

토끼에서 수핵란의 세포질 활성화에 의한 제 2세대 복제수정란의 생산¹

이효종 · 윤희준 · 최창용 · 공일근* · 박충생* · 최상용
경상대학교 수의과대학, 축산진흥연구소

Production of Second Generational Cloning Embryos with Activated Oocytes in Rabbits¹

H. J. Lee, X. J. Yin, C. Y. Choe, I. K. Kong*, C. S. Park* and S. Y. Choe

College of Veterinary Medicine, Institute for Development of Livestock Production,
Gyeongsang National University

SUMMARY

Large scale production of cloned embryos requires the technology of multiple generational nuclear transfer(NT) by using NT embryos itself as the subsequent donor nuclei. In this work we investigated comparatively the effects of enucleated oocytes treated with ionomycin and 6-DMAP on the electrofusion rate and *in vitro* developmental potential in the first and second NT embryos.

The embryos of 16-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 47 hours after hCG injection. The recipient cytoplasm were obtained by removing the nucleus and the first polar body from the oocytes collected at 15 hours after hCG injection. The enucleated oocytes were pre-activated by 5 min incubation in 5 μ M ionomycin and 2 hours incubation in 2 mM 6-DMAP at 19~20 hours post-hCG before microinjection.

In the first and second generation NT, the unsynchronized 16-cell stage embryos were used as nuclear donor. The separated donor blastomeres were injected into the enucleated activated recipient oocytes by micromanipulation and were electrofused by electrical stimulation of single pulse for 60 μ sec at 1.25 kV/cm in Ca²⁺, Mg²⁺ - free 0.28 M mannitol solution. In the non-preactivation group, the electrofusion and electrical stimulation was given 3 pulses for 60 μ sec at 1.25 kV/cm in 100 μ M Ca²⁺, Mg²⁺ 0.28 M mannitol solution. The fused oocytes were co-cultured with a monolayer of rabbit oviductal epithelial cells in TCM-199 solution containing 10% FCS for 120 hours at 39°C in a 5% CO₂ incubator. The results obtained were summarized as follows:

1. In the first generational NT embryos, the electrofusion rate of preactivated and

¹ 이 논문은 1992~1995년도 한국과학재단에서 지원한 특정기초연구지원사업비로 연구되었음(KOSEF: 92-24-00-10).

* 경상대학교 농과대학 축산학과(Department of Animal Science, College of Agriculture, Gyeongsang National University)

non-activated oocytes(80.4 and 87.8%) was not significantly different, but in the second generational NT embryos, the electrofusion rate was significantly($P<0.05$) higher in the non-activated oocytes(85.7%) than in the preactivated oocytes(70.1%).

- 2) In the first and second generational NT embryos, the developmental potential to blastocyst stage was significantly($P<0.05$) higher in the preactivated oocytes(39.3 and 35.7%) than in the non-preactivated oocytes(16.0 and 13.3%). No significant difference in the developmental potential was shown between the first and second generational NT embryos derived from the preactivated oocytes.

In conclusion, it may be efficient to use the oocytes preactivated with ionomycin and 6-DMAP for the multiple production of cloned embryos by recycling nuclear transfer.

(Key words : nuclear transfer, second generation cloning, ionomycin, 6-DMAP, rabbit embryo)

서 론

가축에서 핵이식은 Willadsen(1986)이 면양에서 산자를 보고한 이래 지난 10여년 동안 발전을 거듭하여 오늘날 계대배양한 stem cell에서나(Campbell 등, 1996), 체세포인 유선세포핵을 이용하여(Wilmut 등, 1997) 복제양을 생산하기에까지 이르렀다. 그러나 핵이식기술은 아직 효율이 낮은 상태이고, 후기배 즉 배반포(blastocyst)로의 발달을 뿐만 아니라 핵이식 수정란의 이식 후 산자의 생산 성공률도 낮은 실정이라서 산업적으로 응용할 수 있는 단계에는 도달하지 못하고 있다. 핵이식을 실시하는데 있어서 핵과 세포질 세포주기단계(cellcycle-stage)가 주요한 요소로 인식되고 있는데 토끼(Collas 등, 1992)와 생쥐(Cheong 등, 1993)의 경우, G1기의 핵을 MPF 농도가 높은 제 2감수분열중기(M II기) 난자의 탈핵세포질에 이식할 경우 배반포까지의 발달이 크게 향상되었다고 보고하고 있으나, Pinto-correia 등(1993)은 토끼에서 G1기의 핵을 이식시 높은 핵이식배의 발달에도 불구하고 극히 일부만이 임신중기에 이르렀다고 지적하고 있다. 반면에 소와 양의 수정란에서는 G1기가 극히 짧고 또 할구의 80% 이상이 DNA 합성기인 S기에 머물러 있음이 판명됨에 따라 할구핵의 세포주기 동기화보다는 전기융합전 수핵란의 활성화를 유도함으로써 MPF에 의한 핵막 붕괴(NEBD), 염색체의 조기 농축(PCC) 등을 피하는 핵이식 방법이 보고되고 있다(Barnes 등, 1993; Campbell 등, 1994

). 최근에는 난자의 활성화 방법에 있어서 전기자극 대신 ionomycin과 단백질 효소억제제인 6-DMAP을 사용함으로써 핵이식 수정란의 높은 발달율과 임신율을 보고하고 있어 주목되고 있다(Peura 등, 1997; Lewis 등, 1997; Loi 등, 1997; Lavoit 등, 1997a ; Lavoit 등, 1997b).

본 실험에서는 탈핵된 토끼의 난자를 ionomycin 및 6-DMAP 처리로 활성화시킨 다음 반복핵이식에서 수핵난자로 사용하였을 때, 이들의 핵융합율과 체외발생능을 조사함으로써 제 1 및 제 2세대 복제수정란의 작출효능에 미치는 영향을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물 및 사양관리

본 실험에 사용된 공시동물은 New-Zealand White종의 성숙된 토끼로서 연암원예측산전문대학으로부터 공급받았으며 사용 전에 분리 사육하였고 물과 사료는 자유로이 급식하였다.

2. 수핵난자의 확보

핵을 수여받을 난자의 확보를 위한 과배란 유기는 성숙한 암토끼를 10 mg의 FSH(Folltropin[®], Australia)를 하루에 한번씩 3일간 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 난

관으로부터 성숙난자를 10% FCS가 함유된 D-PBS로 회수하였다. 회수된 난자는 300 IU/ml의 hyaluronidase(Sigma Chem. Co., U.S.A.)에서 39°C, 5% CO₂ 조건에서 7분간 배양한 다음, 150 μm fire-polished pipette으로 난구세포를 제거하여 제 1극체가 명확하고 세포질이 충실한 것만을 사용하였다.

3. 공핵수정란의 확보

핵을 수핵난자에 공급할 수정란의 과배란 유기는 전항 2와 같이 과배란을 유기한 다음 성숙된 수토끼와 교미시켰다. 16-세포기에 있는 수정란은 hCG 주사 후 47시간째에 채란하였다. 수정란은 0.5%의 pronase(Sigma Chem. Co., U.S.A.)에서 8분간 배양한 다음 150 μm 정도의 pipette으로 투명대를 제거하고 이들을 다시 50 μm 정도의 pipette으로 Ca²⁺와 Mg²⁺ 없는 PBS에서 할구를 분리하였다. 또한 제 2세대 핵이식을 위한 공핵란은 제 1세대 핵이식으로 발생한 8-세포기의 핵이식 수정란을 사용하였다. 제 1세대 핵이식 수정란은 0.5%의 pronase에 2-분간 처리한 다음 앞의 기술과 같이 할구를 분리하여 미세조작에 사용하였다.

4. 수핵란의 탈핵 및 활성화

수핵난자와 공핵수정란으로부터 분리된 할구세포를 7.5 μg/ml cytochalasin B(Sigma Chem. Co., U.S.A.), 0.1 μg/ml aphidicolin(Sigma Chem. Co., U.S.A.) 그리고 10% FCS가 함유된 Earl's balanced salt solution(EBSS, Sigma Chem. Co., U.S.A.)에서 미세조작 15분 전에 전처리를 하였고, 미세조작을 위하여 micromanipulators(Narishige Co., Japan)를 DIC 도립현미경(Nikon Co., Japan)위에 장치하였다. 미세조작은 7.5 μg/ml cytochalasin B, 0.1 μg/ml aphidicolin 그리고 10% FCS가 함유된 EBSS에서 실시하였고, 탈핵은 McGrath와 Solter(1983)의 non-destructive 조작법에 의하여 실시하였다. 즉, 성숙된 난자로부터 핵을 제거하기 위하여 외경 30 μm의 연마된 미세 pipette을 투명대 내로 진입시키고 제 1극체와 그 주위에 위치하는 핵을 원형질막에 싸여진 채로 흡입하여 제거하였다. 탈핵된 난자는 직접 할구를

주입하거나(non-preactivation group), hCG 19시간째에 5 μM의 ionomycin(Sigma Chem. Co., U.S.A.)에서 5분간 침지한 후 2.0 mM의 6-DMAP에서 2시간 활성화처리하였다(activation group). 활성화 처리 후 제 2극체를 방출하지 않은 미수정란을 탈핵란으로 판단하여 수핵란 세포질로 공시하였다.

5. 핵주입 및 융합

공핵수정란으로부터 분리된 할구세포 하나를 미세 pipette에 흡입하고 이를 미세조작으로 탈핵된 수핵난자의 원형질 바깥 위관막강에 주입하였다. 핵이 주입된 난자는 0.1 μg/ml aphidicolin이 포함된 TCM-199액(Sigma Chem. Co.,)에서 미세조작 후 핵의 융합 때까지 배양하였다.

핵이 주입된 난자는 이 등(1993)의 방법에 따라 핵융합을 실시하였다. 전기자극은 전압은 1.25 kV/cm, 통전시간은 60 μsec 및 통전횟수는 3회로 정하였다. 융합과 난자의 활성화를 위한 용액은 100 μM Ca²⁺, 100 μM Mg²⁺이 함유되지 않은 0.28 M mannitol 용액으로 할구가 이식된 난자를 이 용액으로 세척한 electrode chamber에 융합용액을 넣고 핵이식란을 옮겨 정렬시킨 후 Electro Cell Manipulator 200(BTX, Inc., U.S.A.)로 핵의 융합을 유도하였다. Preactivation group의 난자는 전과 같은 전기자극으로 1회만 실시하였다. 세포질과 핵의 융합이 확인된 난자는 7.5 μg/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 평균간 차이에 대한 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 난자의 활성화 처리가 제 1세대 핵이식 수정란의 핵융합 효과와 체외발달 능력

hCG 투여 후 15~16시간에 탈핵하고 핵이식한

Table 1. Effect of preactivation of enucleated oocytes treated with ionomycin and 6-DMAP on electrofusion and *in vitro* development of the first generational NT rabbit embryos

Treatments	No. of oocytes used	No. of embryos fused(%)	No. of embryos cultured	No. of embryos developed to(%)		
				2-cell	Morula	Blastocyst
Preactivation	102	82(80.4) ^a	28	20(71.1) ^a	16(57.1) ^a	11(39.3) ^a
Non-preactivation	93	79(87.8) ^a	50	23(46.0) ^b	12(24.0) ^b	8(16.0) ^b

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

비활성화 처리군과 탈핵된 난자를 19~20시간째에 5 μ M의 ionomycin에서 5분간 침지한 후 2.0 mM의 6-DMAP에서 2시간 활성화 처리하여 할구를 주입한 활성화 처리군에서 제 1세대 핵이식시 이들의 핵융합율과 발달율을 조사한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다.

활성화 처리군과 비활성화 처리군과의 제 1세대 핵이식 수정란에서 각각 80.4 및 87.8%의 핵융합율을 보여 핵융합율에 있어서는 서로 유의적인 차이는 나타나지 않았다. Collas와 Robl(1991)은 8- 및 32-세포기 할구를 탈핵된 수핵난자에 핵이식한 다음 2.0 kV/cm 전압에서 60 μ sec간 30분 간격으로 6회 전기자극으로 핵융합을 일으켰던 바, 그 융합율이 모두 100%이었다. 이들은 본 실험에서의 1.25 kV/cm 전압보다 높은 전압을 주었고, 통전횟수도 1회보다 많은 회수를 응용하였다. 반복핵이식에 있어서 이 등(1995)은 제 1세대 핵이식의 32-세포기의 할구에서 79.4%의 융합율을 보고하였는데 본 실험도 비슷한 융합율을 나타내고 있다.

또한 활성화 처리군과 비활성화 처리군에서 핵이식 수정란의 2-세포기(71.1과 46.0%), 상실배(57.1과 24.0%) 및 배반포(39.3과 16.0%)까지의 발달율 사이에는 유의성 있는(P<0.05) 차이를 나타내었다. 제 1세대 핵이식 수정란의 발달율에서 공핵란의

세포분열 주기를 조절하여 DNA를 복제하기 전의 간기인 G1의 세포주기에 공핵란의 할구를 M II기 수핵란에 핵이식했을 경우 50% 이상 높은 배반포로의 발달율을 보고하고 있어(Collas 등, 1992; 이 등, 1995) 공핵란 세포주기를 조절하지 않거나 수핵란을 preactivation하여 사용한 본 실험에서보다 배반포 발달율에서 높은 성적이다. Campbell 등(1993)은 세포주기를 조절하지 않은 할구(G1, G2, S기)를 탈핵 후 활성화시켜 MPF를 떨어뜨린 수핵란에 핵이식시 배반포의 발달율을 향상시킬 수 있었고 이는 PCC(premature chromosome condensation)와 불규칙적인 DNA 합성(unscheduled DNA synthesis)에 의한 염색체의 손상과 비정상형의 발생을 감소시키는데 있다고 추정하고 있다.

2. 난자의 활성화 처리가 제 2세대 핵이식 수정란의 핵융합 효과와 체외발달 능력

hCG 투여 후 15~16시간째에 탈핵하고 핵이식한 비활성화군과 탈핵된 난자를 19~20시간째에 5 μ M의 ionomycin에서 5분간 침지한 후 2.0 mM의 6-DMAP에서 2시간 활성화 처리하여 할구를 주입한 활성화군의 제 2세대 핵이식시 이들의 핵융합율과 발달율을 조사한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같다.

Table 2. Effect of preactivation of enucleated oocytes treated with ionomycin and 6-DMAP on electrofusion and *in vitro* development of the second generation at NT rabbit embryos

Treatments	No. of oocytes used	No. of embryos fused(%)	No. of embryos cultured	No. of embryos developed to(%)		
				2-cell	Morula	Blastocyst
Preactivation	67	47(70.1) ^a	14	9(64.2) ^a	7(50.0) ^a	5(35.7) ^a
Non-preactivation	35	30(85.7) ^b	30	21(70.0) ^a	10(33.3) ^b	4(13.3) ^b

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

활성화군과 비활성화군의 제 2세대 핵이식 수정란에서 각각 70.1 및 85.7%의 핵융합율을 보여 유의성 있는($P < 0.05$) 차이를 보였으나, 세대간에는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 반복핵이식에 있어서 이 등(1995)은 제 1세대 핵이식에서 32-세포기의 할구에서 79.4%의 융합율을 보였고, 제 2세대 핵이식에서 16-세포기의 할구에서 91.5%의 융합율을 보고하였는데 비하여 본 실험에서는 낮게 나타났다. 이는 본 실험에서 전기자극을 한번만 주었기 때문인 것으로 사료된다.

소 반복 핵이식에서 Stice와 Keefer(1993)는 제 1, 2 및 3세대 핵이식 수정란의 융합율은 각각 66, 60 및 52%로 세대간에 융합율의 차이를 보인다고 보고하였으나, Westhusin 등(1991)은 유의적인 차이를 나타내지 않았다고 한다.

활성화군과 비활성화군의 제 2세대 핵이식 수정란에서 2-세포기의 발달율은 64.2와 70.0%를 나타내 유의적 차이를 보이지 않았지만, 상실배(50.0과 33.3%) 및 배반포(35.7과 13.3%)까지의 발달율에서는 유의적($P < 0.05$) 차이를 나타내었다. 토끼 반복핵이식에 있어서 이 등(1995)은 배반포 발달율에서 세대간에 유의성있는 차이를 보였다고 하였으나, Tan 등(1997)은 제 1 및 제 2세대 핵이식에서 배반포 형성율을 각각 32.2와 31.0%를 나타내어 본 실험과 유사한 결과를 보이고 있다. 소의 반복핵이식에서 Bondioli 등(1990), Westhusin 등(1991) 및 Stice와 Keefer(1993)은 핵이식 수정란의 체외발달은 세대간에 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, 산자의 생산율에 있어서는 제 1, 2 및 3세대 복제수정란에서 각각 10, 2, 및 3%로 각 세대간에 차이를 보였다고 한다.

적 요

본 연구는 반복 핵이식에 의한 복제 수정란의 생산에 있어서 ionomycin과 6-DMAP에 의해 활성화된 수핵란을 사용할 때 제 1 및 2세대 복제 수정란의 핵융합율 및 체외발달 능력을 조사하였다. 제 1세대 핵이식에서 활성화 처리된 난자와 비활성화된 난자는 각각 80.4 및 87.8%의 할구세포와의 융합율

을 보여 처리간에 유의적인 차이를 나타내지 않았지만, 제 2세대에서는 각각 70.1와 85.7%를 나타내어 활성화군과 비활성화군간에 유의적($P < 0.05$) 차이를 나타내었다. 이들 융합된 핵이식 난자는 10% FCS가 함유된 TCM-199 배양액에서 토끼 난관 상피세포층과 같이 공배양하였던 바, 활성화된 난자에서는 배반포 형성율은 제 1 및 제 2세대 핵이식 수정란에서 각각 39.3 및 35.7%를 보여 난자의 비활성화군과 유의적($P < 0.05$) 차이를 나타냈다. 이상의 결과로 토끼에서 hCG 주사로부터 15~16시간째에 난자를 채란하고 탈핵한 후 5 μ m ionomycin에서 5분간 처리한 다음 2 mM 6-DMAP에서 2시간 처리하여 활성화를 유도하고, 이들 활성화된 난자를 사용하여 반복 핵이식하여 복제 수정란의 작출이 향상되었음을 확인하였고, 이들의 체외발달 능력면에서도 활성화시키지 않은 난자를 사용할 때보다 우수함이 확인되었다.

참고문헌

- Barnes F, Collas P, Powell R, King WA, Westhusin M and Shepherd D. 1993. Influence of recipient oocyte cell cycle stage on DNA synthesis, nuclear envelope breakdown, chromosome constitution and development in nuclear transplant bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 36:33-41.
- Bondioli KR, Westhusin ME and Loomer CR. 1990. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenology*, 33:165-174.
- Campbell KHS, Mcwhir J, Ritchie WA and Wilmut I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 380:64-66.
- Campbell KHS, Loi P, Cappal P and Wilmut I. 1994. Improved development to blastocyst of ovine nuclear transfer embryos reconstructed during the presumptive S-phase of enucleated activated oocytes. *Biol. Rep-*

- rod., 50:1385-1395.
- Campbell KHS, Ritchie WA and Wilmut I. 1993. Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: implications for deoxyribonucleic acid replication and development. *Biol. Reprod.*, 49:933-942.
- Cheong HT, Takahash Y and Kanagawa H. 1993. Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. *Biol. Reprod.*, 48:958-963.
- 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.
- Lavoit 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.
- Lavoit 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- Pinto-correia C, Collas P, Ponce De. Leon FA and Robl JM. 1993. Chromatin and microtubule organization in the first cell cycle in rabbit parthenotes and nuclear transplant embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 34:33-42.
- Pinto-correia C, Long CR, Chang T and Robl JM. 1995. Factors involved in nuclear reprogramming during early development in the rabbit. *Mol. Reprod. Dev.*, 40:292-304.
- Stice SL, Keefer CL, Maki-Laurila M and Phillips PE. 1991. Producing multiple generations of bovine nuclear transplant embryos. *Theriogenology*, 35:273(Abstract).
- Stice SL and Keefer CL. 1993. Multiple generational bovine embryo cloning. *Biol. Reprod.*, 48:715-719.
- Tan JH, Zhou Q, Li ZY, Sun XS, Liu ZH and He GX. 1997. Embryo cloning by nuclear transplantation in rabbits. *Theriogenology*, 47:237(Abstract).
- Westhusin ME, Pryor JH and Bondioli KR. 1991. Nuclear transfer in the bovine embryo: A comparison of 5-day, 6-day, frozen-thawed, and nuclear transfer donor embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 28:119-123.
- 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.
- 이효종, 전병균, 박충생, 최상용, 윤창현, 강대진. 1995. 반복핵이식에 의한 복제동물 생산에 관한 연구. II. 토끼에서 공핵배의 세포주기조절에 의한 제 2세대 복제배의 생산효율개선. *한국수정란이식학회지*, 10(1):73-82.
- 이효종, 최민철, 최상용, 박충생, 윤창현, 강대진.

1993. 반복핵이식에 의한 복제동물 생산에 관한 연구. I. 토끼 수핵난자의 전기자극에 의한 활성화. 한국수정란이식학회지, 8(2):151-154.

(접수일자: 1997. 7. 28 / 채택일자: 1997. 8. 19)