

생쥐 수정란의 핵이식후 체외발달에 관한 연구

박희성·이효종*·최상용*·박충생
경상대학교 농과대학·수의과대학*

Study on *In Vitro* Development of Mouse Embryos after Nuclear Transplantation

Park, H.S., H.J. Lee*, S.Y. Choe*, C.S. Park

College of Agriculture, College of Veterinary Medicine*, Gyeongsang University

SUMMARY

Single nuclei from two-, four- and eight-cell mouse embryos were transplanted into enucleated two-cell mouse embryos by micromanipulation and sendai virus mediated fusion. no significant difference in successful injection rate and fusion rate was found between the cell stages of nuclear donor embryos. There nuclear transplant embryos receiving different cell stage nuclei were cultured *in vitro* for 96 hours. 75.3% of 255 embryos receiving 2-cell nuclei, 68.2% of 236 embryos receiving 4-cell nuclei and 46.9% of 228 embryos receiving 8-cell nuclei were developed to blastocyst, respectively.

The number of blastomeres was significantly ($P < 0.05$) reduced in the embryos receiving 8-cell nuclei, compared with the embryos receiving 2-cell, 4-cell nuclei or the intact embryos. Also the size of blastocysts was significantly ($P < 0.05$) smaller in the embryos receiving 8-cell nuclei, compared with the intact or other nuclear transplant embryos.

These results suggest that single nuclei introduced into the enucleated two-cell embryos are able to support the *in vitro* development of the reconstituted embryos to blastocysts. The prominent retardation of blastocoele formation and cell division was shown in nuclear transplant embryos receiving eight-cell nuclei when they were cultured *in vitro*.

I. 서 론

핵이식 기술은 전능한(totipotent)시기에 있는 초기 수정란의 핵을 채취하여 탈핵된 다른 수정란 또는 접합체에 직접 이식하는 기술로서, 동물의 유전적 개량에 매우 유익하게 응용될 수 있을 뿐만 아니라 수정란의 cloning을 통하여 우량유전자로 조성된 개체를 다량 복제할 수 있으므로 우수한 수정란을 확대 보급할 수 있고, 유전적으로 동일한 동물을 생산함으로써 정교한

동물실험을 수행할 수 있을 뿐만 아니라 이들 실험에 소요되는 동물의 수도 줄일 수 있다.

핵이식을 통한 cloning의 가능성은 Briggs와 King(1952)에 의하여 양서류에서 최초로 시사되었으며, Gurdon(1962)은 포배기 또는 장배기의 개구리 수정란으로부터 핵을 채취하여 핵이 제거된 동종의 난자에 이식을 실시하여 정상적인 개체로 발육하는 것을 확인하였다.

포유동물에서는 Illmensee와 Hoppe(1981)가 처음

이 논문은 1990년도 대우재단의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

으로 생쥐수정란에 핵이식을 시도한 이래 McGrath와 Solter(1983)가 미세조작기법과 virus 융합기법을 이용하여 생쥐수정란의 핵치환으로 산자를 생산하는데 성공하였다.

한편 가축에 있어서 핵이식에 의한 산자생산은 1986년 Willadsen이 면양의 8-세포기 및 16-세포기 수정란의 핵을 미수정란에 이식하여 포배기로 발달시킨 다음 이를 이식하여 산자를 얻는데 성공하였으며, Prather 등(1987)은 소에 핵이식 기법을 응용하여 2마리의 산자를 얻었다.

최근에 와서 Bondioli 등(1990)은 소에서 16-64세포기 수정란을 recycling method(핵이식된 수정란을 다시 핵이식한 것)로 유전적으로 동일한 산자를 생산하는데 성공함으로써, 가축에 있어서 핵이식 기술의 한무리동물 생산에의 응용이 더욱 발전할 수 있는 계기를 마련하였다.

그러나 핵이식된 수정란의 체외배양에 있어서 실험동물의 경우는 체외배양기법으로는 가능하지만 가축과 같은 대동물에서는 실험동물에서와 달리 아직도 *in vivo* 배양 즉, 중간숙주동물의 난관에 가이식하여 일정기간 배양한 후 다시 회수하여 수란축에 이식하는 복잡한 조작기술에 의존하고 있는 실정이다(Willadsen, 1986). 앞으로 산업적 응용을 위하여서는 핵이식된 수정란의 체외배양 기법의 확립과 아울러 donee 핵과 recipient 수정란의 융합관계 개선 등의 기본적인 연구가 요구된다.

본 연구는 수정란의 효율적인 cloning 방법을 확립하고 나아가 대가축에 응용할 수 있는 기법을 구축하기 위하여 2-, 4 및 8-세포기에 있는 생쥐수정란의 핵을 채취하여 이를 탈핵된 2-세포기의 recipient 수정란에 미세조작기법으로 핵이식을 실시하여 전단계로 핵을 융합과정과 핵 이식된 수정란의 체외발달 능력을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물

공시동물은 C57BL/6J 및 ICR 계통의 생쥐로서 공란생쥐는 4~6주령의 미성숙 암컷과 수란생쥐는 10~12주령의 성숙한 암컷을 실험에 공시하였고, 위임된 유기를 위하여 10~12주령의 정관결찰 기술을 받은 수컷을 실험에 공시하였다. 한편 공시동물의 사육환경

은 실내온도를 20~23°C로 유지하였으며, 조명은 1일 14시간(18:00~22:00)으로 조절하였고, 물과 사료(실험동물용 사료, 삼양사)는 자유로이 급식시켰다.

2. 과배란 유기 및 수정

과배란 유기는 PMSG(Sigma, U.S.A.) 5IU를 부강주사하고 48시간 후에 hCG(Sigma, U.S.A.) 5IU를 동일한 방법으로 주사함과 동시에 수컷생쥐와 1:1의 비율로 합상시켜 자연교미를 유도하였다. 다음날 아침 질전 유무를 확인하여 질전이 형성되어 있는 것만을 실험에 사용하였다.

3. 수정란의 회수

수정 후 2-세포기는 44~45시간, 4-세포기는 55~56시간 및 8-세포기는 65~66시간에 생쥐를 경추탈구법으로 도살하여 난관을 적출하여 Stereozoom microscope(SWIFT, U.S.A.)하에서 난관 관류를 실시하였으며 관류액은 HEPES-BMOC-3에 0.5% BSA(Sigma, U.S.A.)를 첨가하여 사용하였으며 회수한 수정란은 pipette으로 3~4회 세척하였다.

4-세포기와 8-세포기의 donor 수정란은 2-세포기의 recipient 수정란과의 cell cycle 조절을 위하여 4°C에서 4~10시간 보존하였다.

4. 수정란의 핵 이식

Enucleation에 의한 2-세포기의 recipient 수정란의 준비는 McGrath와 Solter(1983)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 정상적으로 발달한 2-세포기의 수정란을 플라 cytochalasin B와 colcemid가 함유된 HEPES-BMOC-3 소립 배양액 내에서 15분간 배양시킨 다음 inverted microscope(Olympus, Japan)로 옮겨 micromanipulator(Goodfellow, England)에 장치된 holding pipette으로 음압에 의하여 수정란을 고정시키고 또 다른 한쪽 micromanipulator에 장치된 enucleation/injection pipette를 미세조작하면서 수정란의 투명대를 관통시킨다. 이때 수정란의 형질막은 관통시키지 않고 일단 pipette 끝부분이 위난포강에 도달하면 더욱 전진시켜서 핵 쪽 가까이로 이동시킨다. 이때 음압을 이용하여 pipette 안으로 형질막과 같이 핵을 흡입한다. 그런 다음 서서히 pipette tip을 후퇴시켜 핵을 약간의 세포질과 함께 형질막에 쌓인채로 제거시킨다.

Donor 핵의 준비도 전술한 바와 같이 enucleation technique(McGrath, 1983)를 응용하여 발달단계별

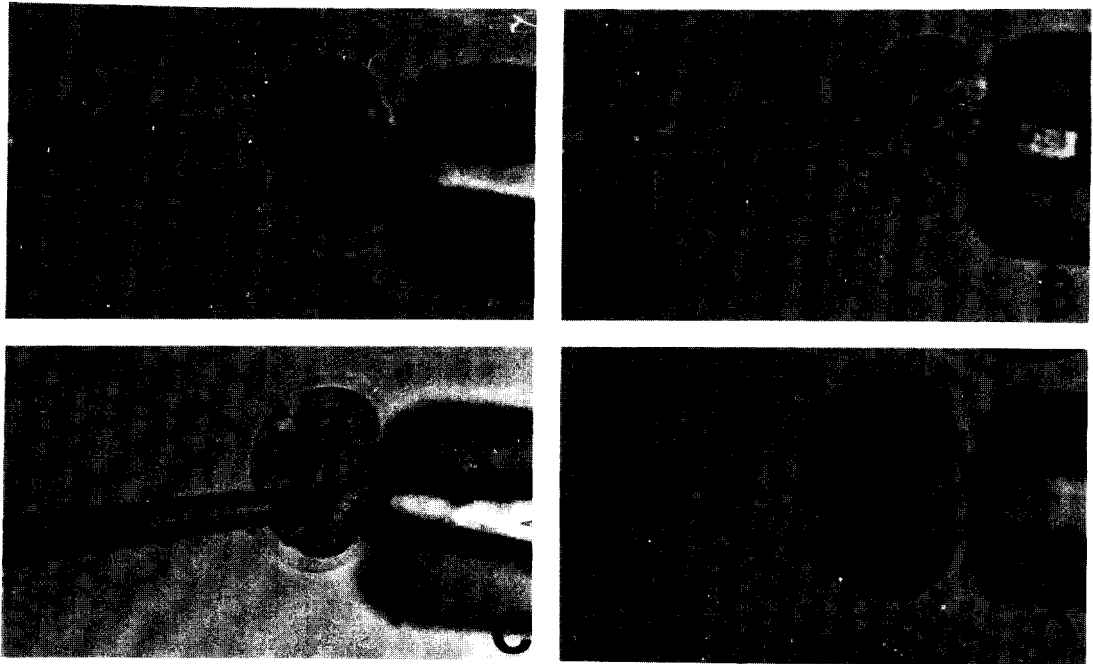


Fig 1. Enucleation of karyoplasts from embryos at two-cell(A), four-cell(B) and eight-cell(C) and injection of a karyoplast in the perivitelline space of enucleated two-cell recipient embryos(D). (X200)

로 핵을 채취한다(Fig. 1). 핵의 주입은 2-, 4- 및 8-세포기의 핵을 취하여 donor embryonic nuclei를 동량의 불활화된 sendai virus(1,000~2,000HAU/ml)와 함께 enucleation/injection pipette에 흡입한 다음 recipient 수정란의 투명대를 관통하여 위난포강 내에

주입한다(Fig. 1). 주입이 끝난 수정란은 cytoskeletal inhibitor가 없는 NaHCO_3 -BMOC-3 배양액에 옮긴 다음 2시간 이내 핵융합반응을 조사하였다.

5. 수정란의 체외배양

정상적으로 핵이 융합된 수정란은 $100\mu\text{M}$ 의 EDTA (Sigma, U.S.A.)가 첨가된 NaHCO_3 -BMOC-3 배양액에 96시간까지 37°C 의 5% CO_2 incubator 내에서 체외배양을 실시하면서 발달단계별과 시간별로 배양상태를 조사하였다(Fig. 2). 배양액의 pH는 7.4로 조정하였으며 사용직전에 $0.2\mu\text{m}$ 의 millipore filter로 여과시켜 사용하였다.

6. 수정란의 핵염색 및 할구의 크기 측정

핵이식된 수정란의 체외발달능력을 알아보기 위하여

expanded blastocyst 단계까지 정상적으로 발달한 수정란만을 골라 fluorescent dye인 Hoechst 33342 (Sigma, U.S.A.)를 이용하여 Pusel 등(1985)의 방법에 준하여 핵의 수와 핵의 크기를 조사하였다(Fig. 2). 할구의 크기는 inverted microscope(Nikon, Japan)하에서 ocular micrometer를 이용하여 투명대를 제외한 할구의 직경을 측정하였다.

7. 통계학적 분석

Donor 핵의 발달단계별로 핵의 이식조작, 핵의 융합과 체외발달 성적은 χ^2 test를 실시하였고, 할구의 크기, 핵의 수와 크기는 분산분석을 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 발달단계별 수정란의 핵이식 및 융합

2-, 4- 및 8-세포기의 수정란으로부터 핵을 채취하여 이들을 탈핵된 2-세포기의 수정란에 이식하였을 때, 이식 성공률 및 핵융합 성적은 Table 1에서 나타난 바와 같다.

Table 1. Injection and fusion of mouse karyoplasts from different stage embryos to enucleated two-cell embryos.

Stage of nuclear donor	Recipient embryos	No. and (%) of embryos injected /enucleated	No. and (%) of embryos fused /injected
2-cell	Enucleated 2 cell	334/352 (94.8)	288/344 (86.2)
4-cell	Enucleated 2-cell	329/350 (94.0)	276/329 (84.8)
8-cell	Enucleated 2 cell	310/336 (92.2)	258/310 (83.2)

There are no significant ($P < 0.05$) differences between the cell stages.

2-, 4- 및 8-세포기 수정란 핵의 이식 성공율은 각각 94.8, 94.0 및 92.2%로써 유의적인 차이 ($P < 0.05$)가 없었으며, 핵융합율은 86.2, 84.8 및 83.2%로써 donor 수정란의 발달단계에 따른 핵융합율 또한 유의적인 차이 ($P < 0.05$)가 없었다.

Roble 등 (1986)은 2-세포기의 생쥐 수정란의 세포질이 전핵단계인 zygote에서 보다 발달된 핵의 수용능력이 앞선다고 하였으며, 이는 생쥐 수정란은 2-세포기에서 모체측의 유전자가 embryonic 유전자로 전환되는데 기인한다고 하였다. 이와 같은 결과는 Tsunoda 등 (1987)이 sendai virus (2,500 HAU)를 융합 매개체로 사용하여 얻은 4-세포기 핵의 이식후 융합율 89%와 8-세포기 핵의 이식후 융합율 86%와 비교하여 볼 때 대체로 일치하는 성적이다.

본 실험에서는 4-세포기와 8-세포기의 donor 수정란은 2-세포기의 recipient 수정란과의 cell cycle을 맞추기 위하여 4°C에서 4~10시간 보존하였다가 이식 실험을 실시하였다. 이식한 핵과 세포질의 융합성적은

donor 핵의 채취, recipient 수정란의 탈핵 및 핵의 주입과정에서 수정란의 부분적 손상을 받는 것과 미세조작 pipette의 세공, 그리고 미세조작의 숙련도 등에 더 많이 좌우되는 것으로 생각된다.

2. 발달단계별 수정란의 핵이식 후 체외발달능력

1) 배반포 형성

핵융합이 이루어진 수정란을 37°C의 5% CO₂ incubator에서 96시간동안 체외배양을 실시한 성적은 Table 2에서 나타난 바와 같다.

2-세포기의 핵을 이식받은 수정란은 75.3%가 배반포로 발달하였으며, 4-세포기의 핵을 이식받은 수정란은 68.2%가 배반포로 발달하여 이들간에 유의적인 차이 ($P < 0.05$)는 없었다. 그러나 8-세포기의 핵을 이식받은 수정란은 46.9%만이 배반포로 발달하여 2-세포기와 4-세포기의 핵을 이식받은 수정란에 비하여 배반포로의 발달성적이 유의적 ($P < 0.05$)으로 낮았다.

이러한 결과는 Robl 등 (1986)은 2-세포기의 핵을 이식받은 수정란은 93%가 배반포로 발달하였다는 성적

Table 2. In vitro development of nuclear transplant mouse embryos with different stage karyoplasts.

Stage of nuclear donor	No. of nuclear transplanted embryos	No. and (%) of embryos developed to		
		4-cell	Morula	Blastocyst
2-cell	255	228 (89.4) ^b	201 (78.8) ^b	192 (75.3) ^b
4-cell	236	199 (84.3) ^b	174 (73.7) ^b	161 (68.2) ^b
8-cell	228	145 (63.6) ^a	118 (51.7) ^a	107 (46.9) ^a

The numbers with the different superscript denote significant ($P < 0.05$) differences between the cell stages of nuclear donor.

Table 3. Time of blastocoele formation in nuclear transplant and intact 2-cell embryos.

Stage of nuclear donor	Recipient embryos	Blastocysts at various intervals after nuclear transplantation per total number of blastocyst at the end of culture (%)			
		24h	48h	72h	96h
2-cell	Enucleated 2-cell	0/150(0.0)	18/150(12.0) ^b	140/150(93.3) ^{ab}	150/150(100)
4-cell	Enucleated 2-cell	0/148(0.0)	0/148(0.0) ^a	136/148(91.9) ^{ab}	148/148(100)
8-cell	Enucleated 2-cell	0/92(0.0)	0/92(0.0) ^a	81/92(88.0) ^a	92/92(100)
None	Enucleated 2-cell	0/160(0.0)	71/160(44.4) ^c	154/160(96.2) ^b	160/160(100)

The proportions with the different superscript denote significant ($P < 0.05$) difference between the cell stages of nuclear donor

보다는 다소 저조하나, 8-세포기의 핵을 이식받은 수정란은 48%가 배반포로 발달하였다고한 성적과는 대체적으로 일치한다. 또한 Tsunoda 등(1987)은 4-세포기와 8-세포기의 핵을 이식받은 수정란이 각각 72%와 35%가 배반포로 발달하였다고한 성적과는 대체로 일치한다.

96시간동안 체외배양을 실시하면서 배반포로 발달하는데 소요되는 시간을 조사한 성적은 Table 3에서 나타난 바와 같다.

2-세포기의 핵을 이식받은 수정란은 48시간 배양후에 관찰하였던바 12%가 배반포로 발달하였으나, 4-세포기 및 8-세포기의 핵을 이식받은 수정란은 전혀 배반포까지 발달되지 않았다 ($P < 0.05$).

8-세포기의 핵을 이식받은 수정란은 72시간 배양후에는 88%가 배반포로 발달하여 2-세포기(93.3%) 및 4-세포기(91.9%)에 비하여 다소 발달이 늦었다 ($P < 0.05$). 또한 핵이식을 한 수정란은 intact 한 2-세포기 수정란의 96.2%에 비하여 다소 늦었다 ($P < 0.05$).

이러한 결과는 세포질과 이식받은 핵과의 cell cycle 에 기인하는 것으로 생각된다. Barnes 등(1987)은 2-세포기 및 8-세포기의 핵을 이식받은 수정란은 66시간에 98% 및 96%가 배반포로 발달하였다는 보고와는 차이가 있으나 이는 수정란의 채취시간과 배양기법의 차이에 기인하는 것으로 생각된다.

2) 배반포의 크기, 할구의 수 및 핵의 크기

2-, 4- 및 8-세포기의 핵을 이식 받은 수정란의 체외 발달능력을 알아보기로자 배반포의 크기, 할구의 수

및 핵의 크기 등을 조사한 성적은 Table 4에서 나타난 바와 같다.

배반포로 발달한 수정란의 크기는 2-, 4- 및 8-세포기의 핵을 이식받은 수정란간에서 각각 100.7 ± 1.1 , 97.9 ± 1.9 , 102.5 ± 2.1 로써 서로 유의적인 차이 ($P < 0.05$)가 없었다.

할구의 수에 있어서 2-세포기의 핵을 이식받은 수정란은 33.1 ± 1.2 로써 4-세포기(27.5 ± 1.8) 및 8-세포기(24.0 ± 1.3)에 비하여 다소 할구의 수가 많았다 ($P < 0.05$). 그러나 핵이식 수정란은 체내에서 배반포로 발달한 수정란(49.2 ± 1.8)과 2-세포기에 채취하여 핵이식을 하지 않고 체외배양한 수정란(51.5 ± 1.8)에 비하여 유의적 ($P < 0.05$)으로 할구의 수가 적었다.

Kono 와 Tsunoda (1989)도 4-세포기와 8-세포기의 핵을 이식받은 수정란을 체외에서 배반포까지 발달시킨 후에 할구수는 각각 30 ± 2.4 및 22 ± 1.3 으로써 본 결과와 대체로 일치한다. 할구수의 감소는 미세조작시 부분적인 손상과 장시간 체외배양에 따른 배양조건, 배양 시간 등이 할구수의 감소요인으로 생각된다.

핵의 직경은 8-세포기의 핵을 이식받은 수정란의 경우 $13.3 \pm 0.5 \mu\text{m}$ 로써 2-세포기($15.0 \pm 0.4 \mu\text{m}$) 및 4-세포기($14.3 \pm 0.5 \mu\text{m}$)의 핵을 이식받은 수정란보다 작았으며 ($P < 0.05$), 체내에서 배반포로 발달한 수정란($13.8 \pm 0.5 \mu\text{m}$) 및 2-세포기에 채취하여 핵이식을 하지 않고 체외배양한 수정란($14.9 \pm 0.4 \mu\text{m}$)보다는 다소 핵의 크기가 작았다. Robl 등(1986)은 2-세포기 및 8-세포기의 핵을 이식받은 수정란이 미세조작

Table 4. Diameter of embryos and nuclei and number of blastomeres in nuclear transplant embryos at blastocyst stage.

Stage of nuclear donor	Recipient embryos	No. of embryos	Diameter of blastocyst (μm)	No. of blastomeres	Diameter of nuclei (μm)
2-cell	Enucleated 2-cell	40	100.7 \pm 1.1 ^b	33.1 \pm 1.2 ^c	15.0 \pm 0.4 ^a
4 cell	Enucleated 4 cell	40	97.9 \pm 1.9 ^b	27.5 \pm 1.8 ^b	14.3 \pm 0.5 ^{ac}
8-cell	Enucleated 8-cell	40	102.5 \pm 2.1 ^{ab}	24.0 \pm 1.3 ^a	13.3 \pm 0.5 ^{bc}
None	Nonenucleated fresh	40	99.4 \pm 2.7 ^b	49.2 \pm 1.8 ^a	13.8 \pm 0.5 ^{ac}
None	Nonenucleated cultured	40	107.5 \pm 2.2 ^a	51.5 \pm 1.8 ^{ab}	14.9 \pm 0.4 ^a

1) Mean \pm S.E.M.

2) The values with the different superscript denote significant ($P < 0.05$) difference between the cell stages of nuclear donor.

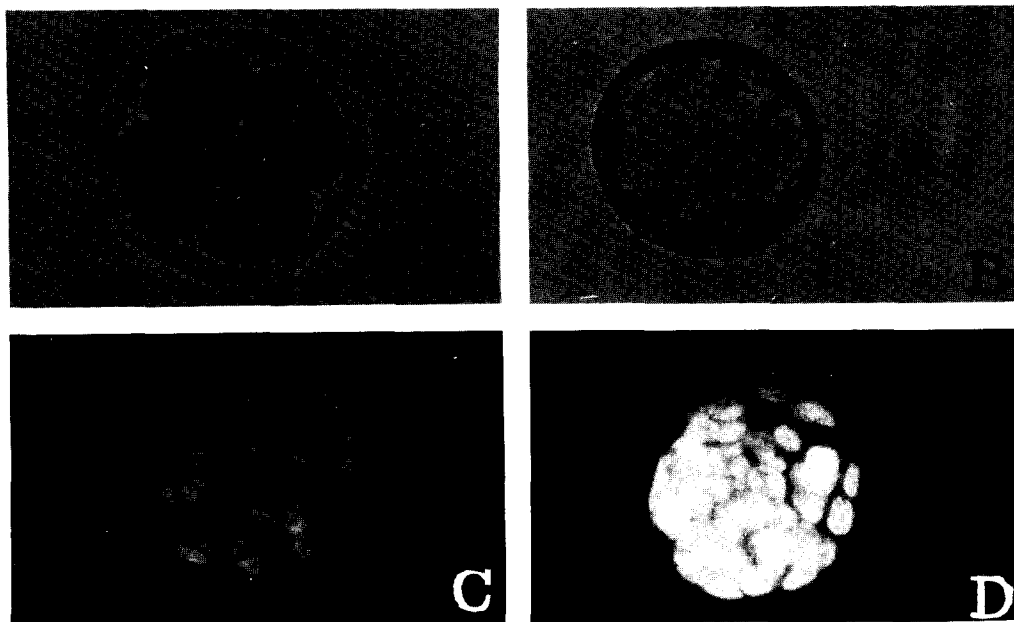


Fig 2. A four-cell embryo(A) and blastocyst(B) produced by nuclear transplantation and in vitro culture($\times 200$). A nuclear transplant blastocyst(C) and an intact blastocyst(D) counterstained with trypan blue and stained with Hoechst 33342. ($\times 200$)

을 하지 않은 수정란의 핵보다 작았다고 하였다.

IV. 적 요

본 연구는 수정란의 효율적인 cloning 방법과 체외배양법을 개선 확립하고 나아가 대가축에 응용하고자, 2-, 4- 및 8-세포기에 있는 생쥐 수정란의 핵을 채취하여 이를 탈핵된 2-세포기의 recipient 수정란에 미세조작기법 및 Sendai virus 를 이용한 융합기법으로 핵이식을 실시하여 핵의 융합과정과 핵 이식된 수정란의 체외발달 능력을 조사하였다.

2-, 4- 및 8-세포기의 수정란으로부터 핵을 채취하여 이들을 탈핵된 2-세포기의 수정란에 이식하였을 때 핵융합 성공율은 각각 86.2%, 84.8% 및 83.2%로써 이들간에 유의적인 차이($P < 0.05$)는 없었다.

나아가서 이들 핵이식된 수정란을 체외에서 96시간 배양한 결과 배반포로의 발달율은 8-세포기의 핵을 이식한 수정란은 46.9%로써 2-세포기(75.3%) 및 8-세포기(68.2%)의 핵을 이식한 수정란에 비하여 유의적($P < 0.05$)으로 낮았다. 또한 배반포로 발달하는데 소요되는 시간은 배양후 72시간에 조사한 결과 8-세포기의 핵을 이식한 수정란은 88.0%가 배반포로 발달함으로써 2- 및 4-세포기에 비하여 다소 늦은 경향을 보였다.

배반포 및 핵의 크기는 8-세포기의 핵을 이식한 수정란이 2- 및 4-세포기의 핵을 이식한 수정란에 비하여 다소 적은 경향을 나타냈다($P < 0.05$). 또한 할구세포의 수에 있어서도 8-세포기의 핵을 이식한 수정란은 24.0 ± 1.3 개로써 2-세포기(33.1 ± 1.2) 및 4-세포기(27.5 ± 1.8)의 핵을 이식한 수정란에 비하여 유의적으로($P < 0.05$) 적었다.

V. 인용문헌

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. Bondioli, K.R., M.E.Westhusin and C.R.Looney. 1990. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. Theriogenology. 33(1): 165-174.
3. Briggs, R. and T.J. King. 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. 38: 455-459.
4. Illmensee, K. and P.C. Hoppe. 1981. Nuclear transplantation in mus musculus: Development potential of nuclei from preimplantation embryos. Cell. 23: 9-18.
5. Kono, T. and Y. Tsunoda. 1989. Development of single blastomeres from four- and eight-cell mouse embryos fused into the enucleated half of a two-cell embryo. Gamete Res. 22: 427-434.
6. McGrath, J. and D. Solter. 1983. Nuclear transplantation in mouse embryos by microsurgery and cell fusion. Science. 220: 1300-1302.
7. Prather, R.S., F.L. Barnes, M.M. Sims, J.M. Robl, W.H. Eyestone and N.L. First. 1987. Nuclear transplantation in bovine embryos: Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. Biol. Reprod. 37: 859-866.
8. Pursel, V.G., R.J.Wall, C.E.Rexroad, Jr., R.E.Hammer and R.L.Brinster. 1985. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. Theriogenology. 24: 687-691.
9. Robl, J.M., B. Gilligan, E.S. Cister and N.L. First. 1986. Nuclear transplantation in mouse embryos: Assessment of recipient cell stage. Biol. Reprod. 34: 733-739.
10. Tsunoda, Y., T. Yasui, Y.Shioda, K. Nakamura and 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.
11. Willadsen, S.M. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. Nature. 320: 63-65.