

마우스 핵이식란의 동결에 관한 연구

이병천·조충호·황우석
서울대학교 수의과대학
(1993년 2월 22일 접수)

Studies on cryopreservation of nuclear transplanted mouse embryos

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

College of Veterinary Medicine, Seoul National University

(Received Feb 22, 1993)

Abstract : The present study was carried out to investigate the developmental potency to blastocyst after freezing and thawing of nuclear transplanted 2-cell embryos.

The nuclei from 2-, 4- and 8-cell mouse embryos were transferred into enucleated 2-cell embryos, and the reconstituted embryos were submitted to direct current(DC) pulse at output voltage of 2.0 kV/cm for 100 μ sec to induce cell fusion. The recovery rate and developmental potency to blastocyst after freezing and thawing of nuclear transplanted 2-cell embryos was investigated.

1. The recovery rate of nuclear transplanted 2-cell embryos in normal morphology after freezing and thawing was significantly higher in rapid freezing(DMSO 4.5M) than in slow cooling($p < 0.01$).

2. 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.

In summary, these experiments have proved that rapid freezing method(DMSO 4.5M) is effective in nuclear transplanted 2-cell mouse embryos. If improved micromanipulation techniques and freezing are combined, nuclear transplantation technique will contribute to the improvement of productivity in livestock animals.

Key words : mouse, nuclear transplantation, cryopreservation.

서 론

포유동물 수정란의 클론은 실험을 위한 유전적으로 동일한 산자의 생산뿐만 아니라 우량 품종에서 동일한 유전자형을 지닌 개체를 단기간에 대량으로 육종, 증식 그리고 개량생산하는 측면에서 매우 유용한 분야이다.¹
~⁶ 포유동물 수정란의 클론을 위해서는 핵이식기법을 응용하는 것이 가장 효과적인 방법이며 이를 수행하려면 동일한 핵들을 공급할 수 있는 공핵란이 필요하고 이를 이식할 수핵란이 준비되어야 하며 세포융합 후 체외 배양 및 체내이식에 의한 산자생산기술이 필요하다.

핵이식에 대한 연구로는 1952년 Briggs와 King⁷이 개구리(*Rana pipiens*)의 배반포(blastula)와 낭배(gastrula)의 핵을 탈핵된 난에 이식하여 배반포까지 발육시켰으나 포유류에서 후기배유래 핵의 발육능은 양서류에 비해 더욱 제한적이다. 마우스 배반포 내세포의 핵을 탈핵된 접합체에 이식하여 Illmensee와 Hoppe⁸는 배반포와 산자를 생산했다고 보고하였으나 이후 다른 연구자들은 이를 재현하지 못하였다.⁹⁻¹²

기존의 미세수술적 방법에 의한 핵이식의 단점을 보완하여 McGrath와 Solter¹³는 세포질막을 통과하지 않고 핵이 세포질막에 싸인 채 탈핵되는 새로운 방법을 보

고하였으며, 세포질과 핵과의 융합개체로 불활화한 Sendai virus(HVJ)를 이용하여 마우스 전핵치환을 실시하였다. 이들은 탈핵된 마우스 집합체에 전핵을 이식하여 체외에서 배반포까지 발육시킨 후 체내에 이식하여 산자를 생산하였으며, 이후 여러 연구자들에 의해 이러한 기술이 발전되어 전핵치환에 의한 산자생산 기술에 현저한 진보를 보였다.^{11, 14~16} 전핵치환에 의한 산자생산 기술을 바탕으로 Kono et al¹²은 탈핵된 집합체에 2, 8세포기 및 내세포기의 핵을 이식한 후 불활화한 HVJ를 매개로 세포융합하여 배양했을 때 배반포기로의 발육률이 각각 23, 4 및 0%이었으며, 2세포기의 핵을 이식했을 때만 산자가 생산되었다고 하였다. 이와같이 탈핵된 집합체를 수핵란으로 사용시 공핵란의 발육단계가 2세포기 이상 진행되면 핵이식 후 후기배로의 발육이 저하되는데 이러한 요인을 극복하기 위해 Tsunoda et al¹⁷은 4 및 8세포기의 핵을 탈핵된 2세포기 수정란에 이식하여 핵이식수정란을 작성하고 이를 체외배양 후 수란마우스에 이식하여 산자를 얻었다고 보고하였다.

한편 수정란의 동결보존은 동물의 번식, 체외수정 그리고 핵이식과정에서 잉여의 수정란을 필요시까지 보존할 수 있다는 이점이 있다. 이상적인 수정란의 동결보존 방법은 생존성에 영향을 주지 않아야 하며, 유전적 변이를 일으키지 말아야 하고 태아기형이나 임신유지에 영향이 없어야 한다.¹⁸ 동결보호제로 dimethyl sulphoxide(DMSO)를 사용하여 Whittingham et al¹⁹이 최초로 마우스 수정란의 동결에 성공한 이후 수정란의 동결은 여러동물종에서 성공적으로 수행되었다. 또한 Shaw et al¹⁸은 2세포기 수정란의 동결보존시 1.5 및 3.0M의 DMSO를 이용하였을 때보다 4.5M의 DMSO를 사용했을 때에 체외 및 체내 생존성이 증가했고, 염색체 이상도 적게 발생했다고 보고하였다. 최근들어 단일정자수정, 수정란단계의 할구생검에 의한 유전적 질병진단 및 핵이식 등 임상 및 실험적 연구를 위해 수정란의 투명대 절개가 요구되는 미세조작과정이 수행되는데 미세조작 기술과 동결보존기술을 연계시킬 수 있다면 응용 범위는 더욱 확대될 것이다. 미세조작한 수정란의 동결보존은 이분한 수정란^{20~26}, 유전자주입 수정란^{27, 28}, 할구의 일부를 제거한 수정란^{29~31} 그리고 집합배^{32, 33} 등에서 실시되었다. 또한 투명대가 없는 마우스 수정란은 동결보존 후 배반포로의 발육이 유의적으로 감소한다고 하였으나³⁴, Garrisi et al³⁵은 산성 Tyrode's액으로 투명대를 천공한 마우스 수정란의 동결융해 후 발육률은 정상 투명대를 지닌 수정란의 동결융해 후의 발육률과 유의차가 없었다고 하였다. 이상에서와 같이 마우스 수정란의 동결에 관한 많은 연구가 진행되어 왔으나 핵이식 수정

란의 동결보존 후의 생존성 및 이와 관련된 연구는 접할 수 없었다.

본 연구에서는 투명대 절개후 핵이식을 실시하는 미세조작법에 의해 작성된 핵이식 수정란을 전기적 세포융합술을 이용하여 세포질과 이식된 핵을 융합후 핵이식 수정란을 2세포기까지 체외배양하여, 동결을 실시함으로써 적절한 동결방법을 제시하여 핵이식수정란 분야의 응용범위를 확대코저 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 본 실험에서는 표현형이 다른 수정란을 얻고자 albino인 ICR계의 성숙(8주령이상) 수컷마우스와 미성숙(4~6주령)암컷마우스, 비albino인 CBA계의 미성숙(4~6주령) 암컷마우스를 실험동물로 사용하였다.

실험동물 사육실은 실내온도를 20°C 내외로 유지시켰으며 오전 7시부터 오후 9시까지 14시간동안 점등하고 오후 9시부터 오전 7시까지 10시간동안 소등하여 명암을 인위적으로 조절하였다. 사료 및 물은 실험동물용 펠렛사료(삼양사)와 깨끗한 수도물을 자유급식시켰다.

과배란 유기 : 과배란 유기를 위하여 pregnant mare's serum gonadotrophin(Folligon[®], Intervet Lab. Holland, 이하 PMSG로 약함) 7.5 IU를 복강내 주사하였으며 47시간 후에 human chorionic gonadotrophin(Chorulon[®], Intervet Lab. Holland, 이하 hCG로 약함) 7.5 IU를 복강내 주사하였다. 공란마우스에 hCG투여 후 ICR계 수컷마우스와 동수로 하룻밤을 동거시키고 다음날 아침 질전의 형성유무를 관찰하여 교배여부를 판정하였다.

수정란의 준비 : 수정란회수를 위하여 HEPES buffer와 0.5%의 bovine serum albumin(Sigma, USA, 이하 BSA로 약함)이 첨가된 Brinster's mouse ovum culture medium-3(Brinster, 1971; 이하 BMOC-3로 약함)을 사용하였다. 마우스는 경추탈구법으로 도살하고 난관채와 자궁난관접합부에 인접한 자궁선단부를 절단하여 난관을 분리하였다. 분리한 난관의 관류는 25배의 실체현미경(Wild, Germany)하에서 60mm petridish(Costar, USA)에 난관을 넣고 3ml 주사기와 30 gauge 주사침을 이용하여 난관채에 주사침을 삽입하는 하향식으로 실시하였다.

실험에 사용된 각 단계의 수정란은 hCG 투여 후 42±2시간에 난관을 관류하여 2세포기 수정란을 회수하였다. 회수된 수정란은 실험에 필요한 발육단계까지 체외배양하였다. 실험에 이용된 2세포기 수정란은 채란 후 즉시 사용하였으며 4세포기 수정란은 2세포기에 회수된 수정란을 체외배양하여 4세포기로 발육시킨 후 실험에 사용시까지 4°C에서 보존하였다. 8세포기의 수정

란을 얻기 위해서는 2세포기에 채란된 수정란을 제외배양하여 8세포기로 발육시킨 후 실험에 사용시까지 4°C에서 보존하였다.

마우스 수정란의 4°C 단기 보존은 Tsunoda et al²²과 권³⁶의 방법을 변형하여 실시하였다. 마우스 4 및 8세포기 수정란의 단기보존시 보존액으로 BMOC-3액을 사용하였으며, 수정란이 포함된 1~2ml의 보존액을 뚜껑이 달린 15ml 원심분리관(Costar, USA)에 넣어 물이 담긴 250ml의 비이커에 위치시켜 4°C로 유지되는 냉장고에 보존하였다.

체외배양 : 핵이식수정란 및 동결융해한 핵이식수정란은 다음과 같은 배양조건에서 체외배양을 실시하였다. 수정란의 체외배양을 위하여 100 μ M/ml의 EDTA(Sigma, USA)가 첨가³⁷된 BMOC-3액을 배양액으로 사용하였으며, 20 μ l의 배양액으로 35mm petridish(Costar, USA)에 미소적을 만들고 light white oil(Mineral oil, Sigma, USA)을 도포하여 준비하였다. 체외배양은 37°C, 5% CO₂, 95% 공기 및 습도가 포화상태인 CO₂ 배양기(Napco, USA, 이하 CO₂ 배양기로 약함)내에서 실시하였다. 동결융해한 핵이식 수정란을 체외배양하면서 발육단계 및 발육형태를 분류하였다.

미세 Pipette의 제작 : 고정용 pipette(holding pipette)은 외경이 1mm의 미세유리관(Leitz, Germany)을 pipette puller(Narishige, Japan)로 가늘게 뽑은 다음 외경이 80~100 μ m되는 부분에서 microforge(Narishige, Japan)를 이용하여 절단하고 절단한 부위를 매끄럽게 하기 위해 micro-grinder(Narishige, Japan)로 연마 후 이를 microforge에 장착하여 끝부분에 열을 가해 매끄럽게 안으로 말려들어가게 함으로써 수정란의 고정시 습도룩 하였다. 투명대 절개용 pipette은 puller로 날카롭게 뽑아 사용하였고, 탈핵 및 주입용 pipette은 puller로 가늘게 뽑은 후 외경이 15~20 μ m인 부위에서 절단하고, 잘린 끝에 열을 가해 일부를 녹여 매끄럽게 한 후 사용하였다.

제작에 앞서 외경 1mm의 미세유리관은 Sigmacote[®] (Sigma, USA)로 내경을 coating한 후 pipette을 제작하였다. 제작된 pipette은 증류수 및 황산으로 수회 세척한 후 NP-40(Tergitol[®], Sigma, USA)으로 다시 세척하고, 증류수로 수회 세척하여 실험에 이용하였다.

핵이식 수정란의 작성 : 수핵란의 준비, 공핵란의 준비 및 핵이식은 Tsunoda et al³⁸의 방법에 준해 실시하였다.

1) 수핵란의 준비 : 수핵란으로 2세포기 수정란을 이용하였으며, 수핵란은 60mm petridish에 BMOC-3액으로 미소적을 만들어 준비하였다. 탈핵을 용이하게 하기

위하여 수핵란은 미리 투명대를 절개하여 두었다. 투명대 절개를 위해 고정용 pipette으로 수정란을 할구의 방향과 수직으로 흡입 고정된 후 예리한 절개용 pipette을 세포질에 손상을 주지 않도록 주의하여 투명대와 할구 사이에 찢러넣는 방법으로 5~7개의 수정란을 동시에 절개용 pipette에 끼워 준비하였다. 수정란을 절개용 pipette에 끼운 채 고정용 pipette과 접촉시킨 후 문질러 두 pipette의 마찰에 의해 투명대가 절개되도록 하였다. 이러한 방법에 의해 투명대의 약 1/10을 절개할 수 있었다.

미세조작시 수정란의 손상을 최소화하기 위해 투명대 절개 후 5 μ g/ml의 cytochalasin B(Sigma, USA)와 0.1 μ g/ml의 colcemide(Demecolcine[®], Sigma, USA)가 첨가된 BMOC-3액에 수정란을 옮겨 20분간 전배양하였다. 전배양한 수정란은 60mm petridish에 cytochalasin B와 colcemide를 첨가한 BMOC-3액으로 만든 미소적내에 넣어 현미경에 장착하여 micromanipulator(Lietz, Germany)를 이용하여 미세조작을 실시하였다.

탈핵은 투명대절개 반대부위를 고정용 pipette으로 잡고 탈핵용 pipette을 투명대 절개부위로 조심스럽게 삽입하여, 세포질에 손상을 입히지 않도록 주의하면서 핵과 가까운 위치까지 pipette을 접근시켜 세포질을 포함한 핵을 흡인하였으며 이때 흡인되는 세포질양을 최소로 하였다. 미세조작은 differential interference contrast (DIC) 장치를 갖추고 있는 도립현미경(Leitz, Germany), $\times 250$ 의 배율하에서 실시하였다.

2) 공핵란의 준비 및 핵이식 : 공핵란은 2, 4 및 8세포기의 수정란을 사용하였으며 2, 4세포기 수정란에서의 핵채취는 수핵란의 탈핵시와 동일한 방법으로 실시하였고, 8세포기 수정란에서의 할구분리는 고정용 pipette으로 공핵란을 고정된 후 탈핵용 pipette으로 절개부위를 관통하여 할구를 분리하였다.

핵이식은 공핵란으로부터 핵을 채취하여 탈핵용 pipette내에 간직한 채 수핵란으로 이동시켜, 수핵란의 탈핵시 만들어 두었던 투명대의 절개부위를 통해 pipette을 삽입한 후 조심스럽게 투명대와 세포질사이에 핵을 위치시켰다. 이러한 과정을 반복하여 핵이 주입된 5~10개 수정란을 작성하였고, 즉시 전기적 세포융합장치를 이용하여 이식된 핵과 세포질의 융합을 유도하였다.

3) 전기적 세포융합 : 전기적 세포융합 장치(Eyela, Japan)를 이용하여 주입된 핵과 세포질을 융합을 유도하였다. 세포융합 배지로 5 μ g/ml의 cytochalasin B와 0.1 μ g/ml의 colcemide가 포함된 BMOC-3액을 사용하였으며, 세포융합은 실온에서 실시하였다. 세포융합배지로 petridish내에 미소적을 만들고 paraffin oil을 도포하여

도립현미경 하에 위치시켰다. 전기적 세포융합 장치의 두 전극(+, -)을 micromanipulator에 장착하여 핵이식 수정란의 양측에 전극을 위치시켰다. 수핵란의 할구분 할방향과 전류의 방향을 수직으로 되게 전극을 장착하였으며³⁹, 전극의 간격은 수정란의 크기와 동일하게 하였다. 전기적 세포융합은 각각 DC 2.0kV/cm에서 100 μ sec의 조건에서 실시하였으며, 1회 통전하여 세포융합을 유도하였다. 통전 1시간 후에 현미경하에서 검사하여 세포융합여부를 판정하였다. 세포융합이 완전히 이루어져 하나의 세포형태로 된 핵이식 수정란만을 선별하여 BMOC-3액으로 수회 세정하고 CO₂ 배양기에서 배양하였다.

핵이식한 수정란의 동결 :

1) 급속동결 : 동결보호제는 Shaw et al¹⁸의 방법에 준해 0.25M sucrose, 8mg/ml BSA와 각각 1.5, 3.0 및 4.5 M의 DMSO를 M2배지⁴⁰에 첨가하여 사용하였다. 정액보존용 0.25ml straw(IMV, France)에 30~40 μ l의 동결보호제를 흡입하고 미세 pipette을 이용하여 10~15개의 2세포기로 배양된 핵이식수정란을 straw내 동결보호제에 위치시켰다. 핵이식 수정란이 들어있는 Straw는 끝부분에 열을 가해 봉한 후 수평으로 정치시켜 2분간 평형을 실시하고 신속하게 액체질소에 넣어 24시간이상 보존하였다.

동결보존된 핵이식수정란의 융해는 액체질소에서 꺼내어 즉시 37°C 온수에 30초간 침지하여 급속융해를 실시하였다. 동결융해한 수정란을 10분간 0.25M의 sucrose가 들어 있는 2ml의 M2액에 넣어 DMSO를 제거하고, 2ml의 M2액에서 다시 10분간 정치시켜 sucrose를 제거하였다. 동결보호제가 제거된 수정란은 BMOC-3액으로 수회 세정하여 배양용 BMOC-3액으로 만든 미소적에 넣은 후 CO₂ 배양기내에서 배양하였다.

2) 완만동결 : 핵이식후 2세포기로 발육된 수정란을 Shaw et al¹⁸의 방법에 준하여 완만동결하였다. 핵이식

수정란을 실온에서 단계적으로 0.5, 1.0 그리고 1.5M DMSO가 들어 있는 M2배양액(BSA 4mg/ml 포함)에서 각각 5분간 처리하였으며, 최종 동결농도인 1.5M에서 정액보존용 0.25ml straw에 넣어 programable computerized freezer(Biocool*, FST system INC, USA)를 이용, 실온에서 -7°C까지는 2°C/min의 비율로 냉각시키고 -7°C에서 10분간 식빙시킨 후 -30°C까지 0.3°C/min으로 냉각하고 그 후 액체질소에 침적하여 보존하였다. 완만동결을 실시한 수정란은 24시간이상 보존한 후 액체질소에서 꺼내어 즉시 37°C 온수에 30초간 침지하는 방법으로 급속융해를 실시하였다. 융해 후 정상형태를 지닌 수정란을 선별하여 체외배양에 이용하였다.

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

결 과

마우스 2, 4 그리고 8세포기의 핵을 탈핵된 2세포기의 수핵란에 이식하여 핵이식 수정란을 작성하여 2세포기까지 체외배양하여 동결융해 후 생존성 및 체외발육을 조사하여 얻은 결과는 다음과 같다.

핵이식 수정란의 동결융해후 생존율 : 급속동결 및 완만동결 후 융해하여 95%이상의 난을 회수할 수 있었으며, 융해 후 형태학적 판정에 의해 정상수정란으로 판명된 비율은 2세포기 수정란을 공핵란으로 사용시 급속동결에서 DMSO의 농도가 1.5, 3.0 및 4.5M에서는 각각 75.0, 81.4, 85.7% 그리고 완만동결은 63.8%를 나타내어 4.5M의 DMSO를 이용한 급속동결이 완만동결시보다 높은 정상형태의 회수율을 나타내었다($p < 0.01$). 공핵란을 4세포기 수정란으로 사용시 동결융해 후 정상형태로 회수된 핵이식 수정란은 DMSO 4.5M인 군(83.3%)에서는 완만동결시(63.5%)보다 높게 나타났고($p < 0.01$), 8세포기의 수정란을 공핵란으로 이용하였을

Table 1. Effect of freezing method and DMSO concentrations in freezing medium on the survival of frozen-thawed nuclear transplanted mouse 2-cell embryos

Freezing method and DMSO concentration (M)	No. normal embryos/ No. of frozen-thawed embryos(%)		
	Stage of donor nuclei		
	2-cell	4-cell	8-cell
Rapid freezing			
1.5	54/72(75.0)	47/64(73.4)	41/60(68.3)
3.0	57/70(81.4)	50/66(75.8)	54/68(79.4) ^a
4.5	60/70(85.7) ^a	50/60(83.3) ^a	66/77(85.7) ^a
Freezing by slow cooling			
1.5	51/80(63.8) ^b	47/74(63.5) ^b	41/69(59.4) ^b

$p < 0.01$ for a vs b.

Table 2. Effect of freezing method and DMSO concentrations in freezing medium on the development of frozen-thawed nuclear transplant 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	21/54(38.9)	15/47(31.9)	8/45(17.8)
3.0	25/57(43.9)	19/50(38.0)	11/54(20.4)
4.5	31/60(51.7)	21/50(42.0)	17/66(25.8)
Freezing by slow cooling			
1.5	20/51(39.2)	29/87(33.3)	8/41(19.5)

때 회수된 정상형태의 핵이식수정란은 DMSO 3.0M (79.4%) 및 4.5M(85.7%)인 군이 완만동결시(59.4%)보다 높았다($p < 0.01$), (Table 1).

핵이식 수정란의 동결융해 후 생존성 및 체외발육률
: 급속동결에 의한 핵이식 수정란의 동결융해 후 체외 배양시 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(Table 2). 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 배반포로의 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 융해 후 배반포로의 발육률은 각각 39.2, 33.3 및 19.5%를 나타내었다. 동결융해 후 배반포기로의 발육률은 각 동결보호제의 농도 및 동결방법간의 통계학적 유의차는 인정되지 않았다.

고 찰

포유동물의 핵이식은 마우스에서 처음 소개되었고^{8, 13}, 그 이후 토끼⁴¹⁻⁴³, 면양^{44, 45}, 소⁴⁶ 그리고 돼지⁴⁷ 등에서도 핵이식기법에 의한 산자를 생산하기에 이르렀다. 그러나 핵이식은 정교한 미세조작과정과 체외에서 생물학적 세포성장요인에 영향을 주기 때문에 아직까지는 그 효율이 매우 낮아서 소의 경우 탈핵 세포융합, 핵이식 수정란의 활성화, 후기배로의 발육 및 산자 생산에 이르기까지 전과정에 걸친 효율은 1~6%이다.⁶ 산업동물에서 이러한 요인들을 극복할 수 있는 반복적이고 재현성있는 기술의 개발을 위해서는 필수적으로 다수의 수정란이 지속적으로 공급되어야 하는 것이 요구되나 현재의 산업동물에서 체외수정유래 수정란의 이용률은 지속적 공급을 충족시키기에는 아직도 기술이 부족

한 실정이다. 그러나 지금까지의 마우스 수정란의 핵이식은 미세조작을 완벽하게 하기 위한 단계에 주안점을 두어 왔으며, 동결에 관한 연구는 거의 수행되지 않고 있다. 이러한 문제점이 해결된다면 핵이식 기술이 마우스뿐만 아니라 산업동물에서도 응용의 폭이 확대될 수 있을 것으로 생각된다.

본 실험에서는 핵이식 수정란을 2세포기까지 체외배양 후 0.25M의 sucrose와 DMSO농도를 각각 1.5, 3.0 및 4.5M로 하여 상온에서 2분간 평형 후 바로 액체질소에 침지하여 급속동결을 실시하였고, 완만동결은 최종농도가 DMSO 1.5M로 하여 3단계로 희석하였다. 동결융해 후 2세포기 핵이식 수정란이 형태학적으로 정상인 것을 생존한 것으로 판명시 공핵란의 발육단계가 2 및 4세포기일 때 생존율은 완만동결시 보다 DMSO 4.5M인 군에서 유의적으로 높았으며, 8세포기인 경우에는 완만동결시보다 DMSO 3.0 및 4.5M에서 높았다. 본 실험의 결과는 핵이식 수정란의 동결에 관한 보문을 접할 수 없어 직접 비교할 수 없었으나, 마우스 2세포기 수정란의 동결에 관한 연구로, 백 등⁴⁸은 DMSO를 이용하여 완만동결시에 71%의 배반포기로의 발육률을 얻었고, Trounson et al³⁴은 0.25M의 sucrose 및 DMSO 1.5, 3.0 및 4.0M을 이용 급속동결시 형태학적으로 정상인 수정란의 회수율과 배반포기로의 발육률은 동결보호제 농도를 4.0M로 실시한 급속동결이 완만동결에서보다 높았다고 보고하였다. Shaw et al¹⁸도 0.25M의 sucrose 및 DMSO 1.5, 3.0 및 4.5M 농도에서 평형시간을 3분으로 하였을 때 61, 67 및 85%가 배반포기로 발육하였으며, DMSO 최종농도를 1.5M로 하여 완만동결시 71%의 발육률을 보여 DMSO 4.5M인 군이 완만동결 및 DMSO 1.5, 3.0M의 급속동결시보다 높은 배반포기로의 발육률을 보였다. 이외에도 동결보호제 및 동결방법에 다소의 차이는 있으나 마우스 2세포기 수정란을 급속동결 및 융해시 Friedler et al⁴⁹은 87%, Criser et al⁵⁰은 90.

5%, Ng et al⁵¹ 70.9% 그리고 Boone et al⁵²은 52%의 다양한 배반포기로의 발육률을 보고하였고, Wilton et al³⁰은 동결보호제로 DMSO 4.5M을 사용시 50%의 할구가 생존하였고 이중 94.9%가 후기배로 발육하였다고 하였다. 강 등³¹은 마우스 4세포기 수정란에서 1개의 할구를 제거하여 3.0M의 DMSO를 이용, 초급속 동결융해 후 체외배양한 결과 81%가 배반포기로 발달하여 미세조작이 동결 및 발육률에 영향을 미치지 않았다는 보고가 있다. 본 실험에서 핵이식 수정란의 동결융해 후 정상형태를 지닌 수정란의 회수율은 급속동결의 4.5M DMSO에서 83.3~85.7%를 보여 선인들의 정상 2세포기 수정란의 동결융해 후의 성적과 유사한 결과였다. 그러나 체외발육능은 현저히 감소되었는데 이는 핵이식 수정란이 후기배로의 발육이 저하되는 원인에 의한 것으로 판단되며 적절한 동결방법을 선택한다면 동결융해로 인한 발육능의 저하를 줄일 수 있을 것으로 생각된다. 또한 본 실험에서 완만동결보다 급속동결(4.5M DMSO)시에 높은 정상형태의 수정란회수율을 얻었는데 이는 선인들의 정상 2세포기 동결융해시 얻은 성적과 유사한 결과로 완만동결시 동결보호제에 장시간 노출된 것이 2세포기 핵이식 수정란의 형태학적 변화 및 생존성에 영향을 미친 것으로 사료된다.

결 론

마우스 수정란의 핵이식시에 탈핵된 2세포기 수핵란에 2, 4 그리고 8세포기의 핵을 주입 후 다양한 전기적 세포융합에 의해 핵이식 수정란을 작성하였다. 핵이식 수정란을 2세포기로 체외배양하여 적절한 동결방법을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 핵이식 수정란의 동결융해 후 정상형태의 회수율은 완만동결보다는 급속동결(DMSO 4.5M)시 유의적으로 높았다($p < 0.01$).
2. 정상형태로 회수된 핵이식 수정란의 체외배양시 배반포기로의 발육률은 동결방법 및 동결보호제 농도에 따른 유의적 차이를 보이지 않았다.

참 고 문 헌

1. McLaren A. Methods and success of nuclear transplantation in mammals. *Nature* 1984 ; 21 : 671-672.
2. Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE, et al. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 1985 ; 315 : 680-683.
3. Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE, et al. Genetic engineering of mammalian embryos. *J Anim Sci*

- 1986 ; 63 : 269-278.
4. Herr CM, Reed KC. Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. *Theriogenology* 1991 ; 35 : 45-54.
5. Wilmut I, Hooper ML, Simons JP. Genetic manipulation of mammals and its application in reproductive biology. *J Reprod Fert* 1991 ; 92 : 245-279.
6. Yang X, Anderson GB. Micromanipulation of mammalian embryos : Principles, progress and future possibilities. *Theriogenology* 1992 ; 38 : 315-335.
7. Briggs R, King TJ. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs eggs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1952 ; 38 : 455-463.
8. Illmensee K, Hoppe PC. Nuclear transplantation in *Mus musculus* : Developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell* 1981 ; 23 : 9-18.
9. McGrath J, Solter D. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development *in vitro*. *Science* 1984 ; 226 : 1317-1319.
10. Surani MAH, Barton SC, Norris ML. Experimental reconstruction of mouse eggs and embryos : An analysis of mammalian development. *Biol Reprod* 1987 ; 36 : 1-6.
11. Tsunoda Y, Kato Y, Shioda Y. Electrofusion for the pronuclear transplantation of mouse eggs. *Gamete Res* 1987 ; 17 : 15-20.
12. Kono T, Kwon OY, Nakahara T. Development of enucleated mouse oocytes reconstituted with embryonic nuclei. *J Reprod Fert* 1991 ; 93 : 165-172.
13. McGrath J, Solter D. Nuclear transplantation in mouse embryos. *J Exp Zool* 1983 ; 228 : 355-362.
14. Mann JR, Lovell-Badge RH. The development of XO gynogenetic mouse embryos. *Development* 1987 ; 99 : 411-416.
15. Surani MAH, Barton SC, Norris ML. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 1984 ; 308 : 548-550.
16. Kono T, Shioda Y, Tsunoda Y. Nuclear transplantation of rat embryos. *J Exp Zool* 1988 ; 248 : 303-305.
17. Tsunoda Y, Yasui T, Shioda Y. Full-term development of mouse blastomere nuclei transplanted into

- enucleated two-cell embryos. *J Exp Zool* 1987 ; 242 : 147~151.
18. 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.
 19. Whittingham DG. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature* 1971 ; 233 : 125~126.
 20. Lehn-Jensen H, Willadsen SM. Deep-freezing of cow 'HALF' and 'QUARTER' embryos. *Theriogenology* 1983 ; 19 : 49~54.
 21. Picard L, King WA, Betteridge KJ. Production of sexed calves from frozen-thawed embryos. *Vet Record* 1985 ; 117 : 603~608.
 22. Tsunoda Y, Tokunaga T, Ojubo Y. Beneficial effect of agar for frozen storage of bisected embryos. *Theriogenology* 1987b ; 28 : 317~322.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 황우석 · 절단마우스 이분배의 동결보존실험 1. 마우스 절단이분배의 체외발육능에 대하여. 한국임상수의학회지 1985 ; 2 : 43~53.
 26. 황우석 · 절단마우스 이분배의 동결보존실험 2. 동결보존후의 체외발육능 및 수태능에 관하여. 서울대학교 수의대논문집 1986 ; 11 : 179~185.
 27. Petters RM, Johnson BH, Mercer WE. Production of transgenic mice following deoxyribonucleic acid microinjection and embryo freezing. *Theriogenology* 1987 ; 27 : 507~515.
 28. Pomeroy KO. Cryopreservation of transgenic mice. *GATA* 1991 ; 8 : 95~101.
 29. Wilton LJ, Tronson AO. Biopsy of preimplantation mouse embryos development of micromanipulated embryos and proliferation of single blastomeres *in vitro*. *Biol Reprod* 1989 ; 40 : 145~152.
 30. Wilton LJ, Shaw JM, Tronson AO. Successful single-cell biopsy and cryopreservation of preimplantation mouse embryos. *Fertil Steril* 1989 ; 51 : 513~517.
 31. 강만종, 이철상, 한용만 등. 할구 한 개가 제거된 생쥐 4세포기 수정란의 초급속동결. 한국수정란이식연구회지 1992 ; 7 : 81~88.
 32. Tkeli T, Kweon OK, Kanagawa H. The viability of deep-frozen aggregated mouse embryos. *Jpn. J Vet Res* 1987 ; 35 : 283~286.
 33. 신상태, 조충호 · 동결보존한 마우스 집합배의 생존성과 Chimera의 생산에 관한 연구. 대한수의학회지 1990 ; 30 : 231~242.
 34. Trounson A, Perua A, Kirby C. Ultrarapid freezing : a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil Steril* 1987 ; 48 : 843~850.
 35. Garrisi GJ, Gordon JW, Talansky BE, et al. An intact zona pellucida is not necessary for successful mouse embryo cryopreservation. *Fertil Steril* 1992 ; 57 : 677~681.
 36. 권오경 · 생쥐 및 소초기배의 체외보존에 관한 연구. 한국임상수의학회지 1991 ; 8 : 103~108.
 37. Abramczuk J, Solter D, Koprowski H. The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. *Dev Biol* 1977 ; 61 : 378~383.
 38. Tsunoda Y, Yasui T, Nakamura K. Effect of cutting the zona pellucida on the pronuclear transplantation in the mouse. *J Exp Zool* 1986 ; 240 : 119~125.
 39. Kubiak JZ, Tarkowski AK. Electrofusion of mouse blastomeres. *Exp Cell Res* 1985 ; 157 : 561~566.
 40. 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.
 41. Stice SL, Robl JM. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod* 1988 ; 39 : 657~664.
 42. Collas P, Robl JM. Development of rabbit nuclear transplant embryos from morula and blastocyst stage donor nuclei. *Theriogenology* 1991 ; 35 : 190(Abst).
 43. Collas P, Robl JM. Relationship between nuclear remodeling and development in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod* 1991 ; 45 : 455~465.
 44. Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 1986 ; 320 : 63~65.
 45. 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.
46. Prather RS, Barnes FL, Sime MM, et al. Nuclear transplantation in the bovine embryo : Assesment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol Reprod* 1987 ; 37 : 859~866.
47. Prather RS, Sims M, First NL. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol Reprod* 1989 ; 41 : 414~418.
48. 백청순, 서병희, 이재현 등. 생쥐 2세포기배의 동결보존. *대한불임학회잡지* 1989 ; 16 : 9~14.
49. Friedler S, Shen E, Lamb EJ. Cryopreservation of mouse 2-cell embryos and ova by vitrification : methodologic studies. *Fertil Steril* 1987 ; 48 : 306~314.
50. Critser JK, Ameson BW, Aaker DV, et al. Factors affecting the cryosurvival of mouse two-cell embryos. *J Reprod Fert* 1988 ; 82 : 27~33.
51. Ng SC, Sathananthan H, Bongso A, et al. The use of amnotic fluid and serum with propanediol in freezing of murine 2-cell embryos. *Fertil Steril* 1988 ; 50 : 510~512.
52. 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.
-