

## 미세현미주입 기법으로 응성호르몬을 주입한 토끼난자의 발생\*

나진수 · 임계택 · 문승주 · 김광현  
전남대학교 농과대학

### Development of Rabbit Eggs Microinjected with Testosterone\*

J. S. Na, K. T. Lim, S. J. Moon and K. H. Kim  
College of Agriculture, Chonnam National University

#### SUMMARY

This study was performed to investigate the differentiation of rabbit blastocysts microinjected with testosterone solution. A total of 140 mixed breed does was superovulated, synchronized and hand mated. The eggs were flushed from uterine horns between 65 and 89 hrs after mating. Testosterone was dissolved in 95% ethanol and diluted with PBS at the ratio of 1 : 99. Final concentration of testosterone was adjusted to 1  $\mu$ g/ml. 6~8 blastocysts were microinjected with 1~10 p $\ell$  of the diluted testosterone solution, and transferred into the uterine horns of the synchronized recipients. When 140 donor does were treated with a single does of 200 IU PMSG in combination with 100 IU HCG 48 hrs apart, 134 of them(97%) showed standing estrus. Ovarian responses of 117 does were examined following mating and the rate of ovulation was  $11.23 \pm 1.20$ . Ova were recovered from donors between 65 and 89 hrs after mating. Recovery rates of ova were 37.5% and 42.2% of recovered ova were blastocysts. A total of 106 blastocysts were microinjected with testosterone solution and transferred into the uterine horns of 15 synchronized recipient does. One of the recipients was pregnant and delivered 7 baby rabbits. The external genitalia of the young rabbits appeared to be the same appearance as the buck entirely.

**Key words:** rabbit blastocyst, microinjection, testosterone

#### 서 론

미세현미주입 기법으로 포유동물 난자의 조작을 시도한 연구에서 최초로 성공한 것은 Lin(1966)이 생쥐 난자내에 bovine gamma globulin을 미세현미주입하여 얻은 결과로 알려져 있다. 그후 이 분야에 관한 연구는 여러 연구자들에 의하여 활발하게 진

척되어 정자, 분할구, 외래유전자 (foreign gene) 등 유전물질을 비롯하여 병원체, 생체염색용 색소에 이르기까지 다양한 물질이 미세현미주입 기법으로 포유동물의 난자내에 이식되어 각각 긍정적인 성과를 거두고 있다 (Lin 와 Monie 1973 ; Glass 등, 1974 ; Seidel, 1982 ; Seidel, 1983). 특히 미세현미주입 기법에 의한 외래 유전자의 포유동물 난자내 이식은 형질전환 동물(transgenic animal)의 생산

\* 이 연구는 1992년도 교육부 학술연구조성비 (유전공학) 지원에 의하여 수행되었음.

가능성을 제시함으로써 동물의 유전형질을 가장 빠르게 개선할 수 있는 지름길이 될 것으로 평가되고 있으며 (Markert, 1984), 가축에 있어서 발육, 산유량, 질병에 대한 저항성, 번식 효율 및 소화 생리 등의 형질개선에 이용될 수 있을 것으로 기대되고 있다 (Wagner 등, 1984 ; Simons and Land, 1987).

출생하는 개체의 성(sex)을 인위적으로 지배하려는 시도는 기원전부터 비롯되어 오늘에 이르고 있다 (Betteridge, 1984). 포유동물의 성은 성염색체에 의하여 지배되며 성염색체는 정자의 X, Y 염색체에 의해 결정되는 것으로 알려져 있다. 가축의 성 지배를 목적으로 초기에 시도된 방법은 수정과정을 지배하려는 것이었다. 즉, 영양상태, 수소이온 농도, 내분비선의 기능 등 생체내 환경을 변화시킴으로써 X, Y 정자중 어느 한쪽을 부활시키거나 억제하여 수정과정에서 성의 결정을 지배하려는 시도였다. 근래에 와서는 X, Y 정자를 분리하여 수정시키는 방법, 수정란의 성염색체를 감별하여 이식함으로써 성을 지배하려는 방법 등이 시도되고 있으나 아직 실험단계에 머물러 있다 (Betteridge 등, 1981). 한편 유전자형 성은 성염색체에 의해 결정되지만 표현형 성의 분화발달에는 성호르몬이 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 어류, 양서류, 파충류 및 조류 등 난생동물에 있어서는 부화 중인 알에게 성호르몬을 투여하여 성전환을 시도한 보고도 있다. 포유류에 있어서도 축우의 freemartin 현상이 규명됨에 따라 표현형 성의 분화발달에 융성호르몬이 영향을 미치는 것으로 밝혀져 있는데 포유동물 난자는 胚期(embryonic stage)에 분화발생된다 (Austin 등, 1981 ; George and Wilson, 1988).

본 연구는 토끼의 배반포 내에 융성호르몬을 미세현미주입 한 다음 수란토끼 (recipient doe)에게 이식하여 분화발생 성적을 검토하고자 시도되었다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시동물

집토끼 연두수 140두를 공시하였다. 이중 120두는 공란토끼(donor)로, 나머지 20두는 발정동기화 처리 후 정관을 절제한 시정수토끼와 교배를 실시하여 수란토끼(recipient)로 공시하였다.

공시동물은 철망제 사육상에 개별적으로 수용하여 사육하였으며, 1일 펠릿사료를 30~60 g/kg 수준으로 급여하고 음수는 자유채식시켰다.

사육실의 조명, 온습도 등은 제어하지 아니한 상태에서 야외조건으로 유지되었다.

### 2. 공시 배반포의 준비

공란토끼에게 PMSG 200 IU를 1회 근육주사한 후 48시간에 교배를 실시함과 동시에 HCG 100 IU를 1회 근육주사하여 배란을 촉진하였다. 교배후 3~4일째에 자궁각을 관류하여 후기 배반포를 회수하였다 (Fig. 1). 이때 관류액으로는 FCS를 1% 첨가한 D-PBS를 사용하고 후기 배반포의 보존액으로는 FCS를 20% 첨가한 D-PBS를 사용하였다. 회수된 후기 배반포는 보존액에 넣어 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기내에 보존하였다.

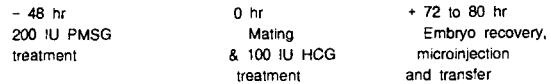


Fig. 1. Schedule of superovulation treatment and embryo transfer

### 3. 미세현미피펫(micropipet) 제작

미세현미피펫 제작 및 세공처리에는 microelectrode puller, microforge 및 microgrinder (Narishige Co., Japan) 등을 사용하여 Lin(1966, 1971) 그리고 Seidel(1982)의 방법에 준하여 다음과 같이 제작하였다.

Egg-holding micropipet은 외경 약 450 micron, 구경 약 200 micron이 되게 capillary tube(Narishige GD-1)를 세공처리하여 제작하였다.

Injection micropipet은 capillary tube(Narishige GD-1)를 재료로하여 천자침 길이 약 2,000 micron, 구경 1~2 micron이 되도록 세공처리하여 사용하였다.

### 4. Testosterone 용액

Testosterone(Sigma, U. S. A.)을 95% ethanol에 용해한 다음 이 용액을 PBS에 1:99로 희석하여

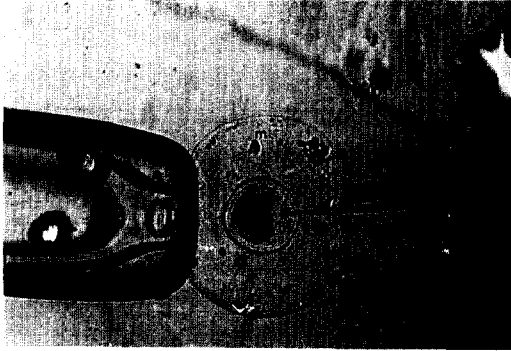


Fig. 2. Microinjection of rabbit blastocyst with testosterone solution ( $\times 200$ ). Mucin coat (m), zona peillucida (z), innercell mass (i), and blastocele (b) can be seen.

testosterone 최종농도가  $1\mu\text{g}/\text{m}\ell$  되게 조제하여  $0.22\mu\text{m}$  millipore filter를 장착한 세균여과장치에서 여과한 다음 사용하였다. 이 용액은 실험 당일에 제조하였다.

### 5. 미세현미주입

Wagner 등(1984)의 방법에 준하여 100~400 배율로 조정된 도립현미경(Narishige)에서 미세조작 장치를 사용하여 다음과 같이 미세현미주입을 실시하였다.

슬라이드에 난자보존액  $0.2\text{m}\ell$ 를 방울이 형성되도록 떨어뜨린 다음 사전에 전처리한 파라핀유로 덮었다. 슬라이드는 chamber slide(Nunc)에서 chamber를 떼어내고 실리콘 개스킷만 부착된 상태로 사용하거나 조직배양접시 뚜껑을 사용하였다. 난자보존액 방울 속에 모세관 피펫을 사용하여 5~10개의 공시 배반포를 옮겨 넣었다.

Egg-holding 피펫으로 공시 배반포 하나씩을 흡인하여 보정하고 모세관피펫을 이용하여 testosterone 용액을 충전한 injection micropipet을 보정된 배반포의 짐액질막, 투명대를 차례로 천자하였다. 투명대를 통과하면 곧 바로 난황막을 천자하는데 이때 난황막이 밀려가 난황막과 투명대 사이에 틈이 벌어지지 않도록 유의하였다. Injection micropipet 끝이 난황막을 통과하면 즉시 1~10 pl의 tes-

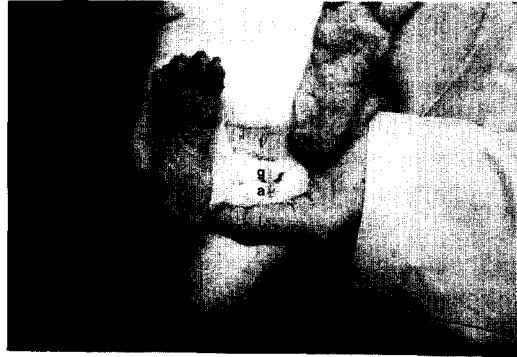


Fig. 3. External genitalia of young rabbits born of blastocysts microinjected with testosterone solution appeared to be male. t : thumb, g : genitalia, a : anus, i : index finger

tosterone 용액을 주입하였다(Fig. 1). 주입이 완료되면 공시 배반포는 혐기성 배양기에 보존하여 이식에 대비하였다.

### 6. Testosterone을 주입한 공시 배반포 이식

외과적 방법으로 다음과 같이 이식하였다.

공란토끼와 동일한 방법으로 PMSG 및 HCG를 처리하여 성주기를 동기화 시킨 수란토끼와 정관을 절제한 시정수토끼를 교배시켜 위임신을 유지하였다.

공란토끼와 성주기가 동기화된 수란토끼에게 체중 kg당 Stresnil  $0.05\text{m}\ell$  씩 근육 주사하여 예비마취를 실시하고, 그로부터 15분 후에 체중 kg당 Hypnodil  $0.2\text{m}\ell$  씩 복강내 주사하여 마취시킨 다음 하복부 정중선을 절개하여 생식기를 노출시켰다.

노출된 자궁각 상단부에 천공한 다음 모세관피펫을 이용하여 공시 배반포 6~8개씩을 황체수가 보나 많은 난소측 자궁강내에 이식하였다(Staples, 1971).

### 7. 배반포 이식에 의하여 출생한 자태의 성감별

통상적인 방법에 따라 이유 후에 감별하였다. 즉, 외부생식기와 항문간의 거리 및 외부생식기의 형태를 관찰하여 성감별을 실시하였다(Fig. 3).

## 결과 및 고찰

PMSG처리에 의하여 발정을 유기한 성적은 Table 1에서 보는 바와 같다. 총 140두중 134두(96%)가 교배를 허용하였으며, 피모색으로 보아서는 유색종 85두중 83두(98%), 백색종 55두중 51두(93%)에서 교배가 이루어졌으나 유의차는 없었다.

교배를 허용한 134두중 117두에서 난소반응을 조사한 결과 (Table 2) 배란수 11.23( $\pm 1.20$ ), 발육난포수 9.40( $\pm 1.22$ )으로 나타나 성적이 저조한 편이었다.

PMSG와 HCG 반복처리에 따른 성적은 Table 3과 같다. 1회 처리한 46두에서 배란수 11.0( $\pm 1.30$ ), 발육난포수 10.6( $\pm 1.33$ )인데 비하여 2회 처리한 18두에서도 각각 11.1( $\pm 1.20$ ), 7.7( $\pm 1.47$ )로 나타나 차이가 없었다. Table 3에는 제시하지 아니하였으나 2회처리한 총두수는 44두였는데 그중 18두를 제

외한 나머지 26두는 1차 개복수술에 따른 생식기 유착등 후유증으로 난소반응을 조사할 수 없었다.

교배후 경시적으로 자궁각 관류에 의하여 난회수를 시도한 성적은 Table 4와 같다. 난회수율이 37.5%(248/632)로서 성적이 저조하였다. 교배후 65시간에 93.3%, 72~79시간 38.3%, 80~89시간 37.5%의 난회수율을 보여 교배 후 시간이 경과될수록 난회수율이 저조한 경향이였다. 회수란의 발달단계 (Table 5)로 보아서는 교배후 72시간 이후에 배반포가 회수되는 것으로 나타났으며 회수된 난자의

Table 1. Effect of PMSG treatment on induction of estrus

Item	Hair color of does		Total (%)
	White	Colored	
No. does treated	55	85	140
No. does estrus(%)	51(93)	83(98)	134(96)

Table 2. Effect of PMSG treatment in combination with HCG on ovarian response

Item	Hair color of does		Total
	white	colored	
No. does laparotomized	50	67	117
No. ovulations(Mean $\pm$ SE)	11.02 $\pm$ 1.22	11.43 $\pm$ 1.18	11.23 $\pm$ 1.20
No. persistent follicles (Mean $\pm$ SE)	7.61 $\pm$ 1.29	11.47 $\pm$ 1.15	9.40 $\pm$ 1.22

Table 3. Influence of repeated treatment of PMSG in combination with HCG on ovarian response

Treatment	No. does laparotomized	Ovarian response	
		No. ovulations	No. follicles (Mean $\pm$ SE)
Single	46	11.0 $\pm$ 1.30	10.6 $\pm$ 1.33
Twice	18	11.1 $\pm$ 1.20	7.7 $\pm$ 1.47

Table 4. Recovery rate of embryo by recovery time after mating

Time (hr)	No. ovulations	Embryos recovered(%)
65	15	14(93.3)
71-79	342	131(38.3)
80-89	275	103(37.5)
Overall	632	248(37.5)

43%(106/248)가 배반포였다.

다배란 유기 처리에 따른 난소반응이 (Table 2) 기존보고에 (Adams, 1980; Gardner와 Edwards, 1968) 비하여 저조한 편인데, 가축에 있어서 호르몬 처리에 따른 성적은 유전, 생리적 요인, 사육환경 및 사양관리에 의하여 영향을 받는 것으로 알려져 있어 이들 요인을 개선하여 표준화 해야 될 것으로 생각된다.

Table 5. Development stage of embryo by recovery time after mating

Development stage	Recovery time(hr)			Total
	65	72~79	80~89	
Morula	14	0	0	14
Tight morula	0	20	23	43
Early blastocyst	0	51	31	71
Expanded blastocyst	0	4	20	35
Degenerated	0	56	29	85
Overall	14	131	103	248

Table 6. Result of transfer of blastocysts microinjected with testosterone to the uterus of recipients

Trial group	No. of animals			Offspring born
	Total	Pregnant	Non-pregnant	
Recipient	15	1	14	7
Control*	3	1	2	2

\* Natural breeding

PMSG 및 HCG 반복처리 성적(Table 3)의 비교에서는 약 1개월 간격으로 2회 처리한 경우 1회 처리와 차이가 없었다. 다만 2회 처리한 공시동물 59%(26/44)에서 1차 개복수술후 생식기 유착등 후유증으로 난소반응을 조사할 수 없었다.

교배후 65, 72~79, 80~89시간에 걸쳐 난회수를 시도한 결과(Table 5) 회수율이 각각 93.3%, 38.3%, 37.5%로 나타나 시간이 경과될수록 회수율이 저하되었으며 총회수율은 37.5%(248/632)로서 저조한 편이었다. 집토끼 난자는 교배후 72~84시간에 자궁에 진입하며 교배후 84~90시간이상 자궁내 진입이 지연되면 발달이 정체되고, 108시간이 경과되면 초기 배반포를 비롯하여 거의 모든 난자의 생존이 불가능하다(Adams, 1980). 여기에 비추어 볼 때 본 시험의 난회수 시간에는 차질이 없는 것으로 생각된다. 그런데 토끼 난자는 발달단계가 진행됨에 따라 점액질막이 점차 발달되어 점액질막을 포함 배반포의 크기는 직경 1~5mm로 알려져 있다(Dickmann, 1977 ; Staples, 1971). 따라서 자궁각 관류시 관류도관의 구경이 보다 커야 될 것으로 생각된다.

Testosterone을 주입한 배반포를 공란토끼와 성주기가 동기화된 수란토끼 두당 6~8개씩 이식한 결과는 Table 6과 같다. 15두중 1두에서 임신이 이

루어져 7두의 자토가 분만되었다. 한편 대조구로서 PMSG와 HCG를 처리한 후 교배를 실시하여 임신을 유기시켰던 공시동물 3두중 1두에서 2두의 자토가 분만되었으나 분만직후 폐사되었다.

Adams(1980)는 집토끼 난자를 교배후 경시적으로 이식한 실험에서 36시간 이후부터 이식한 난자의 자궁내 체재율이 증가되기 시작하여 76~84시간에 절정에 이르렀다고 한다. 따라서 본 시험의 이식 시간은 타당하다고 생각된다. 수정란이식시 양호한 수태율을 얻으려면 신선란의 경우 체외보존기간이 되도록 단축되어야 하고 광선에 노출되면 불리한 것으로 알려져 있다. 그런데 본 시험에서는 공시 배반포의 처리에 3~6시간이 소요되었고 이때 광선에 노출된 점을 개선해야 될 것으로 생각된다. 그러나 대조구 공시동물 3두중 1두에서 2두의 자토가 분만되어 분만직후 폐사한 성적을 감안할 때 공시동물의 번식효율도 문제시 되는 것으로 생각된다.

본 시험에서 출생한 자토 7두의 외부 생식기를 이 유후에 통상적인 성감별 방법으로 관찰한 결과 7두 모두 수토끼로 판정되었다(Fig. 2). 그러나 이 결과가 배반포내 testosterone 처리에서 기인된 것인지 아니면 유전형질의 발현인지를 감별하기 위해서는 성염색체 분석이 요청된다.

## 적 요

집토끼 연두수 140두를 공시하여 배반포내에 testosterone 용액을 미세현미주입하고 수란토끼 15두에게 이식하여 그 발달을 조사하였다. 공시동물 140두에게 PMSG와 HCG를 처리하여 발정 및 배란을 유기한 결과 96%(134/140)에서 교배가 이루어졌고, 교배를 허용한 개체 117두에서 난소반응을 조사한 결과 배란수 11.23( $\pm 1.20$ ), 난포수 9.40( $\pm 1.22$ )로 나타났다. 동일한 개체에서 약 1개월 간격으로 다배란유기 처리를 2회에 걸쳐 실시한 결과 공시동물 59%에서 1차 처리후 개복수술에 따른 후유증으로 인하여 2회 처리후 난소반응을 조사할 수 없었다. 교배후 65~89시간에 난회수를 시도한 결과 5(248/632)의 회수율을 보였으며 경시적으로 보아 65시간에 93.3%, 72~79시간 38.3%, 80~89시간 37.5%의 나타나 교배 후 시간이 경과될수록 회수율이 저조한 경향이였다. 회수된 난자의 발달단계를 보면 교배후 72시간 이후에 배반포가 출현되었으며 회수된 난자의 43%(106/248)가 배반포였다. Testosterone을 미세현미주입한 배반포를 수란토끼 두당 6~8개씩 15두에게 이식한 결과 그중 1두에서 7두의 자태가 분만 되었다. 이들 자태의 외부생식기를 이유시 통상적인 성감별 방법으로 관찰한 결과 7두 모두 수토끼로 판정되었다.

## 참고문헌

- Adams CE. 1980. Retention and development of eggs transferred to the uterus at various times after ovulation in the rabbit. *J. Reprod. Fert.*, 60:309-315
- Austin CR, Edwards GR and Mittwoch U. 1981. Introduction, In: Mechanisms of Sex Differentiation in Animals and Man. Austin CR and Edwards RG. (eds.), Academic Press, New York. pp. 1-54.
- Betteridge KJ, Hare WCD and Singh EL. 1981. Approaches to sex selection in domestic animals. In : New Technologies in Animal Breeding. BG Brackett, GE Seidel Jr and Seidel SM (eds.), Academic Press, New York. pp. 109-125.
- Bidlingmaier F, Knorr D and Neumann F. 1977. Inhibition of masculine differentiation in male offspring of rabbits actively immunized against testosterone before pregnancy. *Nature* 266:647-648.
- Bromhall JD. 1975. Nuclear transplantation in the rabbit egg. *Nature* 258:719-721.
- Buhler ThA, Reding Th, Went DF, Weilenmann R, Frie R and Stranzinger G. 1987. Microinjection of mouse IGM-genes into pronuclei of rabbit eggs. *Theriogenology* 27(1):216.
- Catt KJ, Dufau ML, Neaves WB, Walsh PC and Wilson JD. 1975. LH-hCG receptors and testosterone content during differentiation of the testis in the rabbit embryo. *Endocrinology* 97:1157-1165.
- Dickmann Z. 1971. Egg Transfer. pp 133-145 Freeman and Co.
- Gardner RL and RC Edwards. 1968 : Control of the sex ratio at full term in the rabbit by transferring sexed blastocysts. *Nature* 218 :346-348.
- George FW and Wilson JD. 1988. Sex Determination and Differentiation. In : The Physiology of Reproduction Vol. 1, edited by E. Knobil et al., pp. 3-26. Raven Press, New York.
- Glass RH, Calaco PG, Lin TP, Florence J and OH JO. 1974. Development of the mouse blastocyst following injection with Newcastle disease virus.
- Jost A, Vigier B, Prepin J and Perchellet JP. 1973 : Studies on sex differentiation in mammals. *Recent Prog. Horm. Res.* 29:1-41.
- Jost A and Magre S. 1984 : Testicular development phases and dual hormonal control of sexual organogenesis. In: Sexual Differentiation : Basic and Clinical Aspects, edited

- by M. Serio et al., pp. 1-15. Reven Press, New York.
- Lin TP. 1966. Microinjection of mouse eggs. *Science* 151:333-337.
- Lin TP. 1971. Egg Micromanipulation, *Methods in Mammalian Embryology*, Daniel Ed. pp. 157-171. Freeman and Company, San Francisco, Ca.
- Lin TP and Monie IW. 1973. The development of mouse blastocysts injected with, or cultured in, trypan blue solution *J. Reprod. Fert.* 32:149-151.
- Markert CL. 1984. Genetic manipulation of mammalian embryos: Current techniques and their potential usefulness in livestock improvement. *Proc. 10th Int. Congr. Anim. Reprod. Artificial Insemination (Urbana-Champaign) IV:II-13~II-18.*
- McLaren A. 1983 : Sex reversal in the mouse. *Differentiation* 23 :S93-S98.
- Seidel GE, Jr. 1982. Applications of microsurgery to mammalian embryos. *Theriogenology* 17:23-34.
- Seidel GE, Jr. 1983. Mammalian Oocytes and preimplantation embryos as methodological components. *Biol. Reprod.* 28:36-49.
- Simons JP and Land RB. 1987. Transgenic livestock. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 34:237-250.
- Staples JP and Land RB. 1987. Transplantation in the rabbit. In, *Method in Mammalian Embryology*. Daniel Ed., pp. 290-304 Freeman and Co.
- Wagner TE, Murray FA, Minhas B and Kraemer DC. 1984. The possibility of transgenic livestock. *Theriogenology* 21:29-43.