

토끼에서 공핵란의 발달단계가 할구주입,
전기융합 및 핵이식 수정란의 체외발달에 미치는 영향**

박충생 · 전병균 · 이효종* · 최민철* · 최상용*

경상대학교 축산학과

**Influence of Cell Stage of Donor Nucleus on Nuclear Injection,
Electrofusion and *In Vitro* Development in
Nuclear Transplant Rabbit Embryos****

C. S. Park, B. G. Jeon, H. J. Lee*, M. C. Choi* and S. Y. Choe*

Department of Animal Science, Gyeongsang National University

SUMMARY

This study evaluated the influence of cell stage of donor nucleus on nuclear injection, electrofusion and *in vitro* development in the rabbit to improve the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit. The embryos of 8-, 16- and 32-cell stage were collected from the mated does by flushing oviducts with Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS) containing 10% fetal calf serum(FCS) at 44, 54 and 60 hours after hCG injection. The blastomeres separated from these embryos were used as donor nucleus. The ovulated oocytes collected at 14 hours after hCG injection were used as recipient cytoplasm following removing the nucleus and the first polar body. The separated blastomeres were injected into the enucleated oocytes by micromanipulation and were electrofused in 0.28 M mannitol solution at 1.5 kV/cm, 60 μ sec for three times. The fused oocytes were co-cultured with a monolayer of rabbit oviductal epithelial cells in M-199 solution containing 10% FCS for 72~120 hours at 39°C in a 5% CO₂ incubator. The cultured nuclear transplant embryos were stained with Hoechst 33342 solution and the number of cells were counted by fluorescence microscopy. The successful injection rate of 8-, 16- and 32-cell-stage blastomeres into enucleated oocytes was 86.7, 91.0 and 93.9%, respectively. The electrofusion rate of 8-, 16- and 32-cell-stage blastomeres with enucleated oocytes was 93.3, 89.3 and 79.0%, respectively. Development of blastomeres to blastocyst was similar with 8-, 16- and 32-cell-stage donor nuclei(26.2, 25.8 and 26.6%, respectively, P<0.05). The mean number of cell cycle per day during *in vitro* culture in nuclear transplant embryos which received 8-, 16- and 32-cell-stage nuclei was 1.87, 1.81 and 1.43, respectively.

Key words: nuclear transplantation, cloned rabbit

* 경상대학교 수의학과(Department of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University)

** 이 연구는 1992년도 한국과학재단에서 지원한 특정기초연구 사업비로 연구되었음(KOSEF : 92-24-00-10).

서 론

핵이식은 전능성이 있는 수정란의 할구세포 또는 이들의 핵을 탈핵된 다른 난자 또는 초기의 수정란에 이식하는 기술이다. 이 기술을 활용하면 가축의 우량유전자 보급의 극대화, 번식효율의 개선, 동일한 성과 유전형질을 가진 복제수정란과 복제동물의 생산 등에 매우 유익하여 가축의 번식, 육종에 있어서 종래에 사용되어 오던 교배법이나 인공수정법에서 탈피하고 수정란이식기술을 더욱 발전시킴으로써 새로운 전기를 마련하게 될 것이다.

일반적으로 세포분화가 일어나기 전의 분할기에 있는 수정란의 할구세포들은 전능성을 가지고 있어서 이들 하나의 할구세포만으로도 한 개체를 이룰 수 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 세포의 수가 증가함에 따라 세포는 점진적으로 분화를 시작한다. 그 첫번째 단계는 배반포를 형성할 때 형태와 기능적으로 다른 두 세포가 나타난다. 이것은 내세포피(inner cell mass, ICM)와 영양세포층(trophoblast, TE)으로 분화를 한다. Koyama 등(1994)은 할구들의 세포막에는 미세섬유로 나타나는 두가지의 극성화가 나타나는데 주위극성세포(peripheral polar cell)와 중심극성세포(central polar cell)가 각각 영양세포층과 내세포피를 이룬다고 하였다. 이 연구에서 소의 경우에는 8-세포기 이전까지 그리고 토끼에서는 32-세포기 이전까지 할구들은 전부 비극성을 띠고 있다고 한다.

수정란 핵의 전능성(totipotency)에 있어서 양서류인 개구리의 수정란에서는 수정란 유래 유전자의 전사가 일어나는 시기는 4,000개의 세포로 발달되었을 때이며, 올챙이의 장관상피세포 하나는 한 개체를 이룰 수 있음이 증명되었다(Gurdon, 1986). 그러나 포유류에서는 그 전능성이 훨씬 빨리 상실되는 듯 하다. 생쥐에서는 2-세포기 이후에 상실된다는 주장(Kono 등, 1991)도 있으나, 박 등(1990)은 8-세포기의 핵을 이식하여 산자를 생산하였고, Illemensee와 Hoppe(1981)는 생쥐의 ICM 세포를 핵이식하여 산자를 생산한 바도 있다. 소와绵양에서는 각각 32-세포기와 64-세포기까지는 핵이 전능성이 있다고 주장되고 있으나(Bondioli 등, 1990 ;

Smith 와 Wilmut, 1989), 최근 Keefer 등(1993)은 소 수정란의 ICM세포를 사용하여 핵이식으로 산자를 생산한 바 있다. 그러나 이들 ICM 세포 모두가 각각 개체를 형성할 수 있는 전능성이 있는 지 또는 대부분이 다능성(pluripotency)을 가지고 있는 지에 대하여는 확인하기 어렵다. 토끼에 있어서는 Collas와 Robl(1991)은 32-세포기까지, Yang 등(1992)은 64-세포기까지 할구세포가 전능성이 있다고 한다. 각 동물에서 수정란의 발달단계에 따른 할구세포들의 분화 또는 전능성 상실에 관하여는 위와 같이 의견이 분분하고 아직도 불분명한 점이 많아 이에 관한 연구가 더 필요하다고 본다.

핵이식 기술은 그 과정이 복잡하고 발달역사 또한 짧아서 아직은 그 효율이 매우 낮은 실정이다. 핵이식 기술의 효율 향상을 위하여는 양질의 수핵 난자 확보, 정교한 미세조작에 의한 탈핵과 할구주입, 핵 세포질 융합기술의 개발, 수정란의 체외배양과 이식기술의 향상 등 많은 과제가 있으나, 무엇보다도 전능성이 있는 할구세포의 다량확보가 중요하다. 보다 발달된 수정란에서 더욱 많은 할구세포를 얻을 수 있으므로 이들을 핵의 공급원으로 이용하는 것이 매우 유리하다고 본다. 그러나 발달된 수정란일수록 핵융합율, 체외발달 능력 및 개체생산효율면에서 낮아지는 것으로 알려져 있다.

본 실험에서는 국내 핵이식 기술의 향상을 도모하고, 복제수정란 및 복제동물 생산효율 개선을 위하여 공핵란의 발달단계에 따른 할구주입율, 핵융합율, 체외발달율의 차이를 알아보고자 토끼를 사용하여 8-, 16- 및 32-세포기의 수정란으로부터 분리된 할구세포를 핵의 공급원으로 이용하여 핵이식을 실시하고 위의 사항들을 조사하여 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 공시동물 및 사양관리

본 실험에 사용된 공시동물은 New Zealand White 종의 성숙된 토끼로서 연암원예축산전문대학으로부터 공급받았으며 사용전에 분리 사육하였고 물과 사료는 자유로이 급식하였다.

2. 수핵난자의 확보

핵을 수여받을 난자를 확보하기 위한 토끼의 과배란 유기, 난자의 회수 및 난구세포의 제거는 이 등(1994)의 기술에 따라 실시하였다. 수핵난자는 hCG 주사 후 13~15시간에 채란하여 사용하였으며 난구세포의 제거 후 제1극체가 명확하고 세포질이 충실한 것만을 사용하였다.

3. 공핵수정란의 확보

핵을 수핵난자에 공급할 수정란 역시 이 등(1994)의 기술에 따라 과배란 유기, 수정란의 회수, 투명대 제거 및 할구분리 등을 실시하였다. 8, 16, 32세포기에 있는 수정란은 hCG 주사 후 각각 44, 54, 60시간째에 채란하였다.

4. 미세조작에 의한 탈핵과 핵주입

수핵란의 탈핵을 위한 미세조작은 Stice와 Robl(1988)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 수핵난자와 공핵 수정란으로 부터 분리된 할구세포를 7.5 μ g/ml의 cytochalasin B (Sigma Co., U. S. A.)와 10% FCS가 함유된 D-PBS에서 미세조작 15 분전에 전처리를 하였다. 미세조작을 위하여 micro-manipulators (Narishige Co., Japan)를 DIC 도립 현미경 (Nikon Co., Japan)위에 장치하였다. 탈핵은 McGrath와 Solter(1983)의 비파괴적 조작법에 의하여 실시하였다. 즉, 성숙된 난자로부터 핵을 제거하기 위하여 30~35 μ m의 연마된 미세 pipette을 투명대 내로 진입시키고 제 1극체와 그 주위에 위치하는 핵을 원형질막에 싸여진 채로 흡입하여 제거하였다. 한편, 공핵수정란으로 부터 분리된 할구세포 하나를 미세 pipette에 흡입하고 이를 미세조작으로 탈핵된 수핵난자의 원형질 바깥 위란막강에 주입하였다.

5. 핵융합

핵이 주입된 난자는 Robl 등(1987)의 방법에 따라 핵융합을 실시하였다. 전기자극은 이 등(1993)의 융합조건에 따라 전압(1.5 kV/cm), 통전시간(60 μ sec) 및 통전횟수(3회)를 정하였다. 할구가 이식된 난자를 100 μ M CaCl₂ 및 MgCl₂가 함유된 0.

28 M mannitol 용액으로 세척한 다음 paraffin oil 이 덮여 있는 소직에 옮기고 electro cell manipulator(Eyela Co., Japan)에 장치되어 있는 두 전극 사이에서 핵의 융합과 난자의 활성화를 유도하였다. 전기자극의 시간은 hCG 주입후 20시간에 실시하였다.

6. 핵이식 수정란의 체외배양과 할구수 조사

노 등(1994)의 기술에 따라 융합이 확인된 수정란은 4-well dish에 10% FCS가 포함된 M-199 배양액에 옮겨 monolayer가 형성된 토끼난관상피세포와 같이 39℃의 5% CO₂ 배양기내에서 72~120 시간 공배양하였다.

배양기간 동안 이들 핵이식 수정란의 배반포 형성율을 조사하였고, 핵융합 후 72~120 시간째에 Pursel 등(1985)의 방법에 따라 Hoechst 33342로서 핵염색을 실시하여 할구수를 조사하였다.

한편, 체내에서 발생된 수정란과 핵이식 수정란을 비교하기 위하여 hCG 주사와 교미후 120시간에 채란된 정상 수정란을 채취하여 그 형태학적 차이를 비교하였다.

7. 통계학적 분석

실험결과는 Chi-square test를 실시하여 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 공핵란의 발달단계에 따른 핵주입 효과

공핵란의 발달단계에 따른 핵주입효율을 조사한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다.

8-세포기 공핵란으로부터 분리된 할구를 탈핵된 수핵난자에 성공적으로 주입한 효율은 86.7%이었고, 16-세포기 할구에서는 91.0%이었으며 32-세포기 할구에서는 93.9%이었다. 할구의 크기가 작을수록 할구의 수핵난자 내 주입율이 상승되었다. 이러한 결과는 할구의 크기가 작을수록 미세조작이 용이한 데에 기인하였다고 본다.

2. 공핵란의 발달단계에 따른 핵융합 효과

공핵란의 발달단계에 따른 핵융합율을 조사한 결

Table 1. Effects of cell stage of donor nucleus on injection rate into enucleated oocytes

Cell stage of donor nucleus	No. of oocytes used	No. of oocytes injected	Injection rate (%)
8-cell	120	104	86.7 ^a
16-cell	122	111	91.0 ^a
32-cell	82	77	93.9 ^a

* The values with same superscripts are not significantly different ($P < 0.05$).

Table 2. Effects of cell stage of donor nucleus on electrofusion in nuclear transplant rabbit oocytes

Cell stage of donor nucleus	No. of oocytes used	No. of oocytes fused	Fusion rate (%)
8-cell	104	97	93.3 ^a
16-cell	103	92	89.3 ^a
32-cell	57	45	79.0 ^a

* The values with same superscripts are not significantly different ($P < 0.05$).

과는 Table 2에 나타난 바와 같다.

공핵란의 발달단계가 8, 16, 32 세포기인 것에서 각각 93.3, 89.3, 79.0%의 핵융합율을 보였다. 핵융합율에 있어서는 공핵란의 발달단계 간에 서로 유의적인 차이는 나타내지 않았지만, 32-세포기의 할구들에서 8 및 16 세포기의 할구들보다 다소 낮은 핵융합율을 나타냈다.

Yang 등(1990)은 핵의 공급원으로 8, 16, 및 32 세포기의 할구들을 이용하여 탈핵된 수핵난자에 주입하고 교류전류로서 핵이식 난자를 정렬한 다음 2.4 kV/cm, 60 μ sec의 직류전류로 융합자극을 주었던 바 그 효율은 각각 63, 66 및 64%를 보였다. 이는 본 실험에서의 93.3, 89.3 및 79%에 비하여 다소 낮은 성적이었다. Collas 와 Robl(1991)은 8 및 32 세포기 할구를 탈핵된 수핵난자에 핵이식 한 다음 2.0 kV/cm 전압에서 60 μ sec 간 30분 간격으로 6회 전기자극으로 핵융합을 일으켰던 바 그 융합율이 모두 100%이었다. 이들은 본 실험에서의 성적보다도 다소 나은 융합율을 얻었다.

이와 같이 각 연구보고마다 융합율의 차이는 다소 실험자의 숙련도의 차이도 있겠으나 전기자극에 있어서 그 시기와 전압 및 통전횟수의 차이 등 전기융합법의 차이에 주로 기인되었다고 보며, Collas 와 Robl(1990) 및 이 등(1994)의 보고에서와 같이 탈핵, 활성화 자극 및 난자의 성숙도의 차이도 관여하였으리라 짐작된다. 그러나 위의 각 보고에서 공핵란의 발달단계(8 과 32 세포기 사이)에 따른 핵

융합율의 비교에 있어서는 유의할 만한 차이를 인지할 수 없었다.

3. 공핵란의 발달단계에 따른 핵이식 난자의 체외발달 능력

공핵란의 발달단계에 따른 핵이식 수정란의 핵융합후 체외발달율을 조사한 결과는 Table 3에 나타난 바와 같다.

공핵란의 발달단계별 핵이식 수정란의 체외발달을 조사한 결과 8, 16, 32세포기의 할구들에서 배반포 형성율은 각각 26.2, 25.8와 26.6%로 비슷한 발달율을 보이고 있다.

이러한 결과는 Collas 등(1991)이 보고한 8~32 세포기에 핵이식 수정란의 발달율이 유의적인 차이를 나타내지 않았다는 보고와 일치하고 있다. Yang 등(1990)은 8, 16 및 32 세포기에서 상실배 및 배반포로의 발달율이 22, 16 및 15%를 보고하였고, 또한, 배반포로의 발달율에서 Collas 등(1990)은 8~32 세포기의 할구를 사용하여 44~48%의 높은 발달율을 보였다. 또한, Collas 등(1992)는 공핵란의 세포분열 주기를 조절하여 분열이 완성하고 난 다음 단일사슬의 DNA를 가지고 있는 상태인 G1의 세포주기에 공핵란의 할구를 핵이식했을 경우 71%의 높은 배반포로의 발달율을 얻었다. Barnes 등(1987)은 생쥐에서 1 세포기나 2 세포기의 공핵란으로 핵이식했을 경우에 이러한 공핵란의 발달단계가 중요한 것이 아니라 세포분열주기가 가장 중요

Table 3. Effect of cell stage of donor nucleus on in vitro development following nuclear transplantation in rabbit embryos

Cell stage of donor nucleus	No. of nuclear transplant embryos used	No. of embryos developed to(%)			
		2-cell	4-cell	Morula	Blastocyst
8-cell	42	39(92.9)	33(78.6)	22(52.4)	11(26.2) ^a
16-cell	31	19(61.3)	15(48.4)	12(37.7)	8(25.8) ^a
32-cell	45	35(77.7)	22(48.9)	20(44.4)	12(26.6) ^a

* The values with same superscripts are not significantly different (P < 0.05).

Table 4. Comparison of number of blastomeres following in vitro culture of nuclear transplant embryos

Type of embryos	No. of embryos stained	Culture time(hrs.)	No. of blastomeres (Mean ± SEM)	Mean no. of cell cycle / day
8-cell NT	9	72	47.6 ± 6.6	1.87
16-cell NT	7	72	43.2 ± 3.8	1.81
32-cell NT	8	120	142.9 ± 55.0	1.43

* NT : nuclear transplantation.

한 요소라고 보고하였다. 또한 Kato 등(1993)은 만약 공핵란이 G1의 세포주기에 있다면 핵이식후 핵 물질은 정상적인 핵형을 가질 것이라고 보고하였다.

본 실험에서는 핵이식 수정란의 발달이 2-세포기와 상실배에서 발달이 지연되는 경우가 많았다. 이러한 이유는 비정상적인 핵형이나 유전물질을 가지기 때문이라고 생각된다. 또한, Fischer 등(1990)은 발달지연은 상실배보다 배반포기에서 더 우세하다고 보고하였다.

Yang 등(1990)은 8, 16 및 32 세포기의 수정란으로부터 분리된 할구를 이용하여 핵이식을 실시하고 이들 중 핵융합이 일어난 것만 체외에서 배양하여 상실배 또는 포배기까지의 발달율은 각각 34, 24 및 24%로서 본 실험의 성적인 52.4, 37.7 및 44.4%보다 낮았다. 이러한 차이는 Yang 등은 BSA가 1.5%첨가된 M-199배양액으로 50 μl microdroplet을 만들어 핵이식 난자를 배양한데 비하여 본 실험에서는 FCS가 10% 첨가된 M-199배양액을 사용하여 4-well dish에서 토끼난관상피세포와 공배양을 실시함으로써 보다 나은 성적을 얻었다고 사려된다.

4. 핵이식 수정란의 체외배양기간 할구수와 세포 분열주기 비교

hCG 주사 후 94 시간에 토끼의 자궁각으로부터 채란한 배반포기의 수정란과 체외에서 72~120 시간 배양한 핵이식 수정란을 Hoechst 33342로서 핵 염색을 시행하여 핵의 수를 조사함으로써 핵이식 배의 체외발달 능력을 비교 검토하였던 결과는 Table 4에 나타난 바와 같다.

위의 결과에서 8, 16 세포기 공핵란의 할구들에서는 72 시간동안 배양으로 할구들의 수가 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, 1일 동안 핵이식 수정란의 평균 세포분열주기는 1.87회 및 1.81회였다. 그러나 120시간 동안 체외배양한 32-세포기의 공핵란에서 1일 동안의 분열주기가 1.4회 정도로 8, 16세포기의 평균 1일동안 분열주기의 횟수보다 적었다. Stice와 Robl(1988)은 토끼의 8세포기 수정란의 할구를 이용하여 핵이식 한 다음 120시간 배양하였을 때 세포의 수는 91±10.2개 였다고 하였는데 본 실험에서는 72시간 배양하여서 평균 세포수는 47.6±6.6개 이었다. 서로 배양시간이 달라서 정확한 비교가 어려우나 Stice와 Robl(1988)의 경우 핵이식 수정란의 평균 분열주기는 약 18시간 50분이었는데(1일 평균 세포주기 : 1.28회) 본 실험의 경우 평균 분열주기는 약 13시간 10분이었고(1일 평균 세포주기 : 1.87회), 본 실험에서 보다 빠른 분할이 일어났다. 노 등(1994)은 hCG 주사와 교미후 24시간에 회수된 1 또는 2 세포기의 토끼 수정란을 토끼난관상피

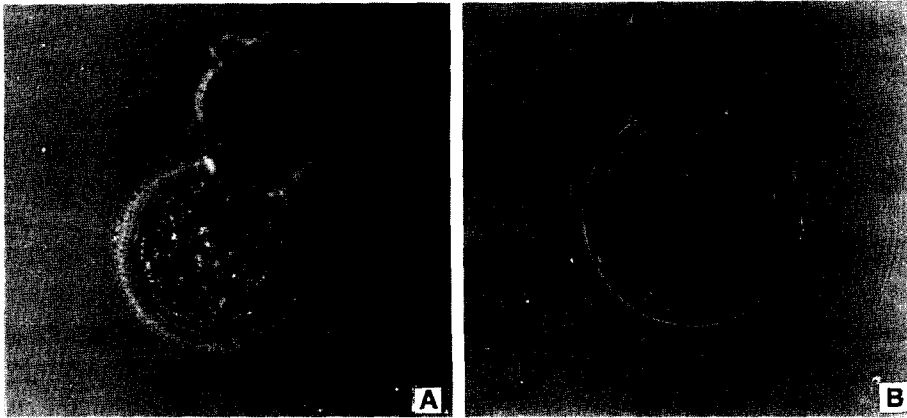


Fig. 1. A hatching blastocyst(A) originated from a nuclear transplant oocyte($\times 100$) and an *in vivo* developed intact blastocyst(B) collected at 120 h post mating($\times 100$).

세포와 같이 M-199 배양액에서 72시간 배양하였던 바 핵의 수가 216.0 ± 33.6 개로 발달되었다고 한다. 본 실험에서는 8 또는 16 세포기에 핵이식한 수정란을 위와 같이 72시간 공배양하였더니 핵의 수는 6 ± 6.6 및 43.2 ± 3.8 개로서 그 수가 현저히 적었다. 그러므로 핵이식 수정란의 체외발달 능력은 정상 수정란보다 세포분열주기가 2회 이상 늦어짐을 관찰하였다. Yang 등(1992)이 체외배양하지 않은 수정란과 20시간 동안 체외배양한 수정란 그리고 핵이식 수정란의 산자로의 생산율에서 41, 20 그리고 8%를 보고한 것처럼 이러한 것은 체내의 조건과 부적당한 체외배양의 조건 때문에 발달지연이 나타나는 것을 알 수 있다. 또한 핵이식시 난자와 할구에 손상을 주는 것으로 사려되며, Northey 등(1991)은 소에서 수정 전에 난자 세포질의 제거는 할구수에서 감소를 가져 온다고 보고하였다. Fisher(1987)은 체외배양한 수정란의 단백질 합성을 조사한 결과 체내에서 자란 수정란보다 발달이 지연되는 것을 알아 내었고, Schumacher 등(1988)과 Bedford 등(1989)은 토끼의 수정란에서 가시광선은 DNA의 손상을 주고 25°C의 실온에 노출되었을 때 세포내 기관의 이동과 세포골격에 손상을 주어 발달이 지연된다는 것을 보고하였다.

또한, Fig. 1에서 보는 것처럼 체내에서 자란 수정란은 토끼에서만 존재하는 난관상피세포에서 분

비되는 당단백질 성분인 mucin coat층이 두껍게 존재하고 있다. 자궁에 도달한 수정란은 바로 착상을 하지 않고 2~3일 동안 mucin coat층이 소화가 되고 난 다음 부화를 하고 그 사이 다른 동물보다 짧은 세포주기를 가지는 토끼는 할구수가 많이 증식된다. Daniel(1964)은 교미 후 7일째 착상시의 토끼의 수정란의 할구수는 255,000개라고 보고하였다. 본 실험에서 핵이식 수정란은 120 시간동안 체외배양으로 할구수가 평균 142개로 현저히 적었으며 핵이식시 손상된 투명대 부분으로 부화하는 경우가 많았다.

적 요

복제배 및 복제동물을 보다 효율적으로 생산하기 위한 핵이식 기술을 개발함에 있어서 공핵란의 발달단계에 따른 할구주입율, 핵융합율 및 핵이식 수정란의 체외발달 능력을 조사하였다. 성선 자극호르몬의 투여로 과배란시킨 다음 교미된 토끼의 난관으로 부터 8, 16 및 32 세포기의 수정란을 채란하여 투명대를 제거한 후 할구세포를 분리하였다. 이들 분리된 할구세포를 hCG 주사 후 14 시간에 채란하여 제1극체와 핵을 제거한 난자의 위관막강에 미세조작으로 주입하였다. 8, 16 및 32 세포기의 할구주입율은 각각 86.7, 91.0 및 93.9%로서 높은

주입율을 보였으며, 발달된 것일수록 주입율은 높아졌으나 유의할만한 차이는 보이지 않았다. 할구세포가 주입된 난자는 hCG 주사로 부터 20시간에 직류전류로서 1.5 kV/cm, 60 μ sec를 3회 반복 통전하였던 바, 8, 16 및 32 세포기의 할구세포의 융합율은 각각 93.3, 89.3 및 79.0%로서 발달된 할구일수록 융합율이 점차 떨어지는 현상을 보였으나 유의할만한 차이는 보이지 않았다. 이들 융합된 핵이식 난자는 10% FCS가 함유된 M 199 배양액에서 토끼 난관 상피세포층과 같이 5% CO₂, 39°C 배양기에서 72~120시간 공배양 하였던 바, 이들의 배반포 형성율은 8, 16 및 32 세포기에서 26.2, 25.8 및 26.6%를 보였다. 그리고 이들 배반포를 Hoechst 33342로서 핵염색을 실시하여 보았던 바 24시간의 평균 분열주기 회수는 8, 16 및 32 세포기에서 각각 1.87, 1.81 및 1.43을 보여 발달단계별로 유의할 만한 차이가 없었다. 그러나 체내에서 발달된 정상 수정란에 비해서는 핵이식 수정란에서 세포수가 현저히 적었다. 이상의 결과로 보아, 토끼에서는 8에서 32세포기까지의 할구세포를 공핵란으로 사용할 경우 핵주입율, 핵융합율 및 체외발달 능력면에서 큰 차이가 없다고 사려되나 하나의 수정란으로부터 다수의 복제배 및 복제동물을 생산하는 효율면에서는 8 세포기 할구보다는 32 세포기 할구를 이용하는 것이 더욱 유리하다고 사려된다.

사 사

본 연구를 수행하는데 있어서 좋은 토끼를 착오 없이 공급하여 준 연암원에축산전문대학과 토끼 사육에 협조하여준 본 대학교 부속동물사육장과 셋별 농장에 감사드리며 아울러 micromanipulator system 이용에 도움을 준 본 대학교 공동실험실습관에 심심한 감사를 드립니다.

참고문헌

Barnes FL, Robl JM and First NL. 1987. Nuclear transplantation in mouse embryos : Assessment of nuclear function. Biol. Reprod. 36:1267-1274.

Bedford JM and Dobrenis A. 1989. Light exposure of oocytes and pregnancy rates after their transfer in the rabbit. J. Reprod. Fert. 85:477-481.

Bondioli KR, Westhusin ME and Loomey CR. 1990. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. Theriogenology 33:165-174.

Collas P and Robl JM. 1990. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. Biol. Reprod. 43:877-884.

Collas P and Robl JM. 1991. Relation between nuclear remodeling and development in nuclear transplant rabbit embryos. Biol. Reprod. 45:455-465.

Collas P, Balise JJ and Robl JM. 1992. Influence of cell stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. Biol. Reprod. 46:492-500.

Daniel JC Jr. 1964. Early growth of rabbit trophoblast. Am. Natur. 98:85-97.

Fischer B. 1987. Development retardation in cultured preimplantation rabbit embryos. J. Reprod. Fert. 79:115-123.

Fischer B, Jung T, Helgele-Hartung, C and Beier HM. 1990. Development of preimplantation rabbit embryos in uterine flushing - supplemented culture media. Mol. Reprod. Dev. 27:216-223.

Gurdon GB. 1986. Nuclear transplantation in eggs and oocytes. J. Cell. Sci. Suppl. 4:287-318.

Illmensee K, Hoppe PC. 1981. Nuclear transplantation in Musculus :Developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. Cell 23:9-18.

Kato Y and Tsunoda Y. 1993. Totipotency and pluripotency of embryonic nuclei in the mouse. Mol. Reprod. Dev. 36:276-278.

Keefer CI, Koppang R, Paporocki AM, Golueke P, Stice S, Maki-Laurola and Matthews.

1993. Bovine inner cell mass (ICM) cells as donor nuclei in the production of nuclear transfer embryos. *Theriogenology* 39:242.
- Kono T, Iwasaki S, Nakahara T. 1991. Development of enucleated mouse oocytes reconstituted with embryonic nuclei. *J. Reprod. Fert.* 93:165-172.
- Koyama H, Suzuki H, Yang X, Jiang S and Foote R. 1994. Analysis of polarity of bovine and rabbit embryos by scanning electron microscopy. *Biol. Reprod.* 50:163-170.
- McGrath J. and Solter D. 1983. Nuclear transplantation of rat embryos. *J. Exp. Zool.* 248:303-305.
- Northey DL, Nuttleman PR and Rosenkrans CF. 1991. Removal of bovine oocyte cytoplasm prior to fertilization reduces cell number in embryos. *Biol. Reprod.* (Suppl. 1) 156 (Astr.).
- Park HS, Lee HJ, Choe SY and Park CS. 1990. Study on *in vitro* development of mouse embryos after nuclear transplantation. *Korean J. Anim. Reprod.* 14:205-211.
- Pursel VG, Wall RJ, Rexroad Jr. CE, Hammer RE and Brinster RL. 1985. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenology* 24:687-691.
- Robl JM, Prather R, Barnes FL, Eyestone WH, Northey D, Gilligan B, and First NL. 1987. Nuclear transplantation in bovine embryos. *J. Anim. Sci.* 64:642-647.
- Schumacher A and Fischer B. 1988. Influence of visible light and room temperature on cell proliferation in preimplantation rabbit embryos. *J. Reprod. Fert.* 84:197-204.
- Smith LC, and Wilmut I. 1989. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the early development *in vivo* of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol. Reprod.* 40:1027-1035.
- Stice SL, and Robl JM. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 39:657-664.
- Yang X, Zhang L, Kovacs A, Tobback C and Foote RH. 1989. Potential of hypertonic medium treatment for embryos micromanipulation II. Assessment of nuclear transplantation methodology, isolation, subzona insertion, and electrofusion of blastomeres to intact of functionally enucleated oocytes in rabbit. *Mol. Reprod. Dev.* 27:118-129.
- Yang X, Jiang S, Kovacs, A and Foote RH. 1992. Nuclear totipotency of cultured rabbit morulae to support full-term development following nuclear transplant. *Biol. Reprod.* 47:636-643.
- 노규진, 이효종, 송상현, 윤희준, 박충생. 1994. 수정란의 체외발달에 미치는 배양액 및 소와 토끼의 난관상피세포들과의 공배양 효과. *한국가축번식학회지* 18:39-46.
- 이효종, 정미경, 전병균, 최민철, 최상용, 박충생. 1994. 토끼에서 난자의 성숙도가 전기융합 및 핵이식 수정란의 체외발달에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지* 9:23-30.
- 이효종, 최민철, 최상용, 박충생, 윤창현, 강대진. 1993. 반복핵이식에 의한 복제동물 생산에 관한 연구. I. 토끼 수핵난자의 전기자극에 의한 활성화. *한국수정란이식학회지* 8:151-154.