

소 초기배 할구세포의 체외발생능력

이홍준 · 서승운 · 최승철 · 박성수 · 김기동 · 이상호 · 송해범*

고려대학교 생명공학원

***In vitro* Development of Blastomeres Isolated from Bovine Early Embryo**

H. J. Lee, S. W. Seo, S. C. Choi, S. S. Park, K. D. Kim, S. H. Lee and H. B. Song*

Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701

SUMMARY

The aims of this study are to establish a stable isolation method of blastomeres from bovine early embryos and examine their developmental potential *in vitro*. Early embryos were produced by maturation and fertilization *in vitro* of bovine follicular oocytes. Blastomeres were isolated from 2~8-cell embryos in Ca^{2+} -, Mg^{2+} -free PBS+EDTA after removing the zonae pellucidae. Isolated blastomeres were cultured in CZB containing BOEC for upto 240 hpi. Cleavage rates of them were 18.5%(10/54) in 1/2 blastomeres, 33.3%(16/48) in 1/4 blastomeres and 34.2%(14/41) in 1/8 blastomeres, respectively. The rates of blastocystic vesicle formed were 8.7%(4/46) in 1/2 blastomeres, 26.6%(17/64) in 1/4 blastomeres and 10.3%(8/78) in 1/8 blastomeres, respectively. Blastomeres developed into various types of blastocystic vesicles and trophoblastic vesicles as evidenced by the Hoechst 33258 staining and morphology. This results suggest that the isolation method used and subsequent culture of isolated blastomeres from bovine early embryos should be useful to obtain extra embryonic cells for various analyses such as PCR and putative ES cell culture.

(Key words : bovine, blastomere, isolation, blastocystic and trophoblastic vesicle)

서론

실험동물에 있어 할구세포의 발생능력은 비교적 구명이 되어 있지만 인간을 포함하여 가축 초기배의 할구세포의 분리 및 각 할구세포의 발생능에 대한 연구는 경제가치 및 안정된 다수의 초기배 공급 문제로 인하여 이와 같은 연구는 매우 미진하다

(Kelly 등, 1977; Willadsen, 1979). 특히 핵이식, gene transfer 등과 같은 생물공학기술의 적극적 도입을 위해서는 생쥐 수준의 기초 발생에 대한 연구 결과의 축적이 절실히 요구되며 이같은 정보에 의해 시행 착오적인 실험 연구와 한정된 재원의 낭비를 피할 수 있을 것이다. 실험동물인 생쥐의 경우 2- 및 4-세포 초기배로부터 분리된 1/2 할구세포는 정상배반포를 형성하여 초기배 이식후 정상 산

대구대학교 축산학과(Department of Animal Science, Taegu University)

*본 연구는 한국과학재단 핵심전문연구과제 지원사업('94~'96)에 의해 수행되었음(과제번호 : 941-0600-067-2).

자를 얻고 있으나(Tarkowski, 1956), 1/4 및 1/8 할구세포는 이같은 발생능력이 없는 것으로 알려져 있다(Rossant, 1976). 쥐의 경우에서도 2-세포 초기배로부터 분리된 1/2 할구세포로부터 정상 산자를 얻었다고 보고하였다(Nicholas 등, 1989). 이와 같이 설치류에 있어서는 매우 이른 시기의 할구세포에만 전능성이 존재하는 것으로 알려져 있다. 토끼에서는 2-, 4-, 8-세포로부터 분리된 1/2, 1/4, 1/8 할구세포가 임신말기까지 발생하는 것을 확인하였으나(Moore 등, 1968), 1/4 및 1/8 할구세포의 경우에는 배반포의 내부세포외 세포수가 적어 blastocystic vesicle이 형성되어 임신말기까지의 발생율이 낮은 것으로 보고되고 있다(Seidel, 1952, 1960; Daniel과 Takahashi, 1965; Tsunoda과 McLaren, 1983). 소의 경우도 이와 비슷하여 2/8 할구세포의 경우 정상 산자를 얻고 있으며(Willadsen과 Polge, 1981), 1/2, 1/4 및 1/8 할구세포까지도 전능성이 있지만 1/8 할구세포의 경우 그 비율이 낮은 것으로 알려져 있다. 그러나 이러한 물리·화학적인 할구세포의 분리 후 체외배양시 투명대의 제거 또는 손상 등으로 인해 발달율이 저하되는 문제점으로 인해 할구세포의 분리 후 수란우의 난관 내에 직접 이식하거나 타 동물의 난관을 이용하여 할구세포를 발달시킨 후 이식하는 방법 등이 이용되었다(Willadsen, 1979). 본 연구는 체외 생산된 소 초기배로부터 안정적인 할구세포의 분리 및 배양방법을 확립하고 소 초기배 할구세포의 체외발생능을 검토하고자 한다.

실험방법 및 재료

1. 시 약

일반적인 난자 배양액 조제에 이용한 시약은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, U. S. A)과 BDH Chemical Co.(Poole, U. K.)에서 구입하였다.

2. 생식세포

본 실험에 이용된 난자는 평택 도축장으로부터 한우 난소를 회수한 후 미성숙 난자를 채취하여 이용하였으며, 정자는 국립종축원과 한우개량사업소로부터 구입한 동결정액을 이용하였다.

3. 난자의 체외성숙

도축장에서 채취한 난소를 37°C의 생리적 식염수가 들어 있는 보온병에 담아 실험실로 운반하여 세정한 후, 18G 주사침이 부착된 10ml 주사기를 이용하여 직경 3~5mm의 난포로부터 난자를 흡입 회수하였다. 회수된 난포내용물은 15ml glass tube에 정치시켜 상정액을 제거한 후 60mm dish에 넣어 균일하게 부착되어 있는 난자 난구세포복합체(oocyte-cumulus cells; OCCs)만을 골라 Wash 배양액으로 3회 세정하였다. 세정된 난자·난구세포복합체를 TCM199 + FCS(Gibco Life Technologies Inc. Grand Island, N. Y., U. S. A.)로 3회 세정한 후 TCM199 + 20% FCS + Gn(PMSG, hCG; 10 IU/ml : Folligon, Intervet Co., Boxmeer, Holland)로 옮겨 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 22~24시간 동안 체외성숙 배양하였다.

4. 체외수정

1) 정자의 준비

유우 및 한우 동결 정액 straw를 액체질소 tank로부터 꺼내어 37°C 물에서 1분간 용해하였다.

2) 성숙난자의 준비

22~24시간 체외성숙 배양한 난자 중에서 난구세포가 잘 확장된 난자만을 성숙난자로 선별하였다. 난구세포가 확장된 난자를 hyaluronidase(300U/mg)와 3% sodium citrate로 처리하여 난구세포를 제거하였다. 제1극체가 보이는 난자만을 Fert 배양액으로 3회 세정한 후, Fert 5μl 당 난자 1개의 비율로 난자를 준비하였다. 1ml 90% Percoll 용액과 1ml Fert 용액을 희석하여 만든 45% Percoll 용액과 2ml 90% Percoll 용액을 준비한 다음 90% Percoll 용액은 하층에, 45% percoll 용액은 상층에 gradient층이 형성되게 15ml conical tube에 넣은 후 2시간 동안 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 용해한 정자를 45% Percoll 용액 상층에 gradient층이 형성되게 한 후 2,000rpm에서 30분간 원심분리하여 상정액을 제거하였다. 생존 정자만을 포함하고 있는 정자 pellet을 회수하여 6~8ml Fert 배양액에

회색시킨 후 800rpm에서 10분간 원심분리한 이후에 상정액을 제거하여 최종적으로 100 μ l Fert 배양액이 남게 하여 정자 pellet을 회색하였다(Florance 등, 1992).

3) 체외수정

10 μ g/ml heparin과 40 μ l/ml PHE 용액이 첨가된 50 μ l Fert 수정용 배양액에 10개의 성숙난자를 넣은 후 4 μ l 정자농축 용액을 첨가하여 1~2 \times 10⁶ 정자/ml의 농도로 체외수정을 실시하였다.

5. 공배양 체세포의 준비

도축장에서 채취한 소 난관에 부착되어 있는 지방 및 기타 결체조직을 모두 제거한 후 생리적 식염수로 5회 세정하였다. 생리적 식염수가 들어 있는 90mm Petri dish에 난관을 넣고 slide glass를 이용

하여 난관을 smear하여 난관내부의 상피세포를 추출하였다. 추출된 상피세포를 원심분리하여 세포피를 얻은 후, 미생물 오염을 방지하기 위해 Wash 및 TCM199 배양액을 사용하여 각각 3회 및 2회 원심분리하여 세정하였다. 세정한 소 난관상피세포를

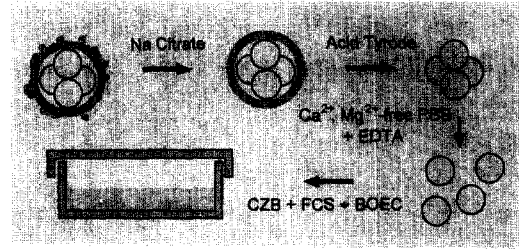


Fig. 1. A schematic diagram for the isolation and culture of bovine blastomeres from early embryos produced *in vitro*.

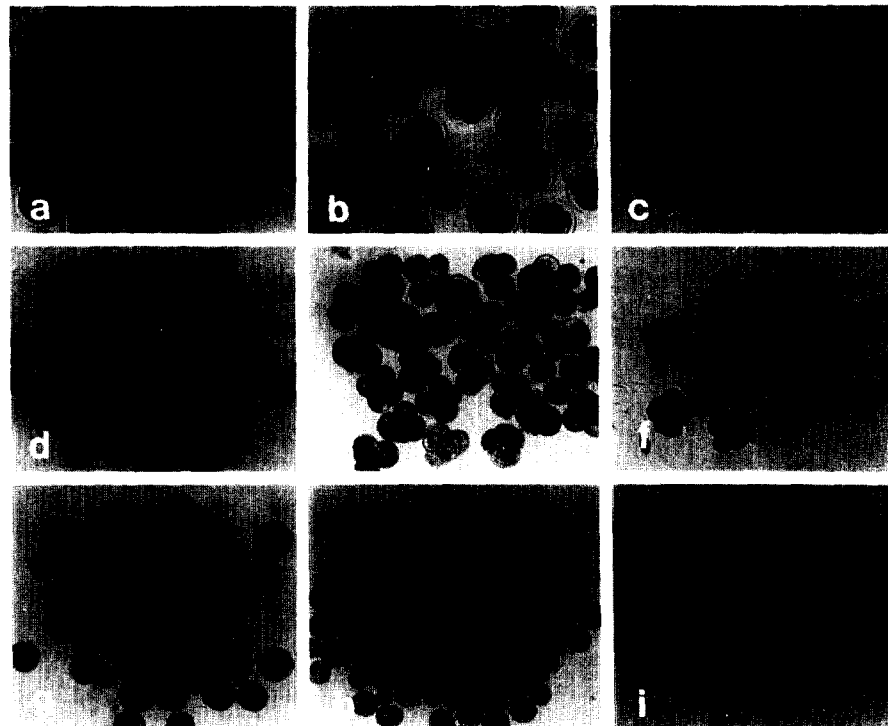


Fig. 2. The removal of zona pellucida and the isolation of blastomeres from bovine early embryos. 2-cell (a), 4-cell(b), 8-cell(c), zonal free embryos(d, e and f) and isolated 1/ 2(g), 1/ 4(h) and 1/ 8 blastomeres(i). Magnification is 200 \times .

15% 소태아혈청이 함유된 50 μ l 의 TCM199 배양액에서 배양하였으며 48시간마다 신선한 배양액으로 교환하였다.

6. 초기배 조작에 의한 할구세포 분리

체외수정된 소 초기배의 경우 투명대 등의 변형 및 배란된 난자와는 달리 난구세포돌기 잔여물 및 정자 등이 투명대 내에 잔존하기에 3% sodium citrate 용액으로 1분간 처리하여 잔여정자 및 난구세포 돌기를 완전히 제거하여 할구분리가 용이하게 하였다(Fig. 1). 적정크기의 1/2, 1/4 및 1/8 할구세포를 가진 2-, 4-, 8-세포기의 소 초기배를 분류한 후 acid Tyrode's 용액으로 투명대를 제거하였다. 투명대가 제거된 각 할구세포를 Wash 배양액에서 수차례 세정한 후 60mm dish 내에 1ml의 Ca²⁺-Mg²⁺-free PBS + 1%(v/v) EDTA + 4mg/ml BSA 배양액에서 30초에서 1분 동안 정치한 후 pipette의 흡입 배출에 의해 할구세포를 개개로 분리하였다. 분리된 할구세포를 Wash 배양액과 CZB + 15% FCS 배양액에서 각각 3회 세정한 후 소 난관상피세포와 공배양하였다(Fig. 2).

7. 초기배 발생의 분석

할구세포 분리 후 6일 동안 배양하여 blastocystic vesicle를 조사하여 배발생율을 확인하였으며, 체외에서 생산된 blastocystic vesicle 세포수를 관찰하기 위해 Hoechst 33258로 염색하여 세포 수

를 조사하였다.

8. 사진촬영

난자 및 초기배의 형태는 Nikon 위상차현미경 사진기하에서 ASA 100 필름을 사용하였고, 형광사진은 Olympus(BH-2) 현미경 사진기하에서 ASA 400 필름으로 촬영하였다.

결과 및 고찰

1. 할구 분리 방법의 확립

실험동물 초기배에 비해서 가축의 초기배는 비교적 늦은 시기까지 전능성을 보이기 때문에 할구세포의 분리 및 배양에 의한 초기배의 cloning은 실험동물에 비하여 유리하다고 할 수 있다. 체외수정에 의해 생산된 초기배 세포중 분열이 신속히 일어나는 초기배만을 선택하여 3% sodium citrate 처리에 의해 투명대에 잔존하는 난구세포 및 정자 등을 제거한 후 acid Tyrode's 용액에서 투명대를 제거하였다. Ca²⁺-Mg²⁺-free PBS + 1%(v/v) EDTA + 4mg/ml BSA 용액에서 할구세포가 이완되도록 처리한 후 미세한 pipette을 이용하여 할구세포를 분리한 후 배양에 이용하였다. 본 실험에서 투명대를 제거한 후 95% 이상의 정상 초기배를 얻을 수 있었으며, Ca²⁺-Mg²⁺-free PBS + 1%(v/v) EDTA + 4mg/ml BSA 용액 내에서 할구세포 분리·회수율은 생쥐에 비해서 약간 떨어지지만 80% 이상의 정

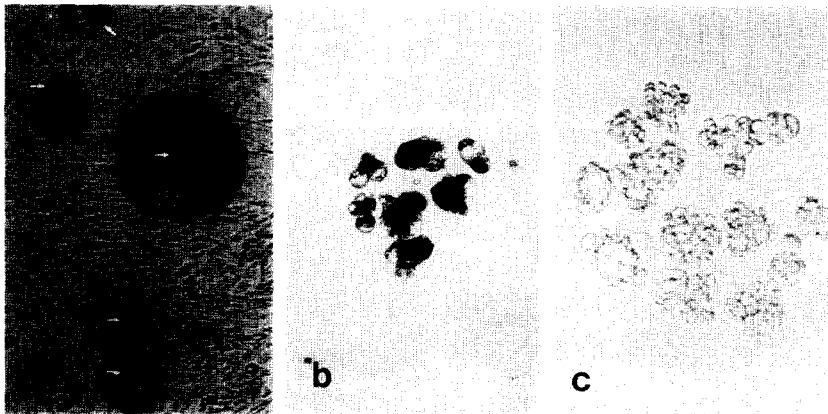


Fig. 3. Various morphological characteristics of blastocystic vesicle derived from bovine blastomeres. Blastocystic vesicles(a) and trophoblastic vesicles(b and c). Arrows indicate inner cell mass(ICM). Magnification is 200 \times .

Table 1. Representative *in vitro* development of isolated bovine blastomeres

Stages of blastomeres	No. of blastomeres used	No. of blastomeres cleaved(%)	No. of embryos showing following stages(%)			
			2-cell	4-cell	8-cell	Blastocystic vesicle
1/2	148	46(31.1)	14(30.4)	18(39.1)	10(21.8)	4(8.7)
1/4	162	64(39.5)	18(28.1)	12(18.7)	17(26.6)	17(26.6)
1/8	197	78(39.6)	33(42.1)	22(27.1)	16(20.5)	8(10.3)
Total	507	188(37.1)	65(34.6)	52(27.7)	43(22.8)	28(14.9)

상 할구세포를 회수할 수 있었다.

2. 분리된 할구세포의 발생

각 할구세포는 48시간 간격으로 관찰하면서 blastocystic vesicle이 형성되는 시기에 발달율을 조사하였다. 할구분리 후 48시간째에 1/2 할구세포는 31.1%(41/148), 1/4 할구세포는 39.5%(64/162), 1/8 할구세포는 39.6%(78/197)의 발달율을 보여주어 1/2 할구세포에 비해 1/4과 1/8 할구의 발달율이 더 높은 것으로 나타났다(Table 1). 체외배양 후 6일째에 조사된 blastocystic vesicle 형성율은 1/2 할구세포는 8.7%(4/46), 1/4 할구세포는 26.6%(17/64), 1/8 할구세포는 10.3%(8/78)를 각각 나타내어 1/4 할구세포에서 blastocystic vesicle 형성율이 가장 높은 것으로 보여졌다. 각 vesicle의 형태는 마치 투명대 탈출을 일으킨 배반포와

유사한 형태인 blastocystic vesicles과 내부세포피가 결여되어 있는 trophoblastic vesicles의 형태를 보여 주었으며 (Fig. 3a, b) vesicles의 형태 및 크기는 다양하였다(Fig. 4a). vesicles 형태가 다양하게 나타내는 이유는 할구세포수의 감소와 투명대의 제거로 인한 구조적인 불안정 때문인 것으로 사료된다(Tarkowski 등 1959 a, b). 특히 발생이 신속히 진행되는 일부 vesicle들은 다양한 형태로 소난관상피세포에 영양외배엽 세포가 부착되어 outgrowth가 일어나는 것과 내부세포피의 colonization이 관찰되어(Fig. 4b와 c) 유사 소 배아주세포의 배양에 대한 가능성을 제시해 주었다.

3. Blastocystic vesicle의 세포 수

1/2, 1/4 및 1/8 할구세포에서 형성된 blastocystic vesicle의 세포 수를 조사하기 위해 Hoechst



Fig. 4. *In vitro* development of blastocystic vesicles. Expanded vesicles from 1/4 and 1/8 blastomeres(a). Some of the blastocystic vesicles showed outgrowth of trophoblast(b) on BOEC and ICM cells were colonized(c). Magnification is 200 \times .

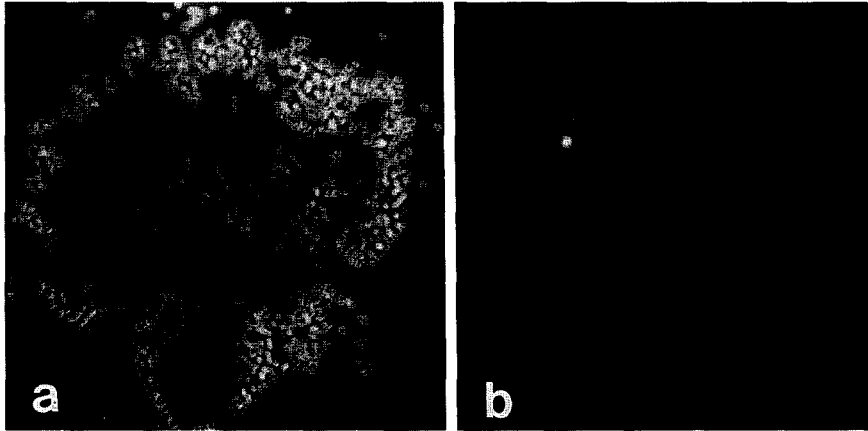


Fig. 5. A blastocystic vesicle showing 29 cells. The vesicle was stained with Hoechst 33258 and mounted under a coverslip with a gentle pressure. The nuclei were visualized under light(a) and fluorescence microscope(b). Magnification is 200 \times .

33258로 염색하여 핵을 관찰한 결과 정상적인 체외 수정 및 배양에 의해 생산된 배반포의 경우에는 120개에서 140개의 세포 수를 가지고 있는 것에 비해 단지 15개에서 30개의 세포 수만이 관찰되었다 (Fig. 5). 이러한 세포 수의 급격한 감소는 부족한 세포질 및 투명대의 결여로 인한 발생의 저해 때문인 것으로 추정된다. 그러나, 부족한 세포수에도 불구하고 정상적인 배반포와 유사한 시기에 blastocystic vesicle을 형성하는 것으로 나타나서 처녀발생 초기배와의 융집 chimera에 의해 세포수를 증가 시킴으로써 정상적인 배 발생을 유도할 수 있는 가능성을 보여주었다. 본 실험에 의해 확립된 할구분리 및 배양방법을 이용하여 세포 수를 증가시킨 후 PCR을 수행하면 보다 정확한 가축초기배의 성 판정이 가능할 것으로 보이며, 인간의 유전적 질병의 조기 진단을 위한 염색체 검사 등에도 효율적으로 이용될 수 있을 것이다. 본 연구에서 이용된 할구세포의 분리 및 배양방법은 가축 초기배의 발생능을 연구하는 주요한 수단으로 이용될 수 있으며, 가축 할구세포의 발생능에 대한 중요한 자료로 이용될 수 있을 것이다.

적 요

본 실험은 체외생산 소 초기배 할구세포의 발생

능력을 조사하기 위해 할구세포의 분리 및 체외발생능력을 조사하였다. 2~8 세포 소 초기배로부터 Ca^{2+} - Mg^{2+} -free PBS+1%(v/v) EDTA+4 mg/ml BSA 용액 하에서 pipette을 이용하여 80% 정도의 정상 할구세포를 분리·회수하였다. 분리된 할구세포의 48시간 동안의 체외발생율은 1/2, 1/4, 1/8 할구세포가 각각 31.1%(46/148), 39.5%(64/162), 39.6%(78/197)의 초기발생율을 나타내었으며, 6일째의 blastocystic vesicle 형성율은 1/4 할구세포가 26.7%(17/64)로 1/2할구세포의 8.7%(4/46)와 1/8할구세포의 10.3%(8/78)에 비해 높은 발생율을 보여주었다. blastocystic vesicle 형태는 배반포와 유사한 blastocystic vesicle 과 내부세포괴가 결여되어 있는 trophoblastic vesicle 형태로 발생하였다. Hoechst 염색에 의해 blastocystic vesicle의 세포 수를 조사한 결과 15~30개의 세포 수를 나타내었다. 이 같이 할구세포로부터 발달된 blastocystic vesicle은 유사 배아주 세포의 배양 및 PCR 성 판정과 유전적 질병의 조기진단 등에 효율적으로 이용될 수 있을 것이다. 본 연구에서 확립된 할구세포의 분리 및 배양방법은 가축 초기배의 발생능을 연구하는 중요한 자료로 이용될 수 있을 것이다.

인용문헌

- Daniel JC and Takahashi K. 1965. Selective laser destruction of rabbit blastomeres and continued cleavage of survivors *in vitro*. Exp. Cell Res., 39:475-482.
- Florence LHN, Liu DY and Baker HWG. 1992. Comparison of percoll, mini-percoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen sample. Human Reprod., 7:261-266.
- Kelly SJ. 1977. Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. J. Exp. Zool., 200:365~376.
- Moore NW, Adams CE and Powson LEA. 1968. Developmental potential of single blastomeres of the rabbit egg. J. Reprod. Fert., 17:527.
- Nicholas JS and Hall BS. 1942. Experiments on developing rats. II. The development of isolated blastomeres and fused eggs. J. Exp. Zool., 90:441.
- Rossant, J. 1976. Postimplantation development of blastomeres isolated from 4- and 8-cell mouse eggs. J. Embryol. Exp. Morphol., 36:283-290.
- Seidel F. 1952. Die Entwicklungspotenzen einer isolierten blastomere des zwizellenstadiums im saugetieral. Naturwissenschaften, 39:335-336.
- Tarkowski AK. 1959. Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. Nature, 184:1286-1287.
- Tsunoda Y and McLaren A. 1983. Effect of various procedures on the viability of mouse embryos containing half the normal number of blastomeres. J. Reprod. Fert., 69:315-322.
- Willadsen SM. 1979. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. Nature, 277:298-300.
- Willadsen SM and Polge C. 1981. Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. Vet. Rec., 108: 211-221.

(접수일자 : 1997. 12. 10 / 채택일자 : 1997. 12. 26)