

반복핵이식에 의한 복제동물 생산에 관한 연구 Ⅲ. 토끼에서 제3세대 복제수정란의 생산*

이효종¹, 전병균, 윤희준, 박충생, 최상용, 윤창현, 강대진
경상대학교 축산진흥연구소

Study on Production of Cloned Animals by Recycling Nuclear Transplantation Ⅲ. Production of Third Generation Cloned Embryos in Rabbits*

Hyo-jong Lee¹, Byeong-gyun Jeon, Xi-jun Yin, Choong-saeng Park,
Sang-yong Choe, Chang-hyun Yun, Dae-jin Kang

Institute for Development of Livestock Production,
Gyeongsang National University, Chinju, 660-701

Abstract

The recycling nuclear transplantation(NT) technique has the powerful potential of producing a large number of genetically identical embryos and offsprings from one embryo. Multiple generational cloning by this technique utilizes the NT embryo itself as the donor for the next generation of cloning.

In this experiment, we have produced the third generational cloned embryos by recycling NT. Further we examined comparatively the electrofusion rate and in vitro developmental potential in the cloned embryos of the first, second and third generations.

The embryos of 16-cell stage were collected from the mated does by flushing oviducts with Dulbecco's phosphate buffered saline containing 10 % fetal calf serum(FCS) at 47 hours after hCG injection. In the first generation NT, the nuclear donor embryos were synchronized in the phase of G1/S transition of 32-cell stage. The first and second generation NT embryos developed to 16-cell were used as donor nuclei for second and third generation. The recipient cytoplasm was utilized the oocytes collected at 14 hours after hCG injection, following removing the nucleus and the first polar body by micromanipulation.

* 이 논문은 1991년도 교육부 지원 한국학술진흥재단의 대학부설연구소 지원 학술연구조성비에 의하여 연구되었음

¹ Correspondence

The separated blastomeres were injected into the enucleated recipient oocytes by micromanipulation and were fused by electrical stimulation. The electrofusion rate was seen to be 78.0, 88.6 and 90.3 % in the first, second and third generation NT rabbit embryos, respectively.

The fused oocytes were co-cultured with a monolayer of rabbit oviductal epithelial cells in M-199 solution containing 10 % FCS for 120 hours at 39 °C in a 5% CO₂ incubator. The *in vitro* developmental potential to blastocyst stage was significantly ($P < 0.05$) decreased in the third (7.2 %) generation NT embryos compared to the first (53.1 %) and second (16.1 %) generation NT embryos. Following *in vitro* development to blastocyst stage, they were stained with Hoechst 33342 dye for counting the number of blastomeres by fluorescence microscopy. The mean blastomere numbers and cell cycle numbers of NT embryos during the culture period were significantly ($P < 0.05$) decreased in the second (93.8 cells and 6.55 cycles) and third (81.5 cells and 1.35 cycles) generation, compared to the first (189.9 cells and 7.55 cycles) generation.

Key words : Nuclear transfer, third generation cloning, electrofusion, rabbit embryo

서 론

반복핵이식기법은 한개의 수정란으로부터 분리된 할구세포 하나 하나를 핵의 공급원으로 사용하고 이를 탈핵된 다수의 난자에 이식하여 다수의 복제된 수정란을 작출하고 이들을 발달시킨 다음 분리된 할구세포를 핵의 공급원으로 재사용하여 핵이식을 반복 실시하는 기술이다. 이 반복 핵이식기법을 활용하면 수많은 복제수정란을 작출할 수 있고 나아가서 이들을 대리모에 이식하여 산자를 생산하게 된다면 수많은 복제동물을 확보할 수 있다. 가정하여 분할기에 있는 하나의 수정란을 공핵란으로 사용하여 핵이식으로 10개의 제1 세대 복제수정란을 작출하였다면, 이들을 체내 외에서 배양하여 분할후기의 수정란으로 발달시키고 이들을 다시 공핵란으로 사용하여 핵이식을 실시하면 100개의 제2 세대 복제수정란을 작출할 수 있을 것이다. 이러한 과정을 5번 반복하면 10⁵개의 복제수정란을 작출할 수 있다는 이론적 계산이 된다. 그러나 아직까지는 그 기술이 이러한 수준에 도달하지 못하고 있다. 그 이유는 첫째, 핵이식기술이 매우 복잡한 과정을 거치게 됨으로써 수정란에 많은 손상과 발달능력 저하를 일으키며, 둘째, 공핵수정란의 발달이 진행될수록

할구의 개수는 많아지나 그의 전능성이 떨어져서 결과적으로 복제수정란 또는 복제동물의 생산효율이 비례적으로 증가하지 않으며, 셋째, 반복적으로 핵이식을 실시하면 세대가 진행될수록 그 할구세포들 모두가 지속적으로 전능성을 유지할 것인가에 대하여는 아직도 의심의 여지가 있다.

실제로, 1990년 Bondioli 등⁴이 소의 성숙된 난자에 16- 및 64-세포기의 핵을 이식하고 체내에서 발달시킨 다음 이를 다시 반복핵이식으로 92마리의 신생자를 생산하였으며 이중 7마리가 유전적으로 동일한 복제산자였다고 보고하였다. 또한 Stice 등²⁰도 소의 32-에서 64-세포기의 핵을 3세대까지 반복이식하는데 성공하였다는 보고가 있었고, Westhusin 등²²도 반복핵이식을 한 바 있다. Stice와 Keefner²¹는 소에서 제3세대 핵이식수정란을 이식하여 산자의 생산에 성공하였다고 보고하였다. 앞으로 핵이식수정란을 핵의 공급원으로 재사용하는 반복핵이식기법을 응용하면 우량 유전자를 가지는 수정란을 기하급수적으로 증가시킬 수 있을 것이다. 국내에서는 박 등²³이 생쥐에서 제2 세대 핵이식에 의한 25마리의 복제산자를 보고하였고, 토끼에서도 박 등²⁴과 이 등²⁵은 제2 세대 핵이식에 의한 복제수정란을 생산한 바 있으나, 국내외에서 토끼에서는 제3 세대 복제수정

란을 작출한 예가 아직까지는 보고된 바가 없다.

그러므로, 본 연구에서는 토끼를 모델동물로 하여 반복핵이식으로 제3 세대 복제수정란을 작출하는 실험을 수행하였으며, 제1, 제2 및 제3세대 복제수정란의 핵융합율과 체외발달능력을 비교 검토하였다.

재료 및 방법

공시동물 및 사양관리 : 본 실험에 사용된 공시동물은 New-Zealand White 종의 성숙된 토끼로서 연암원에축산전문대학으로부터 공급받았으며 사용전에 분리사육하였고 물과 사료는 자유로이 급식하였다.

수핵난자의 확보 : 핵을 수여받을 난자의 확보를 위한 과배란 유기는 성숙한 암토끼를 2 mg의 FSH(Folltropin®, Australia)를 하루에 한번 3일 동안 피하주사하고, 마지막 투여 12시간 후 hCG (PEAMAX®, Japan) 100 IU를 정맥주사하였다. 수핵난자는 hCG 주사 후 13~15시간에 암토끼를 chlorpromazine HCl과 ketamine HCl로 전신마취한 다음 개복수술하여 난관으로부터 성숙난자를 10 % FCS가 함유된 D-PBS로 회수하였다. 회수된 난자는 300 IU/ml의 hyaluronidase(SIGMA Co., U.S.A.) 용액에서 39 °C, 5 % CO₂조건에서 7분간 배양한 다음, 150 µm fire-polished pipette으로 난구세포를 제거하여 제1극체가 명확하고 세포질이 충실한 것만을 사용하였다.

공핵수정란의 확보 : 핵을 수핵난자에 공급할 수정란의 과배란 유기는 전항 2)와 같이 과배란을 유기한 다음 성숙된 수토끼와 교미시켰다. 16-세포기에 있는 수정란은 hCG 주사 후 47시간째에 채란하였다. 수정란은 0.5 %의 pronase(SIGMA Co., U.S.A.) 용액에서 8분간 배양한 다음 150 µm 정도의 pipette으로 투명대를 제거하고 이들을 다시 50 µm 정도의 pipette으로 Ca₂₊와 Mg₂₊가 없는 PBS에서 할구를 분리하였다. 또한 제2 및 제3 세대 핵이식을 위한 공핵란은 제1세대 및 제2세대 핵이식으로 발생한 16-세포기의 핵이식수정란을 사용하였다. 제1 및 제2세대

핵이식수정란은 0.5 %의 pronase 용액에 2분간 처리한 다음 앞의 기술과 같이 할구를 분리하여 미세조작에 사용하였다.

공핵수정란 할구의 세포주기 조절 : 제1 세대 핵이식수정란에서 공핵란의 G1/S 세포주기를 동기화하는 방법은 Collas 등⁷⁾의 방법을 따랐다. 즉, 0.5 µg/ml의 microtubule 중합 저해제인 colcemid(GIBCO, U.S.A.)가 포함된 vitreous humor(VH)에서 10시간 배양으로 분열의 중기에 정지시킨 다음 DNA 합성 저해제인 0.1 µg/ml의 aphidicolin(SIGMA Co., U.S.A.)을 포함한 VH에서 1.5~2시간 동안 배양하여, 다음 세포기로 발달한 G1/S기의 할구를 사용하였다. 또한, 미세조작도 aphidicolin이 함유된 배양액에서 실시하였고, 미세조작 후 핵의 융합때까지 aphidicolin이 함유된 배양액에서 배양하였다.

미세조작에 의한 탈핵과 핵주입 : 수핵란의 탈핵을 위한 미세조작은 Stice와 Robl¹⁹⁾ 그리고 Collas와 Robl²⁾의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 수핵난자와 공핵수정란으로부터 분리된 할구세포를 7.5 µg/ml의 cytochalasin B(SIGMA Co., U.S.A.), 0.1 µg/ml의 aphidicolin 그리고 10 % FCS가 함유된 Earl's balanced salt solution(EBSS, SIGMA Co., U.S.A.)에서 미세조작 15 분전에 전처리 하였고, 미세조작을 위하여 micromanipulators(Narishige Co., Japan)를 DIC 도립현미경(Nikon Co., Japan)위에 장치하였다. 미세조작 또한, 7.5 µg/ml의 cytochalasin B(SIGMA Co., U.S.A.), 0.1 µg/ml의 aphidicolin 그리고 10% FCS가 함유된 EBSS에서 실시하였으며 탈핵은 McGrath와 Solter²³⁾의 non-destructive 조작법에 의하여 실시하였다. 즉, 성숙된 난자로 부터 핵을 제거하기 위하여 외경 30 µm의 연마된 미세 pipette을 투명대 내로 진입시키고 제1극체와 그 주위에 위치하는 핵을 원형질막에 싸여진 채로 흡입하여 제거하였다. 한편, 공핵수정란으로부터 분리된 할구세포 하나를 미세 pipette에 흡입하고 이를 미세조작으로 탈핵된 수핵난자의 원형질 바깥 위관막강에 주입하였다. G1/S기에 있는 핵이 주입된 난자는 aphidicolin이 0.1 µg/ml 포함된 VH에서 미세조작 후 핵의 융합때까지 배양하였

다.

세포융합과 난자의 활성화 : 할구가 주입된 난자는 이 등²¹의 방법에 따라 세포융합을 실시하였다. 전기자극은 1.25 kV/cm의 전압과 60 μsec의 통전시간을 3회의 통전횟수로 정하였다. 융합과 난자의 활성화를 위한 용액은 100 μM CaCl₂ 및 MgCl₂가 함유된 0.28 M mannitol 용액으로, 할구가 이식된 난자들이 이 용액으로 세척한 다음 paraffin oil이 덮여 있는 소적에 옮기고 electro cell manipulator(Eyela Co., Japan)에 장치되어 있는 두 전극 사이에서 세포의 융합과 난자의 활성화를 유도하였다. 그리고 난자와 할구의 융합 및 난자의 활성화는 hCG 주입 후 20시간에 전기자극으로 유도하였다. 이를 aphidicolin이 0.1 μg/ml을 포함한 0.28 M mannitol 용액에서 premature chromosome condensation(PCC)가 일어나는 동안 DNA의 합성을 막기 위하여 20분 동안 배양하였고, 할구의 융합이 확인된 난자는 7.5 μg/ml의 cytochalasin B와 10% FCS가 함유된 M-199(Earl's salt, SIGMA Co., U.S.A.) 배양액에서 1시간 동안 배양한 다음 10% FCS가 함유된 M-199 배양액에서 체외배양을 하였다.

핵이식수정란 체외배양, 염색 및 할구수 조사 : 노 등²⁶의 기술에 따라 융합이 확인된 수정란은 4-well dish에 10 % FCS가 포함된 M-199 배양액에 옮겨 monolayer가 형성된 토끼난관상피세포와 같이 39 °C의 5 % CO₂ 배양기내에서 120 시간 공배양하였다. 모든 기본 배양액은 배양하기 12시간에서 24시간 전에 incubator에서 배양을 하여 pH의 균형을 유도하였다.

배양기간 동안 이들 핵이식수정란의 배반포 형성율을 조사하였고, 세포융합 후 120 시간째에 Pursel 등¹⁷의 방법에 따라 Hoechst 33342로서 핵염색을 실시하여 할구수를 조사하였다.

통계학적 분석 : 실험결과는 Chi-square test 및 Student t-test를 실시하여 평균간의 차이에 대한 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

제1, 제2 및 제3 세대 핵이식수정란의 세포융합 효과 : 제1, 제2 및 제3 세대 핵이식수정란의 세포융합율을 조사한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다.

Table 1. Electrofusion rate of the first, second and third generation NT rabbit embryos

Generation of NT embryos	No of oocytes	No of oocytes fused	Fusion rate *
1st	41	32	78.0 ^a
2nd	35	31	88.6 ^a
3rd	31	28	90.3 ^a

*The values with same superscripts in the column are not significantly different.

제1, 제2 및 제3 세대 핵이식수정란에서 각각 78.0, 88.6 및 90.3%의 세포융합율을 보였다. 세포융합율에 있어서는 세대간 서로 유의적인 차이는 나타내지 않았지만, 제1 세대에서 제2 및 제3 세대의 핵이식수정란보다 다소 낮은 융합율을 보이고 있는데 이러한 차이는 제1 세대 핵이식에서는 공핵란을 32-세포기의 할구를 사용한 반면 제2 세대 핵이식에서는 공핵란의 할구는 16-세포기의 할구를 사용한데서 기인하였다고 사료된다. 박 등²⁷은 32-세포기의 할구에서 79%의 융합율을 보였고, 16-세포기의 할구에서 89.3%의 융합율을 보고하였는데 본 실험에서도 비슷한 융합율을 나타내고 있다.

Yang 등²⁸은 토끼에서 핵의 공급원으로 8-에서 32-세포기까지의 할구들을 이용하여 탈핵된 수핵난자에 주입하고 교류전류로서 핵이식 난자를 정렬한 다음 2.4 kV/cm, 60 μsec의 직류전류로 융합 자극을 주었던 바 그 효율은 63~66%의 범위를 보였다고 한다. 이는 본 실험에서의 78.0~90.3 %에 비하여 다소 낮은 성적이었다. Collas 와 Robl⁶은 8- 및 32-세포기 할구를 탈핵된 수핵난자에 핵이식

Table 2. Development *in vitro* of the first, second and third generation NT rabbit embryos

Generation of NT embryos	No. of embryos cultured	No.(%) of embryos developed to			
		2-cell	4-cell	Morula	Blastocyst*
1st	32	31(96.8)	27(84.3)	24(75.0)	17(53.1) ^a
2nd	31	21(67.7)	13(41.9)	10(32.3)	5(16.1) ^b
3rd	28	10(35.7)	8(28.8)	5(17.9)	2(7.2) ^c

* The values with different superscripts in the column are significantly different($p < 0.05$).

한 다음 2.0 kV/cm 전압에서 60 μ sec 간 30분 간격으로 6회 전기자극으로 세포융합을 일으켰던 바 그 융합율이 모두 100%이었다. 이들은 본 실험에서의 1.25 kV/cm보다 높은 전압을 주었고, 회수에 있어서도 본 실험보다 많은 6회를 응용하였다.

반복핵이식에서 Stice와 Keefer²²은 제1, 제2 및 제3 세대 소 핵이식수정란의 융합율은 각각 66, 60 및 52 %로 세대간에 융합율의 차이를 보인다고 보고하였으나, Westhusin 등²³은 유의적인 차이를 나타내지 않았다고 한다.

이와 같이 각 연구보고마다 융합율의 차이를 보고하고 있으나, 위의 결과에서 세포융합율의 비교에 있어서는 유의할 만한 차이를 인지할 수 없었으며, 공핵수핵란의 분할기에 따른 할구세포의 크기가 세포융합율에 더 큰 영향을 주는 것으로 사려된다.

제1, 제2 및 제3 세대 핵이식수정란의 체외발달 능력 : 체내발달된 수정란과 제1 및 제2 세대 핵이식수정란을 공핵란으로 사용하여 제1, 제2 및 제3 세대 핵이식수정란을 작출하고 이들의 체외발달율을 조사한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같다.

제1, 제2 및 제3 세대 핵이식수정란의 배반포 형성율은 각각 53.1, 16.1 및 7.2 %로 세대간에 유의적인($P < 0.05$) 차이를 나타내었다.

제1 세대 핵이식수정란의 발달율에서 박 등²⁴은 세포주기를 조절하지 않았을 때 32-세포기의 공핵란으로 26.6 %를 보고하였는데, 본 실험에서는

세포주기를 조절하였던 바 53.1 %로 발달율이 향상됨을 관찰하였다. 그러나 Collas 등²⁵은 공핵란의 세포분열주기를 조절하여 DNA를 복제하기 전의 간기인 G1의 세포주기에 공핵란의 할구를 핵이식했을 경우 71 %의 높은 배반포로의 발달율을 얻었으나, 본 실험에서는 다소 낮은 발달율을 보이고 있다. Barnes 등²⁶은 생쥐에서 1-세포기나 2-세포기의 공핵란으로 핵이식했을 경우에 이러한 공핵란의 발달단계가 중요한 것이 아니라 세포분열주기가 가장 중요한 요소라고 보고하였다. 또한 Kato 등²⁷은 만약 공핵란이 G1의 세포주기에 있다면 핵이식후 핵물질은 정상적인 핵형을 가질 것이라고 보고하였다. 박 등²⁸이 토끼에서 제2 세대 핵이식수정란의 발달율에서 9.7 %를 보고하였으나, 본 실험에서 핵이식수정란의 발달율이 16.1 %로 증진됨을 관찰하였다. 또한 이 등²⁹은 공핵란의 세포주기 조절에 의하여 제2세대 핵이식수정란의 발달율을 23.3 %라고 보고하였으나, 본 실험에서 제2 세대 핵이식을 실시하였을 때에는 공핵란의 세포주기를 조절하지 않았기 때문에 16.1 %로 다소 발달율이 저조하였다.

본 실험에서는 핵이식수정란의 발달이 2-세포기와 상실배기에서 발달이 지연되는 경우가 많았다. 이러한 이유는 비정상적인 핵형이나 DNA를 가지기 때문이라고 생각되므로 이에 관한 연구가 더 필요하다고 본다. 토끼에서 수정란의 유전자가 활동을 하는 시기는 2-세포기부터 라고 한다³⁰. 이러한 이유에서 비정상적인 핵형이나 DNA를 소

Table 3. Blastomere counts and cell cycle numbers of blastocysts following *in vitro* culture for 120 hours of the first, second and third generation NT rabbit embryos

Generation of NT embryos	No. of embryos stained	No. of blastomeres*	Cell cycle numbers
1st	10	187.9±26.3 ^a	7.55±0.20
2nd	5	93.8± 8.0 ^b	6.55±0.12
3rd	2	81.5± 6.5 ^b	6.35±0.10

Mean±SEM

* The values with different superscripts in the column are significantly different(p<0.05)

유한 핵이식수정란은 이 발달단계에서 발달이 지연될 것이다. 또한, Fischer 등¹¹은 발달지연은 상실배기 이전보다 상실배기에서 배반포기로 발달할 때 더 현저하다고 보고하였다.

소의 반복 핵이식에서 Bondioli 등⁴, Westhusin 등²² 및 Stice와 Keefer²¹은 핵이식수정란의 체외발달능력에 있어서는 세대간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다고 하였으나, Stice와 Keefer²⁰은 산자의 생산율에 있어서는 제1, 제2 및 제3 세대 핵이식수정란에서 각각 10, 2, 3 %로 각 세대간에 차이를 보인다고 하였다.

제1 세대 핵이식에서 비록 정상적인 수정란을 공핵란으로 사용하였다 하더라도, 탈핵과 할구주입을 위한 미세조작, 세포질 융합을 위한 전기자극, 세포주기 조절에 사용하는 cytochalasin B, colcemid 및 aphidicolin 등과 같은 화학물질에의 노출 등의 원인에 기인하여 핵이식수정란의 핵형 또는 DNA 구조에 변화를 일으켜 비정상적인 복제수정란이 작출되었다면, 이들을 배양하여 제2 및 제3 세대 핵이식 작업에서 핵의 공급원으로 사용하였을 때 이들 복제수정란 역시 비정상적인 상태가 되어 발달에 장애가 될 수 있다고 한다^{16,21}.

제1, 제2 및 제3 세대 핵이식수정란의 체외배양기간 할구수와 세포분열주기 비교 : 핵의 융합 후 120시간에 배반포기의 제1, 제2 및 제3 세대 핵이식수정란을 Hoechst 33342로서 핵염색을 하

여 핵의 수를 조사함으로써 핵이식 배의 체외발달 능력을 비교검토하였던 결과는 Table 3에 나타난 바와 같다.

제1, 제2 및 제3 세대 핵이식수정란을 120 시간동안 배양으로 할구의 수가 187, 93 및 81개로 제2, 제 3세대 핵이식수정란에서 제1 세대 핵이식수정란보다 약 1회의 세포주기가 지연되어 할구의 수에서 유의적인 차이를 나타내었으며 핵이식수정란의 평균 세포분열주기는 각각 7.55, 6.55 및 6.35회이었다. 제1 세대 핵이식수정란에서 Stice와 Robl¹⁹은 토끼의 8-세포기 수정란의 할구를 이용하여 핵이식 한 다음 120시간 배양하였을 때 세포의 수는 91±10.2개 였다고 하였는데, 본 실험에서는 세포수는 187.9±26.3개로 보다 빠른 분할이 일어났다. 노 등²⁶은 회수된 1- 또는 2-세포기의 토끼 수정란을 토끼난관상피세포와 같이 M-199 배양액에서 72시간 배양하였던 바 핵의 수가 216.0±33.6개 이었다고 한다. 본 실험에서는 제1 세대 핵이식수정란을 120시간 공배양하였더니 핵의 수는 187개로 다소 정상 수정란보다 발달이 지연되었고 더욱이 제2 및 제 3세대 핵이식수정란의 체외발달은 제1 세대 및 정상 수정란보다 더욱 늦어짐을 관찰하였다. Yang 등²⁴이 체외배양하지 않은 수정란과 20시간 동안 체외배양한 수정란 그리고 핵이식수정란의 산자로서의 생산율은 41, 20 및 8 %를 보였다고 하였는데, 이러한

것은 체내의 조건과 부적당한 체외배양의 조건 때문에 발달지연이 나타나는 것을 알 수 있다. 또한 핵이식시 난자와 할구에게 물리적 손상을 주는 것으로 사려되며, Northey 등¹⁴은 소에서 수정전에 난자 세포질의 제거는 할구수의 감소를 가져 온다고 보고하였다.

Fisher¹⁵는 체외배양한 수정란의 단백질 합성량의 측정으로 발달능력을 조사한 결과 체내에서 자란 수정란보다 발달이 지연되는 것을 알아 내었고, Schumacher 등¹⁶과 Bedford 등²은 토끼의 수정란에서 가시광선은 DNA의 손상을 주고 25 °C의 실온에 노출되었을 때 세포내 기관의 이동과 세포골격에 손상을 주어 발달이 지연된다는 것을 보고하였다. 그러나 소에서는 Stice 등²⁰은 세대가 진행되어도 핵이식수정란의 할구수에 있어서 차이를 나타내지 않았다고 한다.

또한, Fig 1에서 보는 바와 같이 토끼는 다른 동물보다 짧은 세포주기를 가지므로 120시간 동안의 배양으로 할구수가 더 많이 증가된다. 본 실험에서 핵이식수정란은 120 시간동안 체외배양으로 핵이식시 손상된 투명대 부분으로 부화하는 경우가 많았다.

본 실험에서 토끼에서도 반복핵이식기법으로 제3 세대까지 복제수정란의 작출이 가능함을 입증하였다. 그러나 복제수정란의 생산효율은 제1 및 제2 세대에 비하여 유의적으로 낮았다. 앞으로 반복핵이식기법의 실용화를 위하여는 복제수정란 및 복제동물의 생산효율을 향상시키는 것이 매우 중요하다. 그러기 위하여는 특히, 1) 미세조작기술의 향상, 2) 세포융합기술의 개선, 3) 복제수정란의 체외배양체계의 향상, 4) 공핵수정란과 수핵난자의 세포주기 조절과 핵의 완전한 reprogramming 및 5) 복제수정란의 체내이식후 수태을 향상을 위한 핵이식수정란과 수란측 생식기관과의 동기화(synchronization) 등에 관하여 많은 검토와 연구가 수행되어야 할 것으로 본다.

본 실험에서 토끼에서도 반복핵이식기법으로 제3 세대까지 복제수정란의 작출이 가능함을 입증하였다. 그러나 복제수정란의 생산효율은 제1 및 제2 세대에 비하여 유의적으로 낮았다. 앞으로 반복핵이식기법의 실용화를 위하여는 복제수정란 및 복제동물의 생산효율을 향상시키는 것이 매우 중요하다. 그러기 위하여는 특히, 1) 미세조작기술의 향상, 2) 세포융합기술의 개선, 3) 복제수정란의 체외배양체계의 향상, 4) 공핵수정란과 수핵난자의 세포주기 조절과 핵의 완전한 reprogramming 및 5) 복제수정란의 체내이식후 수태을 향상을 위한 핵이식수정란과 수란측 생식기관과의 동기화(synchronization) 등에 관하여 많은 검토와 연구가 수행되어야 할 것으로 본다.



Fig 1. Blastocyst stage NT rabbit embryos from the first(A), second(B) and third(C) generation cloning ($\times 100$). The embryos show a hatching-like extrusion of partial cell mass through the punctured portion of zona pellucida caused by micromanipulation.

본 연구는 반복핵이식으로 다세대 복제수정란을 작출하고, 또한 이들의 세대간 생산효율을 조사하기 위하여 제1, 제2 및 제3 세대 복제수정란의 세포융합을 및 체외발달능력을 조사하였다. 과배란시킨 토끼의 난관으로부터 16-세포기의 수정란을 채관하여 colcemid와 aphidicolin으로 할구의 세포주기를 G1/S 기로 조절한 32-세포기의 할구세포를 분리하여 제1 세대의 공핵란으로 사용하였다. 제1 및 제2 세대 핵이식 후 16-세포기로 자란 수정란의 할구세포를 분리하여 제2 및 제3 세대 핵이식의 공핵란으로 사용하였다. 이들 분리된 할구세포를 제1극체와 핵을 제거한 난자의 위관막강에 미세조작으로 주입하였다. 할구세포가 주입된 난자는 hCG 주사로 부터 20시간에 직류전류로서 1.25 kV/cm, 60 μ sec를 3회 반복 통전하였던 바, 제1, 제2 및 제3 세대 할구세포는 각각 78.0, 88.6 및 90.3%의 융합율을 보여 유의적인 차이를 나타내지 아니하였다. 이들 융합된 핵이식 난자는 10% FCS가 함유된 M-199 배양액에서 토끼 난관 상피세포층과 같이 5% CO₂, 39 °C 배양기에서 120시간 공배양 하였던 바, 이들의 배반포 형성율은 제1, 제2 및 제3 세대 핵이식 수정란에서 각각 53.1, 16.1 및 7.2%를 보였다. 그리고 이들 배반포를 Hoechst 33342로서 핵염색을 실시하여 보았던 바 제1, 제2 및 제3 세대 핵이식수정란의 할구수는 187.9, 93.8 및 81.5개로서 유의적인 차이를 보였으며, 또한 배양기간에 제1, 제2 및 제3 세대 핵이식수정란에서 평균 세포분열주기 회수는 각각 7.55, 6.55 및 6.35회로 제2 및 제3 세대 핵이식수정란에서 120시간의 체외배양기간 동안에 약 1회 정도의 세포분열주기가 지연되었다. 이상의 결과로 부터 토끼에서도 반복핵이식기법의 활용으로 다세대 복제수정란의 작출이 가능함을 확인하였다. 그러나 토끼에서는 제2 및 제3 세대 핵이식수정란이 제1 세대 핵이식수정란보다 체외발달 능력면에서는 차이가 있음이 확인되었다.

본 연구를 수행하는데 있어서 많은 노력과 시간을 할애하여준 노규진, 강태영, 이경미, 김윤연 대학원 학생들에게 깊은 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Barnes FL, Robl JM, First NL. Nuclear transplantation in mouse embryos : Assessment of nuclear function. *Biol Reprod* 1987; 36: 1267-1274.
2. Barnes F, Collas P, Powell R, King WA, Westhusin M, Shepherd D. Influence of recipient oocyte cell cycle stage on DNA synthesis, Nuclear envelop breakdown, chromosome constitution and development in nuclear transplant bovine embryos. *Mol Reprod Develop* 1993; 36: 33-41.
3. Bedford JM, Dobrenis A. Light exposure of oocytes and pregnancy rates after their transfer in the rabbit. *J Reprod Fert* 1989; 85: 477-481.
4. Bondioli KR, Westhusin ME, Loomey CR. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenology* 1990; 33: 165-174.
5. Collas P, Robl JM. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. *Biol Reprod* 1990; 43: 877-884.
6. Collas P, Robl JM. Relation between nuclear remodeling and development in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod* 1991; 45: 455-465.
7. Collas P, Balise JJ, Robl JM. Influence of cell stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod* 1992; 46: 492-500.
8. Collas P, Pinto-Correia C, Ponce De Lean PA, Robl JM. Effect of donor cell stage on

- chromatin and spindle morphology in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod* 1992; 46: 501-511.
9. Cotton RW, Manes C, Hamkalo BA. Electron microscopic analysis of RNA transcription preimplantation rabbit embryos. *Chromosoma* 1980; 79: 169-178.
 10. Fischer B. Development retardation in cultured preimplantation rabbit embryos. *J Reprod Fert* 1987; 79: 115-123.
 11. Fischer B, Jung T, Helgele-Hartung C, Beier HM. Development of preimplantation rabbit embryos in uterine flushing - supplemented culture media. *Mol Reprod Develop* 1990; 27: 216-223.
 12. Kato Y, Tsunoda Y. Totipotency and pluripotency of embryonic nuclei in the mouse. *Mol Reprod Develop* 1993; 36: 276-278.
 13. McGrath J, Solter D. Nuclear transplantation of rat embryos. *J Exp Zool* 1993; 248: 303-305.
 14. Northey DL, Nuttleman PR, Rosenkrans CF. Removal of bovine oocyte cytoplasm prior to fertilization reduces cell numbers in embryos. *Biol Reprod* 1991: 156.
 15. Pinto-correia C, Collas P, Ponce De Leon FA, Robl JM. Chromatin and microtubule organization in the first cell cycle in rabbit parthenotes and nuclear transplant embryos. *Mol Reprod Dev* 1993; 34: 33-42.
 16. Pinto-correia C, Long CR, Chang T, Robl JM. Factors involved in nuclear reprogramming during early development in the rabbit. *Mol Reprod Dev* 1995; 40: 292-304.
 17. Pursel VG, Wall RJ, Rexroad Jr. CE, Hammer RE, Brinster RL. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenology* 1985; 24: 687-691.
 18. Schumacher A and Fischer B. Influence of visible light and room temperature on cell proliferation in preimplantation rabbit embryos. *J Reprod Fert* 1988; 84: 197-204.
 19. Stice SL, Robl JM. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod* 1988; 39: 657-664.
 20. Stice SL, Keefer CL, Maki-Laurila M, Phillips PE. Producing multiple generations of bovine nuclear transplant embryos. *Theriogenology* 1991; 35: 273.
 21. Stice SL, Keefer CL. Multiple generational bovine embryo cloning. *Biol Reprod* 1993; 48: 715-719.
 22. Westhusin ME, Pryor JH, Bondioli KR. Nuclear transfer in the bovine embryo: A comparison of 5-day, 6-day, frozen-thawed, and nuclear transfer donor embryos. *Mol Reprod Develop* 1991; 28: 119-123.
 23. Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 1986; 320: 63-65.
 24. Yang X, Jiang S, Kovacs A, Foote RH. Nuclear totipotency of cultured rabbit morulae to support full-term development following nuclear transplant. *Biol Reprod* 1992; 47: 636-643.
 25. Yang X, Zhang L, Kovacs A, Tobback C, Foote RH. 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* 1990; 27: 118-129.
 26. 노규진, 이효종, 송상현, 윤희준, 박충생. 수정란의 체외발달에 미치는 배양액 및 소와 토끼의 난관상피세포들과의 공배양 효과. *한국축번식학회지* 1994; 18(1): 39-46.
 27. 박충생, 전병균, 이효종, 최민철, 최상용. 토끼에서 공핵란의 발달단계가 할구주입, 전기융합 및 핵이식수정란의 체외발달에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지* 1994; 9(2): 153-160.
 28. 박충생, 최상용, 이효종, 박희성, 박성재. 생

- 쥐 수정란의 핵이식에 관한 연구 Ⅲ. 제2세대 핵이식에 의한 복제생쥐의 생산. 한국수정란이식학회지 1993; 8(1): 9-12.
29. 박충생, 최상용, 이효종, 최민철, 정미경, 박준규. 제2세대 핵이식에 의한 복제배의 체외 발달에 관한 연구. 한국수정란이식학회지 1993; 8(2): 159-163.
30. 이효종, 전병균, 박충생, 최상용, 윤창현, 강대진. 반복핵이식에 의한 복제동물 생산에 관한 연구. Ⅱ. 토끼에서 공핵배의 세포주기 조절에 의한 제2세대 복제배의 생산효율 개선. 한국수정란이식학회지 1995; (인쇄중).
31. 이효종, 최민철, 최상용, 박충생, 윤창현, 강대진. 반복핵이식에 의한 복제동물 생산에 관한 연구. Ⅰ. 토끼 수핵난자의 전기자극에 의한 활성화. 한국수정란이식학회지 1993; 8(2): 151-154.
-