

토끼에서 공핵란의 세포주기 조절과 수핵란의 세포질 상태에 따른 핵이식 수정란의 체외 발달과 복제동물의 생산¹⁾

박충생 · 전병균 · 하란조 · 윤희준* · 광대오** · 이효종* · 최상용*

경상대학교 농과대학 축산학과

Production of Cloned Embryos and Animals following Regulation of Cell Cycle of Donor Nucleus and Type of Recipient Cytoplasm

C. S. Park, B. G. Jeon, R. J. Ha, H. J. Yun, D. O. Kwack**, H. J. Lee* and S. Y. Choe*

Department of Animal Science, College of Agriculture, Gyeongsang National University

SUMMARY

To improve the efficiency of production of cloned embryos and animals by nuclear transplantation in the rabbit, the effect of cell cycle of donor nuclei and type of recipient cytoplasm on the *in vitro* developmental potential and production efficiency of offspring was determined. The embryos of 16-cell stage were collected from the mated does at 48h post-hCG injection and they were synchronized to G₁ phase of 32-cell stage. The oocytes collected at 14h post-hCG injection were freed from cumulus cells and then enucleated. One group of the enucleated cytoplasm was activated by electrical stimulation prior to injection of donor nucleus, and the other group was not pre-activated. The separated G₁ phase blastomeres of 32-cell stage embryos were injected into the perivitelline space of recipient cytoplasm. After culture for 20h post-hCG injection, the nuclear transplant oocytes were electrofused and activated by electrical stimulation and the fused nuclear transplant embryos were co-cultured for 120h and the nuclear transplant embryos developed to blastocyst stage were stained with Hoechst 33342 dye and their blastomeres were counted. Some of the nuclear transplant embryos developed *in vitro* to 2- to 4-cell stage were transferred into the oviducts of synchronized recipient does.

The electrofusion rate was similar between the types of donor nuclei and recipient cytoplasm used. However, the nuclear transplant embryos using G₁ phase donor nuclei were developed to blastocyst at higher rate(60.3%) than those using S phase ones(24.7%). Also, when non-preactivated oocytes were used as recipient cytoplasm, the developmental rates of nuclear transplant embryos to blastocysts were significantly(P<0.05) higher(57.1%) than those using preactivated ones(20.8%).

The cell counts of nuclear transplant embryos developed to blastocyst stage were

1) 본 연구는 교육부에서 1996년도에 지원한 유전공학 학술연구조성비로 수행되었음.

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

** 경상대학교 과학교육과(Department of Science Education, Gyeongsang National University).

increased significantly($P < 0.05$) more in the non-preactivated recipient cytoplasm(163.7 cells), as compared with the preactivated recipient cytoplasm(85.4 cells). A total of 49 nuclear transplant embryos were transferred into 5 recipient does, of which two offsprings were produced from a foster mother 31 days after embryo transfer.

These results showed that the blastomeres of G₁ phase and non-preactivated oocytes might be utilized efficiently as donor nuclei and recipient cytoplasm in the nuclear transplant procedure, though the offspring production remained still low.

(Key words : nuclear tsansplant, cell cycle, pre-activation, rabbit)

서 론

핵이식 후 주입된 핵과 수핵란 세포질의 상호작용은 많은 연구자들에게 오랫동안 흥미를 불러일으켰다. 일반적으로 체세포뿐만 아니라 난자와 수정란에서도 간기와 분열기의 전이는 maturation promoting factor(MPF)라 불리는 물질에 의해서 유도된다(Gerhart 등, 1984 ; Christmann 등, 1994). 제 2감수분열의 중기에 정지하고 있는 성숙된 난자 역시 높은 수준의 MPF가 존재하고, 이러한 MPF에 의하여 성숙한 난자내로 할구를 융합하였을 경우 할구의 핵은 nuclear envelope breakdown, prematurely chromosome condensation, nucleoli의 분산, 핵막의 재형성 및 pronucleus의 형성, nuclear swelling 등의 nuclear remodeling이 순서적으로 일어난다(Murray와 Kirschner, 1989; Collas 등, 1992a; Campbell 등, 1993). 정상적인 수정의 과정에서도 수정된 난자는 2-세포기로 분열하기 전 양성 전핵의 단계에서 DNA는 복제되어야만 한다. 만약 DNA 복제에 실패하거나 한번 더 복제를 하게 된다면 염색체의 배수성이 비정상적으로 될 것이다. 핵이식 수정란 역시 전핵 단계에서 DNA를 복제해야 한다. 이 때 만약 공핵란의 할구가 DNA를 복제하고 있는 단계인 S기 이거나, DNA를 복제하고 난 다음 G₂기에 융합되었다면, 핵이식 수정란은 전핵 단계에서 다시 한번 더 DNA를 복제하게 될 것이고, 이러한 핵이식 수정란은 정상보다 더 많은 DNA를 가지게 될 것이다. 그러므로 성숙된 M II 난자에 융합하는 공핵란 할구 세포의 세포주기는 핵이식 수정란의 핵형을 유지하게 하고 핵이식 수정란의 발달에 많은 영향을 미치게 되므로 공핵란

할구의 세포주기는 매우 중요한 요인이다(Collas 등, 1992a, 1992b; Kono 등, 1992; Cheong 등, 1993). 또한, 이러한 핵이식 수정란에서 다른 세포주기의 공핵란과 비교하여 방추사의 구조, 염색체의 구성, centrioles, 핵이식 수정란의 체외 발달에 대해 세포학적인 연구로 증명을 하였다(Collas 등, 1992b; Pinto-Correia 등, 1993; Pinto-Correia 등, 1995). Banes 등(1993)도 역시 S기의 할구를 성숙된 M II 난자를 수핵란으로 사용하여 핵이식 수정란을 생산하였을 때 핵막의 소실, 염색체의 응축 등의 핵 재구성 과정에서 염색체의 이상이 많은 것을 보고하였다. 이에, 정상적인 핵형을 가진 핵이식 수정란을 생산하는 다른 방법으로 융합된 핵의 핵막 유지는 중대한 문제이라고 보고하였다(Campbell 등, 1993, 1994). 성숙된 M II 난자를 인위적인 활성화 자극으로 난자가 활성화가 되고 나면 난자내 높은 수준의 MPF는 차츰 감소하게 된다 (Powell과 Barnes, 1992). 이때의 수핵란에 융합된 할구들은 핵막의 소실, 염색체의 응축이나 핵의 팽화 핵의 재구성 과정이 생기지 않을 것이지만, 할구의 핵은 핵막을 그대로 유지하여 정상적인 핵형을 가지는 핵이식 수정란을 생산할 수 있다.

그러나 핵이식 수정란의 체외발달에 영향을 미치는 중요한 요소로는 주입된 핵의 reprogramming이다. 난자내로 주입된 nuclear remodeling은 핵이식된 수정란이 새로운 발달의 순서를 위한 핵이식 수정란의 reprogramming이라고 하였다(Stice와 Robl, 1988; Collas와 Robl, 1991, Collas 등, 1992a). DiBerardino (1987), Modlinski와 Smorag (1991) 및 Barnes 등 (1987)는 공핵란의 분화로 인하여 핵의 비가역적인 변화로 인한 유전자 발현의 부족과 부적당한 reprogramming은 수정란의 발달에 장애

를 준다고 한다. 또한, Latham 등 (1994)은 생쥐에서 전핵 단계의 수핵란과 8-세포기를 융합하여 생성된 단백질을 분석하였을 때 핵이식 수정란의 발달 정지 현상이 생기는 것은 공핵란 핵의 reprogramming의 부족으로 인한 유전자의 재활성화가 일어나는데 실패했기 때문이라고 보고하였다. 수핵란의 측면에서 성숙한 M II 난자내로 융합된 핵은 전핵 단계의 수핵란보다 핵의 재구성에 의하여 좀 더 기능적인 전핵으로 염색질을 변화시킨다고 하며 (DiBerardino, 1992), 전핵 단계의 수정란보다 성숙된 M II 난자가 reprogramming 능력이 우수하다고 보고하였다 (Smith와 Wilmut, 1989).

이에 본 연구는 토끼를 사용하여서 세포주기를 조절한 32-세포기의 G₁기 할구를 공핵란으로 사용하며 전기적 방법으로 탈핵한 난자를 활성화 시킨 다음 이들 난자를 수핵란으로 사용하여, 공핵란의 세포주기 조절과 수핵란의 상태에 따른 핵이식 수정란의 체외 발달율과 산자의 생산 효율을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 공시 동물

본 실험에 사용된 공시 동물은 New-Zealand White 종의 성숙된 토끼로서 연암원예축산전문대학으로부터 공급받았으며 사용 전에 분리 사육하였고 물과 사료는 자유로이 급식하였다.

2. 수핵란의 준비

핵을 수여받을 토끼의 과배란 유기는 박 등 (1996)의 기술에 따라 토끼를 과배란처리한 다음, 난관으로부터 난자를 회수하고 난구세포를 제거하여, 제 1극체가 명확하고 세포질이 균일하며 충실한 것만 수핵란으로 사용하였다. 이러한 수핵란의 미세조작으로 탈핵한 다음 일부는 바로 수핵란으로 사용하였고, 일부는 전기적 방법에 의해 난자의 활성화를 유도하였다.

3. 공핵란의 준비 및 세포주기 조절

핵을 공급할 수정란은 박 등(1996)의 기술에 따라 토끼의 과배란 처리한 다음, 채란된 16-세포기의

수정란은 Collas와 Robl(1992a)의 방법을 따라 세포분열 완성 후 32-세포기의 G₁기로 동기화된 할구를 공핵란으로 사용하였다.

4. 미세조작, 세포 융합 및 난자의 활성화

수핵란의 탈핵을 위한 미세조작은 Stice와 Robl (1988) 및 박 등(1996)의 방법에 따라 실시하였으며, 난자와 할구의 융합 및 난자의 활성화는 Robl 등(1987) 및 박 등(1996)의 방법에 따라 hCG 주입 후 20시간에 전기자극으로 유도하였다.

5. 핵이식 수정란의 체외배양 및 체내이식

난자의 세포질과 할구의 융합이 확인된 난자는 7.5 µg/ml의 cytochalasin B와 10% FCS가 함유된 M-199 배양액에서 1시간 동안 배양한 다음, 4-well dish에 10% FCS가 포함된 M-199 배양액(Earle's salt, SIGMA Co., U.S.A.)에 옮겨 monolayer가 형성된 토끼 난관상피세포와 같이 39°C의 5% CO₂ 배양기내에서 120시간 공배양하였다. 배양액은 48시간마다 신선한 배양액으로 교환하였으며, 모든 기본 배양액은 배양하기 12시간에서 24시간 전에 배양기내에서 pH의 평형을 유도하여 사용하였다. 세포 융합 후 120시간째에 배반포로 발달한 핵이식 수정란의 할구수를 세기 위하여 Pursel 등(1985)의 방법에 따라 형광 염색하였다.

또한, 핵이식 수정란의 체내이식은 핵융합 후 18시간에 2~4-세포기 단계로 발달한 수정란을 발정 동기화된 토끼의 난관으로 이식하였다. 수란토의 발정동기화는 이식 24시간 전에 자연발정이 온 토끼를 골라 정관 결찰된 수토끼와 교미자극을 주었고, 100 IU의 hCG를 주사하였다.

6. 통계학적 분석

실험 결과의 통계학적 분석은 Microsta computer statistical program package를 사용하여 발달율은 Chi-square test를 실시하였고, 할구수는 Student T-test를 실시하여 처리군 간의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 공핵란의 세포주기가 체외발달율에 미치는 영향

공핵란의 세포주기를 S 혹은 G₁기로 조절한 다음 이들 할구를 탈핵한 난자의 위란강에 주입한 다음 이들의 융합율 및 120시간 체외배양하였을 때 체외 발달율을 조사한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다.

32-세포기의 S기 및 G₁기 할구를 공핵란으로 사용한 핵이식 수정란에서 각각 81.7 및 78.2%의 세포융합율을 보여 세포융합율에 있어서는 서로 유의적인 차이는 나타내지 않았다.

S 및 G₁기 할구를 공핵란으로 사용한 핵이식 수정란에서 배반포로의 발달율은 각각 24.7 및 60.3%를 보여, S기 할구를 공핵란으로 사용한 핵이식 수정란보다 G₁기 할구를 공핵란으로 사용한 핵이식 수정란에서 유의적인(P<0.05) 발달율 증가를 나타내어, 공핵란의 세포분열 주기를 조절한 Collas 등 (1992a)의 결과와 비슷한 결과를 보이고 있다.

2. 수핵란의 상태가 체외발달율에 미치는 영향

32-세포기의 G₁기 할구를 공핵란으로 사용하고 non-preactivated 및 preactivated 난자를 수핵란으로 사용하여 핵이식을 실시한 이들의 융합율과 120시간 동안 체외배양하였을 때 배반포로의 발달율을 조사한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같다.

32-세포기의 G₁기 할구를 공핵란으로 사용하고 non-preactivated 및 preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 핵이식 수정란에서 각각 81.8 및 85.7%의 세포 융합율을 보여 세포 융합율에 있어서는 수핵란 세포질의 상태에 따라 서로 유의적인 차이는 나타내지 않았지만, preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 핵이식 수정란에서 세포 융합율이 약간 높게 나타났다. Modlinski와 Smorag (1991)는 토끼에서 M II 난자보다 전핵 단계의 수핵란에서 더 높은 세포 융합율을 보고하고 있으나, Campbell 등 (1994)은 면양에서 전핵 단계보다 M II 난자에서 더 높은 세포 융합율을 보고하고 있다. 그러나 Collas와 Robl (1991)은 non-preactivated 및 preactivated 난자를 사용한 경우 그 융합율이 모두

Table 1. Effect of cell cycle of donor nuclei on fusion rate on *in vitro* development of nuclear transplant rabbit embryos

Cell cycle of donor nuclei	No. of embryos used	No. of embryos fused(%) /cultured	No.(%) of embryos developed to			
			2-cell	8-cell	Morula	Blastocyst
S phase	93	76(81.7) ^a	67(72.0) ^a	45(48.4) ^a	44(47.3) ^a	23(24.7) ^a
G ₁ phase	101	79(78.2) ^a	95(94.1) ^b	84(83.2) ^b	81(80.2) ^b	61(60.3) ^b

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

Table 2. Effect of electrical preactivation of recipient cytoplasm on fusion rate and *in vitro* development of nuclear transplant rabbit embryos

Recipient cytoplasm	No. of embryos used	No. of embryos fused(%) /cultured	No.(%) of embryos developed to			
			2-cell	8-cell	Morula	Blastocyst
Nonpreactivated*	77	63(81.8) ^a	58(92.1) ^a	50(79.3) ^a	48(76.2) ^a	36(57.1) ^a
Preactivated**	84	72(85.7) ^a	60(83.3) ^b	43(59.7) ^b	28(38.8) ^b	15(20.8) ^b

* The M II oocytes were fused and activated by electrical pulses at 20 hours post-hCG.

** After enucleation, the oocytes were preactivated with electrical pulses at 18 hours post-hCG, and followed by electrical fusion at 20 hours post-hCG.

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

100%를 보여 융합율에 차이를 보이지 않았다. 난자의 성숙도가 진행되고 활성화가 되면 난자 원형질막이 변화되고 전기자극을 주었을 때 미세공 형성의 부족과 피질과립의 방출로 인하여 세포의 융합율은 떨어진다고 보고하고 있으나(Collas 등, 1989), 본 실험에서는 preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 경우에 다소 높은 융합율을 보이고 있다.

Non-preactivated 및 preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 핵이식 수정란에서 배반포로의 발달율은 각각 57.1 및 20.8%를 나타내어, non-preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 핵이식 수정란이 preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 핵이식 수정란보다 높은 체외발달율을 나타내었다. Collas와 Robl (1991)은 32-세포기의 S기 공핵란과 배란된 난자를 탈핵한 후 전기자극으로 인위적인 활성화 자극을 주어 MPF를 소실시키고 preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 경우 22%의 발달율을 보였고, non-preactivated 난자 즉, MII 난자를 사용한 핵이식 수정란에서는 36%의 발달율을 보여 MII 난자를 수핵란으로 사용한 경우 발달율이 유의적으로 높았다. Modlinski와 Smorag (1991)도 16-세포기의 S기 공핵란과 탈핵한 전핵 단계와 MII 난자를 수핵란으로 사용하여 핵이식 하였을 때 각각 9.5 및 3.7%의 발달율을 보여 MII 난자를 수핵란으로 사용한 핵이식 수정란에서 더 높은 발달율을 나타내었다. 그러나 Cheong 등 (1992)은 생쥐에서 전핵 단계와 MII 난자 사이에 발달율에서 차이를 나타내지 않는다고 하였다. Campbell 등 (1994)은 면양에서 S기의 공핵란과 MII 난자를 수핵란으로 사용하였을 때 21%의 발달율을 보였고, 탈핵한 다음 난자를 활성화 자극 후 난자의 세포주

기가 S기인 난자의 세포질을 사용으로 61%의 배반포로의 발달율을 보여 preactivated 난자가 수핵란으로 더 좋다고 하였다. 또한 소에서도 역시 preactivated 난자가 수핵란으로 더 좋다고 보고하였고 (Stice 등, 1994; Aoyagi 등, 1994), Kono 등 (1994)은 소에서 탈핵한 난자를 전기적인 방법으로 활성화시킨 후 9시간째에 할구를 융합한 핵이식 수정란이 가장 좋은 발달율을 보이고 있다.

3. 핵이식 수정란의 평균 할구수 및 세포분열 주기

32-세포기의 G₁기 할구를 공핵란으로 사용하고 non-preactivated 및 preactivated 난자를 수핵란을 사용하여 핵이식을 실시한 다음 융합 후 120시간 동안 배양하여 배반포기의 단계로 발달한 핵이식 수정란을 Hoechst 33342로서 핵을 형광 염색을 하여 형광현미경하에서 할구의 수를 세었고, 그들의 하루 평균 세포분열 주기를 비교 조사하여 수핵란 세포질의 상태에 따른 핵이식 수정란의 체외발달 능력을 비교 검토하였던 결과는 Table 3에 나타남과 같다.

배반포로 발달한 핵이식 수정란을 120시간 동안 배양으로 할구들의 수가 non-preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 핵이식 수정란에서 163.7개, preactivated 난자를 수핵란을 사용한 핵이식 수정란에서 85.7개로 할구의 수에서 현저하게 차이를 나타내었고, 1일 동안 핵이식 수정란의 평균 세포분열 주기는 각각 1.47회 및 1.28회를 나타내어, 120시간 배양 동안 1회 정도의 세포분열이 지연됨을 알 수 있었다. 이러한 결과에서도 역시 preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 경우보다 non-preactivated 난자를 수핵란으로 사용하였을 때 높은 체외발달

Table 3. Effect of electrical preactivation of recipient cytoplasm on the blastomere counts and daily cell cycles of nuclear transplant rabbit embryos *in vitro* developed to blastocyst stage at 120 hrs post-fusion

Recipient cytoplasm	No. of embryos stained	No. of blastomeres counted*	Mean no. of cell cycle /day
Nonpreactivated	13	174.3±18.4 ^a	1.49±0.84 ^a
Preactivated	10	85.4±15.4 ^b	1.28±0.79 ^b

* Mean ± SEM.

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

능력을 보여 주어 핵이식에서 수핵란은 활성화 자극을 가하지 않은 탈핵된 난자를 사용하는 것이 좋다고 판단된다. Modlinski와 Smorag (1991)은 탈핵된 M II 난자의 수핵란과 S기의 8-세포기 공핵란으로 사용한 핵이식 수정란을 120시간 체외배양한 결과 평균 할구수가 109개이었고 12개 중 1개만이 100개 이하의 할구를 가졌으나, 탈핵한 전핵 단계를 수핵란으로 사용하였을 경우 평균 할구수는 96개이었고 12개중 1개만이 100개 이상의 할구수를 가졌다고 보고하여 성숙한 M II 난자를 사용한 핵이식 수정란이 발달 능력이 높았음을 보여주었다.

4. 핵이식에 의한 산자의 생산 효율

핵융합 후 18시간 체외배양하여 2 또는 4-세포기 단계로 발달한 핵이식 수정란을 수란토에 체내이식한 결과는 Table 4에서 나타난 바와 같이 이식 후 31일에 1마리의 수란토에서 2마리(4.1%)의 복제산자를 생산하였다.

토끼에서 핵이식에 의한 복제산자의 생산은 Sticce 등(1988)이 6마리(3.7%), Yang 등(1992)이 8마리(3%)의 산자를 생산하였고, 이 등(1994)은 3마리(4.7%)를 생산한 바 있다. 그러나 공핵란의 세포주기를 조절하여 높은 체외발달율을 보이고 있으나, 본 실험에서 산자의 생산 효율은 크게 향상되지 않았다.

핵이식 수정란은 미세조작에 의한 물리적 손상과 더불어 체내와 다른 부적당한 체외배양에 의하여 발달능력이 감소한다. 또한, 핵이식 수정란에서 비정상적이고 손상된 핵물질은 역시 발달에 지대한 영향을 미친다. Von Beroldingen(1981)은 *Rana*

*pipiens*에서 공핵란의 세포주기의 조절은 핵이식 효율을 향상시키며, 염색체의 손상은 발달에 영향을 미치게 되고 발달이 저하되거나 지연될 것이고, 일정시간 동안 배양한 후 배반포를 형성할 때 할구수의 감소를 가져올 것이다. 또한, Modlinski와 Smorag(1991)은 핵분열없이 세포질분열이 일어나고 4-세포기 단계에서 premature compaction이 일어나며, 상실배에서 compaction이 일어나지 않는 핵이식 수정란의 발달 이상을 보고하고 있고, DiBerardino와 Hoffer(1970)는 수정란의 발달에서 상실배 단계의 compaction의 부족은 염색체의 이상 때문이라고 보고하였다.

핵이식 수정란은 염색체의 손상뿐만 아니라 미세조작에 의한 물리적 손상, 가시광선에 노출, 냉각감작과 미세조작 및 세포주기 조절에 사용하는 cytochalasin B, colcemid 및 aphidicolin 등에 과다하게 노출됨으로써 세포의 구성물질에 화학적 손상을 입게 되고, Kato와 Tsunoda(1992) 및 Pinto-Correia 등(1995)도 이러한 물질들은 발달에 장애가 될 수 있다고 보고하였다. 또한, Otaegui 등(1994)은 세포주기 조절을 위해 사용하는 nocodazole의 유해한 효과는 방추사를 형성하는 것을 방해할 뿐만 아니라 세포내 존재하는 다양한 종류의 microtubules의 파괴가 일어난다고 보고하고 있다. 이러한 microtubules에 유해한 효과는 상실배에서 세포의 극성화와 compaction에 영향을 미치고 순서적인 발달에 영향을 준다고 한다(Maro와 Borenens, 1980).

적 요

본 연구는 토끼를 사용하여서 세포주기를 조절한 할구를 공핵란을 사용하고, 수핵란을 인위적인 활성화시켜 이를 수핵란으로 사용한 경우 핵이식 수정란의 체외 발달율과 이들을 체내이식하였을 경우 산자의 생산효율을 조사하고자 하였다.

과배란시킨 토끼의 난관으로부터 hCG 주사로부터 48시간째에 16-세포기의 수정란을 채란하고 16-세포기의 수정란은 할구의 세포주기를 32-세포기의 G₁ 및 S기로 조절하였다. 수핵란은 과배란시킨 토끼로부터 hCG 주사로부터 13~15시간에 채란하여 미세조작으로 제 1극체와 인접한 세포질을 제거하

Table 4. Production of cloned rabbit pups using nuclear transplant embryos

Trial no.	No. of embryos transferred	No. of Pregnancy diagnosis	No. of offsprings born
1	14	-	0
2	18	+	2
3	4	-	0
4	6	-	0
5	7	-	0
Total	49		2(4.1%)

여 제 2감수분열 중기의 염색체를 탈핵한 non-preactivated 난자를 수핵란으로 사용하였다. 한편, 탈핵된 난자의 일부는 전기자극으로 난자의 활성화를 유도한 preactivated 난자를 역시 수핵란으로 사용하여, 분리된 32-세포기 G₁기의 할구 세포를 탈핵한 non-preactivated 및 preactivated 난자의 위란강에 각각 미세조작으로 주입하였다. 할구세포가 주입된 난자는 hCG 주사로부터 20시간에 직류 전류로서 세포의 융합 및 난자의 활성화를 유도하였고, 융합이 확인된 핵이식 수정란은 체외배양을 실시하였다. 융합이 확인된 핵이식 수정란은 120시간 공배양하였고, 배반포기까지 발달한 것을 Hoechst 33342 staining dye로 핵염색을 실시하여 할구수를 비교조사하였다. 또한, 핵융합 후 18시간에 2 또는 4-세포기 단계로 발달한 핵이식 수정란의 일부는 체내이식을 실시하였다.

S 및 G₁기 할구를 공핵란으로 사용한 핵이식 수정란과 수핵란의 상태에 따라 세포융합율에서는 서로 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나, 이들을 120시간 공배양하였던 바, 이들의 배반포로의 발달율은 S 및 G₁기 할구를 공핵란으로 사용한 핵이식 수정란에서 24.7 및 60.3%를 보여 G₁기 할구를 공핵란으로 사용한 유의적으로 ($P < 0.05$) 높은 핵이식 수정란의 발달율을 보였다. 또한, non-preactivated 및 preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 경우 57.1 및 20.8%를 보여 non-preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 경우에 유의적으로 ($P < 0.05$) 배반포로의 수정란의 발달율이 높았다. 그리고 non-preactivated 및 preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 핵이식 수정란에서 평균 할구수는 각각 163.7 및 85.4개로서 유의적인 차이를 보였으며, 또한 1일간의 평균 세포분열 주기 회수는 각각 1.47 및 1.28 회로 preactivated 난자를 수핵란을 사용한 핵이식 수정란에서 120시간의 체외배양 기간동안에 non-preactivated 난자를 수핵란으로 사용한 핵이식 수정란보다 1회 정도의 세포분열 주기가 지연되었다. 역시, 핵융합 후 18시간 체외배양하여 2 또는 4-세포기 단계로 발달한 핵이식 수정란을 수란토에 체내이식한 결과, 1마리의 수란토에서 2마리(4.1%)의 복제산자를 생산하였다.

이러한 결과를 종합해 보면 핵이식 수정란의 발

달율을 개선하기 위해서는 non-preactivated 난자를 수핵란으로 사용하고, G₁기에 있는 할구를 공핵란으로 사용하여 염색체의 손상을 줄이고 주입된 핵의 재구성에 의한 핵이식 수정란의 reprogramming이 일어나게 함으로써 핵이식 수정란의 발달율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- 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(Abstr.).
- Barnes FL, Robl JM and First NL. 1987. Nuclear transplantation in mouse embryos: assessment of nuclear function. *Biol. Reprod.*, 36:1267-1274.
- Barnes FL, Collas P, Powell R, King WA, Westhusin M and Sheperd 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.
- Campbell KHS, Pitchie WA and Wilmot I. 1993. Nuclear cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos : Implications for deoxyribonucleic acid replication and development. *Biol. Reprod.*, 49:933-942.
- Campbell KHS, Loi P, Cappai P and Wilmot I. 1994. Improved development to blastocyst of ovine nuclear transfer embryos reconstituted during the presumptive S-phase of enucleated activated oocytes. *Biol. Reprod.*, 50:1385-1393.
- Cheong HT, Takahashi Y and Kanagawa H. 1993. Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into oocytes. *Biol. Reprod.*, 48:958-963.

- Christmann L, Jung T and Moor RM. 1994. MPF components and meiotic competence in growing pig oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 38:85-90.
- Collas P, Pinto-Correia C, Ponce De Lean FA and Robl JM. 1992b. Effect of donor cell stage on chromatin and spindle morphology in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 46:501-511.
- Collas P, Balise JJ, Hofmann GA and Robl JM. 1989. Electrical activation of mouse oocytes. *Theriogenology*, 32:835-844.
- Collas P, Balise JJ, Hofmann GA and Robl JM. 1992a. Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 46:492-500.
- Collas P and Robl JM. 1991. Relationship between nuclear remodelling and development in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 45: 455-465.
- DiBerardino MA. 1980. Genetic stability and modulation of metazoan nuclei transplanted into eggs and oocytes. *Differentiation*, 17: 17-30.
- DiBerardino MA. 1987. Genetic potential of differentiated cells analyzed by nuclear transplantation. *Am. Zool.*, 27:623-644.
- DiBerardino MA. 1992. Nuclear reprogramming of amphibian differentiated cell. Symposium on cloning mammals by nuclear transplant (Fort Collins). pp5-7.
- DiBerardino MA and Hoffner N. 1970. Origin of chromosomal abnormalities in nuclear transplant a reevaluation of nuclear differentiation and nuclear equivalence in amphibians. *Dev. Biol.*, 23:185-209.
- Gerhart J, Wu M and Kirschner NW. 1984. Cell cycle dynamics of an M-phase specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *J. Cell Biol.*, 98:1247-1255.
- Kato Y and Tsunoda Y. 1992. Synchronous division of mouse 2-cell embryos with nocodazole *in vitro*. *Theriogenology*, 37:235(abstract).
- Kono T, Kwon OY, Watanabe T and Nakahara T. 1992. Development of mouse enucleated oocytes receiving a nucleus from different stages of the second cell cycles. *J. Reprod. Fert.*, 94:481-487.
- Kono T, Sotomaru Y, Apno F, Takahasi 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.
- Latham KE, Garrels JI and Solter D. 1994. Alteration in protein synthesis following transplantation of mouse 8-cell stage nuclei to enucleated 1-cell embryos. *Dev. Biol.*, 163: 341-350.
- Maro B and Borenens M. 1980. The centriole-nucleus association : Effects of cytochalasin B and nocodazole. *Biol. Cell.*, 39:287-290.
- Modlinski JA and Smorag ZA. 1991. Preimplantation development of rabbit embryos after transfer of embryonic nuclei into different cytoplasmic environment. *Mol. Reprod. Dev.*, 28:361-372.
- Murray AW and Kirschner MW. 1989. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature.*, 339:275-280.
- Otaegui PJ, O'neill GT, Campbell KHS and Wilmut I. 1994. Transfer of nuclei from 8-cell stage mouse embryos following use of nocodazole to control the cell cycle. *Mol. Reprod. Dev.* 39:147-152.
- 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.
- 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.
- Powell R and Barnes FL. 1992. The kinetic of oocyte activation and polar body formation in bovine embryo clones. *Mol. Reprod. Dev.* 33:53-58.
- 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.
- Smith LC and Wilmot 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 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 and Robl JM. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 39:657-664.
- Von Beroldingen CH. 1981. The developmental potential of synchronized amphibian cell nuclei. *Dev. Biol.*, 81:115-126.
- Yang X, Jiang S and Shi Z. 1992. Improved activation by combined cycloheximide and electric pulse treatment of bovine follicular oocytes matured *in vitro* for 23-24 hours. *Biol. Reprod.* 46(supplement):117(abstract).
- 박충생, 전병균, 이효종, 최상용. 1996. 토끼 핵이식 수정란의 체외발달에 미치는 공핵란 세포주기의 효과. *한국가축번식학회지*, 20(2):143-153.
- 이효종, 전병균, 윤희준, 이경미, 송상현, 공일근, 노규진, 최민철, 최상용, 박충생. 1994. 핵이식에 의한 복제토끼의 생산. *한국수정란이식학회지*, 9(2):161-166.

(접수일자 : 1997. 11. 12 / 채택일자 : 1997. 12. 20)