

동결보존한 마우스 집합배의 생존성과 chimera의 생산에 관한 연구

신 상 태 · 조 충 호*

충남대학교 농과대학 수의학과, 서울대학교 수의과대학*

(1990. 2. 15 접수)

Developmental potential of aggregated mouse embryos and production of chimeras after freezing

Sang-tae Shin, Choong-ho Jo*

Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Chungnam National University

College of Veterinary Medicine, Seoul National University*

(Received Feb 25, 1990)

Abstract: The present study was carried out to investigate the viability of frozen-thawed aggregated mouse embryos and to produce the chimeras. Different phenotypic embryos were obtained by mating ICR female mice with ICR or CBA male mice. The aggregated morulae were produced following aggregation of embryos at 4-, 8- and 12- to 16-cell stage.

The desirable stage for the aggregation of the mouse embryos was 8- to 16-cell stage. The post-thawed *in vitro* survival rates of aggregated embryos in glycerol, DMSO and ethylene glycerol were 51.5, 78.6 and 69.4%, respectively. Although the higher survival was obtained in DMSO, there were no significant differences in the survival rates among the three cryoprotectants. A total of 155 frozen-thawed aggregated embryos were transferred to 11 recipient mice, 3 out of 7 offsprings were born to overt chimera.

These experiments have proven that mouse chimeras can be obtained from frozen-thawed aggregated embryos.

Keywords: chimera, aggregation, freezing, mouse, embryos.

서 론

포유동물수정란의 동결보존은 1971년 Whittingham¹이 7.5% polyvinylpyrrolidone(PVP)을 이용, -79°C 에서 30분간 냉각시킨 마우스 8세포기배 및 초기배반포의 체외배양 및 체내이식에 성공한 이후부터 본격적으로 개발되었다. 이듬해 Whittingham et al²은 마우스 1~8세포기배 및 초기배반포를 glycerol과 dimethylsulfoxide(DMSO)를 이용, -196°C 및 -269°C 에 동결보존시키는데 성공하였다. 이후 다른 포유동물수정란의 동결보존실험도 활발히 진행되어 소,³ 토끼,⁴

랫드,⁵ 양,⁶ 염소,⁷ 사람,⁸ 그리고 말⁹ 등의 수정란을 각각 -196°C 까지 동결보존시키는데 성공 하였다.

이와 더불어 glycerol, DMSO, 각종 alcohol 및 ethylene glycol 등의 투과성 동결보호제와 sucrose, PVP, dextran, serum 및 bovine serum albumin(BSA) 등 비투과성 동결보호제 및 이들 동결보호제의 농도가 각종 동물수정란의 동결보호효과에 미치는 영향에 관한 연구가 광범위하게 이루어져 왔다.¹⁰⁻¹⁴

한편 전설상의 동물이었던 chimera는, 오늘날 그 의미가 바뀌어 생물학상 2개 이상의 유전적으로 상이한 수정란 또는 개체로부터 유래한 조직, 세포, 핵, 염색

체 등을 함유한 복합기체를 지칭하는 것으로서¹⁵ 새로운 동물의 창조에 대한 단순한 기대의 차원을 초월하여 이 동물이 갖는 특이한 유전형질과 독특한 발생과정 등으로 인해 생명과학분야의 중요한 연구대상으로 부상되었다.

1961년 소련의 Tarkowski¹⁶가 최초로 8세포기의 마우스 수정란을 이용하여 집합chimera 마우스의 생산에 성공한 이후부터 chimera의 작성술은 본격적으로 개발되었다. 이후 Mintz^{17,18}는 pronase처리 투명대제거법과 이 방법을 이용한 집합chimera마우스를 생산하였다고 보고하였으며, 또한 Mintz et al¹⁹은 수정란의 집합시에 배양액내에 phytohemagglutinin-P(PHA-A)를 첨가시킨 결과 집합률이 현저히 증가되었다고 보고함으로써, 현재의 집합 chimera 작성법의 토대를 마련하였다. 이와 같은 마우스 집합 chimera의 생산 보고에 이어 양²⁰, 랫드^{21,22} 및 토끼²³에서의 집합 chimera 생산에 각각 보고되었다. 근래에는 주입 chimera의 생산과 이종동물간의 chimera 생산에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다.^{20,24-29}

이러한 chimera 동물은 발생기전과 유전자의 발현기전,²⁹⁻³¹ 성 분화,^{32,33} 면역 기전,³⁴⁻³⁷ 등 연구분야에서 뿐만 아니라 질환 model 동물의 생산,^{22,38,39} 인간유전자질환의 병인분석 및 치료,³⁹⁻⁴¹ 육종개량,⁴² 등 산업적 측면에서도 광범위하게 이용될 수 있는 장점이 있다. 반면 생산된 chimera 동물은 그 형질이 당대에만 유지되거나 생산성이 극히 낮은 단점이 있다.^{32,43,44} 따라서 작성된 chimera배를 동결보존하거나 동결보존했던 수정란으로 chimera동물을 만들 수 있다면 차후 필요한 시기에 이들을 융해, 이식하여 chimera 동물을 생산할 수 있을 것이다.

그러나 아직 동결보호제로서 ethylene glycol을 이용하여 동결시킨 마우스 집합배를 체내이식하여 한마리의 chimera 마우스를 생산하였다는 Tekeli et al⁴⁴의 보고 외에는 집합배의 동결보존실험에 대한 다른 보문은 접할 수가 없었다.

이에 저자들은 동결보존한 마우스 집합배의 체외배양 및 체내이식을 실시하여 융해후의 생존성을 조사하고 chimera 마우스의 생산을 시도하고자 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 표현형이 다른 수정란을 채취하기 위해 수마우스만을 표현형이 완전히 상이한 계통으로 사용하였다. 즉, 백색마우스 수정란을 채취하기 위해서는 백색의 피모와 pink색 안구를 지닌 동일한 ICR계의

성숙(8주령 이상) 수마우스와 미성숙(3~4주령, 체중 15~20g) 암마우스를, 그리고 유색의 마우스 수정란을 채취하기 위해서는 갈색(agouti)의 피모와 흑색 안구를 지닌 CBA계의 성숙(10주령 이상) 수마우스와 ICR계의 미성숙 암마우스를 교미시켰다. 사육실은 실내온도를 20°C 내외로 유지하였으며, 오전 7시부터 오후 8시까지 13시간 동안은 점등하고 오후 8시부터 오전 7시까지 11시간 동안 소등하여 명암을 조절하였다. 사료 및 물은 실험동물용 펠렛사료(천호제민사료)와 깨끗한 수도물을 자유급식시켰다.

과배란처리 및 수정란의 채취 : 과배란처리는 Hetherington⁴⁵의 방법에 준해 오후 4시에 pregnant mare's serum gonadotrophin (Folligon*, Intervet Lab., Holland, 이하 PMSG) 7.5IU를, 그리고 47시간 후에 human chorionic gonadotrophin(Chorulon*, Intervet Lab., Holland, 이하 HCG) 7.5IU를 복강내 주사하였다. HCG투여후 즉시 ICR계 및 CBA계 수마우스와 동수로 하룻밤을 동거시키고 다음날 아침에 질전의 형성 유무를 관찰하여 교미여부를 확인하였다.

HCG 투여후 평균 56,66 및 74시간에 각각 4,8 및 12~16세포기배(초기상실배)를 채취하였다.

배양액 및 체외배양조건 : 수정란의 회수를 위한 관류액 및 투명대제거액의 조제시에는 Heps buffer가 첨가된 modified Krebs-Ringer bicarbonate medium⁴⁶(이하 M2)을, 수정란의 세척, 융합, 배양 및 이식시에는 Brinster's mouse ovum culture medium-3⁴⁷(이하 BMOC-3)를 사용하였다. 투명대제거액, 세척액, 융합액 및 배양액의 사용은 light weight paraffin oil (Mineral oil, Sigma, U.S.A)을 도포한 Brinster⁴⁸의 미세적배양법에 준하였으며, 체외배양은 37°C, 5%CO₂, 95%공기 및 습도가 포화상태인 CO₂ 배양기(이하 CO₂ 배양기) 내에서 실시하였다. 수정란의 동결액으로는 10%의 소태아혈청(fetal calf serum, 이하 FCS)이 첨가된 modified Dulbecco's buffered medium⁴⁹(이하 10% FCS+PBI)을 사용하였다.

집합배의 작성 : 투명대제거는 CO₂ 배양기내에서 30분 이상 평형시킨 0.5% pronase액에 37°C로 조정된 정자활력검사용항온기를 부착한 50배의 실험현미경하에서 1회에 10~20개의 수정란을 2~5분간 침지시키고 투명대가 약화되는 것이 확인되면 즉시 BMOC-3액으로 4회 세척(1회 1~5초, 2회 1~2분, 3~4회 각 5분간)함으로써 완료하였다.

집합액은 투명대제거배의 집합율을 높이기 위해 PHA-P(Sigma, USA)를 50μg/ml 되게 첨가시킨 BMOC-3액을 사용하였다(이하 PHA+BMOC-3). 투명대제거

배의 집합은 CO₂ 배양기내에서 30분 이상 평형시킨 PHA+BMOC-3액에 표현형이 상이한 투명대제거배를 한쌍씩 넣은 뒤 끝이 등글게 막힌 미세초자봉으로 투명대제거배를 가볍게 밀어 2개 이상의 활구가 서로 접촉되게 하였다(Fig 4). 접촉된 한쌍의 배는 CO₂ 배양기내에서 15~20분간 유지한 다음 신선한 BMOC-3액에 옮겨 20시간 이상 체외배양한 후 100배의 도립현미경 하에서 검사하여 단일소형화 상실배(single compacted morula)로 발육된 것만을 집합배로 정하여 동결보존실험에 사용하였다(Fig 5~10).

동결보존 : 동결보호제로는 glycerol, DMSO 및 ethylene glycol의 3종류를 선택하였으며, 동결보호제의 첨가농도는 각각 1.5M이었다. 단일상실배로 발육된 집합배를 실온에서 10% FCS+PBI로 각 5분간 2회 세척한 후 동결실험에 사용하였다.

동결에 사용된 집합배는 실온에서 각각의 동결보호제가 0.3, 0.6, 0.9, 1.2 및 1.5M 함유된 3ml의 동결액내에 각 단계 5분씩, 5단계로 첨가 및 평형시켰다. 최종농도의 동결보호제로 평형시킨 수정란은 0.25ml의 plastic straw에 각 straw당 7~15개씩 주입하여 programmable microcomputerized freezer(OSK, FFP-190형, 일본)를 이용, 황⁵⁰의 방법에 준해 동결시켰으며, -39°C에 도달한 straw는 즉시 액체질소내에 침지시켜 1~60일간 보존하였다.

수정란의 용해는 straw를 액체질소에서 꺼낸 즉시 38°C의 온수에 30초간 침지하여 급속용해하였다. 용해한 수정란은 동결보호제 첨가시의 역순으로 처리하여 동결보호제를 희석, 제거하였다.

체외배양 및 생존성판정 : 동결하지 않은 수정란은 72시간 이상, 그리고 동결, 용해한 수정란은 동결보호제를 제거시킨 후 3ml의 BMOC-3액으로 각 5분간씩 3회 세척한 다음 48시간 이상 체외배양하면서 증기배반포 이상으로 발육되면 생존한 것으로 판정하였다(Fig 11~18). 대조군은 투명대제거배로서 실험군과 같은 시기에 같은 방법으로 채취한 수정란중에서 실험군과 발육단계가 일치하고 형태가 정상적인 것을 선정하여 집합을 제외한 모든 과정을 실험군에서와 동일하게 거쳤다.

체외배양 및 동결, 용해한 수정란의 생존율에 대한 비교는 동일조건에서 배양한 수정란(12~83개) 또는 동일 straw내에 주입, 동결한 수정란(7~15개)를 기본단위로 하여 분산분석을 실시하였다. 평균생존율에 대한 차이는 SPSS 통계 system⁵¹을 이용하여 one-way분산분석을 실시하였으며, 측정치는 생존율(%)로 나타내었다.

체내이식 : 수란마우스는 생후 6~7 주령의 ICR계 마우스를 사용하였다. 수란마우스는 오후 4시에 5IU의 PMSG를, 그리고 47시간 후 동량의 HCG를 복강내 주사하였다. HCG 투여직후 동계의 정관절제 마우스와 하룻밤을 동거시킨 후 다음날 아침 질전의 형성유무를 관찰하여 위임신여부를 확인하였다. 동결, 용해한 집합배는 수란마우스의 HCG 처치후 3일째 오전에 용해하여 동결보호제제거 및 BMOC-3액으로의 세척이 완료된 직후 수란마우스의 자궁내에 이식하였다. 이식기법은 Rafferty⁵²의 방법에 준해 한쪽 자궁각당 7~10개의 수정란을 이식하였다.

Chimera 마우스의 생산 : 동결, 용해한 집합배를 이식받은 수란마우스는 17일째부터 매일 오전 및 오후에 분만여부를 관찰하여 분만한 마우스 수를 기록하였다. 신생마우스는 분만 후 2주일경에 피모색을 관찰하고 암수를 구별하였다. Chimera의 가부판정은 피모색의 표현형을 보아, 백색 및 갈색의 피모가 혼재되어 있는 것은 chimera 마우스로, 백색 피모만을 가진 것은 recessive 마우스로 그리고 갈색의 피모만을 가진 것은 dominant 마우스로 구분하였다.

결 과

집합배의 체외발육능 : 동결보존실험에 사용된 집합배의 효율적인 작성을 위해, 집합배 작성에 적합한 수정란의 발육단계를 결정하고자 4, 8 및 12~16세포기배(초기상실배)를 채취하여 집합배를 작성하고 체외배양한 결과, 각각 49.1, 87.3 및 95.3%가 확장배반포로, 각각 38.6, 5.9 및 1.6%가 증기배반포로 발육되어 확장배반포로의 발육성적은 8 및 12~16세포기배에서 4세포기배에서보다 유의성있게 높았으며(p<0.01), 이에 대한 대조군으로서의 투명대제거배에서도 비슷한 경향을 나타내었다(p<0.01). 또한 체외배양 후 수정란의 변성률도 집합배 및 투명대제거배에서 공히 4세포기배의 변성률이 8 및 12~16세포기배에서보다 높은 결과를 나타내었다 (p<0.01) (Table 1).

동결보존한 집합배의 체외발육능 : Glycerol, DMSO 및 ethylene glycol을 각각 최종농도가 1.5M되게 5단계로 첨가, 평형시킨 후 동결한 집합배의 용해후 생존율은 glycerol, DMSO 및 ethylene glycol에 대해 각각 51.5, 78.6 및 69.4%였다. 대조군으로서 투명대제거배에서의 생존율은 상기 동결보호제에 대해 각각 48.5, 75.7 및 77.5%로서 집합배와 투명대제거배간 및 집합배에서 3종류의 동결보호제간에는 유의차가 인정되지 않았으나, DMSO, ethylene glycol 및 glycerol의 순으로 높은 생존율을 보였다. 그러나 대조군으로

Table 1. Viability of aggregated and zona free mouse embryos 72 hours after *in vitro* culture in relation to the developmental stage

Type and stage of embryos	No. of embryos cultured	No.(%) of embryos developed to		
		Mid-blastocyst	Expanded-blastocyst	Degenerated
Aggregated 4-cell	57	22(38.6)a	28(49.1)a	7(12.3)a
8-cell	118	7 (5.9)b	103(87.3)b	8 (6.8)b
12- to 16-cell	64	1 (1.6)b	61(95.3)b	2 (3.1)b
Zona free 4-cell	88	35(39.8)a	39(44.3)a	14(15.9)a
8-cell	75	5 (6.7)b	67(89.3)b	3 (4.0)b
12- to 16-cell	41	0 (0.0)b	40(97.6)b	1 (2.4)b

a,b: different subscripts denote significant differences within column($p < 0.01$).

Table 2. Viability of frozen-thawed aggregated and zona free mouse morulae 48 hours after *in vitro* culture

Type of embryos	Cryoprotectants	No. of embryos cultured	No.(%) of embryos developed to blastocyst
Aggregated	Glycerol	33	17(51.5)
	DMSO	28	22(78.6)
	Ethylene glycol	36	25(69.4)
Zona free	Glycerol	33	16(48.5)a
	DMSO	37	28(75.7)b
	Ethylene glycol	40	31(77.5)b

a,b: different subscripts denote significant differences within column($p < 0.05$).

서의 투명대 제거 배에서는 DMSO 및 ethylene glycol에서의 생존율이 glycerol에서보다 유의성있게 높았다 ($p < 0.05$) (Table 2).

동결보존한 집합배의 체내이식후 수태율 및 chimera 마우스의 생산성: 동결, 용해후 체외배양 생존율이 가장 양호했던 DMSO 및 ethylene glycol을 동결보호제로 사용하여 동결, 용해한 집합배 155개를 11마리의 수란마우스에 이식한 결과, 이중 3마리의 수란마우스에서 총 7마리의 마우스가 분만되었다. 분만된 7마리의 마우스 중 3마리가 표현형이 뚜렷한 chimerism을 나타내었으며, 표현형에 따라 분류한 결과, 3마리의 chimera 마우스는 모두 흑색의 안구를 지녔으며 피모색은 갈색과 백색이 혼재되어 있었고, 암수의 비율은 2:1이었다. Chimerism이 관찰되지 않은 나머지 4마리의 마우스는 표현형이 우성인 CBA계통이 2마리 그리고 표현형이 열성인 ICR계통이 2마리였으며 암수의 비율은 3:1이었다(Fig 19).

고찰

Dulcibella⁵³ 및 Johnson Ziomek⁵⁴은 마우스 수정란의 할구는 8세포기에서부터 기능적 분화를 시작하며

16세포기에 이르러 각 할구의 운명은 내세포괴전구할구나 영양막세포전구할구중 하나로 결정된다고 하였으며, Gilbert⁵⁵는 마우스 수정란은 할구의 polarization이 최고에 달하는 8세포기의 중기에 다른 세포나 형광물질 등과의 접촉력이 가장 강해진다고 하였다.

본 실험에서 수정란의 발육단계별 집합배의 체외배양후 배반포로의 발육률은 4, 8 및 12~16세포기배에서 각각 87.9, 93.2 및 96.9%로서, 이러한 결과는 2, 4 및 8세포기배에서 각각 89.2, 93.9 및 92.3%가 배반포로 발육되었다는 안 등⁵⁶의 결과나, 4, 8 및 12~16세포기배에서 각각 85.4, 93.8 및 90.0%가 배반포로 발육되었다는 Tekeli et al⁴⁴의 결과와 유사한 성적이었다.

본 실험의 결과, 집합배의 생산에는 4세포기배보다 8 및 12~16세포기배가 더 적합함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 발육단계가 낮은 4세포기배는 체외배양후 8~16세포기배보다 변성률이 높고 확장배반포로의 발육률은 낮기 때문인 것으로 생각된다. Tarkowski¹⁶는 집합배의 작성이 가능한 마우스 수정란의 발육단계는 8세포이며, 12세포기배에서는 단일배반포의 형성이 불가능하다고 하였다. 그러나 본 실험의 결과 12~16세

포기의 초기상실배도 대부분이 단일·배반포로 발육됨을 알 수 있었다.

동결보존한 포유동물 수정란의 용해후 생존율은 동결 및 용해과정에서 세포내, 외의 빙정형성에 따라 발생하는 삼투압 stress와 기계적 stress의 정도에 의해 결정되며, 이 두가지 stress의 정도는 동결보호제의 종류, 농도, 평형방법, 희석 및 제거방법 그리고 동결 및 용해의 속도 등에 따라 달라진다.^{10, 57-59} Lehn-Jensen¹⁰은 glycerol, DMSO, 각종 glycol 및 alcohol 등 분자량이 낮은 투과성 동결보호제는 주위의 물분자를 구조화하여 빙정형성을 억제함으로써, sucrose 등 분자량은 비교적 낮으나 비투과성인 동결보호제는 수정란을 탈수시켜 세포내 수분형성을 바꾸어 줌으로써, 그리고 PVP, dextran, serum, BSA 등 고분자량의 비투과성 동결보호제는 동결 및 용해과정에서 발생하는 세포막의 손상부위를 방어하고 재생을 촉진시킴으로써 동결보호효과를 나타낸다고 하였다. Leibo와 Mazur⁵⁸은 마우스 수정란의 동결시에는 DMSO가 glycerol에 비해 노출시간이나 온도에 큰 영향을 받지 않으므로 더 좋은 동결보호제이며 최적농도는 1.5M이라고 하였다. 그러나, Miyamoto와 Ishibashi¹¹는 마우스 8세포기배를 동결보호제로서 2M의 glycerol 및 1.2M의 ethylene glycol을 0°C에서 단계적으로 첨가, 평형시키고 동결시켰을때 각각 90%까지의 높은 생존율을 얻을 수 있다고 하였다.

본 실험에서 동결시킨 집합배의 용해후 생존율은 glycerol, DMSO 및 ethylene glycol에 대해 각각 51.5, 78.6 및 69.4%로서 각각의 동결보호제간의 유의차는 인정되지 않았다. 이러한 결과는 동결보호제로서 ethylene glycol을 이용하여 동결시킨 집합배의 용해후 생존율은 단계적 희석법에서 62.5%, 그리고 sucrose희석법에서 80.0%였다는 Tekeli et al⁴⁴의 단계적희석법에 대한 결과와는 유사한 성적이었으며, sucrose희석법에 대한 결과보다는 낮은 성적이었다. 그러나 동결한 투명대제거배의 용해후 배반포로의 발육율은 동결보호제로서 glycerol, DMSO 및 ethylene glycol에 대해 각각 61.6, 64.1 및 67.4%였으며 동결보호제간의 유의차는 인정되지 않았다는 황⁵⁰의 결과와 비슷한 수준이었다. 비록 각 동결보호제간의 유의차는 인정되지 않았으나 DMSO 및 ethylene glycol에서의 생존율이 glycerol에서보다는 높았으므로 집합배의 동결보존시에는 DMSO나 ethylene glycol을 동결보호제로 사용하는 것이 바람직하다고 사료된다.

본 실험에서 동결, 용해한 집합배 155개를 체내이식하여 3마리의 chimera 마우스를 생산하였다. 이러한 결과는, 동결하지 않은 집합배 1,096개를 체내이식하여 11.9%의 분만성적을 얻었다는 Craig-Veit와 Anderson⁴³의 결과보다는 훨씬 저조하였다. 그러나 동결보호제로서 ethylene glycol을 이용하여 완만동결시킨 마우스 집합배 6개를 체내이식하여 한마리의 chimera를 생산하였다는 Tekeli et al⁴⁴의 보고이외에 동결보존한 집합배의 체내이식에 대한 기타의 보문은 아직 집한 바 없다. 또한 chimera의 발생율도 각각 47% 및 41%의 발생율을 보였다는 Craig-Veit와 Anderson⁴³ 및 Avis와 Anderson⁶⁰의 보고와 비슷한 수준이었던 마 동해로 인한 할구의 손상이 chimera의 발생에는 크게 영향을 미치지 않았던 것으로 추측된다.

본 실험에서 동결보존한 집합배의 체내이식후 생존율은 낮았다. 이러한 결과는 동결보존한 투명대제거배는 동해에 의한 할구의 손상때문에 생존세포수가 감소된다는 Lehn-Jensen¹⁰ 및 Tekeli et al⁴⁴의 보고를 감안한다면, 비록 수태율은 낮으나 동결, 용해한 집합배를 이용한 chimera 동물의 생산가능성은 충분하다고 사료된다.

본 실험의 결과, 동결보존한 집합배를 이용한 chimera마우스의 생산이 가능하였으며, 이러한 결과는 차후 다른동물, 특히 산업동물 또는 질환 model동물 등에서의 동결보존 chimera 생산을 위한 기초자료로서 충분히 활용될 것으로 기대된다.

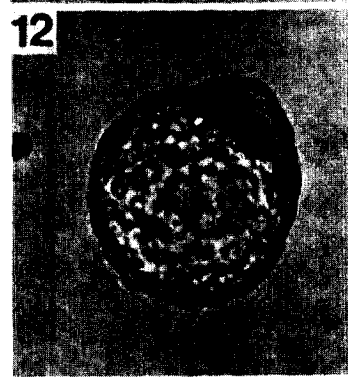
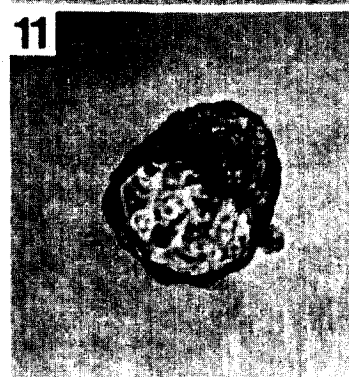
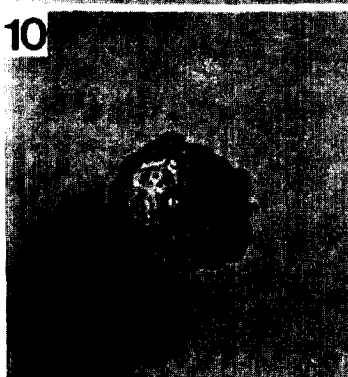
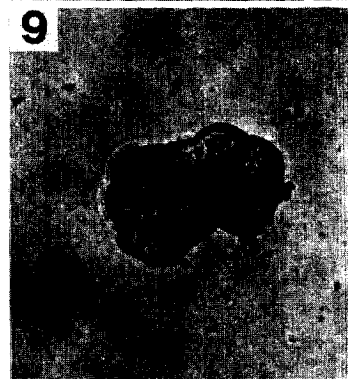
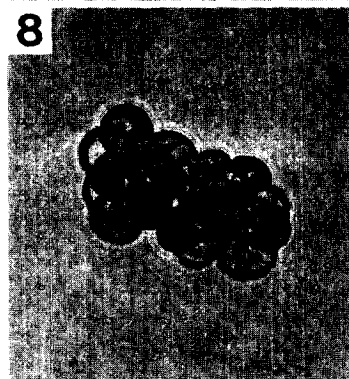
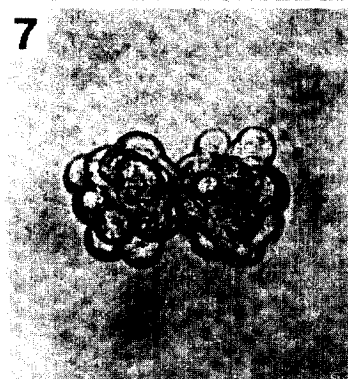
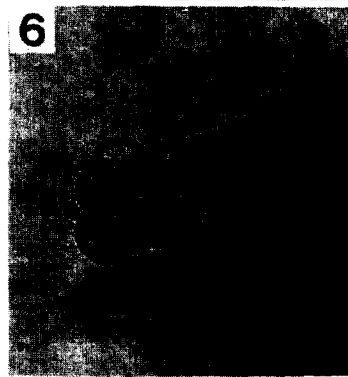
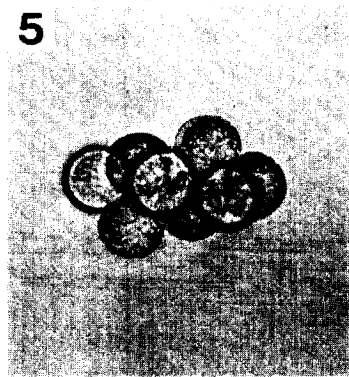
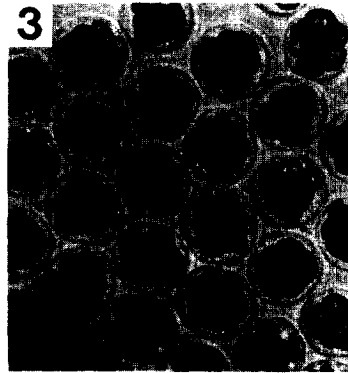
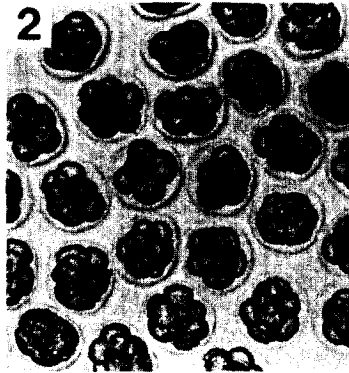
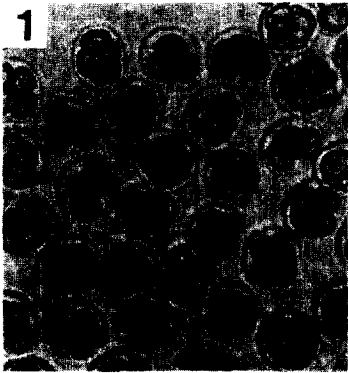
결 론

집합배의 동결보존후 생존성과 chimera의 생산가능성을 규명할 목적으로, 표현형이 백색 및 갈색인 마우스에서 4, 8, 및 12~16 세포기의 수정란을 채취하여 집합배를 작성하고 각각 1.5M의 glycerol, DMSO 및 ethylene glycol을 이용하여 동결, 용해한 후 체외배양 및 체내이식을 실시하였다.

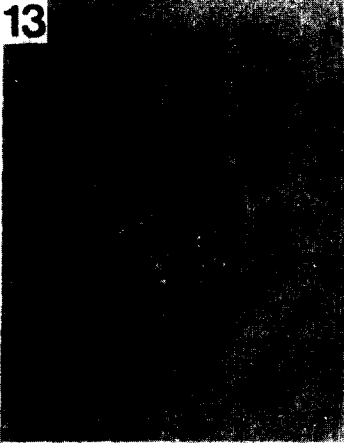
집합배의 작성에 적합한 수정란의 발육단계는 8~16 세포기였다. 동결한 집합배의 용해후 생존율은, 동결보호제로서 1.5M의 glycerol, DMSO 및 ethylene glycol에 대해 각각 51.5, 78.6 및 69.4%로서 각 동결보호제에 따른 유의차는 인정되지 않았으나 DMSO에서 가장 높은 생존율을 나타내었다. 동결, 용해한 집합배 155개를 이식한 결과 7마리의 마우스가 분만되었으며, 이중 3마리에서 뚜렷한 chimerism이 관찰되었다.

Legends for figures

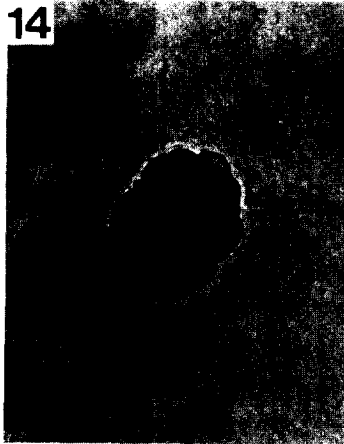
- Fig 1.** Zona intact 4-cell embryos obtained 56 hours after HCG injection. $\times 100$.
- Fig 2.** Zona intact 8-cell embryos obtained 66 hours after HCG injection. $\times 100$.
- Fig 3.** Zona intact early morulae(12- to 16-cell) obtained 74 hours after HCG injection. $\times 100$.
- Fig 4.** A pair of zona free 8-cell embryos obtained after 0.5% pronase solution treatment for 2~5 min. Gently pushing with microglass rod in microdrop of BMCC-3 containing 50 μ g/ml PHA-P. $\times 100$.
- Fig 5.** Aggregating two 4-cell stage embryos immediately after PHA-P treatment for 15~20min. $\times 200$.
- Fig 6.** Aggregating two 8-cell stage embryos immediately after PHA-P treatment for 15~20min. $\times 200$.
- Fig 7.** Aggregating two early morula(16-cell) stage embryos immediately after PHA-P treatment for 15~20min. $\times 200$.
- Fig 8~13.** Aggregation and development of two 8-cell stage embryos.
- Fig 8.** Two hours after *in vitro* culture. $\times 200$.
- Fig 9.** Twelve hours after *in vitro* culture. $\times 200$.
- Fig 10.** Twenty-four hours after *in vitro* culture. $\times 200$.
- Fig 11.** Forty-four hours after *in vitro* culture. $\times 200$.
- Fig 12.** Sixty hours after *in vitro* culture. $\times 200$.
- Fig 13.** A blastocyst developed from a zona free 8-cell stage embryos for 48 hours *in vitro*. $\times 200$.
- Fig 14~17.** Development of aggregated embryos after freezing and thawing.
- Fig 14.** Immediately after thawing. $\times 200$.
- Fig 15.** Twelve hours after *in vitro* culture. $\times 200$.
- Fig 16.** Twenty hours after *in vitro* culture. $\times 200$.
- Fig 17.** Forty-eight hours after *in vitro* culture. $\times 200$.
- Fig 18.** A blastocyst developed from a zona free embryo after freezing and thawing for 48 hours *in vitro*. $\times 200$.
- Fig 19.** Offsprings obtained from transfer of aggregated embryos after freezing and thawing. Two from left are dominant, three in the middle are chimeric, and two from right are recessive. Note the mottled coat on the body and tail of chimera mice(A,B,C).



13



14



15



16



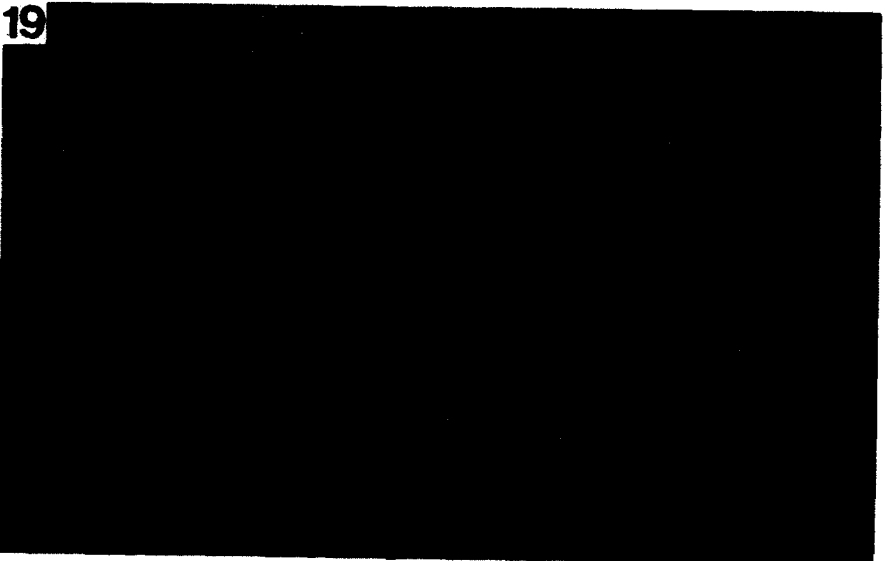
17



18



19



참 고 문 헌

1. Whittingham DG. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature* 1971;233:125~126.
2. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . *Science* 1972;178:411~414.
3. Wilmut I, Rowson LEA. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet Rec* 1973;92:686~690.
4. Bank H, Maurer RR. Survival of frozen rabbit embryos. *Exp Cell Res* 1974;89:188~196.
5. Whittingham DG. Survival of rat embryos after freezing and thawing. *J Reprod Fert* 1975;43:575~578.
6. Willadsen SM, Polge C, Rowson LEA, et al. Deep freezing of sheep embryos. *J Reprod Fert* 1976;46:151~154.
7. Bilton RJ, Moore NW. *In vitro* culture, storage and transfer of goat embryos. *Aust J Biol Sci* 1976;29:125~129.
8. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983;305:707~709.
9. Slade NP, Takeda T, Squires EL, et al. A new procedure for the cryopreservation of equine embryos. *Theriogenology* 1985;24:45~58.
10. Lehn-Jensen H. Cryopreservation of bovine embryos: An evaluation of factors influencing the survival of day $6\frac{1}{2}$ ~ $7\frac{1}{2}$ embryos during freezing and thawing. Copenhagen: *A/S Carl Fr Mortensen*, 1986:17~149.
11. Miyamoto H, Ishibashi T. Survival of mouse embryos frozen-thawed slowly or rapidly in the presence of various cryoprotectants. *J Exp Zool* 1983;226:123~127.
12. Renard JP, Babinet C. High survival of mouse embryos after rapid freezing and thawing inside plastic straws with 1~2 propanediol as cryoprotectant. *J Exp Zool* 1984;230:443~448.
13. Takeda T, Elsdon RP. Comparison of cryoprotectants for freezing mouse embryos. *Theriogenology* 1982;17:109(Abst).
14. Urano K, Takahashi Y, Kanagawa H. Effect of various cryoprotectants on the survival of frozen-thawed mouse embryos. *Jpn J Anim Reprod* 1986;32:130~133(In Japanese).
15. McLaren A. *Mammalian chimaeras*. London: Cambridge University Press, 1976.
16. Tarkowski AK. Mouse chimaeras developed from fused eggs. *Nature* 1961;190:857~860.
17. Mintz B. Experimental study of the developing mammalian egg: Removal of the zona pellucida. *Science* 1962a;138:594~595.
18. Mintz B. Formation of genotypically mosaic mouse embryos. *Am Zool* 1962b;2:432.
19. Mintz B, Gearhart JD, Guymont AO. Phytohemagglutinin-mediated blastomere aggregation and development of allophenic mice. *Dev Biol* 1973;31:195~199.
20. Fehilly CB, Willadsen SM, Tucker EM. Interspecific chimaerism between sheep and goat. *Nature* 1984;307:634~636.
21. Mayer JF Jr, Fritz HI. The culture of preimplantation rat embryos and the production of allophenic rats. *J Reprod Fert* 1974;39:1~9.
22. Mullen RJ, LaVail MM. Inherited Retinal Dystrophy: Primary defect in pigment epithelium determined with experimental rat chimeras. *Science* 1976;192:799~801.
23. Gardner RL, Munro AJ. Successful construction of chimaeric rabbit. *Nature* 1974;250:146~147.
24. Zeilmaker GH. Fusion of rat and mouse morulae and formation of chimaeric blastocysts. *Nature* 1973;242:115~116.
25. Gardner RL, Johnson MH. Investigation of early mammalian development using interspecific chimaeras between rat and mouse. *Nature*(New Biol) 1973;246:86~89.
26. Rossant J. Investigation of inner cell mass determination by aggregation of isolated rat inner cell masses with mouse morulae. *J Embryol Exp Morphol* 1976;36:163~174.
27. Tachi S, Tachi C. Electron microscopic studies of chimeric blastocysts experimentally produced by aggregating blastomeres of rat and mouse embryos. *Dev Biol* 1980;80:18~27.
28. Rossant J, Frels WI. Interspecific chimeras in

- mammals: successful production of live chimeras between *Mus musculus* and *Mus caroli*. *Science* 1980;208:419~421.
29. Gardner RL. Mouse chimaeras obtained by the injection of cells into the blastocyst. *Nature* 1968;220:596~597.
 30. Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, et al. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:7380~7384.
 31. Stern MS. Chimeras obtained by aggregation of mouse eggs with rat eggs. *Nature* 1973;243:472-473.
 32. Gearhart J, Oster-Granite ML. Reproduction in a population of chimeric mice: Relationship of chromosomal sex to functional germ cells and proportions of chimeric components in several tissues. *Biol Reprod* 1981;24:713~722.
 33. Mintz B, Domon M, Hungerford DA, et al. Seminal vesicle formation and specific male protein secretion by female cells in allophenic mice. *Science* 1972;175:657~659.
 34. Boulianne GL, Hozumi N, Shulman MJ. Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature* 1984;312:643~646.
 35. Dent J, McGovern PT, Hancock JL. Immunological implications of ultrastructural studies of goat X sheep hybrid placentae. *Nature* 1971;231:116~117.
 36. Mintz B, Silvers WK. "Intrinsic" Immunological tolerance in Allophenic mice. *Science* 1967;158:1484~1487.
 37. Silvers WK, Billingham RE, Sanford BH. The H-Y transplantation antigen: a Y-linked or sex-influenced factor? *Nature* 1968;220:401~403.
 38. Dewey MJ, Martin DWJr, Martin GR, et al. Mosaic mice with teratocarcinoma-derived mutant cells deficient in hypoxanthine phosphoribosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5564~5568.
 39. Mikoshiba K, Yokoyama M, Inoue Y, et al. Oligodendrocyte abnormalities in shiverer mouse mutant are determined in primary chimaeras. *Nature* 1982;299:357~359.
 40. Hooper M, Hardy K, Handyside A, et al. HPRT-deficient(Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* 1987;326:292~295.
 41. Kuehn MR, Bradley A, Robertson EJ, et al. A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. *Nature* 1987;326:295~298.
 42. Summers PM, Shelton JN, Morris B, et al. Interspecific chimerism-The characterization and immunological responsiveness of *Bos taurus-Bos indicus* hemopoietic chimeras produced by embryo transfer. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1984;62:27~45.
 43. Craig-Veit(Lawrence) C, Anderson GB. Reproductive performance of chimeric mice produced from genetic lines that differ in litter size. *J Anim Sci* 1985;61:1527~1538.
 44. Tekeli T, Kweon OK, Kanagawa H. The viability of deep-frozen aggregated mouse embryos. *Jpn J Vet Res* 1987;35:283~286.
 45. Hetherington CM. Mouse husbandry. In: Monk M, ed. *Mammalian development: a practical approach*. Oxford: IRL press, 1987:1~12.
 46. 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.
 47. Brinster RL. Measuring embryonic enzyme activity. In: Daniel JCJr, ed. *Methods in mammalian embryology*. San Francisco: WH Freeman and Company, 1971:215~227.
 48. Brinster RL. A method for *in vitro* cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. *Exp Cell Res* 1963;32:205~208.
 49. Whittingham DG. Embryo banks in the future of developmental genetics. *Genetics* 1974;78:395~402.
 50. 황우석, 절단마우스 이분배의 동결보존실험. 2. 동결보존후의 체외육능 및 수태능에 관하여. 서울대수의대논문집. 1986;11:179~185.
 51. Nie NH, Hull CH, Jenkins JG, et al. *Statistical package for the social sciences(SPSS)*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 1975:398~433, 267~275.
 52. Rafferty KAJr. *Methods in experimental embry-*

- ology of the mouse*. Baltimore and London: The Johns Hopkins Press, 1970;42~50.
53. Dulcibella T. Surface changes of the developing trophoblast cell. In: Johnson MH, ed. *Development in mammals*. Vol. 1. Amsterdam: Elsevier, 1977;5~30.
 54. Johnson MH, Ziomek CA. Induction of polarity in mouse 8-cell blastomeres: Specificity, geometry, and stability. *J Cell Biol* 1981;91:303~308.
 55. Gilbert SF. *Developmental biology*. 2nd ed. Massachusetts: Sinauer Associates Inc Pub, 1988;74~111, 237~239.
 56. 안치용, 노승찬, 고정재 등. Chimera 생쥐의 생산. *환축지* 1986;28:535~541.
 57. Bank H, Mazur P. Visualization of freezing damage. *J Cell Biol* 1973;57:729~742.
 58. Leibo SP, Mazur P. Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. In: Daniel JC Jr, ed. *Methods in mammalian reproduction*. New York: Academic press, 1978;179~201.
 59. Schneider U, Mazur P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology* 1984;21:68~79.
 60. Avis J, Anderson GB. Viability of blastocysts produced by aggregation of two half-embryos in the mouse. *Theriogenology* 1988;29:505~512.