韓國受精卵移植學會誌(1995) 第 10 卷 第 2 號
Korean J. Emb. Trans. (1995) Vol. 10, No. 2, pp. 171~175

체외생산 소 초기배 할구세포의 Embedding Matrix에서의 발생능력†

이홍준 · 서승운 · 이상호 · 송해범*
고려대학교 응용동물과학과

Development Ability of Bovine Early Embryo Blastomere *In Vitro* in Embedding Matrix†

H. J. Lee, S. W. Seo, S. H. Lee and H. B. Song*
Dept. of Animal Science, Korea Univ.

SUMMARY

This study was performed to establish the condition and the methods for the techniques of insertion the isolated blastomere cells into cytoplasm, in order to research the developmental ability of bovine embryo blastomere cells *in vitro* produced. After 24h *in vitro* ovary maturation with the ovaries from a slaughter house, *in vitro* fertilization was performed to the vital sperms which their mobility were decided by percoll gradient method, with 2~8 cell stage embryos, the blastomeres were isolated in Ca^{2+}, Mg^{2+}-free PBS, and following that embedded into agar and alginate solution, respectively. The rates of *in vitro* development are as follows; in agar embedded 11 among 120(9.2%) 1/2~1/3 blastomers cleaved and 6 among 93(6.5%) 1/4~1/8 blastomeres cleaved. In sodium alginate-embedded 14 among 84(16.7%) 1/2~1/3 blastomeres cleaved and 6 among 85(7.1%) 1/4~1/8 blastomeres cleaved. In case of Na-alginate, the rate of the cells were better than those of agar. The results suggest that the techniques for embeeding the isolated blastomeres into gel may help cloning of bovine early embryo without nuclear transplantation.

서 론

실험동물에 있어 할구세포의 발생능력은 비교적 구명이 되어 있지만 가축초기배의 경우 경제가치로 인하여 이와 같은 연구는 매우 미진하다. 특히, 핵이식, gene transfer등과 같은 생물 공학적 기술의 적극적 도입을 위해서는 생쥐수준의 기초발생에 대한 연구결과의 축적이 절실히 요구되며 이 같은 정보에 의해 시행착오적인 실험연구와 한정된 재원의 낭비를 피할 수 있을 것이다. 많은 종의 경우에서는 정상적인 배 발달에는 투명대를 필요로 하게 된다. 미세조작 기술에는 투명대를 이분으로 제거하는 것이 요구되어서, 결과적으로 초기배 생존 능력을 감소시킨다. 동결한 소 초기배의 영향 또는 투명대가 없는 것은 결과적으로 이식한 후에 임신율이 낮아진다. 이 생존 능력 감소에 대해서는 동결보존한 미세조작된 초기배에서는 비미세 조작된 초기배보다 수화 및 재수화 비율이 빨라지게 된다. 연구 보고에 따르면 미세조작 및 미세조작 하지 않은 초기배를 agar 봉매를 하게 되면 생존 능력을 증가된다고 한다. (Willadaen *et al.*, 1979, 1986) 최근에는 agar

† 본 연구는 한국과학재단지원에 의해 수행되었음.
* 대구대학교 축산학과(Dept. of Animal Science, Daegu Univ.)

gel 보다 안정하게 실험을 할 수 있는 alginate gel을 이용한 봉매법이 발표되었다. (Kojima *et al.*, 1990) 본 실험은 체외생산 소 초기배 할구세포의 발생능력을 조사하기 위해 분리된 할구세포를 gel상의 봉매기질에 매몰시키는 기술에 대한 조건·방법을 확립하고자 하였다.

실험방법 및 재료

1. 체외성숙

체외성숙에 사용된 난자는 도살장에서 난소를 채취하여 직경이 3~5 mm 되는 난포를 18G needle이 부착된 10 mL 주사기를 이용하여 흡입·회수하였다. 난구세포가 균일하게 분포된 것만을 모아서 Wash medium으로 3회 세척, TCM199 + 20% FCS + Gn (Yoo *et al.*, 1993)을 배양액으로 3회 더 세척한 후에 35mm dish에 2mL의 배양액을 넣은 후, 난구세포가 밀집한 난자를 넣어 24시간 체외성숙 배양을 하였다.

2. 체외수정

난구세포가 잘 퍼져있는 난자를 선발하여 hyaluronidase 처리 후, 3% sodium citrate로 난구세포를 완전히 제거하여 25μL Fert medium에 5~7개의 난자를 준비하였다. Percoll 90%와 45%를 2,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상징액을 제거한 후, 5~7mL의 Fert medium에 넣어 희석시키고 다시 800 rpm에서 10분 동안 원심 분리시켰다. 상징액을 제거한 후, 정자부유액을 최종적으로 회수하였다. 2.5μL 의 정자부유액을 난자가 있는 배양액에 첨가하여 수정을 개시하였다.(Florance *et al.*, 1992)

3. 초기배 조작에 의한 할구세포 분리

가축의 초기배는 생쥐에서 이용되고 있는 초기배의 다양한 조작기술이 용이하게 적용되지 않고 있으며, 특히 체외생산된 소 초기배의 경우 투명대 등의 변형 및 배란된 난자와는 달리 난구세포돌기 잔여물이 투명대내에 잔존하게 되므로 조작을 위해 큰 장해가 되고 있다. 이 같은 장애를 극복하기 위해 체외수정된 난자를 일련의 처리방법을 통하여 할구세포 분리기술를 확립시켰다. 3% sodium citrate용액으로 5분간 처리하여 잔여정자 및 난구세포 돌기를 완전히 제거하여 이후의 과정의 처리를 용이하게 하였다. 2세포기 이상 발생이 진행된 수정란을 선별하여 acid Tyrode용액으로 투명대를 제거한 후, Wash 배양액에서 수차례 세정을 한 후, 60mm dish내에 1000μL 의 Ca^{2+}, Mg^{2+}-free PBS drop을 만든 후, mineral oil로 덮은 후에 투명대가 제거된 난자를 넣은 후 37℃ hot plate에서 5분간 배양을 한 후 pipette 흡입·배출을 수차례 이용하여 할구를 개개로 분리한 후, Wash 배양액에서 3회 세정을 하고 봉매에 들어간다. 본 실험에서 확립된 방법에 의해 95% 이상의 투명대 제거 정상 초기배를 얻을 수 있었다. 특히 Ca^{2+}, Mg^{2+}-free PBS +BSA용액내에서의 할구세포분리는 생쥐에 비하여 용이하지 않아 60%정도의 정상할구세포만을 회수할 수 있었다.

4. Agar, sodium alginate 봉매 및 배양

2배 농도의 CZB배양액(2×CZB)과 멸균된 3% agar 또는 2.2% alginate용액을 1:1로 희석하여 1.5% agar-CZB 용액과 1.1% alginate-CZB용액을 만든다. 1.5% agar-CZB 용액은 상온에 두면 굳어지기 때문에 60~70℃의 항온수조에 넣어 용액의 응고를 방지하였다. 분리된 할구를 준비된 agar용액에 넣은 후 Pasteur pipette을 사용하여 용액과 함께 난자를 흡입하여 pipette 안에서 응고시킨 다음에 이를 CZB 배양액에 3회 세정을 한 후, BOEC+CZB배양액에 옮겨 24~48시간 배양한 후, 할구의 발생율을 조사하였으며, alginate의 경우에는 pipette안에 용액과 함께 난자를 흡입한 후, 그대로 CZB 배양액에 넣으면 alginate 응고가 되지 않기 때문에 $CaCl_2$용액내에서 잠깐동안 넣은 후 CZB 배양액에서 3회 세정 후, BOEC+CZB 배양액내에 옮겨 24~48시간 배양을 하였다(Fig. 1).

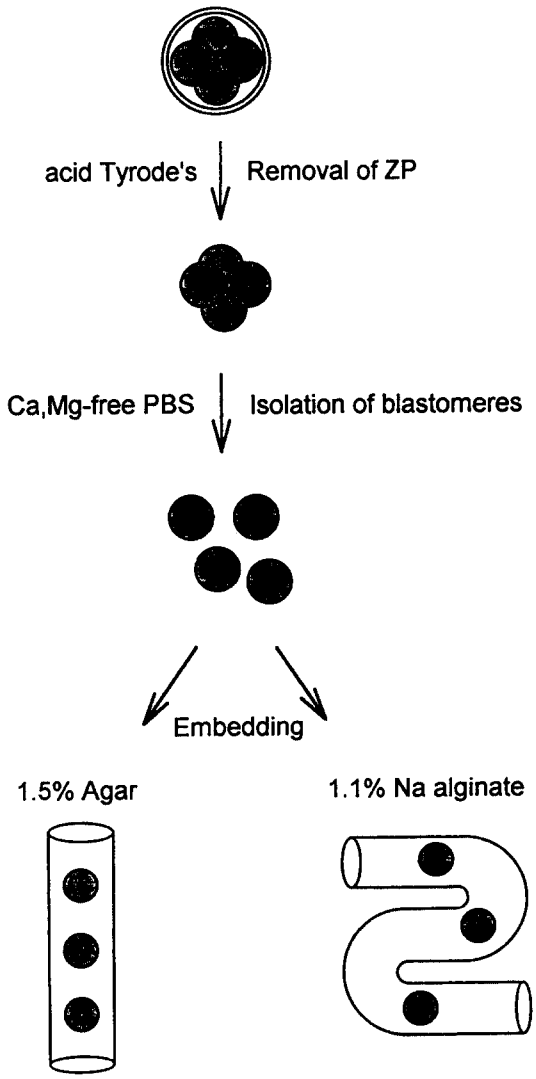

Fig. 1. Isolation and embedding of blastomeres for culture.

결과 및 고찰

1. 봉매기질내 발생

생쥐의 경우는 초기배의 채취가 용이하며 그에 관련된 연구가 많이 연구가 되어 있으며, 할구분리 및 봉매에 대한 연구 또한 많이 보고되어 있지만, 소의 경우는 난소 채취에 대해서 채취하기 어렵고, 생쥐처럼 초기배 발생에 대해서 연구 보고가 되어 있지 않으며, 할구분리 및 봉매에 대해서 연구가 아직 미흡하게 연구되어 있으며 할구분리 및 봉매에 대해서 기술을 확립하고자 연구 시행을 하였다.

본 실험에서 95%이상의 투명대 제거 정상초기배를 얻을 수 있었으며, Ca^{2+}. Mg^{2+}free PBS용액내에서 할구세포 분리는 생쥐에 비해서 용이하지 않아 60%정도의 정상 할구세포만을 회수할 수 있었으나, 생쥐에 보고된 바와 같이 할구세포 분리를 더 높은 비율로 회수할 수 있게 연구가 되어야 한다.

인공투명대인 agar, sodium alginate 봉매에 대한 배발생율을 검토를 하게 되면, 첫째로 agar에 이용한 총 난자는 3회 반복 실험에 213개 할구세포를 사용하여 1/2~1/3 120개, 1/4~1/8 93개를 이용하며 배발생율을 보게 되면 1/2~1/3 120개중 11(9.2%)개가 배발생을 하였고, 1/4~1/8에서는 93개중 6(6.5%)개가 배발생을 보여 주었다(Table 1). 정상적인 초기배의 경우에서는 18~25%의 배반포형성율을 가져 왔으나, agar봉매기질내에서 배발생을 보게 되면, 2세포가 주 배발생을 가지면서 3세포에서 2개, 8세포에서 1개의 배발달만을 가져왔으며 정상초기배처럼 배반포형성을 이루지 못하였다.

둘째로 sodium alginate에 이용한 총 난자는 2회 반복 실험에 169개 할구세포를 사용하여 1/2~1/3 84개, 1/4~1/8 85개를 이용하였으며 배발생율을 보게 되면 1/2~1/3에서 84개중 14(16.7%)개의 배발생을 보였고, 1/4~1/8에서는 85개 중 6(7.1%)개가 배발생을 하였다(Table 2). 대체적으로 결과를 보게 되면, sodium alginate가 agar보다 약간 높은 난할을 보이고 있다. Agar가 sodium alginate보다 낮은 결과를 가져오는 이유는 agar 응고방지를 위해 60~70℃의 물에서 유지하는 과정 중에 할구세포에 영향을 미치기 때문에 이미 보고된 논문들에 의하면 보다 안정된 실험에서 봉매가 가능한 alginate가 좋은 결과를 가져온다고 보고하고 있다(Meredith *et al.*, 1990).

Na-alginate 경우, 2세포의 비율은 agar보다 좋으나, agar에서 처리한 배 발달에서 여러 단계의 초기배가 나오지 못하고 있다(Fig. 2). Agar의 각 실험구별로 보게 되면, 1/2~1/3 초기배세포는 1/4~1/8보다 초기배 발생능력이 보다 좋은 결과를 가져

Table 1. Development of bovine blastomeres after agar embedment

Treatments	No. of experiments	Types of embryos	No. of blastomeres used	No. of blastomeres developed to(%)		
				2 cell	3 cell	8 cell
Agar	1	1/2~1/3	33	2(6.1)	–	1(3.0)
		1/4~1/8	19	2(10.5)	–	–
	2	1/2~1/3	50	2(4.0)	1(2.0)	–
		1/4~1/8	36	2(5.6)	–	–
	3	1/2~1/3	37	3(13.5)	–	–
		1/4~1/8	38	1(2.6)	1(2.6)	–
Total	3	1/2~1/3	120	9(7.5)	1(0.8)	1(0.8)
		1/4~1/8	93	5(5.4)	1(1.1)	–

Table 2. Development of bovine blastomeres after sodium alginate embedment

Treatments	No. of experments	Types of embryos	No. of blastomeres used	No. of blastomeres developed to 2 cell(%)
Sodium alginate	1	1/2~1/3	46	8(17.4)
		1/4~1/8	43	4(9.3)
	2	1/2~1/3	38	6(15.8)
		1/4~1/8	42	4(9.5)
Total	2	1/2~1/3	84	14(16.7)
		1/4~1/8	85	6(7.1)

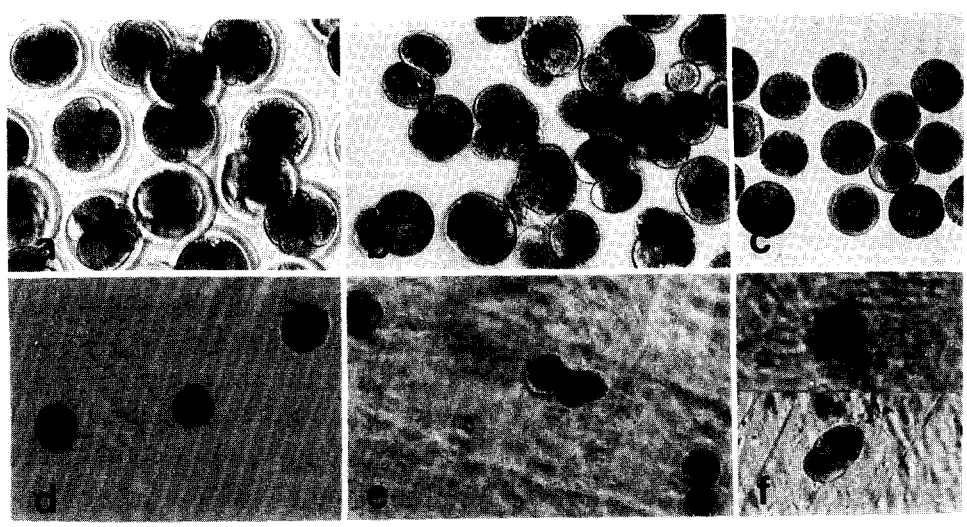

Fig. 2. The development of bovine embryo embedded in agar or sodium-alginate. The morphology of the fertilized bovine embryos (a), zona-free bovine embryos (b), isolated blastomeres of bovine embryos (c), the embryo embedden in agar (d) and in sodim-alginate (e). *In vitro* development of blastomeres embedded (f).

오고 있으며, sodium alginate 경우도 1/2~1/3초기배세포가 높은 결과를 나타내고 있다.

본 실험에서 확립된 소 초기배의 할구세포 분리 방법 및 봉매 방법에 의해 안정된 할구세포의 봉입이 가능하였으며 보다 숙련된 시행으로 발생능력은 개선되리라고 생각된다. 본 실험에서 이용된 봉매 기질외에 agarose, poly-L-lysine, Tisseel등도 비교 실험중이며 적정봉매기질의 선별이 가능할 것으로 기대되어 이 같은 기술확립에 의해 핵이식, 할구세포의 gene transfer와 biopsy, PCR에 의한 할구세포의 sexing 및 할구세포의 동결을 위한 인공투명대로서의 다양한 이용 가능성을 제시한다.

적 요

체외생산 소 초기배 할구세포의 발생능력을 조사하기 위해 분리된 할구세포를 각 처리구인 agar, algiante에 매몰시킨 후 배 발생능력을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 투명대 제거는 95% 정상 초기배세포를 얻을 수 있었다.
2. 할구세포분리는 생쥐에 비해서 60%정도의 정상 할구세포만을 얻을 수 있었다.
3. 난할율을 보게 되면 alginate가 agar보다 약간 높은 난할을 가져왔다.
4. Agar보다는 algiante가 여러 단계의 배발달가 나오지 못하였다.
5. Agar, alginate 실험구별로 보게 되면 1/2~1/3 초기배세포가 1/4~1/8보다 배발생 능력이 보다 좋은 결과를 가져왔다.
6. 따라서 현단계에서는 agar가 alginate보다 봉매기질에 이용될수 있음을 보여 주었다.

참고문헌

Florence LH Ng, Liu DY and Baker HWG. 1992. Comparsion of percoll, mini-percoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen sample. Human Reprod., 7, 261-266.

Kojima T, Hashimoto K, Ito S, Hori Y, Tomizuka T and Oguri N. 1990. Protection of rabbit embryos against fracture damage from freezing and thawing by encapsulation in calcium alginate gel. J. Exp. Zoo., 254: 186-191.

Meredith S, Nicks DK and Kiesling DO. 1990. The effects of time-of-exposure of alginate-coated rat embryos to calcium chloride on *in vitro* development; and pregnancy meintenance in ewes with alginate- coated 4- or 8-cell embryos. Theriogenology, 33: 288(abstr.)

Kolberg R. 1993. Human embryo cloning reported. Science, 262: 652-653.

Willadsen SM. 1979. A method for culture of micromanipulation sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. Nature, 277: 298~300.

Willadsen SM. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. Nature, 320:63~65.

Yoo HJ, Choi SC and Lee SH. 1993. Maximization of the numbers of follicular oocytes recovered from the bovine ovaries. Korean J. Anim. Reprod., 17, 149-157.