

DNA 미세현미 주입 한우 수정란의 체외 발달

김은국·강만중·문승주[†]

전남대학교 농과대학 동물자원학부, 전남대학교 농업과학기술연구소

In Vitro Development of IVM/IVF Derived Hanwoo Embryos after DNA Microinjection

E. K. Kim, M. J. Kang and S. J. Moon[†]

Department of Animal Science, College of Agriculture, Chonnam National University
Institute of Agricultural Science & Technology, Chonnam National University

SUMMARY

This study was carried out to investigate developmental ability of IVM/IVF derived hanwoo embryos after DNA microinjection. Microinjected hanwoo embryos were cultured for 7 days. The cleavage rates of DNA injected embryos (36.3%) was significantly lower than those of non-injected embryos (66.4%; $p < 0.05$). The percentage of injected embryos reaching to the morulae and blastocyst was significantly lower than those of non-injected embryos ($p < 0.05$). When injected embryos were cultured containing L-ascorbic acid and α -tocopherol for 168 hrs, the morulae and blastocyst rates were significantly higher than control ($p < 0.05$).

These results suggested that the addition of L-ascorbic acid and α -tocopherol can enhance development to the morulae and blastocyst of microinjected embryos and improved culture condition increased the transgenic hanwoo embryos.

(Key words : IVM, IVF, microinjection, embryo, antioxidants, Hanwoo)

서론

근래 생물공학의 발달과 더불어 포유동물의 배를 체외에서 조작하는 기술이 세계 각국에서 집중적으로 연구되고 있다. 수정란의 체외조작기술은 번식효율의 극대화 및 유전능력을 획기적으로 향상시킬 수 있기 때문에 동물의 유전적 개량과 번식효율 개선 등에 널리 이용되고 있다. Lin(1966)이 생쥐 난자내에 bovine gamma globulin을 미세현미 주입하여 성공한 이후 이 분야의 연구가 활발하게 진행되고 있으며 미세현미 주입기법으로 외래유전자 등 유전물질을 비롯한 다양한 물질들

이 동물 수정란에 이식하여 좋은 성과를 거두고 있다(Kubisch 등, 1995; 나 등, 1994; Takeda와 Toyoda, 1991; McEvoy와 Sreenam, 1990; Pursel 등, 1987; Hammer 등, 1986; Brem 등, 1985; Seidel, 1982, 1983; Glass 등, 1974; Lin과 Mornie, 1973). 그러나 미세현미 주입 이후 수정란의 극히 낮은 체외발달 성적과 매우 높은 mosaicism이 큰 문제로 대두되고 있다. 이러한 문제를 극복하기 위하여 체외성숙과 수정 및 배양체계의 개발(문 등, 1999; Reed 등, 1996; Bavister 등, 1992; Ellington 등, 1990) 등의 연구가 있었으나 미세현미 주입된 수정란의 체외발달율을 개선하기 위한 연구는 미미한 실정이다.

따라서 본 연구는 미세현미 주입된 한우 수정란

[†]Correspondence

의 체외발달 성적을 개선시키기 위하여 체외배달 배양액 내에 항산화제인 L-ascorbic acid와 α -tocopherol의 첨가효과를 검토하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시 난자의 채취

본 실험에 사용된 난소는 도살 직후 한우 암소에서 적출하여 penicillin G(100 units/ml)와 streptomycin sulfate(100 μ g/ml)가 함유된 생리식염수(30~36°C)에 넣어 2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 미성숙 난포란은 항생제가 첨가된 신선한 생리식염수로 난소 표면을 3~4회 세척한 후 18 gauge의 주사침이 부착된 10cc disposable syringe로 난소의 실질을 통과하지 않고 난소 표면을 조심스럽게 이동하면서 난포의 크기가 3~6 mm인 난포에서 난포액과 함께 난포란을 흡입·채취하였다. 흡입된 난포액을 80mm petri dish에 담아 약 5~10분간 정지한 뒤 실체 현미경 하에서 pasteur pipette를 사용하여 채취하였으며, 채취한 난포란은 3~4회 세척(TCM-199 + 10% FCS)하고, 난구세포 층과 세포질의 충실도에 따라 Wiemer 등(1991)의 방법에 따라 선별·채취하였다. 즉, 실체현미경 하에서 4~5층으로 난구세포 층이 충만하고 균일한 세포질을 가지며 전체적으로 밝은 갈색을 띤 것을 등급 A, 2~3층의 난구세포층을 가지며 전체적으로 다소 어두운 것을 등급 B, 부분적으로 나뉘었으며 전체적으로 어두운 것을 등급 C, 난구세포층이 사방으로 퍼져 있으며 난세포질이 균일하지 않은 것을 등급 D로 구분하였으며, 등급 A와 B에 해당하는 난포란만을 실험에 공시하였다(Funahashi와 Day, 1993).

2. 배양액

1) 체외성숙 배양액

체외성숙 배양액은 TCM-199, streptomycin(100 μ g/ml), penicillin G(100 units/ml)와 hormone(10 IU/ml PMSG, 10 IU/ml HCG)과 10% FCS를 첨가하여 사용하였다.

2) 정자의 수정능 획득 및 체외수정 배양액

B.O. medium에 10 mM의 caffeine(Sigma, U.S.A)을 첨가하여 정자 세척용 B.O. medium을 제조하였고, B.O.medium에 5mM의 caffeine 및 0.5% Bovine Serum Albumin(BSA, Sigma)과 heparin (10 μ l/ml)을 첨가하여 정자의 수정능 획득 및 성숙난자의 체외수정용 B.O. medium을 제조하였으며, 0.22 μ m syringe filter로 여과하고 15 ml cap tube(Falcon, England)에 분주하여 39°C, 5 % CO₂로 조절된 배양기 내에서 20시간 이상 평형시킨 후 사용하였다.

3. 난포란의 체외성숙

미성숙 난포란의 체외성숙은 Wiemer 등(1991)의 방법에 준하여 TCM-199배양액에 hormone과 FCS가 첨가된 체외성숙 배양액을 60 mm petri-dish(Nunc, Denmark)에 분주하여 배양기 내에서 20시간 이상 전배양을 하여 평형을 실시한 후 여기에 난구세포와 세포질의 충실도가 좋은 난포란만을 옮겨 체외성숙을 유도하였다. 체외 성숙도는 난구세포의 팽창과 세포질의 충실도 등으로 판정하였다.

4. 체외수정

축협 한우 개량본부 한우 개량부에서 생산된 한우 동결정액을 액체질소탱크에서 꺼내 공기 중에서 약 5초간 방치하고 38°C의 water bath에서 30초간 용해시킨 후 10 mM caffeine이 첨가된 B.O. medium이 담겨져 있는 15 ml 시험관에 혼합하여 희석한 다음 500 \times g으로 5분간 2~3회 원심분리한 후, 정자 pellet을 5 mM caffeine과 0.5% BSA, 10 μ g/ml heparin이 첨가된 B.O. medium으로 재부유하였다. 그 후 정자의 최종 농도가 1 \times 10⁶ 정자/ml가 되게 조정하여 체외수정에 대비하였다.

정자를 함유한 체외수정 배양액 200 μ l의 소적을 60 mm petri-dish(Nunc)에 만든 후 mineral oil(Sigma)로 피복하고 체외성숙된 난자를 체외수정용 B.O. medium으로 2~3회 세척한 후 정자 소적당 45~50개씩 옮겨 6시간 동안 CO₂ incubator에서 체외수정을 유도하였다.

5. DNA 미세현미 주입과 체외배양

체외수정 유기 16~18시간 후 원심분리(15,000 rpm/5min) 하여 체외수정란의 난구세포와 지방구를 제거한 다음 도립현미경(Zeise)에서 미세조작장치(Narighige)를 이용 음성전핵 내에 미세현미 주입하였다. 미세주입용 외래유전자는 pCMV β -galactosidase DNA(Clontech 사)를 EcoR I 과 Hind III로 소화한 후 약 4.3 Kb의 주입용 DNA를 정제하여 사용하였다. 미세주입이 완료된 수정란은 체외배양액(CR1aa, TCM-199)에서 7일간 배양하면서 체외배발달 성적을 조사하였다.

5. 통계분석

본 실험에서 얻어진 결과는 SAS package를 이용 요인의 유의성 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 미세현미 주입난자의 발달

체외수정 후 음성전핵 내 DNA 미세현미 주입한 수정란과 주입하지 않은 수정란의 발달성적은 Table 1에 제시한 바와 같다. 미세현미 주입 48시간 후에 조사된 난할율은 미세주입하지 않은 수정란의 난할율은 66.4% , 미세주입 난자의 난할율은 36.3%로 유의적으로 낮았으며($p < 0.05$), 168시간 배양 후 조사된 배발달 성적도 미세주입한 경우

상실배와 배반포배 발달율이 각각 5.6%와 1.9%인 반면 미세주입하지 않은 수정란의 발달율은 각각 20.5%와 12.8%로 유의적으로 높았다($p < 0.05$). 이와 같이 미세주입한 난자의 체외발달 성적이 유의적으로 낮은 본 연구의 결과는 Hammer 등(1986)과 Haidu 등(1994)의 보고와 일치하였으며 이러한 결과는 미세주입시 난자에 가해지는 물리·화학적 자극이 난할율과 배발달율의 저해요인으로 작용하기 때문으로 여겨진다(Williams 등, 1992).

2. 체외 배발달 배양액 내 항산화제 첨가효과

L-ascorbic acid와 α -tocopherol을 체외 배발달 배양액에 농도별로 첨가 미세현미 주입 수정란의 체외 배발달 성적을 비교 조사한 결과는 Table 2, 3과 같다.

체외 배발달 배양액에 L-ascorbic acid를 50 μ M 과 100 μ M을 첨가배양시 난할율은 CR1aa에서 각각 45.5% 와 41.8%, TCM-199에서 42.0%와 40.8%로 대조구의 39.3%와 34.6%에 비하여 높았으나 통계적인 유의차는 없었다($p < 0.05$). 그러나 168시간 동안 배양 후 상실배와 배반포배 발달율이 대조구에 비하여 처리구에서 유의적으로 높았다 ($p < 0.05$).

한편, 체외배발달 배양액내 α -tocopherol 첨가했을 경우에도 CR1aa 와 TCM-199 배양액에서 난할율은 처리간에 유의차가 없었으나 168시간 배양

Table 1. *In Vitro* development of Hanwoo IVM/IVF embryos after DNA microinjection

Treatment	Culture medium	No. of embryos examined	No.(%) of embryos cleaved at 48 h	No.(%) of embryos developed to				
				48 h			168 h	
				2 cell	4 cell	8 cell	Mor	Blast
Non-injected	CR1aa	130	90(69.2)	23(25.6) ^a	38(42.2)	29(32.2)	20(22.2) ^a	12(13.3) ^a
	TCM-199	105	66(62.9)	26(29.4) ^a	30(45.4)	10(15.2)	12(18.2) ^a	8(12.1) ^a
	subtotal	235	156(66.4)	49(31.4) ^a	68(43.6)	39(25.0)	32(20.5) ^a	20(12.8) ^a
Injected	CR1aa	140	57(40.7)	23(40.4) ^b	25(43.9)	9(15.8)	4(7.0) ^b	1(1.8) ^b
	TCM-199	155	50(32.3)	19(38.0) ^b	22(44.0)	9(18.0)	2(4.0) ^b	1(2.0) ^b
	subtotal	295	107(36.3)	42(39.3) ^b	47(43.9)	18(15.9)	6(5.6) ^b	2(1.9) ^b

^{a,b} : Different superscripts within column denote significant differences($p < 0.05$).

Table 2. Effect of L-ascorbic acid supplements in cultuer media on *in vitro* development of Hanwoo IVM/IVF embryos after DNA microinjection

Culture media	Concentration of supplements (μ M)	No. of embryos	No.(%) of embryos cleaved at 48 hr	No.(%) of embryos developed to				
				48 h			168 h	
				2 cell	4 cell	8 cell	Mor	Blast
TCM-199	0	78	27(34.6)	9(33.3)	12(44.4)	6(22.2)	1(3.7) ^a	1(3.7) ^a
	50	50	21(42.0)	6(28.6)	10(47.6)	5(23.8)	3(14.3) ^b	2(9.5) ^b
	100	49	20(40.8)	6(30.0)	9(45.0)	5(25.0)	3(14.3) ^b	2(10.0) ^b
CR1aa	0	66	26(39.3)	10(38.4)	12(46.1)	4(15.4)	2(7.7) ^a	1(3.8) ^a
	50	55	25(45.5)	8(32.0)	13(48.0)	5(20.0)	5(20.0) ^b	3(12.0) ^b
	100	55	23(41.8)	7(30.4)	10(43.4)	6(26.1)	4(17.4) ^b	3(13.0) ^b

^{ab} : Different superscripts within column denote significant differences(p<0.05).

Table 3. Effect of α -tocopherol supplements in cultuer media on *in vitro* development of Hanwoo IVM/IVF embryos after DNA microinjection

Culture media	Concentration of supplements (μ M)	No. of embryos	No.(%)of embryos cleaved at 48 hr	No.(%) of embryos developed to				
				48 h			168 h	
				2 cell	4 cell	8 cell	Mor	Blast
TCM-199	0	57	19(33.3)	6(31.6)	8(42.1)	5(26.3)	1(5.3) ^a	1(5.3) ^a
	5.0	65	27(41.5)	9(33.3)	12(44.4)	6(22.2)	6(22.2) ^b	3(11.1) ^b
	10.0	60	24(40.0)	7(29.2)	11(45.8)	6(25.0)	4(16.7) ^b	3(12.5) ^b
CR1aa	0	60	23(38.3)	7(30.4)	9(39.1)	7(30.4)	1(4.4) ^a	2(8.7) ^a
	5.0	55	26(47.3)	9(34.6)	11(42.3)	6(23.1)	4(15.3) ^b	4(15.3) ^b
	10.0	65	27(41.5)	9(33.3)	10(37.0)	8(29.6)	5(18.5) ^b	4(14.8) ^b

^{ab} : Different superscripts within column denote significant differences(p<0.05).

후 상실배와 배반포배 발달율이 처리구에서 유의적으로 높게 나타났다(p<0.05).

이러한 결과는 체외 배발달 배양액내 항산화제 첨가는 배발달율을 개선시킨다(문 등, 1999; 이와 문, 1999; Matsuyama와 Fukui, 1994)는 보고와 일치하는 경향을 보였다. 체외 배발달 배양액 내 항산화제 첨가는 세포 성장을 촉진시키고, GSH 농도를 증진시켜 free radical로부터 수정란을 보호하며(Li 등, 1993; Murray 등, 1990; Tesuro 등, 1981), 수정란의 생존율과 발달을 저해하는 heat shock로부터 수정란을 보호한다(Early 등, 1992 ; Archiga 등, 1995). 따라서 체외 배발달 배양액내

항산화제를 첨가함으로써 미세현미 주입 수정란의 체외배양시 free radical로부터 수정란의 기능손상을 방지할 수 있으며(Bize 등, 1991) 수정란의 특정 배발달 단계에서 발생하는 체외 발생능 정지(*in vitro* cell block) 현상도 극복할 수 있으리라 사료된다.

적 요

본 연구는 한우 체외수정란에 외래 유전자를 미세현미 주입한 후 체외 배발달을 조사하였다. DNA 미세주입은 체외수정 18~20시간 후에 DNA

를 미세주입하였으며 체외 배발달율은 7일간 배양 후 조사하였다. 미세현미 주입 후 난할율은 36.3%로 대조구의 난할율 66.4% 보다 유의적으로 낮았으며($p < 0.05$) DNA가 주입된 수정란 중 상실배와 배반포배까지 발달율은 각각 5.6%와 1.9%로 대조구의 20.5%와 12.8%에 비하여 유의적으로 낮게 나타났다. 체외발달 배양액 내 L-ascorbic acid와 α -tocopherol 첨가 배양시 상실배와 배반포배 발달율이 대조구에 비하여 유의적으로 높게 나타났다. ($p < 0.05$) 따라서 미세현미 주입된 수정란의 체외배발달 배양액에 항산화제의 첨가는 높은 체외 배발달율을 얻을 수 있으며 또한 체외성숙과, 체외 수정된 한우수정란을 이용하여 형질전환 한우 생산이 가능하리라 사료된다.

참고문헌

- Archiga CF, Early AD and Hanson PJ. 1995. Incidence that glutathione is involved in the matolerance of preimplantation murine embryos. *Biol. Reprod.*, 52:1296-1301.
- Bavister BD, Rose-Hellekant TA and Pinyopummintr T. 1992. Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology*, 37:127-146.
- Bize I, Santanler G, Cabello P, Driscoll D. and Sharpe C. 1991. Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 44:398-403.
- Brem Go, Brenig G, Goodman HM, Graf RC, Kruff F, Springman B, Hondele K, Meyer J, Winnaker EL and Krausslich H. 1985. Production of transgenic mice, rabbits and pigs by microinjection into pronuclei. *Zuchthygiene*, 20:251-252.
- Early AD, Drost M, Barros CM, and Hansam PJ. 1992. Thermoprotection of preimplantation bovine embryos from heat shock by glutathione and taurine. *Cell. Bio. Inter. Reprints*, 16(2): 125-131.
- Ellington JE, Edward W, Farrell BP, Simkin ME and Foote RM. 1990. Bovine 1-2 cell embryos development using a simple medium in three oviduct epithelial cell co-culture system. *Biol. Reprod.*, 43:97-104.
- Funahashi H, Cantley T and Day BN. 1994. Different hormonal requirements of pig oocytes-cumulus complexes during maturation *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 101:159-165.
- Glass RH, Calaco PG, Florence J and OH JO 1974. Development of the mouse blastocyst following injection with Newcastle disease virus. *Theriogenology*, 9:351-358.
- Haidu MA, Knight JW, Canseco RS, Krisher RL, Valender WH, Pearson RE and Gwazdauskas FC. 1994. Effect of culture condition, donor age, and injection site on *in vitro* development of DNA microinjected porcine zygotes. *J. Anim. Sci.*, 72:1299-1305.
- Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE, Wall RJ, Bolt DJ, Palmiter RD and Brinster RL 1986. Genetic engineering of mammalian embryos. *J. Anim. Sci.*, 63:269-278.
- Kubisch HM, Larson MA, Funahashi H, Day BN and Roberts RM. 1995. Pronuclear visibility, development and transgene expression in IVM/IVF derived porcine embryos. *Theriogenology*, 44:391-401.
- Li J, Foote RH and Imkin MS 1993a. Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine or superoxide dismutase. *Biol. Reprod.*, 49:33-37.
- Lin TP. 1966. Microrinjection of mouse eggs. *Science.*, 151:333-337.
- Lin TP and Mornie JW 1973. The development of mouse blastocysts injected with, or cultured in trypan blue solution. *J. Reprod. Fert.*, 32:149-151.
- Matsuyama K and Fukui Y. 1994. Effect of oxygen concentration and free radical scavengers on the *in vitro* development of bovine oocytes

- matured and fertilized *in vitro.*, *J. Reprod. Dvel.*, 40:73-79.
- McEvoy TG and Sreenan JM. 1990. The efficiency of production, centrifugation, microinjection and transfer of one-and two-cell bovine ova in a gene transfer program. *Theriogenology*, 33: 819-828.
- Murray RK, Granner DK, Mayer PA and Rodwell VW. 1990. Lipid peroxidation is a source of free radicals *in vivo.*, *Harper's Biochem(eds.)*. pp.142-143.
- Pursel VG, Miller KF, Pinkert CA, Palmiter RD and Brinster RL 1987. Development of 1-cell and 2-cell pig ova after microinjection of genes., *J. Anim. Sci.*, 65(suppl.1):402.
- Reed WA, Suh TK, Bunch TD and White KL. 1996. Culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with bovine oviductal epithelial cells, buffalo rat liver cells, BRL-cell conditioned medium., *Theriogenology*, 45:439-449.
- Seidel G, Jr E. 1982. Applications of microsurgery to mammalian embryos. *Theriogenology*, 17:23-34.
- Seidel G, Jr E. 1983. Mammalian oocytes and preimplantation embryos as methodological components., *Bio. Reprod.*, 28:36-49.
- Takeda S and Toyoda Y. 1991. Expression of SV 40-Lacz gene in mouse preimplantation embryos after pronuclear micorinjection., *Mol. Reprod. Dev.*, 30:90-94.
- Tesuro I, Bannai S and Sugita Y. 1981. Mechanism of growth stimulation of L1210 cells by mercaptoethanol *in vitro.*, *J. Biol. Chemistry*, 256(23):12387-12392.
- Wiemer KE, Waston AJ, Polanski V, McKenna AI, Fick GH and Schultz GA. 1991. Effects of mauration and co-culture treatments on the developmental capacity of bovine embryos., *Mol. Reprod. Dev.*, 30:330-338.
- Williams BL, Johnson AE, Velander WH, Page RL, Drohan WN, Young JM, Pearson RE, Wilkins TD and Gwazdauskas FC. 1992. *In vitro* development of zycotes from prepubertal gilt after microinjection of DNA., *J. Anim. Sci.*, 70:2207-2211.
- 나진수, 임계택, 문승주, 김광현. 1994. 미세현미 주입기법으로 응성호르몬을 주입한 토끼난자의 발생, *한국수정란이식학회지*, 9(2):189-195.
- 문승주, 김은국, 김재홍, 명규호, 선상수. 1999. 항산화제 첨가가 한우 체외수정란의 체외 배발달에 미치는 영향, *한국수정란이식학회지*, 14(3):219-224.
- 이경호, 문승주. 1999. L-ascorbic acid와 Selenium이 돼지 난포란의 체외성숙, 체외수정 및 체외 배발달에 미치는 영향, *한국가축번식학회지*, 23(3):263-270.

(접수일: 2001. 5. 10 / 채택일: 2001. 6. 30)