

전기적 융합과 활성화 방법이 돼지 체세포 복제수정란의 체외발달에 미치는 영향

정 기 화[†]
진주산업대학교 동물소재공학과

Effects of Electric Stimulation and Activation Conditions on the Fusion and Development of Porcine Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos

K. H. Chung[†]

Department of Animal Resources Technology, Jinju National University

SUMMARY

The present study was conducted to investigate the effects of fusion and/or activation protocol on *in vitro* development of porcine somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos. Porcine fetal fibroblast cells were transferred into the perivitelline space of enucleated *in vitro* matured oocytes. Cell fusion and activation were induced simultaneous fusion/activation (SA) or delayed activation (DA) with or without cytochalasin B (CB) treatment with electric pulses in 0.28 M mannitol-based medium. The SCNT embryos were cultured *in vitro* for 7 days and stained with Hoechst 33342 to determine the number of nuclei. After 7 days culture, cleavage and blastocyst formation rates were 72.4% and 7.6% in SCNT and 76.3% and 20.4% in parthenotes. To examine the effect of electric field strengths on development of SCNT embryos, oocytes were fused two pulses of 110 V/mm, 130 V/mm or 150 V/mm for 30 sec post-injection. The fusion and cleavage rates in 130 V/mm group (70.2% and 72.6%) and 150 V/mm group (72.6% and 70.5%) were higher ($P < 0.05$) than 110 V/mm group (47.1% and 48.6%), respectively. However, the rate of embryos developing to the blastocyst stage (8.1%, 9.7% and 10.7%) were not different among three groups. The cleavage rates and the blastocyst formation rates were not different among three treatment groups (SA group, 71.4% and 9.7%; SA+CB treatment group, 74.7% and 8.0%; DA+CB treatment group, 70.8% and 11.2%, respectively). And, no different in the number of cells in blastocysts was observed among the three groups (22.5 ± 12.8 , 23.3 ± 11.2 and 21.6 ± 10.4 , respectively). These result suggest that two pulses of 130 V/mm or 150 V/mm for 30 sec with SA treatment or DA treatment are enough for fusion/activation of porcine somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos to develop to the blastocyst stage.

(Key words : nuclear transfer (NT), electric pulse, activation, porcine)

서 론

최근 돼지에 있어서 체세포를 이용한 복제수정란의 생산은 여러 연구진에 의하여 보고되어 왔

[†] Correspondence : E-mail : kchung@jinju.ac.kr

며(Cha 등, 1997; Wang 등, 1997; Grupen 등, 1999; Tao 등, 1999; Koo 등, 2000, 2001; Park 등, 2001a,b,c; Cheong 등, 2000, 2002; Boquest 등, 2002; De Sousa 등, 2002; Walker 등, 2002; Zhu 등, 2003), 또한 체세포복제에 의한 복제돼지의 생산이 활발하게 이루어져 왔다(Polejaeva 등, 2000; Onishi 등, 2000; Betthausen 등, 2000; Bondioli 등, 2001; Boquest 등, 2002; De Sousa 등, 2002; Walker 등, 2002; Yin 등, 2002, 2003). 이러한 복제 기술은 유전적으로 우수한 가축의 개체를 증가시키고, 멸종위기에 처한 특수한 종을 보호하며, 의학적 사용을 위한 형질전환 동물의 생산과 장기 이식에 응용되고 있다. 그러나 현재까지 돼지에 있어서 체세포를 이용한 복제수정란에 있어서 복제 돼지의 생산효율은 매우 낮은 결과들을 보고하고 있으며, 그러한 이유에 대해서는 아직까지 완전하게 밝혀지지 않고 있다.

돼지에 있어서 체세포 복제수정란의 융합은 주로 전기적 자극에 의한 융합방법이 이용되고 있으며, 핵이식 난자의 활성화 방법에 있어서는 전기적(Onishi 등, 2000; Park 등, 2001a; Kurome 등, 2003), 화학적(Machaty 등, 1999; Tao 등, 1999; Boquest 등, 2002) 및 전기-화학적(Park 등, 2001b, Lee 등, 2003) 방법이 이용되고 있다. Park 등(2001a)은 돼지에 있어서 simultaneous fusion/activation (SA)방법을 이용하여 생산된 체세포 복제수정란을 이식하여 정상적인 복제돼지를 생산하였으며, Yin 등(2003)은 simultaneous fusion/activation (SA)방법과 delayed activation (DA)방법을 각각 이용하여 delayed activation (DA) 방법에서 복제돼지를 생산하였다고 보고하였다. 그러나 전기적 자극에 의한 복제수정란의 융합 및 활성화(SA)는 핵이식 난자의 활성화를 유도할 수는 있지만 후기배로의 발달을 향상시키기에는 부족하며(Chung 등, 2000), 따라서 많은 연구진에서는 핵이식 난자의 활성화와 후기배로의 발달을 향상시키기 위해서는 delayed activation (DA)방법을 이용하여 추가적인 활성화를 유도하고 있다(Boquest 등, 2002; De Sousa 등, 2002; Walker 등, 2002; Chung 등, 2002).

이러한 일련의 결과를 비추어 볼 때 체세포를 이용한 복제수정란의 생산효율을 향상시키기 위해

서는 적절한 전기적 자극에 의한 융합방법과 활성화 방법이 확립되어야 하며, 이를 위해서는 적절한 전기적 자극의 강도가 설정되어야 하고 또한 핵이식 수정란의 융합과 활성화에 따른 조건이 확립되어야 할 것이다. 따라서 본 연구에서는 체세포를 이용한 돼지 복제수정란의 생산효율을 높이는 최적의 방법을 구명코자 핵이식 수정란에 각기 다른 조건들의 전기적 자극에 의한 융합과 활성화를 유도하여 융합율, 분할율, 후기배로의 발달을 및 배반포기배의 할구수를 비교·조사하였다.

재료 및 방법

1. 배양액

난포란의 체외성숙에 사용한 배양액은 NCSU 23을 기본배양액으로 하여 Baxter (Baxter Healthcare Co., U.S.A.)의 물 1 l로 제조하여 0.2 μ m filter (Gelman Sci., U.S.A.)로 여과하였다. pH는 7.2~7.3으로 조정하였으며 50 ml tissue culture flask (Falcon, U.S.A.)에 45 ml씩 분주하여 4°C의 냉장고에 보관하면서 약 2 주간 사용하였다. 체외성숙용 배양액은 NCSU 23 배양액에 10% 난포액, 0.1 mg/ml cysteine, 0.01 μ g/ml EGF, 10 IU/ml eCG 그리고 10 IU/ml hCG를 첨가하여 제조하였다. 체외배양액은 NCSU 23 배양액에 0.4% BSA를 첨가하여 사용하였다. 돼지 난포액은 2~7 mm 크기의 난포에서 난포액을 채취하여 1,900 \times g로 3회 원심분리하고, 최종 0.2 μ m 필터로 거른 후 -20°C 냉장고에 보관하여 사용하였다.

2. 난포란의 채란

본 실험에 공시된 난소는 도축장에서 도살직후 난소를 적출하여 penicillin G (100 units/ml)와 streptomycin (100 μ g/ml)이 함유된 생리식염수(30~35°C)가 들어있는 보온병에 담아 3~4시간 내에 실험실로 운반하였다. 미성숙 난포란을 채란하기 전 난소주위의 지방과 결합조직을 제거하고, 생리식염수로 3~4회 세척한 후, 18-G needle이 부착된 20 ml 주사기를 이용하여 2~7 mm의 가시난포를 흡입하여 난포란을 채란하였다. 난포란의 채취시 사용된 배양액은 0.1 mg/ml PVA가 첨가된 TALP-

HEPES (Prather 등, 1995)를 사용하였다. 흡입된 난포액은 5~10 분간 정치시킨 후 침전된 하부액을 5 ml의 피펫으로 흡입하여 직경 60 mm 배양접시에 옮겨 40× 배율의 도립현미경(Olympus Co., Japan)에서 난포란을 수집한 후 체외성숙용 기본배양액 NCSU 23으로 4~5회 세척하면서 선발하였다. 난포란의 선발은 난구세포의 부착 정도와 세포질의 충실도에 따라 실시하였으며, 최소한 2층 이상의 난구세포층으로 되어 있고, 세포질이 균일하고 충실한 것을 선발하여 실험에 공시하였다.

3. 난포란의 체외성숙

난포란의 체외성숙은 체외성숙용 배양액을 4-well dish (Nunc, Denmark)에 500 μ l씩 분주하여 18 시간 이상 평형을 유도한 다음 사용하였다. 체외성숙용 배양액에 난구세포가 2층 이상이고 세포질이 충실한 100~150 개의 난포란을 넣고 5% CO₂, 98~99% 습도, 39°C CO₂ incubator에서 처음 20~22시간 동안은 호르몬이 첨가된 체외성숙용 배양액에서, 다음 20~22시간은 호르몬이 첨가되지 않은 배양액에서, 총 40~44시간 동안 배양하여 체외성숙을 유도하였다.

4. 공여세포의 채취 및 배양

본 실험에 사용된 공여세포는 임신 30~35일령 된 돼지 태아에서 분리, 이용하였다. 제왕절개로 채취한 태아의 조직을 미세하게 세절하여 0.05% trypsin (Gibco, USA)과 EDTA (Sigma, USA)가 첨가된 D-PBS로 3분간 처리한 후 D-PBS로 원심분리를 실시하여 trypsin과 EDTA를 제거하였다.

분리된 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM으로 25 cm flask (Falcon, USA)에 분주하여 CO₂ incubator에서 배양을 실시하였으며, 배양 12시간 후 바닥에 붙지 않은 세포는 제거하고, 신선한 DMEM에 10% FBS가 첨가된 배양액으로 교체하면서 3~5일간 배양하였다. 계대배양은 공여세포가 flask에 80% 이상 자랐을 때, 0.05% trypsin과 EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 1/3~1/4씩 나누어 10회 이상 계대해서 배양을 실시하였다. 계대배양한 공여세포는 10% DMSO가 첨가된 DMEM 배양액으로 동결 보존해 두고, 핵이식에 사용할 때는 38~39

°C 온수에 용해하여 동결보호제를 제거한 다음 신선한 DMEM에 10% FBS가 첨가된 배양액으로 1회 계대배양한 후 세포가 culture dish에 monolayer를 충분히 형성하여 confluency 상태로 2~3일 정도 배양함으로써 G0나 G1단계로 유도한 다음 공여세포로 사용하였다.

5. 핵이식

핵이식에 사용된 피펫은 직경이 1 mm인 capillary tube (Sigma, USA)를 사용하였으며, 보정용 피펫의 외경은 150~160 μ m, 탈핵과 주입용 피펫은 외경이 20~30 μ m로 조절하였다. 체외성숙 난자를 0.1% hyaluronidase (Sigma, USA)가 첨가된 D-PBS에 넣어 2~3분간 vortexing하여 난구세포를 완전히 제거하고, 3~4회 PVA-TALP-HEPES로 세척한 다음, 0.05 M sucrose (Sigma, USA) 및 0.4% BSA가 첨가된 배양액에서 세포질이 균질하고 제1 극체가 뚜렷하게 보이는 난자만을 선별하여 탈핵에 이용하였다. 핵이식은 0.4% BSA가 첨가된 NCSU-23 배양액에 7.5 μ g/ml의 cytochalasin B (CB) (Sigma, USA)와 0.05 M sucrose를 첨가한 용액에서 실시하였다. 탈핵은 10~20% 정도의 세포질을 흡입함으로써 핵을 제거하였으며, 탈핵된 난자의 세포질이 제거된 공간에 G0나 G1으로 유도한 공여세포를 세포질과 부착되게 주입하였다. 공여세포가 주입된 난자는 전기융합을 실시하기 전까지 0.4% BSA가 첨가된 NCSU-23에서 배양하였다.

6. 핵이식 수정란의 융합 및 활성화

핵이식이 완료된 난자와 공여세포의 융합은 전기세포융합장치(BTX, USA)를 이용하였다. 전기융합은 0.1 mM CaCl₂ (Sigma, USA) 및 0.1 mM MgCl₂ (Sigma, USA)가 첨가된 0.28 M Mannitol (Sigma, USA) 용액에 2~3분간 평형을 실시한 다음, 전기 융합용 chamber로 옮겨 실시하였다. 전기 융합은 처리구에 따라 110~150 V/mm의 강도로 50 μ sec, 2 pulse를 주었으며, 전기융합 후 활성화를 따로 실시할 경우에는 100 V/mm, 20 μ sec, 2 pulses를 주어 활성화를 유도하였다. 핵이식 수정란의 일부는 융합과 활성화를 유도한 다음 cyto-

chalasin B (CB)에 4시간 처리 후 체외배양을 실시하였다.

7. 체외수정란의 체외배양

융합과 활성화가 유도된 수정란은 0.4% BSA가 첨가된 체외배양액 NCSU 23에 3~4회 세척한 후 20~30개씩 50 μ l drop에 넣어 39°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 융합 후 48시간에 복제수정란의 분할율을 조사하였으며, 144~168시간까지 배반포기 상태의 배발달율을 조사하였다.

8. 체외수정란의 할구수 조사

체외수정란의 할구수를 조사하기 위하여 수정 후 7일까지 배양한 배반포기배를 Hoechst 33342 (Sigma, U.S.A.)를 이용하여 Pursel 등(1985)의 방법에 준하여 핵을 염색하였고, 형광현미경 200~400 배의 배율하에서 핵의 수를 조사하였다.

9. 통계학적 분석

실험결과의 통계학적 분석은 SAS package를 이용하여 실시하였으며, GLM (General Linear Model) procedure를 적용하여 각 요인의 least square mean을 구하여 요인간의 유의차를 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 체세포를 이용한 돼지 복제수정란과 단위발생란의 체외발달율

핵이식에 의한 체세포 복제수정란의 생산에 있어서 우선적으로 핵이식 수정란과 전기적 자극에

의한 단위발생란의 분할율과 후기배로의 발달율을 조사하여 Table 1과 같은 결과를 얻었다. 체외배양 후 48시간에 조사된 분할율에 있어서는 핵이식 복제수정란과 단위발생란에 있어서 비슷한 결과를 나타내었으나, 배양 7일째 배반포기배로의 발달율에 있어서는 복제수정란이 7.6%로 나타나 단위발생란의 20.4%에 비해 유의적으로($P<0.05$) 발달율이 낮았다.

Park 등(2001b)은 체외성숙 난자를 전기자극으로 활성화를 유도하여 생산된 단위발생란에 있어서의 분할율은 79.3%로 체세포 복제수정란의 분할율 24.5%보다 높은 성적을 나타내었으며, 배반포기배로의 발달율에 있어서도 단위발생란과 체세포 복제수정란에서 각각 26.8%와 4.9%로 나타나 유의적인 차이를 나타내었다고 보고하였다. Chung 등(2002)은 전기자극에 의한 체외성숙 난자의 활성화를 유도하여 생산된 단위발생란에 있어서 Ca²⁺의 농도 차이에 따라서 각기 다른 분할율과 배반포기배로의 발달율을 보고하였는데, 1.0 mM Ca²⁺이 첨가된 군에서 79.3%의 분할율과 32.4%의 배반포기배로의 발달율을 나타내어 0.1 mM Ca²⁺이 첨가된 군에서의 각각 68.4%와 19.3%의 발달율보다는 유의적($P<0.05$)으로 높게 나타났다. 또한 복제수정란의 생산에 있어서 분할율과 배반포기배로의 발달율에 있어서도 Ca²⁺의 농도에 따라서 각각 0.1 mM (68.6%, 6.3%)와 1.0 mM (74.3%, 15.8%)에서 분할율은 유의적인 차이를 나타내지 않았으나 배반포기배로의 발달율에 있어서는 유의적인 차이를 나타내었다. Yin 등(2003)은 체세포 복제수정란을 생산하기 위한 실험에서 본 연구와 같은

Table 1. *In vitro* development of porcine zygotes cultured for 7 days following nuclear transfer or parthenogenetic activation

Oocyte conditions	No. (%) of oocytes fused	No. (%) of embryos cleaved	No. of embryos developed to blastocysts (%)
NT*	145	105 (72.4)	11 (7.6) ^a
Parthenogenesis**	186	142 (76.3)	38 (20.4) ^b

† Values with different superscripts differ significantly ($P<0.05$).

* 150 Voltages, 50 μ sec, 2 pulses.

** 120 Voltage, 30 μ sec, 2 pulses.

방법으로 대조구로서 전기적 자극에 의해 활성화된 단위발생란의 생산을 유도하여 19.6%의 배반포기배로의 발달율을 보고하였다.

본 연구결과(Table 1)에 있어서 분할율은 복제 수정란과 단위발생란 간에 유의차가 없었으나 Park 등(2001b)의 결과와 비교할 때, 단위발생란의 경우는 비슷한 결과이었으나 체세포복제 수정란의 경우 매우 높은 분할율(72.4 : 24.5%)을 나타내었다. 체세포 복제 수정란의 경우 분할율과 배반포기배의 발달율이 각각의 연구보고가 다르게 나타나는 이유들 중의 하나는 각기 다른 실험체제에서 나타나는 일련의 차이에 기인된다고 볼 수 있을 것으로 사료되며, 적절한 융합과 활성화를 위한 조건들이 확립되어야 할 것이다.

2. 전기적 융합 조건에 따른 돼지 체세포 복제수정란의 융합율과 체외발달율

Table 2에서는 핵이식 수정란의 전기적 융합에 있어서 전기자극의 조건에 따른 융합율과 분할율 그리고 후기배로의 발달율을 조사한 결과는 다음과 같다. 110 V/mm의 자극이 주어진 군에서는 47.1%로써 130 V/mm의 자극이 주어진 군(70.2%)과 150 V/mm의 자극이 주어진 군(72.6%)에 비해 유의적($P<0.05$)으로 낮은 융합율을 나타내었고, 분할율에 있어서도 각각 48.6%, 72.6%와 70.5%로 나타나 110 V/mm의 자극이 주어진 군에서 130 V/mm의 자극과 150 V/mm의 자극이 주어진 군에 비하여 유의적인($P<0.05$) 차이를 나타내었다. 그러나 배반포기배로의 발달율에 있어서는 세 처리군 각각 8.1%, 9.7% 및 10.7%로 나타나 유의적인 차

이를 나타내지 않았다.

Chung 등(2002)은 돼지의 체세포를 이용한 복제수정란 생산에 있어서 핵이식 수정란의 융합시 전기적 자극을 위한 전기세기를 125 V/mm로 고정시킨 후에 2회 또는 3회로 통전하여 나타난 융합율(79.7%, 79.8%)과 분할율(71.6%, 69.7%) 및 배반포기배로의 발달율(15.7%, 14.1%)에 있어서 두 처리군간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다고 보고하였다. 본 연구에서는 110 V/mm에서는 47.1%의 융합율과 48.6%의 분할율을 나타내어 위의 결과에 비하여 낮은 결과를 나타내었으며, 130 V/mm와 150 V/mm에서는 융합율(70.2%, 72.6%)과 분할율(72.6%, 70.5%)에 있어서는 비슷한 결과를 나타내었으나, 배반포기배로의 발달율에 있어서는 다소 낮은 발달율을 나타내었다.

Park 등(2001c)은 핵이식 수정란의 전기적 자극에 의한 융합시 120 V/mm와 130 V/mm에서 분할율은 각각의 처리군에서 차이를 나타내지 않았으며, 융합율에서는 130 V/mm 처리군에서 70.6%로 58.9%를 나타낸 120 V/mm 처리군보다 유의적($P<0.05$)으로 높게 나타났으나, 배반포기배로의 발달율에 있어서는 120 V/mm 처리군에서 11.4%로 130 V/mm 처리군의 3.5%보다 높은 유의적인 차이를 나타내었다고 보고하였다. Yin 등(2002)은 돼지의 태아섬유아세포를 이용한 핵이식 수정란의 전기융합시 150 V/mm로 통전하였을 때 9%의 배반포기배 발달율을 나타내어 본 연구의 배반포기배의 발달율과 유사한 결과를 나타내었다.

본 연구의 결과에서 핵이식 수정란의 융합시 130 V/mm 이상의 전기적 강도가 적합하며 110

Table 2. Effect of electric pulse strengths on fusion and development of porcine NT embryos

Fusion conditions* (V/mm)	No. of oocytes used	No. (%) of oocytes fused	No. (%) of embryos cleaved	No. of embryos developed to blastocysts (%)
110	157	74 (47.1) ^a	36 (48.6) ^a	6 (8.1) ^a
130	161	113 (70.2) ^b	82 (72.6) ^b	11 (9.7) ^a
150	168	122 (72.6) ^b	86 (70.5) ^b	13 (10.7) ^a

[†] Values with different superscripts differ significantly ($P<0.05$).

* Voltages, 50 μ sec, 2 pulses.

V/mm의 강도는 적합하지 않다고 사료된다. 그러나 Chung 등(2002) 및 Park 등(2001c)은 120 V/mm에서도 비슷한 결과를 얻었으므로, 이를 고려하여 체세포를 이용한 복제수정란을 생산하기 위해서는 핵이식 수정란의 전기적 융합을 위한 최적의 전기자극 조건이 확립되어야 할 것으로 사료된다.

3. 체세포 복제수정란의 전기적 융합과 활성화 조건에 따른 체외발달율

Table 3에서는 핵이식수정란의 전기적 융합과 활성화에 있어서 3가지 처리군(A type, B type 및 C type)을 각기 다른 조건으로 처리하여 분할율과 배반포기배로의 발달율 및 할구수를 조사한 결과는 다음과 같다. 3가지의 처리군에 있어서의 분할율은 각각 71.4%, 74.7% 및 70.8%로 나타나 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 배반포기배로의 발달율에 있어서도 각각 9.7%, 8.0% 및 11.2%로 나타나 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 또한 배반포기배의 할구수에 있어서도 3가지 처리군에서 각각 22.5 ± 12.8 , 23.3 ± 11.2 및 21.6 ± 10.4 로 나타나 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

체세포를 이용한 복제수정란의 생산에 있어서 핵이식 수정란의 전기적 융합과 활성화 방법에 있어서 여러 연구진에 의한 결과는 다소간의 차이를 나타내고 있다. Chung 등(2002)은 핵이식 수정란을 전기적 자극에 의해 simultaneous fusion/activation (SA) 방법과 delayed activation (DA) 방법을 이용하여 생산된 수정란의 분할율은 SA 방법이

67.2%로 나타나 76.3%를 나타낸 DA 방법보다 유의적으로 낮은 성적을 나타내었다. 그러나 배반포기배로의 발달율에 있어서는 각각 16.4%와 20.3%로 나타나 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, DA 방법에 의한 추가적 핵이식 수정란의 활성화는 후기배로의 발달율에는 영향을 미치지 않는다고 하였다.

Kurome 등(2003)은 simultaneous fusion/activation (SA) 방법과 delayed activation (DA) 방법을 비교하여 실험한 결과 배반포기배로의 발달율은 각각 11%와 12%를 나타내어 두 처리군간에 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 이 두 가지 방법 모두가 정상적인 복제배자의 생산에 효과적이라고 하였으나, 핵재구성에 있어서는 두 처리군간에 다소간의 차이점이 나타날 수 있다고 하였다. 본 연구에서는 CB 처리와는 상관없이 3가지 처리군(SA 방법, SA 방법과 CB 처리군 그리고 DA 방법과 CB 처리군)에서 위의 결과와 유사한 결과를 나타내었다. 그러나, Yin 등(2003)은 체세포를 이용한 복제수정란의 생산에 있어서 핵이식 수정란의 전기융합시 SA 방법과 DA 방법을 비교하였을 때 배반포기배로의 발달율은 SA 방법에서 3.2%로 7.9%를 나타낸 DA 방법보다 낮은 결과를 나타내었다고 보고하였다. Martinez Diaz 등(2003)은 체세포를 이용한 핵이식 수정란의 융합시 SA 방법과 DA 방법에 있어서 복제수정란의 분할율에 있어서는 차이를 나타내지 않았으나, 배반포기배로의 발달율에 있어서는 각각 20.9%와 4.1%를 나타내어 전기적 자극으로 융합과 활성화를 동시에 실시한 SA

Table 3. Effect of different fusion and/or activation treatment on the development of porcine NT embryos

Treatments*	No. of oocytes fused	No. of embryos cleaved (%)	No. of developed to blastocysts (%)	Cell number of blastocysts
A type	175	125 (71.4)	17 (9.7)	22.5 ± 12.8
B type	162	121 (74.7)	13 (8.0)	23.3 ± 11.2
C type	178	126 (70.8)	20 (11.2)	21.6 ± 10.4

* Three fusion and/or activation methods; A type: Fusion and activation were conducted simultaneously using two pulses of 150 V/mm for 50 μ sec. B type: Fusion and activation were conducted simultaneously using two pulses of 150 V/mm for 50 μ sec, and then CB treatment for 4 h. C type: Fusion pulses (150 V/mm \times 2) followed by 2 direct current activation pulses of 100 V/mm for 20 μ sec after 1 hr, and then CB treatment for 4 h.

처리군에서 DA 처리군보다 높은 유의적($P<0.01$)인 차이를 나타내었다고 하였으며, 또한 이러한 결과는 본 연구에서 나타난 배반포기배의 발달율보다 높은 결과를 나타내었다.

따라서, 위의 연구결과들과 비교하였을 때 본 연구의 결과에서는 돼지의 체세포를 이용한 복제 수정란의 생산에 있어서 핵이식 수정란의 전기적 융합을 위한 전기자극 및 활성화는 앞에서 언급한 3가지의 처리방법 - SA 방법, SA 방법과 CB 처리군, 그리고 DA 방법과 CB 처리군 - 에 있어서 체세포 복제수정란의 생산결과에는 차이가 나타나지 않는 것으로 사료된다. 그러나 전기적 자극에 의한 적절한 융합 및 활성화의 최적조건 확립과 더 나은 배반포기배로의 발달율을 향상시키기 위한 연구가 지속되어야 할 것으로 사료된다.

적 요

본 연구에서는 체세포를 이용한 돼지 복제수정란의 생산효율을 높이는 최적의 방법을 구명코자 핵이식 수정란에 각기 다른 조건들의 전기적 자극에 의한 융합과 활성화를 유도하여 융합율, 분할율, 후기배로의 발달율 및 배반포기배의 할구수를 비교·조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

핵이식 복제 수정란과 전기자극에 의한 단위발생란과의 체외배양후 분할율을 비교한 결과 두 처리간에 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, 배양 7일째 배반포기배로의 발달율에 있어서는 복제수정란이 7.6%로 나타나 단위발생란의 20.4%에 비해 낮은 후기배로의 발달율을 나타내었다. 핵이식 수정란의 전기적 융합에 있어서 각기 다른 전기자극의 조건에 따른 융합율과 분할율 그리고 후기배로의 발달율에 있어서 110 V/mm의 전기적 자극이 주어진 군에서는 47.1%로 나타나 130 V/mm의 자극과 150 V/mm의 자극이 주어진 두 군에서의 70.2%와 72.6%에 비해 낮은 융합율을 나타내었고, 분할율에 있어서도 각각 48.6%, 72.6%와 70.5%로 나타나 110 V/mm의 자극이 주어진 군에서 두 처리군보다 낮은 성적을 나타내었다. 그러나 배반포기배로의 발달율에 있어서는 각각의 처리군에 있어서 8.1%, 9.7% 및 10.7%로 나타나 유의적인 차

이를 나타내지 않았다. 체세포를 이용한 핵이식수정란의 전기적 자극에 의한 융합과 활성화에 있어서 3가지의 각기 다른 처리군(A type, SA 방법; B type, SA 방법과 CB 처리군; C type, DA 방법과 CB 처리군)으로 나누어 조사한 결과 3가지의 처리군에 있어서의 분할율은 각각 71.4%, 74.7% 및 70.8%로 나타나 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 배반포기배로의 발달율에 있어서도 각각 9.7%, 8.0% 및 11.2%로 나타나 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 또한 배반포기배의 할구수에 있어서도 3가지 처리군에서 각각 22.5 ± 12.8 , 23.3 ± 11.2 및 21.6 ± 10.4 로 나타나 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 이상의 실험 결과들을 종합해 보면, 본 연구에서는 돼지의 체세포를 이용한 핵이식 수정란의 융합시 130 V/mm 또는 150 V/mm, 50 μ sec, 2 pulse의 전기적 강도를 이용하고, 활성화 방법으로는 SA 방법 또는 DA 방법을 병행한다면 복제수정란의 생산효율을 향상시킬 수 있음을 시사하였다. 따라서 돼지의 체세포를 이용한 복제수정란의 생산효율을 향상시키기 위해서는 핵이식 수정란의 전기적 자극에 의한 융합과 활성화에 관한 조건이 확립되어야 하며, 또한 후기배로의 발달을 향상 위한 최적의 체외배양조건이 확립되어야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Bethhauser J, Forsberg E, Augenstein M, Childs L, Eilertsen K, Enos J, Forsythe T, Golueke P, Jurgella G, Koppang R, Lesmeister T, Mallon K, Mell G, Misica, P, Pace M, Pfister-Genskow M, Strelchenko N, Voelker G, Watt S, Thompson S and Bishop M. 2000. Production of cloned pigs from *in vitro* systems. Nat. Biotech., 18:1055-1059.
- Bondioli K, Ramsoondar J, Williams B, Costa C and Fodor W. 2001. Cloned pigs generated from cultured skin fibroblasts derived from a H-transferase transgenic boar. Mol. Reprod. Dev., 60:189-195.
- Boquest AC, Grupen CG, Harrison SJ, McIlpatrick

- SM, Ashman RJ, d'Apice AJF and Nottle MB. 2002. Production of cloned pigs from cultured fetal fibroblast cells. *Biol. Reprod.*, 66:1283-1287.
- Cha SK, Kim NH, Lee SM, Baik CS, Lee HT and Chung KS. 1997. Effect of cytochalasin B and cycloheximide on the activation rate, chromosome constituent and *in vitro* development of porcine oocytes following parthenogenetic stimulation. *Reprod. Fertil. Dev.*, 9:441-446.
- Chung HT, Ikeda K, Martinez Diaz MA, Katagiri S and Takahashi Y. 2000. Development of reconstituted pig embryos by nuclear transfer of cultured cumulus cells. *Reprod. Fertil. Dev.*, 12:15-20.
- Chung HT, Park KW, Im GS, Lai L, Sun QY, Day BN and Prather RS. 2002. Effect of elevated Ca^{2+} concentration in fusion/activation medium on the fusion and development of porcine fetal fibroblast nuclear transfer embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 61:488-492.
- De Sousa PA, Dobrinsky JR, Zhu J, Archibald AL, Ainslie A, Bosma W, Bowering J, Bracken J, Ferrier PM, Fletcher J, Gasparrine B, Harkness L, Johnston P, Ritchie M, Ritchie WA, Travers A, Albertini D, Dinnyes A, King TJ and Wilmut I. 2002. Somatic cell nuclear transfer in the pig: Control of pronuclear formation and integrin with improved methods for activation and maintenance of pregnancy. *Biol. Reprod.*, 66:642-650.
- Gruppen CG, Verma PJ, Du ZT, McIlpatrick SM, Ashman RJ and Nottle MB. 1999. Activation of *in vivo* and *in vitro*-derived porcine oocytes by using multiple electrical pulses. *Reprod. Fertil. Dev.*, 9:571-575.
- Koo DB, Kang YK, Choi YH, Park JS, Han SK, Park IY, Kim SU, Lee KK, Son DS, Chang WK and Han YM. 2000. *In vitro* development of reconstructed porcine oocytes after somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 63:986-992.
- Koo DB, Kang YK, Choi YH, Park JS, Kim Hn, Kim T, Lee KK and Han YM. 2001. Developmental potential and transgene expression of porcine nuclear transfer embryos using somatic cells. *Mol. Reprod. Dev.*, 58:15-21.
- Kurome M, Fujimura T, Murakami H, Takahagi Y, Wako N, Ochiai T, Miyazaki K and Nagashima H. 2003. Comparison of electro-fusion and intracytoplasmic nuclear transfer injection methods in pig cloning. *Cloning and stem cells*, 5:367-378.
- Lee GS, Kin HY, Hyun SH, Kim DY, Lee SH, Nam DH, Jeong YW, Kim S, Kang SK, Lee BC and Hwang WS. 2003. Improved developmental competence of cloned porcine embryos with different energy supplements and chemical activation. *Mol. Reprod. Dev.*, 66:17-23.
- Machaty Z, Wang WH, Day BN and Prather RS. 1999. Calcium release and subsequent development induced by modification of sulfhydryl groups in porcine oocytes. *Biol. Reprod.*, 60:1384-1391.
- Martinez Diaz MA, Mori T, Nagano M, Katakiri S and Takahashi Y. 2003. Effect of fusion/activation protocol on *in vitro* development of porcine nuclear transfer embryos constructed with foreign gene-transfected fetal fibroblasts. *J. Vet. Med. Sci.*, 65(9):989-994.
- Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H. and Perry AC. 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 289:1188-1190.
- Park KW, Chung HT, Lai L, Kuhholzer B, Samuel M, Bonk A, Im GS, Rieke A, Murphy C, Carter DV and Prather RS. 2001a. Production of nuclear transfer-derived swine that express the enhanced green fluorescent protein. *Anim. Biotech.*, 12:173-181.
- Park KW, Kuhholzer B, Lai L, Machaty Z, Sun QY, Day BN and Prather RS. 2001b. Development and expression of the green fluorescent

- protein in porcine embryos derived from nuclear transfer of transgenic granulosa-derived cells. *Anim. Reprod. Sci.*, 68:111-120.
- Park KW, Lai L, Cheong HT, Im GS, Sun QY, Wu G, Day BN and Prather RS. 2001c. Developmental potential of porcine nuclear transfer embryos derived from transgenic fetal fibroblasts infected with the gene for the green fluorescent protein: Comparison of different fusion/activation conditions. *Biol. Reprod.*, 65:1681-1685.
- Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A and Campbell KH. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 407:86-90.
- Tao T, Boquest AC, Machaty Z, Peterson AL, Day BN and Prather RS. 1999. Development of pig embryos by nuclear transfer of cultured fetal fibroblast cells. *Cloning*, 1:55-62.
- Walker SC, Shin TY, Zaunbrecher GM, Romano JE, Johnson GA, Bazer FW and Piedrahita JA. 2002. A highly efficient method for porcine cloning by nuclear transfer using *in vitro*-matured oocytes. *Cloning and stem cells*, 4:105-112.
- Wang WH, Abeydeera LR, Cantley TC and Day BN. 1997. Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos production by *in vitro* fertilization. *J. Reprod. Fertil.*, 111: 101-108.
- Yin XJ, Tani T, Yonemura I, Kawakami M, Miyamoto K, Hasegawa R, Kato Y. and Tsunoda Y. 2002. Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes. *Biol. Reprod.*, 67:442-446.
- Yin XJ, Cho SK, Park MR, Im YJ, Park JJ, Bhak JS, Kwon DN, Jun SH, Kim NH and Kim JH. 2003. Nuclear remodelling and the developmental potential of nuclear transferred porcine oocytes under delayed-activated conditions. *Zygote*, 11:167-174.
- Zhu J, King T, Dobrinsky J, Harkness L, Ferrier T, Bosma W, Schreier LL, David Guthrie H, De Sousa P and Wilmut I. 2003. *In vitro* and *in vivo* developmental competence of ovulated and *in vitro* matured porcine oocytes activated by electrical activation. *Cloning and stem cells*, 5:355-365.

(접수일: 2004. 2. 2/ 채택일: 2004. 4. 24)