

EDTA가 생쥐 단위발생란의 체외 발달에 미치는 영향

곽대오 · 김선구* · 김영수 · 박충생**

경상대학교 생물교육과

Effect of EDTA on the *In Vitro* Development of Parthenogenetic Mouse Eggs

Kwack, D. O., 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 parthenogenetic eggs of ICR strain mice, those were cultured in 35mm culture dishes containing NaHCO_3 -BMOC-3 medium supplemented with 10, 50, 100, or 500 μM of EDTA at 37°C for 96hrs. under the atmosphere of 5% CO_2 and 95% air.

EDTA supplementation of 10, 50, or 100 μM to medium significantly ($P < 0.01$) increase morula and blastocyst formation rate compared with controls in haploid (19.8, 25.9, 39.0% vs. 0.0%), diploid (23.3, 23.5, 42.4% vs. 0.0%), and immediately cleavaged eggs (21.3, 26.6, 40.5% vs. 0.0%). And compared with 10, or 50 μM of EDTA supplementation, significantly ($P < 0.01$) higher morula and blastocyst formation rate resulted from EDTA supplementation of 100 μM .

Both the nuclear number and diameter of blastocysts developed from parthenogenetic eggs were not affected by the morphological types when they were cultured, or the supplementary concentrations of EDTA. The nuclear number of blastocysts developed from haploid, diploid, and immediately cleavaged eggs was 44.8 ± 1.2 , 45.2 ± 1.5 , and 45.4 ± 1.8 , respectively. And the diameter of those eggs ranged 104.4 ± 1.8 , 104.3 ± 1.2 , and $103.8 \pm 1.3 \mu\text{m}$, respectively.

I. 서 론

Pincus(1936)가 토끼의 난자에서 단위발생을 유기한 이래 이 분야에 관하여 많은 연구가 이루어져 왔다. 단위발생이란 음성 배우자의 어떠한 관여도 없이 자성 배우자가 단독으로 배를 발생시키는 과정을 말한다(Kaufman, 1979). 단위발생을 유기하는 데는 물리적 자극법(Uehara와 Yanagimachi, 1977), 효소 처리법(Marcus, 1990), 단백질 합성 억제제 첨가법(Siracus 등, 1978), 전기자극법(Tarkowski 등,

1970; Onodera와 Tsunoda, 1989) 및 ethanol 처리법(Kaufman, 1982; Cuthbertson, 1983; Barton 등, 1985) 등이 이용되는데 이러한 방법들에 의해 난자가 활성화되는 기전으로는 난자 세포내의 pH변화(Johnson 등, 1976), 세포 골격계의 붕괴(Nicolson, 1976) 및 세포막의 전기적 특성변화(Seeman 등, 1974) 등이 알려져 있다. 이중 ethanol 처리법은 7% 내외의 ethanol로써 5분 정도 난자를 처리하여 단위발생을 유기하는 방법인데 Dyban과 Kozhai(1980)에 의해 체계화되었다. Ethanol이 생쥐난자를 활성화시

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

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

키는 기전은 명확하지 않으나 Steinhardt 등(1974)과 Cuthbertson 등(1981)에 의하면 세포내 Ca^{2+} 의 일시적 급증에 의하여 난자가 활성화 된다고 하였다.

지금까지 단위발생에 관한 연구는 주로 단위발생의 유기방법에 관한 것들이 주류를 이루고 있으며 체외발달 증진에 대한 연구는 제한적으로 이루어져 왔다. 따라서 단위발생 유기 후 염색체 이상 분석, chimera 작제, 핵치환, 유전자 조절 등 세포유전학, 발생학 및 신종 동물 생산 연구에 폭넓게 응용될 수 있는 단위 발생란의 이용성을 넓히기 위해서는 무엇보다도 체외배양을 통한 단위 발생란의 발달 증진에 관한 연구가 선행되어야 할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 일부 계통 생쥐 초기배의 체외배양시에 나타나는 2-cell block의 극복과 배의 발달에 유용한 효과가 있는 것으로 알려져 있는 유기 착염제인 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)가 생쥐 단위발생란의 체외발달에 미치는 영향을 밝혀 이들의 체외발달 증진에 관한 방법을 확립함과 아울러 대동물에 응용할 수 있는 기초를 마련하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

ICR계통의 생쥐 4~6주령의 암컷을 본 실험에 사용하였다. 실험동물의 사육환경은 실내온도를 20~23℃로 유지하였으며, 조명은 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 단위 발생란의 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 μ m millipore filter로써 제공한 다음 4℃의 냉장고에 보관하면서 1주일 내에 사용하였는데 사용시 다시 millipore filter로써 제공

하였다.

3. 단위발생의 유기 및 단위 발생란의 형태학적 분류

1) 과배란의 유기 및 채란

생쥐에 PMSG(Peamax, Japan) 5 IU를 주사하고 48~50시간 후에 hCG(Sigma, U.S.A.) 5 IU를 동일한 방법으로 주사하여 과배란을 유기하였다.

난자의 채취는 hCG투여 20~22시간 후에 경추탈구법으로 실험동물을 도살한 다음 난관을 적출하여 Dubecco's Phosphate Buffered Saline(D-PBS)에 ethanol을 혼합한 7% ethanol 용액에 담근 다음 실체현미경하에서 난관 팽대부를 21 gauge 주사바늘로 천자하여 채란하였다.

2) 단위발생의 유기

Ethanol 처리에 의한 단위발생의 유기는 Kaufman(1973)의 방법을 변용하여 실시하였다. 즉 7% ethanol 용액에서 채란을 실시함과 동시에 5분간 처리한 다음 5.59 mg/ml의 Hepes가 첨가된 BMOC-3 소적에 5~6회 세척하고 100 IU의 hyaluronidase가 용해되어 있는 D-PBS에 2~3분간 노출하여 난구세포를 제거한 다음 다시 Hepes-BMOC-3 소적에 5~6회 세척하였다. 이어서 직경 35mm의 배양접시에 배양액을 미리 만들어 5% CO_2 , 95% 공기조건과 37℃에서 2시간 동안 평형시킨 $NaHCO_3$ -BMOC-3 소적에 옮긴 다음 37℃, 5% CO_2 및 95% 공기조건하에서 5~6시간 동안 배양하였다.

3) 단위발생란의 형태학적 분류

5~6시간 배양이 끝난 다음 도립현미경(100 \times , Olympus, Japan)하에서 난자들을 Kaufman과 Sachs(1979)의 판정기준에 준하여 감수분열과 세포분열의 유무에 따라 단위발생란을 형태학적으로 분류하였는데, 제 2극체와 하나의 전핵을 가지고 있는 난자를 반수체 단위발생란, 제 2극체 방출이 억제되고 한개 또는 두개의 전핵을 가지고 있는 난자를 이배체 단위 발생란, 그리고 제 2극체를 형성하는 대신에 2개의 할구로 균등하게 나누어진 형태의 난자를 분할란으로 구분하였다.

4. 단위발생란의 체외배양

배양액에 대한 EDTA의 첨가가 단위발생란의 체외 발달에 미치는 영향을 조사하기 위하여 10, 50, 100, 500 μ M의 EDTA가 첨가된 배양액으로 직경 35 mm의 배양접시에 4~5개의 소적을 만든 다음 liquid paraffin oil로 피복하여 37°C, 5% CO₂와 95% 공기 조건하에서 2시간 동안 평형시킨 뒤 소적당 10개 내외의 단위발생란을 옮겨 5% CO₂와 95% 공기 조건하에서 96시간 동안 배양하였다.

5. 배반포로 발달한 단위발생란의 핵 수와 직경의 측정

배반포로 발달한 단위발생란의 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/ml 농도의 hoechst 15 μ l를 혼합하여 조제한 형광 염색액을 매 실험시 마다 만들어 사용하였다. 먼저 silicon (Sigmacote, U.S.A.) 처리를 한 slide glass에 trypan blue 15 μ l를 떨어뜨려 소적을 만든 다음 배반포로 발달한 단위발생란을 30~60초간 소적액 내에 두었다가 내경이 단위발생란보다 적은 피펫으로 trypan blue만 완전히 제거하였다. 이어 hoechst 염색액 15 μ l를 가하여 3~5분간 배양시킨 후 다시 pipette으로써 형광 염색액만을 제거하여 곧 바로 polymount (Polyscience, U.S.A.) 15 μ l를 떨어뜨린 후 cover glass를 덮어 200배의 형광 도립현미경 (Nikon, Japan) 하에서 핵 수를 측정하였다. 한편 배반포의 직경은 ocular micrometer를 이용하여 도립현미경 하에서 측정하였다.

6. 통계학적 분석

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

III. 결과 및 고찰

1. 단위발생란의 형태학적 분류

생쥐 난자를 7% ethanol로써 5분간 처리하여 단위발생란을 유기한 결과는 Table 1과 같다. 실험에 사용된 총 1276개의 난자 중 61.7%인 787개가 반수체란, 12.7%인 162개가 이배체란, 23.2%인 296개가 분할란으로 활성화되어 전체 난자 중 97.6%인 1245개의 난자에서 단위발생이 유기되었다.

이와 같은 결과는 본 연구에서와 동일한 방법으로 C₃H×C₅₇BL 제1세대 교잡종 생쥐 난자에서 단위발생을 유기하여 91.4~94.7%의 난자활성율을 얻었다는 한 등(1987)의 보고에 비해서는 다소 높은 성적이나, 98.6%의 난자 활성율을 얻었다는 이와 이(1990)의 성적에 비해서는 다소 낮은 편인데, 이와 같이 연구자들에 따라 난자 활성율에 차이가 다소 나타나는 것은 ethanol에 난자가 노출되는 기간의 정확도 유지 및 실험에 사용된 난자의 회수시기의 차이에 의한 것으로 추정된다.

2. 배양액에 대한 EDTA 첨가가 단위 발생란의 체외발달에 미치는 영향

배양액에 대한 10, 50, 100, 500 μ M의 EDTA 첨가가 단위발생란의 체외발달에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 반수체란의 경우 10, 50, 100 μ M의 EDTA 첨가구에서 상실배와 배반포로 발달한 비율이 각각 19.8, 25.9, 39.0%로서 대조구와 500 μ M 첨가구의 4.5, 0.0%에 비해 유의적(P<0.01)으로 높은 발달율을 나타내었는데, 그 중에서도 100 μ M 첨가구에서 유의적(P<0.01)으로 가장 높은 발달율을 보였다. 그리고 이배체란의 상실배와 배반포로 발달율도 10, 50, 100 μ M의 EDTA를 첨가하였을 때 각각 23.3, 23.5, 42.4%로서 대조구와 500 μ M 첨가구의 4.0, 0.0%에 비해 유의적(P<0.01)으로 높은 발달율을 보였으며 그 중에서도 이배체란에서와 마찬가지로 100 μ M 첨가구의 성적이 유의적(P<0.01)으로 가장 좋았다. 또한 분할란이 상실배와 배반포까지 발달한 비율이 대조구 10, 50, 100, 500 μ M의 EDTA 첨가구에서 각각 3.8, 21.3, 26.6, 40.5, 0.0%로서 반수체란, 이배체란에서와 같이 10, 50, 100 μ M의 EDTA 첨가구에서 대조구와 500 μ M 첨가구에 비해 유의적(P<0.01)으로 높은 발달율을 얻었고 그 중에서도 역시 100 μ M 첨가구에서 유의적(P<0.01)으로 높은 발달율을 나타내었다.

Table 1. Parthenogenetic activation of mouse oocytes treated with 7% ethanol for 5 min.

No. of eggs treated	No. & (%) of eggs activated			No. & (%) of eggs non-activated
	H*	D*	IC*	
1276	787(61.7)	162(12.7)	296(23.2)	31(2.4)
Total	1245(97.6)			31(2.4)

* Abbreviations : H:Haploid, D:Diploid, IC:Immediately Cleavaged.

Table 2. *In vitro* development of parthenogenetic eggs in NaHCO₃-BMOC-3 medium supplemented with several concentrations of EDTA

Type of Eggs	Concentration of EDTA	No. of eggs cultured	No. & (%) of blastomeres developed to			
			2-cell	4-cell	8-cell	M & B*
Haploid egg	None	132	121(91.7) ^b	62(47.0) ^b	15(11.4) ^b	6(4.5) ^b
	10 μ M	126	121(96.0) ^b	98(77.8) ^c	74(58.7) ^c	25(19.8) ^c
	50 μ M	147	145(98.6) ^b	118(80.3) ^c	88(59.9) ^c	38(25.9) ^c
	100 μ M	259	253(97.7) ^b	218(84.2) ^c	174(67.2) ^c	101(39.0) ^d
	500 μ M	123	43(35.0) ^a	2(1.6) ^a	0(0.0) ^a	0(0.0) ^a
Diploid egg	None	25	22(88.0) ^b	10(40.0) ^b	2(8.0) ^b	1(4.0) ^b
	10 μ M	30	28(93.3) ^b	25(83.3) ^c	16(53.3) ^c	7(23.3) ^c
	50 μ M	34	33(97.0) ^b	28(82.4) ^c	18(53.0) ^c	8(23.5) ^c
	100 μ M	59	57(96.6) ^b	45(76.3) ^c	35(59.3) ^c	25(42.4) ^d
	500 μ M	14	4(28.6) ^a	1(7.1) ^a	0(0.0) ^a	0(0.0) ^a
Immediately Cleavaged egg	None	52	—	18(34.6) ^b	7(13.5) ^b	2(3.8) ^b
	10 μ M	47	—	41(87.2) ^b	28(59.6) ^c	10(21.3) ^c
	50 μ M	64	—	54(84.4) ^c	39(60.9) ^c	17(26.6) ^c
	100 μ M	111	—	108(97.3) ^c	72(64.9) ^c	45(40.5) ^d
	500 μ M	22	—	5(22.7) ^a	0(0.0) ^a	0(0.0) ^a

* Abbreviation : M & B : morula and blastocyst

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

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 유의한 효과에 관한 연구가 여러 연구자들에 의해 이루어져 왔다. 전과 정(1984)은 ICR 및 C₃H 계통의 생쥐 2세포기 배를 10 μ M의 EDTA가 첨가된 배양액으로 체외배양한 결과 49.3, 71.7%가 배반포로 발달하였다고 하였으며, Hoshi와 Toyada(1985)는 ICR 계통 생쥐 1세포기 배의 수정란은 20~100 μ M

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 μ M의 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 μ M의 EDTA 첨가구에 비해서는 그 발달율이 현저히 낮아 배의 체외발달에는 EDTA의 존재가 단백질 또는

아미노산들 보다 더 중요하다고 보고하였고, Pouey-mirou 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 해제와 깊은 관련이 있다고 하였다.

한편 생쥐 단위발생란의 체외발달에 대해 EDTA가 어떠한 영향을 미치는지에 관한 선행연구를 찾아 볼 수 없어 본 연구의 결과를 이들 연구자들의 그것과 정확히 비교하기는 곤란하나 본 연구에서도 배양액에 대한 10, 50, 100 μM 의 EDTA 첨가가 단위발생란의 체외발달을 촉진하는 것으로 나타나 이들 연구자들의 보고와 거의 일치하는 경향이다. 또한 본 연구의 결과로 볼 때 EDTA는 화학적으로 성분이 명확한 배양액에서 생쥐 단위발생란의 발생을 개선하고 상실배와 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, 단위발생란의 체외발달을 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 효과가 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 2.2mM 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 ethylene-glycol-bis(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 단위

발생란의 체외발달에 미친 EDTA의 유익한 효과가 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 과의 착염에 의한 것이 아니라 이들의 이온의 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 착염제로서의 효과가 있으며(Lindenbaum, 1973; Kosakowska 등, 1988), mM 수준의 아미노산을 함유한 배양액으로 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 뒷받침해 주고 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 배양액 내 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, Metha와 Kiessling(1990)은 glycine이나 alanine 등의 아미노산이 함유된 EBBS 배양액에서의 $\text{B}_6\text{D}_2\text{F}_1$ 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% BSA가 함유된 NaHCO_3 -BMOC-3 배양액에 첨가하였을 때 단위발생란의 체외발달을 촉진하였는데 그 중에서도 100 μM 의 EDTA를 첨가하였을 때 가장 좋은 성적을 나타내어 이들 연구자들의 결과와 대체로 일치

하는 경향이였다. 연구자들에 따라 배양액에 대한 EDTA의 최적 농도가 다른 것은 사용한 배양액의 조성이 다른데 따른 결과로 추정되는데 아미노산이나 단백질 함유하지 않은 배양액에는 10 μ M내외의 EDTA 첨가가 적당하나 이들 물질이 함유된 배양액에 대해서는 보다 높은 수준의 EDTA 첨가가 효과적인 것으로 생각된다. 그리고 본 연구에서 500 μ M의 EDTA 첨가구에서는 오히려 단위발생란의 체외발달을 저해하는 것으로 나타났는데 이는 고농도의 EDTA 첨가로 인해 배양액내의 중금속과 같은 유해물질뿐만 아니라 배발생에 필요한 물질까지 EDTA에 착염이 형성되어 단위발생란의 체외 발달을 저해, 퇴행시킨 결과로 추정되나 이에 관한 보다 구체적인 정확한 연구가 앞으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

한편 배양액에 14C가 표지된 EDTA를 첨가하여 5시간 동안 생쥐 1세포기 수정란을 배양하여도 배내로 EDTA가 유입되지 않으며(Abramczuk 등, 1977), 생쥐 1세포기 배의 위란강과 세포질내로 EDTA를

주입한 결과 위란강내로 EDTA를 미세 주입한 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 유익한 영향을 미치는 것으로 사료된다.

3. 단위발생란으로 부터 발달한 배반 포의 핵 수와 직경

EDTA가 첨가된 배양액에서 2, 4, 8세포기 단위발생란으로 부터 발달한 배반포의 핵 수와 직경을 측정된 결과는 Table 3과 같다. 첨가된 EDTA 농도에 따른 핵 수와 직경에는 차이가 없었는데 반수체란, 이배체란, 분할란으로 부터 발달한 배반포의 핵 수는 각각 44.8 ± 1.2 , 45.2 ± 1.5 , 45.4 ± 1.8 개였고, 직경은 각각 104.4 ± 1.8 , 104.3 ± 1.2 , $103.8 \pm 1.3 \mu$ m로 나타났다.

배반포로 발달한 단위발생란의 핵 수와 직경에 관해

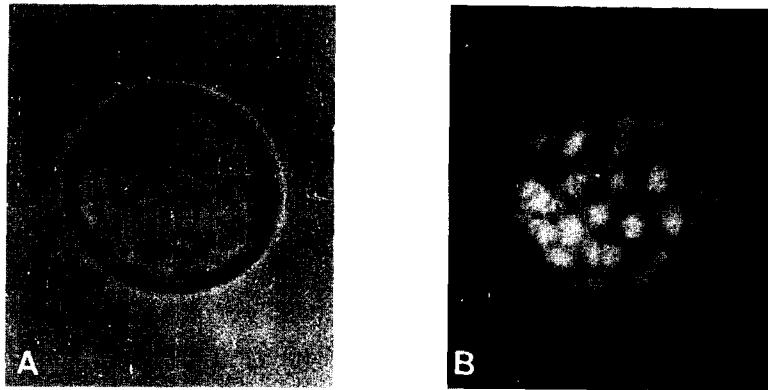


Fig. 1. Blastocysts developed *in vitro* from parthenogenetic eggs ($\times 200$).
A: intact, B: stained with fluorescent dye of hoechst 33342.

Table 3. Nuclear number and diameter of blastocyst developed *in vitro* from parthenogenetic eggs

Type of eggs	No. of blastocysts stained	No. of nuclei Mean \pm S. E.	Diameter of blastocysts (μ m) Mean + S. E.
Haploid	44	44.8 ± 1.2^a	104.4 ± 1.8^a
Diploid	38	45.2 ± 1.5^a	104.3 ± 1.2^a
Immediately cleaved	42	45.4 ± 1.8^a	103.8 ± 1.3^a

Mean \pm S. E. with same superscript in the same column are not significantly ($P < 0.05$) different.

서는 생쥐는 물론 다른 동물에서도 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 체외 배양을 실시한 후 배반포로 발달한 배의 핵 수는 각각 39 ± 4 , 25 ± 4 개 였다고 하였고, Kono와 Tsunoda (1989)도 4, 8세포기의 공핵란을 이식받은 배에서 체외에서 발달시킨 배반포의 핵 수는 각각 30 ± 2.4 , 22 ± 1.3 개 였다고 보고하였다. 또한 박 등(1990)은 탈핵한 2, 4, 8세포기 수핵란에 같은 세포의 핵을 이식한 후 배반포로 발달시켜 핵 수와 직경을 측정된 결과 세포기에 따라 핵 수는 각각 33.1 ± 1.2 , 27.5 ± 1.8 , 24.0 ± 1.3 개, 직경은 100.7 ± 1.1 , 97.9 ± 1.9 , $102.5 \pm 2.1 \mu\text{m}$ 로 나타나 핵 수는 세포기에 따라 유의적($P < 0.05$)인 차이가 있었으나 직경은 유의적($P < 0.05$)인 차이가 없었다고 하였는데 배반포의 직경은 본 연구에서 얻은 배반포로 발달한 단위발생란의 직경과 거의 일치하고 있는 수치이다.

Henery(1992)는 생쥐의 정상 이배체란, 단위발생 이배체란 그리고 단위발생 반수체란을 48~105시간 배양하여 핵 수가 배가 되는데 소요되는 시간을 조사한 결과 hCG 주사후 각각 12.74, 12.25, 15.25시간으로 단위발생 이배체란은 정상란과 비슷하였으나 단위발생 반수체란은 시간이 지연되었다고 하였다. 또한 hCG 주사후 96~99시간 사이의 핵 수는 정상 배수체란, 단위발생 배수체란, 단위발생 반수체란에서 각각 30, 51, 35, 21, 16, 62개로 단위발생 이배체란에서 발달이 현저히 낮았다고 하였다.

본 연구에서는 단위발생란의 형태별로 핵 수와 직경에 유의적($P < 0.05$)인 차이가 없는 것으로 나타났는데 이는 일단 배반포에 도달한 단위발생란들의 질적인 차이가 없음을 시사해 주는 것이다.

IV. 적 요

EDTA가 단위발생란의 체외발달에 미치는 효과를 밝히기 위하여 10, 50, 100, 500 μM 의 EDTA가 첨가된 NaHCO_3 -BMOC-3 배양액으로 생쥐 단위발생란을 체외배양한 결과는 다음과 같다.

배양액에 대한 10, 50, 100 μM 의 EDTA 첨가는 생쥐 단위발생란의 체외발달을 대조구에 비해 유의적

($P < 0.01$)으로 촉진하여 반수체란에서는 각각 19.8, 25.9, 39.0%가, 이배체란에서는 23.3, 23.5, 42.4%가 그리고 분할란에서는 21.3, 26.6, 40.5%가 상실배와 배반포로 발달하였는데 100 μM 의 첨가구가 10, 50 μM 의 첨가구에 비해 유의적($P < 0.01$)으로 좋은 성적을 나타내었다.

또한 배반포로 발달한 단위발생란의 핵 수와 직경에서는 배양액에 첨가된 EDTA 농도 및 배양전 단위발생란의 형태에 따른 차이가 없었다. 배반포로 발달한 반수체란, 이배체란, 분할란의 핵 수는 각각 44.8 ± 1.2 , 45.2 ± 1.5 , 45.4 ± 1.8 개 였고, 직경은 각각 104.4 ± 1.8 , 104.3 ± 1.2 , $103.8 \pm 1.3 \mu\text{m}$ 이었다.

V. 인용문헌

1. Abramczuk, J., D. Solter and H. Koprowski. 1977. The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. *Dev. Biol.* 61:378~383.
2. Barton, S. C., C. A. Adams, M. L. Norris and M. A. H. Surani. 1985. Development of gynogenetic and parthenogenetic inner cell mass and trophoctoderm tissues in reconstituted blastocyst in the mouse. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 90:267~285.
3. Borenfreund, E. and J. A. Puerner. 1986. Cytotoxicity of metals, metal-metal and metal-chelator combinations assayed *in vitro*. *Toxicology* 38:121~134.
4. Cuthbertson, K. S. R., D. G. Whittingham and P. H. Cobbold. 1981. Free Ca^{2+} increase in exponential phase during mouse oocyte activation. *Nature* 294:754~757.
5. Cuthbertson, K. S. R. 1983. Parthenogenetic activation of mouse oocytes *in vitro* with ethanol and benzylalcohol. *J. Exp. Zool.* 226:311~314.
6. Dyban, A. P. and L. I. Khozahi. 1980. Parthenogenetic development of ovulated mouse ova under the influence of ethyla-

- lcohol. Bull. Exp. Biol. Med. 89:528~530.
7. Fissore, R. A., K. V. Jackson and A. A. Kissling. 1989. Mouse zygote development in culture medium without protein in the presence of ethylenediaminetetraacetic acid. Biol. Reprod. 41:835~841.
 8. Henery, P. C. and M. H. Kaufman. 1992. Cleavage rate of haploid and diploid parthenogenetic mouse embryos during the perimplantation period. Mol. Reprod. Dev. 31:258~263.
 9. Hoshi, M. and T. Toyoda. 1985. Effect of EDTA on the preimplantation development of mouse embryos fertilized *in vitro*. Jpn. J. Zootech. Sci. 56:931~937.
 10. Johnson J. D., D. D. Epel and M. Paul 1976. Intracellular pH and activation of sea urchin eggs after fertilization. Nature, Lond. 262:661~664.
 11. Kaufman, M. H. 1979. Mammalian parthenogenetic development. Bibliography (with review). Bibliography of Reproduction, 33: 261~264.
 12. Kaufman, M. H. 1982. The chromosome complement of single pronuclear haploid mouse embryos following activation by ethanol treatment. J. Embryol. Exp. Morphol. 71:139~154.
 13. 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.
 14. Kosakowska, A., L. Falkowski and J. Lewandowska. 1988. Effect of amino acids on the toxicity of heavy metals to phytoplakton. Toxicology 40:532~538.
 15. Lindenbaum, A. 1773. A survey of naturally occurring chelating ligands. Adv. Exp. Med. Biol. 40:67~77.
 16. Loutradis, D. J. D. and A. A. Kiessling. 1987. Hypoxanthine causes a 2-cell block in random-bred mouse embryos. Biol. Reprod. 37:11~16.
 17. Marcus, G. T. 1990. Activation of cumulus-free mouse oocytes. Mol. Reprod. Dev. 26:159~162.
 18. Metha, T. S. and A. A. Kissling. 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.
 19. Nicolson, G. L. 1976. Transmembrane control of the receptors of normal tumor cells. Biochem. Biophys. Acta. 457:57~108.
 20. Pincus, G. 1939. The breeding of some rabbits produced by recipients of artificially activated ova. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 25:557~559.
 21. Poueymirou, W. T., J. C. Conover and R. M. Schultz. 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.
 22. 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. Theriogenol. 24:687~700.
 23. Robl, J. M., B. Gilligan, E. S. Cristser and N. L. First. 1986. Nuclear transplantation in mouse embryos : assessment of recipient cell stage. Biol. Reprod. 34:733~739.
 24. Seeman, P. S., S. Chen, M. Chan-Wong and A. Staiman. 1974. Calcium reversal of nerve blockage by alcohols, anesthetics, tranquilizers and barbiturates. Can. J. Physiol. Pharmacol. 52:526~534.
 25. Siracus, G., D. G. Whittingham, M. Codonesu and M. De Felici. 1978. Local anes-

- thetics and phenothiazine tranquilizers induce parthenogenetic activation of the mouse oocyte. *Dev. Biol.* 65:531~535.
26. Steinhardt, R. A., D. Expl, E. J. Carrol and R. Yanagimachi. 1974. Is calcium ionophores universal activator for unfertilized eggs? *Nature* 252:41~43.
27. Tarkowski, A. K., A. Wittowska and J. Nowicka. 1970. Experimental parthenogenesis in the mouse. *Nature, Lond.* 226:162~165.
28. Uehara, T. and R. Yanagimachi. 1977. Activation of hamster eggs by pricking. *J. Exp. Zool.* 199:269~275.
29. 박희성, 이효종, 최상용, 박충생. 1990. 생쥐 수정란의 핵이식 후 체외발달에 관한 연구. *한국가축번식학회지* 14:205~211.
30. 이철상, 이경광. 1990. 생쥐 8세포기 할구의 발생능. *한국축산학회지*. 32:131~138.
31. 전승재, 정길생. 1984. 생쥐난자의 시험관내 수정과 발달, *한국가축번식연구회보* 8:110~115.
32. 한용만, 백청순, 이경아. 이경광, 정길생. 1987. 생쥐에 있어서 ethanol 처리에 의한 단위발생의 유기. *한국축산학회지* 29:383~389.