

복제동물 생산을 위한 핵이식기술의 개발 현황과 전망

이 효 종

경상대학교 수의과대학 수의학과, 동물의학연구소

Current Status and Prospects of Nuclear Transplantation Technology for Production of Cloned Animals

Hyo-jong Lee

Department of Veterinary Medicine and Institute of Animal Medicine,
Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

ABSTRACT : The nuclear transplantation technique is known as the most potential and efficient method for producing large numbers of genetically identical animals from a single embryo and somatic cells. After Dolly was introduced in 1997, many scientists were amazed. A possibility came to a reality that live offspring could be produced with differentiated somatic cells from an adult animal. On the other side, many in the press and the sensation-alists focused on the socially, ethically and scientifically unacceptable sides of the technology. In this article, the history, current status and prospects of the technological development of nuclear transplantation in mammals and its application to the production of cloned animals are described. For the efficient and successful production of cloned embryos by nuclear transplantation, the right selection, preactivation and micromanipulation of oocytes as capacious recipient cytoplasm, the adequate and beneficial preparation of multiple totipotent embryonic and somatic cells as donor nuclei, fusion of them and *in vitro* production of cloned embryos are very critical. Recently the overall efficiency of production of cloned embryos and offspring in livestock has been much improved. Cloning will also be a more efficient, faster and useful way of creating transgenic fetuses for gene therapies, gene pharming, organs for xenotransplantation by preselection and mass production of transgenic embryos and consequently improving the production efficiency in transgenic animals. Further technical development of nuclear transplantation will enable large-scale production of cloned livestock and in near future the commercial cloning of animals will become a reality.

Key words : nuclear transplantation, cloning, domestic animal

서 론

인류역사상 동물의 육종번식분야에서 큰 획을 긋는 전기는 크게 세가지 기술이 혁신적으로 개발 응용되었기 때문이다. 그 첫째는 1700년대 Bakewell(영국)이 소와 면양에서 처음 실시한 교잡육종법(cross breeding technique)의 개발과 응용이고, 둘째는 1780년 Spallanzani(이테리)가 개에서 성공한 인공수정법

(artificial insemination technique)의 개발이며, 셋째는 1890년 Heape(영국)에 의해 토끼에서 시도된 수정란 이식기법(embryo transfer technique)의 개발이다. 여기서 한걸음 더 나아가 네번째의 기술혁신은 1981년 Illmensee(스위스)와 Hoppe(미국)가 생쥐에서 성공한 핵이식기법(nuclear transfer technique)의 개발이라고 본다. 이러한 인류의 과학기술개발을 통하여 젖소에서 우유생산력도 현저히 향상되었는데, 19세기에는 젖소의 년중 우유생산량은 평균 1,000 Kg 이었으나, 1990년대에 이르러서는 10,000 Kg에 육박하여 한세 기간에 무려 10배나 증가하는 생산성 향상이 이루어졌으며, 앞으로 핵이식기술이 실용화되면 연간 16,000

본 연구의 일부는 1995~1998년 농림부 첨단기술개발과 제 연구비에 의하여 연구되었음.

Corresponding author.

Kg의 우유를 생산하는 고능력 젖소에서 세포를 떼어 내어 복제젖소를 대량 생산하게 되어 우유생산력은 더욱 향상될 것이다.

핵이식기술은 전능한(totipotent) 시기에 있는 수정란의 할구세포나 개체의 체세포로부터 다수의 핵을 얻어서 이를 탈핵된 다른 난자 또는 초기 수정란에 이식시키는 기술로서, 이 기술을 응용하면 하나의 수정란으로부터 수십 내지 수백개의 동일한 성과 유전형질을 가진 복제수정란을 작출할 수가 있으며 나아가서 이들 복제수정란을 수란축에 이식하여 복제동물들을 생산할 수 있다. 1986년 영국의 학자 Willadsen 박사는 가축에서는 처음으로 핵이식에 성공하였고 이후 10년간 많은 연구가 수행되어 왔지만 고도의 숙련된 기술과 과정이 복잡한데 비하여 그 성공 효율이 수정란 하나로서 한 마리 이상의 복제산자를 생산하기 어려운데다가 기형, 난산 등 부작용이 빈번히 나타나 연구의 침체기간이 있었다. 그러던 중 1997년 영국 Roslin 연구소의 Wilmut 박사가 그의 동료와 같이 면양에서 체세포인 유선세포를 이용하여 핵이식으로 복제양을 생산하는 놀랄만한 사건이 발생하였다. 이후 복제기술은 다시금 활기를 띠게 되었다.

핵이식기술은 지금까지 인류가 개발하여 온 가축의 번식과 개량방법 중에서 가장 강력하고 효과적인 것이 될 것이다. 최근 이 기술은 인체 치료약품이나 생리활성물질의 대량생산 및 질환모델동물의 생산에 매우 긴요한 형질전환 동물의 생산에 있어서도 활용된다. 또한 죽어가는 사람에게 대체장기의 제공이 가능하고, 멸종위기의 희귀한 동물의 보존과 재현에도 활용될 수 있기 때문에 이에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 우리나라와 같이 우량 종축이 부족한 나라에서는 이 기술이 더욱 필요하다. 우량종축을 외국에서 도입하려면 많은 외화가 소요되므로 이 기술은 국내에서 자체 개발하지 않으면 안된다.

본 연재에서는 복제동물 생산기술의 목적과 활용범위, 기술의 발달역사, 복제기술의 과정과 방법, 핵이식기술의 효율, 그리고 문제점 등을 알아보려고 한다.

복제동물 생산기술의 목적과 활용

능력이 우수한 가축을 대량 생산할 수 있다.

경제적으로 유익한 가축을 위시한 각종 동물의 우량 유전자를 복제하고 선발하는데 매우 유리하여 수컷과 암컷 종축의 선발강도를 동시에 극대화 할 수 있어서 수정란 이식기술과 핵이식기법을 병용하여 유전적 소질이 극히 우수한 수정란을 다량 확대 보

급할 수 있으므로써 가축의 번식에 있어서 종래에 사용되어 오던 교배법이나 인공수정법에서 탈피하여 번식효율을 증진시키는데 새로운 전기를 마련할 수 있을 것이다.

종축 도입에 소요되는 외화를 절약할 수 있다.

특히 우리나라와 같이 우량 종축의 자원이 부족한 실정에서는 외국에서 값비싼 종축을 다량 수입하지 않고서도 짧은 기간에 종축을 증식하고 확보하는데 매우 효과적인 방법이다.

산자의 입수를 마음대로 조절하여 생산할 수 있다.

복제수정란은 이식전에 성감별이 용이하여 원하는 성의 산자를 조절하여 생산이 가능하다. 또한 체세포를 이용한 복제기술로서 암컷에서 분리한 체세포를 사용하면 100% 암컷만 태어나고, 수컷에서 분리한 체세포를 이용하면 100% 수컷만 태어난다.

복제동물은 연구에 매우 유용하게 쓰인다.

복제동물은 정교한 동물실험에서 개체간의 차이를 줄일 수 있어서 정확한 결과를 얻는데 매우 유익하게 사용될 수 있을 뿐만 아니라 실험에 사용될 동물의 수도 줄일 수 있어서 적은 반복수로 정확한 정보를 얻는 데 유익하다. 예를 들면, 젖소의 우유생산량에 관한 비교시험을 수행할 경우 복제동물 한쌍은 무작위로 선발된 젖소 20마리를 사용하여 얻은 data와 맞먹는 정보를 얻을 수 있다.

치료제 생산 및 인공장기를 제공하는 형질전환 동물 생산에 필요한 기술이다.

외래유전자 주입기법과 핵이식기법을 병용하여 인체에 유용한 유전자가 주입된 형질전환 수정란의 복제가 가능하게 될 뿐만 아니라 주입된 외래유전자의 발현을 조기에 확인하고 선별할 수 있으므로써 형질전환 동물의 작출효율을 개선시킬 수 있으므로 최근에는 이에 관한 연구가 매우 활발하게 이루어지고 있다. 형질전환 동물의 생산은 우유를 통하여 사람의 암치료제 등 고가의 유용한 치료제를 저렴하게 대량 생산하는데 매우 활용도가 높으며, 또한 인체에 이식할 수 있는 장기를 제공받을 수도 있다.

희귀한 동물의 보존과 재현에 응용할 수 있다.

멸종위기에 있는 희귀동물의 세포로부터 핵을 얻어서 이를 대량 복제한 다음 이 복제된 수정란을 정액처럼 냉동보존하면 영구적 보존이 가능할 것이다.

이 기술이 개발되면 “DNA” 나 “취라기 공원” 같은 영화에서나 볼 수 있었던 과거의 생명체 복제도 불가능하다고 단언하기 어렵게 될 것이며, 일본의 어느 학자는 시베리아에서 맘모스를 찾고 있다. 그는 맘모스 시체에서 세포의 핵을 취하여 이를 코끼리의 난자내에 핵이식을 한 다음 이를 대리모 코끼리에 이식하여 코끼리로부터 맘모스를 생산하여 보겠다고 한다.

핵이식기술의 역사

핵이식 기술에 의한 수정란의 복제 가능성은 1952년 Briggs와 King에 의하여 양서류에서 처음으로 시사되었다. 포유류에서는 Illmensee와 Hoppe(1981)가 처음으로 생쥐 수정란에 핵이식을 시도하여 성공함으로써 핵이식기법에 관심이 집중되기 시작하였다. 그러므로 포유동물에서 핵이식기법은 20년 이내의 비교적 짧은 역사를 가지고 있다. 처음에 이들이 사용한 기법은 채취된 핵을 미세한 피펫을 사용하여 난자의 세포질 내에 직접 주입하는 기법(microsurgical method)을 활용하였으나 그 성공율이 낮았고 또한 수정란에 많은 손상을 입혔다. 1983년 McGrath와 Solter는 불활화된 Sendai virus를 이용한 핵-세포질 융합법을 개발하여 핵이식기법의 개선 및 융합을 향상시켰다. 한편, Kubiak와 Tarkowski(1985)는 Zimmermann의 전기융합법을 응용하여 종래의 핵이식기법을 더욱 개선시키고 가축에서의 응용성을 높혀 산업화를 촉진하는데 더욱 이바지하게 되었다.

가축에서는 Willadsen(1986)이 면양에서 핵이식에 의한 산자생산에 성공하였다는 보고가 있는 이래, Prather 등(1987)은 소에서 이에 의한 산자생산에 성공하였으며, Willadsen 등(1991)은 소의 8- 내지 64-세포기의 핵을 이식하여 33.1%의 복제산자를 생산함으로써 핵이식기법에 의한 복제산자 생산효율이 향상되고 있다. 한편 Bondioli 등(1990)은 소의 미수정란에 16- 및 64-세포기의 핵을 이식하여 체내 발달시킨 다음 이를 다시 반복핵이식기술(recycling method)로 핵이식을 실시하여 7마리의 일란성 쌍둥이를 생산하였다고 한다. Stice 등(1993)도 소의 32-64 세포기의 핵을 3세대까지 반복핵이식을 실시하여 54마리의 송아지를 생산하는데 성공하였다는 보고가 있어 앞으로 이들 핵이식 수정란을 체내 또는 체외에서 배양하여 상실패 혹은 포배로 발달시킨 다음 이를 핵의 공급원으로 재이용하는 반복핵이식기법을 응용하면 그 수를 기하급수적으로 증가시킬 수 있을 것이다.

1997년 영국 Roslin 연구소의 Wilmut 박사 등은 면양의 체세포(유선세포)로서 처음으로 동물 복제에 성공하여 세인을 경악케 하였다. 이는 종래에 믿어왔던 동물에서는 생식세포가 아니면 생명이 창출될 수 없다고 믿었던 학설을 뒤엎는 커다란 발전이었다. 이후 많은 과학자들이 이에 관심을 가지고 열심히 연구한 결과, 1998년 미국의 Cibelli 등은 형질전환된 태아의 섬유아세포를 핵이식으로 복제하고 이를 대리모에 이식하여 형질전환된 복제 송아지 생산에 성공하였고, 일본의 Kato 등은 소의 난구세포와 난관상피세포를 이용하여 8마리의 (80% 성공률) 복제 송아지 생산에 성공하였다.

국내에서는 이철상 등(1989)과 최상용 등(1989)이 처음으로 핵이식에 의한 28마리의 복제생쥐 생산에 성공하였다는 보고가 있었다. 본 연구자는 1994년 핵이식기술로 토끼에서 복제산자에 성공하였다. 황우석교수 연구팀은 1998년 소에서 핵이식으로 복제 송아지 생산에 성공하였고, 1999년 2월 12일(조선일보; 1999년 2월 20일자) 세계에서 4번째 국가로 젓소에서 체세포복제(난구세포)로 “영롱이”를 탄생시키는데 성공하였으며, 이어 1999년 3월 27일(조선일보; 1999년 4월 3일자) 한우에서도 성공하여 이 송아지는 “진이”라는 이름을 받았다.

동물 품종별 복제동물 생산 성공 예를 열거하면 Table 1과 같다.

복제동물 생산기법

일반적으로 세포분화가 일어나기 전의 분할기에 있는 포유동물 수정란의 할구세포들은 완전한 개체를 이룰 수 있는 전능성(totipotency)을 가지고 있어서 하나의 할구세포만으로도 배반포를 형성하고 나아가서 한 개체로 생산이 가능한 것으로 알려져 있다. 이론적으로 분할기에 있는 수정란의 핵 하나 하나는 서로 같은 유전자를 가지고 있으므로 하나의 수정란으로부터 유래된 개체들은 같은 성, 표현형 및 유전형질을 가지고 태어난다. 복제동물을 생산하는 기법으로는 수정란 양분법, 할구분할법 및 핵이식기법 등이 개발되어 왔다(Table 3).

수정란 양분법

유전적으로 동일한 동물을 생산하기 위한 하나의 수단으로서 수정란의 양분에 의한 일란성 쌍태 생산기법이 연구되어 왔다. 이 방법은 주로 상실패기 또는 배반포기 수정란을 미세 조작 또는 급속 칼로서

Table 1. Brief history of development of nuclear transplantation technique in production of cloned animals

Year	Researchers	Nation	Species	Remarks
1952	Briggs & King	U.S.A.	Frog	Firstly succeeded in production of cloned animal(frog) by NT.
1981	Illmensee & Hoppe	Switzerland, U.S.A.	Mouse	Firstly succeeded in production of cloned mammals (mouse) by NT.
1982	Zimmermann & Vienken	Germany		Developed electrofusion technique.
1983	McGrath & Solter	U.S.A.	Mouse	Developed fusion technique with Sendai virus.
1985	Kubiak & Tarkowski	Poland	Mouse	Firstly succeeded in production of cloned mammals (mouse) by electrofusion technique
1986	Willadsen	England	Sheep	Firstly succeeded in production of cloned domestic animals (sheep) by NT.
1986	Willadsen	England	Cattle	Firstly succeeded in production of cloned cattle by NT.
1988	Stice & Robl	U.S.A.	Rabbit	Firstly succeeded in production of cloned rabbits by NT.
1989	Prather <i>et al.</i>	U.S.A.	Pig	Firstly succeeded in production of cloned pig by NT.
1990	Bondioli <i>et al.</i>	U.S.A.	Cattle	Production of 92 calves by recycling NT.
1993	Barnes <i>et al.</i>	U.S.A.	Cattle	Firstly succeeded in production of cloned calves with IVP oocytes by NT.
1991	Stice <i>et al.</i>	U.S.A.	Cattle	Succeeded in production of cloned calves with 3rd generation NT embryos.
1993	Stice & Keefer	U.S.A.	Cattle	Production of 54 cloned calves by recycling NT.
1994	Keefer <i>et al.</i>	U.S.A.	Cattle	Firstly succeeded in production of cloned calves by NT of cells from inner cell mass.
1997	Wilmut <i>et al.</i>	England	Sheep	Firstly succeeded in production of cloned mammals (mouse) by NT of somatic cells(mammary gland cells)
1998	Wakayama <i>et al.</i>	U.S.A.	Mouse	Succeeded in production of 50 cloned mouse by recycling NT(5 generation) of mouse cumulus cells.(Cumulina)
1998	Cibelli <i>et al.</i>	U.S.A.	Cattle	Succeeded in production of cloned calves by NT of transgenic fetal fibroblasts.
1998	Kato <i>et al.</i>	Japan	Cattle	Firstly succeeded in production of 8 cloned calves by NT of cumulus cells and oviductal epithelial cells.

Table 2. Brief history of development of nuclear transplantation technique in Korea

Year	Researchers	Species	Remarks
1989	이철상 <i>et al.</i> , 최상용 <i>et al.</i>	Mouse	Firstly succeeded in production of cloned mammals (mouse) by NT in Korea.
1994	이효중 <i>et al.</i>	Rabbit	Firstly succeeded in production of cloned rabbits by NT in Korea.
1995	황우석 <i>et al.</i>	Cattle	Firstly succeeded in production of a cloned calf by NT in Korea.
1999	황우석 <i>et al.</i>	Cattle	Firstly succeeded in production of calves by NT of somatic cells(cumulus cells) in Korea.

양분하고 이를 체외배양으로 온전한 상태로 발달시킨 다음 이를 대리모의 자궁에 이식하여 일란성 쌍자를 생산하였다. 그러나 이기법으로서는 하나의 수정란으로부터 최대한 복제 생산할 수 있는 산자의 수는 2 내지 4마리 밖에 되지 않는 한계점이 있다.

할구분할법

Johnson 등(1995)은 4-세포기의 소 수정란에서 할구세포를 분할하여 이를 대리모에 이식하여 4마리의 송아지를 생산하는데 성공하였다. 그러나 대체로 할구분할법으로는 한 마리 이상의 산자를 생산하기에는 어려운 것이 현기술의 제한 점이다.

Table 3. Efficiency of production of cloned animals by embryo bisection, blastomere separation and nuclear transplantation

Cloning methods	Usable donor embryos or cells	Production efficiency
Embryo bisection	2-cell stage~blastocyst stage	1.5 heads (maximum: 4 heads)
Blastomere separation	2-cell stage~blastocyst stage	2-cell stage: 66% (1.3 heads)
		4-cell stage: 50% (2 heads)
		8-cell stage: 5% (0.4 head)
Nuclear transplantation	Early embryos~adult somatic cells	Unlimited

Table 4. Production efficiency of cloned animals by using embryonic, fetal or adult somatic cells as nuclear donor

Species	Cell types	Efficiency				Year	References
		Cloned embryos	Pregnancy rates	Offspring rates	Total efficiency		
Mouse	Embryonic blastomere	96%		16%	15.4%	1981	Illmensee & Hoppe
Mouse	Cumulus cell	67%		2.8%	1.88%	1998	Wakayama <i>et al.</i>
Rabbit	Embryonic blastomere	35%		4.7%	1.65%	1996	이효중 <i>et al.</i>
Sheep	Embryonic blastomere	55.4%		15.8%	8.75%	1994	Campbell <i>et al.</i>
Sheep	Mammary gland cell	10.5%	7.7%	3.4%	0.36%	1997	Wilmur <i>et al.</i>
Cattle	Morula blastomere	30%	50%	10%	3.0 %	1993	Stice & Keefer
Cattle	Fetal fibroblast	12%	55%	10.7%	1.28%	1998	Cibelli <i>et al.</i>
Cattle	Ear cell	52%	42%	?		1999	Zakhartchenko
Cattle	Fetal muscle cell	5.8%	25%	?		1999	Vignon <i>et al.</i>
Cattle	Fetal skin cell	9.6%	9%	?		1999	Vignon <i>et al.</i>
Cattle	Cumulus cell	49%	83%	83% (5/6)	40.7%	1999	Kato <i>et al.</i>
Cattle	Oviductal epithelial cell	23%	75%	75% (3/4)	17.3%	1999	Kato <i>et al.</i>

할구세포의 분리 배양법에 의하여는 2-세포기의 수정란에서 분리된 할구세포는 비록 세포수는 정상보다 적지만 배반포를 형성하고 이들은 이식하면 정상에 가까운 수태율(약 66%)을 나타낸다. 또한 4-세포기의 수정란에서 분리된 4개의 할구세포도 각각 배반포를 형성하지만 그 형성율은 낮아지고, 세포수도 정상 배반포에 비하여 약 1/4 밖에 되지 않으며 이들을 이식하면 수태율은 약 50%로 떨어진다. 그러나 8-세포기의 수정란으로 분리된 8개의 할구세포는 극히 일부분만 배반포를 형성하고 이들을 이식하면 수태율은 약 5% 밖에 되지 않는다(Willdsen, 1989). 그러므로 수정란의 양분법이나 할구세포의 분리배양법으로는 효과적으로 복제동물을 생산할 수 없다.

핵이식기법

핵이식기법을 활용하면 수정란의 양분법이나 할구세포의 분리배양법보다 더욱 효과적으로 복제동물을 생산할 수 있다. 핵이식기법은 처음에는 수정란의 할구세포를 분리하여 핵의 공급원으로 사용하여 왔으나 최

근에는 체세포를 이용하는 기술이 개발되어 무한정 복제수정란의 작출이 가능하게 되었다. 핵이식 기법을 시행하기 위하여는 많은 핵을 공급할 수 있는 수정란의 확보가 중요하다. 이론적으로 분할 후기에 있는 수정란에서 핵을 채취할 경우 유전적으로 동일한 핵의 공급수는 많아지고 따라서 복제동물의 생산효율도 높아질 수 있다. 그러나 분할과정이 더욱 진행된 핵을 사용할 수록 핵융합 성공률 및 복제수정란의 발달능력은 줄어드는 것으로 알려져 있다. 이러한 문제점들도 최근 연구보고에 의하면 체세포 핵이식기술이 발달하면서 매우 향상되고 있으므로 곧 극복될 것으로 본다.

핵이식 방법

소에서 핵이식에 의한 복제 송아지 생산과정은 Fig. 1과 같으며 이를 설명하면 다음과 같다.

수핵 난자(recipient oocyte)의 준비

난포란을 채란하여 체외성숙 배양액에서 22~24

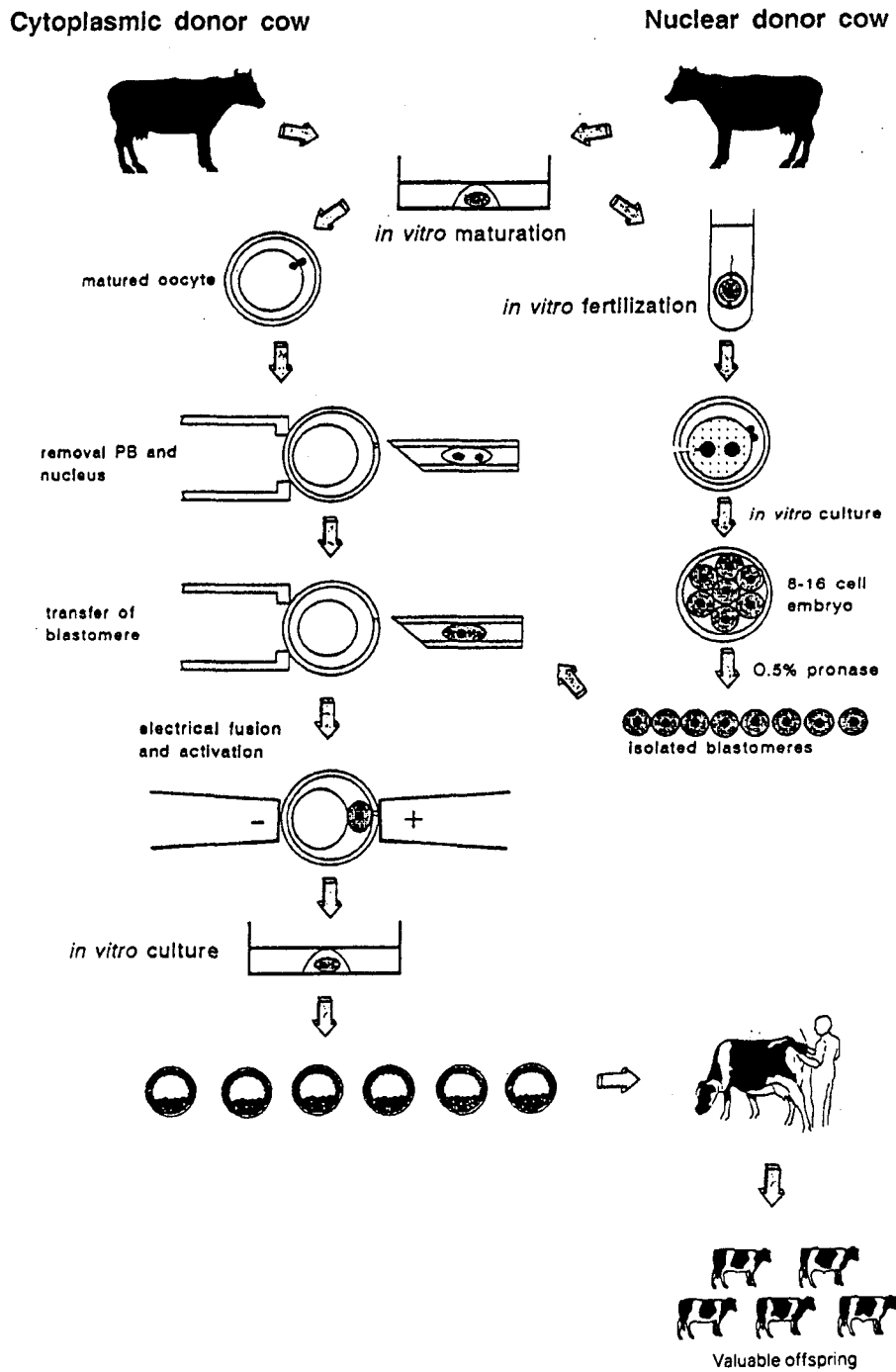


Fig. 1. Procedure for production of cloned calves by nuclear transplantation.

시간 체외성숙된 난자를 300 IU hyaluronidase 용액으로 난구세포를 제거한 후 제 1 극체가 방출되

고 세포질이 충실해 보이는 것만을 수핵난자로 공시한다.

공핵 수정란 또는 체세포의 준비

산자의 유전형질을 결정할 핵의 공급원은 다음과 같이 여러 가지 형태의 수정란의 할구세포 또는 체세포를 분리하여 사용할 수 있다. 핵이식기술의 초기에는 주로 초기 수정란에서 전능성이 있는 할구세포를 분리하여 사용하였으나 근래에는 태아 또는 성체의 체세포를 분리하여 핵 공급원으로 사용하는 연구가 활발하다.

공핵 수정란의 할구 분리

소에서는 16~32세포기의 수정란을 pronase 용액(300 IU/ml)에 3분간 처리하여 투명대를 연화시킨 다음, Ca^{++} 및 Mg^{++} free-PBS에서 pipetting을 하여 응집된 할구를 분리하고 TCM-199 배양액에 세척한다.

· 할구 분리시키는;

- ① cell cycle을 G1기로 할 경우 : 8~16세포기배의 할구를 분리하여 colcemide 용액에 10 시간 처리한 후 apidicolin 용액에 2시간 처리하여 정확하고 균일하게 할구분열이 된 것만을 핵이식 후 30분 이내에 융합까지 실시한다.
- ② cell cycle을 S기로 할 경우 : 핵이식을 하여 융합하기 바로 전에 실시한다.

미세조작에 의한 탈핵 및 핵의 주입

수핵 난자 탈핵 및 공핵 수정란의 할구주입은 McGrath와 Solter(1983)의 비과과적 방법이 주로 활용되고 있다.

수핵 난자의 탈핵: 난자의 성숙 후 22~24시간에 수핵 난자를 성숙 배양액에서 꺼집어 내어 cytochalasin B (Sigma, 미국)가 7.5 μ g/ml 함유된 PBS 배양액에 미세조작 10분전에 전처리 한다. 미세조작을 위하여 Narishige micromanipulator (Narishige, 일본)를 Nikon Diaphot(DIC) 도립 현미경(Nikon, 일본) 위에 장치. enucleation pipette 쪽에 제 1극체 부분이 보이도록 holding하고 제 1극체와 그 주위 ooplasm의 약 1/4을 뽑아 낸다. 탈핵된 부분을 Hoechst 33342 용액으로 염색하여 탈핵의 여부를 형광현미경하에서 관찰한다. 탈핵된 수핵난자는 TCM-199(with 10% FCS) 배양액에서 다음 단계인 전기자극할 때까지 배양한다.

핵이식: 수핵 난자의 전기자극 2시간 후에 cytochalasin B가 5 μ g/ml 함유된 D-PBS 배양액에 전기자극 받은 수핵난자와 분리된 할구를 넣는다. 수핵난자를 holding pipette으로 탈핵시 enucleation pipette의 절립에 의해 생긴 투명대의 작은 흔적이 injection

pipette으로 향하게 하고 injection pipette으로 할구를 흡입하여 투명대의 작은 구멍으로 조심스럽게 주입한다.

탈핵된 수핵 난자의 전기자극에 의한 활성화

탈핵 후 6시간 배양되고 있는 수핵난자를 100 μ M $CaCl_2$ 및 $MgCl_2$ 가 함유된 0.28 M Mannitol 용액에서 0.75~1.0 kV/cm, 60 μ sec, 1회 전기자극을 실시하여 전활성화를 실시하기도 하고 근래에는 ionomycin 또는 6-dimethylaminopurine을 사용하여 화학적 활성화를 유도하기도 한다.

전기핵융합

0.28 M Mannitol 용액에 핵이식된 난자를 세척하고 5분간 평형을 시킨 후 미소적의 mannitol 용액으로 옮겨 Embryonic Cell Fusion Equipment (ECM 200, BTX Co.U.S.A.)를 사용하여 0.75~1.0 kV/cm, 60 μ sec의 전기를 통전하여 핵의 융합을 유도한다.

핵이식 수정란의 체외배양

핵이 융합된 수정란 15개 전후를 50 μ l의 체외배양액 (TCM-199 배양액)에 넣고 39°C의 CO_2 배양기에 넣어 5~7일간 배양하여 상실배기 또는 배반포기까지 키운다.

핵이식 수정란의 수란우 이식과 산자생산

소 수정란을 수란우의 자궁내에 이식하는 방법은 수술적 방법과 비수술적 방법이 있다. 1970년대의 초기에는 전신마취에 의한 정중선 절개로써 난의 회수와 이식이 행하여졌다. 그 후 경비와 시간을 절약하기 위해 여러방법이 검토되었지만 수정란 이식은 전신마취보다 간단한 국소마취에 의한 겸부개복수술로 바뀌어갔다. 그러나 근래에는 마취나 수술도 하지 않고 인공수정의 직장, 질법에 준한 자궁경관 경유법으로 이식하는 방법이 개발되어 널리 이용되고 있다.

반복핵이식 기술의 개발

핵을 다량 확보할 수 있는 효과적인 방법 중 하나는 반복핵이식기법 (recycling nuclear transplantation)을 활용하는 것이다. 반복핵이식기법은 일차로 핵이식으로 발달된 상실배 또는 배반포기의 수정란(제 1세대)을 핵의 공급원으로 재사용하고 이들을 배양하여 상실배 또는 배반포(제 2세대)로 발달시켜 또다시 핵의 공급원으로 재사용하는 기법으로서, 하나의 수

정란으로 많은 산자를 생산하는 데에 효과적인 방법이다. 이 기법은 Willadsen(1989)에 의하여 소의 수정란을 사용하여 최초로 실험적 연구에 성공함으로써 실현 가능성이 입증되었다. Bondioli 등(1990)은 소의 미수정란에 16- 및 64-세포기의 핵을 이식하여 체내 발달시킨 다음 이를 다시 핵공급원으로 사용하는 반복핵이식기술을 실시하여 7마리의 일란성 쌍둥이를 생산하였다고 한다. Stice 등(1993)도 소의 32-64 세포기의 핵을 3세대까지 반복핵이식을 실시하여 54마리의 송아지를 생산하는데 성공하였다. Lewis 등(1998)은 소 수정란을 3세대까지 반복핵이식을 실시하였던 바, 핵 융합률, 체외 배반포 발달률에 있어서는 차이가 없었다고 한다(Table 5). 앞으로 이들 핵이식 수정란을 체내 또는 체외에서 배양하여 상실배 혹은 포배로 발달시킨 다음 이를 핵의 공급원으로 재이용하는 반복핵이식기법을 응용하면 그 수를 기하급수적으로 증가시킬 수 있을 것이다. 이러한 반복핵이식 기법을 활용하면 핵을 무한정 공급받을 수 있겠으나, 핵이식을 여러번 반복하더라도 이들 수정란의 세포들이 전능성을 유지해나갈 수 있을런지에 대하여는 의문의 여지가 있다. 그리고 Table 6에 나타난 바와 같이 핵이식을 반복하면 할수록 핵 융합률 및 상실배-배반포 발달률에는 영향이 없으나 산자생산효율은 매우 낮아지므로 이를 극복하기 위한 기술개발이 필요하다.

Table 5. Developmental rates of bovine embryos following 3 consecutive recycling nuclear transplantation

Generation of nuclear donor	Fusion rate (%)	No. of embryos developed to	
		Cleaved (%)	Morulae/blastocysts(%)
1st generation	88	63	23
2nd gen. NT embryo	97	88	29
3rd gen. NT embryo	89	92	37

(Lewis et al, 1998)

Table 6. Production efficiency of cloned animals by recycling nuclear transplantation

Generation of nuclear donor	Cloned embryos production efficiency(%)	Production efficiency of cloned calves			
		No. of embryos transferred	Recipient cows	New-born calves	Production efficiency(%)
0 gen. IVP embryo	30%	-	7/14(50%)		15%
1st gen. NT embryo	17%	80	50	8	10%
2nd gen. NT embryo	36%	48	32	1	2%
3rd gen. NT embryo	22%	29	25	1	3%

(Stice & Keefer, 1993; Itoh et al, 1998)

핵-세포질 융합 기술 (Nuclear-cytoplasmic fusion techniques)

핵이식 기법에서 핵-세포질 융합 기술은 수정란의 미세조작기술과 아울러 매우 중요한 요건이며 융합율의 개선은 특히 대가축의 핵이식 기법 발달 및 상업적 실용화에 필수적 관건이 된다. 핵-세포질 융합 기술은 다음 3가지 방법이 고안되어 활용되어져 오고 있다.

세포질내 직접주입법(intracytoplasmic injection method)

이 방법은 제일 먼저 고안된 방법으로서 1955년 Danielli 등이 Amoeba의 핵이식에 사용되어 오던 것을 1981년 Illmensee와 Hoppe가 생쥐 수정란의 핵이식에 응용하였다. 공핵수정란 (nuclear donor embryo)의 투명대를 제거하고 내세포외 할구세포를 분리한 다음, 이를 micro transfer pipette에 흡인하여 탈핵된 수핵난자(nuclear recipient oocytes)의 투명대와 형질막을 관통하여 세포질내에 직접 핵을 주입하는 방법이다. 이 방법은 근래 사람에서 정자감소증에 의한 불임을 치료하기 위하여 정자의 난자내 직접주입법(ICSI, Intracytoplasmic sperm injection)이 개발되면서 다시 연구개발되기 시작하여 성공률이 많이 향상되고 있다(Rho 등, 1998).

센다이 바이러스 매개에 의한 방법(Sendai virus-mediated fusion method)

이 방법은 McGrath와 Solter(1983)가 고안한 방법으로서 미세외과적 방법에 비하여 비파괴적이며 핵 융합율도 90% 이상으로 높다. 직경 15 μm 전후의 micropipette을 투명대에 통과하여 삽입하고 형질막은 관통하지 않은 상태에서 핵 부근으로 micropipette을 이동시킨 다음 약한 음압으로 형질막에 쌓인채로 핵을 채취한다.

채취된 핵은 미량의 1,000 HAU 이상의 역가를 가진 불활화된 Sendai virus와 같이 탈핵된 수핵수정란의 투명대와 형질막 사이에 주입하면 1시간 이내에 핵-세포질 융합이 일어난다. 물론 이러한 과정을 거치는 동안 수정란은 5~7.5 Unit의 Cytochalasin B 처리를 받게 된다. Sendai virus에 의한 핵융합법은 virus의 준비에 시간과 노력이 많이 들고, Parainfluenza virus 이기 때문에 사람에게 감염의 우려가 있으며, 효능이 균일하지 않고, 한번 핵이식에 사용된 수정란을 재사용하였을 때에는 세포표면 receptor의 손실로 인하여 핵융합율이 급격히 떨어지는 단점들이 있다. 그러므로 이 방법은 생쥐에서는 많이 이용되어 왔으나 가축에서는 잘 이용되지 않고 있다.

전기적 방법(Electrofusion method)

이 방법은 Zimmermann과 Vienker(1982)가 분화된 동물세포 및 식물의 원형질체(protoplast)의 융합에 쓰이던 것을 Kubiak와 Tarkowski(1985)가 생쥐 수정란의 핵이식에 응용하여 성공함으로써 널리 보급되어 오고 있다. 이 방법은 Sendai virus-mediated fusion method에 비하여 훨씬 조작이 간편하고 융합율도 70~90%를 보이고 있으므로 가축에 있어서는 이 방법이 보다 실용적이며 효과적이다.

전기적 방법을 사용하기 위하여서는 우선 Zimmermann Cell Fusion Unit(GCA Corp. Chicago, U.S.A.) 또는 BTX Electro Cell Manipulator(BTX Co. San Diego, U.S.A.) 같은 전기 핵융합장치가 필요하다. 미세조작에 의하여 핵이 주입된 수정란을 Zimmermann Cell Fusion medium 이나 0.35 M mannitol 용액에 넣어 fusion chamber에 담아서 교류전류(600~1,000 kHz, 5~6 V)를 주어서 수정란을 일렬로 정렬시킨 다음 직류전류(15~160 V, 30~150 μ Sec)를 주어서 핵-세포질 융합을 유도한다.

핵이식 수정란의 체내·외 배양과 발달

핵이식된 수정란의 체내배양은 면양과 토끼의 난관이 많이 이용된다. Willadsen(1986)은 8- 또는 16- 세포기의 수정란유래 할구세포를 핵이 있는 미수정란 또는 탈핵된 미수정란에 주입하고 Sendai virus 또는 전기융합방법으로 핵-세포질 융합을 유도한 다음 한천에 포매하여 면양의 난관내에 주입하여 체내배양을 시행하였던 바, 8-세포기의 수정란유래 할구세포의 핵과 탈핵된 미수정란의 세포질로서 이루어진 핵이식 수정란은 Sendai virus로 핵융합을 유

도한 경우 33.3%가, 전기융합을 유도한 경우 42.1%가 배반포로 발달하였고, 16-세포기 수정란유래 할구세포의 핵과 탈핵된 미수정란의 세포질로서 이루어진 핵이식 수정란은 48.3%가 배반포로 발달하였다고 한다.

생쥐에서는 핵이식된 수정란을 체외배양하면 배반포로의 발달이 용이하게 일어나고 비교적 다른 동물에 비하여 발달율도 높다. Robl 등(1986)은 2-세포기의 핵을 탈핵된 수정란에 이식하였을 때 8-세포기의 핵을 이식하였을 때보다 체외에서 배반포 형성율이 높다고 하며(93% vs 48%), 발달된 수정란으로부터 공급받은 핵일수록 체외발달능력이 떨어지는 현상을 Tsunoda 등(1987), Kono와 Tsunoda(1989) 및 Park 등(1990)에 의하여 재확인 되었다.

발달된 수정란의 핵일수록 일정한 기간 배양 후 분열된 핵의 수는 정상 수정란에서의 핵의 수보다 적은 경향이 있다(Robl *et al.*, 1986; 박 등., 1990). 그리고 핵이식된 배반포는 정상 배반포에 비하여 유의적으로 적은 수의 할구세포를 가지고 있으므로 발달의 저조성을 나타내고 있으며 따라서 이들 핵이식 수정란을 체내이식하면 수태율 및 산자생산율도 낮아진다.

Prather 등(1987)은 핵이식된 소 수정란의 체외배양 성적이 낮아 체내배양법을 활용하였는데, 면양의 난관내에서 발달시켰던 바 20%가 상실배 또는 배반포로 발달하였다고 한다. 그 후 체외배양기법이 발달하면서 Bondioli 등(1990)은 35%의 상실배 또는 배반포 발달율을 얻었다. 소에서는 8-세포기에 발달이 중지되는 "Cell block" 현상이 있으므로 이들의 배반포 형성율은 더욱 낮아질 것이다. 최근 Kato 등(1999)은 일본 화우의 난구세포로 핵이식을 하여 체외배양으로 49%의 배반포 발달율을 얻었다고 하며, Zakharchenko 등(1999)도 소의 귀에서 채취한 체세포로서 핵이식을 하고 이를 체외 배양하였던 바, 이들 중 48%가 부화단계의 배반포로 발달하였다고 한다. 또한 이들의 이식후 수태율도 많이 향상되고 있다. 이와 같이 근래에 소, 돼지, 면양 등 가축 수정란의 체외배양기법이 눈부시게 발달되고 있으므로 앞으로 핵이식 수정란의 체외배양기법도 향상되어질 것이며 따라서 복제수정란 및 복제산자 생산효율도 높아질 것이다.

복제수정란의 이식후 수태율

Table 4에 나타난 바와 같이 복제수정란의 생산효율은 생쥐에서는 96%, 면양에서는 55.4%, 토끼에서

는 48%, 소에서는 49% 등 상당히 높아서 하나의 수정란으로 2개 이상의 복제수정란을 만들 수 있다. 특히 미국 ABS Specialty Genetics 사의 Stice와 Robl(1993)은 하나의 수정란을 가지고 반복핵이식기법으로 54개의 수정란을 만들었다. 그러나 이러한 복제수정란은 이식후 수태율이 매우 낮아서 20%를 상회하지 못하여 하나의 수정란으로 2마리 이상의 쌍둥이를 생산하는 것이 용이하지 못하여 왔다. 발달 후기의 수정란이나 내세포괴 또는 체세포를 이용하면 핵의 공급수는 무한히 증가시킬 수 있으나 복제수정란 및 산자 생산효율이 매우 낮아졌기 때문이다. 그러나 최근 일본의 Tsunoda 박사 실험실에서는 소의 체세포(난구세포 및 난관세포)로서 복제실험을 하였는데, 핵융합율은 47%로 비교적 낮지만 체외 배반포 발달율은 49%로 매우 향상된 성적을 얻었다. 또한 이들을 대리모에 이식하여 산자생산율을 80%까지 향상시켰다고 한다. 이는 매우 경이적인 성적이다. 이를 총생산율로 따지면, 100개의 체세포로서 18마리의 복제 송아지를 생산할 수 있다는 것을 나타낸다. 앞으로 체세포는 무한정 공급받을 수 있으므로 암소의 체세포를 이용하면 암컷만, 그리고 수컷의 체세포를 이용하면 수컷만을 선택적으로 생산할 수 있어 성감별이 필요하지 않게 되며 한 마리의 극히 우수한 젖소로서 무한정의 복제 송아지를 생산할 수 있을 것이다.

형질전환 동물 생산에의 응용

근래에 형질전환동물의 생산기술이 개발되어 연구 차원을 넘어서 일부 산업목적으로 활용하기에 이르렀다. 이 기술은 최근 10년간에 두드러진 발전을 거듭하여 미세주입법(microinjection)에서부터, transfection, viral vector 및 정자를 매개로 하는 방법 등 여러가지 유전자이식기술 (gene transfer techniques)이 개발되고 또한 PCR 분석 등을 통하여 주입된 외래유전자의 조기 확인과 선별이 가능하게 되어 형질전환동물생산 효율이 크게 향상되고 있다.

최근에는 태아의 세포(embryonic stem cells, fetal fibroblasts)에 유전자를 transfection 시킨 다음 이를 핵이식으로 복제하여 형질전환동물의 생산효율을 더욱 증가시키는 방법을 연구하는 사람이 많다. Scnieke 등(1997)은 면양에서 태아의 fibroblast에 사람의 혈액응고인자 유전자를 transfection 시킨 다음 이를 핵이식으로 복제하여 형질전환 면양을 생산한 바 있다. 그러나 이들은 수정란에서 이식전에 유전자 발현을

조기에 확인하지는 못하였다. 유전자가 주입된 수정란을 체외에서 발달시킨 다음 이들로부터 할구를 분리하여 핵이식을 실시한 연구보고는 흔하지 않다. Krisher 등(1995)은 WAP-hPC 유전자를 소 수정란에 주입하고 이들을 체외배양한 다음 이들로부터 할구 세포를 분리하여 핵이식을 실시한 후 이들의 발달능력을 조사하여 본 바, 13.1%가 상실배기 또는 배반포기로 발달하였다고 하며, 할구세포를 분리하여 핵이식을 실시한 후 이들의 발달단계별로 PCR-screening을 하여본 바, 상실배기 또는 배반포기 수정란에서는 90% 이상 양성으로 나타났으나 이들을 핵이식한 후 복제된 상실배기 또는 배반포기 수정란에서는 32.4%만이 양성으로 나타났다고 한다. 본 연구자는 MT-hGH 유전자를 토끼 수정란에 주입하고 8-, 16-세포기로 자란 토끼 수정란을 핵이식으로 복제하고 이들을 체외에서 배반포기까지 자란 것을 PCR-screening으로 유전자를 검출하였던 바, 각각 23 및 33%의 양성율을 보였다(Table 7 참조).

Ikawa 등(1995)은 GFP gene을 유전자전환 동물의 marker로서 유익하다고 주장한 바 있다. 그들은 생쥐를 대상으로 GFP gene을 166개의 수정란 전핵내에 주입하고 이를 이식하여 16(9.6%) 마리의 산자를 생산하였는데 그 중, 3마리(1.8%)의 조직에서 GFP 유전자의 발현이 확인되었다고 한다. 본 연구자는 GFP 유전자 양성인 상실배기 토끼 수정란의 할구를 사용하여 핵이식을 실시하였던 바, 이들 핵융합이 일어난 61개의 수정란 중 13개(23%)가 체외에서 배반포기까지 자랐다. 또한 이들을 형광현미경으로 GFP 유전자 발현을 조사하였더니 13개 모두(100%) 양성을 나타내었다(Table 8 참조). 앞으로 GFP 유전자를 reporter gene으로 활용하면 형질전환 수정란의 복제효율이 높아질 것으로 보며, 나아가 이들을 이식전에 용이하게 선별할 수 있으므로써 형질전환 동물의 복제생산에

Table 7. PCR analysis of blastocysts cloned with MT-hGh gene-injected donor embryos by nuclear transplantation in rabbits

Cell stage of donor nuclei	No. of NT blastocysts analyzed	PCR analysis	
		Positive(%)	Negative(%)
8-cell	22	5(23) ^a	17(77)
16-cell	21	7(33) ^a	14(67)
Total	43	12(28)	31(72)

*The values with same superscript within column were not significantly different ($P < 0.05$).

Table 8. Efficiency of cloning of GFP transgenic embryos by nuclear transplantation

Nuclear donor embryos	No. of oocytes used	No. of oocytes fused (%)	No. of blastocysts(%)	
			Developed	GFP positive
GFP+morula	78	61(78.2)	13(21.3)	13(100)

도 유익하게 활용될 수 있을 것으로 본다.

형질전환동물을 복제생산하는 기술이 개발되면, 이는 복제기술의 단점을 보완할 뿐만 아니라 아직은 낮은 수준과 많은 시간 및 막대한 비용이 소요되는 형질전환동물생산 기술의 단점도 서로 보완될 수 있다고 본다. 아직까지는 형질전환된 수정란을 핵이식으로 복제하고 이들을 대리모에 이식하여 복제된 형질전환동물을 생산하는 연구는 미진하여 앞으로 이에 관한 연구가 많이 수행되어야 할 것이다. 재조합 유전자가 주입된 수정란에서 외래 유전자의 통합 또는 발현에 대한 조기감별과 아울러 핵이식기법을 활용하여 유전자전환 수정란의 수많은 복제를 이룩하면 수란축의 수요를 기존의 1/10 이하로 경감시키고, 따라서 형질전환동물의 생산효율을 10배 이상 증가시킬 수 있을 것이다.

복제기술의 문제점

핵이식으로 수정란을 복제하고 이를 대리모의 자궁에 이식하여 산자를 생산하는 과정은 다음과 같이 복잡하고 고도의 숙련이 필요하며, 복제산자 생산효율을 더욱 향상시켜야 하고, 몇가지 문제점도 해결하여야 실용화가 더욱 앞당겨질 것으로 예상된다. 또한 복제기술에 대한 종교적, 사회적 인식도 고취되어야만 한다.

복제동물 생산 과정이 복잡하며 고도의 숙련된 기술이 필요하다.

핵이식 기술은 개체로 발달할 수 있는 전능성이 있는 핵공급원과 수핵난자의 다량확보가 우선 필요하고, 핵의 분리, 미세조작에 의한 탈핵과 핵주입, 핵과 세포질의 동기화, 난자의 활성화, 핵융합, 체외배양, 및 이식후 산자생산 등 복잡한 과정을 거쳐야 하며 고도의 기술이 겸비되어야 한다.

고가의 장비가 필요하다.

핵융합장치, 미세조작기, 현미경, 체외배양기 등 고가의 장비가 구비되어야 한다.

세포와 핵이 난관을 살아있는 상태에서 무균적으로 조작하여야 한다.

모든 과정을 살아있는 상태에서 무균적으로 조작하여야 하는 어려움이 있다.

복제수정란 및 복제산자 생산효율이 낮다.

최근 이 기술이 매우 빨리 향상되고 있기는 하지만 산자생산 효율을 더욱 향상시켜야 실용화가 가능하다고 본다.

복제산자의 유산, 기형, 난산 및 번식력의 저하

핵이식 수정란을 대리모에 이식하면 유산율이 상대적으로 높고 태아가 커서 정상분만이 어려워 제왕절개술로 분만시켜야 하는 경우도 있다고 한다(난산: 20%). 그리고 태어난 송아지는 기형이 발견되거나 번식력의 저하 등이 따른다는 보고가 있어 왔다. 기형이 발생하는 원인에 관하여는 아직 정확하게 밝혀져 있지 않다. 근래에는 복제기술이 개발되면서 이러한 부작용이 점차 줄어들고 있어서 앞으로 큰 문제는 되지 않을 것으로 본다.

인간복제에의 이용 가능성과 종교 사회적 인식의 고취

인간계승 프로젝트가 마무리되면 탁월한 능력을 발휘하는 염기서열을 확인하고 이를 가진 유전자를 만들어서 아인슈타인의 머리와 랍보의 육체를 지닌 복제인간을 창조할 수 있을 것이라고 믿고 있다. 그러나 인간은 우수한 육체나 지능을 발휘할 수 있는 유전능력을 전달 받을 수는 있더라도 생후에 교육과 훈련이 인간 형성에 더욱 중요하므로 이 지구상에 똑같은 아인슈타인이나 히틀러를 재현하기는 거의 불가능할 것이다. 이러한 점이 인간과 동물의 차이점이다. 이제까지 신의 영역이라고만 여겨왔던 생명 창조 신비가 허물어 지면서 생명에 대한 고귀함과 가치를 상실하지 않을까 우려하는 여론이 많아 생명 복제를 규제하여야 한다는 목소리도 높다. 미국 의회에서는 사람을 실제로 복제하는 것은 법으로 금지하고 있으나 인간복제에 관한 연구차원에서 실험은 허가하고 있다. 그것은 이 기술이 앞으로 인류에게 도움이 되는 기술로 발전할 수 있는 가능성을 가지고 있기 때문이다.

복제동물로부터 생산된 제품에 대한 기피반응

복제동물을 식용에 직접 제공하거나 이들로부터 생산된 축산물을 소비자들이 구입을 기피할 수도 있

으므로 이에 대한 인식의 고취도 필요하다고 본다.

결 론

복제동물 생산기술은 가축의 번식기술 중에서 가장 짧은 기간에 한 마리의 우량 가축으로부터 많은 산자를 얻을 수 있는 장점을 가지고 있으므로 가축의 형질을 빨리 개선하고 번식효율을 향상시키는데 매우 효과적으로 활용될 수 있는 최신 기술이다. 국내에서도 이미 체세포 복제에 의한 복제송아지 생산에 성공하였다. 이는 특히 우리나라와 같이 우수한 종축이 적은 상황에서 매우 긴요하다. 그러므로 무한 경쟁시대에 접어드는 상황에서 국내 축산업의 취약성을 보완하고 생산성을 높이며 경쟁력을 향상시키기 위하여 더욱 많은 연구개발과 효율향상이 절실하다고 본다.

현재 핵이식기법의 응용에 의한 복제수정란의 작출효율은 소에서는 49%, 돼지에서는 21%, 면양에서는 58% 및 토끼에서는 36%에 이르는 수준이다. 또한 핵이식기법에 의한 복제산자의 생산효율은 소에서는 40.7%, 돼지에서는 4%, 면양에서는 9%, 산양에서는 19%에 이르는 수준이다. 최근 체세포를 이용한 복제기술이 개발되어 이에 관한 연구가 많이 이루어지고 있어서 곧 팔목할만한 기술향상과 아울러 생산효율이 향상될 것으로 기대된다. 현재의 기술수준으로는 100개의 체세포로서 18마리의 복제 송아지를 생산할 수 있다. 앞으로 체세포는 무한정 공급받을 수 있으므로 암컷의 체세포를 이용하면 암컷만, 그리고 수컷의 체세포를 이용하면 수컷만을 선택적으로 생산할 수 있어 성감별이 필요하지 않게 되며 한 마리의 극히 우수한 소로서 무한정의 복제 송아지를 생산할 수 있을 것이다.

그러나 핵이식으로 복제동물을 생산하려면 고도의 숙련된 기술이 필요하며 미세조작기와 핵융합장치 등 고가의 기자재가 확보되어야 하는 어려움이 있다. 이를 극복하기 위한 기술의 간편화와 표준화가 더욱 개발되어야 할 것으로 본다. 또한, 복제수정란의 작출효율을 개선하고 대량생산 체제로 들어가기 위하여는 발생능력이 우수한 핵의 다량 공급과 수반하여 수핵난자의 다량 확보도 이루어져야 한다. 이와 아울러 핵-세포질 융합기술의 효율 개선, 핵이식된 수정란의 체외배양기법의 확립 및 이를 수란축에 이식하여 산자 생산율의 향상 등이 이루어지면 핵이식에 의한 복제동물 생산의 산업화가 곧 실현될 것이다.

참고문헌

1. Barnes, F., M. Endebrock, C. Looney, R. Powell, M. Westhusin and K. Bondioli. Embryo cloning in cattle: The use of *in vitro* matured oocytes. J Reprod Fertil 1993; 97: 317-320.
2. Bondioli KR, Westhusin ME, and Looney CR. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. Theriogenology 1990; 33(1): 165-174.
3. Briggs R, and King TJ. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog eggs. Proc Natl Acad Sci, USA 1952; 38: 455-463.
4. Campbell KHS, Loi P, Cappai P, and Wilmut I. Improved development to blastocyst of ovine nuclear transfer embryos reconstructed during the presumptive S-phase of enucleated activated oocytes. Biol Reprod 1994; 50: 1385-1393.
5. Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, de Leon AP and Robl JM. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. Science 1998; 280: 1256-1258.
6. Collas P and Robl J.M. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. Biol Reprod 1990; 43: 877-884.
7. Ikawa M, Kominami K, Yoshimura Y, Yaanaka K, Nishimune Y and Okabe M. Green fluorescent protein as a marker in transgenic mice. Develop. Growth Differ. 1995; 37: 455-459.
8. Illmensee K and Hoppe P.C. Nuclear transplantation in Musculus: Developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. Cell 1981; 23: 9-18.
9. Johnson WH, Loskutoff NM, Plante Y and Betteridge KJ. The production of four identical calves by the separation of blastomeres from an *in vitro* derived four cell embryos. Vet Rec 1995; 137: 15-16.
10. Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H and Tsunoda Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. Science 1998; 282(5396): 2095.
11. Keefer, C.L., S.L.Stice and D.L.Matthews. bovine inner cell mass cells as donor nuclei in the production of nuclear transfer embryos and calves. Biol Reprod 1994; 50: 935-939.
12. Kono T and Tsunoda Y. Development of single blastomeres from four- and eight-cell mouse embryos fused into the enucleated half of a two-cell embryo. Gamete Res 1989; 22: 427-434.
13. Krisher RL, Gibbons JR, Gwaxdauskas FC. Nuclear transfer in the bovine using microinjected donor embryos: Assessment of development and deoxyribonucleic acid detection frequency. J Dairy Sci.

- 1995; 78: 1282-1288
14. Kubiak J, Tarkowski AK. Electroporation of mouse blastomeres. *Exp Cell Res* 1985; 157: 561-565.
 15. McGrath J, Solter D. Nuclear transplantation in mouse embryos by microsurgery and cell fusion. *Science* 1983; 220: 1300-1302.
 16. McGrath J, Solter D. Nuclear transplantation in mouse embryos. *J Exp Zool* 1983; 228: 355-362.
 17. McLughlin KJ, Pugh AP, Logan K, *et al.* Assessment of oocyte source for ovine nuclear transfer. *Theriogenology* 1991; 35: 240.
 18. Park HS, Lee HJ, Choe SY, Park CS. Study on *in vitro* development of mouse embryos after nuclear transplantation. *Korean J Anim Reprod* 1990; 14 (3): 205-211.
 19. Prather RS, Barnes FL, Sims MM, Robl JM, Eyestone WH, First NL. Nuclear transplantation in the bovine embryo. Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol Reprod* 1987; 37: 859-866.
 20. Prather RS, Sims MM, First NL. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol Reprod* 1989; 41: 414-418.
 21. Robl JM, Gilligan B, Crister ES, First NL. Nuclear transplantation in mouse embryos Assessment of recipient cell stage. *Biol Reprod* 1986; 34: 733-739.
 22. Robl JM, Prather R, Eyestone W, Barners F, Northey D, Gilligan B, First NL. Nuclear transplantation in bovine embryos. *Theriogenology* 1987; 25: 189.
 23. Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Ritchie M, Wilmut I, Colman A, Campbell KH. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 1997; 278(5346): 2130-2133.
 24. Smith LC, Wilmut I. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development *in vivo* of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol Reprod* 1989; 40: 1027-1035.
 25. Stice SL, Keefer CL, Maki-Laurila M, Phillips PE. Producing multiple generations of bovine nuclear transplant embryos. *Theriogenology* 1991; 35: 273.
 26. Stice SL, Keefer CI, Maki-Laurila M, Matthews L. Donor blastomere cell cycle stage affects developmental competence of bovine nuclear transfer embryos. *Theriogenology* 1993; 39: 318.
 27. Stice SL, Keefer CI. Multiple generational bovine embryo cloning. *Biol of Reprod* 1993; 48: 715-719.
 28. Stice SL, Robl JM. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod* 1988; 39: 657-664.
 29. Tsunoda Y, Kato Y, Shioda Y. Electroporation for the pronuclear transplantation of mouse eggs. *Gamete Research* 1987; 17: 15-20.
 30. Tsunoda Y, Shioda Y, Onodera M, Nakamura K, Uchida T. Differential sensitivity of mouse pronuclei and zygotes cytoplasm to Hoechst staining and ultraviolet irradiation. *J Reprod Fert* 1988; 82: 173-178.
 31. Vignon X, LeBourhis D, Chesne P, Marchal J Heyman Y, Renard JP. Development of bovine nuclear transfer embryos reconstituted with quiescent and proliferative skin fibroblasts. *Theriogenology* 1999; 51 (1): 216.
 32. Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, Yamagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998; 394: 369-374.
 33. 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.
 34. Willadsen S.M, Janzen R.E, McAlister R.J, Shea BF, Hamilton G, McDermid D. The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. *Theriogenology* 1991; 35: 161-170.
 35. Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 1986; 320: 63-65.
 36. Willadsen SM. Cloning of sheep and cow embryos. *Genome* 1989; 31: 956-962.
 37. Wilmut I, Schnieke AE, Mcwhir J, Kind AJ, Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385: 810-813.
 38. Zakhartchenko V, Schemthaler W, Prelle K, Stojkovic P, Brem G, Wolf E. Nuclear transfer in the bovine embryo: Developmental potential of cultured adult cells. *Theriogenology* 1999; 51(1): 218.
 39. Zimmermann U, Vienken J. Electric field-induced cell-to cell fusion. *J Membr Biol* 1982; 67: 165-182.
 40. 강태영, 채영진, 이항, 이경광, 박충생, 이효종. 사람 성장호르몬 유전자의 전핵내 미세주입이 토끼 수정란의 체외발달에 미치는 영향과 PCR 검색. *한국수정란이식학회지* 1998; 13(2): 97-106.
 41. 강태영, 채영진, 이항, 박충생, 이효종. 사람성장호르몬 유전자주입 토끼 수정란의 핵이식에 의한 복제. *한국가축번식학회지* 1998; 22(4): 419-424.
 42. 노규진, 이효종, 박충생, 최상용. 형질전환 동물의 생산을 위한 원시생식세포와 유핵 적혈구의 이용. *한국수정란이식학회지* 1998; 13(2, 부록): 3-12.
 43. 이철상, 박흥대, 정길생, 이경광. 핵치환 생쥐의 생산. *한국축산학회지* 1989; 31:69-74.
 44. 이효종, 전병균, 윤희준, 이경미, 송상현, 공일근, 노규진, 최민철, 최상용, 박충생. 핵이식에 의한 복제토끼 생산. *한국수정란이식학회지* 1994; 9(2): 161-165.
 45. 이효종, 윤희준, 강태영, 조성근, 박충생, 최상용. 토

- 끼에서 공핵수정란의 발달단계에 따른 복제수정란의 생산 효율. 한국임상수의학회지 1996; 13(2): 149-152.
46. 최상용, 박충생, 이효중, 박희성. 생쥐수정란의 핵이식에 관한 연구. I. 모성 및 부성 genome의 기능차이에 관한 연구. 대한분자생물학 및 유전공학회지 1989; 4:497-502.
47. 한용만, 김선정, 유대열, 박정선, 이철상, 정상균, 박인영, 손보화, 최영희, 남명수, 이훈택, 정병현, 정길생, 고대환, 김영훈, 양철성, 유옥준, 이경광. 락토파린을 우유에서 생산하는 형질전환 젖소의 개발에 관한 연구. 한국가축번식학회지 1996; 20(4): 371-378.
48. 황우석, 조충호, 한재용, 이병천, 신태영, 이원유, 송길영, 민순기, 김영천, 구자홍, 이윤수, 민종식, 김기영, 김준선, 장중명, 임홍순, 이광원, 이수현, 김용길, 이후식. 소 핵이식 수정란에 의한 산자 생산에 관한 연구. 한국수정란이식학회지 1995; 10(1): 83-90.