

핵이식 수정란의 동결, 융해 및 이식에 의한 클론동물의 생산 II

황우석 · 조충호 · 이창우 · 이병천

서울대학교 수의과대학

(1993년 6월 22일 접수)

Production of cloning animals by fresh and frozen-thawed nuclear transfer embryos II

Woo-suk Hwang, Choong-ho Jo, Chang-woo Lee, Byeong-chun Lee

College of Veterinary Medicine, Seoul National University

(Received June 22, 1993)

Abstract : This study was carried out to investigate the best condition for *in vitro* and *in vivo* culture after freezing and thawing of nuclear transplant 2 cell embryos.

When nuclear transplant embryos were submitted to electrofusion, the significantly higher fusion rates of 2 cell donor nuclei were achieved at the electric field strength of DC 1.5 kV/cm for 100 and 150 μ sec, DC 2.0 kV/cm for 100 and 150 μ sec than DC 1.0 kV/cm for 100 and 150 μ sec ($p < 0.01$). The significantly higher fusion rates of 4 cell donor nuclei were achieved at DC 2.0 kV/cm for 100 and 150 μ sec than DC 1.0 kV/cm for 100 and 150 μ sec ($p < 0.01$). The fusion rates in 8 cell donor nuclei were 94.2~99.3%.

The developmental potency to blastocyst in 2 cell donor nuclei was significantly higher in DC 2.0 kV/cm for 150 μ sec treated group ($p < 0.01$). The significantly higher developmental potency to blastocyst in 4 cell donor nuclei were achieved at the electric field strength of DC 2.0 kV/cm for 150 μ sec than DC 1.5 kV/cm for 100 and 150 μ sec, DC 2.0 kV/cm for 100 μ sec treated group ($p < 0.01$). The developmental potency to blastocyst in 8 cell donor nuclei was significantly higher in DC 2.0 kV/cm for 100 μ sec treated group ($p < 0.01$). The developmental potency to blastocyst after nuclear transplantation was significantly higher in 2 cell donor nuclei than in 8 cell donor nuclei ($p < 0.01$).

When the recovered embryos in normal morphology were cultured *in vitro*, there were no significant differences in the developmental potency to blastocyst between the freezing methods and the concentrations of cryoprotectant ($p < 0.01$). The production rates of offspring after transfer of nuclear transplant embryos to recipient mouse were no significant difference in 2, 4 and 8 cell donor nuclei.

Key words : Mouse, nuclear transplantation, electrofusion, cryopreservation.

서 론

마우스의 핵이식은 1982년 Illmensee와 Hoppe¹에 의

해 내세포외의 핵을 탈핵된 집합체에 이식하여 배반포와 산자를 생산하는데 처음 성공하였다. McGrath와 S. olter²는 세포질막을 통과하지 않고 핵이 세포질막에 싸

• 본 논문은 1992년도 교육부 학술연구조성비(유전공학)에 의하여 연구되었음.

인 채 탈핵되는 새로운 방법과 세포질과 핵과의 융합매개체로 불활화한 Sendai virus(HVJ)를 이용해서 탈핵된 마우스 접합체에 전핵을 이식하여 체외에서 배반포까지 발육시킨 후 체내에 이식하여 산자를 생산하는 방법을 보고하였다. 이후 여러 연구자들에 의해 전핵치환에 의한 산자생산 기술에 현저한 진보를 보였다.³⁻⁶ Tsunoda 등⁷은 공핵란과 수핵란의 cell cycle 차이에 의한 핵이식 후 후기배로의 발육저해를 피하기 위해 4 및 8세포기의 핵을 탈핵된 2세포기 수정란에 이식하여 핵이식 수정란을 작성하고 이를 체외배양후 수란마우스에 이식하여 산자를 생산하였다.

핵이식에 응용되는 세포융합술은 초기에는 HVJ²와 polyethylene glycol(PEG)^{8,9}이 세포융합 매개체로 이용되었다. 그러나 HVJ나 PEG를 세포융합 매개체로 이용할 경우 융합매개체에 장시간 노출되고, 외부조건이 세포융합성적에 영향을 줄 수 있으며, 실험과정이 복잡하다는 단점이 있다. 또한 HVJ를 이용시에는 핵이식 수정란을 다시 핵이식에 이용하는 일련의 복제과정을 수행할 수 없다는 단점을 지니고 있다.²⁰ 이에 이런 단점을 보완할 수 있는 방법으로서 전기적 세포융합술이 응용되어졌다. 전기적 세포융합술은 융합하려는 세포에 미치는 영향이 극소화하고, 간편하며 반복 재현성이 있으며, 물리적 수치를 정확하게 제어하여 완벽하게 재현할 수 있고, 세포가 융합매개체에 노출되는 시간이 매우 짧다는 장점이 있다.

한편 수정란의 장기적 보존방안이 요구되어 수정란의 동결보존이 연구되어 왔다. 마우스 수정란의 동결에 관한 연구로 Whittingham 등¹⁰은 dimethyl sulphoxide(DMSO)를 동결보호제로 사용하여 최초로 성공하였다. 대부분의 수정란 동결에 관한 연구가 후기배에서 이루어진데 비해 Shaw 등¹¹은 2세포기 수정란의 동결보존시 1.5 및 3.0M의 DMSO를 이용하였을 때보다 고농도인 4.5M의 DMSO를 사용했을 때에 체외 및 체내 생존성이 증가했고, 염색체 이상도 적게 발생했다고 보고하였다. 최근들어 단일정자수정, 수정란단계의 할구생김에 의한 유전전 질병진단 및 핵이식 등 임상 및 실험적 연구를 위해 수정란의 투명대 절개가 요구되는 미세조작과정이 수행되는데 보다 개선된 동결기술이 적용된다면 이들 분야의 연구에 있어 응용범위가 더욱 넓어질 것이다. 미세조작한 수정란의 동결보존은 이분한 수정란¹²⁻¹⁸, 유전자주입 수정란^{19,20}, 할구의 일부를 제거한 수정란²¹⁻²³ 그리고 접합배^{24,25} 등에서 연구된 바 있다. 이상에서와 같이 미세조작한 마우스 수정란의 동결에 관한 많은 연구가 진행되어 왔으나 핵이식 수정란의 동결보존후의 생존성 및 이와 관련된 연구는 접할 수 없

었다.

본 연구는 투명대 절개후 실시하는 미세조작법에 의해 작성된 핵이식 수정란을 전기적 세포융합 후 직렬한 동결방법을 제시하여 보다 간편하고 재현성 있는 수정란의 복제방법을 확립하고 산업동물에 응용할 수 있는 기초자료를 도출하며, 핵이식 수정란 분야의 응용범위를 확대코저 수행하였다.

재료 및 방법

실험동물 : ICR, CBA계의 미성숙(4~6 주령) 암컷 마우스와 ICR계의 성숙(8 주령이상) 수컷마우스를 실험동물로 사용하였다.

실험동물 사육실은 오전 7시부터 오후 9시까지 점등하고 오후 9시부터 오전 7시까지 소등하였으며, 실내온도를 20℃ 내외로 유지시켰다. 실험동물용 펠릿사료(삼양사) 및 수도물을 자유급식시켰다.

수정란의준비 : 과배란 유기는 47시간 간격으로 pregnant mare's serum gonadotrophin(Folligon[®], Intervet Lab., Holland, 이하 PMSG로 약함) 및 human chorionic gonadotrophin(Chorulon[®], Intervet Lab., Holland, 이하 hCG로 약함) 7.5 IU를 주사하였고, hCG 투여 후 수컷 마우스와 하룻밤을 동거시키고 질전의 형성유무를 관찰하여 교배여부를 판정하여 실험에 이용하였다.

수정란은 0.5%의 bovine serum albumin(Sigma, USA, 이하 BSA로 약함)이 첨가된 Brinster's mouse ovum culture medium-3(이하 BMOC-3로 약함)²⁶를 사용하여 회수하였다. 실험에 사용된 2세포기 수정란은 hCG 투여후 42±2시간에 회수하였으며, 4 및 8세포기 수정란은 각각 2세포기 수정란을 체외배양 후 사용하였다.

체외배양은 BMOC-3액으로 미소적으로 만들고 light white oil(Mineral oil[®], Sigma, USA)을 도포하여 준비하였다. 체외배양은 37℃, 5% CO₂, 95% 공기 및 습도가 포화상태인 CO₂ 배양기(Napco, USA, 이하 CO₂ 배양기로 약함)내에서 실시하였다.

핵이식 수정란 및 동결용해한 핵이식 수정란은 96시간동안 체외배양하면서 발육단계를 관찰하였다.

미세 Pipette의 제작 : 고정용 pipette(holding pipette)은 외경이 1mm의 미세유리관을 외경이 80~100μm되게 하여 사용하였고, 투명대 절개용 pipette은 끝을 날카롭게 하였으며 탈핵 및 주입용 pipette은 외경이 15~20μm되게 세공하여 사용하였다.

핵이식 수정란의 작성 : 수핵란의 준비, 공핵란의 준비 및 핵이식은 Tsunoda 등²⁷의 방법에 준해 실시하였다.

수정란은 투명대 절개 후 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 cytochalasin B (Sigma, USA)와 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 colcemide (Demecolcine[®], Sigma, USA)가 첨가된 BMOC-3액에 수정란을 옮겨 20분간 전배양 후 탈핵을 실시하였다. 미세조작은 differential interference contrast (DIC) 장치를 갖추고 있는 도립현미경 (Leitz, Germany), 250배의 배율하에서 실시하였다.

전기적 세포융합장치 (Eyela, Japan)의 두 전극 (+, -)은 할구분할방향과 전류의 방향을 수직으로 되게 장착하였다.²⁸ 전기적 세포융합은 각각 DC 1.0, 1.5 및 2.0 kV/cm에서 100 및 150 μsec 의 조건에서 실시하였으며, 1회 통전하여 세포융합을 유도하였다. 통전 1시간 후에 현미경하에서 검사하여 세포융합여부를 판정하였다.

핵이식한 수정란의 동결: 급속동결은 Shaw 등¹¹의 방법에 준해 0.25M sucrose, 8 mg/ml BSA와 각각 1.5, 3.0 및 4.5M의 DMSO를 M2배지²⁹에 첨가하여 사용하였다. 정액보존용 0.25ml straw (IMV, France)에 30~40 μl 의 동결보호제를 흡입하고 미세 pipette을 이용하여 10~15개의 2세포기로 배양된 핵이식 수정란을 straw내 동결보호제에 위치시켰다. 핵이식 수정란이 들어 있는 straw는 끝부분에 열을 가해 봉한 후 수평으로 정지시켜 2분간 평형을 실시하고 신속하게 액체질소에 넣어 24시간 이상 보존하였다.

융해는 액체질소에서 꺼내어 즉시 37°C 온수에 30초간 침지하여 급속융해를 실시하였다. 융해한 수정란은 10분간 0.25M의 sucrose가 들어 있는 2ml의 M2배지에 넣어 DMSO를 제거하고, 2ml의 M2배지에서 다시 10분간 정지시켜 sucrose를 제거하였다. 동결보호제가 제거된 수정란은 BMOC-3액으로 수회 세정하여 배양용 BMOC-3액 미소적에 넣은 후 CO₂ 배양기내에서 배양하였다.

완만동결은 Shaw 등¹¹의 방법에 준하여 실시하였다. 핵이식 후 2세포기로 발육된 수정란은 실온에서 단계적으로 0.5, 1.0 그리고 1.5M DMSO가 들어 있는 M2배지 (BSA 4 mg/ml 포함)에서 각각 5분간 처리하여 탈수과정을 거쳤으며, 최종 동결농도인 1.5M에서 정액보존용 0.25ml straw에 넣어 programable computerized freezer (Biocool[®], FST system INC, USA)를 사용, 실온에서 -7°C까지는 2°C/min으로 냉각시키고 -7°C에서 10분간 식빙시킨 후 -30°C까지 0.3°C/min으로 냉각하고 그후 액체질소에 침적하여 보존하였다. 완만동결을 실시한 수정란은 24시간 이상 보존한 후 액체질소에서 꺼내어 즉시 37°C 온수에 30초간 침지하는 방법으로 급속융해를 실시하였다. 융해후 정상형태를 지닌 수정란

을 선별하여 체외배양에 이용하였다.

동결융해한 핵이식 수정란의 이식: 동결보존한 핵이식 수정란은 융해후 상실배 및 배반포까지 체외배양하여 3일전에 hCG를 처치하여 위임신된 수란마우스에 Rafferty³⁰의 방법에 준해 자궁각당 3~10개의 수정란을 이식하였다.

통계학적 분석: 실험결과와 통계학적 유의성검정은 χ^2 -test를 이용하여 실시하였다.

결 과

핵이식 수정란의 세포융합률 및 배반포로의 발육률:

1) **핵이식 수정란의 세포융합률:** 탈핵된 2세포기 수정란을 수핵란으로 사용하여 2, 4 및 8세포기 수정란의 핵을 이식후 100 및 150 μsec 동안 DC 1.0, 1.5 및 2.0 kV/cm를 통전하였을 때의 세포융합률은 Table 1과 같다.

공핵란의 발육단계가 2세포기인 군에서 세포융합률은 100 및 150 μsec 동안 DC 1.5 kV/cm 처리군(93.9 및 95.2%) 과 100 및 150 μsec 동안 DC 2.0 kV/cm 처리군(95.7 및 95.3%)에서 100 및 150 μsec 동안 DC 1.0 kV/cm 통전군(83.0 및 85.0%)보다 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.01$).

공핵란의 발육단계가 4세포기인 군에서 세포융합률은 100 및 150 μsec 동안 DC 2.0 kV/cm 처리군에서 모두 99.1%를 보여 100 및 150 μsec 동안 DC 1.0 kV/cm 통전시(86.2 및 87.9%)보다 유의적으로 높았다($p < 0.01$). 동일한 전기적 세포융합 조건에서 공핵란의 발육단계에 따른 세포융합률은 100 μsec 동안 DC 1.0 kV/cm 통전시에 공핵란의 발육단계가 8세포기인 경우에는 99.0%를 나타내어 2 및 4세포기(83.0 및 86.2%)보다 유의적으로 높았다($p < 0.01$).

2) **핵이식 수정란의 배반포기로의 발육률:** 핵이식 수정란의 세포융합시 통전시간, 직류전압 및 공핵수정란의 발육단계에 따른 배반포로의 발육률은 Table 2와 같다.

공핵란의 발육단계가 2세포기일 때 배반포기로의 발육률은 100 및 150 μsec 동안 DC 1.0 및 1.5 kV/cm 통전군과 100 μsec 동안 DC 2.0 kV/cm 통전군은 47.6~62.7%로 150 μsec 동안 DC 2.0 kV/cm 통전군의 32.2%보다 유의적으로 높았다($p < 0.01$).

공핵란의 발육단계가 4세포기인 경우에 통전시간 및 통전량에 따른 배반포기로의 발육률의 차이는 공핵란의 발육단계가 2세포기인 경우의 성적과 유사한 경향을 나타내었다.

공핵란의 발육단계가 8세포기일 때 배반포기로의 발

Table 1. The fusion rate of nuclear transplanted mouse embryos received 2-cell to 8-cell stage nuclei with various DC voltage and duration of pulse

Duration of Dc pulse(μ sec)	DC voltage (kV/cm)	No. of embryos fused/No. of embryos injected(%)		
		Stage of donor nuclei		
		2-cell	4-cell	8-cell
100	1.0	83/100(83.0) ^{aA}	81/94 (86.2) ^{aA}	104/105(99.0) ^B
	1.5	124/132((93.9) ^b	109/116(94.0)	106/107(99.1)
	2.0	110/115(95.7) ^b	114/115(99.1) ^b	119/120(99.2)
150	1.0	102/120(85.0) ^a	94/107(87.9) ^a	97/103(94.2)
	1.5	140/147(95.2) ^b	114/121(94.2)	98/101(97.0)
	2.0	121/127(95.3) ^b	109/110(99.1) ^b	135/136(99.3)

a, b : Different superscripts denote significant difference within column($p < 0.01$).

A, B : Different superscripts denote significant difference between rows($p < 0.01$).

Table 2. *In vitro* development of fused embryos after stimuli of various DC voltage and duration with different stage of donor nuclei

Duration of Dc pulse(μ sec)	DC voltage (kV/cm)	No. of embryos developed to blastocyst/No. of fused embryos(%)		
		Stage of donor nuclei		
		2-cell	4-cell	8-cell
100	1.0	41/ 83(49.4) ^{aA}	31/ 81(38.3)	27/104(26.0) ^{aB}
	1.5	59/124(47.6) ^b	52/109(47.7) ^{aA}	33/106(31.1) ^{abcB}
	2.0	69/110(62.7) ^b	60/114(52.6) ^a	49/119(41.2) ^{bcB}
150	1.0	56/102(54.9) ^{aA}	37/94(39.4)	28/ 97(28.9) ^B
	1.5	69/140(49.3) ^a	50/114(43.9) ^a	39/ 98(39.8) ^{ac}
	2.0	39/121(32.2) ^b	30/109(27.5) ^b	29/135(21.5) ^{cd}

a, b, c, d : Different superscripts denote significant difference within column($p < 0.01$).

A, B : Different superscripts denote significant difference between rows($p < 0.01$).

Table 3. Effect of freezing method and DMSO concentration in freezing medium on the development of frozen-thawed nuclear transplanted mouse 2-cell embryos

Freezing method and DMSO concentration (M)	No. of blastocysts/ No. of cultured embryos(%)		
	Stage of donor nuclei		
	2-cell	4-cell	8-cell
Rapid freezing			
1.5	27/69(39.1)	18/57(31.6)	11/64(17.2)
3.0	26/61(42.6)	23/60(38.3)	14/65(21.5)
4.5	31/60(51.7)	27/65(41.5)	17/66(25.8)
Freezing by slow cooling			
1.5	31/80(38.8)	27/85(32.8)	17/90(18.9)

There are no significant differences between the treated groups($p > 0.05$)

Table 4. Production of offsprings after transfer of frozen-thawed nuclear transplanted embryos in mouse

Recipient cytoplasm	Donor nuclei	No. of pregnant/ No. of recipients (%)	No. of offsprings/ No. of transferred blastocysts(%)
2-cell	2-cell	5/12(41.7)	12/46(26.1)
	4-cell	3/9(33.3)	7/34(20.6)
	8-cell	1/4(25.0)	2/19(10.5)

There are no significant differences between the nuclear stages($p > 0.05$).

육률은 150 μ sec 동안 DC 2.0 kV/cm 통전군은 21.5%를 나타내어 150 μ sec 동안 DC 1.5 kV/cm 및 100 μ sec 동안 DC 2.0 kV/cm 통전군의 39.8 및 41.2%보다 유의적으로 낮게 나타났다($p < 0.01$).

동일한 전기적 세포융합조건에서 공핵란의 발육단계에 따른 세포융합후 배반포기로의 발육률은 100 및 150 μ sec 동안 DC 1.0 kV/cm 통전시킨 군에서 8세포기의 핵을 이식한 군(26.0~37.9%)보다 2세포기의 핵을 이식한 군(49.4~56.7%)에서 유의적으로 높게 나타났으며($p < 0.01$), 100 μ sec 동안 2.0 kV/cm 통전군에서 8세포기의 핵을 이식한 경우(41.2%)보다 2세포기의 핵을 이식했을 경우(62.7%)에서 유의적으로 높았다($p < 0.01$). 전기적 세포융합 조건이 100 μ sec, DC 1.5 kV/cm 인 경우에 배반포기로의 발육률은 2 및 4세포기의 핵을 이식시에 47.6 및 47.7%로 나타나 8세포기의 핵을 이식시에 31.1%보다 유의적으로 높았다($p < 0.01$).

핵이식 수정란의 동결융해후 체외발육률 : 핵이식 수정란은 2세포기까지 체외배양후 급속동결 및 완만동결을 실시하였다. 액체질소에 24시간이상 동결보존된 수정란을 융해하여 얻은 성적은 다음과 같다(Table 3). 핵이식 수정란은 급속동결 및 융해후 체외배양시 배반포기까지의 발육률은 2세포기 유래의 핵이식 수정란의 경우 DMSO 농도가 1.5, 3.0 및 4.5M에서 각각 38.9, 43.9 및 51.7%의 발육률을 보였다. 마우스 4세포기 유래의 핵이식 수정란의 경우 DMSO 농도가 1.5, 3.0 그리고 4.5M일 때 각각 31.9, 38.0 및 42.0%의 배반포기로의 발육률을 보였으며, 8세포기 유래의 핵이식 수정란은 각각 17.8, 20.4 및 25.8%의 배반포기로의 발육률을 나타내었다. 완만동결시 공핵란의 발육단계가 2, 4 및 8세포기일 때 융해후 배반포기로의 발육률은 각각 39.2, 33.3 및 19.5%를 나타내었다. 동결융해후 배반포기로의 발육률은 각 동결보호제의 농도 및 동결방법간의 통계학적 유의차는 인정되지 않았다.

동결융해한 핵이식 수정란의 이식에 의한 산자생산 : 동결융해한 핵이식 수정란을 위임시킨 수란마우스에 이식하여 얻은 결과는 다음과 같다(Table 4). 마우스 2세포기 수정란 유래의 핵을 이식한 수정란을 동결융해후 수란마우스에 이식하였을 때 수란마우스중 41.7%가 수태되었고, 이식된 수정란의 26.1%가 산자로 태어났다. 공핵란의 발육단계가 4세포기인 동결융해한 핵이식 수정란의 이식시 33.3%의 수란마우스가 수태하였고, 산자생산율은 20.6%였다. 마우스 8세포기 유래의 동결융해한 핵이식 수정란을 이식하여 4마리중 1마리의 수란마우스가 수태되었으며, 이식된 수정란중 10.5%가 산자로 태어났다.

포유동물의 핵이식에 관한 연구는 마우스^{1,2}, 토끼³¹⁻³³, 면양^{34,35}, 소³⁶ 그리고 돼지³⁷ 등이 보고되었다.

그러나 핵이식시 그 효율이 매우 낮아서 소의 경우 탈핵, 세포융합, 핵이식 수정란의 활성화, 후기배로의 발육 및 산자생산에 이르기까지 전과정에 걸친 효율은 1~6%이다.³⁸ 산업동물에서 이러한 요인들을 극복할 수 있는 재현성 있는 기술의 개발을 위해서는 필수적으로 다수의 수정란을 지속적으로 공급하여 반복적 실험이 요구되나 현재의 산업동물에서 체외수정유래 수정란의 이용률은 이를 충족시키기에는 만족스럽지 못한 실정이다. 그러나 마우스 수정란을 이용하여 핵이식 전과정의 단계별 최적조건을 구하여 이를 활용한다면 다른 동물에서의 핵이식효율도 개선될 것이다.

본 실험에서는 전기적 세포융합장치를 이용하여 핵이식후 83.0~99.3%의 높은 세포융합률을 얻었다. 이는 HVJ를 이용하여 얻은 마우스 핵이식후 세포융합률인 McGrath와 Solter²의 99%, Tsunoda 등³의 84~97%, Kono 등³⁹의 91~93% 그리고 Park 등⁴⁰의 84.7~88.6%와 유사한 결과로 마우스 핵이식시에 전기적 세포융합술의 유용성이 입증되었다고 하겠다.

공핵란의 발육단계가 2 및 4세포기 수정란의 경우에 100 및 150 μ sec 동안 통전시 DC 1.0 kV/cm 보다 2.0 kV/cm의 군에서 유의적으로 높은 세포융합률을 나타내어 직류전압의 강도가 증가할수록 세포융합률이 증가하는 경향을 보였고, 8세포기 수정란을 공핵으로 사용한 군이 2세포기란의 핵을 공핵으로 사용한 군보다 높은 세포융합률을 나타내었다. 이는 핵이식시에 2세포기 공핵란 유래의 karyoplast보다 8세포기 공핵란 유래의 할구가 더 크기때문에 전기자극시 핵과 세포질의 접촉면적이 넓어 세포융합이 용이하게 이루어진 것으로 사료된다.

다양한 조건의 전기적 자극에 의한 세포융합후 핵이식 수정란의 배반포로의 발육률을 보면 각각의 전기자극조건에 따라 직접적으로 후기배로의 발육률에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 150 μ sec 처리군에서는 DC 1.0 및 1.5 kV/cm보다 2.0 kV/cm 군에서 유의적으로 낮은 배반포기로의 발육률을 보여 전압의 증가가 발육률에 직접적인 영향을 미치는 것으로 나타났는데 이는 필요이상의 높은 전압이 가해지면 비가역적인 세포질 변화가 일어남을 의미하는 것으로 강한 전기자극에 의해 세포융합시 형성된 세포가 수복되지 않아 세포가 사멸한다는 보고⁴¹와 일치하는 결과였다. 이에 비해 100 μ sec 처리군에서는 오히려 DC 1.0 및 1.5 kV/cm보다 2.0

kV/cm의 군에서 높은 배반포기로의 발육률을 보여 100 μ sec 처리시 1.0 및 1.5 kV/cm의 군에서 불충분한 세포융합이 이루어진 것으로 판명된다. 이상의 결과로 볼 때 전압이 증가하면 세포융합률은 높아졌으나 150 μ sec 처리시에는 전압이 증가함에 따라 DC 1.0 및 1.5 kV/cm 보다는 2.0 kV/cm에서 배반포기로의 발육률이 현저히 감소하였으며, 공핵란의 발육단계가 2 및 4세포기인 경우에는 100 μ sec에서 2.0 kV/cm 처리시 가장 높은 배반포기로의 발육률을 나타내었고, 8세포기인 경우에는 100 μ sec동안 2.0 kV/cm 그리고 150 μ sec동안 1.5 kV/cm인 처리군에서 배반포기로의 높은 발육률을 보여 이들 조건이 핵이식시 적당한 전기자극 조건인 것으로 나타났다. 이상의 결과로 보아 이식시 공핵란과 수핵란이 발육단계의 차이가 클 경우 핵이식후 후기배로의 발육률이 저하되었는데 그 이유는 이식된 핵의 발육단계가 진행될수록 수핵란의 세포질과 일치된 발육양상을 완벽하게 나타내지 못하기 때문인 것으로 사료된다.

동결융해후 형태학적으로 정상인 것을 생존한 핵이식 수정란으로 판명시 공핵란의 발육단계가 2 및 4세포기일 때 생존율은 완만동결보다 DMSO 4.5M인 군에서 유의적으로 높았으며, 8세포기인 경우에는 완만동결시보다 DMSO 3.0 및 4.5 M에서 높았다. 본 실험의 결과는 핵이식 수정란의 동결에 관한 보문을 접할 수 없어 직접 비교할 수 없었으나 마우스 2세포기 수정란의 동결에 관한 연구로 백 등⁴²은 DMSO를 이용하여 완만동결시에 71%의 배반포기로의 발육률을 얻었고, Trounson 등⁴³은 형태학적으로 정상인 수정란의 회수율과 배반포기로의 발육률이 동결보호제(DMSO) 농도를 4.0 M로 실시한 급속동결이 완만동결에서보다 높았다는 보고와 유사한 추이를 나타내었다. 마우스 수정란의 동결 보존시 Shaw 등¹¹은 DMSO 최종농도를 1.5M로 하여 완만동결시 71%의 발육률을 보여 DMSO 4.5M인 군이 완만동결 및 DMSO 1.5, 3.0 M의 급속동결시보다 높은 배반포기로의 발육률을 보였다고 보고하였다. 이외에도 동결에 관한 보고는 동결 보호제 및 동결방법에 다소의 차이는 있으나 마우스 2세포기 수정란을 급속동결 및 융해시 Friedler 등⁴⁴은 87%, Critser 등⁴⁵은 90.5%, Ng 등⁴⁶은 70.9% 그리고 Boone 등⁴⁷은 52%의 다양한 배반포기로의 발육률을 보고하였고, Wilton 등²²은 동결융해후 50%가 생존하였고, 이중 94.9%가 후기배로 발육하였다고 하였다. 본 실험에서 핵이식 수정란의 동결융해후 체외발육능은 현저히 감소되었는데 이는 핵이식 수정란이 후기배로의 발육이 저하되는 원인에 의한 것으로 판단되며, 적절한 동결방법을 선택한다면 동결

융해로 인한 발육능의 저하를 줄일 수 있을 것으로 생각된다.

동결융해한 핵이식 수정란을 상실배 및 배반포기로 발육시킨 후 위임시킨 수란마우스에 이식하였을 때 수태율은 공핵란의 발육단계가 2, 4 및 8세포기에서는 각각 41.7, 33.3 및 25.0%의 수태율을 보였으며 또한 산자생산율은 이들에서 26.1, 20.6 및 10.5%로 공핵란의 발육단계에 따른 유의적 차이는 인정되지 않았으나 이에 대한 반복적인 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

핵이식 수정란의 세포질과 핵의 적당한 융합 조건, 핵이식 수정란을 체외배양시에 발육률을 증진시킬 수 있는 조건을 조사하고 2세포기로 체외발육한 핵이식 수정란을 동결융해하여 얻은 결과는 다음과 같다.

1. 핵이식 수정란의 전기적 세포융합시 세포융합률은 공핵란의 발육단계가 2세포기인 경우에는 100 μ sec 동안 DC 1.5 및 2.0 kV/cm 통전군과 150 μ sec 동안 DC 1.0, 1.5 및 2.0 kV/cm 통전군에서 100 및 150 μ sec 동안 1.0 kV/cm 통전군보다 유의적으로 높았으며($p < 0.01$), 4세포기인 경우에는 100 및 150 μ sec 동안 DC 2.0 kV/cm 처리군에서 100 및 150 μ sec 동안 DC 1.0 kV/cm 통전군보다 유의적으로 높았다($p < 0.01$). 공핵란의 발육 단계가 8세포기인 경우에는 94.2~99.3%의 세포융합률을 보였다.
2. 핵이식 수정란의 배반포기로의 발육률은 공핵란의 발육단계가 2 및 4세포기인 경우에는 100 및 150 μ sec 동안 DC 1.0 및 1.5 kV/cm 통전군과 100 μ sec DC 2.0kV/cm 통전군에서 150 μ sec 동안 DC 2.0 kV/cm 통전군 보다 유의적으로 높았으며($p < 0.01$), 8세포기인 경우에는 100 μ sec 동안 DC 2.0 kV/cm 통전군이 DC 1.0 kV/cm, 100 μ sec 통전군과 150 및 200 μ sec 동안 DC 2.0 kV/cm 통전군보다 유의적으로 높았다($p < 0.01$).
3. 핵이식후 배반포기로의 발육률은 공핵란의 발육 단계가 8세포기보다는 2세포기일 때 높았다($p < 0.01$).
4. 정상형태로 회수된 핵이식 수정란의 체외배양시 배반포기로의 발육률은 동결방법 및 동결보호제 농도에 따른 유의적 차이를 보이지 않았다.
5. 핵이식 수정란을 이식시 산자생산율은 공핵란의 발육단계에 따른 유의차를 나타내지는 않았다.

참 고 문 헌

1. Illmensee K, Hoppe PC. Nuclear transplantation in *Mus musculus* : Developmental potential of nuclei

- from preimplantation embryos. *Cell* 1981 ; 23 : 9~18.
2. McGrath J, Solter D. Nuclear transplantation in mouse embryos. *J Exp Zool* 1983 ; 228 : 355~362.
 3. Tsunoda Y, Kato Y, Shioda Y. Electrofusion for the pronuclear transplantation of mouse eggs. *Gamele Res* 1987 ; 17 : 15~20.
 4. Surani MAH, Barton SC, Norris ML. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 1984 ; 308 : 548~550.
 5. Mann JR, Lovell-Badge RH. The development of XO gynogenetic mouse embryos. *Development* 1987 ; 99 : 411~416.
 6. Kono T, Shioda Y, Tsunoda Y. Nuclear transplantation of rat embryos. *J Exp Zool* 1988 ; 248 : 303~305.
 7. Tsunoda Y, Yasui T, Shioda Y, et al. Full-term development of mouse blastomere nuclei transplanted into enucleated two-cell embryos. *J Exp Zool* 1987 ; 242 : 147~151.
 8. Eglitis MA. Formation of tetraploid mouse blastocysts following blastomere fusion with polyethylene glycol. *J Exp Zool* 1980 ; 213 : 309~313.
 9. Spindle A. Polyethylene glycol-induced fusion of two-cell mouse embryo blastomeres. *Exp Cell Res* 1981 ; 131 : 465~470.
 10. Whittingham DG. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature* 1971 ; 233 : 125~126.
 11. Shaw JM, Kola I, MacFarlane DR, et al. An association between chromosomal abnormalities in rapidly frozen 2-cell mouse embryos and the ice-forming properties of the cryoprotective solution. *J Reprod Fert* 1991 ; 91 : 9~18.
 12. Lehn-Jensen H, Willadsen SM. Deep-freezing of cow 'half' and 'quarter' embryos. *Theriogenology* 1983 ; 19 : 49~54.
 13. Picard L, King WA, Betteridge KJ. Production of sexed calves from frozen-thawed embryos. *Vet Record* 1985 ; 117 : 603~608.
 14. Tsunoda Y, Tokunaga T, Ojubo Y, et al. Beneficial effect of agar for frozen storage of bisected embryos. *Theriogenology* 1987 ; 28 : 317~322.
 15. Kobayashi K, Nagashima H, Yamakawa, H, et al. The survival of whole and bisected rabbit morulae after cryopreservation by the vitrification method. *Theriogenology* 1990 ; 33 : 777~788.
 16. Seike N, Sakai M, Kanagawa H. Development of frozen-thawed demi-embryos and production of identical twin calves of different ages. *J Vet Med Sci* 1991 ; 53 : 37~42.
 17. 황우석. 절단마우스 이분배의 동결보존실험 1. 마우스 절단이분배의 체외발육능에 대하여. 한국임상수의학회지 1985 ; 2 : 43~53.
 18. 황우석. 절단마우스 이분배의 동결보존실험 2. 동결보존후의 체외발육능 및 수태능에 관하여. 서울대학교 수의대논문집 1986 ; 11 : 179~185.
 19. Petters RM, Johnson BH, Mercer WE. Production of transgenic mice following deoxyribonucleic acid microinjection and embryo freezing. *Theriogenology* 1987 ; 27 : 507~515.
 20. Pomeroy KO. Cryopreservation of transgenic mice. *GATA* 1991 ; 8 : 95~101.
 21. Wilton LJ, Trounson AO. Biopsy of preimplantation mouse embryos development of micromanipulated embryos and proliferation of single blastomeres *in vitro*. *Biol Reprod* 1989 ; 40 : 145~152.
 22. Wilton LJ, Shaw JM, Trounson AO. Successful single-cell biopsy and cryopreservation of preimplantation mouse embryos. *Fertil Steril* 1989 ; 51 : 513~517.
 23. 강만종, 이철상, 한용만 등. 할구 한 개가 제거된 생쥐 4세포기 수정란의 초급속 동결. 한국수정란이식연구회지 1992 ; 7 : 81~88.
 24. Tekeli T, Kweon OK, Kanagawa H. The viability of deep-frozen aggregated mouse embryos. *Jpn J Vet Res* 1987 ; 35 : 283~286.
 25. 신상태, 조충호, 동결보존한 마우스 접합배의 생존성과 Chimera의 생산에 관한 연구. 대한수의학회지 1990 ; 30 : 231~242.
 26. Brinster RL. Measuring embryonic enzyme activity. In : Daniel, J.C.Jr. *Methods in mammalian embryology*. W.H. Freeman and Company, San Francisco, USA, 1971 ; 215~227.
 27. Tsunoda Y, Yasui T, Nakamura K, et al. Effect of cutting the zona pellucida on the pronuclear transplantation in the mouse. *J Exp Zool* 1986 ; 240 : 119~125.
 28. Kubiak JZ, Tarkowski AK. Electrofusion of mouse blastomeres. *Exp Cell Res* 1985 ; 157 : 561~566.
 29. Quinn P, Barros C, Whittingham DG. Preservation

- of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J Reprod Fert* 1982 ; 66 : 161 ~168.
30. Rafferty KA Jr. Method in experimental embryology of the mouse. The Johns Hopkins Press. Baltimore and Londo. 1970 ; 42 : 50.
 31. Stice SL, Robl JM. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod* 1988 ; 39 : 657~664.
 32. Collas P, Robl JM. Development of rabbit nuclear transplant embryos from morula and blastocyst stage donor nuclei. *Theriogenology* 1991 ; 35 : 190(Abst).
 33. Collas P, Robl JM. Relationship between nuclear remodeling and development in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod* 1991 ; 45 : 455~465.
 34. Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 1986 ; 320 : 63~65.
 35. Smith LC, Wilnut I. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development *in vivo* of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol Reprod* 1989 ; 40 : 1027~1035.
 36. Prather RS, Barnes FL, Sims M, et al. Nuclear transplantation in the bovine embryo : Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol Reprod* 1987 ; 37 : 859~866.
 37. Prather RS, Sims M, First NL. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol Reprod* 1989 ; 41 : 414~418.
 38. Yang X, Anderson GB. Micromanipulation of mammalian embryos : Principles, progress and future possibilities. *Theriogenology* 1992 ; 38 : 315~335.
 39. Kono T, Kwon OY, Nakahara T. Development of enucleated mouse oocytes reconstitute with embryonic nuclei. *J Reprod Fert* 1991 ; 93 : 165 ~ 172.
 40. Park CS, Choe SY, Lee HJ, et al. Studies on nuclear transplantation in mouse embryos. II. Developmental potential of nuclei from embryos of different developmental stages. *Proc Mol Biol & Genet* 1990 ; 5 : 325~330.
 41. Kato Y, Tsunoda Y. Blastomere fusion of mouse 2-cell embryos by electric stimulus. *Jpn J Anim Reprod* 1987 ; 33 : 19~26.
 42. 백청순, 서병희, 이재현 등. 생쥐 2세포기배의 동결보존. 대한불임학회잡지 1989 ; 16 : 9~14.
 43. Trounson A, Peura A, Kirby C. Ultrarapid freezing : a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation *Fertil Steril* 1987 ; 48 : 843~850.
 44. Friedler S, Shen E, Lamb EJ. Cryopreservation of mouse 2-cell embryos and ova by vitrification : methodologic studies. *Fertil Steril* 1987 ; 48 : 306 ~ 314.
 45. Critser JK, Ameson BW, Aaker DV, et al. Factors affecting the cryosurvival of mouse two-cell embryos. *J Reprod Fert* 1988 ; 82 : 27~33.
 46. Ng SC, Sathananthan H, Bongso A, et al. The use of amniotic fluid and serum with propanediol in freezing of muring 2-cell embryos. *Fertil Steril* 1988 ; 50 : 510~512.
 47. Boone W, Brown CA, Vasquez JM, et al. Freezing of mammalian embryos without the aid of a programmable freezer. *Fertil Steril* 1988 ; 50 : 348~354.