

수핵 난자의 활성화 방법과 공핵 수정란의 배양체계 및 할구의 크기가 소 핵이식 수정란의 발달에 미치는 영향

심보웅 · 조성근 · 이효종* · 박충생 · 최상용*

경상대학교 농과대학 축산학과

Effects of Activation Regimens of Recipient Cytoplasm, Culture Condition of Donor Embryos and Size of Blastomeres on Development of Reconstituted Bovine Embryos

Sim, B. W., S. K. Cho, H. J. Lee*, C. S. Park and S. Y. Choe*

Dept. of Animal Science, Gyeongsang National University

SUMMARY

To improve the efficiency of nuclear transplantation in bovine, in this study the development *in vitro* of nuclear transferred (NT) embryos was compared by different activation regimens of the enucleated oocytes. The effect of developmental stage and culture system of donor nuclei on fusion and development *in vitro* of NT embryos were also evaluated. Oocytes were collected from Hanwoo ovaries obtained from slaughterhouse and matured in Ham's F-10 supplemented with hormones. After 20~22 h maturation, the oocytes were vortexed to be free from cumulus cells and subsequently their nucleus and the first polar body were removed.

Enucleated oocytes were divided into 3 groups for activation; the oocytes of group I were activated with ionomycin for 5 min and subsequently incubated in 6-dimethylaminopurine (DMAP) for 4 h. Those of group II were treated with DMAP for 4 h at 39 h after onset of *in vitro* maturation (IVM) and those of group III were kept in room temperature (25°C) for 3 h at 39 h after onset of IVM. After *in vitro* fertilization (IVF) the embryos for nuclear donor were cultured either by group culture (20 embryos/50 μ l drop) or individually (1 embryo/50 μ l drop) for 4 day and 5 day. At day 4 and 5 after IVF, blastomeres were separated in calcium-magnesium free medium, and then classified into small (day 5: $\leq 38 \mu$ m, day 4: $46 \leq \mu$ m) and large (day 5: $\geq 38 \mu$ m, day 4: $\geq 46 \mu$ m). The separated blastomeres were replaced into enucleated and activated recipient cytoplasm. The blastomere-oocyte complexes were fused by electrically. The NT embryos were cultured in TCM-199 containing 10% FCS in 39°C, 5% CO₂ incubator for 7 day.

The results obtained were summarized as follows;

There were no differences in fusion and development to blastocyst between groups as group I (68%, 10%), group II (75%, 14%) and group III (73%, 9%), respectively. However, the cell number in blastocyst of NT embryos in group III were significantly fewer than in the other

† 본 연구는 1997~1998년도 학술진흥재단에서 지원한 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

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

groups ($P < 0.05$). No differences in fusion and development to blastocyst were found between individual or group cultured and between small or large blastomeres of day 4 and day 5 donor embryos.

From these results, it was concluded that the combination of ionomycin and DMAP, or treatment of DMAP at 39 h after onset of IVM were useful for the efficient of production of NT bovine embryos, and the individual cultured embryos could be simply used as donor nuclei for NT bovine embryo.

(Key words : Ionomycin, DMAP, Activation, Nuclear transplantation, Bovine)

I. 서 론

핵이식기술은 복제하고자 하는 공핵체를 탈핵된 수핵난자에 이식하여 유전형질과 표현형이 동일한 복수의 수정란을 생산하는 기술이다. 이처럼 핵이식은 공핵체의 핵과 수핵난자의 세포질의 재구성을 필요로 하며 공핵과 수핵난자의 적합성이 핵이식 수정란의 발달에 많은 영향을 미치게 된다. 대가축에서는 보편적으로 metaphase II (M II)의 수정란을 탈핵하여 수핵 세포질로 이용하는데, M II의 난자는 maturation promoting factor (MPF)의 수준이 높아 공핵할구와 융합시 핵막붕괴, 미성숙 염색체 응축의 현상이 생기는데 (Murray와 Kirschner, 1989; Collas 등, 1992a; Campbell 등, 1993), 사용된 핵의 세포주기기간이 길 경우에 간기의 핵이 다시 세포분열기를 거쳐 간기로 들어가게 되므로 DNA가 복제되지 않은 G₁기를 제외한 나머지 DNA합성기인 S기와 합성이 끝난 G₂기의 핵을 사용하였을 때에는 DNA의 재복제에 의한 핵형이상이가 나타난다 (Campbell 등, 1993, 1994). 감수분열기의 세포질을 간기로 전환시키는 난자의 활성화과정이 필요하며, M II의 탈핵난자에 활성화 자극을 주어 세포주기를 간기로 전환시킨 후 핵이식에 이용시 핵이식 수정란의 발달율을 향상시킬 수 있다고 한다 (Aoyagi 등, 1994; Kono 등, 1994).

M II 난자의 MPF의 수준을 떨어뜨리기 위한 방법으로 칼슘이온을 세포질로 인위적으로 증가시키기 위하여 전기자극법 (Ware 등, 1989), 에탄올 처리법 (Nagai, 1987), calcium ionophore 처리법 (Steinhardt 등, 1974) 등이 사용되었다. 포유동물의 난자는 계속해서 CSF나 C-mos같은 단백질을 합성하는데 이 CSF나 C-mos 단백질은 MPF를 높은 수준으로 유지

시키는 기능을 하는데 (Parrish 등, 1992), 하나의 자극으로 칼슘의 농도를 유도하는 것은 현 세포질에 존재하는 CSF의 파괴만 유도하지만 새로이 생성되는 CSF에 대해서는 영향을 미치지 못한다 (Fissore와 Robl, 1992). 이러한 단점을 보완하기 위하여 2종 이상의 복합처리법의 방법으로 난자의 활성화를 및 유지를 증진시킬 수 있으며 또한 CSF는 young 난자에서는 계속해서 합성이 일어나지만, aged 난자에서는 합성이 일어나지 않아 에탄올이나 전기자극, 온도자극처럼 하나의 자극으로도 MPF의 수준을 떨어뜨릴 수 있다고 한다 (Presicce와 Yang, 1994). 복합처리법으로 ionomycin을 이용해서 활성화를 유도하고 histone kinase inhibitor인 6-dimethylaminopurine (DMAP)을 이용하여 M II 난자의 높은 활성화를 배반포기배로의 발달율을 보이고 있으며 (Loi 등, 1998; Lavoir 등, 1997; Rho 등, 1998; 하 등, 1998), aged 난자의 사용에서도 aged 난자를 3시간 동안 실온 (25°C)에 두어 난자의 활성화를 유도하여 높은 활성화를 얻었으며, 핵이식 후 후기배로의 발달율을 증진시켰다고 한다 (Stice 등, 1994; Zakhartchenko 등, 1996, 1997). 하지만 인위적인 활성화 유도 물질의 이용은 수핵란 세포질에 많은 변화를 초래하여 핵이식 수정란의 발달에 좋지 않은 영향을 미치므로 활성화 방법의 비교가 필요하다.

소 핵이식에 사용되는 공핵란은 후기배로 발달하면서 세포질 및 핵에 있어서 많은 변화과정을 겪는데, 이러한 변화는 배양체계 및 수정란의 발달단계에 따라서 수정란의 발달에 영향을 미친다. 공핵란으로 이용되는 수정란의 단계는 핵이식 수정란의 발달에 영향을 미치며 (McGrath와 Solter, 1984; Prather 등, 1987; Zakhartchenko 등, 1997), 또한 수정란의 발달환경이 체내 수정란이 체외 수정란에 비해 핵이식 수정란의

발달율이 더 높았다고 한다(Yang 등, 1993; Heyman 등, 1994), 하지만 현재 핵이식에 사용되는 공핵란은 비교적 생산이 용이한 체외수정란을 주로 이용한다. 일반적으로 우량형질을 지닌 개체에서 초음파를 이용하여 난소에서 난자를 채취하여 체외배양시에는 적은 난자의 채취에 의한 개별배양이 수반되어진다. 그리고 개별배양된 수정란의 핵이식에의 공핵란으로서 이용은 우량형질 수정란의 복제동물생산 측면에서 매우 유용하다고 할 수 있을 것이다.

본 연구는 도축 한우의 난소를 이용하여 난자의 체외성숙을 유도, 탈핵하여 여러 활성화 유도 방법을 이용하여 활성화를 유도하여 핵이식 수정란의 체외발달을 조사하여 활성화 방법에 의한 핵이식 수정란의 생산효율을 비교 조사하였고, 개별 및 그룹배양된 공핵란을 핵이식에 이용하여 융합 및 발달율을 비교하였으며, 수정란의 할구분리시 관찰할 수 있는 할구의 크기를 대·소로 분류하여 핵이식 수정란의 발달에 미치는 효과를 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 수핵난자와 공핵수정란의 준비

도축우로부터 난소를 회수하여 3~8 mm의 난포로부터 난자를 채취하여 Wiemer 등(1991)의 방법에 준하여 1층 이상의 난구세포층이 있으며, 세포질이 균일하고 충실한 것을 선발하였다. 난포란의 체외성숙은 Ham's F-10 배양액에 sodium pyruvate(56 μ g/ml), streptomycin(100 μ g/ml), penicillin G(100 units/ml)와 hormones으로는 LH(10 μ g/ml), FSH(35 μ g/ml), estradiol-17 β (1 μ g/ml) 10% BCS를 첨가한 배양액으로 수핵난자는 20~22시간, 공핵란의 준비는 체외수정을 위하여 24시간 동안 체외성숙을 유도하였다.

체외수정을 위한 정자의 준비는 정액을 Percoll density gradient(90%:45%) 방법으로 활력이 좋은 정자를 선발하여 체외수정에 이용하였으며, 체외수정은 체외성숙된 난포란을 수정용 IVF-TALP medium으로 3~4회 세척한 후 수정용 IVF-TALP medium에 난자를 옮긴 다음 수정능이 획득된 활력도가 높은 정자의 최종농도가 1~2 \times 10⁶ cells/ml이 되도록 매정한 후, 24시간 동안 수정을 유도하였다.

체외수정된 수정란은 HECM-6 (Hamster Embryo Culture Medium)으로 4~5회 세척하여 난구세포와 정자를 완전히 제거한 다음 3일간 HECM에서 배양한 후, 10% BCS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 체외수정란을 옮겨 4~5일까지 배양하였다. 배양방법으로 개별 배양은 50 μ l 소적에 1개의 수정란을 넣어 배양하였으며, 그룹배양은 50 μ l의 소적에 20개의 수정란을 배양하여 공핵란으로 사용하였다. 한편 20~22시간 체외성숙된 난자를 300 IU/ml의 hyaluronidase (Sigma Co., U.S.A.)에 넣어 3분간 voltex하여 난구세포를 제거하고 제1극체가 명확하고 세포질이 균일하고 충실한 것만 수핵란으로 사용하였다. 그리고 공핵란은 체외배양후 4일(수정후 90시간)과 5일째(수정후 114시간)의 수정란으로 0.5%의 pronase (Sigma Co., U.S.A.)에서 투명대를 제거한 후 Ca²⁺ 및 Mg²⁺가 들어있지 않은 D-PBS에서 할구를 분리하여 공핵란으로 사용하였다.

2. 수핵난자의 탈핵 및 활성화

난구세포가 제거된 수핵란과 공핵배로부터 분리된 할구 세포를 세포골격 억제제인 7.5 μ g/ml의 cytochalasin B (Sigma Co., U.S.A.)에서 15분간 전처리를 하였으며, 7.5 μ g/ml의 cytochalasin B를 10% BCS가 포함된 TCM-199에 첨가한 용액에서 1시간 이내에 실시하였다. 미세조작을 위하여 micromanipulator (Narishige Co., Japan)를 DIC 도립현미경(Nikon Co., Japan) 위에 장치하였고 McGrath와 Solter (1983)의 non-disruptive 조작법에 의하여 실시하였다. 즉 성숙된 난자를 holding pipette으로 고정시키고 핵을 제거하기 위하여 injection pipette을 투명대 내로 진입시켜 제1극체와 그 주위에 위치하는 제2감수분열 중기의 염색체를 원형질막에 싸여진 채로 흡입하여 제거하였다.

탈핵후 0.5 μ g/ml Hoechst 33342(Sigma CO., U.S.A.)가 든 D-PBS에서 10분간 염색 후 형광현미경으로 탈핵 여부를 확인 후 탈핵이 확인된 난자는 세포융합 전에 아래 방법으로 활성화를 유도하였다.

1) Ionomycin과 DMAP의 병용법

탈핵된 수핵난자에 세포내 칼슘의 농도를 증가시켜 주는 5 μ M ionomycin(Sigma, Co., U.S.A.)에서 5

분간 처리하여 난자활성화를 유기한 후 2 mM DMAP에 4시간 침지하여 탈핵난자 세포질의 활성화를 유도하였다

2) 시간경과와 실온배양에 의한 활성화

탈핵된 난자를 10% BCS가 첨가된 TCM-199에 넣어 39°C, 5% CO₂ incubator에서 17~19시간 추가 배양하여 시간경과에 따른 1차 활성화를 유도한 후 25°C 실온에서 3시간 동안 탈핵난자의 세포질활성화를 유도하였다.

3) 시간경과와 DMAP처리에 의한 활성화

Stice 등(1994)의 방법에 따라 탈핵된 난자를 10% BCS가 첨가된 TCM-199에 넣어 39°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였으며, 배양시간은 체외성숙 후 39시간으로 시간경과에 따른 1차 활성화를 유도 후 2 mM DMAP가 들은 TCM-199에 4시간 동안 세포질 활성화를 유도한 후 할구의 주입 및 세포융합에 이용하였다.

3. 공핵수정란의 할구의 크기

할구 분리후 pipetting에 의해 변형된 할구의 모양을 원형으로 유도하기 위하여 10분간 배양 후 할구의 크기는 100× 배율의 도립현미경(Olympus Co., Japan)에서 접안렌즈의 눈금자를 이용하여 크기를 측정하였다.

수정후 90시간(4일째)의 수정란은 46 μ m를 기준으로 small과 large의 그룹으로 구분하였으며, 수정후 114시간(5일째)의 수정란은 38 μ m를 기준으로 small과 large의 그룹으로 구분하여 핵이식에 이용하였다.

4. 핵주입 및 융합

공핵란으로부터 분리된 할구세포를 미세 pipette에 흡입하고 이를 미세조작으로 탈핵된 수핵란의 위란강에 주입하였다.

핵이식란의 전기융합은 BTX-200 세포융합장치(BTX, San Diego, CA, U.S.A.) 및 1.0 mm폭의 wire chamber를 사용하여 이 등(1992)의 방법에 준하여 실시하였다. 핵이 주입된 난자는 Zimmerman fusion solution을 넣은 wire chamber의 양전극 사이로 옮겨, pipette으로 할구와 세포질의 접촉면이 양

전극에 수평이 되도록 유도한 후, 1.1kV/cm의 직류(DC)전류를 60 μ sec로 2회 통전하여 세포융합을 유도하였다. 통전 후 핵이식란은 즉시 7.5 μ g/ml의 cytochalasin B를 10% BCS가 함유된 TCM-199에 첨가한 용액에서 30분간 배양후 융합 여부를 관찰하였다

5. 핵이식수정란의 체외배양 및 할구수 조사

융합이 이루어진 수정란은 10% BCS가 함유된 TCM-199 배양액의 50 μ l 소적으로 옮겨 5% CO₂, 39°C incubator에서 7~9일간 배양하였으며, 배양후 48시간마다 신선 배양액으로 교환하여 분할율 및 배발달율을 검사하였다. 또한 핵이식수정란의 배반포기 배의 할구수를 관찰하기 위하여 세포융합 후 7일에 배반포로 발달한 핵이식 수정란을 Pursel 등 (1985)의 방법에 따라 bisbenzamide로 형광염색하여 형광현미경(Nikon Co., Japan)으로 할구수를 조사하였다.

6. 통계학적 분석

실험 결과의 통계학적 분석은 SAS package를 이용하여 실시하였으며, GLM(General Linear Model) Procedure를 적용하여 각 요인의 Least square means를 구하여 요인간의 유의차를 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 핵이식에 있어서 탈핵난자의 활성화 방법의 효과

탈핵난자를 ionomycin과 DMAP의 처리, 39~43시간에 DMAP 처리 그리고 39~42시간에 실온에서 활성화를 유도하여 핵이식을 실시한 다음 이들의 세포융합율 및 배반포로의 발달율을 조사한 결과는 Table 1, 배반포기 배로 발달한 수정란의 할구수는 Table 2에 나타난 바와 같다.

Table 1에서 보는 바와 같이 5일째의 수정란의 할구를 ionomycin과 DMAP의 처리, 39~43시간에 DMAP의 처리 그리고 39~42시간에 실온에 두어 활성화를 유도한 탈핵난자에 주입한 후 전기 융합율은 각각 68.0, 74.7 그리고 72.8%로 ionomycin과 DMAP의 처리구가 낮게 나타났으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 배반포기 배로의 발달율 또한 각각 10.0, 14.3 그리고 9.0%로 39~42시간에 실온에서 활

Table 1. Effect of different activation regimens on fusion and development of NT bovine embryos

Activation regimens ¹⁾	No. (%) of embryos fused /used	No. (%) of embryos developed to		
		2-cell	Morula	Blastocyst
I+DMAP	70 /103(68.0) ^a	58(82.8)	14(20.0)	7(10.0) ^a
DMAP	112 /153(74.7) ^a	90(80.3)	27(24.1)	16(14.3) ^a
RTA	67 / 92(72.8) ^a	56(83.6)	13(19.4)	6(9.0) ^a

¹⁾ I+DMAP : Ionomycin, 5 min + DMAP, 4 hrs

DMAP : Aging (39 hrs after onset of maturation)+DMAP, 4 hrs

RTA : Aging (40 hrs after onset of maturation)+room temperature, 3 hrs

* Values with same superscripts in the same column were not significantly different ($P < 0.05$).

Table 2. Effect of activation regimens on numbers of nuclei in NT bovine cultured for 7 days

Activation regimens ¹⁾	No. of embryos used	No. of nuclei /embryo	
		Mean \pm S.D.	Range
I+DMAP	5	79.2 \pm 16.05 ^a	53~ 96
DMAP	10	73.4 \pm 18.57 ^a	50~ 100
RTA	5	53.2 \pm 8.12 ^b	43~ 66

¹⁾ I+DMAP : Ionomycin, 5 min + DMAP, 4 hrs

DMAP : Aging (39 h onset of maturation) + DMAP, 4 hrs

RTA : Aging (40 h onset of maturation) + Room temperature, 3 hrs

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

성화를 유도한 처리구에서 낮은 경향을 나타내었으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 그러나 Table 2에서 보는 바와 같이 핵이식 수정란의 7일째 배반포기배의 할구수에서는 39~42시간에 실온처리구가 53.2개로 ionomycin과 DMAP의 처리구의 79.2개 그리고 39~43시간에 DMAP의 처리구의 73.4개보다 유의적 ($P < 0.05$)으로 낮게 나타났으며, 세포수의 범위에서도 43~66의 범위로 다른 처리구에 비하여 낮은 경향을 나타냈다.

이는 탈핵난자에 DMAP이 처리된 구에서 핵이식 후 수정란의 재구성률 증진시켜 발달율을 높이고 발달된 배반포기배의 세포수도 높게 나타나 탈핵난자의 활성화율을 증진시킴을 알 수 있다.

Loi 등(1998)은 면양에서 탈핵난자에 ionomycin을 처리 후에 DMAP을 처리하였을 때 핵이식 후 PCC현상이 없었으며 후기배로의 발달율을 증진시켰다고 보고하였으며, 탈핵난자에 ionomycin으로 세포질내 칼슘의 증가를 유도한 후 DMAP으로 활성화율을 증진시켰음을 알 수 있다. 이것은 DMAP이 puromycin의 유사체로써 protein kinase, protein 합성 억제제로

서 칼슘유도체인 ionomycin으로 세포내 칼슘의 증가를 유도한 후 단백질의 인산화를 억제시켜 MPF의 활성을 감소시켜 M II의 난자를 빨리 간기로 전환시킨 결과이다(Rebhun 등, 1973; Neant와 Guerrier, 1988). 이와 같이 핵이식에 있어 혼합처리법에 DMAP을 이용하여 소에서도 핵이식 수정란의 높은 발달율을 나타내고 있다(Tatham과 Trounson, 1996; Lavoit 등, 1997). Sims 등(1991)은 할구를 탈핵세포질에 이식한 후 6시간, 18시간이 경과한 후 세포융합후 면양의 난관에서 체내 배양을 유도하여 발달율에서 6시간 후 융합한 처리구가 배반포기 배로의 발달율이 4.7%로써 18시간의 경우(32.6%)에 비하여 유의적으로 낮게 나타났는데 이는 수정란의 세포질의 시간 경과에 따른 활성화를 유도한 경우에 MPF의 높은 수준을 낮출 수 있음을 나타내었다. 높은 MPF의 수준을 안정화 시켜 주는 CSF는 young 난자에서는 지속적으로 합성이 일어나지만 aged 난자에서는 합성이 일어나지 않아 에탄올이나 전기자극, 실온배양 등의 자극으로도 CSF를 파괴시켜 MPF의 수준을 떨어뜨릴 수 있으며(Presicce와 Yang, 1994), 핵이식시 M II의

난자의 경우에 볼 수 있는 PCC현상이 억제되어 공핵의 세포주기 단계에 의한 영향이 감소된다고 한다 (Collas와 Robl, 1991). 그리고 Leibfried-Rutledge 등(1989)은 체외수정에 있어서 정자를 성숙된 난자에 넣어 주입했을 경우 수정에 필요한 시간은 8~16시간 또는 그 이상의 시간이 걸린다는 보고는 aged 난자의 사용이 핵이식 수정란의 수핵 세포질로 사용이 적합하다는 것을 시사해주고 있다.

본 실험에서도 ionomycin과 DMAP의 처리구가 배반포기배의 할구수가 39~42시간에 실온처리한 구에 비하여 많게 나타나 탈핵난자에 좋은 활성화 방법으로 사료되며, 또한 시간 경과를 통하여 MPF의 수준을 떨어트린 후 DMAP으로 탈핵난자의 세포주기를 분열기에서 간기로의 전환을 촉진한 처리구도 배반포기배의 할구수가 높게 나타나 DMAP이 실온처리하여 활성화를 유도한 방법에 비하여 활성화 유도 물질로 사료된다.

2. 배양체계에 따른 수정란의 세포수 및 할구의 크기

개별배양 및 그룹배양으로 수정후 90시간(day 4) 또는 114시간(day 5) 배양한 수정란의 세포수 및 할구의 크기를 비교 조사한 결과는 Table 3에 나타난 바와 같다.

수정후 90시간째의 개별 및 그룹배양한 수정란의 세포의 수에서 평균 11.1개로 비슷한 경향을 나타내었고, 할구의 크기도 평균 46.8 μm 와 46.6 μm 로 비슷한 결과를 나타내었으며, 수정후 114시간째의 개별 및

그룹배양한 수정란의 세포수에서도 평균 16.8개와 17.6개로 비슷하게 나타났으나 수정후 90시간째의 결과에 비하여 개별 및 그룹간의 차이가 나고 있음을 보여주고 있다. 그리고 할구의 크기에 있어서도 39.3 μm 와 38.3 μm 로 수정후 90시간째의 결과에 비하여 개별 및 그룹배양간의 차이가 나고 있음을 알 수 있다. 이는 배양체계에 따른 수정란의 발달율에 있어서 후기배로 갈수록 개별 배양이 그룹배양 체계에 비하여 발달율이 떨어질 것을 시사하고 있다.

할구수에 있어서 Zakhartchenko 등(1997)은 핵이식에 사용된 공핵수정란의 할구수가 수정후 4일, 5일, 6일에 각각 12.6, 19.0 및 51.5개로 나타나 본 실험에 비하여 약간 많게 나타났는데 이는 수정후 90시간과 113시간을 공시하여 정확한 4일과 5일에 못 미치는 시간 때문으로 생각된다. 그리고 Bondioli 등(1990)은 5일간 배양한 수정란의 할구수가 28.2개로써 할구수에서 본 실험에 비하여 많은 할구를 나타내었으나 이는 체내수정란으로 체외수정란에 비하여 체내수정란의 발달이 빠르게 진행되는 것을 나타낸다.

수정란의 할구의 크기는 분할이 진행될수록 작게 나타난다. 할구의 크기는 작은 할구일수록 많은 분할이 일어났다고 예측할 수 있다. 또한 수정란의 할구를 분리하면 같은 수정란내의 할구크기의 차이는 수정란의 내부에 위치한 할구의 크기가 외부에 위치한 할구의 크기에 비하여 작게 나타나는데 (Zakhartchenko 등, 1995), Koyama 등(1994)은 수정란의 각 할구주위의 용모의 형태를 관찰하여 9~15세포기의 수정란의 할

Table 3. Characteristics of individual or group-cultured bovine embryos for 4 to 5 days (Mean \pm S.D.)

Age of donor embryos	Culture method	No. of embryo	Cell number	Diameter of blastomeres (μm)		
				Small ³⁾	Large ⁴⁾	Mean
Day 4 ¹⁾	Individual	15	11.1 \pm 2.43 ^b	42.0 \pm 2.73 ^b	50.9 \pm 4.24 ^b	46.8 \pm 5.72 ^b
	group	15	11.1 \pm 2.20 ^b	41.6 \pm 2.89 ^b	50.6 \pm 3.63 ^b	46.6 \pm 5.58 ^b
Day 5 ²⁾	Individual	15	16.8 \pm 1.86 ^a	35.2 \pm 3.20 ^a	42.5 \pm 1.74 ^a	39.3 \pm 4.51 ^a
	group	16	17.6 \pm 2.34 ^a	34.8 \pm 3.09 ^a	42.1 \pm 2.06 ^a	38.7 \pm 4.51 ^a

³⁾ Day-4 were 90 hours post insemination.

⁴⁾ Day-5 were 113 hours post insemination.

¹⁾ day 4 = \leq 46 μm , day 5 = \geq 46 μm .

²⁾ day 5 = \leq 38 μm , day 5 = \geq 38 μm .

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

구에서 극체화가 일어난 할구가 15%, 극체화되지 않은 할구가 75%로 이 시점에서 수정란의 극체화가 일어나기 시작하여 16세포기 이후에 극체화를 완성한다고 보고하였다. 따라서 본 실험에서의 4일째와 5일째의 수정란의 할구의 일부분은 극체화가 이루어진 것으로 사료된다.

할구의 크기를 small과 large로의 분류는 수정후 90시간째에는 할구의 평균치인 46 μm 를 기준으로 수정후 114시간째에는 할구의 평균치인 38 μm 를 기준으로 분류하여 핵이식에 공시하였다.

3. 공핵란의 배양체계 및 할구의 크기에 따른 핵이식에 있어서 융합율과 발달율

수정후 90시간(day 4)까지 개별 및 그룹배양한 수정란의 할구를 크기별로 분류하여 핵이식에 사용하여 융합율 및 발달율을 조사한 결과는 Table 4와 같다. 핵이식 수정란의 세포융합율에 있어서는 개별배양의 small과 large 처리구에서 69.2와 72.3%, 그룹배양의 small과 large 처리구에서 71.6와 76.3%의 융합율로서 large의 할구가 small의 할구보다 융합율이 높은 것으로 나타났으나 유의적인 차이는 보이지 않았다.

그리고 배반포로의 발달율에 있어서도 각각 11.1, 10.2, 12.2 그리고 13.0%를 보여 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 수정후 90시간 개별 배양된 수정란의 할구가 핵이식 후의 발달율에는 그룹배양에 비해 발달율이 유의적인 차이는 나타나지 않아 특정개별의 난소에서 난자를 채란시 적은 수의 난자를 채란하여 배양의 경우 불가피한 개별배양된 수정란의 배반포기 배로의 발달율은 그룹배양된 경우에 비하여 낮은 발달율을 보였으나 본 실험의 결과에서 보는 바와 같이 핵이식수정란의 공핵체로서는 좋은 것으로 사료된다.

수정후 114시간(day 5)까지 개별 및 그룹배양한 수정란의 할구를 크기별로 분류하여 핵이식에 사용하여 융합율 및 발달율을 조사한 결과는 Table 5와 같다.

개별배양된 수정란의 할구의 크기가 small과 large 처리구와 그룹배양된 small과 large 처리구에서 각각 71.0, 71.4, 69.9, 77.1%의 융합율을 보여 유의적인 차이는 나지 않았으며, 배반포기 배로의 발달율도 각각 11.4, 8.0, 17.2 및 12.9%를 보여 개별 배양된 수정란을 공핵체로 사용한 처리구가 그룹배양된 수정란을 공핵체로 사용한 처리구에 비하여 핵이식 수정란의 배반포로의 발달율에 낮은 경향을 보였으나 유의적인 차이

Table 4. Effect of culture method and blastomere size of Day 4 embryos on subsequent development of NT bovine embryos

Culture method	Blastomere size	No. (%) of embryos fused /used	No. (%) of embryos developed to		
			2-cell	Morula	Blastocyst
Individual	Small	36 /52(69.2)	29(80.6)	7(19.4)	4(11.1)
	Large	39 /54(72.3)	33(84.6)	8(20.5)	4(10.2)
Group	Small	41 /60(71.6)	34(82.9)	10(24.3)	5(12.2)
	Large	54 /72(76.3)	41(75.9)	13(24.0)	6(13.0)

* There was no significant difference in fusion rate and development rate between the groups.

Table 5. Effect of culture method and blastomere size of Day 5 embryos on subsequent development in NT bovine embryos

Culture method	Blastomere sizes	No. (%) of embryos fused /used	No. (%) of embryos developed to		
			2-cell	Morula	Blastocyst
Individual	Small	44 /62(71.0)	36(81.9)	9 (20.4)	5(11.4)
	Large	50 /70(71.4)	39(78.0)	9(18.0)	4(8.0)
Group	Small	58 /83(69.9)	44(81.1)	16(27.6)	10(17.2)
	Large	54 /70(77.1)	46(84.6)	12(22.2)	7(12.9)

* There was no significant difference in fusion rate and development rate between the groups.

는 나지 않았다. Prather 등(1987)는 공핵수정란을 2~8세포기, 9~16세포기, 17~32세포기를 이용하여 융합율을 조사하였던 바, 2~8세포기의 수정란을 공핵체로 사용했을 때 융합율이 가장 높게 나타났으며, 9~16세포기와 17~32세포기의 경우는 융합율에는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 본 실험에서 사용된 공핵수정란의 할구의 개수도 11.1~17.6개의 수정란을 사용하여 유의적인 차이를 나타내지 않았다. Stice와 Keefer(1993)도 4일째와 5일째의 수정란을 핵이식에 공핵체로 사용하여 61와 63%의 융합율을 얻었으며, 핵이식 수정란의 발달율에서도 상실배로의 발달율이 20와 16%로 유의적인 차이를 나타내지 않아, 본 실험과 같은 경향을 나타내었다. Koyama 등(1994)은 9~15세포기의 수정란은 극체화가 일어나기 시작한다고 하였는데, Navara 등(1992)은 40세포기의 수정란을 주변에 위치한 할구와 내부에 위치한 할구를 공핵란으로 사용하여 상실배로의 발달율이 2.52와 27.16%로 내부에 위치한 할구의 경우가 높았다고 보고하여, 외부에 위치한 할구 즉 수정란의 극체화가 이루어진 할구의 사용은 핵이식수정란의 발달의 저해요소로 알려져 있다.

할구의 분리시 관찰할 수 있는 큰 할구는 대부분 수정란의 주변에 위치하며 작은 할구는 내부에 위치하고 있어(Zakhartchenko 등, 1995), 본 실험에서 사용된 4일째와 5일째의 수정란의 할구는 극체화가 완성되지 않아 핵이식 수정란의 발달에 유의적인 차이를 나타내지 않은 것으로 추측된다. 그리고 우량형질을 지닌 개별에서 초음파검사 등을 통하여 난소에서 지속적으로 난자를 채취하여 공핵란으로 사용하기 위해서는 채취시 작은 수의 난자를 채취하였거나, 체외 배양에서도 체외성숙, 체외 수정, 체외 배양의 과정을 거치면서 배반포까지 발달하는 수정란의 수가 적으므로 개별배양을 필요로 한다. 본 실험에서 체외배양시 개별배양된 수정란도 그룹배양된 수정란을 공핵체로 사용하였을 때와 유의적 차이를 보이지 않아 핵이식에 개별배양된 수정란의 공핵체로의 사용이 유용하다고 사료된다.

IV. 적 요

본 연구는 핵이식 효율을 증진시키기 위하여 소의 핵이식에 있어서 M II의 탈핵난자의 활성화 방법과 공

핵란으로써 개별배양과 그룹배양된 수정란을 사용하여 할구분리시 발견할수 있는 할구의 크기별로 대·소로 구분하여 핵이식에 미치는 영향을 비교하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 핵이식에 있어 M II의 탈핵난자에 5 μ M ionomycin에서 5분 처리 후 2.0 mM DMAP을 4시간 동안 처리구, 탈핵 후 체외성숙으로부터 39~43시간에 2.0 mM DMAP을 4시간 동안 처리구와 탈핵후 체외성숙으로부터 39~42시간에 실온에 3시간 두어 활성을 유도한 처리구에서 융합율은 각각 68, 74.7와 72.8%를 보여 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 배반포기배로의 발달율에 있어서도 10.0, 14.3와 9.0%으로써 처리구간의 유의적인 차이는 보이지 않았다. 하지만 핵이식 후 7일째 배반포기 배로 발달한 수정란의 할구수에서는 각 처리구 별로 79.2개, 73.4개 그리고 53.2개로 체외성숙으로부터 39~42시간에 실온에 3시간 두어 활성화를 유도한 처리구가 다른 처리구에 비하여 유의적으로 낮게 나타났다($P < 0.05$).
2. 수정후 90시간 개별 배양 또는 그룹배양된 수정란의 평균할구수는 11.1개로 같게 나타났으며 할구분리시 할구의 크기는 평균 46.8, 46.6 μ m로 나타났으며, 두 그룹 모두 46 μ m를 기준으로 large와 small로 나누었을 때 개별배양에서는 할구의 크기가 42.0, 50.9 μ m로 측정되었으며, 그룹배양에서는 41.6, 50.6 μ m로 측정되었다. 수정후 114시간 개별 및 그룹배양된 수정란의 평균할구수는 16.8개와 17.6개로 나타났으며, 할구분리시 할구의 크기는 평균 39.3, 38.7 μ m로 나타났다. 두 그룹 모두 38 μ m를 기준으로 Large와 small로 나누었을 때 개별배양에서는 할구의 크기가 42.5, 35.2 μ m로 측정되었으며, 그룹배양에서는 42.1, 34.8 μ m로 측정되었다.
3. 핵이식 수정란의 세포융합율에 있어서 수정 후 90시간 개별배양된 수정란의 small과 large의 할구를 공핵체로 사용한 처리구에서 69.2와 72.3%, 그룹배양된 수정란의 small과 large의 할구를 공핵체로 사용한 처리구에서는 71.6와 76.3%의 융합율을 보여 유의적으로 차이를 나타내지 않았으며, 핵이식 수정란의 배반포기배로의 발달율에 있어서도 각각 11.1, 10.2, 12.2 그리고 13.0%

의 발달율을 보여 유의적인 차이를 보이지 않았다.

4. 수정 후 114시간 개별배양된 수정란으로부터 분리된 small과 large의 할구를 공핵체로 사용한 처리구와 그룹배양된 수정란 small과 large의 할구를 공핵체로 사용한 처리구에서 핵이식 수정란의 세포융합율에 있어서 각각 71.0, 71.4, 69.9 및 77.1%의 융합율을 보여 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 핵이식 수정란의 배반포기배로의 발달율에 있어서도 각각 11.4%, 8.0%, 17.2% 그리고 12.9%의 발달율을 보여 유의적인 차이를 보이지 않았다.

이상의 결과로 보아 핵이식 수정란을 효율적으로 생산하기 위하여 수핵난자의 세포질에 ionomycin과 DMAP의 혼합처리로 탈핵난자의 활성화를 유도하는 것이 효율을 증진시킬 수 있었다고 본다. 또한 공핵수정란을 수정 후 90시간과 114시간 개별 배양하여 할구를 공핵체로 핵이식에 이용하였을 때도 그룹배양에 비하여 효율이 떨어지지 않음을 알 수 있었으며, 수정란의 할구 크기의 차이가 핵이식 수정란의 생산효율에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다

V. 인용문헌

1. Aoyagi, Y., M. Konishi, T. Wada and T. Takedomi. 1994. Unaged bovine oocytes successfully develop to blastocysts after parthenogenic activation or nuclear transfer. *Theriogenology*, 41:157(abstract).
2. Bondioli, K. R., M. E. Westhusin and C. R. Looney. 1990. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenology*, 33:165-174.
3. Campbell, K. H. S., P. Loi, P. Cappai and I. Wilmut. 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.
4. Campbell, K. H. S., W. A. Pitchie and I. Wilmut. 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.
5. Collas, P. and J. M. Robl. 1991. Relationship between nuclear remodeling and development in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Rprod.*, 45:455-465.
6. Collas, P., J. J. Balise, G. A. Hofmann and J. M. Robl. 1992a. Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Bio. Reprod.*, 46:492-500.
7. Fissore, R. A and J. M. Robl. 1992. Intracellular Ca^{2+} response of rabbit oocytes to electrical stimulation. *Mol. Reprod. Dev.*, 32:9-16.
8. Heyman, Y., P. Chesne, D. Lebourhis, N. Peynot and J. P. Renard. 1994. Developmental ability of bovine embryos after nuclear transfer based on the nuclear source: *In vivo* versus *In Vitro*. *Theriogenology*, 42: 695-702.
9. Kono, T., Y. Sotomaru, F. Apno, T. Takahashi, I. Ogiwara, F. Sekizawa, T. Arai and T. Nakahara. 1994. Effect of ooplast activation on the development of oocytes following nucleus transfer in cattle. *Theriogenology*, 41:1463-1471.
10. Koyama, H., H. Suzuki, X. Yang, S. Jiang and R. H. Foote. 1994. Analysis of polarity of bovine and rabbit embryos by scanning electron microscopy. *Biol. Reprod.*, 50:163-170.
11. Lavoit, M. C., N. D. Rumph, A. Moens, W. A. King, Y. Plant, W. H. Johnson, J. Ding and K. J. Betteridge, 1997. Development of bovine nuclear transfer embryos made with oogonia. *Biol. Reprod.*, 56:194-199.
12. Leibfried-Rutledge, M. L., E. S. Crister, J. J. Prrish and N. L. First. 1989. *In vitro* nat-

- uration and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 31: 61-74.
13. Loi, P., S. Ledda, Jr. Fulka, P. Cappai and R. M. Moor. 1998. Development of parthenogenetic and cloned ovine embryo: Effect of activation protocols. *Biol. Reprod.*, 58: 1177-1187.
 14. McGrath, A. B and D. Solter. 1984. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development *in vitro*. *Science*, 226:1317-1319.
 15. Murray, A. W and M. W. Kirschner. 1989. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature*, 339:275-280.
 16. Nagai, T. 1987. Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes *in vitro* with ethanol. *Gamate Res.*, 16:243-249.
 17. Navara, C. S., M. M. Sims and N. L. First, 1992. Timing of polarization in bovine embryos and developmental potential of polarized blastomeres. *Biol. Reprod. suppl.*, 46:82 (abstract).
 18. Neant, I. and P. Guerrier. 1988. 6-Dimethylaminopurin Blocks Starfish Oocytes Maturation by inhibiting a relevant protein kinase activity. *Experimental Cell Research*, 176:68-79.
 19. Parrish, J. J., C. I. Kim and I. H. Bae. 1992. Current concepts of cell-cycle regulation and its relationship to oocyte maturation, fertilization and embryo development. *Theriogenology*, 38:277-296.
 20. Prather, R. S., F. L. Barnes, M. M. Sims, J. M. Robl, W. H. Eyestone and N. L. First. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryo : Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.*, 37:859-866.
 21. Presicce, G. A. and X. Yang. 1994. Nuclear dynamics of parthenogenesis of bovine oocytes matured *in vitro* for 20 and 40 hours and activated with combined ethanol and cycloheximide treatment. *Mol. Reprod. Dev.*, 37: 61-68.
 22. Pursel, V. G., Wall Jr, R. J., Rexroad, C. E., Hammer, R. E and Brinster. R. L. 1985. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenology*, 24:687-691.
 23. Rebhun, L. I., D. White, G. Sander and N. Ivy. 1973. Cleavage inhibition in marine eggs by puromycin and 6-dimethylaminopurine. *Exp. Cell Res.*, 77:12-318.
 24. Rho, G. J., B. Wu, S. Kawarsky, S. P. Leibo and K. J. Betteridge. 1998. Activation regimens to prepare bovine oocytes for intracytoplasmic sperm injection. *Mol. Reprod. Dev.*, 50:486-492.
 25. Sims, M. M., C. F. Rosenkrans Jr and N. L. First. 1991. Development *in vitro* of bovine embryos derived from nuclear transfer. *Theriogenology*, 35:272(abstract).
 26. Steinhardt, R. A., D. Epel, E. J. Carroll and R. Yanagimachi. 1974. Is calcium ionophore a universal activator for unfertilised eggs? *Nature*, 252:41-43.
 27. Stice, S. L. and C. L. Keefer. 1993. Multiple generational bovine embryo cloning. *Biol. Reprod.*, 48:715-719.
 28. Stice, S. L., C. L. Keefer and L. Matthews. 1994. Bovine Nuclear transfer embryos: Oocyte activation prior to blastomere fusion. *Mol. Reprod. Dev.*, 38:61-68.
 29. Tatham, B. G. and A. O. Trounson. 1996. Effect of activation treatment on the cleavage of nuclear transfer embryos produced after enucleation by centrifugation. *Proc. 13th Inter. Cong. Animal Reprod.*, pp.21-2.
 30. Ware, C. B., F. L. Barnes, M. Maiki-Laurila and N. L. First. 1989. Age dependence of bovine oocyte activation. *Gamate Res.*, 22: 65-275.
 31. Wiemer, K. E., A. J. Watson, V. Polanski,

- A. I. McKenna, G. H. Fick and G. A. Schultz. 1991. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 30:330-338.
32. Yang, X., S. Jiang, P. Farrell, R. H. Foote and A. McGrath. 1993. Nuclear transfer in cattle : effect of nuclear donor cells, cytoplasmic age, co-culture and embryos transfer. *Mol. Reprod. Dev.*, 35:29-36.
33. Zakhartchenko, V., M. Stojkovic, G. Brem and E. Wolf, 1997. Karyoplast-cytoplasm volume ratio in bovine nuclear transfer embryos: Effect on developmental potential. *Mol. Reprod. Dev.*, 48:332-338.
34. Zakhartchenko, V., H. D. Reichenbach, J. Riedl, G. A. Plama, E. Wolf and G. Brem, 1996. Nuclear transfer in cattle using *in vivo*-derived vs. *in vitro*-produced donor embryos: effect of developmental stage. *Mol. Reprod. Dev.*, 44:493-498.
35. Zakhartchenko, V., E. Wolf, G. A. Palma and G. Brem, 1995. Effect of donor embryo cell number and cell size on the efficiency of bovine embryos cloning. *Mol. Reprod. Dev.*, 42:53-57.
36. 이효종, 하대식, 강태영, 최민철. 1992. 생쥐난자의 단위발생에 관한 연구. I. Ethanol 및 hyaluronidase 처리에 의한 단위발생의 유기. *대한수의학회지*, 32(4):663-669.
37. 하란조, 강다원, 최창용, 윤희준, 강태영, 최상용, 이효종, 박충생. 1998. Ionomycin과 6-Dimethylaminopurine이 토끼의 난자 활성화와 핵이식배 생산효율에 미치는 효과. *한국수정란이식학회지*, 13(1):11-19.
(접수일자 : 1998. 12. 22. /채택일자 : 1998. 12. 30.)