

제주흑우 체세포 복제수정란의 체외 생산

김동훈^{1,*}, 양병철¹, 임기순¹, 류재규¹, 노진구¹, 박종주¹, 이성수², 고문석², 박진기¹
¹국립축산과학원 동물바이오공학과, ²난지축산시험장

In Vitro Production of Jeju Black Cattle Cloned Embryos by Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT)

Dong-Hoon Kim^{1,*}, Byoung-Chul Yang¹, Gi-Sun Im¹, Jae Gyu Yoo¹, Jin-Gu No¹, Jong-Ju Park¹,
 Sung-Soo Lee², Moon-Suck Ko² and Jin-Ki Park¹

¹Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea

²Subtropical Animal Experiment Station, National Institute of Animal Science, RDA, Jeju 690-150, Korea

ABSTRACT

This study was carried out to investigate effective condition for producing somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos of Jeju native cattle. As donor cells for SCNT, ear skin cells from Jeju native cattle were used. In experiment 1, the effect of recipient oocyte sources on the development of Jeju native cattle SCNT embryos were examined. Fusion rate of recipient oocyte and donor cell was not different between the Hanwoo and Holstein recipient oocytes (86.0% vs 89.9%). The rate of embryos developing to the blastocyst stage was significantly ($p < 0.05$) higher in Hanwoo recipient oocytes than in Holstein recipient ones (28.2% vs 14.7%). Blastocysts derived from Hanwoo recipient oocytes contained higher numbers of total cells than those derived from Holstein ones (115.1 ± 40.8 vs 101.4 ± 33.3), although there were no significant difference. The mean proportion of apoptotic cells in blastocyst was not different between the sources of recipient oocytes. In experiment 2, the development of Jeju native cattle and Hanwoo SCNT embryos were compared. Hanwoo oocytes were used as the recipient oocytes. Fusion rate was not different between the Jeju native cattle and Hanwoo SCNT embryos (92.1% vs 92.9%). The blastocyst rate of SCNT embryos was significantly ($p < 0.05$) lower in Jeju native cattle than in Hanwoo (16.9% vs 31.0%). Blastocysts derived from Jeju native cattle SCNT embryos contained smaller numbers of total cells than those derived from Hanwoo ones (136.6 ± 33.7 vs 149.9 ± 39.7), but there were no significant difference. The mean proportion of apoptotic cells in blastocyst was not different between the Jeju native cattle and Hanwoo SCNT embryos. The present study demonstrated that Hanwoo recipient oocytes were more effective in supporting production of Jeju native cattle SCNT embryos, although Jeju native cattle SCNT embryos showed reduced developmental capacity when compared to Hanwoo SCNT embryos.

(Key words : somatic cell nuclear transfer (SCNT), jeju native cattle, recipient oocyte)

서 론

체세포 복제기술을 이용한 최초의 복제동물인 면양(Wilmot 등, 1997)이 생산된 이후, 소(Kato 등, 1998)를 포함한 다수의 동물 중에서 복제동물의 생산을 보고하였다. 이러한 결과들은 체세포 복제기술은 유전적으로 동일한 복제동물을 증식하는데 유용한 기술임을 제시하고 있다. 또한 멸종 위기 동물과 재래동물 자원의 보존 및 증식을 위하여 체세포 복제기술이 효과적으로 이용되고 있다. 이러한 연구의 일환으로 일반소의 수핵란에 희귀소의 체세포를 이식하는 이중 간 체세포 복제

를 이용하여 Enderby Island 소를 성공적으로 복제하였으며 (Wells 등, 1998). 또한 Gaur 및 Yak에서는 체세포 복제수정란 이식 후 태아 발생 (Lanza 등, 2000; Li 등, 2007a; Li 등, 2007b), 중국 황우와 Buffalo에서는 복제수정란의 배반포 발달을 보고하고 있다(Lu 등, 2005; Yang 등, 2005).

제주흑우는 국내에서 제주 지역에서만 보존, 사육되고 있는 재래가축 자원으로서 한우와 더불어 FAO에 한국 고유의 재래가축의 한 계통으로 등재되어 있다. 현재 제주흑우는 기초 집단이 작아서 제주흑우의 지속적인 보존과 실용화를 위해서는 조기 증식이 요구되고 있다. 가축 증식 기술 중에 특정 개체

* 본 과제는 농촌진흥청 어젠다 프로그램 연구비로 실시되었음.

* Correspondence : E-mail : kimdhj@korea.kr

를 생산하기 위해 이용되고 있는 가장 일반적인 MOET (Multiple Ovulation Embryo Transfer) 기술로 제주흑우를 증식하였을 때 이식 가능한 수정란 생산은 그 수가 제한되어 있는 것이 현실이며, 또한 종모우의 경우는 고령으로 인해 정액의 질과 생산량이 감소하는 등 제주흑우의 무한 증식에는 현재 한계가 있는 상황이다. 따라서 현재 멸종 위기 동물 및 형질 전환 동물 생산에 활용되고 있는 생명공학기법의 하나인 체세포 복제기술은 제주흑우의 보존과 증식에 유용한 방법으로 활용될 수 있다.

따라서 본 연구 목적은 체세포 복제 기술을 활용하여 제주흑우 복제수정란의 체외생산 조건을 확립하는데 있다.

재료 및 방법

1. 체세포의 준비

본 실험에서는 동결보존된 제주흑우 및 한우 귀세포를 이용하였다. 체세포의 동결보존을 위하여 10% DMSO가 첨가된 fetal bovine serum을 동결보존액으로 이용하였다. 동결보존된 체세포는 용해하여 10% FBS 그리고 1% antibiotic-antimycotics(Gibco-BRL, Grand Island, NY, U.S.A.)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM; Gibco-BRL)에서 세척한 다음, 신선한 배양액에 재부유시켜 25 cm² flask에 분주하여 5% CO₂, 95% 공기 그리고 39°C 조건의 배양기 내에서 배양을 실시하였다. 배양 5~7일 경에 체세포가 flask에서 100% confluence 상태가 되었을 때, 0.05% trypsin-EDTA 용액(Gibco-BRL)으로 처리하여 부유시킨 다음, 0.5% FBS가 첨가된 PBS로 세척하여 체세포 복제수정란 생산에 이용하였으며, 사용된 체세포는 3~7 passage이었다.

2. 난포란의 채취 및 성숙배양

도축장에서 회수된 난소에서 직경 2~7 mm의 난포로부터 미성숙 난자를 채취하여, 난구세포가 치밀하게 부착되고, 세포질이 균일한 난자만을 선별하여 체외성숙에 이용하였다. 회수된 미성숙 난자의 체외성숙에는 TCM 199(Gibco-BRL)을 기본 배양액으로 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco-BRL), 1 μg/ml follicle-stimulating hormone(FSH)(Folltropin-V; Bioniche, ON, Canada), 1 μg/ml estradiol-17β (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) 그리고 10 ng/ml epidermal growth factor(EGF; Sigma)가 첨가된 배양액을 사용하였으며, 3시간 이상 전배양을 실시한 paraffin oil이 피복된 500 μl의 체외성숙용 배양액에 미성숙 난자를 옮겨, 5% CO₂, 95% 공기 그리고 39°C 조건의 배양기 내에서 20시간 배양함으로써 체외성숙을 유도하였다.

3. 제핵 및 핵이식

체외성숙이 유도된 수핵란은 0.1% hyaluronidase(Sigma)가

첨가된 D-PBS에 침적하여 4분간 vortex를 실시하여 난구세포를 완전히 제거하였으며, 세포질이 균일하고 제 1극체가 뚜렷하게 방출된 난자만을 선별하여 실험에 이용하였다.

제핵 전에 수핵란은 20% FBS와 5 μg/ml PHA-P(Sigma)가 첨가된 HEPES-buffered TCM-199 배양액(Gibco-BRL)에 침적하였다. 제핵을 위하여 미세 유리관을 이용하여 제 1극체 부근의 투명대를 부분 절개하였으며, squeezing 방법을 이용하여 제 1극체와 세포질을 들춰내어 핵을 제거하였다. 제핵된 난자들은 10 μg/ml Hoechst 33342를 사용해 5분간 염색한 다음, 형광현미경을 사용해 탈핵 여부를 검사하였다. 제핵된 수핵란은 20% FBS가 첨가된 HEPES-buffered TCM-199 배양액에서 핵이식 때까지 배양을 실시하였다. 핵이식을 위하여 제핵된 수핵란은 20% FBS와 5 μg/ml PHA-P가 첨가된 HEPES-buffered TCM-199 배양액에 침적한 후에 공여세포를 미세 주입 피펫을 이용하여 절개된 투명대를 통하여 수핵란의 위난강 내에 주입하였다.

4. 융합 및 활성화 처리

핵이식이 완료된 난자의 융합은 전기세포융합장치(Fujihira Industry Co., Japan)를 이용하여 실시하였다. 핵이식란은 Zimmermann 세포융합액에서 5분간 평형을 실시한 다음, 세포융합액이 채워진 배양 접시로 옮겨서 두 개의 electrode로 핵이식란을 한 개씩 양쪽에서 고정하여 직류 25 V/mm, 20 μsec, 1회 통전하여 세포 융합을 유도하였다. 통전 후, 핵이식란은 20% FBS가 첨가된 HEPES-buffered TCM-199 배양액에서 배양하였으며, 융합 여부는 배양 후 30분경에 관찰하였다.

융합된 핵이식란의 활성화를 유도하기 위하여 10 μM Ca-ionophore(Sigma)가 첨가된 CR2 배양액에서 5분간 처리한 다음 2 mM 6-dimethylaminopurine(6-DMAP; Sigma)이 첨가된 CR2 배양액(108 mM NaCl, 3 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 5 mM Ca-lactate, 0.3 mM Na-pyruvate, 1 mM glutamine, Gentamycin, MEM nonessential amino acids, BME essential amino acids)에서 3시간 배양을 실시하였다.

5. 체외배양

활성화 처리된 핵이식란은 3 mg/ml fatty acid free BSA(FAF-BSA; Sigma)가 첨가된 20 μl CR2 배양액 소적에서 3일간 배양을 한 후, 1.5 mg/ml FAF-BSA와 5% FBS가 첨가된 CR2 배양액으로 교체하여 4일간 추가 배양을 실시하였다. 수정란 배양조건은 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂ 그리고 39°C이었다.

6. 배반포의 세포수 및 세포자연사 조사

배양 7일째 배반포를 4% paraformaldehyde가 첨가된 PBS에서 1시간 이상 고정시킨 다음, 0.5% Triton X-100에서 30분간 처리를 하였다. TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling (TUNEL)을 위해 배반포는 TMR red-conjugated TUNEL rea-

gent(Roche, Mennhein, Germany)에 침적시켜 39°C에서 1시간 배양하였으며, 그리고 counterstain을 위해 배반포는 50 µg/ml Hoechst 33342(Sigma)로 실온에서 30분간 염색을 실시하였다. 형광염색이 완료된 배반포는 anti-bleaching액(Vectashield; Vector, Burlingame, CA, U.S.A.)과 함께 slide glass에 mount하여 형광 현미경 하에서 총 세포수와 세포자연사(apoptosis) 유발 세포수를 관찰하였다. 세포 중에 빨간색 형광을 나타내는 것만을 세포자연사가 유발된 세포로 판정을 하였으며, 총세포수에서 세포자연사가 유발된 세포를 백분율로 계산하여 세포자연사를 나타내었다.

7. 실험계획

실험 1. 수핵란의 종류에 따른 제주흑우 복제수정란의 발생 능력을 살펴보기 위하여 홀스타인 및 한우 난자를 비교 실험하였다.

실험 2. 제주흑우 및 한우 복제수정란의 발생 능력을 비교하기 위하여 한우 수핵란에 제주흑우 및 한우 체세포를 각각 이식하여 배반포 발달율, 세포수를 조사하였다.

8. 통계분석

본 연구를 통하여 획득된 결과에 대한 통계 분석은 Chi-square test와 Student's t-test를 이용하였으며, $p < 0.05$ 이하인 경우 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 수핵란 종류에 따른 제주흑우 복제수정란의 발달 비교
제주흑우 체세포 복제수정란 생산에 있어 수핵란의 종류가

복제수정란 발달에 미치는 영향을 조사하였다. Table 1에 제시된 바와 같이 복제수정란의 융합율은 한우 수핵란(86.0%)과 젓소 수핵란(87.9%) 간에 차이를 나타내지 않았으나, 배양 7일 째에 배반포 발달율은 한우 수핵란(28.2%)이 젓소 수핵란(14.7%)보다 유의하게 높은 것으로 나타났다($p < 0.05$). 배양 7일째 배반포의 세포수를 조사한 결과(Table 2)는 한우 수핵란이 젓소 수핵란보다 다소 많은 것으로 나타났다(115.1±40.8 vs 101.4±33.3). 또한 세포자연사 유발 세포수(2.4±1.9 vs 1.6±1.1)와 그 비율(2.2±1.8% vs 1.9±1.8%)에 있어서는 두 수핵란 간에 차이가 없는 것으로 조사되었다.

2. 제주흑우 및 한우 체세포 복제수정란 발달 비교

제핵된 한우 수핵란에 제주흑우와 한우 체세포를 융합 후 체외배양하여 복제수정란 생산 효율을 비교하였다. Table 3에 제시된 바와 같이 복제수정란의 융합율은 제주흑우(92.1%)와 한우(92.9%) 간에 차이를 나타내지 않았으나, 배양 7일 째에 배반포 발달율은 제주흑우(16.9%)가 한우(31.0%) 복제수정란보다 유의하게 낮은 것으로 나타났다($p < 0.05$). 배양 7일 째 배

Table 2. Comparison of the the cell number and apoptosis in Jeju Black Cattle SCNT blastocysts according to recipient oocyte sources

Recipient oocytes	No. of blastocysts examined	Cell number	Apoptotic cell number	Apoptotic cell (%)
Hanwoo	24	115.1 ± 40.8	2.4 ± 1.9	2.2 ± 1.8
Holstein	5	101.4 ± 33.3	1.6 ± 1.1	1.9 ± 1.8

Table 1. Comparison of the development of Jeju Black Cattle SCNT embryos according to recipient oocyte sources

Recipient oocytes	No. of oocytes manipulated	No.(%) of oocytes fused	No.(%) of oocytes cultured	No.(%) of embryos developed to	
				2-cell	Blastocyst
Hanwoo	209	180 (86.0 ± 0.8)	178	113 (62.3 ± 10.9)	50 (28.2 ± 9.7) ^a
Holstein	85	76 (87.9 ± 7.1)	75	42 (59.9 ± 19.1)	11 (14.7 ± 5.2) ^b

^{a,b} Significant differences within the same column ($p < 0.05$).

Table 3. Comparison of the development of Jeju Black Cattle and Hanwoo SCNT embryos

Somatic cell	No. of oocytes manipulated	No.(%) of oocytes fused	No. of oocytes cultured	No.(%) of embryos developed to	
				2-cell	Blastocyst
Jeju Black	128	118 (92.1 ± 0.9)	118	84 (72.1 ± 4.5)	22 (16.9 ± 6.1) ^a
Hanwoo	137	126 (92.9 ± 1.0)	151	88 (69.8 ± 0.8)	37 (31.0 ± 5.9) ^b

^{a,b} Significant differences within the same column ($p < 0.05$).

Table 4. Comparison of the cell number and apoptosis in Jeju Black Cattle and Hanwoo SCNT blastocysts

Somatic cell	No. of blastocysts examined	Cell number	Apoptotic cell number	Apoptotic cell (%)
Jeju Black	11	136.6 ± 33.7	1.5 ± 1.5	1.2 ± 1.2
Hanwoo	17	149.9 ± 39.7	1.5 ± 1.7	1.1 ± 1.2

반포의 세포수를 조사한 결과(Table 4)는 제주흑우가 한우 복제수정란보다 세포수가 적은 것으로 나타났으나, 통계적 차이는 인정되지 않았다(136.6±33.7 vs 149.9±39.7). 또한 세포자연사 유발 세포수(1.5±1.5 vs 1.5±1.7)와 그 비율(1.2±1.2% vs 1.1±1.2%)에 있어서도 제주흑우와 한우 복제수정란 간에 차이가 없는 것으로 조사되었다.

고찰

제주흑우는 외형상 한우와 비슷하지만, 체형이 다소 작고 체모가 전반적으로 흑색을 나타내는 우리나라 고유 재래소의 한 품종이다. 제주흑우의 기원은 유럽원우와 인도원우 혼혈종으로 한반도에 유래되어 다른 품종과 교배없이 동종 번식을 하여 정립된 것으로 알려져 있다. 1980년대까지 유전자원의 보존 측면보다 산업적 활용을 위한 한우개량을 지향하면서 제주흑우는 심각한 멸종위기의 상황에 직면하였으나, 1990년대 이후 원종 수급과 축군 증식을 위한 연구 및 관리 체계가 마련되었다(Han 등, 2010). 현재 제주흑우의 증식은 체내 수정란 이식과 인공수정을 통하여 진행되고 있으나, 기술의 한계점에 의해 다량 증식에는 어려움이 있다. 따라서 이러한 상황을 극복하기 위해서 새로운 대안 기술의 개발 및 적용의 필요성이 제기되고 있다.

체세포 복제기술은 유전적으로 동일한 동물을 복제 증식하는데 유용한 기술로 알려져 있으며, 체세포 복제기술이 발전함에 따라 멸종위기 동물과 재래동물 자원의 보존 및 증식을 위하여 본 기술이 활용되고 있다. 멸종 위기 동물의 보존 차원에서 야생 양의 일종인 Mouflon의 과립막세포를 양 난자에 이식하는 이종간 체세포 복제를 통하여 Mouflon을 생산하였으며(Loi 등, 2001), 또한 집 고양이 난자를 활용한 아프리카 야생고양이의 복제(Gomez 등, 2004), 개 난자를 이용한 회색 늑대의 성공적 복제(Kim 등, 2007)를 보고하고 있다. 소의 경우에는 멸종위기 종인 Enderby Island 소와 들소의 일종인 Gaur 소를 일반 소의 난자를 수핵란으로 사용하여 복제 생산을 보고하고 있다(Wells 등, 1998; Vogel 등, 2001).

본 연구는 우리나라 고유의 재래품종인 제주흑우의 복제생산을 위한 기반을 구축하고자 수행하였다. 체세포 복제수정란

체의생산 조건을 확립하기 위하여 체세포 복제에 사용되는 수핵란으로 홀스타인 및 한우 난자를 비교하였으며, 또한 제주흑우 복제수정란의 발생 능력을 조사하기 위하여 제주흑우와 한우 체세포 복제수정란의 체외발달율을 비교하였다.

본 연구 결과에서 제주흑우 체세포 복제수정란 발달은 한우 수핵란이 젓소 수핵란보다 효과적인 것으로 나타났다. Kim 등(2008)은 한우 체세포 복제수정란의 생산에 있어서 한우 수핵란의 사용이 Holstein 수핵란보다 유의하게 높은 배반포 발달율과 배반포 세포수를 보고하였다. 이러한 결과들은 다음과 같은 2가지 요인에 기인한 것으로 사료된다. 첫 번째는 발생 초기 핵 리프로그래밍 과정에서 수핵란의 중간 차이이다. 최근에 체세포 복제수정란의 발달 능력에 있어서 수핵란 중간 차이가 생쥐와 소에서 보고되고 있다(Gao 등, 2004; Yang 등, 2005). 생쥐 연구 결과는 BDF₁ 계통의 난구세포를 동종인 BDF₁ 계통 수핵란과 융합하여 다른 계통의 수핵란은 이용하는 것보다 높은 배반포 발달을 나타냈다(Gao 등, 2004). 두 번째는 수핵란을 제공하는 공여축의 연령이다. 일반적으로 젓소인 Holstein은 육우인 한우보다 많은 연령에 도축된다. 소의 경우, 연령이 증가함에 따라 난자의 질이 감소하여 비정상적인 수정율이 증가하는 것으로 보고되고 있으며(Malhi 등, 2007; Yamamoto 등, 2010), 그리고 사람 및 생쥐 연구 결과에서도 난자 공여자의 연령이 증가됨에 따라 공여난자의 수정율과 배반포 발달율이 감소한다고 보고하고 있다(Fujino 등, 1996; Janny와 Menezo, 1996). 나이와 관련된 난자의 발생 능력 저하는 난자 세포질 내 미토콘드리아의 비정상적 기능과 과립막 세포의 기능 저하 등과 관련이 있는 것으로 생각된다(Thouas 등, 2005). 미토콘드리아는 난자에서 주요 에너지 공급원이며, 방추체 부근에 집락 형성, 단백질 기능과 세포 구조물의 조절, 세포 내 칼슘 항상성 조절을 통하여 세포내 pH를 조절하는 중요한 역할을 수행한다(Van Blerkom 등, 2002). 미토콘드리아의 비정상적 기능과 형태는 난자의 염색체 분리 이상, 성숙 및 수정의 실패, 난자 및 수정란의 파편화 등을 유발하여 발달과정에 악영향을 미치는 것으로 보고되고 있다(Brookes 등, 2004). 과립막세포는 에너지 대사, 아미노산 흡수, 호르몬 분비 등에 관여하여 난자 발달에 적합한 미세 환경을 제공한다. 그러나 연령이 증가하면 난포 내 과립막세포의 p38 MAPK 활성화도 증가에 의한 산화 스트레스의 유발, 증식 능력 저하 등에 의하여 난자의 발달 능력도 감소하는 것으로 보고되고 있다(Ito 등, 2010; Goto 등, 2011). 따라서 이러한 요인들에 기인하여 제주흑우 체세포 복제수정란 생산을 위한 수핵란으로 한우가 보다 적합하다는 것으로 사료된다.

본 연구에서 한우난자를 수핵란으로 이용하여 제주흑우와 한우 체세포 복제수정란의 체외발달 능력을 비교한 결과, 제주흑우 복제수정란의 발달이 저조한 것으로 나타났다. Li 등(2007b)은 일반소의 난자를 수핵란으로 Yak와 일반소 복제수

정란의 배반포 발달을 비교 조사하여 Yak 복제수정란의 발달이 현저히 저조하였으며, 또한 trophectoderm 세포: 전체 세포 비율이 비정상적인 배반포가 증가하였으며, 그리고 배반포의 착상전 발생과 trophoblast 전구체의 발달에 중요한 역할을 하는 Mash2(a mammalian homologue of the *Drosophila achaete-scute* genes)와 배반포의 발달과 착상에 중요한 기능을 하는 IL-6 유전자의 비정상적 발현이 나타나는 것을 확인하였다. Gaur소의 경우에도 일반소 수핵란에 체세포 이식을 하였을 때, 일반소 복제수정란에 비하여 현저히 낮은 배반포 발달 및 배반포의 세포수, 미토콘드리아 관련 유전자인 MT-CYB(Cytochrome B)의 비정상적 발현을 보고하고 있다(Mastrotonaco 등, 2007). 이중 간 체세포 복제 시, 복제수정란의 발달이 저하되는 원인은 체세포와 수핵란 간의 미토콘드리아 DNA(mtDNA) 융화성에 기인한 것으로 추정된다. 최근 연구 결과에 따르면, 소 체세포 복제수정란 생산 시 동일한 mtDNA haplotype의 체세포와 수핵란으로 복제하는 것이 상이한 mtDNA haplotype을 이용하는 것보다 높은 배반포 발달율, 배반포에서의 정상적인 히스톤 H3K9 메틸화 패턴 및 감소된 다능성 유전자(Oct4, Sox2) 프로모터의 DNA 메틸화 패턴을 나타냈으며, 또한 복제소의 분만율이 약 2배 정도 증가하였다고 보고하고 있다(Yan 등, 2010; Yan 등, 2011). 따라서 제주흑우 복제수정란의 낮은 발달율은 이중의 체세포와 수핵란 이용에 따른 mtDNA haplotype의 상이성에 기인한 것으로 사료된다.

본 연구 결과를 종합해 볼 때, 비록 한우난자를 수핵란으로 이용하여 제주흑우와 한우 체세포 복제수정란의 배반포 발달을 비교한 결과는 제주흑우 복제수정란의 발달율이 낮은 것으로 나타났지만, 제주흑우 체세포 복제수정란 생산을 위해서는 한우 수핵란이 젓소 수핵란보다 효과적임을 확인할 수 있었다.

결 론

본 연구는 제주흑우 체세포 복제수정란을 생산하기 위한 효과적인 조건을 조사하기 위하여 실시하였다. 복제수정란 생산을 위한 공여세포는 제주흑우이 귀 피부세포를 이용하였다. 실험 1에서는 제주흑우 체세포 복제수정란 발달에 있어서 수핵란(한우, 젓소) 효과를 조사하였다. 수핵란과 공여세포의 융합율은 한우 및 젓소 수핵란 간에 차이가 없었으나(86.0% vs 87.9%), 배반포까지의 발달율은 한우 수핵란이 젓소 수핵란보다 유의하게($p < 0.05$) 높은 결과를 나타냈다(28.2% vs 14.7%). 배반포의 세포수는 한우 수핵란 유래의 배반포가 젓소 수핵란 유래의 것보다 많은 세포수 나타냈으나(115.1±40.8 vs 104.3±33.3), 통계적인 차이는 없었다. 또한 세포자연사가 유발된 세포수도 한우 및 젓소 수핵란 간에 차이가 없는 것으로 분석되었다. 실험 2에서는 한우 수핵란을 이용하여 제주흑우와 한우

체세포 복제수정란의 발달을 비교하였다. 융합율은 제주흑우 및 한우 복제수정란 간에 차이가 없었지만(92.1% vs 92.9%), 배반포까지의 발달율은 제주흑우가 한우 복제수정란보다 유의하게($p < 0.05$) 낮은 결과를 나타냈다(16.9% vs 31.0%). 배반포의 세포수는 제주흑우 배반포가 한우의 것보다 적은 세포수 나타냈으나(136.6±33.7 vs 149.9±39.7), 통계적인 차이는 인정되지 않았다. 또한 세포자연사가 유발된 세포수도 제주흑우와 한우 배반포 간에 차이가 없는 것으로 나타났다. 본 연구 결과를 통해 제주흑우 복제수정란이 한우 복제수정란에 비하여 감소된 발달율을 나타내지만, 한우 수핵란이 제주흑우 복제수정란 생산에 보다 효과적임을 확인할 수 있었다.

참고문헌

- Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW and Sheu SS. 2004. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 287:817-833.
- Fujino Y, Ozaki K, Yamamasu S, Ito F, Matsuoka I, Hayashi E, Nakamura H, Ogita S, Sato E and Inoue M. 1996. DNA fragmentation of oocytes in aged mice. *Hum. Reprod.* 11: 1480-1483.
- Gao S, Czirr E, Chung YG, Han Z and Latham KE. 2004. Genetic variation in oocyte phenotype revealed through parthenogenesis and cloning: correlation with differences in pronuclear epigenetic modification. *Biol. Reprod.* 70:1162-1170.
- Gomez MC, Pope CE, Giraldo A, Lyons LA, Harris RF, King AL, Cole A, Godke RA and Dresser BL. 2004. Birth of african wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning Stem Cells* 6:247-258.
- Goto H, Iwata H, Takeo S, Nisinonso K, Murakami S, Monji Y and Kuwayama T. 2011. Effect of bovine age on the proliferative activity, global DNA methylation, relative telomere length and telomerase activity of granulosa cells. *Zygote* 27:1-9.
- Han SH, Ko JC, Kim YH, Kim NY, Kim JH, Ko MS, Jeong HY, Cho IC, Yang YH and Lee SS. 2010. Verification of ET and AI derived offspring using on the genetic polymorphisms of microsatellite and coat color related genes in Jeju black cattle. *J. Life Sci.* 20:381-387.
- Ito M, Miyado K, Nakagawa K, Muraki M, Imai M, Yamakawa N, Qin J, Hosoi Y, Saito H and Takahashi Y. 2010. Age-associated changes in the subcellular localization of phosphorylated p38 MAPK in human granulosa cells. *Mol. Hum. Reprod.* 16:928-937.

- Janny L and Menezo YJ. 1996. Maternal age effect on early human embryonic development and blastocyst formation. *Mol. Reprod. Dev.* 45: 31-37.
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H and Tsunoda Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282:2095-2098.
- Kim DH, Kim SW, Lee MJ, Bae SH, Im GS, Lim HJ, Yang BC and Seong HH. 2008. Effects of recipient oocyte and embryo culture system on production of Hanwoo (Korean Native Cattle) somatic cell nuclear transferred embryos. *Reprod. Dev. Biol.* 32:175-181.
- Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Hwang WS, Hossain MS, Kim JJ, Shin NS, Kang SK and Lee BC. 2007. Endangered wolves cloned from adult somatic cells. *Cloning Stem Cells* 9(1):130-137.
- Lanza RP, Cibelli JB, Diaz F, Moraes CT, Farin PW, Farin CE, Hammer CJ, West MD and Damiani P. 2000. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning* 2:79-90.
- Li Y, Dai Y, Du W, Zhao W, Wang L, Wang H, Liu Y, Li R and Li N. 2007a. *In vitro* development yak (*Bos grunniens*) embryos generated by interspecies nuclear transfer. *Anim. Reprod. Sci.* 101:45-59.
- Li Y, Li S, Dai Y, Du W, Zhao C, Wang L, Wang H, Li R, Liu Y, Wan R and Li N. 2007b. Nuclear reprogramming in embryos generated by the transfer of yak (*Bos grunniens*) nuclei into bovine oocytes and comparison with bovine-bovine SCNT and bovine IVF embryos. *Theriogenology* 67:1331-1338.
- Loi P, Ptak G, Barboni B, Fulka J Jr, Cappai P and Clinton M. 2001. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat. Biotechnol.* 19:962-964.
- Lu F, Shi D, Wei J, Yang S and Wei Y. 2005. Development of embryos reconstructed by interspecies nuclear transfer of adult fibroblasts between buffalo (*Bubalus bubalis*) and cattle (*Bos indicus*). *Theriogenology* 64:1309-1319.
- Malhi PS, Adams GP, Mapletoft RJ and Singh J. 2007. Oocyte developmental competence in a bovine model of reproductive aging. *Reproduction* 134:233-239.
- Mastromonaco GF, Favetta LA, Smith LC, Filcon F and Allan King W. 2007. The influence of nuclear content on developmental competence of Gaur × Cattle hybrid *in vitro* fertilized and somatic cell nuclear transfer embryos. *Biol. Reprod.* 76:514-523.
- Thouas GA, Trounson AO and Jones GM. 2005. Effect of female age on mouse oocyte developmental competence following mitochondrial injury. *Biol. Reprod.* 73:366-373.
- Van Blerkom J, Davis P, Mathwig V and Alexander S. 2002. Domains of high-polarized and low-polarized mitochondria may occur in mouse and human oocytes and early embryos. *Hum. Reprod.* 17:393-406.
- Vogel G. 2001. Endangered species. Cloned gaur a short-lived success. *Science* 219:409.
- Wells DN, Misica PM, Tervit HR and Vivanco WH. 1998. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby island cattle breed. *Reprod. Fertil. Dev.* 10:369-378.
- 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.
- Yamamoto T, Iwata H, Goto H, Shiratuki S, Tanaka H, Monji Y and Kuwayama T. 2010. Effect of maternal age on the developmental competence and progression of nuclear maturation in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 77:595-604.
- Yan H, Yan Z, Ma Q, Jiao F, Huang S, Zeng F and Zeng Y. 2011. Association between mitochondrial DNA haplotype compatibility and increased efficiency of bovine interspecies cloning. *J. Genet. Genomics* 38:21-28.
- Yan Z, Zhou Y, Fu J, Zhao L, Guan P, Huang S, Zeng Y and Zeng F. 2010. Donor-host mitochondrial compatibility improves efficiency of bovine somatic cell nuclear transfer. *BMC Dev. Biol.* 10:31.
- Yang XY, Zhao JG, Li HW, Li H, Liu HF, Huang SZ and Zeng YT. 2005. Improving *in vitro* development of cloned bovine embryos with hybrid (Holstein-Chinese Yellow) recipient oocytes recovered by ovum pick up. *Theriogenology* 64:1263-1272.