

생쥐 分離割球의 融合方法이 融合率 向上에 미치는 影響

崔善昊·鄭英彩·金昌根·丁永浩*·尹鐘澤**·宋學雄***

中央大學校 産業大學 畜産學科

Effects of Aggregation Methods of Mouse Blastomeres on Aggregation Rate

S.H. Choi, Y.C. Chung, C.K. Kim, Y.H. Chung*, J.T. Yoon** and X.X. Song***

Department of Animal Science, Chung-Ang University

SUMMARY

This study was carried out to investigate the aggregation rate of isolated mouse 2-, 4- and 8-cell stage blastomeres in phytohemagglutinin(PHA) solution. The morphologically normal embryos were collected from the oviduct of superovulated female mouse by flushing with M2 and the zona pellucida of embryos were removed with 0.5% pronase. The blastomeres were isolated by pipetting after plunging into Ca⁺⁺-Mg⁺⁺free PBS for 20 min. The result showed that aggregation rate in 0.5% (84.9~93.1%) was higher than that in 1.0% PHA(76.0~82.1%). Optimal aggregation time was 60min (83.9~100.0%) when compared with 30min (78.8~87.5%). Developmental to blastocyst in recombined blastomeres was higher under conditions of 0.5% PHA solution and 60-min aggregation than that under other conditions.

서 론

가축을 포함한 포유동물의 발생기전에 대한 연구가 활발히 진행되면서, 수정란의 분리할구들이 단독으로 발생하여 개체를 이룰 수 있다는 전능성(totipotency)이 입증되었고 (Tarkowski, 1959; Tarkowski와 Wroblewska, 1976), 분리할구들의 융합에 의한 chimerae의 생산이 1960년대 생쥐에 의해 시작되어되었다(Tarkowski, 1961; Mintz, 1962). 할구융합은 동종 뿐만 아니라 변종간에서도 가능하며 할구융합후 발생된 배반포를 이식하여 산자가 생산되었다(Rossant와 Frels, 1980). 그러나 이종간의 경우와 마찬가지로, 초기배 융합에는 성공적이지만 융합배반포기를 자궁에 이식하였을 때

변종간 또는 이종간의 면역학적 거부반응에 의해 대부분 착상에 곧 괴사하는 것으로 보고되었다(Rossant, 1976; Tachi와 Tachi, 1980). 가축에 있어서는 토끼(Gardner와 Munro, 1974), 면양(Butler등, 1987)과 소(Brem등, 1985) 등에서 동종 또는 변종간의 할구로 융합배 생산으로 산자가 보고하였으나, chimerae의 성질이 발현되지 않았다. 한편, 분리할구들의 융합으로는 융합(집합)법(Tarkowski, 1959, Tachi와 Tachi, 1980)과 주입법(Gardner와 Munro, 1974)이 이용되었으나, 대부분이 융합법에 의한 방법이었으며, 주입법에 의한 경우는 고가의 미세조작기가 요구되기 때문에 보고가 드문 편이었다. 따라서 본 연구는 미세조작기를 사용하지 않으면서 생쥐 분리할구의 융합을 보다 간편하게 실시함과 동시에 융합효과를 향상시

* 중부대학 동물자원학과(Dept. of Animal Science, Joong-Bu University)

** 안성산업대학교 축산학과(Dept. of Animal Science, An-Sung National University)

*** 중국 연변 농학원 축산학부(Dept. of Animal Science, Yan-Bien Agricultural College, China)

킬 수 있는 혈구응집소phytohemagglutinin의 농도와 융합시간을 찾고자 시도하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물

본 실험에 사용된 공시동물은 ICR계의 생쥐로서 15~20g의 3~5주령 암컷과 20~30g의 5~8주령 수컷을 공시하였고, 물과 사료(실험용 생쥐 pellet 사료)는 자유급이하였다. 조명은 1일 14시간으로 조정하였으며, 사육실의 온도는 23~25℃로 조정하여 사육하였다.

2. 과배란 유기 및 수정란의 채취

과배란 유기를 위하여 발정전기 상태인 암컷의 복강내로 5 IU의 PMSG(Folligon, Intervet; Holland)를 주사하고, 48시간 후 동일한 방법으로 5 IU의 HCG(Choluron, Intervet; Holland)를 주사한 다음 수컷의 cage에 1:1로 합사하여 교미를 유도하였다. 다음날 아침 질전의 유무를 확인한 후 실험에 공시하였으며, HCG 투여 후 2세포기의 난자는 44시간에, 4세포기 난자는 55시간에, 8세포기 난자는 60~64시간에 도살하여 수정란을 채취하였다. 과배란 처리된 생쥐를 각 시기별로 경추탈구법에 의하여 도살한 다음 난관채 및 난관과 난관-자궁 연결부를 절단하였고, 30 gauge의 blunt needle이 부착된 1ml의 주사기에 M2 배양액을 넣고 난관을 관류하여 수정란을 채취하였으며 형태학적으로 정상적인 것만을 공시하였다.

3. 배양액 및 융합배양액의 제조

수정란의 채취 및 할구분리에 사용된 배양액은 M2(Quinn 등, 1982)이었으며, 분할란의 발생과 융합된 수정란의 배양액은 M16 (Whittingham, 1971)으로서 pH는 7.2~7.4로 조정하였고, 삼투압은 M2는 284 mOsm, M16은 288 mOsm로 조정하였다. 사용전 배양액은 0.2 μ m의 millipore filter로 여과하여 4℃ 냉장고에 보관하였다.

융합배양액은 M16을 기본배양액으로 하여 0.5% 또는 1%-Phytohemagglutinin(Gibco, 이하 PHA)이 되게 조정하여 냉장고에 동결보존하였고, 사용

시 M2는 실온으로 M16과 PHA용액은 plastic petri dish에 근접하게 20 μ l 소적을 만들고 paraffin oil로 피복하였고, 37℃ 5% CO₂, 95% 공기인 배양기에서 12시간 이상 전배양한 후 사용하였다.

4. 수정란의 할구분리

회수된 정상 수정란의 투명대 제거는 0.5% pronase액(Tarkowski, 1961)으로 투명대를 제거하고 Ca⁺⁺-Mg⁺⁺ free PBS에서 20분간 체외배양한 후 pipetting에 의해 할구를 분리하였고, 신선한 M2 배양액으로 3회 이상 세척하여 할구 융합에 공시하였다.

5. 분리할구의 응집

분리할구의 융합은 0.5% 또는 1%-PHA용액에 30분간 또는 60분간 체외배양한 후 융합을 시도하였으며, 융합이 완료된 융합난은 곧바로 M16 배양액에 옮겨 48~60시간 37℃ 5% CO₂, 95% 공기인 배양기에서 체외배양을 실시하였다.

결과 및 고찰

1. PHA농도에 따른 융합효과

생쥐 분리할구의 융합을 PHA의 농도에 따라 60분간 융합시킨 융합효과는 Table 1과 같다. 0.5% PHA의 농도에 있어서, 1/2+1/2, +1/4, +1/8의 융합율은 93.1%, 89.7%, 86.9%로 나타났으며, 1/4+1/4, +1/8은 84.9%, 90.6%를 보였고, 1/8+1/8의 경우 90.5%의 융합율을 보여, 할구들간에 있어서 융합율은 큰 차이를 보이지 않았다. 이들 융합할구에 있어서 배반포기로의 발생율은 87.9~96.4%로서 비교적 높은 결과를 나타냈다. 1.0% PHA에 있어서 1/2+1/2, +1/4, +1/8의 융합율은 각각 81.8%, 80.8%, 79.3%를 보였으며, 1/4+1/4, +1/8은 82.1%, 78.8%, 1/8+1/8은 76.0%의 융합율을 보여, 0.5% PHA의 경우보다는 다소 낮은 융합율을 보였다. 배반포기로의 발생율도 68.4%~90.5%였으며 1/8+1/8의 경우 특히 낮게 나타났다. 따라서 PHA를 이용하여 할구 융합시 낮은 농도에서 융합율이 높게 나타났으며, 재구성된 융합할구의 체외 발생율도 좋은 것으로 나타

Table 1. Effects of phytohemagglutinin concentration on aggregation of isolated mouse blastomeres

Concentration	Pair	Pair and No. of blastomeres		Developed to blastocyst*(%)	Degenerated
		Treated	Aggregated(%)		
0.5%	1/2+1/2	29	27(93.1)	26(96.3)	1
	+1/4	29	26(89.7)	23(88.5)	3
	+1/8	38	33(86.9)	29(87.9)	4
	1/4+1/4	33	28(84.9)	27(96.4)	3
	+1/8	32	29(90.6)	27(93.1)	2
	1/8+1/8	32	29(90.5)	26(89.7)	3
1.0%	1/2+1/2	22	18(81.8)	16(88.9)	3
	+1/4	26	21(80.8)	19(90.5)	2
	+1/8	29	23(79.3)	19(82.6)	2
	1/4+1/4	39	32(82.1)	25(78.1)	7
	+1/8	33	26(78.8)	21(80.8)	5
	1/8+1/8	25	19(76.0)	13(68.4)	6

* Aggregated 1/2+1/2, +1/4 and +1/8-embryos were cultured *in vitro* for 60h and other embryos were cultured for 48h

* Aggregation time was 60min

났다.

2. 융합시간에 따른 융합효과

생쥐 분리할구의 융합에 있어서 0.5% PHA의 조건에서 융합시간에 따른 융합효과는 Table 2와 같다. 융합시간 30분의 경우 1/2+1/2, +1/4, +1/8의 융합율은 81.5%, 87.5%, 85.7%를 보였고, 1/4+1/4, +1/8은 87.1%, 8.11%를 나타냈으며, 1/8+1/8은 78.8%를 나타내어, 할구들간에 큰 차이를 보이지 않았다. 재구성 융합할구의 배반포 기로의 발생율은 80.6~90.0%의 발생율을 보였다. 융합시간 60분의 경우 1/2+1/2, +1/4, +1/8의 융합율은 100.0%, 97.1%, 96.6%로 높은 융합율을 보였으며, 1/4+1/4, +1/8은 83.9%, 5.5%, 1/8+1/8은 85.7%의 융합율을 나타내어, 융합시간 30분의 경우보다 다소 높은 융합율을 나타냈다. 배반포기로의 발생율도 83.3~96.4%였다. 또한 융합시간 60분의 경우 Table 1의 0.5% PHA와 동일한 처리로 융합을 및 배반포기로의 발생율도 유사한 결과를 나타냈으나, Table 2의 결과(83.9~100.0%)가 할구들간에 Table 1(84.9~93.1%)보다

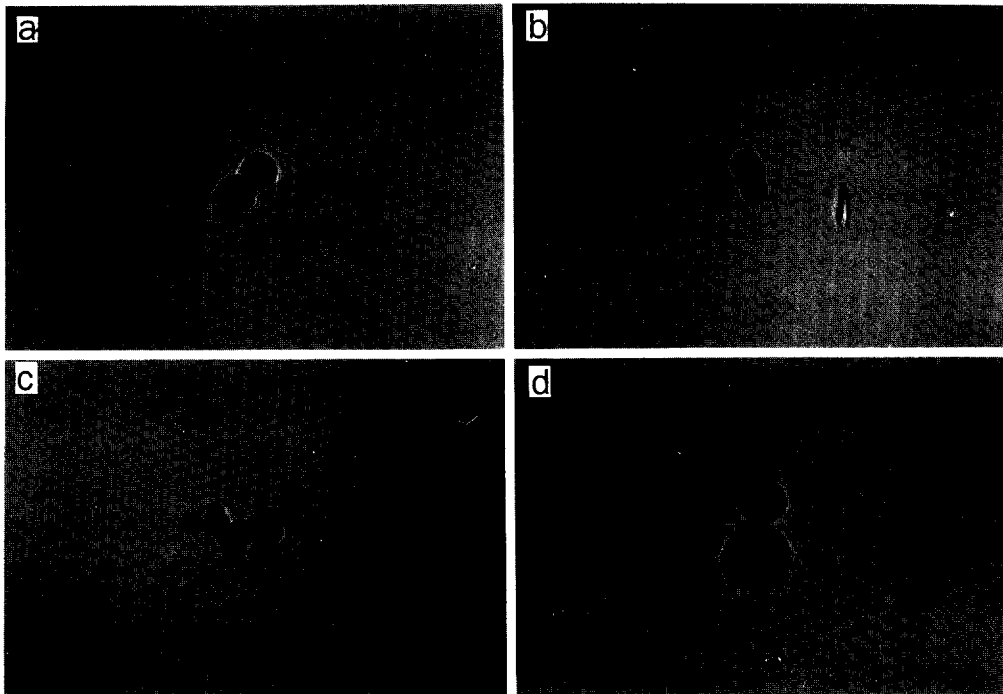
다소 차이가 있었다.

이상의 결과에서 체내수정란의 발달율보다는 본 실험의 결과가 더 빠른 것으로 나타났으며(Fig 1-g, g). Smith와 McLaren(1977)이 수정란이 5회 핵분열이 진전되어야 blastocoel이 형성된다고 하였으나, 본 실험에서 각 융합할구가 모두 48~60시간에 blastocoel이 형성되었던 것은 Iwasaki등(1989)과 유사한 결과였고, 또한 Rands(1985)가 mouse 2분분리배를 체내에서 48~72시간 배양하여 배반포로 발생되었다는 것과는 같은 결과였다. 또한 Kono 등(1990)도 생쥐에 있어서 2세포기 투명대 제거 2분분리배가 48시간에 blastocyst로 발생되었다는 결과와도 같은 경향이였다. 한편, 1/8+1/8의 경우는 Tarkowski(1959)와 Tarkowski와 Wroblewska(1967)등이 초기배의 단독 할구가 하나의 개체를 이룰 수 있다는 결과와는 달리 융합한 후 발생하여도 정상 수정란의 세포수보다 적다고 한 최(1992)의 결과와 유사한 경향을 보여, 1/8 또는 1/8+1/8의 경우 단독 발생에 의해서는 inner cell mass의 부족으로 전능성이 없다고 한 Seidel(1969)의 보고와도 같은 결과를 나타내었다.

Table 2. Effects of aggregation times in 0.5% phytohemagglutinin on aggregation of isolated mouse blastomeres

Aggregation time(min)	Pair and No. of blastomeres	Pair		Developed to blastocyst*(%)	Degenerated
		Treated	Aggregated(%)		
30	1/2+1/2	27	22(81.5)	20(90.9)	2
	+1/4	24	21(87.5)	19(90.5)	2
	+1/8	42	36(85.7)	29(80.6)	7
	1/4+1/4	31	27(87.1)	23(85.2)	4
	+1/8	33	27(81.8)	23(85.2)	4
	1/8+1/8	33	26(78.8)	23(88.5)	3
60	1/2+1/2	22	22(100.0)	20(90.9)	1
	+1/4	34	33(97.1)	30(90.9)	3
	+1/8	29	28(96.6)	27(96.4)	1
	1/4+1/4	31	26(83.9)	23(88.5)	3
	+1/8	22	21	(95.5)	20(95.2)
	1/8+1/8	28	24(85.7)	20(83.3)	4

* Aggregated 1/2+1/2, +1/4 and +1/8 embryos were cultured *in vitro* for 60h and other embryos were cultured 48h



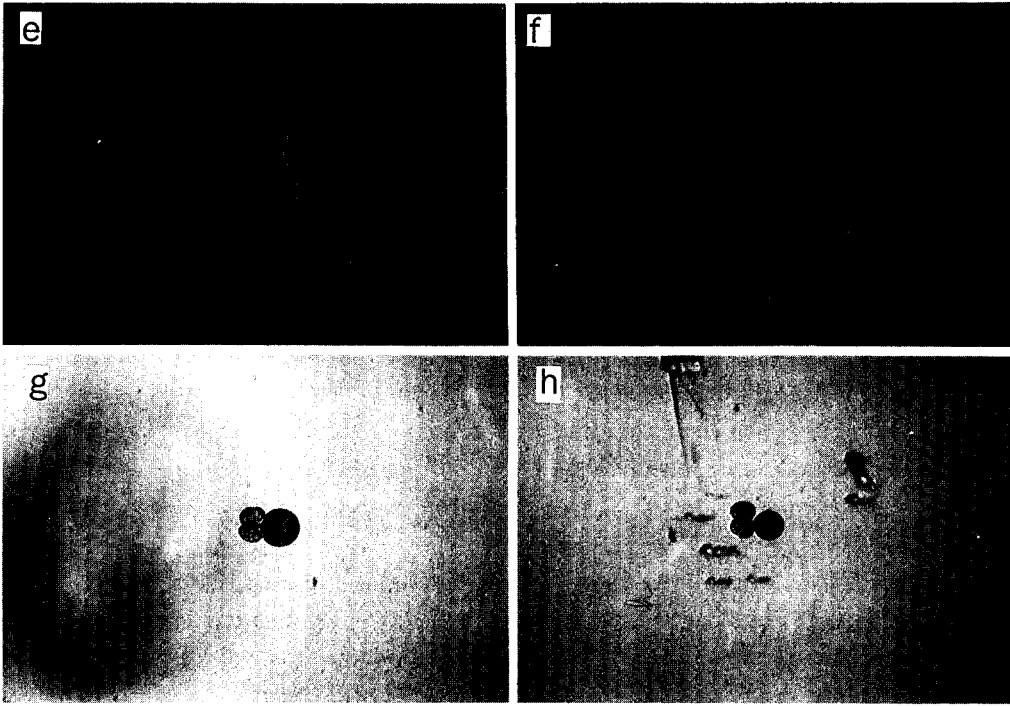


Fig 1. a. Aggregated blastomeres from 1/ 4+1/ 4 pair (x 100).
 b. c Cleavage of each blastomeres(1/ 4) after aggregation.
 d. Aggregated blastomeres from 1/ 2+1/ 8 pair (x 200).
 e. f Aggregated blastomeres(1/ 2+1/ 8) Similar to fusion status(e: x 200, f:x 100)
 g. h Aggregated blastomeres from 1/ 2+1/ 8 pair and 1/ 8 blastomere showed firstly cleavage.

적 요

본 연구는 생쥐 2, 4와 8세포기 수정란의 분리할 구들을 phytohemagglutinin 용액(이하PHA)을 이용하여 융합하였을 때 PHA 농도와 융합시간이 융합율에 미치는 영향에 대하여 조사하였다. 각 세포기의 수정란은 과배란처리된 암컷 생쥐의 난관을 M2로 관류하여 회수하였고, 분리할구는 각 수정란을 0.5% pronase로 투명대를 제거하고, Ca^{++} - Mg^{++} free PBS에 20분간 침지한 후 pipetting에 의해 할구를 분리하였다.

1. 0.5%와 1% PHA의 농도에서 60분간 융합시킨 결과는 0.5%에서 융합율은 84.9~93.1%였

고, 재구성 할구들의 배반포기로의 발생율은 87.9%~96.4%였다. 1.0%일때의 융합율은 76.0~82.1%, 배반포기 발생율은 68.4~90.5%였다.

2. 0.5% PHA 조건에서 융합시간에 따른 융합 결과는 30분일때는 78.8~87.5%의 융합율을, 배반포기로의 발생율은 80.6~90.9%였으며, 60분일때 83.9~100.0%의 융합율과 83.3~96.4%를 나타냈다.

이상의 결과에서 생쥐 분리할구의 융합에 있어 PHA농도가 0.5%일때와 융합시간은 60분일 때가 적절한 융합조건임을 보여주었다.

참고문헌

- Brem GH, Tenhumberg B, Kruff B and Kraußlich H. 1985. Production of cattle chimeras through embryo microsurgery, *Theriogenology* 23:182.
- Butler JE, Anderson GB, BonDurant RH, Pashen RL and Panedo MCT. 1987. Production of ovine chimeras by inner cell mass transplantation. *J. Anim. Sci.* 65:317-324.
- Gardner RL and Munro AJ. 1974. Successful construction of chimeric rabbit. *Nature* 250:146-147.
- Iwasaki S, Kono T and Nakahara T. 1989. Sexing rate and developmental ability of bovine two- to eight-cell stage embryos split by treatment with pronase. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 35:147-153.
- Kono T, Okawa M, Ichinoe K and Nakahara T. 1990. Development of mouse half embryos produced by micromanipulation at two cell stage. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 36(3) : 164-170.
- Mayer J, Jr R and Fritz HI. 1974. The culture of preimplantation rat embryos and the production of allophenic rats. *J. Reprod. Fert.* 39:1-10.
- Mintz B. 1962. Experimental study of the developing mammalian egg: removal of the zona pellucida. *Science* 138:594-595.
- Nicholas JS and Hall BV. 1942. Experiments on developing rat II. The development of isolated blastomeres and fused egg. *J. Exp. Zool.* 90:441-459.
- Quinn P, Barros C and Whittingham. DG. 1982. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 66:161-168.
- Rossant J. 1976. Investigation of inner cell mass determination by aggregation of rat inner cell mass with mouse morulae. *J. Embryol. Exp. Morph.* 36:136.
- Rossant J and Frels WI. 1980. Interspecific chimaeras in mammals successful production of live chimaeras between *M. musculus* and *M. caroli*. *Science* 208:419. 3-130.
- Seidel F. 1969. Die entwicklungsfähigkeiten isolierter furchungszellen aus dem ei des kaninchens, *Oryctolagus cuniculus*. *Wilhelm Roux Arch., Entw Mech. Org.* 152:43-130.
- Smith R and McLaren A. 1988. Factors affecting the time of formation of the mouse blastocoel. *J. Embryol. Exp. Morph.* 41:79-92.
- Tachi S and Tachi C. 1980. Electron microscopic studies of chimeric blastocysts experimentally produced by aggregating blastomeres of rat and mouse embryos. *Dev. Biol* 80:18.
- Tarkowski AK. 1961. Mouse chimeras developed from fused eggs. *Nature.* 190:857-860.
- 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.
- Whittingham DG. 1971. Survival of mouse embryos freezing and thawing. *Nature* 233:125-126.
- 崔善昊, 1992. 생쥐분리할구의 체외발생과 동결 및 염색체 분석에 관한 연구. 중앙대학교. 박사학위논문.