

핵이식 기법을 이용한 한우 쌍태생산에 관한 연구

II. Ovum pick-up(OPU) 유래 공여핵 및 활성화 유도 수핵난자의 핵이식

황우석 · 신태영* · 노상호 · 박종임 · 이병천

서울대학교 수의과대학
국립수의과학검역원*
(1998년 4월 20일 접수)

Induction of twinning in Korean native cattle by transfer of nuclear transplanted embryos

II. Nuclear transfer using donor embryos originated from ovum pick-up(OPU) and activated recipient cytoplasts

Woo-suk Hwang, Tae-young Shin* , Sang-ho Roh, Jong-im Park, Byeong-chun Lee

*College of Veterinary Medicine, Seoul National University
National Veterinary Research and Quarantine Services**

(Received April 20, 1998)

Abstract : The efficiency of nuclear transfer using donor embryos originated from ovum pick-up(OPU) and activated recipient cytoplasts were examined for induction of twinning in Korean native cattle(KNC). After aspiration of follicle by OPU, regardless of the vacuum applied, we obtained same result in proportions of recovered cumulus-oocyte complex (COCs) with compact cumulus. Under electric stimulation(1.0kV/cm DC for 40 μ s), most of activated oocytes proceed to anaphase II/telophase II within 3h(84.7%). In the treatment of oocyte activation, the pre-activation which was performed before fusion had significant effect on the developmental rates to morula/blastocyst stage(9.4 vs 4.0%). In embryo transfer of nuclear transferred embryos, we obtained 2 twins from KNC recipients and 1 twin from a Holstein recipient. Our results showed that it is possible to obtain twins using nuclear transfer technique in KNC.

Key words : nuclear transfer, ovum pick-up, bovine, oocyte activation.

본 논문은 1997년도 교육부 학술연구조성비(유전공학 GE 96-57)에 의하여 연구되었음.

Address reprint requests to Dr. Woo-suk Hwang, Veterinary Teaching Hospital, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Republic of Korea.

서 론

산업동물에서 핵이식 기법에 의한 산자생산은 면양에서 최초로 보고되었으며¹ 최근에는 암양의 유선세포² 및 소 태아 섬유아세포³를 공여핵으로 이용하여 산자생산에 성공하는 등 그 응용도를 높여가고 있다.

최근 우수한 수정란을 생산하기 위한 방법으로 소에서 초음파 유도에 의해 미성숙난자를 채취하는 ovum pick-up(OPU) 기법이 시도되고 있다. 이는 탐촉자를 질에 삽입하고 탐촉면에 난소를 견인하여 화면상에서 난소의 형태를 관찰하며 관련장치를 사용하여 직접 생체에서 미성숙난자를 회수하는 방법이다. 이러한 OPU 기법은 수정란의 체외생산과 함께 적용할 경우 과배란치방법의 제한점을 해결할 수 있는 방법으로 관심이 높아지고 있는 분야이다⁴. 이러한 OPU 기법은 1회용 주사침의 사용⁵, 흡인압력⁶, 사용하는 주사침의 예각 및 흡인방법⁷ 등 OPU 기구의 개량에 따라 발전해왔다. 일반적으로 OPU 작업시 좋은 품질의 난자를 회수하기 위해서는 주사침의 직경과 진공압이 중요한 요인으로 작용하는 것으로 알려져 있다⁸. 최근까지 나온 보고들에 의하면 흡인압력은 40~400mmHg로 그 범위가 매우 넓으나^{8,9} 주사침 끝의 압력은 OPU 기구의 종류, 주사침 및 튜브의 길이와 직경에 따라 차이를 나타내기 때문에 다양한 설정을 통하여 난자의 적정 회수조건을 확립할 필요가 있다.

핵이식의 미세조작은 수핵난자와 공여핵 할구를 융합하는 것으로 종료된다. 체외숙성한 MII기의 난자를 수핵난자로 이용한다면 단위발생에서처럼 난자를 활성화하는 과정이 필요하게 된다. 이러한 난자의 활성화에는 에탄올(7%) 단시간 노출법, 통전법 및 Ca-ionophore와 단백질합성 억제제인 cycloheximide 병행처리법 등이 이용되어 왔다¹⁰. 특히 통전에 의한 난자의 활성화는 반복재현이 용이하고 핵이식 전기적 세포융합과 유사 혹은 동일한 조건하에서 이뤄질 수 있기 때문에 핵이식 과정중 보편적으로 이용되고 있는데 통전시 난자의 세포막에 순간적인 pore를 형성하여 Ca 이온이 유입되어 활성화를 유도하는 것으로 알려져 있다¹¹.

Campbell *et al*¹²은 maturation/meiosis/mitosis/metaphase promoting factor(MPF) 수준이 높은 MII기의 난자와 공여핵 할구융합시 remodeling 과정을 통하여 S, G2기의 경우

DNA 재복제에 의한 핵형이상(aneuploidy)이 나타날 수 있기 때문에 공여핵의 세포주기를 G1기에 일치시키거나 융합전 활성화를 통하여 MPF 수준을 저하시켜 remodeling 과정을 거치지 않고 이후 핵형의 변화없이 발생을 유도해야만 정상적인 핵이식란의 생산이 가능하다고 하였다. 특히 착상전 수정란에서는 대부분의 핵이 S기에 머물러 있으며 공여핵의 G1 동기화가 용이하지 않기 때문에¹³ 수핵난자를 활성화하는 방법이 효율적인 것으로 여겨지고 있다.

이에 저자는 수정란의 체외생산시 필요한 난자를 생체로부터 효율적으로 획득하기 위하여 주사침의 직경을 18 gauge로 고정하고 흡인압력을 적절히 조절하면서 최적의 난자회수조건을 조사하고 전기자극을 통한 난자의 활성화 정도를 조사하여 융합전 활성화가 유도된 난자를 수핵난자로 공여, 융합후 발육률의 향상을 도모하여 핵이식을 통한 효율적인 한우 쌍태생산에 적용하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

초음파를 이용한 난자의 채취 : 초음파 probe는 sector scanner(5.0 또는 7.5MHz)를 사용하였다. Long non-disposable needle(55cm, 17 또는 18G)의 dead space를 줄이고 cumulus-oocyte complex(COC)에 적합한 환경을 조성하기 위해 난자흡인용 배지(PBS, pH 7.4, 2% fetal calf serum; 이하 FBS, 0.2% W/V heparin)을 주사침 내강 및 흡입관 내에 채웠다. 자궁을 끌어당긴 후 질로 삽입되어 자궁경 부근에 고정된 transducer 위에 위치하여 난소를 관찰하여 초음파 화면상에서 검고 등근 점의 형태의 난포내강을 확인하였다. 초음파 유도에 의해 난포가 확인되면 주사침을 난포내강으로 진입시켰다. 난포의 직경을 초음파 상에서 측정하여 기록하고 인쇄하였다. 난포를 화면상에서 확고히 고정된 후 주사침이 난포내강에서 끝이 보일 때까지 밀어 넣었다. 이때 화면상에서의 위치와 난소내로 주사침이 들어가는 감각이 느껴졌을 때 regulated vacuum pump의 foot switch를 작동시켜 난포액에 포함된 난자를 직접 흡인하였다. 주사침을 제거한 후 배양액으로 주사침을 세척하였다. 각각의 난포는 50ml tube에 채취하여 실험실내로 운반하였다. 난자의 흡인시 사용되는 주사침은 18G로 압력은 50, 80, 100 및 120mmHg로 구분하였으며, 흡인속도는 22ml/min으로 고정하였다. 난포가

collapse 될 때까지 계속적으로 흡입하며 주사침의 끝이 난포벽에 닿아 음압이 차단될 때까지 실시하였다. 이때 주사침의 방향을 180° 돌려서 주사침의 경사면과 반대에 있을지도 모르는 COC를 흡입하였다. 흡입후 주사침 및 연결관내에 잔류된 난포액 회수를 위해 흡입용 PBS로 세척하였다. 회수한 난포액을 실제 현미경 하에서 검경하여 다층의 치밀한 난구세포를 가지며 세포질이 균질한 난자를 선별하여 체외성숙, 수정 및 배양에 공여하였다.

체외성숙 : OPU에 의해 회수된 난포란은 Wiemer *et al*¹⁴의 기준에 준해 난구세포가 치밀하게 부착되고 세포질이 균질한 것만을 선별하여 사용하였다. 체외성숙은 4-well dish(Nunc, Denmark)의 각 well당 10% FBS 및 5 μ AU/ml의 FSH(Antrin[®], Denka Pharm., Japan)가 포함된 TCM199 0.5ml를 분주하고 여기에 15개씩의 미성숙난자를 넣어 공기 및 습도가 포화상태인 39 $^{\circ}$ C, CO₂ 배양기내에서 20~24시간 배양하였다.

체외수정 : 정액은 straw당 4 \times 10⁷개의 정자가 들어있는 동결정액을 사용하였으며, 기본배양액은 modified Tyrode's medium(이하 TALP로 약함)¹⁵을 사용하였다. 난자의 성숙배양개시 22시간 후에 체외수정을 위해 동결정액을 38 $^{\circ}$ C 수조에 30초간 침지하여 진탕 용해시킨 후 현미경하에서 운동성을 확인하였다. 준비된 10개의 round bottom plastic tube(Falcon, USA; 11 \times 55mm)에 1ml의 수정능 획득용 배양액(sp-TALP)을 넣고 0.2ml씩의 정액을 첨가하여 CO₂ 배양기내에서 1시간 정치하였다 (swim-up 처리). 그후 정액의 상층액 0.8ml를 Pasteur pipette으로 흡입하여 하나의 원심관에 모으고 세정을 위해 2회 원심분리(700g, 5분)하여 활력정자를 선별하였다. 수정능 획득은 원심관에 들어있는 정자를 농도가 1 \times 10⁸개/ml 되도록 조정하고 heparin(Gibco BRL, USA ; 200 μ g/ml)을 포함한 sp-TALP를 동량 첨가하여 CO₂ 배양기에 15분간 배양함으로써 유도하였다. 한편 정자를 swim-up 시키는 동안 성숙난자는 세정과정을 통하여 팽대된 난구세포의 1/3 정도를 제거한 후 light white oil (Sigma, USA)이 도포된 35mm petridish(Costar, USA)내의 수정용-TALP 43 μ l drop에 3 μ l의 배지와 함께 각각 5개씩 주입하였다. 체외수정은 준비된 난자의 drop에 heparin 처리후 동량의 sp-TALP를 혼합한 다음 4 μ l의 배지로 정자를 최종농도가 2 \times 10⁶/ml가 되도록 첨가하여 CO₂ 배양기내에서 18~24시간 동안 배양하여 실시하였다.

체외배양 : 체외수정란은 체외수정용 TALP를 기본으로 8mg/ml BSA(fatty acid free, Sigma, USA), 2% essential amino acid 및 1% non-essential amino acid(Gibco BRL, USA)를 첨가하고 삼투압을 260mOsm로 낮춘 modified TALP(mTALP)를 이용, 배양을 실시하여 후기배로의 발육을 유도하였다. 수정란을 수정용 TALP에서 3회 세정한 후 35mm dish에 배양용 mTALP로 30 μ l의 미소적을 작성, light white oil 도포 및 2시간의 전배양 처리후 실시하였다. 난자는 각각의 미소적에 6~10개씩 첨가하였으며 배양 7일째 후기배로의 발육률을 조사하였다.

수핵난자의 활성화 : 수핵난자로 준비된 체외성숙난자(성숙 22시간 후)는 0.1% hyaluronidase(Sigma, USA)가 첨가된 PBS(+)(Gibco BRL, USA) 2ml가 분주된 35mm petridish에서 mouth pipetting을 실시하여 난구세포를 완전히 벗겨낸 후 제 1극체가 보이는 것만을 선별하여 실험에 사용하였다. 난구세포를 벗긴 난자는 0.1mM의 Ca⁺⁺ 및 Mg⁺⁺가 함유된 0.28M mannitol 20 μ l의 용합 미소적내로 옮겨 10분간 평형시킨 후 동일한 배양액을 분주한 3.2mm chamber 내에서 1.0kV/cm에서 40 μ s 동안 통전시켜 전기적 활성화를 유도하였다. 단, 활성화와 용합을 동시에 실시한 군은 용합전 활성화를 수행하지 않았다.

활성화 처리후 난자의 염색 : 전기적 활성화 0, 1, 2 및 3시간 후의 난자의 일부를 cacodylate buffer로 고정하고 D.W. 및 에탄올로 세정한 후 aceto-orcein으로 염색하여 활성화 정도를 평가하였다. 활성화는 anaphase II 및 telophase II로 진행된 것을 확인하여 평가하였다.

탈 핵 : 미세조작은 differential interference contrast (DIC)가 장착된 도립현미경(Leitz, Germany; \times 250)하에서 실시하였다. 수핵난자는 탈핵을 용이하게 하기 위하여 미리 투명대를 10~20% 정도 절개하고 미세조작시의 손상을 최소화 하기 위해 절개후 7.5 μ l/ml의 cytochalasin B(Sigma, USA)가 함유된 PBS(-) 20 μ l의 미소적 내에서 20분간 전배양시켰다. 전배양후 외경 20 μ m의 탈핵용 pipette을 사용하여 수핵난자의 절개되어진 투명대를 관통하여 제 1극체와 metaphase chromosome을 한꺼번에 karyoplast 형태로 흡입, 제거하였다. 탈핵후 난자는 세정과정을 거쳐 핵이식에 공여하였다.

공여핵의 준비 및 핵이식 : 공여핵으로 제공된 체외생산란은 OPU 유래로서 전술한 방법에 준하여 준비하였다. 난자의 체외성숙 22시간째에 수핵란의 탈핵을 실시하고 16-32세포기의 공여핵을 0.5%의 pronase(Sigma, USA)

Table 1. COCs classification, recovery rates and vacuum pressure in transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up

Vacuum pressure(mmHg)	No. of follicles aspirated	Grade of COCs*				No. of oocytes recovered	Recovery rates (%)
		A	B	C	D		
50	128	8	15	5	3	31	24.2
80	255	18	20	23	13	74	29.0
100	353	31	40	25	18	113	32.0
120	83	5	5	5	8	23	27.7

* COCs : cumulus-oocyte complexes.

가 첨가된 PBS(-) 내에서 1분동안 처리하여 할구를 분리하였다. 핵이식은 공여핵의 할구를 외경 30 μ m의 주입용 pipette 내로 흡입하여 탈핵된 수정란의 절개된 투명대를 관통한 다음 주란강에 주입함으로 실시하였다.

전기융합 : 핵이식란은 light white oil이 도포된 60mm petridish의 PBS(+), 0.28M mannitol 그리고 0.28M mannitol 이 20 μ l의 융합미소적내로 옮겨 10분간 평형시킨 후 세 포융합을 실시하였다. 전기적 세포융합은 실험설계에 따라 1.0kV/cm에서 30, 50 및 100 μ s의 조건으로 실시하였으며, 1회 통전하였다. 직류전압을 통전하기 전에 20V, 5초간 교류전압을 통전하여 agglutination plane과 통전방향이 수직이 되도록 alignment를 형성시켰다. 통전 1시간 후에 현미경하에서 검사하여 세포융합여부를 판정하였다.

핵이식란의 배양 : 핵이식란은 체외수정란의 배양과 동일한 방법으로 수행하였다.

핵이식 수정란의 이식

1) 수정란의 등급판정 : 체외수정유래 수정란을 Lindner 와 Wright¹⁶의 기준에 따라 excellent, good, fair 및 poor의 4등급으로 구분하여 excellent와 good의 등급을 보인 것만을 공핵수정란으로 이용하였다.

2) 수정란의 이식 : 수란우는 한우와 Holstein 종에서 선발하였다. 모든 수란우는 이식 12시간전부터 절식시키고, 이식을 용이하게 하기 위해 이식직전에 2% lidocaine액 5ml로 척추경막의 마취를 실시하였다. 주사후 꼬리를 묶어 앞으로 고정시킨 후 외음부 주위를 소독액과 멸균 생리식염수로 세정하고 멸균된 tissue paper로 물기를 제거하였다. 이식방법은 straw가 장착된 수정란이식기를 사용, 비외과적 자궁경관 경유법에 의해 자궁각선단부의 자궁난관 접합부 5cm 부위에 수정란을 이식하였다.

3) 수태율 판정 : 이식한 후 90일경에 직장검사에 의한 태막 및 태아촉진법과 초음파검사법으로 수태여부를 판정하였다.

통계학적 분석 : 실험결과와 통계학적 유의성 검정에 는 χ^2 -test를 실시하였다.

결 과

흡인압력에 따른 난자의 품질 및 회수율 : 흡인압력을 50, 80, 100 및 120mmHg로 구분하여 OPU에 의해 난포를 흡인한 결과 80 및 120mmHg 군에서 난자의 품질 및 난 회수율이 높은 경향을 보였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Table 1).

전기자극후 시간에 따른 난자의 활성화 : 난구세포를 제거한 난자를 1.0kV/cm, DC로 40 μ s 동안 통전한 후 0, 1, 2 및 3시간째에 anaphase II 및 telophase II로의 활성화 정도를 측정한 결과 1시간 이후부터 시간이 지남에 따라 활성화 된 난자의 수가 유의적으로 증가하였다($p < 0.01$, Table 2).

Table 2. Activation of *in vitro* matured bovine oocytes after electric stimulation

Activation period(h)*	No. of oocytes	No.(%) of oocytes developed to anaphase II/ telophase II
0	81	4(4.9) ^a
1	83	9(10.8) ^a
2	80	47(58.5) ^b
3	78	66(84.7) ^c

* Oocytes were activated by electric stimulation(1.0kV/cm, 40 μ s).

^{a-c} Different superscripts in the same column are differ significantly($p < 0.01$).

난자의 활성화 유무에 따른 핵이식란의 발육율 : 수핵 난자를 활성화 처리한 후 융합하거나 융합과 동시에 활성화를 유도하여 후기배로의 발육률을 조사한 결과 융합된 활성화 처리한 난자를 핵이식에 공여한 군의 후기배로의 발육률이 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.1$, Table 3).

Table 3. Development to morula and blastocyst stage of bovine embryos using 2 different cytoplasm recipients

Cytoplasm type*	No. of oocytes	No. of fused	No. of morulae and blastocysts/fused
Pre-activated	158	117(74.1)	11(9.4) ^a
Activation and fusion	167	125(74.9)	5(4.0) ^b

* Same electric stimulation (1.0kV/cm, 40 μ s) were used for oocyte activation and karyoplast/cytoplasm fusion.

^{a-c} Different superscripts in the same column are differ significantly ($p < 0.01$).

수란우의 품종에 따른 쌍태 생산율 : 상실배 및 배반포로 발육된 핵이식란을 수란우에 이식하여 쌍태를 유도한 결과, 한우에서 2, Holstein 종에서 1마리의 수란우에서 쌍태가 유도되었으며, 이식한 총 핵이식란중 한우 수란우에서 28.6%, Holstein 수란우에서 33.3%가 산자로 탄생되었다(Table 4).

Table 4. Pregnancy rate following transfer to recipients of bovine nuclear transplanted embryos

Breed of recipient cow	NT* embryos transferred	No. of recipients	Offsprings		Total calves/ transferred embryos(%)
			single	twins	
KNC**	21	13	2	2	6/21(28.6)
Holstein	12	7	2	1	4/12(33.3)

* Nuclear transfer.

**Korean native cattle.

고 찰

핵이식 및 형질전환동물 생산 등 최근 관심이 높아지고 있는 번식기법 중에서 가장 중요한 요인의 하나는 양질의 난자 및 수정란을 공급받는 것이다. 특히 경제성이 높은 소에서 난자 및 수정란의 공급은 이후 각종 실험을 수행하는데 매우 중요하다. 일반적으로 난자는 도축장

에서 도살직후의 생체로부터 난소를 회수한 후 채취되며 이는 체외성숙, 수정 및 배양을 통해 성숙난자 및 수정란을 생산하게 된다. 그러나 특정 개체에서의 반복채취를 위하여 Pieterse *et al*¹⁷은 사람에서 이용되는 OPU 기법을 소에 적용하였다. 일반적으로 OPU 작업시 좋은 품질의 난자를 회수하기 위해서는 주사침의 직경과 진공압이 중요한 요인으로 작용하는 것으로 알려져 있으며⁶ 최근까지의 보고에 의하면 흡인압력은 40-400mmHg로 그 범위가 매우 넓으나^{8,9} 이는 사용하는 기기에 따라 주사침 끝의 압력에 차이를 보이므로 기기에 따라 일정한 기준을 설정해두고 조건을 확립하는 것이 중요하다. Lopata *et al*¹⁸은 사람에서 흡인압력이 120mmHg에서 200mmHg로 증가함에 따라 난자의 회수율이 높아짐을 보고하였고 Kanitz *et al*⁹은 흡인압력이 난포의 추정크기와 연관되어있다고 보고하였다. 본 실험실의 OPU 기기를 기준으로 할 경우 흡인압력은 각 군간에 유의적인 차이는 없었으나 80-100mmHg의 압력으로 난자를 채취하는 것이 양질의 난자-난구 복합체(cumulus-oocyte complex; COC)를 획득하는데 적절한 수준으로 나타났다. 그러나 주사침 끝의 압력은 그 직경 및 흡입 튜브의 길이와도 밀접한 관련이 있기 때문에 향후 난자의 회수에 있어서 이러한 물리적 조건을 확립하는 것이 중요할 것으로 사료된다.

일반적으로 정자와 융합된 난자는 정자로부터의 어떤 인자에 의해 세포내 칼슘이온농도가 증가하고 MPF 수준의 감소, cortical granule reaction, 감수분열제거 및 제2극체의 방출 등의 현상을 보인다. 난자의 인위적인 활성화 또한 세포내 칼슘이온의 유입을 통해 수정시 보이는 난자의 활성을 유도하는 것으로 7% 에탄올에 단시간 노출시키는 방법¹⁹, 통전을 통한 방법²⁰ 및 Ca-ionophore (A23187)와 단백질합성 억제제인 cycloheximide 병행처리 방법²¹ 등 여러가지 방법이 이용되어 왔으며, 이와는 별도로 정자로부터 유래한 활성유도인자를 추출하여 난자의 활성화를 유도하는 연구 또한 수행되고 있다¹⁰. 정자로부터 좀더 순수한 인자를 분리해낼 수 있다면 핵이식 수정란의 활성화 유도시 생리학적으로 좀더 나은 칼슘반응을 유도할 수 있을 것으로 생각된다. 통전에 의한 난자의 활성화는 전기적 세포융합과 유사 혹은 동일한 조건하에서 이뤄질 수 있기 때문에 핵이식 과정중 보편적으로 사용되고 있는데 통전시 난자의 세포막에 순간적으로 pore가 형성되어 칼슘이온이 유입, 활성화를 유

도하는 것으로 알려져 있다¹¹. 핵이식 후의 수정란을 수핵난자의 활성화를 통해 MPF의 수준을 떨어뜨리지 않을 경우 공여핵의 세포주기를 G1기로 동기화 하여 nuclear envelope breakdown(NEBD), premature chromosome condensation(PCC), nuclear envelope reformation(NER) 및 nuclear swelling(NS) 등을 유도하여 정상적인 핵형을 유지해야 하며²², S 및 G2기의 경우 DNA 재복제에 의한 핵형 이상이 나타나기 때문에 융합전 활성화를 통해 MPF 수준을 저하시켜 NEBD, PCC 및 NER의 과정을 거치지 않고 정상세포주기에 도입토록 해야 핵형의 변화없이 발생이 가능하게 된다¹². 본 연구에서는 핵이식란의 작성전 난자의 활성화를 유도하여 시간에 따른 활성화 정도를 조사하고 이를 핵이식에 적용, 활성화 처리가 핵이식란의 발육에 미치는 영향을 조사하였다. 본 실험결과 대다수 난자의 활성화는 전기자극후 2~3시간 후에 유도되었으며, 이는 에탄올과 cycloheximide를 병행처리한 Yang과 Presicce¹⁹의 결과와 유사하여 전기적 자극이 화학처리와 동일한 수준의 활성화를 나타내는 것으로 증명되었다. 전기적 자극을 통해 활성화된 난자를 핵이식에 공여한 경우 융합과 동시에 활성화를 유도했을 때와 비교하여 공여핵과 수핵난자 간의 융합율에는 차이를 보이지 않았으나 후기배로의 발육율은 활성화 처리군이 유의적으로 높게 나타나 핵이식란의 생산에 있어 수핵난자의 활성화 전처리가 유효한 것으로 판명되었다. 특히 소의 경우 분할란의 세포주기가 대부분 S기에 머물러 있고 G1기는 매우 짧아 동기화가 어렵기 때문에²³ 전기자극을 통해 활성화된 수핵난자를 이용하는 것이 유용한 것으로 판단된다.

소 핵이식유래 배반포의 경우 이식후 산자생산율이 20~25%에 머무르는 것으로 알려져 있다²⁴. 본 실험에서는 쌍태생산을 유도하여 그 효율을 높이고자 하였는데 이식후 산자생산율이 28.6~33.3%로 나타나 타 연구자들의 성과와 유사한 것으로 나타났으나 산자생산율이 50%인 체외수정 및 배양란²⁵에 비하여는 60% 정도에 머무르는 것으로 나타났다.

결 론

OPU 유래 난자를 체외성숙, 수정 및 배양을 통하여 생산, 핵이식의 공여핵으로 이용하고 활성화 유도된 MII 기의 난자를 수핵난자로 이용하여 한우에서 핵이식 유

래 쌍태를 생산하고자 수행한 본 연구에서 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 흡인압력을 50, 80, 100 및 120mmHg로 구분하여 OPU에 의해 난포를 흡인한 결과 80 및 120mmHg 군에서 난자의 품질 및 난 회수율이 높은 경향을 보였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다.
2. 난구세포를 제거한 난자를 1.0kV/cm, DC로 40 μ s 동안 통전한 후 0, 1, 2 및 3시간째에 anaphase II 및 telophase II로의 활성화 정도를 측정된 결과 1시간 이후부터 시간이 지남에 따라 활성화된 난자의 수가 유의적으로 증가하였다.
3. 수핵난자를 활성화 처리한 후 융합하거나 융합과 동시에 활성화를 유도하여 후기배로의 발육률을 조사한 결과 융합전 활성화 처리한 난자를 핵이식에 공여한 군의 후기배로의 발육율이 유의적으로 높게 나타났다.
4. 상실배 및 배반포로 발육된 핵이식란을 수란우에 이식하여 쌍태를 유도한 결과, 한우에서 2, Holstein 종에서 1마리의 수란우에서 쌍태가 유도되었으며, 이식한 총 핵이식란중 한우 수란우에서 28.6%, Holstein 수란우에서 33.3%가 산자로 탄생되었다.

참 고 문 헌

1. Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, 321:63-65, 1986.
2. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385:810-813, 1997.
3. Wells DN, Misica PM, McMillan WH, et al. Production of cloned bovine fetuses following nuclear transfer using cells from a fetal fibroblast cell line. *Theriogenology*, 49:330 abstr, 1998.
4. Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL, et al. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*, 41:67-72, 1994.
5. Bols PEJ, Vandenheede JMM, Van Soom A, et al. Transvaginal ovum pick-up(OPU) in the cow: A new disposable needle guidance system. *Theriogenology*, 43:677-687, 1995.
6. Bols PEJ, Van Soom A, Ysebaert MT, et al. Effects

- of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology*, 45:1001-1014, 1996.
7. Bols PEJ, Ysebaert MT, Van Soom A, *et al.* Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology*, 47:1221-1236, 1997.
 8. Kruip ThAM, Boni R, Wurth YA, *et al.* Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology*, 42:675-684, 1994.
 9. Kanitz W, Becker F, Spitschak M, *et al.* Method and results of ultrasound guided follicular aspiration in cattle. In *Proc 9e Reunion AETE*, 1:218 abstr, 1993.
 10. Stice SL, First NL. Progress towards efficient commercial embryo cloning. *Anim Reprod Sci*, 33:83-98, 1993.
 11. Zimmermann U, Vienken J. Electric field-induced cell-to-cell fusion. *J Memb Biol*, 67:165-182, 1982.
 12. Campbell KHS, Ritchie WA, Wilmut I. 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, 1993.
 13. Barnes FL, Endebrock M, Looney CR, *et al.* Embryo cloning in cattle: the use of *in vitro* matured oocytes. *J Reprod Fert*, 97:317-320, 1993.
 14. Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, *et al.* Effect of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol Reprod Dev*, 30:330-338, 1991.
 15. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA, *et al.* Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod*, 38: 1171-1180, 1988.
 16. Lindner GM, Wright RW Jr. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20:407-416, 1983.
 17. Pieterse MC, Kappen KA, Kruip ThAM, *et al.* Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30: 751-762, 1998.
 18. Lopata A, Johnston IWH, Leeton JF, *et al.* Collection of human oocytes at laparoscopy and laparotomy. *Fert Steril*, 25:1030-1038, 1974.
 19. Presicce GA, Yang X. 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, 1994.
 20. Prochazka R, Kanka J, Sutovsky P, *et al.* Development of pronuclei in pig oocytes activated by a single electric pulse. *J Reprod Fert*, 96:725-734, 1992.
 21. Soloy E, Kanka J, Viuff D, *et al.* Time course of pronuclear deoxyribonucleic acid synthesis in parthenogenetically activated bovine oocytes. *Biol Reprod*, 57: 27-35, 1997.
 22. Collas P, Balise JJ, Robl JM. Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod*, 46:492-500, 1992.
 23. Barnes FL, Eyestone WH. Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos. *Theriogenology*, 33:141-152, 1990.
 24. Westhusin ME, Pryor JH, Bondioli K. Nuclear transfer in the bovine embryos: a comparison of 5-day, 6-day, frozen-thawed, and nuclear transfer donor embryos. *Mol Reprod Dev*, 28:119-123, 1991.
 25. Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, *et al.* Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43: 141-152, 1995.