大韓獸醫學會誌 (1991) 第31卷 第2號
Korean J Vet Res (1991) 31(2) : 229~233

동결보존한 마우스 이분집합배의 생존성에 관한 연구

신 상 태·조 충 호
충남대학교 수의과대학, 서울대학교 수의과대학*

(1991. 1. 25 접수)

Developmental potential of bisected-aggregated mouse embryos after freezing

Sang-tae Shin • Choong-ho Jo*
College of Veterinary Medicine, Chungnam National University
*College of Veterinary Medicine, Seoul National University**

(Received Jan 25, 1991)

ABSTRACT: The chimeric morulae were produced following aggregation of the half embryos which were microsurgically bisected at 8-cell and early morula stage. Different phenotypic embryos were obtained by mating ICR female mice with ICR or CBA male mice. The early morula stage was the desirable stage for the aggregation of mouse embryos after bisection. The post-thawed survival rates of bisected-aggregated embryos that developed into normal blastocyst after conventional freezing in DMSO and ethylene glycol were 30.5 and 32.8%, respectively. One offspring was produced by transferring the 67 frozen-thawed bisected-aggregated embryos.

Keyword: bisected-aggregated, frozen-thawed, chimeric, embryos.

서 론

근래 미세조작장치 및 면역수술법이 발전, 향상됨에 따라 DNA 또는 특정유전자를 배반포내에 주입시켜 유전자의 변형을 유도하는 분자생물학적 방법에 의한 chimera의 생산[1-3] 및 핵치환 기법에 의한 chimera 동물의 생산[4-6] 등 첨단기술에 의한 chimera 동물의 생산에 관한 연구가 급속도로 발전되고 있다. 또한 Brem et al[7]은 한정된 수정란을 이용하여 다수의 chimera동물을 생산하기 위해 이분배 및 4분배의 집합에 의한 집합chimera송아지의 생산을, 그리고 Avis와 Anderson[8]은 각각을 분리시킨 마우스 8세포기배의 할구를 집합하여 집합chimera 마우스의 생산을 시도하였다. 한편, 절단이분배의 동결보존이 가능해짐에 따라,[9-12] 분할란의 한쪽을 동결보존하면서 다른쪽은 염색체검사, 유전적조작 및 이식 등에 제공함으로써 수정란이식의 실용성을 한층 확대, 제고시킬 수 있게 되었다, 최근 Tekeli et al[13] 및 신과 조[14]는 동결보존집합배를 이용한 chimera 마우스의 생산에 성공하였다고 보고하였다. 그러나 아직까지 이분집합배의 동결보존후 생존성에 대해서는 보고된 바가 없다.

재료 및 방법

수정란의 채취 및 이분집합배의 작성 : 공란마우스는 생후 3~5 주령의 ICR계 및 CBA계 미성숙 마우스였으며, Hetherington[15]의 방법에 준해 PMSG 및 HCG를 복강내 주사하여 과배란을 유도하였다. HCG투여 후 평균 66 및 74시간에 8세포기배 및 초기상실 배를 채취하여 0.5% pronase액으로 투명대를 제거하였다. 투명대가 제거된 수정란은 Mg^{++}과 Ca^{++}이 포함되지 않은 M2액(이하 M2(−)액)에 20~30분간 정치하여 할구의 개체별 윤곽이 명료해질 때까지 decompaction시킨후(Fig 1), 소량의 M2(−)액에 각각 한개씩의 수정란을 정치시키고 200배의 시야에서 micro glass needle로 수정란의 중앙부위를 절단한 다음(Fig 2), micropipette으로 흡인하여 발육단계는 같으나 표현형이 상이

한 한쌍의 이분배를 前報[14]의 집합배작성법에 따라 접착시킨후 체외배양하였다. 접착시킨배는 24시간 체외배양한후 100배의 도립현미경하에서 검사하여 단일소형화상실배로 발육된 것만을 이분집합배로 정하여 체외배양실험 및 동결보존실험에 사용하였다.

동결보존 : 동결보호제로는 DMSO 또는 ethylene glycol을 10% fetal bovine serum 첨가 Dulbecco's phosphate buffered saline에 최종농도가 각각 1.5M 되게 첨가하여 사용하였다. 동결보호제는 실온에서 각각의 동결보호제가 0.3, 0.6, 0.9, 1.2 및 1.5M 함유된 3ml의 동결액내에 각 단계 5분씩, 5단계로 첨가, 평형시켰다. 최종농도의 동결보호제로 평형시킨 수정란은 0.25ml의 plastic straw에 주입하여 황[12]의 방법에 준해 2단계로 동결시킨후 액체질소내에 보존하면서 필요한 시기에 꺼내어 즉시 38°C의 온수에 침지하여 급속융해한 다음 동결보호제첨가시의 역순으로 처리하여 동결보호제를 희석, 제거하였다.

체외배양 및 체내이식 : 동결하지 않은 이분집합배는 Brinster's mouse ova culture medium(이하 BMOC-3액)에 72시간까지(Fig 3~6), 그리고 동결, 융해한 이분집합배는 동결보호제를 제거시킨후 3ml의 BMOC-3액으로 각 5분간씩 3회 세척한 다음 48시간 이상 체외배양하면서 Tarkowski와 Wroblewska[16]의 방법에 준해 그 발육형태를 분류하였으며, 중기배반포 이상으로 발육되면 생존한 것으로 판정하였다(Fig 8~11). 대조군은 실험군과 같은 시기에 같은 방법으로 채취하여 작성한 정상적인 이분배를 사용하였다(Fig 7 and 12). 동결, 융해한 이분집합배는 위임신 3일째인 생후 6~7주령의 ICR계 수란마우스의 자궁에 Rafferty[17]의 방법에 준하여 이식하였다.

결 과

표현형이 백색 및 갈색인 마우스 수정란을 채취하여 이분집합배를 작성한 후, 체외배양 및 동결보존후의 생존성과, 동결, 융해한 이분집합배를 체내이식하여 얻은 결과는 다음과 같다.

이분집합배의 체외발육능 : 이분배를 이용한 집합배의 작성가능성과 동결보존실험에 사용할 이분집합배의 효율적인 작성을 위해, 8세포기배 및 초기상실배를 채취하여 이분집합배를 작성하고 체외배양한 결과, 8세포기배 및 초기상실배에서 각각 87.1 및 94.2%가 정상배반포로 발육되었으며, 이에 대한 대조군으로서의 8세포기배 및 초기상실배의 이분배에서는 각각 70.0 및 92.4%가 정상배반포로 발육되어 이분집합배에서 보다 비교적 낮은 발육률을 나타내었다. 특히 8세포기의 이분배에서의 정상배반포로의 발육률은 8세포기배의 이분집합배에서보다 유의성있게 낮았다($p<0.05$) (Table 1).

동결보존한 이분집합배의 체외발육능 : 동결보호제로서 1.5M의 DMSO 및 ethylene glycol을 단계적으로 첨가, 평형시키고 동결보존한 이분집합배의 융해후 정상배반포로의 발육률은 DMSO 및 ethylene glycol에 대해 각각 30.5 및 32.8%였으며, 이에 대한 대조군인 이분배에서는 각각 29.5 및 26.4%로서 이분집합배와 이분배간 및 2가지 동결보호제간의 유의차는 인정되지 않았다(Table 2).

동결보존한 이분집합배의 체내발육능 : 동결, 융해한 이분집합배 67개를 7마리의 수란마우스에 이식한 결과, 한마리의 갈색마우스가 분만되었으며 분만된 마우스는 표현 형상의 chimerism은 나타내지 않았다.

Table 1. Morphological classification of bisected-aggregated and bisected mouse embryos after 72 hours *in vitro* culture

Type and stage of embryos	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to*		
		Normal BL	False BL	Degenerated
Bisected-Aggregated				
8-cell	101	88(87.1)a	2(2.0)	11(10.9)
Morula	156	147(94.2)a	0(0.0)	9(5.8)
Bisected				
8-cell	86	61(70.0)b	18(20.9)	7(8.1)
Morula	92	85(92.4)a	1(1.1)	6(6.5)

a, b: Different subcripts denote significant differences within columns ($p<0.05$).
*: BL; blastocyst.

Table 2. Morphological classification of bisected-aggregated and bisected mouse morulae following cryopreservation and *in vitro* culture for 48 hours

Type of embryos	Cryoprotectants	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to*			
			NB	FB	TV	Deg
Bisected-Aggregated						
	DMSO	59	18(30.5)	6(10.2)	9(15.3)	26(44.1)
	Ethylene glycol	61	20(32.8)	6(9.8)	5(8.2)	30(49.2)
Bisected						
	DMSO	122	36(29.5)	14(11.5)	11(9.0)	61(50.0)
	Ethylene glycol	110	29(26.4)	12(10.9)	10(9.1)	59(53.6)

*: NB; normal blastocyst, FB; false blastocyst, TV; trophectodermal vesicle, Deg; degeneration.

고 찰

포유동물수정란의 동결보존기술은 근래 눈부신 발전을 거듭하여 오늘날에는 최적조건하에서 동결, 융해한 마우스 수정란의 90%이상을 생존시킬 수 있게 되었다.[18,19] 그러나 투명대제거배나 이분배의 동결보존후 생존율은 아직 70%이하의 수준이며,[20] 특히 chimera배의 동결보존에 관한 연구는 극히 드물다.[13,14] Leibo와 Mazur[21]는 돌연변이종이나 유용동물의 계통보존에 소요되는 경비 및 소멸의 위험성은 수정란을 동결보존함으로써 감소시킬 수 있다고 하였으며, Lehn-Jensen[20]은 분리배를 이용하여 일란성다태아를 생산한다면 유용동물의 생산성 증가는 물론 유전적 소인이나 성이 예지된 동물을 생산할 수 있는 장점이 있으며 이러한 장점은 분리배의 동결보존으로 더욱 증가시킬 수 있다고 하였다. 따라서 chimera동물의 이용도가 날로 증가되는 현추세에 비추어 볼때, 분리배를 이용한 chimera의 생산이나 chimera배의 동결보존필요성은 더욱 높아질 것으로 예상된다.

본 실험에서 체외배양한 8세포기배 및 초기상실배의 이분집합배는 각각 87.1 및 94.2%가 정상배반포로 발육되었다. 이러한 결과는, 투명대를 제거한 마우스 8세포기배를 micropipette으로 흡인, 유출을 반복하여 각각의 할구를 분리한 후, 8개의 할구를 재결합시킨 분리집합배를 체외배양한 결과 이중 93%가 배반포로 발육되었다는 Avis와 Anderson[8]의 결과나, 마우스 상실배의 절단이분배는 할구수가 7개 이상인 경우 90% 이상이 정상배반포로 발육되었다는 황[22]의 결과와 유사한 성적이었으며, 절단이분한 마우스 상실배 131쌍중 57.3%가 정상배반포로 그리고 15.3%가 위배반포로 발육되었다는 Nagashima et al[23]의 결과보다는 높은 성적이었다. 본 실험에서 이분집합배에서의 정상배반포로의 발육률은 대조군인이 분배에 비해 높았다. 이러한 결과는 이분배의 집합으로 인해 할구수가 증가됨으로써 이분조작에 의한 할구의 감소현상과 이에 따른 발육률의 저하를 줄일 수 있었던 것으로 사료된다. 또한 8세포기배는 구조의 특수성때문에 할구에 손상을 입히지 않고 절단, 이분하기가 까다로왔던 점과 본 실험의 성적을 종합해 볼때, 이분집합배의 작성에 적합한 수정란의 발육단계는 초기상실배가 적절하다고 생각된다.

Lehn-Jensen과 Willadsen[10]은 소 수정란을 절단하여 이분배 및 4분배로 만든뒤 투명대내에 다시 주입하여 동결, 융해한 결과 각각 70 및 75%의 생존율을 얻을 수 있었다고 하였다. Nagashima와 Ogawa[9]는 microglass needle로 절단한 랫드 및 토끼의 절단이분배를 동결, 융해하고 체외배양한 결과 각각 26.7 및 23.1%가 정상배반포로 발육되었다고 하였다. 본 실험에서 이분집합배의 동결, 융해후 정상배반포로의 발육률은 동결보호제로서 1.5M의 DMSO 및 ethylene glycol에 대해 각각 30.5 및 32.8%를 나타내었으며 체내이식후 정상적인 새끼를 분만시킬 수 있었다. 이러한 결과로서 이분집합배의 동결보존 가능성이 확인되었으나, 생존율을 향상시킬 수 있는 적절한 방법은 차후 더욱 연구되어지야 할 것으로 사료된다.

결 론

이분집합배의 동결보존후 생존성과 chimera의 생산가능성을 규명하기 위해, 표현형이 백색 및 갈색인 마우스 수정란으로 이분집합배를 작성하여 체외배양 및 동결, 융해후의 생존성을 조사하고, 동결, 융해한 이분집합배의 체내이식을 실시하였다.

실험결과, 이분집합배 작성에 적합한 수정란의 발육단계는 초기상실배기였으며, 동결보존한 이분집합배의

융해후 정상배반포로의 발육률은 동결보호제로서 1.5 M의 DMSO 및 ethylene glycol에 대해 각각 30.5 및 32.8%였다. 동결, 융해한 이분집합배 67개를 이식한 결과 1마리의 마우스가 분만되었다.

Legends for Figures

Fig 1. A decompacted early morula (16-cell) treated with Ca^{++} and Mg^{++} free M2 medium for 20~30min. ×200.

Fig 2. A monozygotic pair of half-morulae, immediately after bisection. ×200.

Fig 3~6. Aggregation and development of two embryos bisected at early morula stage.

Fig 3. Two hours after in vitro culture. ×200.

Fig 4. Twelve hours after in vitro culture. ×200.

Fig 5. Forty-four hours after in vitro culture. ×200.

Fig 6. Sixty hours in vitro culture. ×200.

Fig 7. A blastocyst developed from an embryo bisected at early morula stage and cultured for 48 hours in vitro. ×200.

Fig 8~11. Development of bisected-aggregated embryos after freezing and thawing

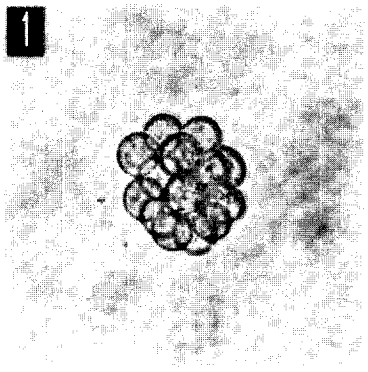
Fig 8. Immediately after thawing. ×200.

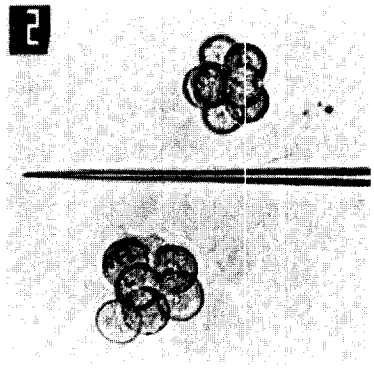
Fig 9. Twelve hours after in vitro culture. ×200.

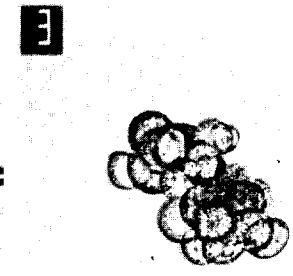
Fig 10. Forty-eight hours after in vitro culture. ×200.

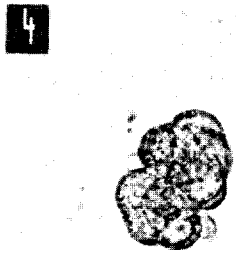
Fig 11. False blastocyst(FB), trophectodermal vesicle(TV), non-integrated form(NI) and degenerated(D) embryos 48 hours after in vitro culture. ×200.

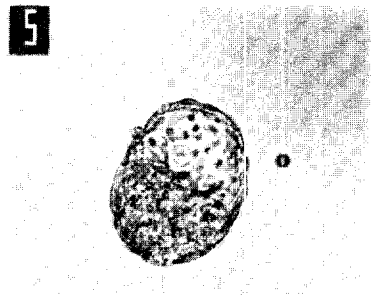
Fig 12. A false blastocyst developed from a bisected-aggregated embryos at early morula stage and cultured for 60 hours in vitro. ×200.

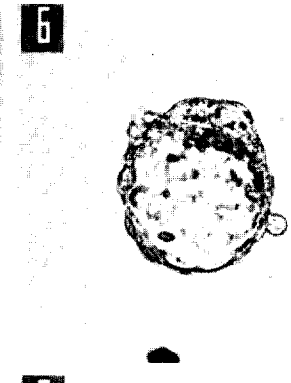

1

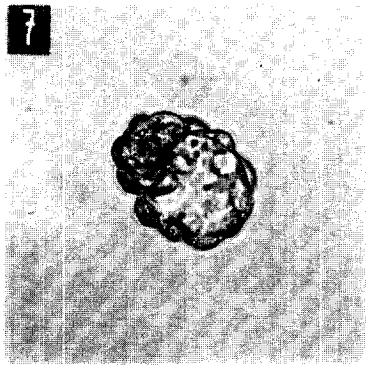

2

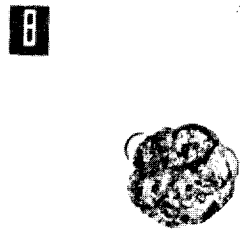

3

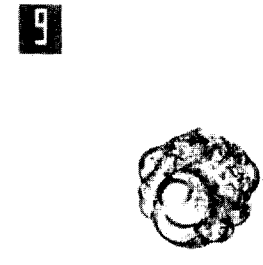

4

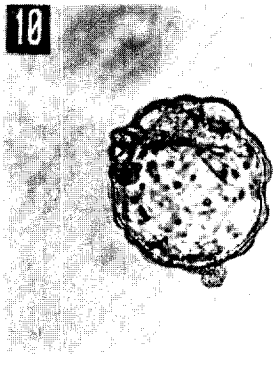

5

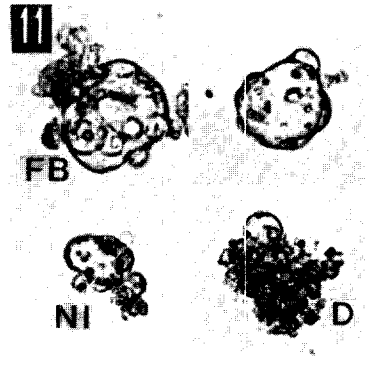

6

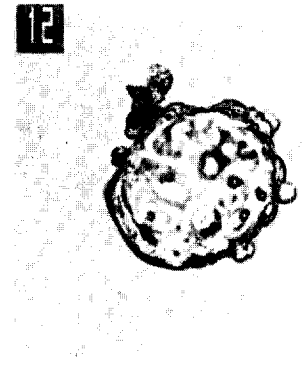

7


8


9


10


11
FB
NI
D


12

참 고 문 헌

1. Brinster RL, Chen HY, Trumbauer ME, et al. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:4438~4442.
2. Brinster RL, Chen HY, Trumbauer M, et al. Somatic expression of hepes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell* 1981;27:223~231.
3. Costantini F, Lacy E. Introduction of a rabbit β-globin gene into the mouse germ line. *Nature* 1981;294:92~94.
4. McGrath J, Solter D. Nuclear transplantation in mouse embryos. *J Exp Zool* 1983;228:355~362.
5. McGrath J, Solter D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science* 1983;220:1300~1302.
6. Nakamura K, Tsunoda Y. Chimaeras obtained by the nuclear transplantation technique in the mouse. *Jpn J Anim Reprod* 1987;33:82~87 (In Japanese).
7. Brem G, Tenhumberg H, Kruff B, et al. Production of cattle chimerae through embryo microsurgery. *Theriogenology* 1985;23:182 (Abst).
8. Avis J, Anderson GB. Viability of blastocysts produced by aggregation of two half-embryos in the mouse. *Theriogenology* 1988;29:505~512.
9. Nagashima H, Ogawa S. Studies on the developmental potential and the survival after the deep freezing of microsurgically dichotomized morula embryos in rats and rabbits. *Jpn J Anim Reprod* 1981;27:12~19 (In Japanese).
10. Lehn-Jensen H, Willadsen SM. Deep-freezing of cow 'half' and 'quarter' embryos. *Theriogenology* 1983;19:49~54.
11. Heyman Y. Factors affecting the survival of whole and half-embryos transferred in cattle. *Theriogenology* 1985;23:63~75.
12. 황우석. 결단마우스 이분배의 동결보존실험. 2. 동결보존후의 체외발육능 및 수태능에 관하여. 서울대수의대논문집 1986;11:179~185.
13. Tekeli T, Kweon OK, Kanagawa H. The viability of deep-frozen aggregated mouse embryos. *Jpn J Vet Res* 1987;35:283~286.
14. 신상태, 조충호. 동결보존한 마우스 집합배의 생존성과 chimera의 생산에 관한 연구. 대한수의학회지 1990;30:231~241.
15. Hetherington CM. Mouse husbandry. In: Monk M, ed. *Mammalian development: a practical approach.* Oxford: IRL press, 1987;1~12.
16. Tarkowski AK, Wroblewska J. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J Embryol exp Morph* 1967;18:155~180.
17. Rafferty KAJr. *Methods in experimental embryology of the mouse.* Baltimore and London: The Johns Hopkins Press, 1970;42~50.
18. Szell A, Shelton JN. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solutions on day-3 mouse embryos. *J Reprod Fert* 1987;80:309~316.
19. Szell A, Shelton JN. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. *J Reprod Fert* 1986;76:401~408.
20. Lehn-Jensen H. *Cryopreservation of bovine embryos: An evaluation of factors influencing the survival of day 6 ½~7 ½ embryos during freezing and thawing.* Copenhagen: A/S Carl Fr. Mortensen, 1986;17~149.
21. Leibo SP, Mazur P. Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. In: Daniel JCJr, ed. *Methods in mammalian reproduction.* New York: Academic press, 1978;179~201.
22. 황우석. 결단마우스 이분배의 동결보존실험. 1. 마우스 결단이분배의 체외발육능에 대하여. 한국임상수의학회지 1985;2:43~53.
23. Nagashima H, Matsui K, Sawasaki T, et al. Production of monozygotic mouse twins from microsurgically bisected morulae. *J Reprod Fert* 1984;70:357~362.