

전기자극법에 의한 생쥐 2세포기란의 분할구 융합에 관한 연구

강원대학교 축산대학

양부근 · 한상익 · 김정익

Blastomeres Fusion of 2-cell Mouse Embryos by Electric Stimulation

B.Y. Yang, S.I. Han and C.I. Kim

College of Animal Agriculture, Kangweon National University

= Abstract =

To find out the suitable method for blastomeres fusion of mouse 2-cell embryo using electric stimuli, these studies were carried out with various voltages (1.0KV, 1.2KV, 1.5KV, 1.7KV and 2.0KV), pulse duration times(50 μ sec, 75 μ sec, 100 μ sec) and different fusion solutions. In addition, the fused embryos were cultured for 72-80hr to observe their subsequent development.

These results were summarized as follows:

1. The proportion of the fused embryos were 50.8% (34/67), 60.7% (34/56), 70.6% (48/68), 66.7% (48/72) and 85.3% (58/68) after stimuli of 1.0KV, 1.2KV, 1.5KV, 1.7KV and 2.0KV for 100 μ sec with 2 times, and the electric stimulation at 2.0KV(85.3%) was the most effective voltage on the blastomere fusion.
2. For in vitro development, blastocysts of the fused embryos were cultured for 72-80hrs in M₁₆ medium. The group(52.1%) treated with 1.5KV for 100 μ sec with 2 times showed higher development rates than those any other group. However, these results were not corresponded to those of the rates of blastomere fusion.
3. There were no significant differences among the rates of blastomeres fusion to 50(70.6%), 75(71.9%), and 100(78.0%) μ sec stimulation at 1.5KV with two times. However, the development rates of the fused embryo in vitro were 52.1%(25/48), 28.3%(13/46) and 9.4%(3/32) at the above conditions, and the development rates of fused embryo increased as the pulse duration times increased.
4. The rates of the blastomeres fusion were 38.9%(28/72) or 70.6% (48/68) in electrolyte (PBS) or non-electrolyte(0.3M mannitol) solution. The development rates of the fused embryo were 32.1% (9/28) or 52.1%(25/48) in the above fusion solutions, and non-electrolyte-treated group showed higher development rates of embryo than that of electrolyte-treated group.

서 론

세포융합법은 세포공학, 유전공학 및 발생공학 등의 분야에서 많이 사용되고 있는 방법으로서, Monoclonal 항체의 제작이나, 새로운 특성을 갖는 잡종세포의 형성 및 핵산등의 생화학적 활성물질을 세포내에 도입하는데 대단히

유용한 방법으로 이용되어져 왔다.

최근 포유동물에서 세포융합법은 전핵이식의 핵융합에 의한 개체의 작출, 단위발생, 난핵과 난세포질의 융합, 동일 유전형질을 갖는 개체의 생산(clone) 및 다배체 개체(polyploidy)의 생산 등에 활용이 시도되고 있다.

이와같은 기술등의 개발되어지면 세포발생의 조절기능과 자연상태에서 다배체 개체발생기작

을 규명할 수 있으며 또한 가축육종개량에 획기적인 변화와 생산성 향상에 크게 기여할 것으로 생각된다.

자연상태에서 발생하는 同型接合性 二倍體 (Homogygous diploid)인 四倍體個體(Tetraploid)는 제 2극체를 방출하지 않는 난자 또는 二卵核 卵子(digynic ovum)에 정상적인 2개의 반수체 정자, 혹은 2배체 염색체를 가진 정자가 수정되어 발생하는 것으로 추측되는데 자연상태에서 발생빈도가 극히 저조하며(Beatty & Fischberg, 1952; Baranov, 1976), 발생초기에 사멸된다(Dyban & Baranov, 1987).

세포융합기술을 이용한 四倍體個體의 생산방법은 불활성화된 sendai virus를 이용한 분할구의 융합(McGrath and Solter, 1983), Cytochalasin B 처리(Snow, 1973; Tarkowski et al., 1977), Polyethylene glycol (PEG) 처리에 의한 분할구의 융합(Spindle, 1981; 양, 1990) 및 전기 자극에 의한 전기융합법(Kubiak and Tarkowski, 1985; Ozil and Modlinski, 1986) 등이 있다.

불활성화된 Sendai virus를 이용한 방법과 cytochalasin B 처리에 의한 방법은 특별한 주의가 필요하고, 세포에 유해한 영향을 미쳐 세포 생존성이 낮고, 융합율이 낮은 결점을 가지고 있다. PEG 처리에 의한 분할구 융합법은 PEG는 여러 항산화제나 그 불순물이 포함되어 있고 이것이 세포독성을 나타내는데, 이러한 PEG 용액에 수정란을 오랫동안 노출시켜 융합란에 유해한 영향을 미치는 것으로 생각된다.

이러한 결점을 극복하는 방법으로서 실험실 내에서 간편하게 분할구 융합에 의한 四倍體個體의 생산법으로서 전기자극에 의한 전기 융합법이 이용되고 있다. 전기융합법은 1981년 Zimmerman 등에 의해서 확립되어 주로 식물세포의 protoplast 융합에 이용되어져 왔다. 그 후 식물세포에 의한 전기 세포융합법의 유용성이 대두되어 포유동물의 수정란에 응용이 시험되었다. 전기자극에 의한 분할구 융합법은 지금까지의 방법에 비하여 조작의 간편, 수정란의 안정성 및 높은 융합율과 생존성을 기대할 수 있다.

본 실험은 포유동물 수정란의 4배체 개체 발생의 가능성을 검토하기 위하여, 생쥐 2세포기 수정란을 이용하여 전기강도, 통전시간 및 수정란의 융합액이 분할구의 융합을 및 융합란의 체외배양율에 미치는 영향을 검토하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물과 공시 수정란

본 실험에 사용된 공시동물로서는 생후 5-8 주령의 체중이 25-30g인 ICR 계통의 생쥐가 사용되었다. 과배란 유기를 위하여 자성 생쥐에 PMSG 5IU를 1회 복강내 주사하고, 48시간 후에 HCG 5IU를 복강내 주사한다. HCG 주사와 동시에 음성 생쥐와 1:1로 합사하여 교미시킨후, 40-44시간에 생쥐를 경추탈골법으로 도살하여 난관을 분리 절단하여, 2-세포기의 수정란을 회수, 실체 현미경하에서 발육상태를 검사한뒤 형태적으로 정상적인 수정란만을 실험에 공시하였다.

2. 전기자극에 의한 분할구 융합

1) 전압의 강도에 따른 분할구 융합

교미후 40-44시간에 외과적 방법으로 회수한 2-세포기 생쥐 수정란을 전압, 통전시간 및 배양액에 따라 Zimmerman 전기 세포융합장치에 의하여 분할구를 융합하여 四倍體 個體를 작출하였다.

실체현미경에 Cell fusion chamber (200mm H X 20mm L X 200mm W)를 올려놓고 양전극간에 비전해질 용액인 0.3M Mannitol 용액과 2-세포기 수정란을 옮긴후, 수정란의 분할구가 수직이 되도록 조정(그림 1)하여 1.0KV, 1.2KV, 1.5KV, 1.7KV 및 2.0KV의 전압을 100 μ sec 동안 2회 통전하여 분할구 융합을 유도하였다. 전기자극을 실시한 수정란을 신선한 M16 배양액으로 5-6회 이상 세척하여 CO₂ 배양기(CO₂ 95% Air 37°C)에서 1-2시간 배양시키면서 분할구의 융합유무(그림 2)를 확인하였다. 분할구 융합란과 비분할구 융합란으로 구분된 수정란을 BSA가 첨가된 신선한 M₁₆ 배양액 내로 옮겨 일정시간 체외배양하였다.

2) 통전시간에 따른 분할구 융합

통전시간에 따른 분할구 융합율을 조사하기 위하여 일정한 전압조건(1.5KV)에서 통전시간을 50 μ sec, 75 μ sec 및 100 μ sec 동안 2회 통전시킨후, 상기방법과 같이 수정란을 처리하여 분할구의 융합유무를 검사하여 체외배양에 공용하였다.

3) 배양액에 따른 분할구 융합

배양액에 따른 분할구 융합율을 조사하기 위하여 전해질 용액인 PBS 배양액과 비전해질

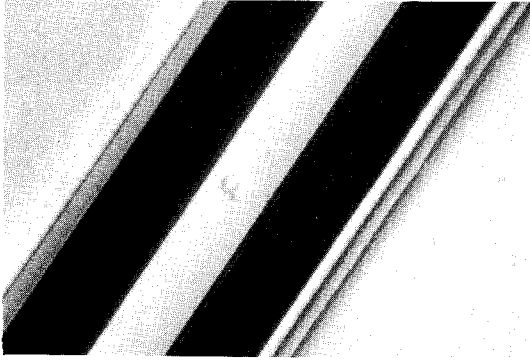


Fig. 1. Two-cell mouse embryo between electrodes.

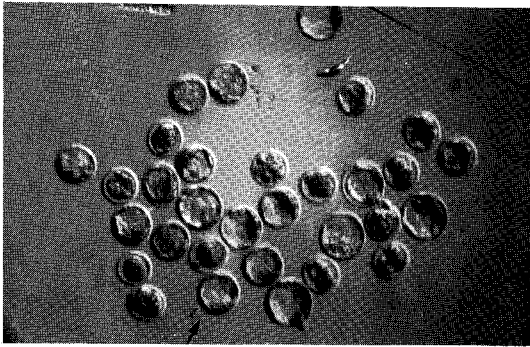


Fig. 3. Blastocysts(arrow) developed from fused embryos by electric stimulation.

용액인 0.3M Mannitol 용액을 Cell fusion chamber에 채운후 1.5KV의 전압을 100 μ sec 동안 2회 통전시켜 분할구의 융합율과 체외배양 성적을 조사하였다.

3. 융합후 4배체난의 체외배양

전압(1.0KV, 1.2KV, 1.5KV, 2.0KV), 통전시간(50 μ sec, 75 μ sec, 100 μ sec) 및 배양액(0.3M mannitol, PBS)등의 조건에 따라 2-세포기 수정란의 분할구가 융합된 융합란을 BSA가 첨가된 M₁₆ 배양액을 조직배양용 petri dish의 저면에 부착, 멸균된 paraffin-oil로 피복하여 소적배양액을 만들고 5% CO₂와 37 $^{\circ}$ C의 배양조건으로 2시간 이상 평형시킨 배양액내로 옮겨 3-4일간 배양하여 배반포까지의 발육상을 조사하였다(그림 3).

결과 및 고찰

1. 전압 강도에 따른 생쥐 2-세포기만의 분할구 융합과 융합란의 체외발육

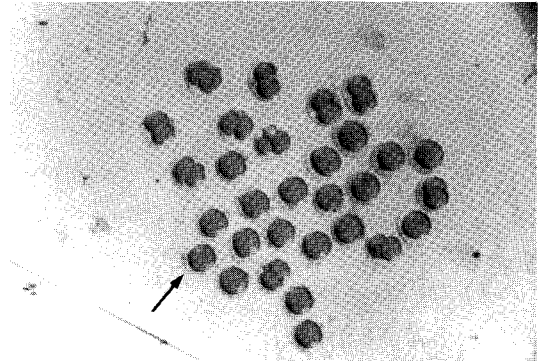


Fig. 2. Complete fusion embryos (arrow) at 1/2-1hr after electrofusion of 2 cell mouse embryos.

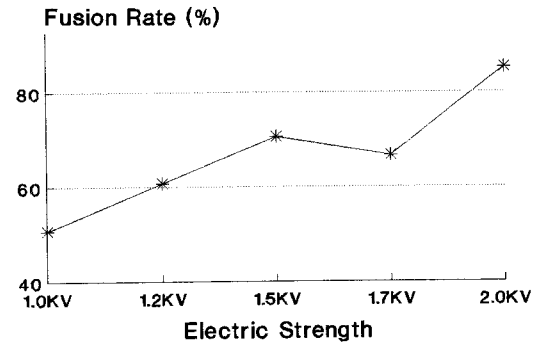


Fig. 4. Influence of the electric strength on the blastomere fusion rate in two-cell mouse embryos.

전압강도가 생쥐 2-세포기의 분할구 융합율 및 융합된 융합란이 체외에서 배반포기까지 발육된 체외발육율은 그림 4와 표 1의 성적을 얻었다.

전압강도를 1.0KV, 1.2KV, 1.5KV, 1.7KV 및 2.0KV의 전압을 100 μ sec 동안 2회 통전하여 30분-1시간 후에 분할구가 융합된 분할구의 융합율은 각각 50.8% (34/67), 60.7% (34/56), 70.6% (48/68), 66.7% (48/72) 및 85.3% (58/68)로서 2.0KV 전압을 통전시킨구가 85.3%로서 여타구의 성적보다 우수하였으며, 전압의 강도를 증가시킴에 따라 분할구의 융합율이 증가되는 경향을 보였다. 분할구가 융합된 분할구 융합란을 체외에서 72-80시간 배양하여 배반포까지 발육된 체외 발육성적은 1.0KV, 1.2KV, 1.5KV, 1.7KV 및 2.0KV에서 각각 11.8% (4/34), 23.5% (8/34), 52.1% (25/48), 37.5% (18/48) 및 10.3% (6/58)로서 1.5KV의 전압을 통전시킨구가 52.1%로서 가장 우수하여 분할구 융합율과 다른 경향을 보였다.

이와같은 성적은 Kato등(1987)이 생쥐 2-세

Table 1. The effect of the electric stimulus on the fusion of blastomeres and development of fused embryos to blastocyst in vitro

| Voltage | Duration of pulse (μ sec) | No. of fused embryos/ No. of embryo used (%) | No. of embryos developed to blastocyst (%) |
|---------|--------------------------------|---|--|
| 1.0 KV | 100 X 2 | 34/67 (50.8) | 4/34(11.8) |
| 1.2 KV | 100 X 2 | 34/56 (60.7) | 8/34(23.5) |
| 1.5 KV | 100 X 2 | 48/68 (70.6) | 25/48(52.1) |
| 1.7 KV | 100 X 2 | 48/72 (66.7) | 18/48(37.5) |
| 2.0 KV | 100 X 2 | 58/68 (85.3) | 6/58(10.3) |

Table 2. The effect of pulses duration time of the fusion of blastomeres and the development of fused embryos to blastocysts in vitro

| Voltage | Duration of pulse (μ sec) | No. of fused embryos/ No. of embryo used (%) | No. of embryos developed to blastocyst (%) |
|---------|--------------------------------|---|--|
| 1.5KV | 50 X 2 | 32/41 (78.0) | 3/32(9.4) |
| | 50 X 2 | 46/64 (71.9) | 13/46(28.3) |
| | 100 X 2 | 48/68 (70.6) | 25/48(52.1) |

포기 수정란을 1.0KV, 1.5KV, 2.0KV의 전압을 100 μ sec 동안 2회 통전시켜 얻은 분할구 융합 성적은 39%(11/28), 89%(16/18) 및 70%(14/20)였으며, 체외 발육율은 각각 91%(10/11), 25%(4/16) 및 21%(3/14)로서 분할구 융합율은 1.5KV의 구(89%)가, 체외발육 성적은 1.0KV구(91%)가 우수하여 본 실험의 결과와는 다른 경향을 나타냈다.

한편 弘忠등(1989)은 1.0KV, 1.1KV 및 1.2KV의 전압을 100 μ sec동안 2회 통전시켜 분할구 융합율은 30%, 75%, 70%의 성적을 얻어 본 실험 결과와 비슷한 경향을 나타냈다.

본 실험의 결과로 볼때 생쥐 2-세포기 수정란의 분할구 융합과 융합란의 체외 발육율에는 1.5KV의 전압을 100 μ sec 동안 2회 통전시키는 것이 가장 좋은 것으로 생각된다.

2. 통전시간에 따른 생쥐 2-세포기의 분할구 융합 및 융합란의 체외 발육

일정한 전압조건하에서 통전시간이 생쥐 2-세포기 수정란의 분할구 융합율과 융합란의 체외발육성적을 조사하기 위하여 1.5KV의 전압을 50 μ sec, 75 μ sec 및 100 μ sec 동안 2회 통전후에 얻은 분할구 융합율과 융합란의 체외발육율은 표 2와 같다.

표 2에서 나타난 바와같이 1.5KV의 전압조건에서 50 μ sec를 2회 통전시킨구는 41개의 수정란중 32개가 융합되어 78.0%의 분할구 융합

성적을 얻었고, 융합된 32개의 수정란중 3개가 배반포까지 발육되어 9.4%의 낮은 체외발육 성적을 얻었다. 동일조건에서 통전시간이 75 μ sec구는 분할구 융합율 71.9%(46/64)와 체외 발육율은 28.3%(13/46)를 얻어 분할구 융합율과 체외발육율이 다소 회복되었으며 100 μ sec구에서는 68개의 수정란중 48개가 융합되어 70.6%의 융합율과 48개의 융합란중 25개가 배반포까지 발육되어 52.1%로서 가장 우수한 성적을 보였다.

이와같은 성적은 Kato등(1987)이 통전시간(100 μ sec, 150 μ sec, 200 μ sec)이 2-세포기 생쥐 수정란의 분할구 융합율(89%, 89%, 100%)과 체외발육율(25%, 45%, 27%)에 커다란 영향을 미치지 않는다고 보고한 결과와 다소 다른 경향을 나타냈다.

본 실험의 결과로만 볼때 1.5KV의 전압조건에서는 통전시간이 100 μ sec동안 2회 시키는 것이 가장 바람직한 것으로 나타났다.

3. 분할구 융합액에 따른 생쥐 2-세포기난의 분할구 융합율과 체외 배양율

분할구 융합액에 따른 분할구의 융합 성적을 조사하기 위하여 1.5KV의 전압을 100 μ sec동안 2회 통전시킨 조건에서 비전해질 용액인 0.3M Mannitol과 전해질 용액인 D-PBS를 이용하여 전기융합을 실시하여 얻은 성적은 표 3과 같다.

0.3M Mannitol과 D-PBS를 사용했을 경우의

Table 3. The effect of non-electrolyte and electrolyte solution on the fusion of blastomeres and the development of fused embryos to blastocyst

| Media | Voltage (KV/cm) | Duration of Pulse (μ sec) | No. of fused embryos/ No. of embryo used (%) | No. of embryos developed to blastocyst (%) |
|---------------|-----------------|--------------------------------|---|--|
| 0.3M mannitol | 1.5 | 100 X 2 | 48/68 (70.6) | 25/48(52.1) |
| D-PBS | 1.5 | 100 X 2 | 28/72 (38.9) | 9/28(32.1) |

분할구의 융합율은 각각 70.6% (48/68), 38.9% (28/72)로서 비전해질 용액인 0.3M mannitol에서 분할구 융합율이 우수한 경향을 보였으며 분할구 융합란의 체외 발육율은 0.3M mannitol 처리구가 25.1% (25/48)로서 PBS 처리구의 32.1% (9/28)보다 우수하게 나타났다.

이와같은 결과는 Kato와 Tsunoda(1987)가 0.3M mannitol과 PBS를 이용한 실험에서 융합율 48% (13/27)와 39% (11/28)의 성적과 체외 발육율은 69% (9/13)와 31% (10/11)의 성적을 얻어 융합율에 대한 성적은 본 실험과 같은 경향을 나타냈으나, 체외배양성적은 다른 경향을 보였다.

한편 Kubiak등(1985)은 동일조건에서 0.3M mannitol과 PBS를 이용한 실험에서 분할구 융합율 57% (45/79)와 77% (37/38)의 성적을 얻어 본 실험과는 상이한 경향을 나타냈다.

이상의 실험결과를 요약해 보면, 본 실험의 결과로만 볼때 생쥐 2세포기란의 분할구 융합과 융합란의 체외발육율에는 분할구 융합액으로는 0.3M mannitol과 1.5KV의 전압강도로 100 μ sec동안 2회 통전시키는 것이 가장 좋은 것으로 사료된다.

결 론

전압(1.0KV, 1.2KV, 1.5KV, 1.7KV, 2.0KV), 통전시간(50 μ sec, 75 μ sec, 100 μ sec) 및 수정란 융합액이 생쥐 2-세포기란의 분할구 융합에 미치는 영향과 분할구 융합란을 체외에서 일정시간 배양한 후 체외발육율의 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 1.0KV, 1.2KV, 1.5KV, 1.7KV 및 2.0KV의 전압을 100 μ sec동안 2회 통전한 후 얻은 분할구의 융합율은 각각 50.8% (34/67), 60.7% (34/56), 70.6% (48/68), 66.7% (48/72) 및 85.3% (58/68)로서 2.0KV의 경우가 85.3%로서 여타구의 성적보다 우수하였다.

2. 분할구 융합란을 체외에서 72-80시간 배

양하여 배반포까지 발육된 체외 발육율은 1.5KV의 전압을 100 μ sec동안 2회 통전시킨구가 52.1% (25/48)로서 가장 우수하여 분할구 융합율과는 다른 경향을 보였다.

3. 1.5KV의 전압을 50 μ sec, 75 μ sec 및 100 μ sec를 2회 통전한 후 분할구 융합율은 78.0%, 71.9% 및 70.6%로서 큰 차이는 인정되지 않았으나, 분할구 융합란의 체외발육 성적은 52.1% (25/48), 28.3% (13/46) 및 9.4% (3/32)로서 통전시간이 길어 질수록 체외발육성적이 좋은 것으로 나타났다.

4. 수정란 융합액에서 전해질 용액(PBS)과 비전해질 용액(0.3M mannitol)을 사용한 분할구 융합율은 각각 38.9% (28/72)와 70.6% (48/68)였으며, 분할구 융합란의 체외발육성적은 32.1% (9/29)와 52.1% (25/48)로서 비전해질 용액을 사용한 구가 전해질용액을 사용한구보다 우수한 성적을 나타냈다.

인 용 문 헌

- Baranov VS: Spontaneous polyploidy in laboratory mice an embryological and cytological analysis. *Ontogenez* 1976, 7, 229-238.
- Beatty RA, Fischberg M: Hetroploidy in mammals III. Induction of tetraploidy in preimplantation mouse eggs. *J Genet* 1952, 50, 471-475.
- Kato Y, Tsunoda Y: Blastomere fusion of mouse 2-cell embryos by electric stimulus. *JPn J Anim Reprod* 1987, 33, 19-26.
- Kubiak JE, Tarkowski AK: Electro fusion of mouse blastomeres. *Exp Cell Res* 1985, 157, 561-566.
- McGrath J, Solter D: Nucler transplantation in the mouse embryo by micromanipulation and cell fusion. *Science* 1982, 320, 1300-1302.
- Ozil JP, Modlinski JA: Effect of electric field on fusion rate and survival of 2-cell rabbit embryo. *J Embryo Exp Morph* 1986, 96, 211-228.

- Snow MHL: Tetraploid mouse embryos produced by cytochalasin B during cleavage. *Nature* 1973, 244, 513-514.
- Spindle A: Polyethylene glycol-induced fusion of two-cell mouse blastomeres. *Exp Cell Res* 1981, 131, 465-470.
- Tarkowski A, Witkowska K, Opas J: Development of cytochalasin B-induced tetraploid and diploid/tetraploid mosaic mouse embryos. *J. Embryol Exp Morph* 1977, 41, 47-64.
- Zimmerman U, Scheurich P: High frequency fusion of plant protoplasts by electric field. *Planta* 1981, 151, 26.
- 辻井弘忠, 寺札下浩一: ヌウス 2細胞期胚の電氣的融合について, 日本受精着床學會雜誌 1989, 6, 48-51.
- 양부근: Polyethylene glycol 처리에 의한 생쥐 2細胞期胚의 分割球融合에 관한 研究. 韓國家畜繁殖學會誌 1990, 14, 133-140.
-