

재래산양의 체세포 핵이식에 의한 복제수정란의 체외발달에 관한 연구

박희성[†] · 김태숙 · 정수영 · 이윤희 · 정장용
진주산업대학교 동물생명과학과 · 동물생명산업지역협력연구센터

Studies on the *In Vitro* Development of Cloned Embryos by Somatic Cell Nuclear Transfer in Korean Native Goats

H. S. Park[†], T. S. Kim, S. Y. Jung, Y. H. Lee and J. Y. Jung

Department of Animal Science and Biotechnology & RAIRC, Jinju National University

SUMMARY

The present study was conducted to examine some factors affecting *in vitro* development of oocytes from somatic cell nuclear transfer (SCNT) in Korean native goats. Recipient oocytes were surgically collected after superovulation by using CIDR and FSH, PMSG, hCG and estrous synchronization in Korean Native goats. For nuclear transfer, the fibroblasts from caprine ear cells and fetal fibroblasts were surgically harvested and were cultured *in vitro* until cell confluency in serum-starvation condition (TCM-199 + 0.5% FBS) for 3 to 5 days. The zona pellucidae of matured oocytes were partially drilled by laser irradiation. A single somatic cell was individually transferred into each enucleated oocyte. The reconstructed oocytes were then electrically fused and activated. Activated NT embryos were cultured in mSOF medium supplemented with 0.8% BSA 6~7 day at 39°C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ in air.

There were no significant difference in the number of embryos cleaved and 4-cell development between the fibroblast nuclei from mature ear cells and fetal cells, but the rate of 8-cell development was higher ($P<0.05$) in ear cells (40.5%) than in fetal cells (55.5%). However, the embryo development to morula or blastocyst was not significantly different between both the groups (6.7% vs 16.0%), respectively. The number of embryo cleaved (79.0%) were higher ($P<0.05$) in the oocytes activated with ionomycin+6-DMAP than in the oocytes activated electrically (9.5%). The development of fused embryos to morula or blastocyst was found 15.6% in ionomycin+6-DMAP, but no morula or blastocysts were developed in electrical stimulation. The development rate of SCNT embryos to morula or blastocyst was lower ($P<0.05$) in SCNT embryos (19.0% vs 0.0%) than that in parthenotes (66.1% vs 59.1%). In the parthenotes, the cleavage rate and development to morula or blastocyst were significantly higher ($P<0.05$) as 86.8% and 50.0% in ovulated oocytes than in follicular oocytes (69.0% vs 23.6%), respectively. These results suggest that some factors including superovulation treatment, oocyte source, maturation of follicular oocytes, activation method and culture condition may affect *in vitro*

* 본 연구는 산업자원부 지정 진주산업대학교 동물생명산업지역협력연구센터(RAIRC)의 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

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

developmental capability of embryos produced by somatic cell nuclear transfer in Korean Native goats, and the fusion rate be greatly low compared with other species.

(Key words : somatic cell, nuclear transfer, cleavage, morula, blastocyst, goat)

서 론

체세포 핵이식에 의한 복제동물 생산 기법은 유전적으로 능력이 우수한 개체를 단기간에 대량 복제 생산하게 함으로써 유전력이 높은 형질의 경우는 개량 효과를 극대화시킬 수 있는 유용한 수단이 된다. 뿐만 아니라 나아가 형질 전환 동물의 생산을 통한 인간 대체장기 생산, 생체물질 생산, 세포 분화, 유전자 치료 등 인간 질병 치료 기술에 응용이 가능하며 멸종 위기에 처해 있는 동물의 보존 등에도 널리 이용될 수 있다.

핵이식 기법에 의한 복제 수정란 생산에 관한 연구는 1983년 McGrath와 Solter가 생쥐 전핵을 핵치환하여 복제 산자 생산에 성공한 후, Wilmut 등(1997)이 면양의 체세포를 이용하여 복제 면양을 탄생시킴으로 단순 동물 복제 연구에만 국한되지 않고 인간의 질병 치료 분야까지 응용 범위가 확대되고 있다. 핵이식 기법이 개발되기 전까지는 암수 생식세포간의 수정에 의해서만 정상적인 개체 발생이 가능한 것으로 알려져 있었으나, 최근 세포 융합 혹은 세포 직접 주입에 의한 체세포 핵이식 기술이 발전되면서 각종 동물에서 복제 동물 생산이 성공하고 있다.

한국 재래 산양은 체구가 왜소하며 임신기간이 짧고 온순하여 다루기 용이하여 생명공학 연구에 매우 적합한 동물임에도 불구하고 기대할만한 연구 결과가 없었다. 산양에서도 1999년 Bagugisi 등이 처음으로 복제 산양 생산에 성공한 후, Reggio 등(2001), Keefer 등(2002), Zou 등(2002) 및 Melican 등(2004)이 복제 산양 생산에 성공한 바 있다. 우리나라 재래산양의 핵이식에 관한 연구는 거의 없으며, 양질의 수핵란 확보, 핵이식란의 융합, 활성화, 배양조건 등의 연구가 수행되어야 할 것이다.

본 연구는 체세포 핵이식에 의한 산양 복제 수정란의 생산효율을 높이기 위한 기초 자료를 얻고자 재래산양에 핵이식을 실시하여 공핵세포의 종류, 핵이식란의 활성화 처리 방법 및 수핵난자의 조건이

체외발달율에 미치는 영향을 조사하여 핵이식란 생산을 위한 최적의 조건을 규명하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공핵세포의 배양 및 보존

공핵세포는 귀 유래 섬유아세포와 태아 유래 섬유아세포 2종류를 분리 배양하여 사용하였다. 귀 유래 섬유아세포는 성숙한 재래산양(*Capra hircus*)으로부터 귀를 5×5mm 정도 크기로 절제하여 채취하였으며, 미세하게 세절하여 0.25% trypsin-EDTA (Sigma, U.S.A)가 첨가된 D-PBS로 분리한 다음 10% FBS가 첨가된 TCM-199로 25cm² flask (Falcon, U.S.A)에 분주하여 5% CO₂, 98~99% 습도, 39℃ 배양기 내에서 계대배양을 실시하였다. 태아 유래 섬유아세포는 임신 40일령의 태아로부터 세포를 분리배양하여 귀 유래 섬유아세포와 동일한 방법으로 계대배양을 실시하여 사용하였다. 배양한 공여세포의 동결은 10% DMSO(Sigma, U.S.A) 및 10% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 동결 보존해 두고, 핵이식에 사용할 때는 39℃ 온수에 용해하여 동결보호제를 제거한 다음 10% FBS가 첨가된 신선한 TCM-199 배양액을 첨가하여 4-well dish에 분주하여 배양기 내에서 배양을 실시하였다. 세포가 dish 바닥에 monolayer 형성이 충분히 되었을 때 0.5% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 3~5일간 기아배양을 실시하였다.

2. 공시동물

공시동물은 체중 15~25kg 전후의 성숙한 미경산 재래산양으로서 진주 근교의 사육농가로부터 임상적으로 건강하다고 인정되는 것을 구입하여 본 대학 종합농장에서 사육하면서 내·외부 기생충 구제와 일정기간 동안 적응시킨 다음 본 연구에 사용하였다. 사양관리는 일반 관행법에 따라 사육하되 농후사료는 추가 급여하였으며, 식염과 물은 자유섭취토록 하였다.

3. 과배란유기

수핵난자의 회수를 위하여 다음과 같은 방법으로 과배란유기를 실시하였다. Progesterone 제제인 CIDR(Progesterone 0.3g, Eazi Breed, InterAg, New Zealand)를 10일간 질내에 삽입하고 과배란 처리는 재래산양에 8, 9, 10일째에 1일 2회 12시간 간격으로 총 70mg의 FSH(Folltropin-V, Vetrepharm, Canada)를 감량법으로 근육주사하였으며, PMSG(Folligon, Intervet, Netherland)의 경우는 CIDR 삽입 제 8일째에 PMSG 1,000IU를 1회 근육주사하였다. 배란 및 발정의 유기를 위하여 PGF₂α(Lutalyse, Upjohn, U.S.A.)는 8일째에 FSH 또는 PMSG 투여와 함께 10mg을 근육주사하고 CIDR는 10일째에 제거와 동시에 hCG(Chorulon, Intervet, Netherland) 400IU를 근육주사하여 과배란을 유도하였다.

4. 수핵난자의 회수

난관으로부터 성숙난자(*In vivo*)의 회수는 외과적인 방법으로 난관에서 관류방법으로 난자를 회수하였다. 먼저 과배란 처리한 산양을 약 24시간 절식시킨 다음 2% xylazine(렘폰, 바이엘, 한국)을 0.2mg/kg 근육주사하여 진정마취시키고, HCl ketamine(케타민, 유한양행, 한국)을 11mg/kg 근육주사하여 마취를 유도하였다. 마취가 도입된 산양은 복정중선을 절개하여 난관과 난소를 체외로 노출시킨 다음 배란점을 확인한 후, 난자의 회수를 위하여 catheter(Tom Cat, Kendall Co., U.S.A.)를 난관 누두부로 삽입하여 5~10ml의 M2(Sigma Co., U.S.A.) 배양액을 난관 자궁접합부 쪽에서 주입하여 관류하였다.

난포란(*In vitro*)의 회수는 성숙난자를 회수한 다음 난소의 난포로부터 22G needle이 부착된 5ml 주사기로 난포액과 난포란을 흡입하여 회수하였다. 회수란은 5% GS(Sigma, U.S.A.)가 첨가된 신선한 M2 배양액으로 4~5회 세척한 후 난구세포의 부착 정도와 세포질이 충실한 것만 선별하여 본 연구에 사용하였다.

5. 수핵난자의 체외성숙

회수한 난포란의 체외성숙은 25mM의 Hepes 가 첨가된 TCM-199 체외성숙용 기본 배양액에 10%

GS(goat serum), 10 μg/ml LH(luteinizing hormone), 1 μg/ml estradiol 17-β 및 5 μg/ml FSH(follicular stimulating hormone)을 첨가하여 5% CO₂, 98~99% 습도, 39°C 배양기 내에서 약 12시간 정도 전 배양을 시킨 다음 4 well-dish(NUNC, Denmark)에 well 당 15~20개의 미성숙 난포란을 적하하여 22~24시간 동안 배양함으로써 체외성숙을 유도하였다.

6. 핵이식

핵이식을 위한 피펫의 제작은 직경이 1mm인 capillary tube(Narishige, Japan)를 이용하여 보정용 피펫(holding pipette)은 외경이 160~180 μm, 주입용 피펫(injection pipette)은 외경이 20~30 μm가 되게 제작하여 멸균시켜 사용하였다.

수핵난자는 0.3% hyluronidase(Sigma, U.S.A.)가 첨가된 D-PBS로 3~5분간 처리하여 난구세포를 제거한 다음 세포질이 양호하고 극체가 뚜렷하게 보이는 난자만을 선별하여 핵이식에 사용하였다. 핵이식 조작시 수핵난자는 M2(Sigma, U.S.A.) 배양액에 7.5 μg/ml의 cytochalasin B(Sigma, U.S.A.)를 첨가하여 탈핵을 실시하였으며, 공핵세포는 먼저 주입용 피펫에 흡입 loading 하였다. 수핵난자는 탈핵 및 주입용 피펫의 삽입을 용이하게 하기 위하여 zona drilling한 다음 탈핵용 피펫을 위관강내로 진입시켜 극체와 세포질을 흡입하여 제거하였다. 탈핵한 난자는 곧바로 세포질이 제거된 공간에 공핵세포를 세포질과 부착되게 주입함으로써 미세 조작 과정을 완료하였다.

Laser system(MTM, Switzerland)을 이용한 zona drilling은 Park 등(2001)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, laser system이 부착된 도립현미경 하에서 laser 전용 렌즈(×400)로 drilling할 수핵난자의 투명대를 맞춘 다음 20~40 μsec의 강도로 laser를 1~2회 투과시킴으로써 zona drilling을 실시하였으며, 이때 drilling은 핵이식 조작시 불필요한 배양액의 침투 등을 막기 위하여 zona 두께의 약 60~80% 정도의 부분적 drilling을 하였다.

7. 핵과 세포질의 융합 및 활성화 처리

핵이식이 완료된 난자의 공여세포와 수핵난자의 세포질 융합은 전기세포융합장치(BTX, U.S.A)

로 실시하였다. 이때 융합 배지는 0.05mM CaCl₂ (Sigma, U.S.A), 0.1mM MgSO₄(Sigma, U.S.A) 및 0.5mM Hepes(Sigma, U.S.A.)가 첨가된 0.3M Mannitol(Sigma, U.S.A) 용액을 사용하였으며, 핵이식란을 chamber로 옮겨 양전극 사이에 일렬로 주입하여 핵은 전극의 “+” 극쪽으로 향하게 하고 세포질은 “-” 극쪽으로 향하게 하여 직류전류(DC)로 2.40kv/cm, 15~30 μsec, 1회 통전하여 세포 융합을 유도하였다. 두 번째 융합을 위한 전기자극은 동일한 방법으로 1시간 후에 자극을 가하였고 세 번째도 같은 방법으로 30분 후에 통전하였다. 핵이식란은 10% GS가 첨가된 M16 배양액으로 배양을 실시하였으며, 융합 여부는 배양 후 1시간 정도 경과 후에 판단하였다.

융합이 이루어진 핵이식란의 활성화 처리는 핵이식 조작 후 약 3시간 동안 전배양을 실시한 다음 5 μM의 ionomycin 용액에서 5분, 2mM 6-DMAP 용액에서 4시간 동안 처리하여 활성화를 유도하였다.

8. 복제 수정란의 체외 배양

복제 수정란과 단위발생란의 배양은 0.8% BSA가 첨가된 mSOF 배양액(5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂, 96~98% humidity, 39℃)에서 6~7일 동안 배양을 실시하면서 후기배로의 발달을 유도하였으며, 분할율은 활성화 처리 후 24시간째에 조사하였다.

9. 통계학적 분석

실험결과와 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. 공핵세포의 종류에 따른 핵이식란의 체외발달을 산양의 체세포 핵이식에 있어서 공핵세포를 귀 유래 섬유아세포와 태아 섬유아세포를 사용하여 핵이식을 실시하였을 때 핵이식란의 체외발달율을 조사한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다.

융합이 이루어진 핵이식란의 활성화 처리 후 분할율은 귀 유래 섬유아세포를 공핵세포로 사용하였을 때가 40.5%(15/37)로서 태아 유래 섬유아세포를 공핵세포로 사용하였을 때의 55.5%(25/45)와 유의적인 차이가 없었다. 또한 상실배 또는 배반포기로의 발달율도 각각 6.7%(1/15; 귀 유래 섬유아세포) 및 16.0%(4/25; 태아 유래 섬유아세포)로서 유의적인 차이가 없었다.

Reggio(2002)는 산양의 핵이식에 있어서 BECM 배양액을 기본배양액으로 하여 공핵세포를 태아세포와 난구세포를 사용하였을 때 상실배 또는 배반포로의 발달율은 모두 5%라고 보고하여 본 연구에서보다 다소 낮은 발달율을 나타내었다. Keefer 등(2002)은 공여체세포를 암, 수 서로 성이 다른 체세포를 이용하였을 때 융합율은 각각 87%와 60%로서 암컷 유래 공여체세포의 융합율이 유의적으로 높았으며, 수란산양의 수태율에 있어서도 각각 50 및 17%로서 차이가 있다고 보고하였다. 돼지의 경우 Hill 등(2000)은 소의 핵이식에 있어서 공핵세포를 성체세포와 태아섬유아세포를 사용하였을 때 배반포기로의 발달율은 각각 17 및 12%로서 이들 간에 차이가 없다고 하였다.

산양에 있어서 핵이식란의 체외발달에 관한 연구 보고가 적은 것은 첫 째는 난소 확보가 어렵기

Table 1. Effects of different donor cells on *in vitro* development of caprine SCNT embryos*

Donor cells	No. of oocytes fused	No. of embryos cleaved (%)	No. of oocytes developed to (%)		
			4-cell	8-cell	Mol. & Bl.
Ear cell	37	15 (40.5) ^a	11 (73.3) ^a	2 (13.3) ^b	1 (6.7) ^a
Fetal fibroblast	45	25 (55.5) ^a	20 (80.0) ^a	13 (52.0) ^a	4 (16.0) ^a

* Values with different superscripts in the same column are significantly different($P < 0.05$).

** Electric strength : 2.40kv/cm, 30 μsec, 1 pulse.

*** Iono+6-DMAP : 5μM ionomycin for 5min, and followed by 2mM 6-DMAP for 4h.

때문이며, 두 번째는 복제수정란의 이식이 외과적으로 실시되므로 배반포기보다는 2-4 세포기의 초기 단계에 복제수정란을 이식하기 때문인 것으로 생각된다.

2. 핵이식란의 활성화 처리 방법에 따른 체외발달을 산양의 체세포 핵이식에 있어서 핵이식 후 융합이 이루어진 난자의 활성화를 유도하기 위하여 전기자극과 ionomycin+6-DMAP를 처리하여 체외발달을 조사한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 핵이식란을 ionomycin+6-DMAP 처리를 하였을 때 분할율은 79.0%(45/57)로서 전기자극을 주었을 때의 9.5%(2/21)보다는 유의적($P<0.05$)으로 높았다. 상실배 또는 배반포기로의 발달율도 ionomycin+6-DMAP 처리를 하였을 때는 15.6%(7/45)가 발달하였으나, 전기자극을 주었을 때는 4-세포기 이후로의 발달이 전혀 이루어지지 않았다.

Apimeteetumrong 등(2004)은 체세포 핵이식란의 활성화를 ionomycin과 ethanol을 각각 처리하였을 때 배반포기로의 발달율은 9.5%와 5.9%로서

차이가 없다고 하였다. Ohkoshi 등(2003)은 체세포 핵이식란의 전기자극에 의한 융합율은 70%였으며, 배반포기로의 발달율은 3%라고 하였다. Butler 등(2004)은 핵이식란의 활성화 처리를 cycloheximide를 사용하였을 때 분할율은 39%로서 대조구의 27%보다는 높다고 하였다. 산양의 핵이식에 의한 복제산자 생산에 관한 연구 보고(Reggio 등, 2001; Keefer 등, 2001; Zou 등, 2002; Butler 등, 2004; Echelard 등, 2004; Melican 등, 2004)에 의하면 거의 대부분이 핵이식란의 활성화 처리는 Ionomycin+6-DMAP 처리를 실시하여 활성화를 유도하였다. 따라서 세밀한 비교 검토가 어려운 실정이며, 본 연구에서 보는 바와 같이 전기자극에 의한 활성화 방법은 앞으로 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

3. 수핵난자의 조건에 따른 핵이식란의 체외발달을 체세포 핵이식란과 단위발생란의 체외발달에 있어서 수핵난자를 체내 성숙난자와 난포란을 각각 사용하였을 때 체외발달율을 조사한 결과는 Table 3

Table 2. Effects of different activation on *in vitro* development of caprine SCNT oocytes*

Activation	No. of oocytes fused	No. of embryos cleaved (%)	No. of oocytes developed to (%)		
			4-cell	8-cell	Mol. & BI.
Electric.	21	2 (9.5) ^b	0 (0.0) ^b	0 (0.0) ^b	0 (0.0) ^b
Iono+DMAP**	57	45 (79.0) ^a	33 (73.3) ^a	22 (48.9) ^a	7 (15.6) ^a

* Values with different superscripts in the same column are significantly different($P<0.05$).

** Activation : 5 μ M ionomycin for 5 min, and followed by 2mM 6-DMAP for 4h.

Table 3. Effects of different oocyte sources on *in vitro* development following of caprine SCNT embryos*

Oocytes	Sources of oocytes	No. of oocytes fused	No. of oocytes cleaved (%)	No. of oocytes developed to (%)		
				4-cell	8-cell	Mol. & BI.
Parthenogenetic	Ovulated	76	66 (86.8) ^{aA}	62 (93.9) ^{aA}	60 (90.9) ^{aA}	33 (50.0) ^{aA}
	Follicular	184	127 (69.0) ^{bA}	84 (66.1) ^{bA}	47 (37.0) ^{bB}	30 (23.6) ^{bA}
SCNT	Ovulated	56	37 (66.1) ^{aB}	27 (73.0) ^{aB}	19 (51.4) ^{aB}	7 (19.0) ^{aB}
	Follicular	44	26 (59.1) ^{aA}	12 (46.2) ^{bB}	3 (11.5) ^{bA}	0 (0.0) ^{bB}

* Values with different superscripts in the same column are significantly different($P<0.05$) between ovulated and follicular oocytes (small letters) or between parthenogenetic and SCNT oocytes (capital letters).

에서 보는 바와 같다.

수핵난자를 체내 성숙난자와 난포란을 사용하였을 때 분할율은 각각 66.1%(37/56) 및 59.1%(26/44)로서 이들 간에 유의적인 차이가 없었다. 단위발생란의 분할율은 체내 성숙난자가 86.8%(66/76)로서 난포란의 69.0%(127/184)보다는 유의적으로 높았다. 뿐만 아니라 핵이식란과 단위발생란의 분할율은 체내 성숙난자의 경우는 66.1% 및 86.8%로서 단위발생란의 분할율이 유의적($P < 0.05$)으로 높았으나, 난포란의 경우는 각각 59.1% 및 69.0%로서 이들 간에 유의적인 차이가 없었다. 상실배 또는 배반포기로의 분할율에 있어서 핵이식란의 경우는 체내 성숙난자의 경우 19.0%(7/37)가 발달하였으나, 난포란은 전혀 발달이 이루어지지 않았다. 단위발생란의 경우에 있어서도 체내 성숙난자(50.0%; 33/66)가 난포란(23.6%; 30/127)보다 유의적($P < 0.05$)으로 발달율이 높았다. 전체적으로 단위발생란이 핵이식란에 비하여 발달율이 높았다.

Reggio 등(2001)은 수핵난자를 도축장 유래 난포란과 과배란처리에 의한 난포란의 경우 융합율은 57%와 63%로서 차이가 없었으며, 이식 후 태아로의 발달율에도 차이가 없다고 하였다. Zou 등(2001)은 복제수정란을 *in vivo*(1.0% agarose)에서 배양을 실시하였을 때 상실배기로의 발달율이 26.5%였으며, 배반포기로의 발달율도 7.8%라고 하여 본 연구 결과의 체외배양시의 발달율보다는 높은 성적이다. Echelard 등(2004)은 수핵난자를 체내 성숙난자와 도축장 유래 난포란을 사용하여 핵이식을 실시하였을 때 융합율은 68%와 63%로서 차이가 없었으며, TCM-199 배양액에 10% FCS를 첨가하여 난관 상피세포와 공배양을 실시하였을 때 배반포기로의 발달율은 각각 26 및 8%로서 수핵난자를 체내 성숙난자로 사용하였을 때가 유의적으로 높았다고 보고하였다. 이러한 결과는 본 연구 결과보다 높은 성적이다.

산양난자의 활성화 유도에 의한 단위발생에 관한 연구는 체내 성숙난자(배란된 난자) 뿐만 아니라 체외 성숙난자(난포란)에 대한 연구보고도 없어서 직접적인 비교는 불가능하다. 돼지의 경우도 거의 대부분이 체외 성숙난자를 이용하여 단위발생에 관한 보고만 있을 뿐이다. 이러한 이유 중의 하

나는 산양의 경우, 사육두수가 소나 돼지처럼 많지 않기 때문에 도축장으로부터의 난소 확보가 거의 불가능하기 때문이며, 특히 우리나라 재래산양의 경우 사육두수가 계속 감소하고 있으며, 산양육이 식육으로 이용하기보다는 강장식품으로 취급을 받고 있기 때문에 도축장에서의 도축보다는 대부분이 음성적으로 도축되고 있기 때문에 난소의 확보는 거의가 불가능하다고 할 수 있다.

적 요

본 연구는 재래산양에서 복제 수정란의 생산효율을 향상시키기 위한 기초 자료를 제시하고자 체세포 핵이식을 실시하여 공핵세포의 종류, 핵이식란의 활성화 처리 방법 및 수핵난자의 조건이 체외발달율에 미치는 영향을 조사, 검토하여 핵이식란 생산을 위한 최적의 조건을 규명하고자 실시하였다.

공핵세포의 종류에 따른 핵이식란의 체외발달율은 융합이 이루어진 핵이식란의 활성화 처리 후 분할율은 귀 유래 섬유아세포를 공핵세포로 사용하였을 때가 40.5%로서 태아 유래 섬유아세포를 공핵세포로 사용하였을 때의 55.5%와 유의적인 차이가 없었다. 또한 상실배 또는 배반포기로의 발달율도 각각 6.7% 및 16.0%로서 유의적인 차이가 없었다. 핵이식란의 활성화 방법에 따른 체외발달율은 ionomycin+6-DMAP 처리를 하였을 때 분할율은 79.0%로서 전기자극을 주었을 때의 9.5%보다는 유의적($P < 0.05$)으로 높았다. 상실배 또는 배반포기로의 발달율도 ionomycin+6-DMAP 처리를 하였을 때는 15.6%가 발달하였으나, 전기 자극을 주었을 때는 4-세포기 이후로의 발달이 전혀 이루어지지 않았다. 체세포 핵이식란은 단위발생란에 비하여 분할율(66.1% vs 59.18%) 및 상실배 또는 배반포배로의 발달율(19.0% vs 0.0%)이 유의적($P < 0.05$)으로 낮았다. 단위발생란의 분할율은 체내 성숙난자에서 86.8%로서 난포란의 69.0%보다는 유의적($P < 0.05$)으로 높았다. 단위발생란의 상실배 또는 배반포기로의 발달율에 있어서도 체내 성숙난자(50.0%)가 난포란(23.6%)보다 유의적($P < 0.05$)으로 발달율이 높았다.

이상의 결과로 볼 때 재래산양의 체세포를 이용한 복제수정란의 생산효율을 향상시키기 위해서는 다수의 난자 확보를 위한 과배란처리 방법의 개선, 난포란의 이용효율 개선 및 활성화 처리방법 등이 확립되어야 하며, 후기배로의 발달을 향상을 위해서는 최적의 체외 배양조건 확립이 시급한 것으로 생각된다.

참고문헌

- Apimeteetumrong M, Thuangsanthia A, Leingcharoen N, Yiengvisavakul V, Harintharanon A, Kunavongkrit A, Sumretprasong J, Vignon X and Techakumphu M. 2004. The effect of activation protocols on the development of cloned goat embryos. *Theriogenology*, 66:1529-1534.
- Bagugisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempe MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overstrom EW and Echelard Y. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotechnology*, 17:456-461.
- Butler RE, Melican D, Hawkins N, Jellerette T, Nims S, Graslie K and Gavin WG. 2004. Effects of cycloheximide on caprine somatic cell nuclear transfer embryo and fetal development. *Reprod. Fert. Dev. Abstr.*, 16:138.
- Echelard Y, Memili E, Ayres SL, O'Coin M, Chen LH, Meade HM and Behboodi E. 2004. Comparison of the developmental potential of caprine nuclear transfer embryos derived from *in vitro* and *in vivo* matured oocytes. *Reprod. Fert. Dev. Abstr.*, 16:140.
- Hill JR, Winger QA, Long CR, Looney CR, Thompson JA and Westhusin ME. 2000. Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Biol. Reprod.*, 62:1135-1140.
- Keefer CL, Baldassarre H, Keyston R, Wang B, Bhatia B, Bilodeau AS, Zhou JF, Leduc M, Downey BR, Lazaris A and Karatzas CN. 2001. Generation of dwarf goat(*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and nontransfected fetal fibroblasts and *in vitro*-matured oocytes. *Biol. Reprod.*, 64: 849-856.
- Keefer CL, Keystone R, Lazaris A, Bhatia B, Begin I, Bilodeau AS, Zhou FJ, Kafidi N, Wang B, Baldassarre H and Karatzas CN. 2002. Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. *Biol. Reprod.*, 66:199-203.
- McGrath J and Solter D. 1983. Nuclear transplantation in the mouse embryo on micromanipulation and cell fusion. *Science*, 220:1300-1302.
- Melican D, Butler R, Hawkins N, Nims S, Buzzell N, Jellerette T and Gavin WG. 2004. Estrus synchronization of dairy goats utilized as recipients for caprine nuclear transfer embryos. *Reprod. Fert. Dev.*, 16:151(abstr).
- Ohkoshi K, Takahashi S, Koyama S, Akagi S, Adachi N, Furusawa T, Fujimoto J, Takeda K, Kubo M, Izaike Y and Tokunaga T. 2003. *In vitro* oocyte culture and somatic cell nuclear transfer used to produce a live-born cloned goat. *Cloning Stem Cells*, 5:109-115.
- Reggio BC, James AN, Green HL, Gavin WG, Behboodi E, Echelard Y and Godke R. A. 2001. Cloned transgenic offspring resulting from somatic cell nuclear transfer in the goats: oocytes derived from both follicle-stimulating hormone-stimulated and nonstimulated abattoir-derived ovaries. *Biol. Reprod.*, 65:1528-1533.
- Reggio BC, Green HL, Sansinena M, Chen LH, Behboodi E, Denniston RS, Echelard Y and Godke RA. 2002. Production of cloned transgenic goats as a potential source for human pharmaceuticals. *Theriogenology*, 57:445(abstr.).
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ and

Campbell KHS. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385:810-813.

Zou XG, Chen Y, Wang Y, Luo JP, Zhang QB, Zhang XC, Yang Y, Ju HM, Shen Y, Lao W, Xu S and Du MA. 2001. Production of cloned goats from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei or fused with cumulus cells. *Cloning*, 3:31-37.

Zou XG, Wang UG, Cheng Y, Yang YE, Ju HM, Tang HL, Shen Y, Mu ZY, Xu SF and Du M. 2002. Generation of cloned goats(*Capra hircus*) from transfected foetal fibroblast cells, the effect of donor cell cycle. *Mol. Rerod. Dev.*, 61:164-172.

(접수일: 2005. 5. 15 / 채택일: 2005. 6. 29)