

생쥐배의 발생단계별 미세분할, 배양 및 이식에 관한 연구

강대진 · 박희성 · 이효종* · 박중생

경상대학교 농과대학, 수의과대학*

Studies on Culture and Transfer of Mouse Embryos Bisected at Various Cell Stages

D. J. Kang, H. S. Park, H. J. Lee* and C. S. Park

College of Agriculture and Veterinary Medicine*, Gyeongsang National University, Chinju.

Summary

These experiments were carried out to determine the effect of cell stage in embryo bisection on the subsequent in vitro and in vivo development in mouse. The embryos of ICR mouse were microsurgically bisected at 2-cell, 4-cell, 8-cell, morula and blastocyst stage using a microsurgical blade attached a micromanipulator. These demi-embryos without zona pellucida were cultured up to blastocyst stage and transferred to pseudopregnant mice, and the development of these demi-embryos was compared with the results of intact embryos of the corresponding cell stage.

The successful rate of mouse embryo bisection at 4-cell stage (59.0%) was significantly ($P < 0.05$) lower than those at 8-cell (75.6%), 2-cell (80.7%) or morula stage (84.8%), and highest at blastocyst stage (95.7%).

When the bisected embryos without any damage from microsurgery were cultured in vitro up to blastocyst, the in vitro development of demi-embryos bisected at morula to blastocyst was 91.6 to 95.3%, which was similar to the culture result of intact embryos of corresponding stage. However, the in vitro development of demi-embryos bisected at 2- to 8-cell stage was significantly ($P < 0.05$) lower.

The post-transfer implantation rate of demi-embryos developed in vitro to eu-blastocyst were 19.6 and 25.4% in demi-embryos bisected at morula and blastocyst stage, respectively and not significantly ($P < 0.05$) different from the result of intact embryos of the same stage. However, the implantation rates of demi-embryos bisected at 2- or 8-cell stage were significantly ($P < 0.05$) lower than the result from the intact embryos of the corresponding stage.

서 론

수정란의 분할 기술은 공란축으로부터 회수된 수정란의 수를 증가시키므로써 산자수를 늘릴 수 있을 뿐만 아니라 유전적으로 동일한 형질을 가진 쌍자를 생산함으로써 동물을 대상으로 한 여러가지 연구에 매우 유용하게 이용될 수 있으며, 또한 번식율을 증가로 가축의 증식에 또 크게 기여할 수 있을

것이다.

Nicholas와 Hall(1942)은 분할한 수정란으로 부터 완전한 개체를 생산하고자 처음으로 시도한 이래 주로 생쥐와 같은 실험동물을 대상으로한 연구가 진행되어 왔다. 가축에 있어서 수정란 분할에 의한 산자생산은 1979년 Willadsen에 의하여 최초로 면양에서 성공하였다. 초기의 수정란 분할은 pronase와 같은 단백분해 효소제를 이용하거나 물

* 이 논문은 1988년도 문교부 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

리적으로 투명대를 제거한 후 blastomere를 양분하였으며, 분할 후 빈 투명대에 다시 넣어 중간속도의 난관에 가이식하여 일정기간 배양한 후 다시 회수하여 수란측에 이식하는 복잡한 조작기술을 필요로 하였으며, 분할시 blastomere의 부분적 손상이나 파괴 및 장시간 체외배양을 시켜야함으로써 이식후 수태율이 매우 저조하였다.

근년에 와서 McEvoy와 Sreenan(1987)은 상질배기와 포배기의 수정란을 투명대를 제거하지 않고 분할하여 3~6시간 배양을 시킨 후에 곧바로 수란측에 이식하는 방법으로써 양호한 수태성적을 얻었다. Park등(1987, 1988)은 상질배 및 포배기 수정란을 분할하여 단시간 배양을 시킨 수정란과 분할 후 배양과정 없이 곧바로 이식을 실시하였을 때 이들간에 수태율에 유의적인 차이가 없었다고 하였다. 또한 분할 수정란의 수태율은 수정란의 분할기술의 숙련도에 크게 좌우된다(Lee 등, 1988). 그러나 수정란의 분할은 가족에 응용하기엔 아직도 분할기술의 개발 및 수태율 향상을 위한 연구가 요구된다.

본 연구는 생쥐 수정란을 분할함에 있어서 2세 포기에서 포배기에 이르는 각 발생단계 별로 분할 성공율, 분할란의 배양 및 이식 성공율을 비교 검토하여 최적 발생단계를 규명하고자 하였다. 발달단계 별로 분할을 실시함으로써 분할기술을 개발하고 체외발달능력을 조사하여 분할수정란의 생존을 향상시키고자 본 실험을 수행하였다. 상질배기와 포배기의 수정란의 분할성공율은 2, 4, 8세포기의 수정란에서보다 유의적으로 높았으며, 체외배양 성적도 분할조작기술에 영향을 많이 받는 것으로 사료되며, 분할수정란의 이식 후의 수태율과 총 이식한

수정란중 착상수의 비율도 상질배기 및 포배기의 수정란을 이식하였을 경우에 온전한 수정란과 각각 52%와 53%로서 유의적인 차이가 없었다. 이러한 결과로 미루어 생쥐 수정란의 분할 적기는 포배기 내지 상질배기인 것으로 사료된다.

재료 및 방법

1. 공시동물

공시동물은 ICR 계통의 생쥐로서 공란생쥐는 4~6주령의 미성숙 암컷과 수란생쥐는 10~12주령의 성숙한 암컷을 실험에 공시하고 위임신유기를 위하여 10~12주령의 정관결찰 시술을 받은 수컷을 실험에 공시하였다. 한편 공시동물의 사육환경으로 실내온도는 20~23°C로 유지하였으며, 조명은 1일 14시간(07:00~21:00)으로 조절하였고, 물과 표준사료(생쥐용 펠렛사료)는 자유로이 급식시켰다.

2. 과배란의 유가 및 수정

과배란 유기는 PMSG(Sigma, U. S. A.) 51U를 복강주사하고 48시간 후에 HCG(Sigma, U. S. A.) 51U를 동일한 방법으로 주사함과 동시에 수컷생쥐와 1:1의 비율로 합사시켜 자연교미를 유도하였다. 다음날 아침 질전유무를 확인하여 질전이 형성되어 있는 것만을 실험에 사용하였으며, 질전이 확인된 날을 수정 제 1일로 정하였다.

3. 수정란의 회수

수정 후 2-cell, 4-cell, 8-cell, morula 및 blas-

Table 1. Time schedule for embryo collection

Day and time	Treatment	Stage of embryo at collection	Collection site
-2	5:00 pm	5 IU PMSG	
0	5:00 pm	5 IU hcG	
+2	10:00 am		Oviduct
+2	11:00 pm		Oviduct
+3	10:00 am		Oviduct
+4	10:00 am		Uterine horn
+4	5:00 pm		Uterine horn

tocyst 등 각 stage별 (Table 1)로 경추탈구법으로도 살하여 난관 및 자궁을 석출하여 Stereozoom microscope하에서 실시하였으며, 이 때 관류액은 Dulbecco's phosphate-buffered saline(D-PBS, Sigma)에 0.3% BSA(Sigma, U. S. A.)를 첨가하여 사용하였으며, 회수한 수정란은 mouth-operating pipette으로 3~4회 세척하였다.

4. 수정란의 분할 조작

정상적인 수정란을 선별하여 유동 paraffin이 덮혀진 소립배양액내에 수정란을 옮긴 다음 inverted microscope(Olympus, Japan)하에서 micromanipulator(Goodfellow, England)에 장치된 holding pipette으로 수정란을 고정시킨 다음 수정란의 분할은 McEvoy와 Sreenan(1987)의 방법을 일부 수정하여 실시하였다.

5. 수정란의 체외배양

체외배양에 사용된 배양액은 M-16 배양액으로써 pH는 7.4로 조정하였으며, 배양액은 사용직전에 0.2 μm 의 millipore filter로 여과시켜 세포배양용 plastic petri dish(녹십자, Korea)에 5개의 drop (20-30 μl)을 만들어서 각 drop에 1쌍씩의 수정란을 incubator 내에서 expanded blastocyst까지 배양을 실시하였다. 2-cell stage의 수정란은 M-16 배양액에 100 μM 의 EDTA(Sigma, U. S. A.)를 첨가하여 72시간 배양을 시켰고, 4-cell 및 8-cell stage의 수정란은 48시간 체외배양을 시켰으며, morula stage의 수정란은 24시간, 그리고 blastocyst stage

의 수정란은 6~12시간씩 각각 체외배양을 시켰다. 분할수정란의 체외 발달 상태는 Nagashima 등(1984)의 관찰기준에 준하여 실시하였다.

위임전이 유기된 수란생쥐는 마취를 위하여 Xylazine(바이엘, Korea)과 Ketamin(유한양행, Korea)을 1:5의 비율로 희석하여 개체당 0.1~0.2ml 씩 근육주사하여 마취를 유도하였다. 이식은 위임전제 3.0~3.5일째에 등을 절개하여 양쪽 자궁을 노출시킨 다음 26 gauge needle로 puncture하여 transfer pipette이 lumen 내에 완전히 삽입된 것을 확인한 다음 blastocyst stage까지 발달한 수정란만을 골라 한쪽 자궁에 2~6개씩 주입하였다. 이식용 pipette은 Hogan 등(1986)의 방법으로 내경 120~180 μm 로 제작하여 수정란과 배양액의 양이 1~2 μl 로 되게 조작하였다. 이식한 recipient의 임신관장은 이식후 7일째에 개방하여 착상여부를 조사하였다.

6. 통계학적 분석

통계학적 분석은 Steel과 Torrie(1960)에 의하여 X^2 -test를 실시하여 embryo의 체외 배양성적 및 이식후 수태율 등에 대하여 각 처리군 간의 차이에 대한 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 생쥐 수정란의 발생 단계별 분할 성공률

각 발생단계별로 micromanipulating blade로 수정란분할을 실시하여 demi수정란을 생산한 결과는

Table 2. Production of mouse demi-embryos by micromanipulation at different stages of development

Stage of eggs at bisection	No. of embryos used	No. and (%) of embryos bisected without damage*	No. and (%) of damaged embryos
2-cell	374	302 (80.7)b	72 (19.3)
4-cell	322	189 (59.0)a	133 (41.0)
8-cell	348	263 (75.6)b	85 (24.4)
Morula	217	184 (84.8)b	33 (15.2)
Blastocyst	186	178 (95.7)c	8 (4.3)

*There are no significant ($P < 0.05$) differences between the cell stages with the same letter.

Table 2에서 나타난 바와 같다. 즉 발생단계별 수정란의 분할 성공률은 4 세포기와 8 세포기에서 59%와 75.6%로써 분할과정에서 가장 많은 손상을 받았으며, 2 세포기와 상실배기는 각각 80.7%와 84.8%으로서 유의차인 차이 ($P < 0.05$) 가 없었으며, 포배기의 수정란은 95.7%로써 가장 적은 손상을 받았다. 이러한 결과는 Nagashima 등(1984)이 pronase 처리로 투명대를 제거한 후 미세조작용으로 분할한 경우의 80.4%보다 양호한 성적이며 Kim 등(1986)의 39.2%보다는 월등히 높은 결과이며 Park (1987), Park 등(1987, 1988), Lee(1989)의 80.6%와 대체로 일치하는 성적이다.

본 실험에서의 분할방법은 투명대를 제거하지 않고 microblade가 부착된 micromanipulator로 blade를 수직으로 미세조작하면서 양분을 실시하였다. 이 기술은 매우 간편하고 1 개의 수정란을 분할하는데 1 분이내에 완료하므로써 소요시간을 단축할수가 있었다. 특히 2 세포기, 상실배기 및 포배기의 수정란은 holding pipette을 이용하지 않고도 분할이 가능하였다. 그러나 4 세포기와 8 세포기의 수정란은 blastomere가 삼각추형을 이루고 있어서 수직으로 양분하는 것이 어려우며 양분과정중 blastomere의 파괴가 많이 일어난다는 Lee 등(1989)의 결과와 일치한다.

2. 분할된 수정란의 체외배양

2 세포기부터 포배기 단계까지의 intact한 수정란과 분할된 수정란의 체외배양 성적은 Table 3에서 나타난 바와 같다. Intact한 2 세포기의 수정란에서는 82.8%가 포배기까지 발달하였으나 분할된 수정란은 불과 42.4%만이 포배기까지 발달하였다. Intact한 4 세포기와 8 세포기의 수정란에서는 94% 및 96%가 정상적으로 발달하였으며, 이들 발생 단계간에 유의적인 차이 ($P < 0.05$) 가 없었으나 분할한 4 세포기와 8 세포기의 수정란에서는 불과 29.9%와 36.8%만이 포배기까지 발달하였다. 분할 후 단기간 체외배양을 실시한 상실배와 포배기의 분할 수정란은 91.6% 및 95.3%가 정상적으로 발달하였으며 이들간의 유의적인 차이 ($P < 0.05$) 는 없었다.

이러한 결과는 Nagashima 등(1984)의 상실배 분할란에서 57.3%가 포배로 발달하였다는 성적보다는 월등히 높은 결과이며, McEvoy와 Sreenan (1987)이 소의 상실배기 수정란을 분할하여 PBS에 48시간 배양하였을 때에 86%가 정상적으로 발달하였다는 성적과 Lee 등(1989)의 89.6%와 비슷한 수준이었다. Ponzilius 등(1987)이 8 세포기 수정란을 pronase 처리 후 분할한 수정란에서 47.7%가

Table 3. In vitro development of intact and bisected mouse embryos by cell stage

Embryos	Stage of embryos at bisection and/ or culture	No. of intact or bisected embryos used	No. and (%) of embryos developed to		No. and (%) of degenerated embryos
			Eu-blastocyst*	Abnormal blastocyst	
Intact	2-cell	152	126 (82.8)a B	3 (2.0)	23 (15.1)
	4-cell	130	122 (94.0)abB	0 (0.0)	8 (6.0)
	8-cell	137	132 (96.3)b B	0 (0.0)	5 (3.7)
	Morula	126	126 (100.0)b B	0 (0.0)	0 (0.0)
Bisected	2-cell	172	73 (42.4)a A	61 (35.5)	38 (22.1)
	4-cell	107	32 (29.9)a A	50 (46.7)	25 (23.4)
	8-cell	125	46 (36.8)a A	61 (48.8)	18 (14.4)
	Morula	96	88 (91.6)b B	6 (6.2)	2 (2.1)
	Blastocyst	150	143 (95.3)b B	5 (3.3)	2 (1.4)

*There are no significant ($P < 0.05$) differences in embryo development between cell stages with the same small letters within intact or bisected embryo, and between intact and bisected embryo with the same capital letters within the same cell stage.

Table 4. Post-transfer development of mouse embryos of blastocyst stage following bisection and/or culture at different cell stage

Embryos	Stage of embryos at bisection and/ or culture	No. of embryos transferred	No. of mice transferred	No. and (%) of mice pregnant	No. and (%) of developing fetuses*
Intact	2-cell	132	14	6 (42.8)	35 (26.5)a B
	4-cell	93	10	3 (30.0)	18 (19.3)a A
	8-cell	121	12	6 (50.0)	34 (38.1)a B
	Morula	94	10	5 (50.0)	24 (25.5)a A
	Blastocyst	273	25	13 (52.0)	73 (26.7)a A
Bisected	2-cell	105	11	3 (27.3)	11 (10.5)abA
	4-cell	87	9	1 (11.1)	5 (5.7)a A
	8-cell	113	11	3 (27.3)	11 (9.7)a A
	Morula	51	7	3 (42.8)	10 (19.6)bcA
	Blastocyst	130	13	7 (53.8)	33 (52.4)c A

*There are no significant ($P < 0.05$) differences in fetal development between cell stage with the same small letters within intact or bisected embryo, and between intact and bisected embryo with the same capital letters within the same cell stage.

포배기까지 정상적으로 발달하였다는 보고 보다는 월등히 높은 성적이며, intact한 수정란의 배양성적 89.5%와 대체로 일치한다. 이는 투명대 제거시의 효소처리에 의하여 영향을 많이 받아 체외배양성적도 감소한 것으로 생각된다.

분할한 2 세포기와 4 세포기의 수정란은 8 세포기 단계에서 발달이 중지된다고 한 Lawitts와 Gracia(1988)도 2, 4, 8 세포기의 intact 수정란과 분할 수정란을 상질배기까지 체외배양을 실시하였을 때 intact 수정란에서는 각각 87%, 89% 및 99%로써 대기로 비슷하였으나 분할 수정란의 경우는 70%, 76% 및 93%로써 2 세포기와 4 세포기에서는 배양 성적이 낮았다고 하여, 본 연구의 결과와 비슷한 경향이었다. Matsumoto 등(1989)은 수정란의 분할 조직지에 Cytochalasin B를 배양액 Fucine 처리함으로써 수정란의 수정을 막을 수 있다고 하였다.

3. 분할 수정란의 이식 후 착상율

각 발생 단계별로 분할한 수정란을 체외배양을 실시하여 포배기까지 정상적으로 발달한 수정란만을 골라 수란생취에 이식한 후 7 일째에 도산자의 착상율을 조사한 성적은 Table 4에서 보듯이 비외

다.

분할한 2 세포기와 8 세포기의 수정란에서는 착상율이 각각 27.3%로서 intact한 2 세포기와 8 세포기의 수정란의 착상율 42.8%와 50.0%에 비해 저조하였으며, 4 세포기의 경우 분할 수정란의 착상율은 11.1%로써 intact 수정란의 30%와 비교해 볼때 매우 저조한 성적이었다. 그러나 분할한 상질배기 및 포배기 수정란의 착상율은 42.8% 및 53.8%로써 intact한 수정란의 착상율 50.0% 및 52.0%에 비슷하게 영호한 성적이다.

이러한 결과는 Nagashima 등(1984)과 Park 등(1988)의 분할한 상질배기 수정란을 이식한 착상율 41.7%와 대체로 비슷하며, Park 등(1987, 1988)도 상질배기나 포배기 및 투명대 제거 수정란을 양분하 막을 수란생취에 이식한 후 착상율 41.7%와 42.8%의 성적을 바로 이식하였을 때의 성적과 비교하였던 것이다.

본 실험에서 분할한 상질배기 수정란을 이식한 후 착상률과 포배기 수정란을 이식한 성적보다 저조한 것은 compact 상질배기는 분할시에 부분적인 카페에 의해 cell수의 감소에 기인한다고 한 Tsunoda 등(1985)의 보고와 일치한다고 본다. 또한 분할한 2,

4 및 8세포기 수정란의 경우 Lawitts와 Graves (1988)도 착상율이 각각 12%, 13% 및 18%로 낮은 성적을 보고하여 본 실험의 결과와 비슷하였는데, 이는 장시간 체외배양에 따른 cell의 감소등에 기인되는 것으로 생각된다.

결 론

본 연구는 생쥐 수정란의 발생단계별 수정란의 분할성공율, 분할란의 체외배양성적 및 이식후의 착상율 등을 조사 비교하여 수정란의 분할적기를 규명하고자 하였다.

1. 발생단계별 수정란의 분할성공율은 4세포기에는 59.0%로써 분할시의 손상으로 인하여 그 성공율이 가장 낮았고, 이에 비하여 8세포기(75.6%), 2세포기(80.7%) 및 상질배(84.8%)에서는 유의적($P < 0.05$)으로 높았고, 포배기에서는 95.7%로써 가장 높았다.

2. 성공적으로 분할된 수정란을 체외배양한 결과 포배기까지의 발생율은 2, 4 및 8세포기에 분할한 수정란에서는 29.9~42.2%로써 낮았으나 상질배기 및 포배기에 분할한 경우는 91.6~95.3%로써 온전한 수정란의 배양성적과 비슷하였다.

3. 분할란을 포배기까지 체외배양한 후 정상적인 포배를 수란귀에게 이식한 결과 상질배기 및 포배기에 분할한 수정란에서는 착상율이 각각 19.6% 및 25.4%로써 온전한 수정란을 이식한 결과와 비슷하였으나 2세포기 또는 8세포기에 분할한 경우의 착상율은 온전한 수정란의 이식에 비하여 유의적($P < 0.05$)으로 낮았다.

Reference

- Bronson R and McLaren A. 1970. Transfer to the mouse oviduct of eggs with and without the zona pellucida. *J. Reprod. Fert.*, 22: 129-137.
- Hogan B, Costantini F and Lacy E. 1986. Embryo transfer. In: *Manipulating the mouse embryo*. Cold Spring Harbor Lab., New York. pp. 135-145.
- Kim, NH Chung KS, Rho HC, Pek UH and Lee KK 1986. Production of monozygotic twin mice bisecting morula. *Korean J. Anim. Sci.*, 28: 527-534.
- Lawitts JA and Graves CN. 1988. Viability of mouse half-embryos in vitro and in vivo. *Gamete Res.*, 20: 421-430.
- Lee, HJ, Park HS, Kim TS, Choe SY and Park CS. 1989. Study on improvement of viability of mouse embryos after bisection. *Korean J. Vet. Res.*, 29: 123-128.
- Matsumoto K, Miyake M, Utsumi K and Iritani A. 1989. Production of identical twin by separating two-cell rag embryos. *Gamete Res.*, 22: 257-263.
- McEvoy TG and Sreenan JM. 1987. The survival of bisected cattle embryos without zonae pellucidae. *Theriogenol.*, 22: 257.
- Modlinski JA. 1970. The role of the zona pellucida in the development of mouse eggs in vivo. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 23: 539-547.
- Nagashima H, Matsui K Sawasaki T and Kano Y. 1984. Production of monozygotic mouse twins from microsurgically bisected morulae. *J. Reprod. Fert.*, 70: 357-362.
- Nicholas JS and Hall BV. 1942. Experiments on developing rats. II. The development of isolated blastomeres and fused eggs. *J. Exp. Zool.*, 90: 441-459.
- Park HS. 1987. Surgical and non-surgical transfer of microsurgically bisected mouse embryos. M.S. Thesis. Gyeongsang Natl. Univ., Chinju, Korea.
- Park, CS, Choe SY, Lee HY, Lee JS and Park HS, 1987. Studies on the technological development of embryo transfer and manipulation in goat. II. Production of monozygotic twins by bisection of embryos. *Proc. Mol. Biol. & Genet. Engineering*. Seoul, pp. 215-222.
- Park, CS, Choe SY, Lee HY, Lee JS and Park HS, 1988. Studies on the technological development of embryo transfer and manipulation in goat. III. Improvement of viability and conception rate following bisection and transfer of embryos. *Proc. Mol. Biol. & Genet. Engineering*, Seoul, pp. 9-14.
- Ponzilius KH, Nagai J Marcus GJ and Hackett AJ, 1987. Survival of bisected mouse embryos after exposure to pronase and medium free of calcium and magnesium. *Theriogenol.*, 27: 859-867.

Steel RGD and Torrie JH. 1960. Principles and procedures of statistics. McGraw Hill Book Co., New York, U.S.A.

Tsunoda M. Tokunaga T, Sugie T and Katsumata M. 1985. Production of monozygotic twins following the transfer of bisected embryos in the goats. trans-

fer of bisected embryos in the goats. Theriogenol., 24: 337-343.

Willadsen SM. 1979. A method for culture of micro-manipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. Nature, 227: 298-300.