

생쥐에 있어서 單一害球가 分離된 受精卵의 移植에 의한 새끼生産에 관한 연구

全益秀 · 朴修奉* · 辛明宰 · 崔有林 · 金宣宜 · 崔光洙

慶北大學校 農科大學 酪農學科

*畜産試驗場

Studies on Offspring Production by Transfer of Biopsied Embryo in Mice

Jeon, Ik Soo · Park, Soo Bong* · Shin, Myung Jae · Choi, You Lim

Kim, Seun Eui · Choi, Kwang Soo

Dept. of Dairy Sci., Coll. of Agric., Kyungpook Natl. Univ.

*Livestock Experiment Station

Summary

The study was carried out to investigate the viability and the offspring production rate of single blastomeres and biopsied 4-cell mouse embryos and, also to examine the efficiency of biopsy.

The results obtained are summerised as follows:

1. The separated blastomeres from 4-cell embryos and intact 4-cell embryos which were cultured in Medium 2 were developed to trophoblastic vesicle and blastocyst embryo by 82.6% and 89.5%, respectively.

2. The biopsied embryos from 4-cell embryos and intact 4-cell embryos which were cultured in Medium 2 were developed to blastocyst embryo by 83.3% and 90.4%, respectively.

3. The biopsied blastomeres and the separated blastomeres from 4-cell embryos which were cultured in Medium 2 were developed to trophoblastic vesicle by 80.8% and 83.3%, respectively.

4. The biopsied embryos from 4-cell embryos and intact 4-cell embryos were transferred to recipients, and the offspring rate was 36% and 48.6%, respectively.

緒 論

實驗動物이나 家畜의 受精卵을 性鑑別한 후 移植하여 새끼를 生産하거나 性이 鑑別된 受精卵을 凍結, 保存한 후 인간이 원하는 대

로 새끼를 生産할 수 있다면 家畜育種에 크게 기여할 수 있을 것이다.

受精卵을 性鑑別하는 방법에는 H-Y 항체를 이용하는 방법^{1,8,9)}과 染色體 分析에 의한 방법^{2,9,12)}등이 보고되었다.

染色體分析法를 이용한 受精卵 性鑑別에 대하여, 受精卵의 分割球에 관한 연구가 Nicholas와 Hall¹¹⁾에 의해 보고된 이래 하나의 受精卵를 2개로 분리 또는 절단하여 그 중 하나는 染色體를 분석하여 性を 감별하고 다른 하나는 이식하여 性判別된 새끼를 획득하고자 하는 연구가 진행되어 오고 있다^{2,12)}.

兩分 分割球의 性鑑別에 있어서는 受精卵 移植 技術과 性감별된 受精卵의 凍結처리가 필수적이나 兩分 分割球는 凍結, 融解과정을 거치면서 치명적인 損傷을 입게 되므로¹⁶⁾ 受精卵의 兩分방법은 실용화에 限界를 나타내고 있다. 그러나 受精卵의 兩分이나 切斷방법보다 효과적인 biopsy에 의한 割球分離技術이 보고되었는데 Wilton과 Trounson¹⁸⁾은 생쥐의 4細胞期胚를 aspiration pipette을 이용하여 하나의 割球를 分離하고 분리된 受精卵 (biopsied embryo)과 분리한 單一割球 (biopsied blastomere)를 배양한 결과 분리된 受精卵는 94.4%가 胚盤胞期胚까지 發生하였으며 분리한 單一割球는 81.4%가 10개 이상의 細胞를 포함하는 割球로 發生하였다고 보고하였다. 또한 생쥐의 4細胞期胚를 4개의 할구로 분리하여 배양한 결과 Fiser와 Macpherson⁴⁾과 Takeda등¹⁵⁾은 영양배엽을 형성한 할구(trophoblastic vesicle)까지의 發生率은 각각 59.2%와 29%였다고 보고하였다.

Gordon과 Gang⁶⁾은 투명대의 일부분을 녹인 후 하나의 할구를 분리하는 zona drilling 방법으로 돼지의 4-6細胞期胚에서 1개의 할구 (biopsied blastomere)를 分離하였는데 분리율은 100%였으며 한개의 割球를 뽑아낸 受精卵 (biopsied embryo)을 胚盤胞期胚까지 배양한 결과, 역시 100%의 發生率을 보였다고 보고하였다.

한편 Wilton등¹⁹⁾은 생쥐의 4細胞期胚에서 하나의 割球를 분리한 biopsy된 受精卵과 대조구인 4細胞期胚를 胚盤胞期胚까지 배양 후 移植하여 각각 52.6%와 52.4%의 胎兒發生率을 보고하였으며, 하나의 割球를 분리한 biopsy된 受精卵과 대조구인 4細胞期胚를 凍結, 融解 후 受卵생쥐에 移植한 결과 각각 62.2%와 62.9%의 胎兒發生率을 보고하였다.

따라서 본 연구는 생쥐의 4細胞期胚에서 分離한 割球를 培養, 發生시키고 4細胞期胚에서 分離한 割球를 性鑑別에 이용하여 수정란의 性を 判別하고 性判別된 受精卵를 凍結, 融解 처리후, 性鑑別된 새끼를 생산하고자 하는 생쥐의 性調節에 관한 연구에 응용할 수 있는 기초자료를 얻기 위하여 Wilton과 Trounson¹⁸⁾이 제시한 4細胞期胚에서 하나의 割球를 뽑아내는 biopsy의 효율성과 4細胞期胚에서 分離한 單一割球의 發生率 그리고 biopsy된 受精卵의 생존성 및 산자율을 검토하고자 실시 되었다.

材料 및 方法

1. 供試動物

實驗動物은 albino BALB/C 系統의 생쥐로서 供卵생쥐는 4-6週齡의 생쥐를 이용하였으며, 受卵생쥐는 8-12週齡으로서 최소 한번 이상 分娩經驗이 있는 생쥐를 使用하였다.

供卵 생쥐에 교미를 시키기 위한 숫쥐는 12週齡의 생쥐를 使用하였으며 受卵생쥐의 發情同期化를 위한 숫쥐는 Robertson¹⁴⁾의 방법에 따라 精管을 切除하고 다른 암쥐와 合숙시켜 不妊을 確認한 후 使用하였다.

供試動物은 慶北大學校 農科大學 實驗動物 飼育室에서 1일 照明時間 14時間, 室溫 25-30°C의 條件下에서 1989년 9월 부터 1990년 9월까지 生産 飼育하면서 使用하였다.

2. 過排卵誘起와 發情同期化

供卵생쥐의 發情週期에 關係없이 오후 5시에 PMSG(帝國臟器, 日本) 5IU를 腹腔內 1회 注射하고 過排卵을 誘起하였으며⁵⁾ hCG주사 직후 암수를 1:1로 合숙시켜 다음날 아침 10시 이전에 臍檢이 確認된 암쥐를 採卵用으로 供試하였다.

受卵생쥐는 수정란이 채란된 공란생쥐의 자궁상태보다 하루늦은 자궁상태를 유지하기 위해 供卵생쥐보다 하루늦게 숫쥐와 2:1의 比率로 合숙시켜 다음날 아침 10시 以前에 질전이 확인된 암쥐를 使用하였다.

3. 培養液

受精卵의 回收와 biopsy 및 培養에 사용한 培養液은 Quinn 등¹³⁾의 방법에 따라 製造한 M2 培養液을 이용하였다. 培養液은 사용직전 0.2 μ m의 millipore filter(Gelman Sciences Inc., U.S.A)를 사용하여 濾過 除菌하였으며 培養 1-2시간전에 37°C, 5% CO₂, 濕度 飽和 상태인 배양기內에 定置하여 CO₂ 平衡을 시켰다^{10,14)}.

4. 受精卵의 回收

hCG注射 54時間 後에 供卵생쥐를 屠殺하여 子宮과 卵管부위를 꺼내어 30배 실체현미경(Olympus Optical Co., Japan)아래서 前述한 培養液을 이용하여 30G 注射針이 附着된 1ml의 注射器로 卵管采에서 子宮으로 0.1ml 灌流시켜 4細胞期胚를 回收하였다⁷⁾.

回收된 4細胞期胚는 80배 실체 현미경 아래서 正常的으로 發達한 것만을 選別하여 本實驗에 供試하였다.

5. 透明帶의 除去와 decompaction 및 單一割球의 分離

回收된 4細胞期胚는 37°C 透明帶除去用 酸性 Tyrode溶液에 3-5초간 노출시킨 상태로 觀察하면서 透明帶가 軟化되었을때 다른 신선한 培養液에 세척하는 과정을 3회반복 하여 透明帶를 除去하였다^{7,14)}. 투명대를 제거한 4細胞期胚에서 割球 分離를 용이하게 하기 위해 37°C, 5% CO₂, 濕度 飽和 상태인 배양기에 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺가 함유되지 않은 M2 배양액 小滴內에서 decompaction을 유도하였다¹⁴⁾.

Decompaction후 내경 30-40 μ m의 특수 micro pipette으로 채취하여 4細胞期胚를 4개의 割球로 分離하였다.

6. 4細胞期胚의 biopsy

1) Holding 및 aspiration pipette

Biopsy를 하기 위한 4細胞期胚의 고정용 pipette(holding pipette)은 micromanipulator용 유리관(Narishige Co., Japan)으로 외경 80-

100 μ m, 내경 20-25 μ m가 되도록 화염을 이용하여 만들었고 하나의 割球를 뽑아내기 위한 單一割球 分離用 pipette(aspiration pipette)은 micromanipulator용 유리관을 micropipette puller와 grinder(Narishige Co., Japan)를 이용하여 외경 25-30 μ m, 각도 45°가 되도록 제작¹⁸⁾한 후 47% 불화수소로써 pipette 끝을 마모시킨 다음 멸균후 사용하였다.

2) Biopsy

4細胞期胚를 상술한 decompaction用 배양액과 배양기內에서 30-40분간 decompaction을 유기시킨 후 할구가 pipette 벽면에 붙는 것을 방지하기 위해 bovine serum albumine (BSA, Sigma, U.S.A.)이 M2 배양액보다 50% 더 들어있는 배양액 小滴內에 옮긴 후 holding pipette과 aspiration pipette이 부착되어 있는 micromanipulator(Fig. 1; Curtin Matheson Scientific, Inc., France)를 이용하여 Fig. 2와 같이 4細胞期胚에서 하나의 割球를 뽑아내었다¹⁸⁾. 이때 대구조로 쓸 4細胞期胚도 biopsy를 가하는 受精卵의 조건과 동일하게 해주었다. Biopsy과정은 Fig. 2와 같다.

7. 培養

4細胞期胚에서 4개로 분리한 單一割球(separated blastomere)와 biopsy하여 분리한 單一割球(biopsied blastomere) 및 biopsy하여 하나의 割球를 뽑아낸 受精卵(biopsied embryo)과 대구조로 쓰인 4細胞期胚의 배양에는 상술한 배양액과 배양기內에서 배양하였다.

4細胞期胚에서 4개로 분리한 單一割球와 biopsy하여 분리한 單一割球는 36-48시간 배양하여 영양배엽을 형성한 할구(trophoblastic vesicle)까지의 發生 여부를 검토하였으며, biopsy하여 하나의 割球를 뽑아낸 受精卵과 대구조로 쓰인 4細胞期胚는 48-56시간 배양하여 胚盤胞期胚까지 發生 여부를 검토하고 정상적으로 發生한 受精卵은 상술한 受卵생쥐에 이식하였으며 대구조로 쓰인 4細胞期胚는 동일한 조건으로 배양하여 移植에 供試 하였다.

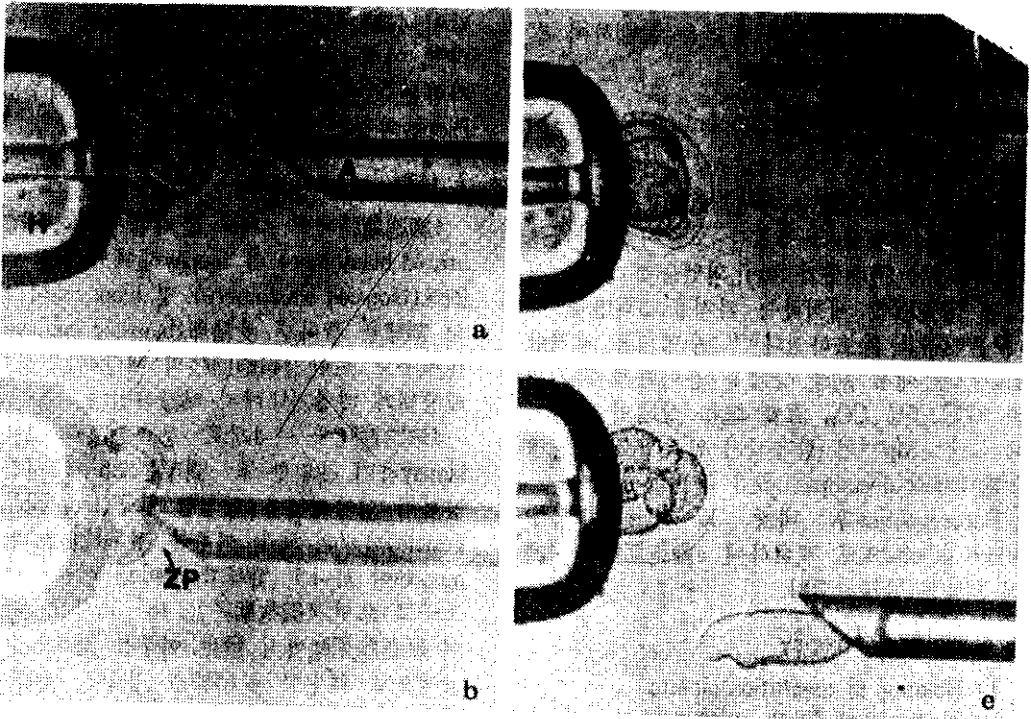
8. 移植

Biopsy한 4細胞期胚와 biopsy를 하지않은 대조구를 48-54시간 배양후 受卵생쥐에 移植하였다.

이식은 受卵생쥐에 sodium pentobarbital (Somnopenyl, Pitman-Moore Inc., U.S.A)을 복강내에 주사하여 마취시킨 후 背側 정중앙 부위를 면도날로 표피의 털을 제거한 다음 절개하여 난소, 난관 및 자궁을 노출시켰다. 노출된 자궁에 멸균된 주사침(26G)을 사용하여 자궁각 선단에 혈관을 피해 小孔을 만들고 그 小孔에 micropipette을 삽입하여 Hogan 등⁷⁾의 방법에 따라 소량의 배양액과 함께 受精卵를 移植하였다.



Fig. 1. Micromanipulator(H: holding pipette, A: aspiration pipette CD: culture dish)



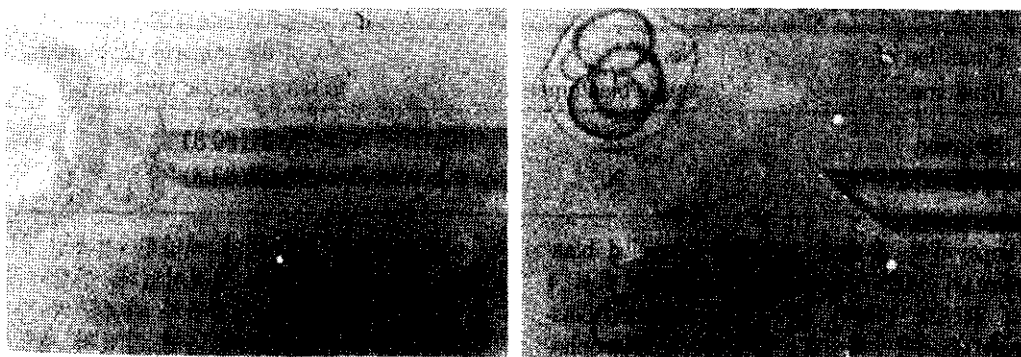


Fig. 2. Biopsy of single blastomere from a 4-cell mouse embryo(X 400).

- a. The embryo is held stationary by suction through the glass holding pipette(H).
- b. The aspiration pipette(A) is pushed onto the zona pellucida(ZP).
- c. The zona pellucida has been punctured and the aspiration pipette is inside the embryo.
- d. The aspiration pipette containing one blastomere is removed from the embryo.
- e. The biopsied blastomere is pushed into the medium.
- f. The biopsied embryo and blastomere immediately after biopsy.

結果 및 考察

1. Biopsy한 受精卵과 單一割球의 배양

4細胞期胚를 biopsy하여 M2 배양액에 배양시킨 결과 83.3%가 胚盤胞期胚로 發生하였으며 대조구인 biopsy 하지 않은 受精卵은 90.4%가 정상적인 割球로 發生하였다(Table 1, Fig. 3).

Biopsy된 수정란과 대조구간에는 발생율이 있어서 유의차가 인정되지 않았으며 이는 biopsy에 의한 할구손상이 없었다는 것을 의미한다.

Table 1. In vitro development of biopsied embryos at the stage of 4-cell of mouse embryos

Embryo	No. of embryos	No. of embryos developed to blastocysts(%)
Biopsied embryo	54	45(83.3)
Intact embryo	94	85(90.4)

본 실험에서 biopsy된 수정란과 대조구의 발생율은 각각 83.3%, 90.4%로서 Wilton과 Trounson¹⁸⁾의 보고인 94.4% 및 97.8%에 비하여 발생율이 약간 낮은 경향을 보였다.

이와 같은 차이는 본 실험에서 사용한 배양액은 M2였으나 Wilton과 Trounson¹⁸⁾은 M2에서 biopsy한 후 human amniotic fluid에 옮겨 배양한 결과로서 biopsy 후 사용한 배양액의 종류에 의한 차이라고 사료된다.

한편 Gordon과 Gang⁶⁾은 biopsy된 돼지의 4-6細胞期胚를 M16 배양액에서 胚盤胞期胚까지 배양하여 본 실험의 결과인 83.3%보다 훨씬 높은 100%의 發生率을 보고하였다.

이것은 실험동물과 배양액의 차이라고도 볼 수 있으나 Gordon과 Gang⁶⁾은 산성 Tyrode 용액을 이용하여 투명대의 일부분을 녹인 후 하나의 할구를 밀어내는 방법을 사용한 실험으로서 biopsy 방법의 차이에 의한 결과라고 사료된다.

생쥐의 4細胞期胚를 biopsy하여 뽑아낸 單一割球의 배양 결과는 Table 2와 같다(Fig. 3).

Table 2. Development of single blastomeres in vitro

Condition of blastomere	No. of single blastomeres	No. of blastomeres developed to trophoblastic vesicle (%)
Biopsied	26	21(80.8)
Separated	90	75(83.3)

Biopsy하여 뽑아낸 단일할구(biopsied blastomere)와 대조구로 사용한 4細胞期胚에서 4개의 割球로 분리한 單一割球(separated blastomere)를 영양배엽을 형성한 割球(trophoblastic vesicle)까지 배양시킨 發生率은 각각 80.8%와 83.3%로서 그 결과간의 유의차는 없었다.

이것은 biopsy하여 뽑아낸 單一割球 역시 biopsy에 의한 세포손상이 없었음을 나타낸다. 또한 본 실험의 결과는 Wilton과 Trounson¹⁸⁾이 생쥐의 4細胞期胚를 biopsy하여

하나의 割球를 뽑아내어 배양한 결과인 81.4%의 發生率과 비슷한 성적이었다. 이상과 같은 결과를 종합하면 실험구와 대조구의 발생 성적에 있어서 유의차가 나지 않았기 때문에 본 실험에서 사용한 biopsy는 생쥐의 4細胞期胚와 단일할구에 미치는 손상은 없었다고 사료되나 holding pipette과 aspiration pipette에 의한 물리적인 영향과 biopsy에 소요되는 시간등에 의한 경미한 세포손상은 끼쳤을 것으로 추측된다.

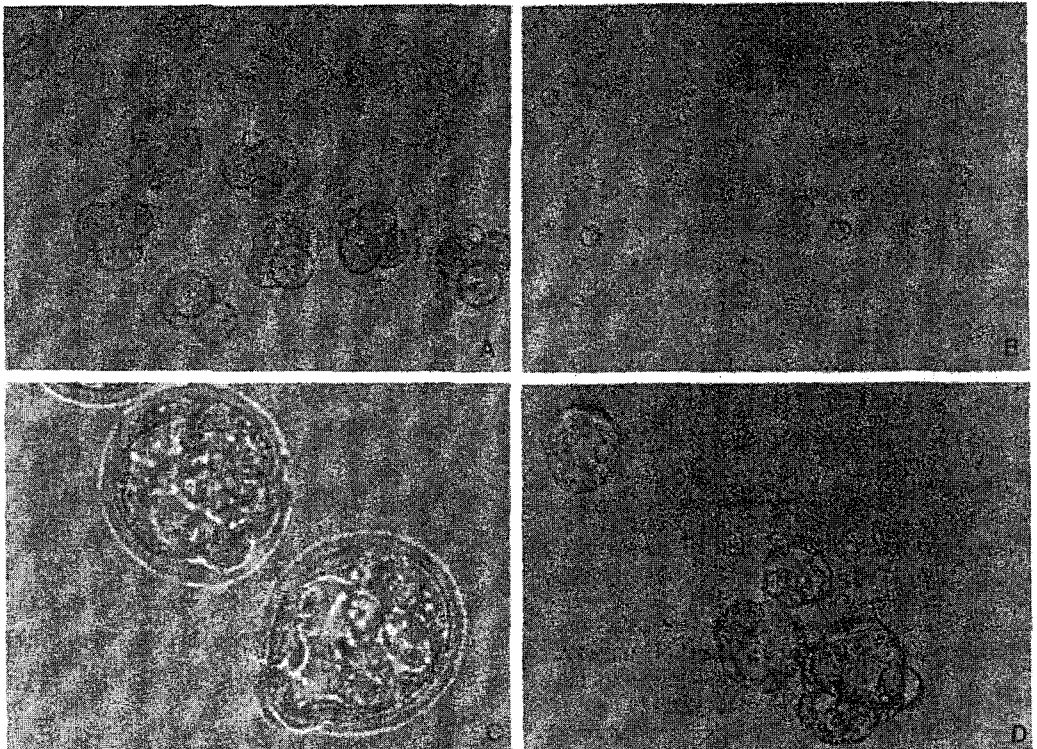


Fig. 3. In vitro development of biopsied embryos and blastomeres obtained from 4-cell embryos.

A: The biopsied embryos after biopsy

B: The biopsied blastomeres 15min. after biopsy.

C: Blastocyst developed from biopsied 4-cell embryos which were cultured 54 hrs.

D: Trophoblastic vesicle developed 4-cell embryos which were cultured 48 hrs.

2. 새끼쥐 生産

Biopsy된 受精卵과 대조구인 4細胞期胚를

移植하여 얻은 새끼生産率은 Table 3과 같으며 태어난 새끼는 Fig. 4와 같다.

Table 3. Production of offspring following transfer of biopsied and intact embryos

Embryo	No. of recipient	No. of embryos transferred	No. of offspring(%)
Biopsied embryo	5	25	9(36.0)
Intact embryo	5	37	18(48.6)

Table 3에 나타난 바와 같이 4細胞期胚에서 하나의 割球를 분리한 biopsy된 受精卵을 胚盤胞期胚까지 48-56시간 배양후 정상적으로 發生한 受精卵 25개를 5마리의 受卵생쥐에 移植한 결과 36%의 새끼生産率을 얻었으며 대조구에서는 48.6%의 새끼생산율을 얻었는데 biopsy된 수정란과 대조구간의 새끼생산율에는 유의차가 인정되지 아니하였다. 본 연구에서 얻어진 생쥐의 새끼생산율 36.0%와 48.6%는 Wilton등¹⁹⁾이 보고한 태아발생율 52.6%와 52.4%보다 다소 떨어지는 바 이는 Wilton등¹⁹⁾은 태아발생율을 검토한 것이며 본 실험결과는 새끼생산율(offspring rate)을 검토하였기 때문에 나타난 차이라고 볼 수 있다.

또한 biopsy된 受精卵과 대조구를 48-56시간 體外에서 배양할시 형태상으로는 正常성을 유지하나 移植후 體內에서 着床을 위한 受精卵의 세포자체 분비기능 저하로 인한 결과라고 사료된다¹⁷⁾.



Fig. 4. The offspring of a mouse obtained following transfer.

要 約

本 연구는 생쥐의 4細胞期胚에서 하나의 割球를 뽑아내는 새로운 割球分離技術인 biopsy에 대한 효율성과 分離된 受精卵과 分離한 割球의 생존성 및 새끼생산율을 검토한 결과이다.

그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 4細胞期胚에서 分離한 單一割球와 4細胞期胚를 M2 배양액에 배양한 결과, 單一割球는 82.6%가 영양배엽을 형성한 割球로 發生하였고 4細胞期胚로 89.5%가 胚盤胞期胚로 發生하였다.

2. 4細胞期胚를 biopsy하여 하나의 割球가 分離된 受精卵과 대조구인 4細胞期胚를 M2배양액에서 배양한 결과 각각 83.3%와 90.4%가 胚盤胞期胚로 發生하였다.

3. Biopsy하여 4細胞期胚에서 分離한 單一割球와 대조구인 4細胞期胚에서 4개의 割球로 분리한 單一割球를 M2 배양액에서 배양한 결과 각각 80.8%와 83.3%가 영양배엽을 형성한 割球로 發生하였다.

5. 4細胞期胚에서 하나의 割球를 뽑아낸 受精卵과 대조구인 4細胞期胚를 수란생쥐에 이식한 결과 각각 36.0%와 48.6%의 새끼쥐 생산율을 얻었다.

引 用 文 獻

1. Anderson, G. B. 1987. Identification of embryonic sex by detection of H-Y antigen. *Theriogenology*, 27:81-97.

2. Baik, C. S., Y. M. Man, K. K. Lee, K. K. Chung, J. B. Kim and D. W. Ko. 1986. Sexing mouse demi-embryos by chromosomal analysis. *Korean J. Anim. Sci.* 28(11): 708-713.
3. Edwards, R. G. and R. L. Gardner. 1967. Sexing of live rabbit blastocysts. *Nature.* 214: 576-577.
4. Fiser, P. S. and J. W. Macpherson. 1976. Development of embryonic structure from isolated mouse blastomeres. *Can. J. Anim. Sci.* 56:33-36.
5. Fowler, R. E. and R. G. Edwards. 1957. Induction of superovulation and pregnancy in mature mice by gonadotrophins. *J. Endocr.* 15: 374-384.
6. Gordon, J. W. and I. Gang. 1990. Use of zona drilling for safe and effective biopsy of murine oocytes and embryos. *Biol. of Reprod.* 42: 869-876.
7. Hogan, B., F. Constantini and E. Lacy. 1986. Manipulation the mouse embryo, CSH Lab. U.S.A. pp.99-102, 106, 135-145.
8. Krco, C. J. and E. H. Goldberg. 1976. H-Y(male) antigen: Detection of eight-cell mouse embryos. *Science.* 193: 1134-1135.
9. Lee, C. K., K. M. Chung, S. H. Kim and K. S. Im. 1990. Studies on sexing of rabbit embryos by H-Y antibody. I. Sexing of embryos by in vitro development and detection of fluorescence. *Korean J. Anim. Sci.* 32(7): 377-388.
10. Monk, M. 1987. Mammalian development a practical approach. IRL Press. Oxford. pp. 55.
11. Nicholas, J. S. and D. V. Hall. 1942. Experiments on developing rats II. The developments of isolated blastomeres and fused eggs. *J. Exp. Zool.* 90: 441-459.
12. Picard, X. L., K. P. Xu, W. A. King and A. K. Gott. 1989. Sexing and bisecting bovine embryos produced by in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology.* 31: 274.
13. Quinn, P., C. Barros and D. G. Whittingham. 1982. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 66:161-168.
14. Robertson, E. J. 1987. Teratocarcinomas and embryonic stem cells a practical approach. IRL Press, Oxford, pp.121-123, 138, 138-139, 144-146.
15. Takeda, T. T., Takedomi and T. Aonihara. 1989 a. Development of blastomeres isolated at the four-cell or eight-cell stage and embryos after bisection at the morula and blastocyst stage in the mouse. *Theriogenology.* 31: 262.
16. Takeda, T., T. Takedomi and T. Aonihara. 1989 b. Effect of the zona pellucida on viability of cryopreserved bisected mouse morula and blastocysts. *Theriogenology.* 31: 263.
17. Willadsen, S. M., H. Lehn-Jeusen, C. B. Fehilly and R. Newcomb. 1981. The Production of monozygotic twins of preselected percentage by micromanipulation on non-surgically collected cow embryos. *Theriogenology.* 15:23.
18. Wilton, L. J. and A. O. Trounson. 1989. Biopsy of preimplantation mouse embryos: Development of micromanipulated embryos and proliferation of single blastomers in vitro. *Biol. of Reprod.* 40: 145-152.
19. Wilton, J., M. Shaw and A. O. Trounson. 1989. Successful single-cell biopsy and cryopreservation of preimplantation mouse embryos. *Fertil. Steril.* 51(3): 513-517.