

## 생쥐胚의 核置換에 關한 研究

### III. 核置換 생쥐의 生産

朴容奭 · 鄭炳敏 · 朴世必 · 李相鎭 · 鄭柄鉉 · 鄭吉生

建國大學校 畜産大學

## Studies on Nuclear Transplantation in Mouse Embryos

### III. Production of Nuclear Transplanted Mice

Park, Y.S., H.M. Chung, S.P. Park, S.J. Lee, B.H. Chung and K.S. Chung

College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

#### SUMMARY

These experiments were carried out to develop the technique of nuclear transplantation necessary for elevating utilization efficiency of high quality embryos and the production of clone animals.

Embryos of pronucleus stages were obtained from ICR mice. Removal of pronuclei and their transfer to recipient embryos were carried out by micromanipulation and virus mediation.

The results obtained in these experiments were summarized as follows ;

1. Total 337 pairs of pronuclear stage embryos were subjected to nuclear transplantation and 247 pairs(73.3%) of them were successfully transplanted and the number of fused embryos between transplanted nucleus and cytoplasm was 188 pairs(55.8%).
2. Of the 188 fused embryos cultured *in vitro*, 174(92.4%), 131(69.7%) and 117(62.2%) embryos were developed to 2-cell, morula and blastocyst stages, respectively.
3. When total 104 nuclear transplanted embryos were transferred to uteri of recipient mice on day 2-3 of pseudopregnancy, 4 of 12 recipient mice were pregnant and the number of embryos developed to young was 28(26.9%).

Key words : Pronuclear transplantation, Clone animal, Micromanipulation, Virus mediation, Nuclear transplanted mouse

#### I. 緒 論

McGrath 와 Solter(1983)가 前核期の 생쥐卵子를 使用하여 微細操作技法과 virus 誘起融合法을 利用,

核置換胚의 *in vitro* 發生과 産子の 生産에 成功한 以來, 類似的한 研究들이 活潑하게 遂行되어 왔다 (Surani 等, 1984 ; Tsunoda 等, 1985 ; Robl 等, 1986). 그 結果, 核을 보다 容易하게 置換할 수 있

註) 本 研究는 韓國科學財團의 支援에 의하여 遂行되었음.

는 微細操作技法(Tsunoda 等, 1986)과 核과 細胞質 間의 效率的인 融合法(Robl 等, 1987; Prather 等, 1987)이 開發되어 實驗小動物은 물론이요, 中小家畜 및 大家畜에서까지도 核置換動物을 生産하게 되었다(Willadsen, 1986; Prather, 1987). 그리고 이러한 微細操作技法에 依한 核置換胚의 *in vitro* 培養은 發生段階가 同一하거나 또는 相異한 核과 細胞質 間의 相互作用 및 核의 全能性등에 관한 研究의 進展을 可能하게 하였다(McGrath와 Solter, 1983; Surani 等, 1984; Barnes 等, 1987).

한편, 國內의 경우, 이 分野에 관한 研究는 아직 도 이렇다할 研究成果를 얻지 못하고 있으며, 鄭 等(1988)과 李 等(1989)의 斷片的인 研究結果가 報告되어 있을 뿐이다.

이에 本 研究에서는 前報(鄭 等, 1988)에 이어, 前核期の 생쥐 受精卵를 供試하여 核置換胚를 作成하고, 이를 *in vitro*에서 發生시킨 다음 그것을 recipient 생쥐의 子宮에 移植하여, 産子를 生産하는데 成功하였으므로 그 結果를 報告한다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 供試材料

#### 1) 供試動物

供試動物로는 ICR 系統의 생쥐를 使用하였는데, 雌性은 4~6 週齡으로 體重은 15~20 g 이었으며, 雄性은 10~12 週齡으로 體重은 25~35 g 이었다. 飼養管理時의 日照時間은 14 時間으로 調節하였으며 固型飼料과 물은 無制限 給與하였다.

#### 2) 培養液

卵子的 回收, 微細操作 및 胚의 *in vitro* 培養을 위한 基礎培養液으로는 Whitten(1969) 培養液을 使用하였다.

卵자의 回收를 위해서는 上記 培養液에 BSA 대신 3%의 PVP(Polyvinylpyrrolidone; Sigma, U.S.A.)를 添加한 것이었으며, 微細操作用 培養液은 基礎培養液에 HEPES(N-2-Hydroxy Ethyl Piperazine-N-2-Ethane Sulfonic acid; Gibco, U.S.A.) 25 mM, Cytochalasin B(Sigma, U.S.A.) 7.5  $\mu$ g/ml 와 Colcemid(Gibco, U.S.A.) 0.1  $\mu$ g/ml 및 3%의 PVP를 添加한 것이었다. 또한 100  $\mu$ M의 EDTA(Ethylenediaminetetraacetic

acid, 2-Na-Salt; Junsei Chemical Co, Japan)와 3%의 PVP를 基礎培養液에 添加한 것을 核置換胚의 *in vitro* 培養에 使用하였다.

이들 培養液의 pH는 7.2~7.4로, 滲透壓은 280~290 mOsm로 調整하였으며 使用直前に 0.45  $\mu$ m millipore filter로 濾過하여 除菌한 다음 4°C에서 保管하면서 使用하였다.

#### 3) 微細操作用 pipette

受精卵의 保定(holding), 核의 除去(enucleation) 및 置換(transplantation)에 使用한 micropipette은 microelectrode puller(Narishige Co., Japan), microforge(Narishige Co., Japan) 및 microgrinder(Narishige Co., Japan) 등을 使用하여 自家製作하였다.

이때, pipette에 붙어있는 glass plaque와 異物質은 15% HF溶液에 수초간 浸漬한 후 蒸溜水로 反復하여 洗滌함으로써 除去하였고, 洗滌한 pipette은 核과 細胞質이 glass內側に 附着되는 것을 防止하기 위하여, NP-40으로 處理한 다음 使用하였다. 이렇게 하여 製作된 卵子保定用 pipette의 外徑은 80~100  $\mu$ m 이었고 內徑은 25~30  $\mu$ m 였으며, 核除去 및 核置換用 pipette의 內徑은 10~15  $\mu$ m 였다.

#### 4) Sendai Virus의 不活性化

注入된 核과 細胞質間의 融合效率을 높이기 위하여 Sendai Virus 浮遊液을 使用하였다. 이때 virus 浮遊液과 0.1%의  $\beta$ -propiolactone(Sigma, U.S.A.)을 9:1로 混合한 다음 4°C에서 24 時間 培養하고 37°C water bath에서 20 分間 攪拌함으로써 virus를 不活性化시켰다.

이렇게 不活性化된 Sendai Virus 浮遊液은 100  $\mu$ l 씩 分注하여 -70°C에서 保存하면서 使用하였다.

#### 5) 受精卵의 準備

雌性생쥐에게 5 I.U.의 PMSG(Pregnant Mare's Serum Gonadotropin; Invert, Holland)와 hCG(Human Chorionic Gonadotropin; Invert, Holland)를 48 時間 間隔으로 腹腔內에 注射한 다음, 雄性생쥐와 合舍하여 交尾를 誘導하였다. 翌日 아침 腹腔腔이 確認된 個體만을 골라 hCG 注射後 18 時間에 屠殺하여 卵管에서 卵丘細胞에 둘러싸인 前核期の 受精卵를 回收하였다. 回收된 前核期の 受精卵은, 微細操作을 容易하게 하기 위하여, 0.1% hyaluronidase(Sigma, U.S.A.)溶液으로 5~10 分間 處理하여 卵丘細胞를 除去한 後, 新鮮한 培養液

으로 3회 洗滌하여 微細操作用 培養液 小滴(400 $\mu$ l)으로 옮겼다.

## 2. 試驗方法

### 1) 核置換

微細操作을 實施하기에 앞서, 受精卵을 微細操作用 培養液 小滴(400 $\mu$ l)에서 1時間동안 前培養하였다. 保定用 pipette 으로 前核期의 受精卵을 保定한後, 核除去用 pipette 으로 細胞質內의 雌雄前核을 吸引한 다음, 이 pipette 을 不活性化된 virus 浮遊液 小滴으로 옮겨, 먼저 吸引한 前核 등과 同量의 virus 浮遊液을 吸引하였다. 이어 미리 準備한 雌雄前核이 除去된 核注入用 受精卵의 圍卵腔內에 核과 virus 浮遊液을 함께 注入함으로써 核置換을 實施하였다.

### 2) 核置換胚의 *in vitro* 培養과 移植

核이 置換된 卵子是 新鮮한 培養液으로 3회 洗滌한 다음, 100 $\mu$ M EDTA 가 添加된 Whitten 培養液 小滴(20~30 $\mu$ l)으로 옮겨 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 95% 空氣條件의 培養器內에서 培養하면서 注入된 核의 細胞質과의 融合與否와 融合後의 發達狀態를 調査하였다. 雌性생쥐의 膣粘液을 檢査하여 發情期에 到達한 雌性생쥐를 選定, 精管을 結紮한 雄性생쥐와 1:1로 合榿시켜 偽妊娠을 誘導하였다. 偽妊娠을 誘導한 翌日 아침 膣腔이 確認된 個體만을 選擇(偽妊娠 1日)하여 그로부터 2~3日째에 0.03~0.04 mg/g의 Sodium pentobarbital(Abbot Lab., U. S. A.)을 腹腔內에 注射하여 受卵생쥐를 痲醉시킨後, 腰椎上의 皮膚를 橫으로 1cm 정도 切開하여 子宮角을 露出시킨 다음, 正常的으로 後期桑實胚나 初期胚盤胞 段階까지 發達한 核置換胚를 5~8個씩 양쪽 子宮에 移植하였다.

## III. 結果 및 考察

### 1. 核置換 成績

Virus 誘起融合法과 微細操作技法으로 同系統 생쥐 受精卵 相互間의 核置換을 實施한 結果는 Table 1에서 보는 바와 같았다.

Table 1에서 보는 바와 같이 供試한 總 337個의 受精卵 중 247個에서 成功的으로 核이 置換되어 置換率은 63.2~81.7% 로써 平均 73.3% 였다. 이러한 結果는 McGrath와 Solter(1983)의 96% 보다는

低調한 成績이었으나 鄭 等(1988)의 成績과는 대체로 一致하는 것이었다.

Table 1. Results of nuclear transplantation between pronuclear stage embryos of ICR mouse

Exp. No.	No. of embryos operated	No. of embryos nuclear trans-planted(%)	No. of embryos nuclei fused (%)
I	54	38(70.4)	28(51.9)
II	57	36(63.2)	28(49.1)
III	53	38(73.1)	31(58.5)
IV	60	49(81.7)	34(56.7)
V	58	45(77.6)	35(60.3)
VI	55	41(74.6)	32(58.2)
Total or Mean	337	247(73.3)	188(55.8)

한편, 置換된 核과 受精卵의 細胞質과의 融合與否를 觀察하기 위하여 核置換 受精卵을 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 95% 空氣條件의 培養器內에서 10時間동안 培養한 結果, 置換된 核과 細胞質間에 融合이 일어난 受精卵은 49.1~60.3% 로서 平均 55.8% 였다. 이의 같은 成績은 McGrath와 Solter(1983)의 99%, Tsunoda 等(1986)의 94% 및 李 等(1989)의 90.8% 보다는 상당히 低調한 것이었는데 그것은 微細操作時에 發生하는 細胞質의 損傷이 主된 原因이라고 생각되나, 供試한 생쥐의 系統이 다른데에도 그 原因의 一端이 있을 것으로 思料된다.

### 2. 核置換 受精卵의 *in vitro* 發達

注入된 核과 細胞質間의 融合이 이루어진 受精卵을 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 95% 空氣條件의 培養器內에서 培養하면서 그 發達狀態를 24時間 間隔으로 觀察한 結果를 Table 2에 提示하였다.

즉, 置換된 核이 細胞質과 融合된 188個의 受精卵을 培養한 結果, 174個가 2-細胞期까지 發達하여 平均 92.6% 의 높은 發生率을 보였다. 그러나 桑實胚 및 胚盤胞段階에까지 發達한 比率은 平均 69.7% 와 62.2% 로 對照區에 비해 有意差가 認定되었다(P < 0.05).

그러나, 實驗回收가 反復될수록 桑實胚와 胚盤胞

Table 2. *In vitro* development of nuclear transplanted ICR mouse embryos

Exp. No.	No. of embryos nuclei fused	<i>In vitro</i> development(%)		
		2-cell	Morula	Blastocyst
Control*	60*	60(100)	58(96.7)	58(96.7)
I	28	23(82.1)	10(35.7)	9(32.1)
II	28	27(96.4)	18(64.3)	15(53.6)
III	31	28(90.3)	19(61.3)	17(54.8)
IV	34	31(91.2)	27(79.4)	25(73.5)
V	35	34(97.1)	31(88.6)	25(71.4)
VI	32	31(96.9)	26(81.3)	26(81.3)
Total or Mean	188	174(92.6)	131(69.7)*	117(62.2)*

\* P<0.05

Control : Intact 1-cell stage embryos

로 發達하는 比率은 向上되었는데, 이는 微細操作技術의 熟練으로, 胚에 대한 損傷을 점차 줄일 수 있었기 때문인 것으로 생각된다.

### 3. 核置換 생쥐의 生産

核置換 後 *in vitro* 培養에 의해 正常的인 後期桑實胚 및 初期胚盤胞段階까지 發達한 核置換胚를 偽妊娠 3日째의 생쥐 子宮에 移植하여 Table 3에 提示한 바와 같은 結果를 얻었다.

Table 3. Production of nuclear transplanted mice following transfer of nuclear transplanted embryos

Subject	No. of embryos transferred	No. of recipient	No. of pregnant	No. of offsprings (%)
Control**	144	32	14	48(33.3)
Nuclear-transplanted embryos	104	12	4	28(26.9)*

\* P<0.05

\*\* Control : Intact blastocyst

Table 3에서 보는 바와 같이 後期桑實胚 및 初期胚盤胞段階에까지 發達한 核置換胚 104 個를 12首의 偽妊娠 受卵 생쥐의 子宮內에 各各 5~10 個씩 移植하였던바 그 중 4 首가 妊娠하여 28 首의 産子를 生産하여 平均 産子生産率은 26.9% 였다. 이는

Tsunoda 等(1986)의 結果와 對等한 成績이었다.

한편, 對照區의 경우 144 個의 胚盤胞를 32 首의 偽妊娠 생쥐에게 移植하였던바 14 首에서 48 首의 産子が 生産되어 平均 33.3%의 産子生産率을 보였다. 그 結果, 核置換胚의 産子生産率은 對照區의 그것에 비해 有意하게 낮았다(P<0.05).

## IV. 摘要

優秀한 遺傳子의 利用效率을 提高하는데에 有效하게 活用할 수 있는 核置換 技術을 開發할 目的으로, 微細操作技法과 virus 誘起融合法을 並用하여 前核期 생쥐 受精卵 相互間의 核置換을 實施하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 總 337 個의 受精卵 中 核이 置換된 것은 297 個로서 核置換率은 73.3% 였으며, 置換된 核과 細胞質間에 融合이 이루어진 것은 188 個로서 融合率은 55.8% 였다.

2. 核과 細胞質間에 融合이 이루어진 188 個의 受精卵을 *in vitro* 에서 培養한 結果, 2-細胞, 桑實胚 및 胚盤胞段階에까지 發達한 것은 各各 174(92.6%), 131(69.7%) 및 117(62.2%) 였다.

3. 核置換 後, 桑實胚 및 胚盤胞段階에까지 發達한 104 個의 受精卵을 偽妊娠 3日째의 생쥐의 子宮에 移植한 結果, 12 首의 受卵 생쥐 中 4 首에서 妊娠이 成立하였고 28 首의 産子が 生産되어 産子生産

率は 平均 26.9% 였다.

## V. 引用文獻

1. Barnes, F.L., J.M. Robl and N.L. First. 1987. Nuclear transplantation in mouse embryos; Assessment of nuclear function. Biol. Reprod. 36 : 1267-1274.
2. McGrath, J. and D. Solter. 1983. Nuclear transplantation in the mouse embryos. J. Exp. Zool. 228 : 355-362.
3. McGrath, J. and D. Solter. 1983. Nuclear transplantation in the mouse embryos by microsurgery and cell fusion. Science. 220 : 1300-1302.
4. McGrath, J. and D. Solter. 1984. Completion mouse embryogenesis required both maternal and paternal genomes. Cell. 37 : 179-183.
5. McGrath, J. and D. Solter. 1984. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development *in vitro*. Nature. 309 : 671-672.
6. McGrath, J. and D. Solter. 1986. Nucleocytoplasmic interactions in the mouse embryo. J. Embryol. Exp. Morph. 97(Suppl) : 277-289.
7. Prather, R.L., F.L. Barnes, M.M. Sins, J. M. Robl, W.H. Eyestone and N.L. First. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryos; Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. Biol. Reprod. 37 : 859-866.
8. Robl, J.M., R.L. Prather, W.H. Eyestone and N.L. First. 1986. Nuclear transplantation in mouse embryos; Assessment of recipient cell stage. Biol. Reprod. 34 : 733-739.
9. Surani, M.A.H., S.C. Barton and M.L. Norris. 1984. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. Nature. 308 : 548-550.
10. Surani, M.A.H., S.C. Barton and M.L. Norris. 1986. Nuclear transplantation in the mouse; Heritable differences between parental genome after activation of embryonic genome. Cell. 45 : 127-136.
11. Tsunoda, Y., T. Yusui, K. Nakamura, T. Uchida and T. Sugie. 1985. Pronuclear transplantation in mouse. Jpn. J. Anim. Reprod. 31 : 130-134.
12. Tsunoda, Y., T. Yusui, K. Nakamura, T. Uchida and T. Sugie. 1986. Effect of cutting the zona pellucida on the pronuclear transplantation in the mouse. J. Exp. Zool. 240 : 119-125.
13. Tsunoda, Y., T. Yusui, Y. Shioda, K. Nakamura, T. Uchida and T. Sugie. 1987. Full-term development of mouse blastomere nuclei transplanted into enucleated two-cell embryos. J. Exp. Zool. 242 : 147-151.
14. Willadsen, S.M. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. Nature. 320 : 63-65.
15. 이철상, 박흥대, 정길생, 이경광. 1989. 핵치환 생쥐의 생산. 한축지. 31(2) : 69-74.
16. 정형민, 박용석, 정길생, 이경광. 1988. 생쥐배의 핵치환에 관한 연구. I. 핵치환 생쥐배의 시험관내 발달. 한축지. 30(8) : 452-456.