

EDTA가 생쥐 분리할구의 체외 발달에 미치는 영향

곽대오 · 김진구* · 김영수 · 박충생**

경상대학교 생물교육과

Effect of EDTA on the *In Vitro* Development of Isolated Mouse Blastomeres

D. O. Kwack, S. K. Kim*, Y. S. Kim and C. S. Park**

Department of Biology Education, Gyeongsang National University

SUMMARY

To investigate the effect of EDTA on the *in vitro* development of blastomeres isolated from 2, 4, and 8-cell embryos (termed 1/2, 1/4 and 1/8 blastomeres, respectively) of ICR strain mice, those were cultured *in vitro* in 35 mm culture dishes containing NaHCO_3 -BMOC-3 medium supplemented with 10, 50, 100, or 500 μM of EDTA at 37°C for 72hrs. under the atmosphere of 5% CO_2 and 95% air.

EDTA supplementation of 10, 50, or 100 μM to medium significantly ($P < 0.01$) increased blastocyst formation rate compared with controls in 1/2 (58.3, 63.7, and 61.3% vs 21.6%), 1/4 (54.7, 57.5 and 62.2% vs. 21.3%), and 1/8 blastomeres (46.2, 48.7, and 57.7% vs. 19.1%). Whereas, it was significantly ($P < 0.01$) decreased to 4.5, 2.3, and 2.0% for 1/2, 1/4 and 1/8 blastomeres, respectively by the EDTA supplementation of 500 M.

Both the nuclear number ($P < 0.05$) and diameter of blastocysts ($P < 0.01$) developed from blastomeres were significantly affected by the origin of blastomeres. The nuclear number of blastocysts developed from 1/2, 1/4, and 1/8 blastomeres ranged 28.3 ± 1.3 , 24.18 ± 1.2 , and 19.84 ± 0.9 , respectively. And the diameter of those blastocysts was 87.2 ± 1.1 , 56.4 ± 0.9 , and $39.2 \pm 0.8 \mu\text{M}$, respectively.

서 론

포유동물의 배는 배 발생 초기 일정기간까지는 각 할구의 운명이 결정되지 않으므로 그 이전에 배로부터 할구를 분리하여 배양하면 발생의 전능성을 갖는 배반포로 발달시킬 수 있다. 따라서 한 개체로부터 유전적 특성이 동일한 다수의 수정란을 확보하여 일관성 쌍자의 생산은 물론 가족에 있어서 생식효율성의 증대, 품종의 개량, 성의 사전감별을 통

한 인위적 성의 지배, 그리고 유전적으로 동일한 동물의 특수연구 등에 응용이 가능하다. 특히 포유동물 배의 각 발달 단계별 분리할구의 발생능을 검토하는 것은 배의 초기 분화 시기 및 분화 기작을 밝히는 데는 물론 복제동물 생산을 위한 기초 연구로서도 중요하다.

포유동물의 배 분리할구에 대한 연구는 Nicholas와 Hall(1942)이 흰쥐의 2세포기 배에서 분리된 분리할구가 발생에 전능성을 가지고 있음을 확인한 이래 분리할구의 착상전 발생에 관한 연구가 활발

*밀양산업대학교 축산학과(Department of Animal Science, Miryang National University of Industry)

**경상대학교 축산학과(Department of Animal Science, Gyeongsang National University)

하게 수행되어 왔다.

Tarkowski와 Wroblewska(1967)는 생쥐 4세포기와 8세포기 배에서 분리된 할구의 40%와 15%가 각각 배반포까지 발달하였음을 보고하였고, Fiser와 Macpherson(1975)은 생쥐 2세포기 및 4세포기 배에서 얻어진 분리할구를 체외배양한 결과 44.6% 및 34.9%가 각각 배반포로 발달하였다고 하였다. 또한 Nagashima 등(1984)과 김 등(1986)은 생쥐의 상실배를 양분한 후 체외배양한 결과 각각 79.5% 및 75.0% 배반포로 발달하였다고 보고하였다. 정 등(1988)은 pronase처리 생쥐 2, 4, 8세포기 배의 분리할구를 체외 배양하여 64.7%~87.1%를 배반포까지 발달시켰다고 하였다.

이처럼 분리할구의 발능과 체외발달에 관하여 많은 검토가 이루어지고 있으며 최근에는 단위발생관과 배의 할구를 재조합하여 개체로의 발달 가능성을 시사하고 있다(이와 이, 1990). 그러나 이에 대한 지금까지의 연구는 주로 할구의 분리방법과 발달 가능성에 국한되었고(Nagashima와 Ogawa, 1981; Baker와 Shea, 1985; 윤 등, 1990) 체외발달의 증진이나 이식 후의 수태율, 생존율 등에 대해서는 대동물은 물론 실험동물에 있어서도 극히 제한적으로 연구가 이루어져 왔다. 따라서 분리할구의 이용성을 넓히기 위해서는 무엇보다도 체외배양을 통한 배발달 증진에 관한 연구가 선행되어야 할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 일부 계통의 생쥐 배의 초기 배의 배양시에 나타나는 2-cell block의 극복과 초기 배의 발달에 유익한 것으로 알려져 있는 유기착염제인 ethylenediaminetetra acetic acid(EDTA)가 생쥐 분할구의 체외발달에 미치는 영향을 밝히고 아울러 생쥐 분리할구의 체외발달 증진에 관한 방법을 확립하고 대동물에 응용할 수 있는 기초를 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

ICR계통의 생쥐 4~6주령의 암컷과, 10~12주령의 수컷을 본 실험에 사용하였다. 실험동물의 사육환경은 실내온도를 20~23℃로 유지하였으며, 조명

은 1일 14시간(08:00~22:00)으로 조절하였고, 물과 사료(실험동물용 사료, 삼양유지)는 자유로이 급식시켰다.

2. 배양액

0.5%의 BSA(Sigma, U.S.A.)가 함유된 Brinster medium(BMOC-3)을 기본 배양액으로 하여 분리할구의 조작용 배양액으로는 NaHCO_3 가 포함되어 있지 않는 대신 기본 배양액에 5.95 mg/ml의 HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid; Sigma, U.S.A.)가 첨가된 것을, 그리고 체외배양용 배양액으로는 기본 배양액에 2.11 mg/ml의 NaHCO_3 가 함유된 것을 사용하였다.

모든 배양액은 제조시 0.2 μm millipore filter로써 제균한 다음 4℃의 냉장고에 보관하면서 1주일 내에 사용하였는데 사용시 다시 millipore filter로써 제균하였다.

3. 배의 회수 및 할구의 분리

(1) 과배란 유기 및 수정

암컷 생쥐에 PMSG(Peamax, Japan) 5 IU를 주사하고 48시간 후에 hCG(Sigma, U.S.A.) 5 IU를 동일한 방법으로 주사하여 과배란을 유기하였다.

수정을 위하여 hCG를 주사함과 동시에 수컷과 1:1의 비율로 하루밤 동안 합사시켜 자연교미를 유도하였으며, 다음 날 아침 질전 유무를 확인하여 질전이 형성되어있는 개체만을 골라 실험에 사용하였으며 질전이 확인된 날을 수정 제1일로 정하였다.

(2) 배의 회수

각 발달 단계별 즉 2, 4, 8세포기의 배를 회수하기 위하여 hCG주사 후 44~45, 55~56, 65~66시간에 각각 생쥐를 경추탄구법으로 도살하여 난관을 적출한 다음 실체현미경하에서 끝이 무딘 30 1/2 guage 주사바늘을 사용하여 5.95 mg/ml의 HEPES가 함유된 BMOC-3(HEPES-BMOC-3)로써 난관을 관류하여 배를 회수하였다. 회수된 배는 HEPES-BMOC-3로써 3~4회 세척한 다음 정상적인 배만을 선별하여 실험에 사용하였다.

(3) 투명대 제거 및 할구의 분리

형태적으로 정상적인 배만을 골라 투명대를 연하

시키기 위해 300 IU/ml의 pronase(Sigma, U.S. A.) 용액에 3~5분간 노출시켰다. 실체현미경 하에서 관찰하면서 투명대가 연화되었을 때에 다른 신선한 용액으로 옮겨가며 4~5회 반복하여 세척하였는데 이때 투명대가 완전히 제거하지 않은 것은 할구에 대한 효소의 직접적인 영향을 피하기 위함이었다. 이어 할구의 분리를 위하여 Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 이 함유되지 않은 D-PBS에 20~30분간 배양한 다음 Hepes-BMOC-3 에서 다시 4~5회 세척하고, 세척시 pipetting 조작을 약간 강하게 함으로써 잔존 투명대를 완전히 제거하였는데, 이 때 배로 부터 대부분의 할구가 개별적으로 분리되었다. 분리되지 않은 할구에 대해서는 직경 10 μm 이하의 미세 초자봉을 이용하여 물리적으로 분리하였다.

4. 분리할구의 체외배양

배양액에 대한 EDTA의 첨가가 분리할구의 체외 발달에 미치는 영향을 조사하기 위하여 10, 50, 100, 400 μM 의 EDTA가 첨가된 배양액으로 직경 35 mm의 배양접시에 4~5개의 소적울 만든 다음

liquid paraffin oil로 피복하여 37°C, 5% CO₂와 95% 공기 조건하에서 2시간 동안 평형시킨 뒤 소적당 10개 내외의 분리할구를 옮겨 5% CO₂와 95% 공기 조건하에서 72시간 동안 배양하였다.

5. 배반포로 발달한 분리할구의 핵 수와 직경의 측정

배반포로 발달한 분리 할구의 핵 수의 측정은 Pusel 등(1985)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉 2.3% sodium citrate dihydrate 0.75 ml과 ethanol 0.25 ml 및 1 mg/ml농도의 hoechst 15 μl 를 혼합하여 조제한 형광 염색액을 매 실험시 마다 만들어 사용하였는데 silicon (Sigmacote, U.S.A.)처리를 한 slide glass에 trypan blue 15 μl 를 떨어뜨려 소적을 만들어 배반포로 발달한 분리할구를 30~60초간 소적액 내에 두었다가 내경이 분리할구보다 적은 피펫으로 trypan blue만 완전히 제거하였다. 이어 hoechst염색액 15 μl 를 가하여 3~5분간 배양시킨 후 다시 pipet으로써 형광 염색액만을 제거하여 곧 바로 polymount (Polyscience, U.S.A.) 15 μl

Table 1. *In vitro* development of isolated blastomeres in NaHCO₃-BMOC-3 medium supplemented with several concentrations of EDTA

Blastomeres isolated from	Concentration of EDTA	No. of blastomeres cultured	No. & (%) of blastomeres developed to	
			Morula	Blastocyst
2-cell embryos	None	116	36(31.0) ^b	25(21.6) ^b
	10 μM	108	71(65.7) ^c	63(58.3) ^c
	50 μM	113	78(69.0) ^c	72(63.7) ^c
	100 μM	212	151(71.2) ^c	130(61.3) ^c
	500 μM	44	3(6.8) ^c	2(4.5) ^a
4-cell embryos	None	133	38(28.6) ^b	35(26.3) ^b
	10 μM	139	84(60.4) ^c	76(54.7) ^c
	50 μM	146	95(65.1) ^c	84(57.5) ^c
	100 μM	230	155(67.4) ^c	143(62.2) ^c
	500 μM	86	4(4.7) ^a	2(2.3) ^a
8-cell embryos	None	141	28(19.9) ^b	27(19.1) ^c
	10 μM	132	64(48.5) ^c	61(46.2) ^c
	50 μM	154	80(52.0) ^c	75(48.7) ^c
	100 μM	272	159(58.5) ^c	157(57.7) ^c
	500 μM	99	3(3.0) ^a	2(2.0) ^a

Values with different superscripts in the same column of each blastomere group are significantly ($P < 0.01$) different.

를 떨어뜨린 후 cover glass를 덮어 200배의 형광도립현미경(Nikon, Japan)하에서 핵 수를 측정하였다. 한편 배반포의 직경은 ocular micrometer를 이용하여 도립현미경 하에서 측정하였다.

5. 통계학적 분석

통계학적인 분석은 Microstat Statistical Program Package(Ecosoft Inc., 1984)를 사용하여 분리할구의 체외발달 성적은 χ^2 -test를 실시하였고 배반포로 발달한 분리할구의 핵 수 및 직경은 분산분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 배양액에 대한 EDTA 첨가가 분리 할구의 체외 발달에 미치는 영향

배양액에 대한 10, 50, 100, 500 μM 의 EDTA 첨가가 분리할구의 체외발달에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 2세포기의 분리할구의 경우 10, 50, 100 μM 의 EDTA첨가구에서 배반포로 발달한 비율이 각각 58.3, 63.7, 61.3%로서 대조구와 500 μM 첨가구의 21.6, 4.5%에 비해 유의적($P < 0.01$)으로 높은 발달율을 나타내었고, 4세포기 분리할구의 배반포로의 발달율도 10, 50, 100 μM 의 EDTA를 첨가하였을 때 각각 54.7, 57.5, 62.2%로서 대조구와 500 μM 첨가구의 26.3, 2.3%에 비해 유의적($P < 0.01$)으로 높은 발달율을 보였다. 또한 8세포기 분리할구가 배반포까지 발달한 비율이 대조구 10, 50, 100, 500 μM 의 EDTA 첨가구에서 각각 19.1, 46.2, 48.7, 43.7, 2.0%로서 2, 4세포기 분리할구에서와 마찬가지로 10, 50, 100 μM 의 EDTA 첨가구에서 대조구와 500 μM 첨가구에 비해 유의적($P < 0.01$)으로 높은 발달율을 얻었다.

Abramczuk 등(1977)이 비근교 계통으로서 2-cell block 현상을 나타내는 ICR 계통 생쥐 1세포기 배를 BSA가 함유된 Whitten 배양액에 EDTA를 첨가하여 체외배양한 결과 70% 이상이 배반포로 발달하였다고 보고한 이래 생쥐 초기 배의 체외 발달에 미치는 EDTA의 유익한 효과에 관한 연구가 여러 연구자들에 의해 이루어져 왔다. 전과 정(1984)은 ICR 및 C₃H 계통의 생쥐 2세포기 배를 10

μM 의 EDTA가 첨가된 배양액으로 체외배양한 결과 49.3, 71.7%가 배반포로 발달하였다고 하였으며, Hoshi와 Toyada(1985)는 ICR 계통 생쥐 1세포기 체외 수정란은 20~100 μM 의 EDTA가 함유된 Whitten 배양액에서 90% 이상이 배반포로 발달하여 대조구의 31%의 발달율에 비해 현저히 높은 발달율을 나타내었다고 보고하였다.

또한 Fissore 등(1989)은 20 μM 의 glycine 또는 alanine을 Earle's Balanced Salts Solution (EBSS)에 첨가하여 근교계통인 C₅₇BL/6와 DBA/2J 간의 제1대 교잡종인 B₆D₂F₁ 계통 생쥐 1세포기 배를 체외 배양하면 이들 아미노산들이 효과적인 착염제로서의 기능을 발휘하여 배반포로의 발달이 촉진되나 10 μM 의 EDTA 첨가구에 비해서는 그 발달율이 현저히 낮아 배의 체외발달에는 EDTA의 존재가 단백질 또는 아미노산들 보다 더 중요하다고 보고하였고, Poueymirou 등(1989)은 CZB 배양액과 100 μM 의 EDTA가 첨가되거나 첨가되지 않은 Whitten 배양액으로 2-cell block 현상을 나타내는 CF-1 계통 생쥐 1세포기 배를 체외 배양하면 전반적인 단백질 합성 양식은 비슷하나 TRPs(transcriptional-requiring proteins)의 합성은 CZB, EDTA 첨가 Whitten 배양액에 비해 EDTA 무첨가 Whitten 배양액에서 현저히 지연되는 양상을 보였는데 이들 TRPs의 조기합성이 2-cell block 해체와 깊이 관련이 있다고 하였다.

본 연구에서도 배양액에 대한 10, 50, 100 μM 의 EDTA 첨가가 분리할구의 체외발달을 촉진하는 것으로 나타나 이들 연구자들의 보고와 거의 일치하는 경향이다. 또한 본 연구의 결과로 볼 때 EDTA는 화학적으로 성분이 명확한 배양액에서 생쥐 분리할구의 발생을 개선하고 배반포로의 발달에 유익하게 작용하는 것이 분명하다. 이것은 생쥐 1세포기 체내 외 수정란의 체외발달에 대한 EDTA의 영향을 조사한 Abramczuk 등(1977)과 Hoshi와 Toyoda(1985)의 보고와 기본적으로 일치하고 있고 초기 체내 외 수정란, 분리할구의 체외발생을 지배하는 요인이 기본적으로 동일함을 시사하고 있다.

EDTA가 배의 체외배양시 어떤 기작에 의해 배의 발달을 촉진하는지는 정확히 밝혀지지 않았으나 대개 어떤 금속 이온과의 착염에 의해 그러한 효과

가 나타나는 것으로 추정하고 있다. 일반적으로 EDTA는 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 과의 착염에 이용되지만, 본 실험에 사용한 NaHCO_3 -BMOC-3 배양액 중에는 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 이온이 최소 2.2 mM 이상 포함되어 있어 EDTA의 유익한 효과가 인정되는 최저 농도에 비해 200배 이상 높을 뿐만 아니라 EDTA와 마찬가지로 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 이온과 착염을 하는 ethyleneglycolbis(β -aminoethyl ether)-N, N'-tetraacetic acid(EGTA) 100 μM 을 Whitten 배양액에 첨가하여 생쥐 1세포기 체외 수정란을 체외배양하였을 때 체외발달율이 대조구와 차이가 없었다고 한 Hoshi와 Toyoda(1985)의 보고로 미루어 볼 때 본 연구에서 분리할구의 체외발달에 미친 EDTA의 유익한 효과가 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 과의 착염에 의한 것이 아니라 이들 이온외 다른 금속 이온과의 착염에 의한 것이라 생각할 수 있다.

세포 배양 과정중의 오염물질에 중금속 이온이 포함될 가능성이 있으며 그러한 중금속 이온의 오염은 EDTA에 의해 극복될 수 있는데 실제로 생쥐 배양세포에 대한 Cd 등의 중금속 이온들의 독성은 배양세포가 중금속 이온에 노출된 후 2시간 이내에 EDTA를 가해 줌으로써 그 독성은 중화되는 것으로 보고된 바 있다(Borenfreund 와 Puerner, 1986). 또한 정제과정과 원액 저장과정 중 중금속 이온의 오염 가능성이 높은 아미노산들이 착염체로서의 효과가 있으며(Lindenbaum, 1973; Kosakowska 등, 1988), mM 수준의 아미노산을 함유한 배

양액으로 수정란을 배양할 때 100 μM 의 EDTA 첨가수준이 10 μM 에 비해 체외 수정란의 체외 발달에 더욱 효과적인 영향을 미쳤다는 보고(Mehta와 Kiessling, 1990)가 배양액에 첨가된 EDTA는 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 이외의 독성이 있는 중금속이온과 착염을 한다는 가정을 뒷받침 해주고 있다. Abramczuk 등 (1977)은 ICR 계통 생쥐 1세포기 배를 Whitten배양액으로 체외배양할 때 배양액에 대한 EDTA의 최적 첨가수준은 10.8 μM 이라고 하였으나 Hoshi와 Toyoda(1985)는 ICR 계통 생쥐 1세포기 체외 수정란의 체외 발달에 대한 Whitten 배양액내 최적 EDTA농도는 20~100 μM 이라 보고하였다. 또한 아미노산을 함유하고 있는 Ham's F-10배양액내에서는 10.8 μM 보다 더 높은 농도의 EDTA가 첨가되어 있을 때 생쥐 배의 체외 발달이 더욱 촉진된다는 보고(Loutradis 등, 1987)가 있고, Mehta와 Kiessling(1990)은 glycine이나 alanine 등의 아미노산이 함유된 EBBS 배양액에서의 B₆D₂F₁ 계통 생쥐 1세포기 체외 수정란의 체외발달에 대해 10 μM 수준 보다는 100 μM 의 EDTA 첨가수준이 보다 효과적이라 하였다.

본 연구에서도 10, 50, 100 μM 의 EDTA를 0.5% BSA 함유된 NaHCO_3 -BMOC-3 배양액에 첨가하였을 때 EDTA 농도간에는 유의적인 차이가 없이 2, 4, 8세포기 분리할구의 배반포로의 발달에 유익한 영향을 미쳤다. 연구자들에 따라 배양액에 대한 EDTA의 최적 농도가 다른 것은 사용한 배양액의

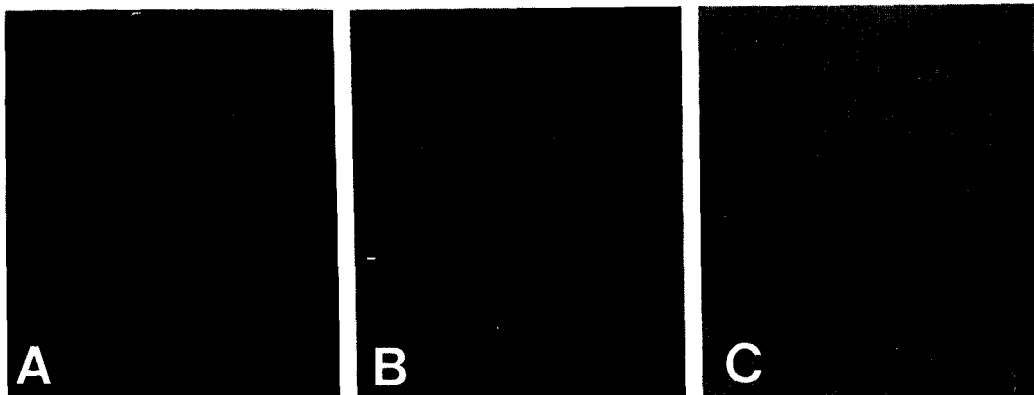


Fig. 1. Blastocysts developed *in vitro* from blastomeres isolated from 2-cell(A), 4-cell(B), and 8-cell(C) embryos($\times 200$).

조성이 다른데 따른 결과로 추정되는데 아미노산이나 단백질을 함유하지 않은 배양액에는 10 μM 내외의 EDTA 첨가가 적당하나 이들 물질이 함유된 배양액에 대해서는 보다 높은 수준의 EDTA 첨가가 효과적인 것으로 생각된다. 그리고 본 연구에서 500 μM 의 EDTA 첨가구에서는 오히려 분리할구의 체외발달을 저해하는 것으로 나타났는데 이는 고농도의 EDTA 첨가로 인해 배양액내의 중금속과 같은 유해물질뿐만 아니라 배발생에 필요한 물질까지 EDTA에 착음이 형성되어 분리할구의 체외발달을 저해, 퇴행시킨 결과로 추정되나 이에 관한 보다 구체적이고 정확한 연구가 앞으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

한편 배양액에 ^{14}C 가 표지된 EDTA를 첨가하여 5시간 동안 생쥐 1세포기 수정란을 배양하여도 배내로 EDTA가 유입되지 않으며(Abramczuk 등, 1977), 생쥐 1세포기 배의 위관강과 세포질내로 EDTA를 주입한 결과 위관강 내로 EDTA를 미세주입한 배만이 배반포로 정상적으로 발달하였다는 보고(Fissore 등, 1989)로 미루어 볼 때 EDTA는 난황막 등의 배 표면부 또는 배양액내에서 독성 중금속 이온과 착염하거나 배의 발달에 중요한 다른 요소들의 이동을 용이하게 함으로써 배의 체외 발달에 유의한 영향을 미치는 것으로 사료된다.

2. 분리할구로 부터 발달한 배반포의 핵 수와 직경

EDTA가 첨가된 배양액에서 2, 4, 8세포기 분리할구로 부터 발달한 배반포의 핵 수와 직경을 측정 한 결과는 Table 2와 같다. Table 2에서 보는 바와 같이 2, 4, 8세포기의 분리할구로부터 발달한 배반

포에서 배양액에 첨가한 EDTA 농도에 따른 핵 수와 직경에는 차이가 없었으나 모든 처리구에서 2, 4, 8세포기 분리할구에서 발달한 배반포의 핵 수는 각각 28.3 ± 1.3 , 24.18 ± 1.2 , 19.84 ± 0.9 개로, 직경은 각각 87.2 ± 1.1 , 56.4 ± 0.9 , 39.2 ± 0.8 μm 로 나타나 배양전 분리할구의 기원에 따라 배반포의 핵 수 ($P < 0.05$)와 직경($P < 0.01$)에 유의적인 차이가 있었다.

생쥐 분리할구로 부터 발달한 배반포의 핵 수와 직경에 관해서는 선행 연구를 찾아 볼 수 없고 생쥐 핵 이식란에서 이러한 연구가 일부 이루어져 왔다. Robl 등(1986)은 탈핵한 2세포기의 수핵란에 2, 8세포기의 핵을 이식하여 66시간 동안 체외배양을 실시하여 배반포로 발달한 배의 핵 수는 각각 39 ± 4 , 25 ± 4 개 였다고 하였고, Kono와 Tsunoda(1989)도 4, 8세포기의 공핵란을 이식받은 배를 체외에서 발달시킨 배반포의 핵 수는 각각 30 ± 2.4 , 22 ± 1.3 개였다고 보고하였다. 또한 박 등(1990)은 탈핵한 2, 4, 8세포기 수핵란에 같은 세포기의 핵을 이식한 후 배반포로 발달시켜 핵 수와 직경을 측정 한 결과 세포기에 따라 핵 수는 33.1 ± 1.2 , 27.5 ± 1.8 , 24.0 ± 1.3 개, 직경은 각각 100.7 ± 1.1 , 97.9 ± 1.9 , 102 ± 2.1 μm 로 나타나 핵 수는 세포기에 따라 유의적 ($P < 0.05$)인 차이가 있었으나 직경은 유의적($P < 0.05$)인 차이가 없었다고 하여 핵 수에서는 본 연구의 결과가 일치한다.

한편 돼지 4~6세포기 분리할구가 배반포로 발달 하였을 때의 핵 수는 정상 배반포의 핵 수인 1/3 정도였다는 본 연구의 결과와 일치되는 보고(Moore, 1969)가 있는데, 일반적으로 세포기가 늦은 배로 부터 얻은 분리할구는 체외에서 배반포까지의 발달

Table 2. The nuclear number and diameter of blastocysts developed in vitro from 1/2, 1/4, and 1/8 blastomeres

Blastomeres isolated from	No. of blastocysts stained	No. of nuclei Mean \pm S.E.	Diameter of blastocysts(μm) Mean \pm S.E.
2-cell embryos	48	28.3 ± 1.3^c	$87.2 \pm 1.1\text{C}$
4-cell embryos	48	24.18 ± 1.2^b	$56.4 \pm 0.9\text{B}$
8-cell embryos	46	19.84 ± 0.9^a	$39.2 \pm 0.8\text{A}$

Mean \pm S.E with different small ($P < 0.05$) and capital ($P < 0.01$) superscripts in the same column are significantly different.

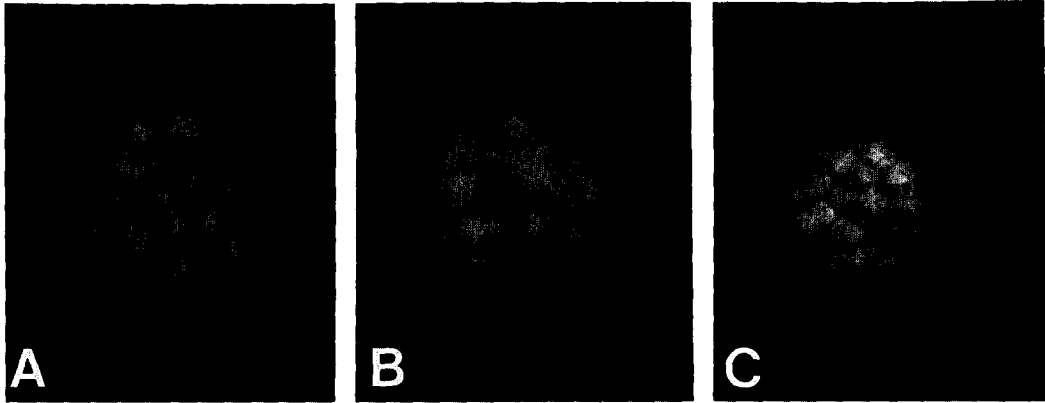


Fig. 2. Fluorescent staining of blastocysts developed *in vitro* from blastomeres isolated from 2-cell(A), 4-cell(B) and 8-cell(C) embryos($\times 200$).

은 가능하나 세포수의 부족으로 인하여 이식 후 착상이 어려운 것으로 생각된다.

적 요

EDTA가 생쥐 2, 4, 8세포기 배로 부터 유래한 분리할구의 체외발달에 미치는 효과를 밝히기 위하여 10, 50, 100, 500 μM 의 EDTA가 첨가된 NaHCO_3 -BMOC-3 배양액으로 분리할구들을 체외 배양한 결과는 다음과 같다.

배양액에 대한 10, 50, 100 μM 의 EDTA 첨가는 농도간에는 유의적($P < 0.05$)인 차이없이 생쥐 분리할구의 체외발달을 대조구에 비해 유의적($P < 0.01$)으로 촉진하여 2세포기 분리할구에는 각각 58.3, 63.7, 61.3%가, 4세포기 분리할구에서는 54.7, 57.5, 62.2%가, 8세포기 분리할구에서는 각각 46.2, 48.7, 57.7%가 배반포로 발달하였으나 500 μM 의 EDTA 첨가는 오히려 분리할구의 체외발달을 저해하는 결과를 나타내었다.

또한 배반포로 발달한 분리할구의 핵 수와 직경에서는 EDTA 농도에 따른 차이는 없었으나 2, 4, 8세포기 분리할구로 부터 발달한 배반포의 핵 수는 각각 28.3 ± 1.3 , 24.18 ± 1.2 , 19.84 ± 0.9 개로, 직경은 각각 87.2 ± 1.1 , 56.4 ± 0.9 , 39.2 ± 0.8 μM 으로 나타나 배양전 분리할구 기원에 따라 배반포의 핵

수($P < 0.05$)와 직경($P < 0.01$)에 유의적인 차이가 있었다.

참고문헌

- Abramczuk T, Solter D and Koprowski H. 1977. The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. *Dev. Biol.* 61:378~383.
- Baker RD and Shea BF. 1985. Commercial splitting of bovine embryos. *Theriogenology* 23 (1):3~12.
- Borenfreund E and Puerner JA. 1986. Cytotoxicity of metals, metal-metal and metal-chelator combinations assayed *in vitro*. *Toxicology* 38:121~134.
- Fiser PS and Macpherson. JW. 1975. Development embryonic structures from isolated mouse blastomeres. *Can. J. Anim. Sci.* 56:33~36.
- Fissore RA, Jackson KV and Kissling AA. 1989. Mouse zygote development in culture medium without protein in the presence of ethylenediaminetetraacetic acid. *Biol. Rep-*

- rod. 41:835~841.
- Hoshi M and Toyoda T. 1985. Effect of EDTA on the preimplantation development of mouse embryos fertilized. *in vitro*. Jpn. J. Zootech. Sci. 56:931~937.
- Kono T and Tsunoda Y. 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.
- Kosakowska A, Falkowski L and Lewandowska J. 1988. Effect of amino acids on the toxicity of heavy metals to phytoplakton. Toxicology 40:552~538.
- Lindenbaum A. 1773. A survey of naturally occurring chelating ligands. Adv. Exp. Med. Biol. 40:67~77.
- Loutraids DJD and Kiessling AA. 1987. Hypoxanthine causes a 2-cell block in random-bred mouse embryos. Biol. Reprod. 37:11-16.
- Metha TS and Kissling AA. 1990. Development potential of mouse embryos conceived *in vitro* and cultured in ethylenediaminetetraacetic acid with or without amino acids or serum. Biol. Reprod. 43:600~606.
- Moor NW, Polge C and Rowson LEA. 1969. The survival of single blastomeres of pig eggs transferred to recipients gilts. Aust. J. Biol. Sci. 22:979~982.
- Nagashima H and Ogawa S. 1981. Studies on the developmental potential and survival after the deep freezing of microsurgically dichotomized morula embryos in rats and rabbits. Jpn. J. Anim. Reprod. 27:12~19.
- Nagashima H, Matsui K, Sawaski T and Kano Y. 1984. Production of monozygotic mouse twins from microsurgically bisected morula. J. Reprod. Fert. 70:357~362.
- Nicholas JS and Hall BV. 1942. Experiments on developing rats. II. The development of isolated blastomeres and fused egg. J. Exp. Zool. 90:441~459.
- Poueymirou WT, Conover JC and Schultz RM. 1989. Regulation of mouse preimplantation development: differential effects of CZB medium and Whitten's medium on rates and patterns of protein synthesis in 2-cell embryos. Biol. Reprod. 41:317~322.
- Pursel VG, Wall RJ, Rexroad, Jr. CE, Hammer RE and Brinster RL. 1985. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. Theriogenology 24:687~700.
- Robl JM, Gilligan B, Cristser ES and First NL. 1986. Nuclear Transplantation in mouse embryos: assessment of recipient cell stage. Biol. Reprod. 34:733~739.
- Tarkowski AK and Wroblewska J. 1967. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. J. Embryol. Exp. Morph. 18:155~180.
- 김남형, 정길생, 노환철, 백운화, 이경관. 1986. 생쥐 수정란의 양분에 의한 일관성 상태의 생산. 한국축산학회지. 28:527~634.
- 박희성, 이효종, 최상용, 박충생. 1990. 생쥐 수정란의 핵이식 후 체외발달에 관한 연구. 한국가축번식학회지. 14:205~211.
- 전승제, 정길생. 1984. 생쥐 난자의 시험관내 수정 및 발달. 한국가축번식학회지. 8(2):110~115.
- 정덕수, 이상진, 정길생. 1988. 생쥐배 분할구의 *in vitro* 발달에 관한 연구. 한국가축번식학회지. 12:132~140.
- 이철상, 이경광. 1990. 생쥐 8세포기 할구의 발생능. 한국축산학회지. 32(3):131~138.
- 윤창현, 강대진, 박충생, 민관식, 오석두, 이은봉. 1990. 생쥐 초기배의 분리 할구와 분할배의 체외 배양. 한국축산학회지. 32(2):781~784.