수의 형질전환 수정란을 복제할 수도 있는 장점을 가지고 있다. 실제 실험동물인 생쥐(Ninomya 등, 1989)와 가축(Krimpenfort 등, 1991; Hyttinen 등, 1996; Bowen 등, 1993)의 배반포에서 PCR기법으로 유전자가 발현된 수정란을 검출하여 대리모에 이식함으로써 많은 경비와 노력을 절감하고 형질전환동물 생산효율을 향상시키는 연구가 수행되어 오고 있다.

본 실험에서는 먼저 토끼 수정란을 사용하여 MT-hGH 유전자와 GFP 유전자를 응성전핵내 주입하고 이들을 체외배양 후 배반포 발달률과 배반포에서의 PCR 검출률을 비교 조사하였다. 유전자간의 차이에 따른 배반포발달률은 MT-hGH 유전자에서는 60%, GFP유전자 주입수정란은 67%로 유의할 만한 차이를 나타내지 않았다. 그러나 배반포에서 유전자의 PCR검출률은 GFP 유전자 주입수정란이 30% 양성으로 MT-hGH 유전자 주입수정란 25% 양성률 보다 약간 높게 나타났다.

MT-hGH 유전자는 수정란이 발달할수록 수정란 뿐만 아니라 할구세포에서도 양성

으로 검출되는 율이 점차 낮아지는 경향을 보였다. 배반포기까지 발달한 수정란 132 개 중 PCR 검색에서 양성인 것은 33개로서 25%를 차지하였다. Burdon과 Wall(1992)은 생쥐에서 KH gene을 전핵내에 주입하고 체외발달을 시키면서 발달 단계별로 수정란에서의 유전자를 PCR로 검출하여 보았더니, 2- 및 4-세포기에서는 100% 양성을 보였으나 상실배기에서는 44% 그리고 배반포기에서는 26%의 양성률을 보여 본 실험에서와 같이 점차 양성률이 낮아지는 경향을 보였다고 한다. Koo 등(1996)은 돼지 수정란에서 gGH 유전자를 융성전핵 내에 주입하고 발달 단계별로 조사하였는던 바, 역시 2-, 4-, 및 8-세포기에서는 100% 양성률을 보였고, 상실배기에서는 45% 그리고 배반포기에서는 44.4%가 양성을 보였다고 한다. 그리고 Thomas 등(1993)은 소에서 2.25 Kb의 SV-40-gp51 gene을 전핵내에 주입하고 배반포로 자란 것에서 PCR로 유전자를 검출하여 보았더니 6.7% 만이 양성을 보였다고 한다(Table 참조). 본 연구에서 한우의 수정란에 GFP 유전자를 주입한 후 배반포에서 PCR검색으로 11.8%의 양성율을 확인할 수 있었다. 그리고 multiplex PCR 기법을 이용하여 한우의 수정란에서 성감별을 동시에 확인할 수가 있었다. Hyttinen 등(1996)도 소에서 DNA 주입후 배반포로 자란 수정란에서 93%의 음성인 것을 PCR검색으로 가려낼 수 있었다고 한다. 그러나 Krisher 등(1994)은 소의 배반포 수정란에서 89%가 양성을 보였다고 한다. 이러한 유전자검색률의 차이는 동물의 품종, 유전자의 종류 및 PCR 검출 방법에 따른 차이로 생각되며 대체로 수정란이 발달할수록 점차 낮아지는 것을 알 수 있었다. 이는 착상전의 초기단계 수정란에서도 PCR 검색으로 유전자 통합이 일어나지 않았거나 소실된 것을 조기에 55-90% 이상 선별함으로써 이식 후 형질전환 산자의 생산률 향상에 도움이 될 것으로 본다. 그리고 본 연구에서는 PCR을 이용하여 유전자통합여부와 성감별을 동시에 함으로써 형질전환 수정란을 생산함과 동시에 성조질이 가능함을 확인할 수 있었다.

Table 19. Preselection efficiency of transgenic embryos by PCR-screening

Animal species	Genes	No. of morulae or blastocysts		References
		Analyzed	Positive(%)	
Mouse	pSV2-pgt-gE1A	84	30(35.7)	Ninomiya et al (1989)
	WAP-KH	85	22(26.0)	Burdon & Wall(1992)
	WAPPC-3	89	26(29.0)	Page et al(1995)
Rabbit	MT-hGH	132	33(25)	Lee et al (1998)
Cattle	SV40-glycoprotein	92	6(6.5)	Thomas et al(1993)
	MT-oGH	26	14(54)	Behboodi et al(1993)
	hPC	20	19(95)	Krisher et al(1994)
	b-casein +h-erythropoietin	41	2(5)	Hyttinen et al(1996)
Pig	LacZ-gGH	18	8(44.4)	Koo et al(1996)

제5절. 연구의 결론

토끼 및 한우 수정란의 응성전핵 내에 MT-hGH 유전자와 GFP 유전자를 미세주입하여 유전자전환 수정란을 작출하고, PCR-screening 및 GFP-screening으로 주입된 유전자의 존재여부 및 발현을 조기에 확인하여 유전자전환 수정란의 선별기술을 개발하고자 하였다. 그리고 앞으로 이들 선별된 수정란의 할구를 이용하여 핵이식기법으로 형질전환된 수정란을 다량 복제를 실시함으로써 형질전환동물 생산기술을 향상시키고자 일련의 실험을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MT-hGH 유전자를 주입한 토끼 수정란을 체외배양하여서 세포단계별로 PCR screening한 결과, 2-, 4-, 8-세포기에서 각각 59, 65, 63%의 비슷한 양성반응을 나타내었으나, 배반포에서는 유의적($P < 0.05$)으로 낮은 25%의 양성반응을 보였다. 그리고 할구별

PCR-screening에서도 2- 및 4-세포기 할구에서 각각 84, 77%의 양성반응을 보였으나 8- 및 16-세포기 할구에서는 유의적($P < 0.05$)으로 낮은 25%의 양성반응을 보였다.

2. 소 수정란에 MT-hGH 유전자를 주입하여 이들의 분할율을 조사함으로써 주입성공율을 확인하였던 바, 총 72개의 주입된 수정란 중 48개가 분할하여 66.7%의 주입성공율을 보였고, buffer만 주입하였던 대조군에서도 57.5%의 분할율을 보여 유전자 주입이 50% 이상 성공적으로 일어났음을 확인하였다.

3. 유전자가 주입된 소 수정란을 난관상피세포와 공배양을 실시하였던 바, 48개중 9개가 배반포기로 발달하여 18.7%의 발달율을 보였다.

4. 유전자가 주입된 후 체외에서 배반포기로 자란 수정란을 PCR 분석을 실시하였던 바, 토끼에서는 88%가 유전자 음성을 나타내었다. 2-, 4-, 8- 및 16-세포기의 embryo 할구에서 각각 15, 13, 5, 및 10 개의 양성할구를 얻었다. 그러므로 단일 할구에서도 PCR 검색에 의한 양성판정이 가능함을 확인하였다.

5. 토끼수정란에 GFP 유전자를 주입한 후 체외배양한 결과, 배반포기까지의 발달률은 67.6%였다. 이들 배반포중에서 형광현미경으로 확인된 GFP 유전자의 발현율은 30.6%였다. 이들 GFP 양성반응 11개의 배반포를 PCR screening한 결과, 45.5%가 양성으로 검출되었다. 그러나 형광현미경 상에서 음성으로 나타난 8개의 배반포는 PCR screening에서도 모두 음성으로 나타났다.

6. 한우 수정란에 GFP 유전자를 주입한 후 체외배양한 결과, 배반포기까지의 발달률은 17.0%였다. 이들 배반포 중에서 형광현미경으로 확인된 GFP 유전자의 발현율은 11.8%였다. 그러므로 GFP 분석을 통하여 다수의 유전자 발현이 일어나지 않은 수정란(88%)을 조기에 선별이 가능하게 되었다.

제6절. 참고문헌

Amsterdam, A., Lin, S. and Hopkins, N. 1995. The *Aequorea victoria* green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos. *Dev. Biol.* 171:123-129.

Biery, K. A., Bondioli, K. R. and De Mayo, F. J. 1988. Gene transfer by pronuclear injection in the bovine. *Theriogenology.* 29:224.

Bowen, R. A., Reed, M. L., Schnieke A., Seidel G. E. J., Stacey, A., Thomas, W. K. and Kajikawa, O. 1994. Transgenic cattle resulting from biopsied embryos: Expression of c-ski in a transgenic calf. *Bio. Reprod.* 50:664-668.

Bowen, R. A., Reed, M., Schnieke, A., Seidel, G. E., Brink, Z. and Stacey, A. 1993. Production of transgenic cattle from PCR-screened embryos. *Theriogenology.* 39:194.

Brinster, R. L., Chen, H. Y., Trumbauer, M. E., Yagle, M. K. and Palmiter, R. D. 1985. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc. Natl. Sci. USA.* 82:4438-4442.

Burdon, T. G. and Wall, R. J. 1992. Fate of microinjected genes in preimplantation mouse embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 33:436-442.

Camper, S. A., Saunders, T. L., Kendal, S. K., Keri, R. A., Seasholtz, A. F., Gordon, D. F., Birkmeier, T. S., Keegan, C. E., Karolyi, I. J. and Roller, M. L. 1995. Implementing transgenic and embryonic stem cell technology to study gene expression, cell-cell interactions and gene function. *Biol. Reprod.* 52:246-257.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., and Prasher, D. C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science.* 263:802-805.

Crenshaw, E. B., Kalla, K., Simmons, D. M., Swanson, L. W. and Rosenfeld, M. G. 1989. Cell-specific expression of the prolactin gene in transgenic mice is controlled by synergistic interactions between promoter and enhancer elements. *Genes Dev.* 3:959-972.

Gorman, C. M., Moffat, L. F. and Howard, B. H. 1982. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 2:1944-1951.

Haskell, R. E. and Bowen, R. A. 1995. Efficient production of transgenic cattle by retroviral infection of early embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 40:386-390.

Hill, K. G., Curry, J., DeMayo, F. J., Jones-Diller, K., Slapak, J. R. and Bondioli, K. R. 1992. Production of transgenic cattle by pronuclear injection. *Theriogenology.* 37:222.

Hughes, S. M. and Blau, H. M. 1990. Migration of myoblasts across basal lamina during skeletal muscle development. *Nature.* 345:350-353.

Huang, Y., Xu, X. P. and Li, B. J. 1997. Improved green fluorescent protein as a fast reporter of gene expression in plant cells. *Bio/Technology.* 11:133-136.

Hyttinen, J. M., Peura, T., Tolvanen, M., Aalto, J. and Janne, J. 1996. Detection of microinjected genes in bovine preimplantation embryos with combined DNA digestion and polymerase chain reaction. *Mol. Reprod. Dev.* 43:150-157

Ikawa, M., Kominami, K., Yoshimura, Y., Tanaka, K., Nishimune, Y. and Okabe, M.

1995. A rapid and non-invasive selection of transgenic embryos before implantation using green fluorescent protein(GFP). *FEBS Letter.* 375:125-128.
- Kim, J. H., Jung, H. S., Lee, H. T. and Chung, K. S. 1997. Development of a positive method for male stem cell-mediated gene transfer in mouse and pig. *Mol. Reprod. Dev.* 46:515-526.
- King, D. and Wall, R. J. 1988. Identification of specific gene sequences in preimplantation embryos by genomic amplification : detection of a transgene. *Mol. Reprod. Dev.* 1:57-62.
- Koo, D. B., Lim, J. G., Lee, S. M., Chang, W. K., Kim, N. H., Lee, H. T. and Chung, K. S. 1996. Developmental ability and transgene expression of IVM/IVF derived porcine embryos after DNA microinjection. *Korean J. Anim. Sci.* 20:19-26.
- Krimpenfort, P., Rademarkers, A., Eyestone, W., Schans, A., Broek, S., Kooiman, P., Kootwijk, E., Platenburg, G., Piper, Frank., Strijker, R. and de Boer, H. 1991. Generation of transgenic dairy cattle using in vitro embryo production. *Bio/Technology.* 9:844-847.
- Krisner, R. L., Gibbons, J. R., Canseco, R. S., Johnson, J. L., Russell, C. G., Notter, D. R., Velandar, W. H. and Gwazdauskas, F. C. 1994. Influence of time of gene microinjection on development and DNA detection frequency in bovine embryos. *Transgenic Research.* 3:226-231.
- Kubisch, H. M., Larson, M. A., Eichen, P. A., Wilson, J. M. and Roberts, R. M. 1997. Adenovirus-mediated gene transfer by perivitelline microinjection of mouse, rat, and cow embryos. *Bio. Reprod.* 56:119-124.
- McEvoy, T. G. and Sreenan, J. M. 1990. The efficiency of production, centrifugation, microinjection and transfer of one- and two-cell bovine ova in a gene transfer program. *Theriogenology.* 33:819.
- Morrey, J. D., Bourn, S. M., Bunch, T. D., Sidwell, R.W. and Rosen, C. A. 1992. HIV-1 LTR activation model : evaluation of various agents in skin of transgenic mice. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 5:1195-1203.
- Ninomiya, T., Hoshi, M., Mizuno, A., Nagao, M. and Yuki A. 1989. Selection of mouse preimplantation embryos carrying exogenous DNA by polymerase chain reaction. *Mol. Reprod. Dev.* 1:242-248.
- Palmiter, R. D., Norstedt, G, Galinas, R. E., Hammer, R. E. and Brinster, R. L. 1983. Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science.* 222:809.
- Palmiter, R. D., Sandgren, E. P., Avarbock, M. R., Allen, D. D. and Brinster, R. L. 1991. Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 478-482.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. and Cormier, M. J. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111:229-233.
- Roschlau, K., Bommel, P., Andreewa, L., Zackel, M., Roschlau, D., Zackel, B. Schwerin, M., Huhn, R. and Gazarjan, K. G. 1989. Gene transfer experiments in cattle. *J. Reprod. Fertil. suppl.* 38:153-160.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. In *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor laboratory Press. 1989.

Sharma, A., Martin, M. J., Okabe, J. F., Truglio, R. A., Dhanjal, N. K., Logan, J. S. and Kumar, R. 1994. An isologous porcine promoter permits high level expression of human hemoglobin in transgenic swine. *Bio/Technology*. 12:55-59.

Shaw-White, J. R., Denko, N., Albers, L., Doetschman, T. C. and Stringer, J. R. 1993. Expression of the *lac Z* gene targeted to the HPRT locus in embryonic stem cells and their derivatives. *Transgenic Research*. 2:1-13.

Shaw, W. V. 1975. Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria. In Hash, J. H. ed., *Methods in Enzymology*, vol. 43: Antibiotics, pp. 737-755. New York: Academic Press, Inc.

Takada, T., Lida, K., Awaji, T., Itoh, K., Takahashi, R., Shibui, A., Yoshida, K., Sugano, S. and Tsujimoto, G. 1997. Selective production of transgenic mice using green fluorescent protein as a marker. *Nature Biotechnology*. 15:458-461.

Thomas, W. K., Schnieke, A. and Seidel, G. E. 1993. Methods for production transgenic bovine embryos from in vitro matured and fertilized oocytes. *Theriogenology*. 40:679-688.

Ting, C. N., Rogenberg, M. P., Snow, C. M., Samuelson, L. C. and Meisler, M. H. 1992. Endogenous retroviral sequences are required for tissue-specific expression of a human salivary amylase gene. *Genes Dev*. 6:1457-1465.

Wall, R. J., Hawk, H. W. and Nel, N. 1992. Making transgenic livestock : genetic engineering on a large scale. *J. Cell. Biochem*. 49:113-120.

Weis, J., Fine, S. M., David, C., Savarirayan, S. and Sanes, J. R. 1991. Integration site-dependent expression of a transgene reveals specialized features of cells associated with neuro-muscular junctions. *J. Cell. Biol*. 113:1385-1397.

이효중, 전병균, 윤희준, 이경미, 송상현, 공일근, 노규진, 최민철, 최상용, 박충생. 1994. 핵이식에 의한 복제토끼 생산. *한국수정란이식학회지*. 9(2):161-165.

제4장. 복제수정란 생산을 위한 핵이식기법의 개발

제1절. 서론

1952년 Briggs 와 King이 개구리에서 처음으로 핵이식산자를 보고한 이래, 생쥐(C hoe 등, 1992), 토끼(이 등, 1994), 양(Willadsen, 1986), 돼지(Prather 등, 1989) 와 소(Robl 등, 1987)에서도 핵이식에 의한 산자가 보고되어 복제동물의 생산 가능성이 입증되었으며 오늘날에는 계대배양한 stem cell 이나(Campbell 등, 1996) 체세포인 유선세포핵을 이용하여(Willmut 등, 1997) 복제양을 생산하기에 이르렀다. 그러나 핵이식 기술은 수핵란의 탈핵, 핵의 주입등 숙련된 미세조작을 요구하고 있으며 작출한 수정란을 이식시 낮은 산자 생산률, 기형과 기능이상 등을 나타내어 실용화에 커다란 장애요소로 되어 있다(Kruip and den Daas, 1997).

성숙된 난자는 Maturation promoting factor(MPF)를 유지하고 있으며 이는 핵막의 소실(nuclear envelope breakdown)과 염색체의 응축(chromatin condensation)을 유기한다(Nurse, 1990). 수정이나 외부의 자극에 의하여 난자를 활성화시키면 난자내의 MPF는 낮아지면서 간기로 전이한다. 또 정상상태의 대부분의 상질배 단계의 할구는 세포 분열간기(interphase)에 있으므로 핵이식을 할 때에 활성화된 난자를 사용하면 핵막의 소실이나 염색체 응축과 같은 핵에 좋지않은 영향으로 인정되는 작용을 피할수 있다고 보고하고 있다(Barnes et al, 1993; Campbell et al., 1993). 이러한 측면에서 면양에서는 MPF가 떨어진 활성화된 난자를 사용하여 높은 배반포 발달률을 얻었으며, 산자생산에도 성공하였다(Campbell 등, 1993;). 소에서는 Aoyagi 등 (1994), Kono 등 (1994) 및 Stice 등(1994, 1996) 도 탈핵된 MII기 난자를 인위적으로 활성화 자극을 준 다음, 이것을 수핵란으로 사용할 때 성숙된 MII기의 난자를 사용할 때보다 높은 배반포로의 발달률을 얻었으며, Stice 등 (1994) 도 역시 같은 방법으로 산자 생산에 성공 하였다. 또 난자의 활성화 방법에 있어서 전기자극대신 Ionomycin 과 단백질 효소억제제인 6-DMAP을 사용하여 난자를 활성화시킴으로 소(Peura 등, 1997; Lewis 등, 1997; Lavoit 등, 1997b), 양(Loi 등, 1997; Lavoit 등, 1997a), 토끼(Yin 등, 1998; 하 등,1998)의 핵이식 수정란의 높은 체외발달을 혹은 임신율을 보고하고 있다.

그리고 핵이식은 조작상 숙련된 기술을 필요하고 있으며 특히 미세조작에서 수핵란의 탈핵은 제 1극체와 주변의 염색질을 제거하는 방법이 많이 사용되고 있고 이는 형광형미

경에서 핵염색 후 확인해야하는 번거로움과 부작용이 우려되고 있다(Prather 등, 1989; Westhusin 등, 1992). 더욱이 확실한 핵제거를 위하여 거의 1/5-1/3 의 세포질의 제거는 세포질내 함유된 미지의 세포질인자의 소실을 가져오며 체적이 작은 후기배를 공핵란으로 사용할 때 융합율을 떨어뜨린다. 그러므로 간편하고 핵만 제거하는 탈핵법의 개발은 핵이식을 실용화시키는데 중요한 과제로 되고 있다.

본 연구에서는 토끼와 한우 난자를 ionomycin 과 6-DMAP 의 복합활성화 방법으로 활성화시켜 응축된 난자핵이 제 2극체와 함께 밖으로 도출되는 자체탈핵을 유도하고 제 2극체 돌기만 제거하므로써 난자의 핵을 쉽게 제거하는 방법을 개발하고 이 방법으로 핵이식한후 발달율을 비교조사하여 핵이식에 있어서 핵만 쉽게 제거하는 이상적이고 간편한 방법을 건립하고자 하였다.

이러한 수핵난자의 전환성화 유도와 탈핵기법의 개선을 통하여 수정란의 복제기술을 개발하고자 하였다.

제2절. 재료 및 방법

가. Ionomycin 과 6-dimethylaminopurine(6-DMAP) 처리로 활성화된 난자를 이용한 핵이식기법의 개선

1) 실험동물

본 실험에 사용된 공시동물은 New-Zealand White 종의 체중이 3kg 전후의 성숙된 토끼로서 연암원에축산전문대학으로부터 공급받았으며 빛(light: 14시간, dark: 10시간)을 조절하여 분리 사육하였고 물과 사료(토끼용 펠렛사료, 퓨리나사료)는 자유로이 급식하였다.

2) 수핵난자와 공핵수정란의 준비

난자의 확보를 위한 과배란 유기는 성숙한 암토끼를 10 mg의 FSH(Folltropin[®], Vetrepharm Co., Australia)를 1일 2회 3일간 근육주사하였고, 마지막 투여 12시간 후 hCG(PEAMAX[®], Japan)를 100 IU를 정맥주사하였다. 난자는 hCG 주사 후 13~15 사이에 암토끼를 chlorpromazine HCl과 ketamine HCl로 전신마취한 다음 개복수술하여 난관

으로 부터 성숙난자를 10% FCS가 함유된 D-PBS로 회수하였다. 회수된 난자는 300 IU/ml의 hyaluronidase(Sigma Chemical Co., U.S.A.)에서 39°C, 5% CO₂조건에서 7분간 배양한 다음, 150 μ m fire-polished pipette으로 난구세포를 제거하여 제1극체가 명확하고 세포질이 충실한 것을 공시난자로 사용하였다.

핵을 공급할 수정란의 준비도 역시 상기방법으로 과배란을 유기한 다음 토끼를 성숙된 수토끼와 교미후 32-세포기에 있는 수정란을 회수하였고, 이들로부터 할구를 분리하여 실험에 사용하였다.

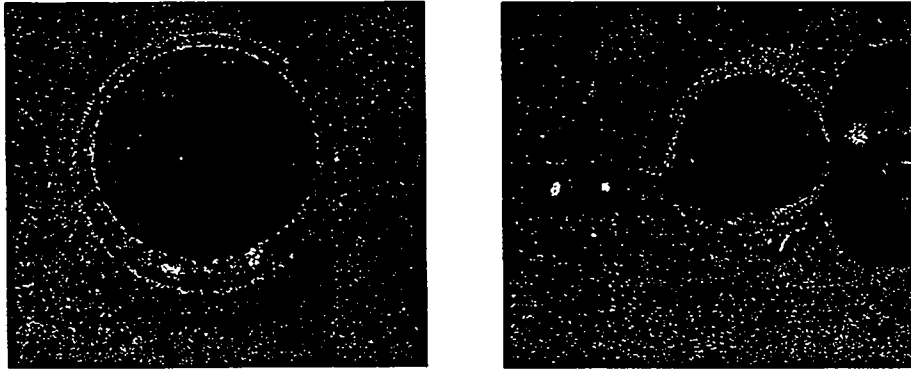
3) 수핵란의 탈핵 및 핵염색

(1) Non-preactivated group: McGrath와 Solter(1983)의 non-distruptive 조작법에 의하여 실시하였다. 즉 MII 단계의 성숙된 난자로 부터 핵을 제거하기 위하여 외경 30 μ m의 연마된 미세 pipette을 투명대 내로 진입시키고 제 1극체와 그 주위에 위치하는 핵을 원형 질막에 싸여진 채로 흡입하여 제거하였다. 또 수핵난자의 체란시간에 따른 탈핵효율을 조사하고자 hCG 투여 후 15-16, 16-17, 및 19-20시간대에 체란된 난자를 사용하여 상기 방법으로 탈핵후 5 μ g/ml Hoechst 33342, 의 D-PBS에서 5분간 염색한후 형광현미경 아래서 탈핵여부를 판단한다.

(2) Preactivated group: 새로고안된 탈핵법(modified enucleation technique)에 의하여 hCG 투여 16-20시간후에 체란한 난자를 5 μ M 의 Ionomycin 에서 5분 침지한후 2.0 mM 의 6-DMAP 에서 2시간 배양하면 활성화 처리한 대부분의 난자에서 제 2극체가 돌출되며 난자의 핵은 응축되어 제 2극체와 함께 형질막에 싸여진 채로 위관막강으로 돌출되는 지체탈핵현상이(Fig. 11A)관찰된다. 이러한 현상을 응용하여 위와 같이 처리된 난자를 외경 10-20 μ m의 연마된 미세 pipette을 투명대 내로 진입시키고 돌출된 제 2극체와 제1극체만 제거하므로써 탈핵을 완료한다(Fig. 11B)

4) 난자의 활성화처리

Non-preactivated group의 난자의 활성화는 탈핵된난자를 5 μ M 의 Ionomycin 에서 5분 침지한후 2.0 mM 의 6-DMAP 에서 2시간 처리하였다.



A

B

Fig. 11. Outline of the procedure for preparing activated recipient oocytes for enucleation. A: A self-enucleated oocytes. Note that the entire chromatin complemented and extruded into the the second polar body. B: Enucleation of the second and first polar bodies by micromanipulation.

5) 핵주입 및 융합

공핵수정란으로 부터 분리된 할구세포 하나를 미세 pipette에 흡입하고 이를 미세조작으로 탈핵된 수핵난자의 원형질 바깥 위란막강에 주입하였다

핵이 주입된 난자는 이 등(1993)의 방법에 따라 핵융합을 실시하였다. 전기자극은 전압은 1.25 kV/cm, 통전시간은 60 μ sec 및 통전횟수는 1회로 정하였다. 융합과 난자의 활성화를 위한 용액은 Ca^{++} , Mg^{++} 이 함유되지 않은 0.28 M mannitol 용액으로 할구가 이식된 난자를 이 용액으로 세척한 electrode chamber 에 융합용액을 700 μ l 넣고 핵이식란을 옮겨 Electro Cell Manipulator 200(BTX. Inc., U.S.A.)로 핵의 융합을 유도하였다. 세포질과 핵의 융합이 확인된 난자는 7.5 μ g/ml의 cytochalasin B와 10% FCS가 함유된 TCM-199배양액(Earl's salt, Sigma Chim. Co.)에서 1시간 동안 배양한 다음 공배양하였다.

6) 통계학적 분석

실험결과는 Chi-square test 및 Student t-test를 실시하여 처리군간의 차이에 대한 유의성을 검정하였다.

나. 핵이식에 의한 한우 수정란의 복제

1) 수핵난자와 공핵할구의 준비

한우에서 채란된 Grade I 과 II 의 난포란을 선별하여 10% FBS (Gibco, U.S.A.)가 첨가된 TCM-199 (Sigma, U.S.A.)에 sodium pyruvate(56 $\mu\text{g}/\text{ml}$), NaHCO_3 (2.2 mg/ml), streptomycin(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), penicillin G(100 unit/ml), LH(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), estradiol-17 β (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 FSH(35 $\mu\text{g}/\text{ml}$)가 첨가된 체외성숙 배양액에 24-32 시간 체외배양후 제 1극체가 방출되고 세포질이 충만한 난자만을 수핵난자로, 8~32-세포기로 발달한 체외수정란을 공핵할구로 공시하였다. 공핵수정란의 할구분리는 300 IU/ml pronase에 3분간 처리하여 투명대를 연화시킨 다음, Ca^{2+} , Mg^{2+} free 액에서 pipetting으로 응집된 할구를 분리하고 분리된 할구를 TCM-199 액으로 세정하였다.

2) 미세조작에 의한 난포란의 탈핵과 핵이식

McGrath 와 Solter(1983)의 방법에 준하여 탈핵하여 제거된 난자를 Pursel 등(1985)의 방법에 따라 형광염색액인 Hoechst 33342 (Sigma, U.S.A.)로 핵염색을 실시하여 형광현미경하에서 탈핵성공의 유무를 확인하였다. 공핵수정란으로 부터 분리된 할구세포 하나를 미세 pipette에 흡입하고 이를 미세조작으로 탈핵된 수핵난자의 원형질 바깥 위란막강에 주입하였다

3) 핵융합

핵이식수정란을 100 μM CaCl_2 및 MgCl_2 , 0.05 mg/ml BSA 가 함유된 0.28 M mannitol 용액이 700 μl 담긴 electrode chamber 내에 핵이식란을 옮겨 Electro Cell Manipulator 200(BTX. Inc., U.S.A.)로 핵의 융합을 유도하였다. 세포질과 핵의 융합이 확인된 난자는 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 cytochalasin B와 10% FCS가 함유된 TCM-199배양액(Earl's salt, Sigma Chim. Co.,)에서 1시간 동안 배양한 다음 공배양하였다.

4) 난자의 Preactivation에 따른 핵이식수정란의 융합율 및 발달율

전기적 방법: 핵이식수정란의 융합율과 발달율에 대한 preactivation의 효과를 조사하

기 위해서 탈핵된 수핵난자를 TCM-199 배양액에서 4 시간 배양하고, 0.28 M mannitol 용액에서 DC 1.5 kV/cm, 60 μ sec, 1회의 통전횟수로 전기자극을 가하여 활성화를 유도하고, 2 시간 후에 핵이식한 후 DC 0.75~1.0 kV/cm, 60 μ sec, 1회의 통전횟수로 전기자극을 가하여 융합율과 발달율을 비교·조사하였다.

화학적 방법: 난자의 활성화는 탈핵된 난자를 5 μ M 의 Ionomycin 에서 5분 침적한후 2.0 mM 의 6-DMAP 에서 3시간 처리하였다.

5) 핵이식 수정란의 체외배양

융합이 확인된 핵이식수정란은 TCM-199 배양액으로 3~4회 세정하여 CO₂ 배양기에서 TCM-199액에 단층을 형성하고 있는 난관상피세포와 공배양하여 7~9일간 배양하면서 발달율을 조사하였으며, 배양액은 48 시간 간격으로 교환하였다. 7~9일간 배양된 배반포기의 체외성숙·수정된 수정란과 핵이식된 수정란을 Hoechst 33342로 핵염색하여 형광현미경하에서 할구수를 조사하였다.

6) 통계학적 분석

실험결과의 통계학적 분석은 χ^2 -test 및 Student's t-test를 이용하여 분산분석과 유의차를 검정하였다.

제3절. 연구의 결과

1) Ionomycin 과 6-dimethylaminopurine(6-DMAP) 처리로 활성화된 토끼 난자를 이용한 핵이식기법의 개선

(1) 수핵난자 체란시간에 따른 탈핵효율

난자의 체란시간에 따른 탈핵률의 효과를 알아보고자 hCG 투여 후 15-20시간에 난자를 체란하여 미세조작후 난자의 탈핵여부를 검사하였던 결과는 Table 19 에서 보는 바와 같다. hCG 투여 후 15-16 시간에 체란한 난자는 73.4%의 탈핵률을 보였고, 16-17 시간의 난자는 75.8%의 탈핵률을 보였으며 후 19-20 시간의 난자에서는 58.5%의 탈핵률을 보여 체란

시간에 따라 탈핵률은 유의적($p < 0.10$) 차이를 나타내었다.

Tebel 19. Successful enucleation of rabbit oocytes in different ages by micromanipulation

Age of oocytes (hrs post hCG)	No. of oocytes used	No. of oocytes manipulated(%)	No. of oocytes enucleated(%)
15-16	81	79(97.5)	58(73.4) ^a
16-17	36	33(91.7)	25(75.8) ^a
19-20	44	41(93.2)	24(58.5) ^b

* The values with different superscripts in the same column were significantly different($P < 0.10$).

(2) 개선된 탈핵방법에 의한 탈핵효율

hCG 투여 15-16시간후에 채란한 난자를 미세조작하여 제1극체와 극체주위 염색질을 제거하므로써 핵을 제거하는 대조구(control)와 $5\mu\text{M}$ 의 Ionomycin 에서 5분 침지한 후 2.0mM 의 6-DMAP 에서 2시간 처리하여 제 2극체 돌출을 유도하고 이를 제거하므로써 응축되어 제 2극체내에 있는 핵을 동시에 제거하는 새방법(new method)을 사용할 때 탈핵율을 비교하였는바 Table 20 에서 보는 바와 같다.

제1극체와 극체주위 염색질을 제거하므로써 핵을 제거하는 대조구(control)에서는 70.4%의 탈핵율을 보였지만 Ionomycin 와 6-DMAP 으로 제 2극체 돌출을 유도하고 이를 제거하므로써 응축되어 제 2극체내에 있는 핵을 동시에 제거하는 개선된 탈핵방법을 사용할 때 96.8% 의 탈핵율을 보여 유의적 차이를 나타내고 있다. 그리고 미세조작한 난자에서 탈핵되지 않은 난자를 $5\mu\text{M}$ 의 Ionomycin 에서 5분간 배양한 후 2.0mM 의 6-DMAP에서 2시간 처리시 98.87%의 난자에서 제 2극체를 방출하였으며, 탈핵된 난자는 제 2극체를 방출하지 않았다. 염색후 확인 결과 탈핵되지 않은 난자의 핵은 응축되어 제 2극체내에 나와 있었다. 이로부터 미세조작한 난자를 제 2극체의 출현여부로서 탈핵여부를 확인할 수 있음을 알 수 있었다.

Table 20. Enucleation efficiency of rabbit oocytes preactivated by ionomycin and 6-DMAP treatments.

Type of oocytes	No. of oocytes used	No. of oocytes manipulated	No.(%) of oocytes enucleated
Non-preactivated	107	98	69(70.4) ^a
Preactivated	96	93	90(96.8) ^b

* The values with different superscripts in the same column were significantly different(P<0.05).

(3) 새로운 탈핵방법에 의한 핵이식 수정란 작출 효과

hCG 투여 13-16시간후에 채란한 난자를 미세조작하여 제 1극체와 극체주위염색질을 제거하므로써 핵을 제거하는 대조구(control)와 5 μ M 의 Ionomycin 에서 5분 침적한 후 2.0 mM 의 6-DMAP 에서 2시간 처리하여 제 2극체 돌출을 유도하고 이를 제거하므로써 제 2극체내에 응축되어있는 핵을 동시에 제거하는 새로 고안된 방법(new method)을 사용하여 할구를 주입한후 이들의 핵융합율과 발달율을 조사한 결과는 Table 21에 나타난 바와 같다.

기존탈핵법과 새로운 탈핵법을 사용하여 핵이식시 핵이식 수정란에서 각각 80.4 및 88.2%의 핵융합율을 보여 핵융합율에 있어서는 서로 유의적인 차이는 나타내지 않았으며 배반포까지의 발달률에서는 39.3% 와 33.3%를 나타내여 유의적 차이를 나타내지 않았다.

Table 21. Electrofusion and *in vitro* development of rabbit NT embryos reconstituted with preactivated oocytes

Experimental groups	No. of oocytes used	No. of embryos fused(%)	No. of embryos cultured	No. of embryos developed to(%)	
				2-cell	Blastocyst
Non-preactivated	102	82(80.4) ^a	28	20(71.1)	11(39.3) ^a
Preactivated	51	45(88.2) ^a	12	9(75.0)	3(33.3) ^a

* There was no significantly difference in development rate and fusion rate between control and new method groups.

2) 핵이식에 의한 한우 수정란의 복제생산

(1) 수핵난자의 preactivation에 따른 핵이식수정란의 융합율 및 발달율

24 시간 체외배양된 수핵난자를 탈핵하고 체외성숙 28 시간에 DC 1.5 kV/cm, 60 μ sec 및 1 회의 통전자극조건으로 전기자극을 가해 preactivation 을 유도한 후 체외배양 32 시간에 공핵할구를 이식하고 DC 1.0 kV/cm, 60 μ sec 및 1 회의 통전자극조건으로 전기자극을 가한 preactivation과 non-preactivation에 따른 핵이식수정란의 융합율과 발달율을 조사한 결과는 Table 24와 같다. 융합율에 있어서 preactivation이 85.8%로 non-preactivation (71.7%) 보다 좋은 성적이었고, 상실배기와 배반포기로의 발달율에 있어서도 preactivation이 24.2%로 non-preactivation의 12.8% 보다 유의적(P<0.05) 차이가 인정되었다. 따라서 핵이식수정란의 융합과 발달율을 상승시키기 위해서 탈핵 후 활성화 자극을 가하고 핵이식과 전기융합을 실시하는 것이 효과적임을 알 수 있었다.

Table 22. Electrofusion and *in vitro* development of rabbit NT embryos reconstituted with preactivated oocytes

Experimental groups	No. of oocytes used	No. of embryos fused(%)	No. of embryos developed to(%)	
			2-cell	Morula & blastocyst
Non-preactivated	152	109(71.7)	70(64.2)	14(12.8) ^a
Preactivated	183	152(85.8)	119(75.8)	38(24.2) ^b

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

2. Ionomycin 과 6-dimethylaminopurine(6-DMAP) 처리로 활성화된 난자를 이용한 핵이식기법의 개선

24 시간 체외배양된 수핵난자를 탈핵하고 체외성숙 28 시간에 전기자극대신 5 μ M

의 Ionomycin 에서 5분 침적한후 2.0 mM 의 6-DMAP 에서 3시간 처리하브로서 핵이식수정란의 융합율과 발달율을 조사한 결과는 Table 23와 같다 배반포기로의 발달율에 있어서 Ionomycin + DMAP으로 활성화한 그룹에서 23%로서 대조구보다 유의적(P<0.05) 차이가 인정되었다. 따라서 핵이식수정란의 생산에 있어서 Ionomycin + DMAP으로 활성화방법이 효과적임을 알 수 있었다.

Table 23. Development in vitro of bovine NT embryos produced by intracytoplasmic injection of nuclei isolated from 32-cell stage blastomeres

Groups	Replicates	No. of oocytes	No. of embryos(%)	
			Cleaved	Blastocysts
Control	9	127	10 (8)	0 (0) ^a
Ionomycin + DMAP	9	145	103 (71)	33 (23) ^c

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

3. 배양체계 및 할구의 크기에 따른 핵이식수정란의 융합율 및 발달율

수정후 114시간(day 5)까지 개체 및 그룹배양한 수정란의 할구를 크기별로 분류하여 핵이식에 사용하여 융합율 및 발달율을 조사한 결과는 Table 24에 나타난 바와 같다.

개체배양된 한우 수정란에서 할구의 크기에 따라 작은 것(small) 과 큰 것(large) 두처리구로 분류하고 이들의 핵이식후 핵융합율은 각각 71.0 및 71.4% 이었고, 그룹배양된 수정란에서는 할구의 크기가 작은 것(small)과 large 처리구에서 각각 69.9 및 77.1%로 유의적(P<0.05)인 차이는 나지 않았으며, 배반포기 배로의 발달에 있어서도 각각 11.4%, 8.0%, 17.2%, 12.9%의 발달율을 보였다. 그러므로 개체 배양된 수정란을 공핵수정란으로 사용이 가능할 것으로 사료된다.

Tabel 24. Effect of culture condition and blastomere size on subsequent development in Day-5 donor embryos on NT embryos.

Method of culture	Size of blastomeres	No. of oocytes used	No.(%) of embryos fused	No.(%) of embryos developed to			
				2-cell	8-cell	Morula	Blastocyst
Individual	Small	62	44(71.0)	36(81.9)	20(45.4)	9 (20.4)	5(11.4)
	Large	70	50(71.4)	39(78.0)	20(40.0)	9 (18.0)	4(8.0)
Group	Small	83	58(69.9)	44(81.1)	25(47.2)	16(27.6)	10(17.2)
	Large	70	54(77.1)	46(84.6)	23(44.2)	12(22.2)	7(12.9)

제4절. 연구결과의 고찰

핵이식 방법에 있어서 탈핵은 하나의 중요한 기술이지만 현재 대부분의 포유류 핵이식에서는 난자의 제1 극체와 극체 주변의 염색질을 제거하는 미세조작에 탈핵을 의존하고 있으며 이는 숙련된 기술과 경험이 필요하다. 탈핵 효과를 높이기 위하여 DNA 염색액을 조작용액에 첨가하고 형광형미경으로 확인하는 방법을 사용하고 있으나 이러한 방법들은 여전히 숙련된 기술을 요구하고 있으며 이것들은 핵이식 기술의 보편화를 제한하고 있다(First 와 Prather, 1991; Robl 등,1992). 정상적인 난자의 발달은 metaphase I에서 anaphase I 그리고 metaphase II에서 anaphase II 로 발달되며 이과정에서 제 1극체와 제 2극체를 방출한다. 본 실험에서 metaphase II 단계의 핵이 남아 있는 난자를 Ionomycin 에서 5분 배양후 6-DMAP에서 2시간 처리시 제 2극체가 돌출되며 핵은 응축되어 극체 내에 들어 있어 이는 Ionomycin의 활성화 작용과 6-DMAP의 핵 응축작용의 복합결과라고 사료되며, 이는 Fulka와 Moor는(1993) MI 단계의 마우스 난자를 50 μ g/ml 의 etoposid(ETO) 와 50 μ g/ml의 cycloheximide(CHXM)에 배양시 96%의 난자에서 염색체는 응축되어 제1 극체와 같이 방출되는 자체탈핵을 나타냈다는 것과 유사하다.

핵이식시 공핵란과 수핵란의 정확한 Remodelling 이 수행되기 위해서는 완전한 탈핵이 선행되어야 한다. 토끼 난자에 있어서 Collas와 Robl (1990)은 제1 극체와 주변의 염

색체를 흡입제거시 탈핵 pipette에서 MII기의 핵이확인 가능하므로 육안으로 직접 탈핵을 확인하였다고 보고하고 있으나, Adenot 등(1997) 과 Heyman 등 (1990)은 토끼에서 DNA 염색액을 사용하여 형광현미경하에서 탈핵을 확인하였다. 본 실험실에서도 수년간 육안으로 탈핵확인 가능 여부를 시도하였지만 정확한 관정이 불가능하여 임의로 제 1극체 주변의 염색질을 제거하는 방법을 사용하여 왔다. 본 실험에서는 MII기의 난자를 사용하여 제 1극체와 그 주변의 세포질을 1/5 혹은 1/6을 제거한 후 Ionomycin 과 6-DMAP를 처리하여 제 2극체의 출현여부로 탈핵률을 조사한 결과 hCG주사후 15-17시간의 난자는 73.4, 75.8% 의 탈핵률을 보이는 반면, 19-20 시간의 난자에서는 58.5% 의 탈핵률을 보여 탈핵률이 유의적으로 저하되었다. 이러한 결과는 배란직후의 난자의 핵은 제 1극체 바로 부근 세포질에 위치하지만 시간이 경과되면 핵은 중앙으로 이동하여 탈핵을 어렵게 만들며 또 난구세포 제거시 제 1극체의 이동이 더욱 큰 원인임이 본 실험에서 처음으로 밝혀졌다. 이의 근거는 정상난자를 Ionomycin 과 6-DMAP 처리시 제 2차극체의 위치는 20% 정도가 제1 극체와 떨어져 있거나 반대쪽에 있었음이 확인되었다. 제 1극체의 위치 이동은 난구세포 제거방법과 관련되어 있고 이는 조작자의 숙련도와 난구세포 제거 방법과 관련되었다고 사료된다. 이러한 탈핵 성적은 소(Parther 등, 1987)에서 60%, 양에서 (Smith 와 Wilmut, 1989) 68%와 돼지에서의 (Prather 등, 1989) 74%와 유사한 성적을 나타내고 있다.

토끼에 있어서 난자를 핵융합술에 있어서는 Ionomycin 과 6-DMAP 의 활성화처리로 제 2극체 돌출을 유도하고 제 2극체를 제거함으로써 응축되어 제 2극체내에 있는 핵을 동시에 제거하는 새방법(new method)을 사용함으로써 재래의 DNA염색과 형광현미경아래서 확인하는 번거러움과 유해함을 피할 수 있으며 간편하고 탈핵율이 높으며 그리고 작은 내경의 탈핵 피펫을 사용함으로써 난자의 상처를 최소한 줄일 수 있었다. 핵이식에 있어서 탈핵방법은 DNA염색액이 함유한 조작 미디어에서 작업하거나 작업후 형광현미경아래서 확인 하는 방법을 사용하는 것외에 미성숙난자를 약물처리로서 제 1극체와 함께 자체탈핵을 유도하는 방법(Fulka and Moor, 1993), mucin을 제거한 세포질을 원심분리하는 방법(Tatham 등, 1995) 등이 시도되고 있으나 여러 가지 제한성으로 제 1극체와 주위 세포질을 제거하는 재래방법을 사용하고 있다. 본 실험에서는 기존탈핵법과 새로운 탈핵법을 사용하여 핵이식시 핵이식 수정란에서 각각 80.4 및 88.2%의 핵융합율을 보여 핵융합율에 있어서는 서로 유의적인 차이는 나타내지 않았지만 이는 공핵란을 크기가 큰 초기배를 사용하였으므로 사료되며 근래에 와서는 공핵란의 공급원으로 크기가 작은 후기배의 태아 세포나 심지어 체세포를 사용하므로 더욱 적은 세포질의 제거는 융합율을 높이기 위해 질

실이 필요하다 이 점에서 본 방법은 탈핵법에서의 획기적인 방법으로 사료된다. 그리고 기존탈핵법과 새로운 탈핵법을 사용하여 핵이식시 핵이식 수정란의 배반포까지의 발달률에서는 39.3% 와 33.3%를 나타내어 핵이식 수정란 생산의 효과적인 방법으로 사료된다.

24 시간 체외배양된 수핵난자를 탈핵하고 체외배양 28 시간에 DC 1.5 kV/cm, 60 μ sec 및 1회의 통전자극조건으로 preactivation을 유도한 후 체외배양 30시간에 공핵할구를 이식하고 32시간에 DC 1.0 kV/cm, 60 μ sec 및 1회의 통전자극조건으로 전기자극을 가해 preactivation과 non-preactivation에 따른 핵이식수정란의 융합율과 발달율을 조사한바, 융합율에 있어서 preactivation이 85.8% 로 non-preactivation(71.7%) 보다 좋은 성적 이였고, 상실배기 및 배반포기로의 발달율에 있어서도 preactivation이 24.2%로 non-preactivation의 12.8% 보다 유의적($P < 0.05$) 차이가 인정되었다. Stice와 Keeper (1993)는 활성화된 난자를 핵이식시 수핵난자로 이용할 경우 발달율이 향상된다고 하였다. 특히 전기자극을 가한 난자는 1.5~2 시간 후에 제 2극체의 방출이 일어나고, 4 시간 후에 전핵형성을 나타낸다(Powell과 Barnes, 1992). 이는 제 2감수분열 중기에 있는 활성화된 MPF가 전기자극 2시간후 부터 비활성화되기 시작하고, DNA 합성은 4시간 후에 시작된다는 것을 시사한다. 따라서 핵이식수정란의 융합과 발달율을 상승시키기 위해서 탈핵 4 시간 후에 전기자극으로 활성화자극을 가하고 활성화자극 4시간 후에 핵이식과 전기융합을 실시하는 것이 효과적일 것으로 사료된다.

따라서 핵이식수정란의 발달율을 향상시키기 위한 향후의 대책은 핵이식시 공핵할구의 세포주기동기화가 요구되며, 배양체계의 개선도 향후의 문제점으로 제시된다.

Prather 등(1987)는 공핵수정란을 2~8세포기, 9~16세포기, 17~32세포기를 이용하여 융합율이 2-8세포기의 수정란을 공핵체로 사용했을 때 융합율이 가장 높게 나타났으며, 9~16 세포기와 17~32세포기를 사용했을때는 융합율에 유의적 차이를 나타내지 않았다. 본실험에서 사용된 공핵수정란의 할구의 개수도 11.1~17.6개의 수정란을 사용하여 유의적인 차이를 나타내지 않았다. Steven (1993)도 4일째와 5일째의 수정란을 핵이식에 공핵체로 사용하여 61%와 63%의 융합율을 얻었으며, 핵이식 수정란의 발달율에서도 상실배로의 발달율이 20%와 16%로 유의적인 차이를 나타내지 않아, 본실험과 같은 경향을 나타내었다.

그리고 우량형질의 한우에서 초음파유도로 난소에서 지속적으로 난자를 채취하여 공핵란으로 사용하기 위해서는 채취된 난자의 수가 적거나, 체외 배양에서도 체외성숙, 체외 수정, 체외 배양의 과정을 거치면서 발달한 수정란의 수가 적을 겨우에도 개체배양이 필요하다. 본실험에서 체외배양시 개체배양된 수정란도 그룹배양된 수정란을 공핵체로 사용하였을때와 유의적 차이를 보이지 않아 핵이식에 개체배양된 수정란을 핵의 공급원으로 사

용이 유용하다고 사료된다.

제5절. 연구결과의 결론

1. 미세조작한 난자를 Ionomycin과 6-DMAP로 활성화 처리시 탈핵되지 않은 난자중 98.87%가 돌기모양의 제 2극체를 돌출하는 것을 확인하였다.
2. 토끼 난자의 배란후 경과시간에 의한 미세조작에 의한 탈핵 여부를 조사한 결과 hCG 주사후 15-16 시간에 73.4%의 탈핵률을 보였고, 16-17시간에는 75.8%, 19-20 시간에는 58.5%의 탈핵률을 보여 탈핵은 hCG 주사후 17시간 이내에 실시함이 효과적임을 알 수 있었다.
3. 제 1극체와 극체주위 염색질을 제거하므로써 핵을 제거하는 기존방법에서는 70.4%의 탈핵률을 보였지만 새방법(new method)을 사용할 때 96.8%의 탈핵률 보여 탈핵효율이 향상되었다.
4. 기존탈핵법과 새로운 탈핵법을 사용하여 핵이식시 핵이식 수정란에서 각각 80.4, 39.3% 및 88.2, 33.3%의 핵융합률과 배반포까지의 발달률을 보여 유의적 차이를 나타내지 않았다.
5. 한우에서 핵이식후 수정란의 핵융합율은 preactivation(85.8%)이 non-preactivation(71.7%) 보다 좋은 성적을 나타내었고, 상실배기 및 배반포기로의 발달율에서도 역시 preactivation(24.2%) 처리구에서 non-preactivation (12.8%) 처리구에 비하여 유의적 ($P<0.05$)으로 높았다. 따라서 핵이식수정란의 융합율과 발달율을 상승시키기 위해서 탈핵후 활성화자극을 가하고 핵이식과 전기융합을 실시하는 것이 효과적이라고 사려된다.

제6절. 참고문헌

- Adenot PG, Szollosi MS, Chesne P, Chastant S and Renard JP. 1997. In vivo aging of oocytes influences the behavior of nuclear transferred to enucleated rabbit oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 46: 325-336.
- Ayogi Y, Konishi M, Wada T and Takedomi T. 1994. Unaged bovine oocytes successfully develop to blastocysts after parthenogenetic activation of nuclear transfer. *Theriogenology*. 41: 157(abstract).
- Barnes FL, Collase P, Powell R, King WA, Westthusin M, Shepherd D. 1993. Influence of recipient oocyte cell cycle stage on DNA synthesis, nuclear envelope break down, chromosome constitution, and development in nuclear transplant bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 36:33-41.
- Bordignon V and Smith LC. 1998. Telophase enucleation: An improved method to prepare recipient cytoplasts for use in bovine nuclear transfer. *Molecular Reproduction and Development* 49:29-36.
- Briggs R and King TJ. 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 38:455-463.
- Campbell KHS, Loi P, Otaegui PJ and Wilmut I. 1993. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Biol Reprod* 49:40-46.
- Campbell KHS, Mcwhir J, Ritchie WA and Wilmut I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380:64~66.
- Choe SY, Park HS, Lee HJ and Park CS. 1992. Production of cloned mice by transplantation of nucleus from eight-cell embryos. *Korean J, Anim. Science*. 34(2):89-96.
- Collas P and Robl JM. 1990. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. *Biol. Reprod.* 43:877~884.
- Fulka, Jr.J and Moor RM. 1993. Noninvasive chemical enucleation of mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 34: 427-430.
- Heyman Y, Chesne P and Penard JP. 1990. Full-term reprogramming of frozen embryonic nuclei after nuclear transfer in the rabbit species. 1990. *C.R.Acad.Sci.Paris.t.311, Serie III*, p.321-326.
- Kono T, Sotomaru Y, Apno F, Takahash T, Ogiwara I, Sekizawa F, Arai T and Nakahara T. 1994. Effect of ooplast activation on the development of oocytes following nucleus transfer in cattle. *Theriogenology* 41: 1463-1471.
- Kruip TAM, den Dass JHG. 1997. In vitro produce and cloned embryos. Effect on the pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology* 47:43-52.
- Lavoir MC, Rumph ND, Fuente R, Barnes F, King WA and Betteridge KJ. 1997. The influence of cytoplasmic age on the development of embryos made by nuclear transfer. *Theriogenology* 47:286(Abstract).
- Lavoir MC, Rumph ND, Moens A, King WA, Plante Y, Johnson WH, Ding J and Betteridge KJ. 1997. Development of bovine nuclear transfer embryos made with oogonia. *Theriogenology* 56:194~199.
- Lewis IM, Peura TT and Trounson AO. 1997. Post-transfer viability of bovine nuclear

transfer embryos cultured as aggregates or as individual clones. *Theriogenology* 47:231(Abstract).

Liu L, Dai YF and Moor RM. 1997. Nuclear transfer in sheep embryos : The effect of cell- cycle coordination between nucleus and cytoplasm and the use of in vitro matured oocytes. *Mol Reprod Dev* 47: 255-264.

Loi P, Ledda S and Cappai P. 1997. Nuclear dynamics and developmental potential of sheep nuclear transfer embryos treated with protein kinase inhibitor 6-dimethylaminopurine. *Theriogenology* 47: 232(Abstract).

Nurse P. 1990. Universal control mechanism regulatin onset of M-phase. *Nature* 344:503-508.

Peura TT, Wild SP and Trounson AO. 1997. The effect of cytoplasmic volume on development of bovine nuclear transfer embryos derived from in vivo donor embryos. *Theriogenology* 47:235(Abstract).

Powell, B. C., Walker, S. K., Bawden, C. S., Sivaprasad, A. V. and Rogers, G. E. 1994. Transgenic sheep and wool growth : possibilities and current status. *Reprod. Fert. Dev.* 6:615-623.

Prather RS, Barnes FL, Sims MM, Robl JM, Eyestone WH, First NL. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryo: Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol Reprod* 37:859-966.

Prather RS, Sims MM and First NL. 1989. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol. Reprod.* 41: 414-418.

Robl JM, Prather R, Barnes FL, Eyestone W, Northey D, Gilligan B and First NL. 1987. Nuclear transplantation in bovin embryos. *J. Anim. Sci.* 64: 642-647.

Smith LC and Wilmut I. 1998. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vivo of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol. Reprod.* 40: 1027-1035.

Stice SL, Keefer CL and Matthews L. 1994. Bovine nuclear transfer embryos: oocyte activation prior to blastomere fusion. *Mol. Reprod. Dev.* 38: 61-68.

Stice SL, Strelchenko NS, Keefer CL and Matthews L. 1996. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic following nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 54: 100-110.

Stice, S. L. and Robl, J. M. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod.* 39:657-664.

Stice, S. L., Keefer, C. L., Maki-Laurila, M. and Phillips, P. E. 1991. Producing multiple generations of bovine nuclear transplant embryos. *Theriogenology.* 35:273.

Tatham BG, Dowsing AT, Trouson AO. 1995. Enucleation by centrifugation of in vitro matured bovine oocytes for in nuclear transfer. *Biol Reprod* 53(5) 1088-1094.

Willadsen SM. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 320:63-65.

Wilmut I, Mcwhir J, Ritchie WA and Campbell KHS. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813.

Yin XJ, Cho CY, Kong IK, Cho SY, Park CS and Lee HJ. 1998. Production of second generation rabbit embryos by nuclear transfer. *Theriogenology* 49(1): 331(Abstract).

이효중, 전병균, 윤희준, 이경미, 송상현, 공일근, 노규진, 최민철, 최상용, 박충생. 1994.

핵이식에 의한 복제토끼 생산. 한국수정란이식학회지 9(2):161-165.

하란조, 강다원, 최창용, 윤회준, 강태영, 최상용, 이효중, 박충생. 1998. Ionomycin과 6-dimethylaminopurine이 토끼의 난자활성화와 핵이식배 생산효율에 미치는 효과. 한국수정란이식학회 13: 11-19.

제5장. 유전자전환 수정란의 핵이식에 의한 복제

제1절. 서론

유전적으로 동일한 복제동물을 대량 생산하기 위한 핵이식기술(Nuclear transplantation technique)의 개발은 경제적으로 유익한 가축을 위시한 각종 동물에서 수정란에 주입된 외래유전자나 우수한 유전자를 복제하고 선발하는데 매우 유리하게 활용될 수 있다. 핵이식 기술에 의한 수정란의 cloning의 가능성은 Gurdon(1964)에 의하여 양서류에서 처음으로 시사된 이후 여러 동물에서 신생자를 생산하는데 성공하였다. 최근 영국 Roslin 연구소의 Wimut 박사가 생식세포가 아닌 면양의 유선세포로부터 복제양 "Dolly"를 생산하였다는 보고가 알려지자 세인의 관심사가 되었으며, 이는 기존의 생명 복제에 관한 개념을 뛰어 넘는 커다란 변혁이었다. 또한 최근 Scnieke 등(1997)은 면양에서 태아의 fibroblast에 사람의 혈액응고인자 유전자를 transfection 시킨 다음 이를 핵이식으로 복제하여 형질전환 면양을 생산한 바 있다. 그러나 이들은 수정란에서 이식전에 유전자 발현을 조기에 확인하지는 못 하였다.

유전자가 주입된 수정란을 체외에서 발달시킨 다음 이들로부터 할구를 분리하여 핵이식을 실시한 연구보고는 흔하지 않으며 이에 관한 연구는 유전자전환 수정란을 조기 선발하고 다수 복제하는데 매우 유익하므로 필요하다고 본다.

최근 GFP 유전자를 reporter gene으로 활용하는 연구가 진행되고 있다. 이 유전자는 수정란에 주입된 다음 발현이 되어야만 형광을 발하므로 수정란을 염색하거나 biopsy하지 않고 형광현미경으로 간편하게 그리고 조기에 확인이 가능한 장점이 있다. 그러나 아직까지는 GFP 유전자가 주입된 수정란을 핵이식으로 복제한 연구는 보고된 바가 없으므로 앞으로 GFP 유전자를 reporter gene으로 활용하면 형질전환 수정란의 복제효율이 높아질 것으로 보며, 나아가 이들을 이식전에 용이하게 선발할 수 있으므로써 형질전환 동물의 복제생산에도 유익하게 활용될 수 있을 것으로 본다.

본 연구에서는 예비실험으로 토끼를 사용하여 유전자전환 수정란의 체외생산과 핵이식기법을 사용하여 이를 복제하는 기술을 익힌 다음 한우를 대상으로 본실험을 수행하였다. 토끼와 소에서 GFP유전자를 이용하여 형질전환 수정란을 생산한 보고와 이 유전자를 이용하여 핵이식으로 복제한 예가 보고된 문헌을 접하지 못하여 토끼를 모델동물로 사용하여 MT-hGH 또는 GFP gene을 외래유전자로 사용하여 음성전핵 내에 미세주

입하고, 이들 수정란의 체외배양체계를 구축하고자 하였으며, 유전자가 주입된 수정란을 이용하여 복제수정란의 생산효율과 이들에서의 gene integration 을 PCR 분석 및 GFP의 형광현미경검정으로 확인하였다. 나아가서 이를 토대로 하여 한우에서 유전자전환 수정란의 생산과 복제에 관한 일련의 실험을 수행하였다.

제2절. 재료 및 방법

가. 유전자전환 토끼 및 한우 수정란의 생산

1) 실험동물(토끼 및 한우)

본 실험의 예비실험에 사용한 토끼는 연암축산전문대학으로부터 공급받은 New Zealand White 종으로 생후 3 ~ 5 개월령의 암컷으로 체중은 3 ~ 3.5 kg인 것을 사용하였고, 수컷토끼는 생후 10 개월 이상된 것으로 체중은 4 kg 이상인 것을 공시하였다. 이들의 사료급여와 물의 공급은 자유로이 급식시켰다.

본 실험에서는 임상적으로 건강하고 번식장애가 없으며 연령 14~22개월령, 체중 350~400 kg의 한우 암소를 사용하였다. 한우를 구입하여 경상남도 산청군 신안면 하정리 샛별목장에서 사양표준에 준하여 위탁사양관리하면서 채란 실험을 실시하였다.

2) 과배란유기와 수정란의 채란

한우에서는 초음파 또는 도축한우의 난소로부터 채란된 난포란을 체외성숙, 체외수정 및 체외배양시켜 실험에 공시하였다.(앞의 1-가-1), -2), 및 -3에서 기술함) 토끼에서 과배란의 유기와 수정란의 채란은 앞의 3-가-2)항에 기술된 바와 같이 실시하였다. 채란된 수정란은 실체현미경상에서 검경하여 세포질이 정상인 것과 전핵형성이 뚜렷하게 잘 보이는 것을 선택하여 실험에 공시하였다.

3) 수정란의 체외배양

수정란의 체외배양은 10% FCS를 첨가한 TCM-199 배양액과 D-MEM(GibcoBRL, USA)와 RPMI 1640(GibcoBRL, USA)을 1 : 1 로 희석하여 만든 RD 배양액을 한우 또는 토끼의 난관 상피세포와 같이 39℃의 5% CO₂ 배양기내에서 공배양

하였다. 그리고 배양액은 48시간마다 신선한 배양액으로 교환하였으며, RD 배양액은 48시간 배양 후 TCM-199 배양액으로 교환하였다.

4) 유전자의 준비

본 실험에 사용한 유전자는 mouse metallothionein promoter-human growth hormone fusion gene(MT-hGH, Fig. 5 A)과 green fluorescent protein gene(GFP, Fig. 5 B)를 사용하였다.

5) 외래유전자의 수정란내 미세주입

외래유전자의 미세주입은 미세조작기가 장착된 DIC(Differential Interference Contrast) 도립현미경하에서 실시하였다. 수정란의 응성전핵에 준비된 2.6 kb 의 MT-hGH 와 2.7 kb 의 GFP 유전자를 약 2-3 pl 정도 조심스럽게 주입하여 핵막이 약간 부풀어 오를 정도에서 미세피펫을 후진하였다. 수정란의 체외배양은 미세주입이 끝난 후 세포질이 파괴되지 않은 것만 골라 TCM-199 또는 RD 배양으로 옮겨 난관상피세포와 같이 5% CO₂ 배양기내에서 공배양하였다.

나. 토끼 및 한우 수정란에서 외래유전자의 검색

1) 할구분리 및 세포 lysate 준비

Gene injection 후 8-cell 혹은 16-cell stage로 자란 embryo를 pronase 처리로 투명대를 제거하고 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺-free D-PBS에서 할구를 분리하였다(이 등, 1994). 분석될 세포는 D-PBS로 여러번 세척 후 200µg/ml의 proteinase K가 들어있는 1x PCR buffer 1µl에 옮겨서 58℃에서 1시간 배양한 후 94℃에서 10분간 가열하여 효소의 활성을 없앴다(Dziadek과 Bakker, 1993).

3) MT-hGH gene의 PCR

Nested PCR 반응은 Dziadek과 Bakker(1993)의 방법에 따라 실시하였다. 1x PCR buffer, 1.2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.4 µM primer, 0.5 U Dynazyme(Finnzymes) 으로 구성된 PCR reaction stock solution을 만들어 분주하여 -20 ℃에 보관하였다가 PCR 분석 직전에 녹여 cell lysate이 들어있는 각 tube에 18 µl씩 mineral oil 층을 통하여 더한

후 PCR cycle을 시작하였다. 첫 primer 쌍(P1-P2)을 사용하여 35 cycle의 PCR 반응을 실시하였다. PCR machine은 Robocycler Gradient 40[®](STRATAGENE Co., USA).을 사용하였다. PCR의 primer는 P1과 P2쌍으로 첫 cycle은 94°C에서 180초, 60°C에서 40초, 72°C에서 35초로 하고 그 다음 cycle에서 35 cycle까지는 94°C에서 35초, 60°C에서 40초, 72°C에서 40초로 하고 마지막 72°C에서는 300초로하여 실시하였다. 이렇게하여 생성된 산물을 2 µl를 취하여 primer P3과 P4쌍으로 다시 같은 cycle로 증폭시켰다.

4) GFP gene의 PCR

GFP gene의 PCR 조건은 다음과 같이 실시하였다. PCR reaction components의 구성은 1 X PCR buffer, 1.2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.4 uM primer, 0.5 U *Taq* pol로 하였다.

GFP gene의 PCR 증폭을 위하여 한국생공으로부터 주문제작된 primer를 사용하였고 그의 염기배열은 다음과 같다.

P1 (forward), 22-mer,

5' -TTGCACTACTGGAAACTACCT- 3'

P2 (reverse), 21-mer,

5' -TTTTGTTGATAATGGTCTGCTA-3'

PCR의 primer는 P1과 P2쌍으로 첫 cycle은 96°C에서 300초, 61°C에서 35초, 72°C에서 32초로 하고 그 다음 cycle에서 45cycle까지는 96°C에서 35초, 60°C에서 35초, 72°C에서 32초로 하고 마지막 72°C에서는 300초로하여 실시하였다.

5) PCR 생성물 분석

2차 PCR 반응 생성물 중 약 15 µl를 LE(FMC) agarose gel에서 전기영동하여 ethidium bromide stain 후 UV transilluminator로 증폭된 DNA를 확인하였다.

6) 형광현미경에 의한 GFP gene의 검색

토끼 및 한우 수정란에 GFP 유전자를 주입하고 배반포기까지 자라는 동안 이들에서 유전자발현을 excitation : 488 nm, emission: 500 nm의 GFP filter(Chroma Tech

Corp., USA)가 장치된 형광현미경(Diaphot 300[®], Nikon Co., Japan)으로 관찰 조사하였다.

다. 유전자전환 수정란의 핵이식

1) 수핵난자(nuclear recipient oocytes)의 준비

한우에서는 도축한우의 난소로부터 채란된 난포란을 체외성숙시켜 실험에 공시하였다.(앞의 1-가-2에서 기술함) 토끼에서 과배란의 유기와 난자의 채란은 앞의 3-가-2)항에 기술된 바와 같이 실시하였다. 채란된 난자는 실체현미경상에서 검경하여 세포질이 정상인 것과 제1극체가 뚜렷하게 잘 보이는 것을 선택하여 실험에 공시하였다.

2) 공핵수정란(nuclear donor embryos)의 준비

핵을 공급할 수정란은 전핵기에 외래유전자를 미세주입한 후 체외에서 8 ~ 16 세포기로 자라는 것을 회수하여 사용하였다. 이 회수된 수정란은 pronase로 투명대를 연화시켜 제거하고, Ca⁺⁺과 Mg⁺⁺이 첨가하지 않은 D-PBS에서 할구세포를 분리하였다. 할구 1개를 PCR로 gene의 integration을 확인하여 확인된 나머지 할구를 핵이식시 공핵란으로 사용하였다. GFP gene이 주입된 수정란은 형광현미경으로 green 색상을 나타내는 것만을 가려서 그의 할구를 분리하여 공핵란으로 사용하였다.

3) PCR 및 GFP screening 된 할구의 분리

핵을 공급할 수정란은 외래유전자를 미세주입한 transgenic embryos 를 8- 16세포기에 있는 수정란을 회수한다. 이 회수된 수정란은 pronase 로 투명대를 연화시켜 제거하고, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ free D-PBS 에서 할구세포를 분리한다. 한 개의 할구를 PCR 및 GFP로 gene의 integration 을 확인하여 확인된 나머지 할구를 핵이식시 공핵란으로 사용하였다.

4) 미세조작에 의한 핵이식

탈핵된 수핵난자와 분리된 공핵할구를 cytochalasin B(Sigma Chem., Co., U.S.A.) 가 7.5 μ g/ml 함유된 D-PBS에 10 분 전에 처리한 다음, 공핵할구 하나를 주입용 pipette에 흡입하고, 수핵난자를 보정용 pipette 으로 탈핵시 탈핵 pipette 으로 인해 생긴 투명대의 작은 흔적

이 있는 곳을 주입용 pipette 쪽으로 향하게 고정하여 투명대의 작은 흔적으로 주입용 pipette 을 넣어 위관막강에 할구를 주입하였다.

5) 핵-세포질 융합

핵이 주입된 난자는 Robl 등(1987)의 방법에 따라 핵융합을 실시한다. 전기자극은 이 등(1994)의 융합조건에 따라 전압, 통전시간 및 통전횟수를 정하였다. 즉, 이들 난자를 100 μ M CaCl₂ 및 MgCl₂가 함유된 0.28 M mannitol 용액으로 세척한 다음 paraffin oil이 덮여 있는 소적에 옮기고 electro cell manipulator(Eyela Co., Japan)에 장치되어 있는 두 전극 사이에서 hCG 투여 후 20시간째에 핵의 융합과 난자의 활성화를 유도하였다. 융합조건은 직류전류로서 전압을 1.5 kV/cm, 통전시간은 60 μ sec로 1회 통전하였다.

6) 핵이식된 수정란의 체외배양

융합이 확인된 수정란은 노 등(1994)의 기술에 따라 10% FCS가 포함된 M-199 배양액에 옮겨 monolayer가 형성된 소 난관상피세포와 같이 39°C의 5% CO₂ 배양기내에서 공배양하였다.

라. 복제 토끼 및 한우 수정란에서 외래유전자의 검색

1) MT-hGH gene와 GFP gene의 PCR 검색

핵이식으로 복제된 수정란을 체외배양하여 배반포로 자란 것에서 전술한 바와 같이 PCR 검색을 실시하여 유전자존재 여부 및 발현을 확인하였다.

2) 형광현미경에 의한 GFP gene의 검색

핵이식후 상실배 또는 배반포로 자란 토끼 및 한우 수정란에서 GFP 유전자발현 확인은 excitation : 488 nm, emission: 500 nm의 GFP filter(Chroma Tech, Corp., USA)가 장치된 형광현미경(Diaphot 300[®], Nikon Co., Japan)으로 관찰 조사하였다.

제3절. 연구의 결과

1) 핵이식에 의한 유전자전환 토끼 수정란의 복제생산과 유전자 확인

(1) 유전자주입 토끼 수정란의 핵이식에 의한 복제효율

유전자가 주입된 수정란을 8- 및 16- 세포기로 발달시킨 다음 이들로부터 할구를 분리하여 핵이식을 실시하였던 바, 핵융합률과 체외배발달률의 결과는 Table 25 및 Table 26과 같다.. 유전자가 주입된 할구를 핵이식한 결과 세포기간에 따른 핵융합률은 8-세포기에서는 69%, 16-세포기에서는 62.8%로 유의적인 차이를 나타내지 않았지만, 유전자를 주입하지 않은 대조군은 80.4%로 유전자를 주입한 할구를 이용한 것 보다 유의적($P<0.05$)으로 높게 나타났다.

Table 25. Effect of cell stage of nuclear donor blastomeres and gene injection on electrofusion in rabbit embryos reconstituted by nuclear transplantation

Gene injection	Cell stages of donor nuclei	No. of oocytes used	No. of oocytes fused	Fusion rate(%) ^a
-	16-cell	102	82	80.4 ^a
+	8-cell	142	98	69.0 ^b
+	16-cell	191	120	62.8 ^b

* The values with different superscripts within column were significantly different($P<0.05$).

또한 이들중 정상적으로 융합이 일어난 수정란을 TCM-199 배양액으로 옮겨 체외배양시켜 배반포기까지 발달률을 조사한 결과, 유전자가 주입된 8-, 16-세포기 할구를 이용한 것은 각각 34.6%, 28.1%의 발달률을 보여 세포기간에 따른 유의적인 차이를 보이지 않았고, 대조군의 39.3%에 비하여 낮은 발달률을 보였으나, 역시 유의적 차이를 나타내지 않았다(Table 26).

Table 26. Effect of cell stage of nuclear donor blastomeres and gene injection on *in vitro* development of rabbit embryos reconstituted by nuclear transplantation

Gene injection	Cell stage of donor nuclei	No. of NT zygotes used	Developed to(%)	
			Morula	Blastocyst*
-	16-cell	28	27	11(39.3) ^a
+	8-cell	81	38	28(34.6) ^a
+	16-cell	96	43	27(28.1) ^a

* There was no significant difference between the cell stage of donor nuclei.

(2) 유전자 주입 복제 토끼 수정란에서의 MT-hGH gene의 PCR 검색 결과

유전자 주입후 8- 및 16-세포기로 자란 수정란의 할구세포를 핵공급원으로 사용하여 핵이식으로 복제하고 이들을 체외에서 배반포기까지 자란 것을 PCR 검색으로 유전자를 검출하였던 바, 8-세포기의 할구를 이용한 것은 23%의 양성률을 보였고, 16-세포기의 할구를 이용한 것은 33%의 양성률을 보여 세포기간에 따른 배반포기에서의 양성률은 유의적인 차이를 보이지 않았다.

Table 27. PCR-screening of blastocysts cloned with MT-hGH gene injected blastomeres at 8- and 16-cell stages

Cell stages of donor nuclei	No. of NT blastocysts analyzed	PCR-screening of MT-hGH gene		
		No. of positive	No. of negative	Percent positive*
8-cell	22	5	17	23 ^a
16-cell	21	7	14	33 ^a
Total	43	12	31	28

* There was no significant difference between the two cell stages of donor nuclei.

(3) GFP 유전자주입 토끼 수정란의 체외발달률과 유전자 발현율

GFP 유전자가 주입된 토끼 수정란의 체외배발달능력과 형광현미경으로 GFP 유전자의 발현여부를 조사한 결과는 Table 28과 Table 29에 나타난 바와 같다. 토끼 수정란에 GFP 유전자를 주입하고 체외에서 배양하였던 바, 배반포로의 발달률은 67.6%이었으며, 이들의 GFP 유전자의 발현 여부를 형광현미경으로 관찰하였던 바, 45.2%가 양성을 보였다.

Table 28. Effect of GFP gene injection on *in vitro* development in rabbit embryos

No. of zygotes injected	No. of zygotes developed to(%)	
	Morula	Blastocyst
108	94	73(67.6)

Table 29. GFP expression in rabbit blastocysts following injection of GFP gene and *in vitro* culture

No. of blastocyst observed	GFP expression		
	No. of positive	No. of negative	Percent positive
73	33	40	45.2

또한 형광현미경상에서 GFP 양성을 보인 11개의 수정란을 PCR 검색하였던 바, 5개 (45.5%)는 역시 PCR 검색에서도 양성을 보였고, 6개(54.5%)는 음성을 보였다. 형광현미경상에서 GFP 음성인 수정란은 PCR 검색에서도 모두 음성을 보였다(Table 30).

Table 30. PCR-screening of rabbit blastocysts injected with GFP gene at pronuclear stage

GFP expression	No. of gene injected blastocysts	PCR-screening of GFP gene		
		No. of positive	No. of negative	Percent positive
+	11	5	6	45.5
-	8	0	8	0

(4) 핵이식에 의한 GFP 유전자전환 토끼 수정란의 복제효율

GFP 유전자를 미세주입하고 상실배까지 체외배양 후 형광현미경으로 GFP 유전자가 발현된 양성인 상실배기 수정란의 할구를 분리하여 핵이식을 실시하였던 바, 융합률과 체외배발달률은 Table 31에 나타난 바와 같다. GFP 양성인 상실배의 할구로 핵이식한 결과 이들의 핵융합률은 78.2% 였고, 핵융합이 일어난 61개의 수정란 중 13개(23%)가 체외에서 배반포기까지 발달하였다.

또한 이들 복제수정란을 형광현미경으로 GFP 유전자 발현을 여부를 조사하였더니 13개 모두(100%) 양성으로 나타났다(Table 32 , Fig 12).

Table 31. Efficiency of cloning of GFP transgenic embryos by nuclear transplantation

Nuclear donor embryos	No. of oocytes used	No. of oocytes fused (%)	No. of blastocysts(%)
GFP-positive morula	78	61(78.2)	13(21.3)

Table 32. GFP expression of rabbit blastocysts cloned with blastomeres from transgenic embryos by nuclear transplantation

No. of NT blastocyst observed	GFP expression		
	No. of positive	No. of negative	Percent positive
13	13	0	100

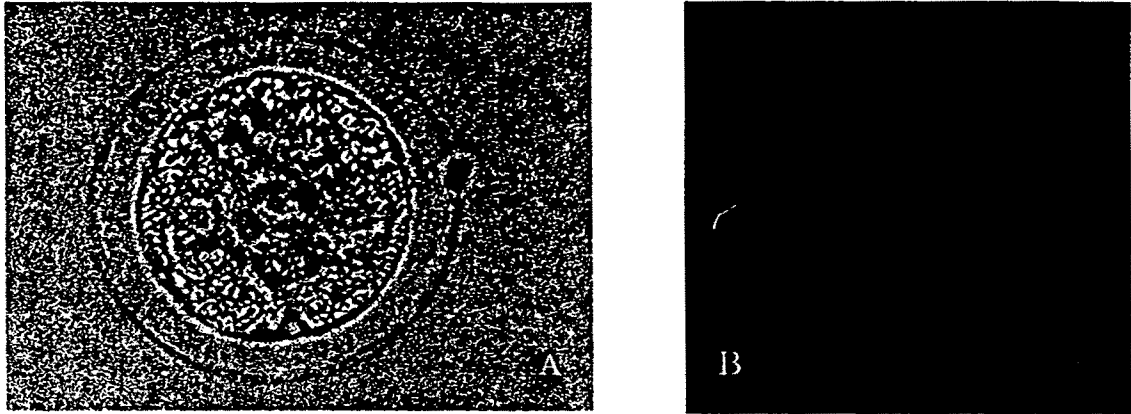


Fig. 12. GFP gene expression in a cloned transgenic rabbit blastocyst produced by nuclear transplantation and *in vitro* culture under a phase contrast microscope (A) and under a fluorescence microscope (B).

제4절. 연구결과의 고찰

1) MT-hGH 유전자주입 복제 수정란의 생산효율 및 유전자 확인

유전자가 주입된 수정란을 체외에서 발달시킨 다음 이들로부터 할구를 분리하여 핵이식을 실시한 연구보고는 흔하지 않다. Krisher 등(1995)은 WAP-hPC 유전자를 소 수정란에 주입하고 이들을 체외배양한 다음 이들로부터 할구세포를 분리하여 핵이식을 실시한 후 이들의 발달능력을 조사하여 본 바, 13.1%가 상실배기 또는 배반포기로 발달하였다고 한다. 본 실험에서는 토끼에서 MT-hGH 유전자가 주입된 수정란을 8- 및 16-세포기로 발달시킨 다음 이들로부터 할구를 분리하여 핵이식을 실시하였던 바, 핵융합률은 대조군에 비하여 유의성 있게 낮았으나 이들의 체외배양에서 배반포기까지 발달률에는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 유전자를 주입한 수정란의 할구는 세포융합시 정상 수정란의 할구보다 탄력성이 적어 전기자극에 의해 할구자체가 와해되는 것이 많았다. 이는 전핵에 유전자미세주입시 핵막과 세포질의 손상으로 인한 것으로 생각된다.

또한 Krisher 등(1995)은 WAP-hPC 유전자가 주입된 소 수정란으로부터 할구세포를 분리하여 핵이식을 실시한 후 이들의 발달단계별로 PCR 검색을 하여본 바, 상실배기 또

는 배반포기 수정란에서는 90% 이상 양성으로 나타났으나 이들을 핵이식한 후 복제된 상 실배기 또는 배반포기 수정란에서는 32.4% 만이 양성으로 나타났다고 한다. 본 실험에서 는 유전자 주입 후 8-, 16-세포기로 자란 토끼 수정란을 핵이식으로 복제하고 이들을 체 외에서 배반포기까지 자란 것을 PCR 검색으로 유전자를 검출하였던 바, 각각 23 및 33% 의 양성률을 보였다. 유전자가 주입된 수정란은 핵이식 후 발달하면서 대다수(70-80%)가 유전자를 소실하는 것으로 보인다. 그러므로 핵이식으로 복제된 수정란을 체외에서 배반 포기까지 발달시킨 다음 주입된 유전자의 유무를 PCR 검색을 통하여 확인하고 이식하여 산자를 생산한다면 형질전환동물의 생산효율이 높아질 것으로 보이므로 이에 관한 연구는 앞으로 더 수행되어야 할 것으로 생각된다.

2) GFP 유전자주입 복제 수정란의 생산효율 및 유전자 확인

형질전환 유전자의 검색방법은 주로 3-4 주된 산자의 꼬리 또는 조직으로부터 DNA 를 추출한 후 PCR이나 Southern blotting을 통하여 검색하였다(Gendron과 Gridley, 1993; Hogan 등, 1994). 그러나 이러한 검출방법들을 모든 산자에 적용하자면 많은 경비와 시간 이 소모된다. 산자로부터 형질전환 생쥐의 빠른 분리는 marker transgene과 co-injection 함으로써 가능하다고 한다(Overbeek 등, 1991; Bonnerot와 Nicolas, 1993). Ikawa 등(1995) 은 GFP가 발현되는 형질전환 산자를 분만 1일에 390 nm의 excitation light로 녹색의 발 광색을 비침습적인 방법으로 관찰하였다. 형질전환산자를 간단하게 검색하는 방법은 형질 전환생쥐의 계통을 설립하는데 유용할 것이다. 더군다나 소와 돼지와 같은 대동물의 형질 전환동물생산을 위해서도 초기 수정란단계에서 유전자를 검색하는 것이 긴 임신기간과 한정된 산자수를 고려한다면 바람직하다. 배반포의 biopsy와 PCR로 유전자는 물론 X-, Y- 염색체를 확인할 수 있으므로 수정란의 유전자를 효과적으로 검색할 수가 있다(Cui 등, 1993; Kirkpatrick과 Monson, 1993). 그러나 비침습적 검색법은 바람직하고 앞으로 더욱 발전하려면 더욱 많은 연구가 수행되어야 할 것이다. 이런 목적을 위하여 예전부터 reporter gene을 사용하여 왔는데 이는 수정란에 헤로운 효과가 있었다. 최근 luciferase로 비침습적인 방법으로 형질전환 수정란을 분리하였다는 연구결과를 보고한 적이 있다. 그러나 이 방법으로 분리된 수정란으로 산자를 생산하는데에는 성공하지 못하고 있다 (Thompson 등, 1995).

해파리의 일종인 *Aequorea victoria*에서 분리된 green fluorescent protein(GFP)은 푸른 빛을 흡수하여 유기기질이나 cofactor의 도움없이 초록형광을 방출한다. 그러므로

GFP의 검색은 luciferase, β -galactosides나 CAT와 같이 추출이나 기질을 필요로 하지 않을 뿐만아니라 살아있는 수정란에서 쉽고 빠르게 유전자의 발현 여부를 알 수 있다. GFP 유전자를 이용하여 수정란에 주입하고 체외발달시켜 형광현미경으로 관찰하여 초록색 빛을 발산하는 수정란을 선택하여 이식함으로써 형질전환동물을 생산하는데 획기적인 계기가 되었다. Ikawa 등(1995)은 GFP 유전자를 유전자전환 동물의 marker로서 유익하다고 주장한 바 있다. 그들은 생쥐를 대상으로 GFP 유전자를 166개의 수정란 전핵 내에 주입하고 이를 이식하여 16(9.6%) 마리의 산자를 생산하였는데, 그 중 3마리(1.8%)의 조직에서 GFP 유전자의 발현이 확인되었다고 한다. 본 실험에서는 토끼 및 한우 수정란에 GFP 유전자를 주입하고 체외에서 배양하였던 바, 배반포로의 발달률은 67.6% 및 17.0%이었으며, 이들을 형광현미경으로 유전자 발현을 검사하였더니 토끼에서는 30.6%가 그리고 한우에서는 11.8%가 양성을 보였다. Takada 등(1997)은 생쥐 및 소 수정란에 GFP 유전자를 주입하고 체외에서 배양하였던 바, 배반포로의 발달률은 46.9% 및 11%이었으며, 이들을 형광현미경으로 유전자 발현을 검사하였더니 각각 39.9%, 9.3%가 양성을 보였다고 한다. 토끼에 관한 다른 연구 보고가 없으므로 정확한 비교가 어려우나 동물 품종간에 유전자 발현율에 차이가 있는 것으로 본다. 또한 이들 수정란을 PCR 검색하였던 바, GFP 양성을 보인 11개의 수정란에서 5개(45.5%)는 역시 PCR 검색에서도 양성을 보였고, 6개(54.5%)는 음성을 보였다. Takada 등(1997)은 GFP 양성인 생쥐 수정란을 대리모에 이식하여 22%의 산자생산율을 얻었고 이 중 11마리(8%)에서 GFP 유전자의 발현을 확인하였다.

아직까지는 GFP 유전자가 주입된 수정란을 핵이식으로 복제한 연구는 보고된 바가 없으므로 비교검토가 어려우나, 본 실험에서는 GFP 유전자 양성인 상실배기 수정란의 할구를 사용하여 핵이식을 실시하였던 바, 이들 핵융합이 일어난 61개의 수정란 중 13개(23%)가 체외에서 배반포기까지 자랐다. 또한 이들을 형광현미경으로 GFP 유전자 발현을 조사하였더니 13개 모두(100%) 양성을 나타내었다. 앞으로 GFP 유전자를 reporter gene으로 활용하면 형질전환 수정란의 복제효율이 높아질 것으로 보며, 나아가 이들을 이식 전에 용이하게 선별할 수 있으므로써 형질전환 동물의 복제생산에도 유익하게 활용될 수 있을 것으로 사려된다. 그리고 본 실험에서는 GFP 유전자 자체의 발현 여부만을 조사하였지만 앞으로 이 유전자와 유익한 유전자를 융합하여 GFP 유전자의 발현을 확인하고 유익한 유전자와 함께 형질전환된 동물을 생산할 수 있는 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

제5절. 연구의 결론

토끼 및 한우 수정란의 응성진핵 내에 MT-hGH 유전자와 GFP 유전자를 미세주입하여 유전자전환 수정란을 작출하고, PCR-screening 및 GFP-screening으로 주입된 유전자의 존재여부 및 발현을 조기에 확인하여 유전자전환 수정란의 선별기술을 개발함과 아울러 선별된 수정란의 할구를 이용하여 핵이식기법으로 형질전환된 수정란을 다량 복제를 실시함으로써 형질전환동물 생산기술을 향상시키고자 일련의 실험을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) MT-hGH 유전자를 주입하여 8- 및 16-세포기로 자란 수정란을 공핵란으로 사용하여 핵이식을 실시하였던 바, 세포융합률은 각각 60.0%, 62.8%로 비슷하였으나 정상수정란을 공급핵으로 사용한 80.4%보다 유의적으로 낮은 융합률을 보였다. 그러나 이들 복제수정란의 체외발달률은 처리군간에 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

2) 유전자 주입 후 8- 및 16-세포기로 자란 수정란의 할구를 이용하여 핵이식으로 복제하고 체외에서 배반포까지 자란 수정란을 PCR-screening 으로 유전자를 검출한 결과, 각각 23%와 33%의 유전자 양성 수정란을 감별하였다.

3) 토끼수정란에 GFP 유전자를 주입한 후 체외배양한 결과, 배반포기까지의 발달률은 67.6%였다. 이들 배반포중에서 형광현미경으로 확인된 GFP 유전자의 발현율은 30.6%였다. 이들 GFP 양성반응 11개의 배반포를 PCR screening한 결과, 45.5%가 양성으로 검출되었다. 그러나 형광현미경 상에서 음성으로 나타난 8개의 배반포는 PCR screening에서도 모두 음성으로 나타났다.

4) 형광현미경으로 GFP 유전자가 양성으로 판정된 상실배기의 수정란에서 할구를 분리하여 공핵란으로 사용하여 핵이식한 결과, 핵이식란의 세포융합률은 78.2%였고, 배반포기까지의 체외발달률은 21.3%로 나타났다. 그리고 이들 복제된 13개의 배반포를 형광현미경으로 조사하였더니 GFP 유전자의 발현률은 100% 양성을 나타냈다.

제6절. 참고문헌

Bondioli, K. R., Westhusin, M. E. and Looney, C. R. 1990. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenology*. 33(1):165-174.

Bonnerot, C. and Nicolas, J. F. 1993. In : *Methods in Enzymology*(Wassarman, P. M. and Depamphilis. M. L. eds). Vol. 225. pp. 451-469. Academic Press London.

Briggs R. and King T. J. 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 38:455-463.

Cui, K. H., Putland, R. A., Seamark, R. F. and Matthews, C. D. 1993. Precise sex selected births of mice following single cell embryo biopsy and Y-linked testis-specific gene analysis. *Human Reprod.* 8:621-626.

Dziadek, M. and Bakker, M. Genetic analysis of the preimplantation embryos. In *Handbook of In Vitro Fertilization*. CRC Press 1993:151-171.

Gendron, M. M. and Grindley, T. 1993. In : *Methods in Enzymology*(Wassarman. P. M. and DePamphilis. M. L. eds). Vol. 225. pp. 794-799. Academic Press. London.

Gurdon, J. B. 1964. The transplantation of living cell nuclei. *Advances in Morphogenesis*. 4:1-13.

Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F. and Lacy, E. 1994. In : *Manipulating the Mouse Embryo*(Hogan. B., Beddington, R., Costantini, F. and Lacy, E. eds) 2nd end. pp. 291-326. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. NY.

Ikawa, M., Kominami, K., Yoshimura, Y., Tanaka, K., Nishimune, Y. and Okabe, M. 1995. A rapid and non-invasive selection of transgenic embryos before implantation using green fluorescent protein(GFP). *FEBS Letter*. 375:125-128.

Illmensee, K. and Hoppe, P. C. 1981. Nuclear transplantation in *Musculus* :developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell*. 23:9-18.

Kirkpatrick, B. W. and Monson, R. L. 1993. Sensitive sex determination assay applicable to bovine embryos derived from IVM and IVF. *J Rerprod Fertil*. 98:335-340.

Krisher, R. L., Gibbons, J. R. and Gwazdauskas, F. C. 1995. Nuclear transfer in the bovine using microinjected donor embryos: Assessment of development and deoxyribonucleic acid detection frequency. *J. Dairy Sci.* 78:1282-1288

McGrath, J. and Solter, D. 1983. Nuclear transplantation in mouse embryos by microsurgery and cell fusion. *Science.* 220:1300-1302.

Overbeek, P. A., Aguilar-Cordova, E., Hanten, G., Schaffner, D. L., Patel, P., Lebovitz, R. M. and Lieberman, M. W. 1991. Coinjection strategy for visual identification of transgenic mice. *Transgenic Res.* 1(1):31-37.

Prather, R. S. 1989. Nuclear transfer in mammals and amphibians : Nuclear equivalence, species specificity ? In : Schatten H and Schatten G(eds), *The molecular Biology of Fertilization*. San Diego: Academic Press, Inc. 323-340.

Prather, R. S., Barners, F. L., Sims, M. M., Robl, J. M., Eyestone, W. H. and First, N. L. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryo. Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.* 37:859-866.

Rho, G. J., Wu, B., Leibo, S. P. and Betteridge, K. J. 1996. Bovine parthenogenesis following various oocytes activation regimens. *Society for the Study of Reproduction(Abs.)*

Robl, J. M., Prather, R., Barnes, F. L., Eyestone, W. H., Northey, D., Gilligan, B. and First, N. L. 1987. Nuclear transplantation in bovine embryos. *J. Anim. Sci.* 64:642-647.

Schnieke, A. E., Kind, A. J., Ritchie, Q. A., Mycock, K., Scott, A. R., Ritchie, M., Wilmut, I., Colman, A. and Campbell, K. H. S. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science.* 278:2130-2133.

Smith, L. C. and Wilmut, I. 1989. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vivo of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol. Reprod.* 40:1027-1035.

Stice, S. L. and Robl, J. M. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit

embryos. *Biol Reprod.* 39:657-664.

Takada, T., Lida, K., Awaji, T., Itoh, K., Takahashi, R., Shibui, A., Yoshida, K., Sugano, S. and Tsujimoto, G. 1997. Selective production of transgenic mice using green fluorescent protein as a marker. *Nature Biotechnology.* 15:458-461.

Thompson, E. M., Adenot, P., Tsuji, F. I. and Renard, J. P. 1995. Real time imaging of transcriptional activity in live mouse preimplantation embryos using a secreted luciferase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92:1317-1321.

Wilmut, I., McWhir, J., Ritchie, W. A. and Campbell, K. H. S. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature.* 385:810-813.

Zang, S. C. and Masui, Y. 1992. Activation of *Xenopus laevis* eggs in the absence of intracellular Ca activity by the protein phosphorylation inhibitor, 6-dimethylaminopurine(6-DMAP). *J. Exp. Zool.* 262:317-329.

노규진, 이효중, 송상현, 윤희준, 박충생. 1994. 토끼 수정란의 체외발달에 미치는 배양액 및 소와 토끼의 난관상피세포들과 공배양 효과. *한국가축번식학회지.* 18(1) :39-46.

이효중, 전병균, 윤희준, 이경미, 송상현, 공일근, 노규진, 최민철, 최상용, 박충생. 1994. 핵이식에 의한 복제토끼 생산. *한국수정란이식학회지.* 9(2):161-165.

최상용, 박희성, 이효중, 박충생. 1992. 생쥐 8-세포기 수정란의 핵이식에 의한 복제산자의 생산. *한국축산학회지* 34(2):89-96.

제6장 . 연구개발 결과의 활용방안

가) 한우에서 초음파 유도로 난포란을 채란하는 기술을 개발함으로써 고능력 한우로부터 우수한 수정란을 실험실에서 다량 생산이 가능하여 한우의 개량 및 번식에 매우 유익하게 활용할 수 있다.

나) 도축된 한우의 난소로부터 난포란을 채란하여 다량의 수정란을 생산하기 위한 체외조작과 배양체계를 구축함으로써 체외수정란의 다량생산과 적은 비용으로 확보하는데 활용 가능하다. 이는 앞으로 국내 수정란이식을 통한 한우의 번식에 있어서 그 효과가 크다고 사려되며 이의 실용화를 앞당기는데 도움이 될 것이다. 나아가서 핵이식에 의한 유량 한우의 복제생산과 형질전환 한우의 생산에 크게 도움이 된다.

다) 소에서 FSH 처리시의 단일주사법(single-dose technique)을 개발함으로써 수정란이식 및 체외수정란 생산에 있어서 경비 및 노력의 절감 효과를 얻을 수 있다(6회에서 1회로 절감).

라) 한우 수정란에 유용한 유전자를 주입하고 이들을 상실배기 또는 배반포기까지 발달시켜 PCR 또는 GFP 분석을 통하여 유전자전환 수정란의 조기선별 기법을 개발하였다. PCR 분석법으로는 75% 이상 음성인 수정란을 가려낼 수 있으며, 한우 수정란에서 GFP 분석법으로는 88% 이상 음성인 수정란을 선별하였다. 이러한 기법을 이용함으로써 형질전환 동물의 생산에 있어서 수란우의 수를 경감시키고 형질전환 한우 송아지 생산효율을 크게 향상시킬 수 있을 것을 사려된다.

마) 한우 수정란에서 이식전단계에서 PCR 기법으로 성감별하는 기법을 동시에 개발함으로써 수컷과 암컷 중 원하는 성의 송아지 생산이 가능하게 되었다. 이는 농가소득 증대에도 도움이 되지만 우유나 뇨를 통하여 유용물질을 생산하는 유전자전환 젖소 및 한우를 생산하는 데에도 유익한 기술이 된다.

바) 수정란의 할구세포 하나에서도 주입된 유전자의 존재/발현을 확인하는 기술이 개발되었다. 이는 앞으로 유전자전환 수정란의 다량 복제 및 조기감별에 유익한 기술이다.

사) 동물의 핵이식에 있어서 수핵난자의 탈핵방법을 개선함과 아울러 전환성화를 시키는 방법을 개발.활용함으로써 복제수정란 및 복제동물의 작출효과가 향상될 것으로 본다. 핵이식에 의한 복제동물 생산효율 향상은 앞으로 우량 한우의 번식과 개량에 매우 효과적으로 활용될 것으로 기대되며, 수정란 복제기술은 본 연구가 추구하는 형질전환 수정란의 조기 복제 및 산자생산 효율 향상에 매우 유익하게 활용될 것이다.

아) 앞으로 GFP 유전자를 reporter gene으로 활용하면 형질전환 수정란의 복제효율이 높아질 것으로 보며, 나아가 이들을 이식 전에 용이하게 선별할 수 있으므로 형질전환 동물의 복제생산에도 유익하게 활용될 수 있을 것으로 사려된다.

자) 핵이식기술로서 형질전환동물의 번식효율을 향상시킴으로써 하나의 수정란으로 부터 많은 복제된 형질전환 수정란을 작출할 수 있으며 이를 대리모에 이식하여 복제된 많은 수의 형질전환 동물을 생산함으로써 이용 효율을 극대화할 수 있고 나아가서 국내 축산업의 발전에 이바지할 것이다.

제7장. 기대효과

가. 기술적인 측면

1) 국외는 물론 국내에서도 형질전환 동물 생산에 관한 연구가 많이 수행되고 있다. 그러나 현재의 기술 수준으로 소에서 유전전환동물 생산 성공율이 0.7%로서 1% 미만이다. 그러므로 한마리의 유전자전환 소를 생산하기 위하여서는 적어도 100 마리 이상의 대리모가 필요하다. 그러나 PCR분석 및 GFP 검색을 응용하여 이식전의 수정란에서 주입된 유전자의 발현여부를 조기에 가려냄으로써 수란우의 수를 80% 정도 줄일 수 있다.

2) PCR 기법을 사용하여 조기에 주입된 유전자의 통합 및 발현가능성을 확인함으로써 수란축의 소요를 기존의 1/10 이하로 경감시키고 형질전환동물의 생산효율을 향상시킬 수 있다. 또한 PCR기법을 활용하면 50종 이상의 사람과 동물의 유전질환을 조기진단 및 예방할 수 있을 뿐만 아니라 성감별을 조기에 실시하여 동물의 성을 조절하는데 활용할 수 있다.

3) 핵이식기술로서 형질전환동물의 번식효율을 향상시킴으로써 하나의 수정란으로 부터 많은 복제된 형질전환 수정란을 작출할 수 있으며 이를 대리모에 이식하여 복제된 많은 수의 형질전환 동물을 생산함으로써 이용 효율을 극대화할 수 있고 나아가서 국내 축산업의 발전에 이바지할 것이다.

4) 핵이식기술은 전능한(totipotent) 시기에 있는 배의 핵을 다수의 할구세포로부터 얻어서 이를 탈핵된 다른 접합체 또는 초기 배에 이식시킴으로서 하나의 배로부터 20개의 동일한 성과 유전형질을 가진 복제 배를 작출할 수가 있으며, 나아가서 이들 핵이식 배를 체내 또는 체외에서 배양하여 사실배 혹은 포배로 발달시킨 다음 이를 핵의 공급원으로 재이용하는 recycling nuclear transplantation

기법을 응용하면 그 수를 기하급수적으로 증가시킬 수 있다.

5) 포유동물 수정란에서의 유전자 발현 기작의 규명, 발달 단계별 할구세포의 개체 발생능력, 세포의 분화 기전, 핵-세포질의 상호작용 규명 등 축산학 및 발생학 분야에서 많은 정보를 제공받을 것이다.

나. 경제·산업적 측면

1) 한우에서 생산성이 증대되고 육질이 향상되어 수입쇠고기와의 경쟁력이 제고될 것이다. 따라서 한우 쇠고기의 안정적 공급으로 소비자를 보호하고 사육농가의 소득증대에 기여하여 국내 축산업을 보호하는데 기여할 수 있을 것이다.

2) 한우에서 질병에 대한 저항력을 촉진하는 유전자 및 생리활성유도 유전자를 이용하여 형질전환시키면 질병에 대한 저항력이 강한 한우를 생산하게 되어 질병발생율을 떨어뜨리고, 양질의 쇠고기생산 및 성장저해 요인제거 등에 기여할 것이다.

3) 현재의 기술 수준으로 소에서 유전전환동물 생산 성공율이 0.7%로서 1% 미만이다. 그러므로 한마리의 유전자전환 소를 생산하기 위하여서는 적어도 100마리 이상의 대리모가 필요하다. 그러나 PCR분석기법과 GFP 검색기법을 응용하여 이식전의 수정란에서 주입된 유전자의 발현여부를 조기에 가려냄으로써 수란우의 수를 80% 정도 줄일 수 있으므로 (Bowen 등,1993) 그 경제적 시간적 절약은 막대하다. PCR 분석기법으로 조기감별을 실시하면 유전자전환 한우 한마리를 생산하는데 80두의 암소를 절감할 수 있고, 이를 금액으로 환산하면 약 2억원이 절감된다(80두×250만원 = 2억원 절감).

4) 유전자가 주입된 수정란에서 PCR 분석기법으로 유전자의 통합을 조기에

확인함으로서 형질전환 송아지의 생산 성공율을 10배 이상(0.75%→7%)향상시킬 수 있다.

5) 핵이식 기법으로 형질전환된 수정란만 가려서 복제함으로서 하나의 수정란으로 부터 많은 복제수정란을 작출할 수 있으므로 형질전환 수정란의 생산비를 절감할 수 있다.