

생쥐 수정란의 분할조작후 생존성 향상에 관한 연구

이효종 · 박희성* · 김택석 · 최상용 · 박충생*

경상대학교 수의과대학 · 경상대학교 농과대학*

(1989. 1. 30 접수)

Study on improvement of viability of mouse embryos after bisection

Hyo-jong Lee, Hee-sung Park*, Taeg-seog Kim, Sang-yong Choe, Choong-saeng Park*

College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

College of Agriculture, Gyeongsang National University*

(Received Jan 30, 1989)

Abstract: Demi-embryos were successfully produced by bisection of ICR mouse embryos at preimplantation stages. They were microsurgically bisected using a microsurgical blade attached to a micromanipulator after pretreatment with 0.5% pronase in PBS for two minutes or not. Embryos with softened zona pellucida were more easily bisected and less damaged than intact embryos. The highest success rate in bisection has been achieved by selecting blastocysts (94.1% in success rate with intact blastocysts and 100% in success rate with zona softened blastocysts). Demi-embryos without zona pellucida were cultured in D-PBS or M-16 medium at 37°C, 5% CO₂ in air for 72 hours for 2-cell stage embryos, 48 hours for 4-to 8-cell stage embryos, 24 hours for morula stage embryos and 6~12 hours for blastocyst stage embryos. For the *in vitro* culture of 2-cell stage embryos, 100 μM 2Na-EDTA was added to the media. M-16 medium was better for the *in vitro* development of mouse embryos than PBS, and PBS is not considered to be suitable for long-term culture of embryos, especially at early stage of cleavage. In M-16 medium, developing rate of demi-embryos of which pair underwent development to form eu-blastocysts was 15.8% at 2-cell stage, 16.8% at 4-cell stage, 38% at 8-cell stage, 89.6% at morula stage and 94.4% at blastocyst stage, respectively.

The more rapid and efficient production of demi-embryos and higher viability after bisection can be expected by softening zona pellucida with pronase and by selecting morulae or blastocysts rather than embryos at early stage of cleavage.

Key words: embryo bisection, viability, mouse

서 론

수정란의 양분기술은 동물에서 일란성 쌍자의 생산, 품종의 개량, 번식효율의 증대, 유전적으로 동일한 동물을 이용한 특수연구 및 sex preselection을 통한 인위적 성의 지배 등에도 응용이 가능하다. 이러한 연유

로 하여 수정란의 미세조작 기술로 수정란을 분할하여 쌍태 혹은 다태를 유도하는 연구가 진행되어 오고 있다. 가축에서 최초의 수정란 양분은 1979년 Willadsen¹에 의하여 면양에서 성공하였으나 그 과정은 매우 복잡할뿐만 아니라 중간숙주와 정교한 미세조작기술을 필요로 한다. 한편 상실배기나 포배기에 있는 수정란

이 논문은 1988년도 문교부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

은 양분이 용이하고 중간속주나 투명대내의 재투입을 요구하지 않으므로 근년에는 소^{2,3}, 돼지⁴, 말⁵, 면양⁶ 및 산양⁷ 등에서 상실배기 혹은 포배기에 있는 수정란을 양분하여 이식함으로써 가족의 쌍자생산에 박차를 가하고 있으나, 그 성공율은 40%에 미치지 못하고 있어서 인공수정술에 의한 수태율이나 신선 수정란 이식에 의한 수태율에 비하면 아직도 매우 저조하여 양분 기술의 개발 및 수태율 향상을 위한 연구가 요구된다.

본 실험은 분할 수정란의 발달에 영향을 미칠 수 있는 몇가지 요인들, 즉, pronase의 처리, 미세조작기법의 개발, 수정란의 발달단계별 체외배양 능력 등을 조사하여 demi-embryo의 손상 방지 및 생존성을 개선시키고자 착수하였다.

재료 및 방법

공시동물: 공시동물은 ICR계 생쥐이었으며 암컷은 생후 8주령인 것을 실험에 공시하고 수컷은 생후 12주령 이상인 것을 실험에 공시하였다. 사육은 표준사료와 물을 자유로이 급식시키고 사육실 내의 온도는 22±2°C로 유지하고 빛은 1일 14시간(07:00~21:00) 허용하였다.

과배란의 유기 및 수정: 처리군의 과배란은 PMSG (SIGMA) 5 IU를 복강내에 주사하고 48시간 후 hCG (SIGMA) 5 IU를 복강내 주사하여 유기시킨 다음, 수컷 1마리에 암컷 1마리씩을 사육상자에 합사시켜 자연 교미시켰다. 다음 날오전에 vaginal plug를 검사함으로써 교미여부를 확인하고 확인된 날을 수정 제 1일로 정하였다.

수정란의 회수: 수정란은 수정 후 2-세포기, 4-세포기, 8-세포기, 상실배기 및 포배기 등 각 발생단계별로 아래 일정에 맞추어 Dulbecco's phosphate-buffered saline(D-PBS)으로 회수하였다(Table 1). 회수된 관류액은 5분간 정지 후 60배의 실체 현미경(stereozoom microscope, Nikon, Japan)하에서 검경 후 mouth-

operating pipette으로 수정란을 3~4회 세척하였다.

수정란의 분할 조작: 회수된 수정란의 일부는 아무런 처리도 하지 않은 intact한 상태로 그리고 다른 일부는 Nagashima et al⁸의 방법에 의하여 pronase(0.5%)를 2분간 처리하여 투명대를 연화시키고 배양액으로 3~4회 세척한 다음, 유동 paraffin으로 덮혀진 소립 배양액 내에 수정란을 주입하고 도립 현미경(inverted microscope, 200X, Olympus, Japan) 아래에 놓는다. micromanipulator(Goodfellow, England)에 장치된 holding pipette로 수정란을 고정시킨 다음 microsurgery blade로 미세조작하면서 수정란을 양분하였다.

분할 수정란의 인공배양 및 생존성 조사: 위의 조작으로 분할된 수정란은 D-PBS 혹은 M-16 배양액으로 37°C, 5% CO₂ incubator 내에서 expanded blastocyst까지 발달시켰다. 2-세포기에 있는 수정란은 위의 배양액에 100 μM의 2Na-EDTA(SIGMA)를 첨가한 다음 72시간 체외배양시켰고, 4-세포기 및 8-세포기에 있는 수정란은 48시간 체외배양시켰으며, 상실배기에 있는 수정란은 28시간 그리고 포배기에 있는 수정란은 6~12시간 체외배양시켰다. 분할 수정란의 발달 상태 및 이상유무는 Nagashima et al⁸의 판정기준에 준하여 실시하였다.

결 과

생쥐 수정란의 양분: 2-세포기에서 포배기까지의 생쥐 수정란을 intact한 상태 또는 pronase를 처리하여 투명대를 연화시킨 다음 microsurgery blade로 양분하여 demi-embryo를 생산한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같다. 수정란의 발달단계별로 보면 4-세포기의 수정란이 양분과정 중 가장 많은 손상(intact한 상태에서 49.4%)을 받았으며 포배기의 수정란이 양분과정 중 가장 적은 손상(intact한 상태에서 5.9%)을 받았다. 수정란의 분할은 intact한 상태에서 시행하였을 때보다 pronase를 처리하여 투명대를 연화시킨 다음 시행하였을 때 성공율이 더 높았으며 할구세포에 대한 손상도 적었다.

D-PBS와 M-16 배양액에서 생쥐 수정란의 체외 발달: 2-세포기에서 포배기까지에 있는 intact한 상태의 생쥐 수정란을 D-PBS와 M-16 배양액에서 72시간까지 체외배양하여 그 발달능력을 조사한 결과는 Table 3에 나타난 바와 같다. 2-세포기의 수정란은 D-PBS에서는 상실배나 포배로 전혀 발달하지 않고 모두 퇴행하였으나 M-16배양액에서는 154개의 수정란 중 13개(8.4%)는 상실배로 발달하였고, 60개(39%)는 포배로 발달하

Table 1. Time-schedule for embryo collection

Day	Time	Treatment	Embryo stage	Collection site
-2	5:00PM	FSH, 5 IU		
-0	5:00PM	hCG, 5 IU		
1				
2	10:00AM		2-cell	oviduct
	11:00PM		4-cell	oviduct
3	10:00AM		8-cell	oviduct
4	10:00AM		morula	uterine horn
	5:00PM		blastocyst	uterine horn

Table 2. Production of demi-embryos by bisection of mouse embryos at various stages of development

Stage of embryos	Intact ZP*			Softened ZP*		
	No of embryos	without damage(%)	with damage(%)	No of embryos	without damage(%)	with damage(%)
2-cell	302	218(72.2)	84(27.8)	204	191(93.6)	13(6.4)
4-cell	164	83(50.6)	81(49.4)	186	121(65.1)	65(34.9)
8-cell	163	108(66.3)	55(33.7)	216	178(82.4)	38(17.6)
Morula	186	150(80.6)	36(19.4)	50	47(94.0)	3(6.0)
Blastocyst	152	143(94.1)	9(5.9)	40	40(100.0)	0(0.0)

* ZP : Zona pellucida.

Table 3. *In vitro* development of intact mouse embryos in D-PBS or M-16 medium

Medium	Stage of development	No of embryos	No of embryos developed to		
			Morula(%)	Blastocyst(%)	Degenerated(%)
D-PBS	2-cell	96	0	0	96(100.0)
	4-cell	79	6(7.6)	64(81.0)	9(11.4)
	8-cell	78	2(2.6)	70(89.7)	6(7.7)
	Morula	101	—	99(98.0)	2(2.0)
	Blastocyst*	65	—	64(98.5)	1(1.5)
M-16	2-cell	154	13(8.4)	60(39.0)	81(52.6)
	4-cell	105	4(3.8)	98(93.3)	3(2.9)
	8-cell	93	0	89(95.7)	4(4.3)
	Morula	40	—	40(100.0)	0(0.0)
	Blastocyst ¹⁾	50	—	50(100.0)	0(0.0)

* Embryos were cultured for 6~12 hours and the intact embryos which had developed to expanded or hatched blastocyst stages were identified as survival.

Table 4. *In vitro* development of bisected mouse embryos in D-PBS or M-16 medium

Medium	Stage of development	Pairs of bisected embryos	Pairs of bisected embryos developed to eu-blastocysts(%)			
			Twin	Single	Pseudo	Degenerated
D-PBS	2-cell	116	0	0	0	116(100.0)
	4-cell	50	7(14.0)	10(20.0)	14(28.0)	19(38.0)
	8-cell	101	30(29.7)	37(36.6)	14(13.9)	20(19.8)
	Morula	99	71(71.8)	14(14.1)	9(9.1)	5(5.0)
	Blastocyst*	92	78(84.8)	11(11.9)	3(3.3)	0(0.0)
M-16	2-cell	184	29(15.8)	67(36.4)	31(16.8)	57(31.0)
	4-cell	113	19(16.8)	50(45.3)	25(22.1)	19(16.8)
	8-cell	63	24(38.1)	21(33.3)	6(9.5)	12(19.5)
	Morula	48	43(89.6)	2(4.2)	1(2.0)	2(4.2)
	Blastocyst ¹⁾	36	34(94.4)	2(5.6)	0(0.0)	0(0.0)

* Survival of bisected embryos was based on the reformation of a blastocoele cavity and a clear inner cell mass region after culture for 6~12 hours.

였으며, 81개 (52.6%)는 퇴행하였다. 4-세포기의 수정란은 D-PBS에서는 81%가 포배로 발달하였고 M-16배양액에서는 93.3%가 포배로 발달하였다. 8-세포기의 수정란은 D-PBS에서는 89.7%가 포배로 발달하였고, M-16배양액에서는 95.7%가 포배로 발달하였다. 생쥐에서 초기 수정란의 24시간 이상 장기배양에 있어서는 D-PBS보다는 M-16배양액이 더욱 발달 능력이 좋았다. 상실배기 이후의 생쥐 수정란을 단기간 체외배양하는데 있어서는 D-PBS나 M-16배양액 모두 높은 생존율을 보였다(98% 이상).

D-PBS와 M-16 배양액에서 양분된 생쥐 수정란의 체외 발달: 2-세포기에서 포배기까지의 생쥐 수정란을 pronase를 처리하여 투명대를 연화시킨 다음 microsurgery blade로 양분하고 이들을 D-PBS와 M-16배양액에서 72시간까지 체외배양시켜 그 발달능력을 조사한 결과는 Table 4에 나타난 바와 같다.

2-세포기에서 양분된 수정란은 D-PBS에서는 72시간까지 포배로 전혀 발달하지 않고 모두 퇴행하였으나, M-16배양액에서는 52.2%(Twin; 15.8%, Single; 36.4%)가 eu-blastocyst로 발달하였고, 16.8%는 pseudo-blastocyst로 발달하였고 31%는 퇴행하였다. D-PBS에서 양분된 수정란의 쌍 모두가 eu-blastocyst로 발달한 비율은 2-세포기에서는 0%, 4-세포기에서는 14%, 8-세포기에서는 29.7%, 상실배기에서는 71.8% 그리고 포배기에서는 84.8%이었다. M-16배양액에서 양분된 수정란의 쌍 모두가 eu-blastocyst로 발달한 비율은 2-세포기에서는 15.8%, 4-세포에서는 16.8%, 8-세포기에서는 38.1%, 상실배기에서는 89.6%, 그리고 포배기에서는 94.4%이었다. 양분된 수정란의 체외배양을 위하여는 D-PBS보다는 M-16배양액이 더 적합하였으며 상실배기와 포배기에서 월등히 높은 생존율을 보였다.

고 찰

근본적으로 생쥐의 수정란은 상실배기 이후에 할구세포의 분화가 일어나며^{9,10}, 그 이전에 분할된 각 할구세포들은 독립된 개체로 발생할 수 있는 전능성(totipotency)을 가지고 있다는 것이 입증되어져 있다.¹¹

본 실험에서는 2-세포기에서 포배기까지의 생쥐 수정란을 microsurgery blade로 미세조작하면서 양분하는 기술을 습득하여 간편하고 빠르게(수정란 1개 분할하는데 1분간 소요) 수정란을 양분하였다. Table 2에서 나타난 바와 같이 투명대를 pronase로 연화시킨 다음 양분하는 것이 intact한 상태에서 양분하는 것보다 더 성공율이 높았다. 수정란의 발생단계별로는 포배기에

양분하는 것이 가장 성공율이 높은 것으로 나타났으며 4-세포기에 양분하는 것이 수정란에 손상을 가장 많이 주는 것으로 나타났다. 4-세포기의 할구세포들은 삼각추형을 이루고 있어서 수직으로 또는 수평으로 양분하는 것이 어려우며 양분과정중에 이들의 파괴가 쉽게 일어났다. 2-세포기의 수정란은 4-세포기나 8-세포기에 비하여 양분은 쉬우나 Table 3과 Table 4에 나타난 바와 같이 체외배양 과정중에 많이 사멸 또는 발생이 증지되었다. 상실배기의 수정란은 양분과정중 어떤 분화된 할구세포들이 얼마나 파괴 또는 분리되는 지는 정확히 알 수 없으나 Skrzyszowska와 Smorage¹²에 의하면 할구세포의 약 14%가 손상을 입는다고 한다. Nagashima et al⁸은 상실배기에 있는 생쥐 수정란을 pronase 처리한 다음 Ca²⁺ 및 Mg²⁺ 이 결여된 D-PBS에 20분간 처리하여 decompaction시킨 다음 초자봉으로 양분하여 80%의 성공율을 얻었다고 하였는데 본 실험에서는 상실배를 pronase 처리한 다음 microsurgical blade로써 양분하여 94%의 성공율을 얻음으로써 이들보다 나은 성적을 얻었다. 포배기의 수정란을 양분할 경우에는 태아의 발생부위인 내세포의 정확한 양분이 매우 중요한 것으로 인식되어 있다. 그리고 micro-manipulator의 미세조작 기술의 숙련도와 microsurgical blade의 예리성 또한 양분의 정확도와 양분후의 생존성에 영향을 많이 미치는 것으로 보인다.

생쥐 수정란은 투명대 없이도 성장이 가능하나 초기 분할기에 있는 수정란은 투명대를 제거하고 이식하면 대부분 난관벽에 부착되거나 백혈구의 탐식작용에 의해 소실되는 것으로 알려져 있다.¹³ 그러므로 상실배기 이전의 초기 수정란은 분할한 다음 agar나 gelatin에 봉입하여 중간속주의 난관내에 넣어 생체배양하는 방법을 이용하기도 하나 그 절차가 복잡한 단점을 가지고 있다. 다른 방법은 이들 분할구들을 체외배양하여 상실배나 포배로 발달시킨 다음 이식하는 것이다. 본 실험에서는 수정란의 이식 및 조작에 흔히 사용되고 있는 D-PBS와 M-16 배양액을 생쥐 수정란의 체외배양에 이용하여 보았으나 2-세포기의 수정란의 장기 배양에는 적합하지 않았으며, 대체로 D-PBS 보다는 M-16 배양액이 더 좋은 성적을 보였다. 이는 두 배양액의 성분상의 차이에 기인한 것으로 여겨진다. 즉 D-PBS에서는 초기 수정란의 대사에 중요한 lactate가 결여되어 있기 때문이다. 2-세포기에서 포배기까지의 생쥐 수정란은 양분한 후 다시 투명대에 넣지 않아도 체외에서 착상전 단계에까지 발달이 되었는데 이는 Mintz,¹⁴ 그리고 Tarkowski와 Wroblewska¹⁵가 시사한 바와 같다.

그러나 2-세포기에서 8-세포기까지의 분할 수정란이 체외에서 포배로 배양된 다음 이식되어 착상이 가능할지, 나아가서 정상적인 태아로 발달될런지에 관하여는 아직도 실험적인 연구가 더 많이 수행되어져야 할 것으로 여겨지나 최근 Togashi et al¹⁶ 그리고 정¹⁷ 등의 보고에 의하면 이러한 방법으로 신생자의 생산에 성공하였다고 한다. 상실배기 및 포배기의 수정란은 초기 배에 비하여 분할시 성공율도 높았으며 체외배양 후 생존성도 우수하였는데 특히 포배의 경우에는 94.4%가 분할란 양쪽이 모두 eu-blastocyst로 발달하였다. 이러한 성적은 Nagashima et al¹⁸ 이 compact한 상실배기에 있는 생쥐 수정란을 양분한 다음 Whittingham's 배양액에서 배양한 결과 57.3%가 eu-blastocyst로 성장하였다는 성장보다는 월등히 좋은 결과이며, McEvoy와 Sreenan¹⁸이 소의 수정란을 양분하여 PBS에서 48시간 배양하여 86%가 정상적으로 발달하였다는 보고와도 나은 성적이다. Park et al¹⁹의 보고에 의하면 초기 포배기나 확장된 포배기에 있는 생쥐 수정란을 양분한 다음 수란 생쥐에 이식하였을 때 그 착상을 및 수태율은 intact한 수정란을 바로 이식하였을 때의 성적과 대등하였다고 하며, 수정란을 양분한 후 곧 바로 이식하는 것보다 24시간 체외 배양시킨 다음 이식하였을 때 더 착상을 및 수태율이 좋았다고 한다.

결 론

2-세포기에서 포배기까지의 ICR계 생쥐수정란을 일부는 intact한 상태에서 그리고 다른 일부는 0.5% pronase를 2분간 처리하여 투명대를 연화시킨 다음 미세조작기법으로 양분하였다. 생쥐 수정란은 intact한 상태에서 양분하는 것보다 pronase로 투명대를 연화시켜 양분하는 것이 수정란에게 손상을 훨씬 덜 주었다. 수정란의 발달 단계별로는 포배기에 양분하는 것이 가장 성공율이 높았다(intact한 상태에서는 94.1% 그리고 투명대를 연화시킨 상태에서는 100%). 양분된 수정란은 투명대 없이 D-PBS와 M-16 배양액에서 37°C, 5% CO₂ 배양기내에서 2-세포기의 수정란은 72시간, 4-세포기 및 8-세포기의 수정란은 48시간, 상실배기의 수정란은 24시간 그리고 포배기의 수정란은 6~12시간 체외배양시켜 이들의 발달을 조사하였던 바, 수정란의 체외배양을 위하여는 D-PBS 보다는 M-16 배양액이 더욱 좋았고, D-PBS는 초기 수정란의 장기 배양에는 적합하지 않은 것으로 나타났다. M-16 배양액에서 양분된 분할구의 한 쌍 모두가 eu-blastocyst로 발달한 것은 2-세포기에서는 15.8%, 4-세포기에서는 16.8%, 8-세포기에서는 38.1%, 상실배기에서는 89.6% 그리

고 포배기에서는 94.4%였다. 그러므로 일란성 쌍자를 생산하기 위하여는 초기 분할단계의 수정란 보다는 상실배기나 포배기의 수정란을 사용하는 것이 더 높은 생존율을 기대할 수 있다고 본다.

참 고 문 헌

1. Willadsen SM. A method for culture of micro-manipulated sheep embryos and use to produce monozygotic twins. *Nature* 1979; 227:298~300.
2. Warfield SJ, Seidel Jr. GE, Elsdon RP. Transfer of bovine demi-embryos with and without the zona pellucida. *J Anim Sci* 1987; 65:756~761.
3. Hwang WS. Studies on the production of twins in cattle. *Proc Mol Biol & Genet* 1988; 3:27~34.
4. Nagashima H, Katoh Y, Shibata K, et al. Development of half embryos produced from morulae and blastocysts in pigs. *Theriogenol* 1987; 27:262.
5. Allen WR, Pashen RL. Production of monozygotic(identical) horse twins by embryo micromanipulation. *J Reprod Fert* 1984; 71:607~613.
6. Willadsen SM, Godke RA. A simple procedure for the production of identical sheep twins. *Vet Rec* 1984; 114:351~243.
7. Tsunoda Y, Tokunaga T, Sugie T, et al. Production of monozygotic twins following the transfer of bisected embryos in the goats. *Theriogenol* 1985; 24:337~343.
8. Nagashima H, Matsui K, Sawasaki T, et al. Production of monozygotic mouse twins from microsurgically bisected morulae. *J Reprod Fert* 1984; 70:357~362.
9. Ducibella T. Surface changes of the developing trophoblast cell. In: Johnson MH, ed. *Development in mammals*, vol. 1. Amsterdam, North-Holland. 1977; 5~30.
10. Johnson MH, Handyside AH, Braude PR. Control mechanisms in early mammalian development. In: Johnson MH, ed. *Development in mammals*, vol. 1. Amsterdam, North-Holland. 1977; 67~97.
11. Tarkowski AK. Experiments on the development of mouse embryos after *in vitro* culture and fusion *J Embryol exp Morph* 1970; 23:693~704.

12. Skrzyszowska M, Smorag A. Effect of splitting on cell losses and the quality of bisected embryos. *Theriogenol* 1987; 27:276.
13. Bowman P, McLaren A. Viability and growth of mouse embryos after *in vitro* culture and fusion *J Embryol exp Morph* 1970; 23:693~704.
14. Mintz B. Experimental study of the developing mammalian egg: Removal of the zona pellucida. *Science* 1962; 138:594~595.
15. Tarkowski AK, Wroblewska J. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the four and eight-cell stage. *J Embryol exp Morph* 1967; 18:155~180.
16. Togashi M, Suzuki H, Miyai T, et al. Production of monozygotic twins by splitting of 2-cell stage embryos in mice. *Jpn J Anim Reprod* 1987; 33: 51~57.
17. 鄭德洙, 李相緝, 鄭吉生, 생취胚分割珠의 *in vitro* 發達에 관한 研究. 韓國家畜繁殖學會誌 1988; 12: 132~140.
18. McEvoy TG, Sreenan JM. The survival of bisected cattle embryos without zona pellucida. *Theriogenol* 1987; 27:257.
19. Park CS, Choes SY, Lee HJ, et al. Studies on the technological development of embryo transfer and manipulation in goats. III. Improvement of viability and conception rate following bisection and transfer of mouse and goat embryos. *Proc Mol Biol & Genet* 1988; 3:9~14.