

## 초급속 동결보존한 체외수정란 유래의 형질전환 마우스 생산효율성 검토

김 현<sup>1,2</sup> · 최창용<sup>1</sup> · 성환후<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원센터, <sup>2</sup>Tokyo 대학 수의생리학 교실

### Production of Transgenic Animals derived from *In Vitro* Fertilized Eggs cryopreserved by Ultrarapid Freezing

Hyun Kim<sup>1,2</sup>, Changyong Choe<sup>1</sup> and Hwan-Hoo Seong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Animal Genetic Resources Research Center, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea,

<sup>2</sup>Dept. of Veterinary Physiology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences,

The University of Tokyo, Tokyo 113-8657, Japan

#### ABSTRACT

Many pronuclear stage eggs were used to generate transgenic mice (Tg) by microinjection. In this study, we used *in vitro* fertilized mouse eggs, followed by ultrarapid freezing to establish a simple procedure for production of Tg mice. We produced *in vitro* fertilized mouse eggs and cryopreserved them by ultrarapid freezing method. A total of 139 cryopreserved-thawed pronuclear eggs, of which 101 (72.6%) were survived following microinjection of chicken  $\delta$ -actin promoter-driven firefly improved luciferase cDNA ( $\beta$ -act/ $luc^+$ ) and were transferred into 5 recipients. All recipients became pregnant and gave birth to a total of 15 (14.8%) pups. As a control, same DNA construction ( $\beta$ -act/ $luc^+$ ) was also injected into 450 *in vitro* fertilized eggs, of which 338 (75.1%) were survived and then were transferred into 14 recipients. Eleven (78%) mice became pregnant and littered a total of 54 (19.1%) pups. Southern blotting analysis of Tg mice indicated that one (1/15, 6.6%) and three (3/54, 5.5%) transgenic mice were production from cryopreserved and *in vitro* fertilized eggs, respectively. All Tg mice produced from both eggs showed the expression of improved luciferase gene. These results indicated that efficiency of produced of Tg mice from cryopreserved eggs was comparable to that from *in vitro* fertilized eggs. Furthermore, it is suggested that microinjection of transgene into *in vitro* fertilized eggs cryopreserved by ultrarapid freezing is an easy and conveniently method for production of Tg mice.

(Key words: transgenic mice (Tg), luciferase gene, ultrarapid freezing, southern blotting)

#### 서 론

전핵기 수정란 미세 주입법에 의한 마우스 계놈에 외래 유전자의 도입방법은 1980년에 Gordon 등에 의해서 처음으로 보고되었다(Gordon *et al.*, 1980). 이 기술을 이용해 염색체 계놈에 외래유전자를 도입시킨 형질전환 마우스(이하 Tg 마우스)를 제작해 특정 유전자의 생리적인 기능 등을 생체 내에서 해석하는 것이 가능하게 되었다(Brinster *et al.*, 1982; Palmiter *et al.*, 1982). 그러나 이와 같은 Tg 마우스 제작에는 공시란 획득

을 위해 암컷 마우스를 과배란 유기 처리를 하고 수컷마우스와 교배시켜 전핵기 수정란을 회수하였다. 이를 위해 공시란 획득에는 많은 수의 donor 마우스와 대량의 시간을 필요로 하고, 공시란수가 불안정하기 때문에 이식을 위한 위 임신 암컷 마우스를 여분으로 준비를 해야 할 필요가 있다. 한편, Whittingham 등(1972)과 Whilmur 등(1972)에 의해 초기배자의 동결보존 방법이 보고된 이후, 자동 프로그램 동결기기의 개발과 함께 초기배자의 동결보존에는 대부분 완만 동결방법이 많이 이용되어왔다. 그러나 최근에 복잡한 절차가 필요 없는 배자의 동결

\* 본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호 PJ009418)에서 연구비를 지원 받았습니다.

\* This work was carried out with the support from the "Agenda Program (No. PJ009418)" Rural Development Administration, Republic of Korea.

\* This work was supported by 2015 Post Doctoral Fellowship Program of National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Republic of Korea.

† Correspondence : seonghh@korea.kr

보존 방법인 유리화 방법도 고안되었다(Rall and Fahy, 1985). 이러한 방법들에 의해서 동결 및 융해 후의 초기배자의 생존성은 기존의 완만 동결방법과 비교해서 비슷하거나, 더 높은 생존성을 명확하게 보였다. 그래서 Tg 마우스 제작을 보다 효율적으로 하기 위해서는 미세주입법과 함께 동결보존기술을 잘 조합한 새로운 방법이 연구되었다. 현재까지 완만 동결법(Leibo *et al.*, 1991), 유리화 동결방법(Tada *et al.*, 1995) 그리고 초급속 동결법(Anzai *et al.*, 1994)을 이용해 동결 보존한 전핵기 수정란을 사용해서 Tg 마우스를 제작한 보고가 있었다. 이러한 방법에는 전핵기 수정란을 동결보존하는 것으로 마우스의 콜로니를 대량유지가 필요 없고, 미세주입조작에 공시하는 수정란을 획득하기 위해서 실험과정 간소화가 가능해, 계획적인 실험과 실험방법의 효율화 등의 이점이 예상된다. 따라서 본 연구에서는 완만동결법과 비교해 조작이 용이하고, 시간적 제약이 없는 초급속 동결법에 의한 체외수정 유래의 전핵기 수정란의 동결보존을 실시하고, 융해 후에 이런 수정란을 이용해 효율적인 Tg 마우스 제작방법을 검토 및 확립을 위해 시도를 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 체외수정

실험에 사용한 마우스는 Imamichi Institute of Animal Reproduction(Ibaraki, Japan)에서 구입하였다. 또한, 본 실험에서는 한 번에 대량의 전핵기란을 확보하기 위해 체외수정란을 이용하였다. 체외수정의 순서는 Toyoda 등의 방법(Toyoda *et al.*, 1971)에 의해 실시하였다. 먼저, 성숙한 ICR 수컷 마우스의 정소상체 미부로부터 정자를 채취하고, 미네랄 오일로 덮은 400  $\mu$ l의 Human tubal fluid(HTF) 배지에서 배양시켰다. 정자현탁액을 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 수정능 획득을 위해 1.5시간 동안 배양하였다. 한편, 난모세포의 채취는 다음과 같이 실시했다. 먼저, ICR 계통의 암컷 마우스를 5 IU의 pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG, Sigma)과 48시간 후에 5 IU의 hu-

man chorionic gonadotropin(hCG, Sigma)를 투여해 과배란 처리를 하고, hCG 투여 후, 14~15시간에 적출한 난관 팽대부에서 난구세포괴를 채취하고, 미리 평형화한 400  $\mu$ l의 HTF 배양액에 회수하였다. 수정 후 6시간째에 HTF 배지 내에서 세정하고, 형태학적으로 정상인 수정란만을 회수했다. 이러한 체외 수정란은 미세주입조작까지 5%, CO<sub>2</sub> 인큐베이터 내의 HTF 배양액에 넣어졌다. 이상과 같은 실험동물을 이용한 일련의 실험은 일본 Tokyo대학교 농업생명과학센터 수의과학대학 동물 실험 윤리위원회 A-10-1211을 기준으로 진행하였다.

### 2. 도입유전자의 구조와 조정

조직 및 세포에서 구성적으로 발현을 유도하는 닭  $\beta$ -action 프로모터(Fregien와 Davidson, 1990)를 가진 직쇄상의 단편(1.5 kbp)을 분리한 개량형 루시페라제의 cDNA 단편(1.8 kbp)의 상류에 연결해서, 융합한 유전자를 pUC118 벡터 내에 주입(Hind III-Xba I)하고, 그 다음 SV 40 스플라이싱 영역과 SV40 poly A 부가 신호 영역으로 구분하였다. 구축한 플라스미드 DNA를 대량정제 후, Pst I과 Sac I의 각각의 제한 효소를 이용해 절단하고, 1.0% agrose로 전기영동을 실시하고, 목적의 사이즈를 가진 Fig. 1에 나타낸 도입절단(4.3 kbp)를 잘라내었다. DNA 단편은 Gene clean II(Hunakoshi, Japan)를 이용해 정제하고, TE (pH 8.0)로 융해한 후, 미세주입실험에 공시하기 전까지 -20°C에서 보존하였다. 또한, 미세주입에는 4  $\mu$ g/ml가 될 수 있게 최종적으로는 TE buffer(pH 7.4)에 융해한 DNA 용액을 이용하였다.

### 3. 수정란의 동결 및 융해

전핵기 수정란의 급속동결은 Nakagata의 방법(1990)에 준하여 실시하였다. 먼저 급속동결에는 M 16 배양액 중의 전핵기 수정란을 1 M DMSO의 drop에 옮기고, M 16을 제거한 후, 5  $\mu$ l의 1 M DMSO와 초기배자를 함께 직접 동결용 튜브(cryotube) 속에 넣고, 얼음물속에서 5분간 유지하였다. 그 다음은 95  $\mu$ l의 DAP213(DMSO 2 M, 아세트아미드 1 M, 프로필렌글리콜

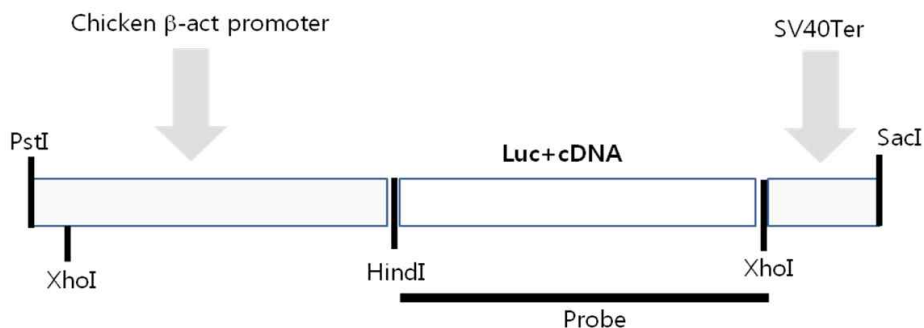


Fig. 1. Structures of the luciferase cDNA ( $\beta$ -actin/luc<sup>+</sup>) used in this study.

3 M로 조정된 동결보존용액)을 첨가하고, 다시 5분 간 유지하였다. 그리고 튜브를 캔에 장착한 후, 액체질소에 담그고 급속 동결을 실시하였다. 용해조작에는 액체질소에서 동결용 튜브 속에 미리 37°C로 가온해 둔 0.3 M sucrose 용액을 첨가해, 수정란의 동결용해와 보존액의 희석을 동시에 실시하였다. 그리고 현미경하에서 형태학적으로 정상으로 판정되는 전핵기 수정란만을 유전자주입 실험에 공시하였다.

#### 4. 마우스 전핵기란에 도입유전자의 미세주입과 배이식

수정 후 5시간째에 암·수 양 전핵이 확인된 수정란에 대해서는 일부는 그대로 유전자도입에 공시하고, 나머지는 초급속 동결법에 의해서 동결보존을 하였다. 또한, DNA 용액의 미세주입조작은 Hogan 등의 방법(1986)에 준하고, 전핵기란의 수컷전핵에 대해서 실시하였다. 미세주입 후, 형태학적으로 정상적인 수정란만을 대리모 마우스의 난관에 이식하였다. 수정란의 평가는 Manual of the International Embryo Transfer Society (Stringfellow와 Seidel, 1998)의 기준에 따라 Code 1(excellent or good)과 Code 2(fair)로 평가된 수정란은 이식가능 수정란, Code 3(poor)과 Code 4(dead or degenerated)로 평가된 수정란은 이식 불가능 수정란으로 구분하였다.

#### 5. 서던블롯 분석

분만 후 얻은 산자에 대해서는 생후 3주 동안에 미부조직의 선단부분 약 1 cm를 절단하고 채취하였다. 기존의 방법에 따라서 미부의 세포에 의해 게놈 DNA를 추출 및 정제 한 후, 이하에 나타낸 것처럼 서던블롯 분석을 실시해 도입유전자의 염색체 내에 도입의 성공 유무에 대해서 조사하였다. 먼저, 제한효소 Xho I에 의해 완전절단시킨 10 µg 게놈 DNA를 1% agarose 겔 전기영동에 의해 분리한 후, 통상적인 방법에 따라서 게놈을 변성 및 중화하고, 나일론 필터(Hybond-N<sup>+</sup>, WAKO, Japan)에 DNA를 전사하였다. 그 다음은 길이 1.8 kbp의 개량형 루시페라제 cDNA를 Hind III와 Xho I로 절단하고 그 유전자의 단편을 probe(Fig. 1)로써 ECL detection system(WAKO, Japan)에 의해 필터 및 hybridization을 실시하였다.

#### 6. Tg 마우스의 발현해석

서던블롯 분석에 의해 도입유전자의 염색체 내에 도입이 확인된 마우스에, 그 발현의 유·무를 확인하기 위해 LT 2.0 발광 키트(PLT 25, Inki, Japan)와 루미노미터(EG G BERTHOLD Lumat LB 9507)를 이용해서 루시페라제 활성화를 조사하였다. 먼저, 각 Tg 마우스로부터 미부조직 1 cm를 마취하에 채취하고, 2 ml 튜브 속에 소량의 세포 용해제(배양세포 용해제 Luc PGC-50, Inki, Japan) 100 µl 속에서 용해시키고, 실온에서 10~15분 간 정지시켰다. 원심분리 후, 상층액 20 µl와 발광 기질액

100 µl를 혼합해 30분간 실온에서 발광반응을 시켰다. 그 후, 루미노미터를 사용해 20초간 그 발광량을 측정하였다. 또한 각 샘플의 루시페라제 활성은 최대 발광량을 각 추출액 중의 총 단백질량으로 보정하는 것으로 나타내었다. Table 1에서는 루시페라제 활성을 단백질 1 µg에 LU(light unit)로 표시하였다. 또한, 대조군으로서 야생형 루시페라제 cDNA(luc)와 닭 β-actin 프로모터와의 융합유전자인 β-actin/luc 유전자를 도입한 Tg 마우스(Matsumoto 등, 1994)의 미부조직으로부터 동일하게 효소활성을 측정한 값을 이용하였다.

#### 7. 통계분석

본 시험에서 얻어진 모든 자료들의 통계 분석은 Statistical Analysis System(SAS release ver. 8.2, 2002)의 General Linear Model(GLM) procedure를 이용하여 분산분석을 실시하였고, 처리구 간에 유의성은 Duncan's multiple range-test(Duncan, 1955)를 이용하여 5% 수준에서 검정하였으며, 각 요인들의 상관관계의 유의성 검정은 Pearson's correlation coefficient를 활용하였다.

## 결 과

체외수정에 의해 얻은 전핵기란 250개를 동결보존에 공시하고, 용해 후 244개(97.6%)가 회수되었고, 233개(93.2%)의 수정란이 형태학적으로 정상이었다(Table 1). 수정란의 평가는 Manual of the International Embryo Transfer Society(Stringfellow와 Seidel, 1998)의 기준에 따라 Code 1(excellent or good)과 Code 2(fair)로 평가된 수정란은 이식가능 수정란, Code 3(poor)과 Code 4(dead 혹은 degenerated)로 평가된 수정란은 이식 불가능 수정란으로 구분하였다. 체외수정란을 이용해 유전자도입을 한 경우, 75.1%의 난자가 조작 후, 형태학적으로 정상이었다. 한편, 동결수정란을 이용해 도입유전자를 주입할 때에는 조작 후, 72.6%의 난자가 형태학적으로 정상이었다. 또한 유전자도입을 실시한 동결수정란과 체외수정란을 이식한 경우의 산자 생산율은 각각 14.8%, 19.1%로 나타내었다. 마우스 염색체내 유전자도입의 성공 유·무를 southern blot 방법으로 확인한 결과, 동결 수정란 처리구에서 1마리(6.6%)의 Tg 마우스가 획득된 반면에, 체외수정란 처리구에서의 경우 3마리(5.5%)의 Tg 마우스를 얻었다. 유전자의 도입이 확인된 Tg 마우스 전

Table 1. Viability and recovery of IVF-derived embryos after ultrarapid frozen-thawed

No. of frozen	No. (%) of recovered oocyte	No. (%) of normal oocyte
250	244(97.6)	233(93.2)

개체에 루시페라제 활성을 확인한 결과, 개체 간에 있어 도입 유전자의 발현량에 차이가 확인되었다(Fig. 2).

고찰

본 연구에서 유전자도입을 실시한 동결수정란과 체외수정란을 이식한 경우의 산자 생산율은 각각 14.8%, 19.1%로 나타내었다. 마우스 염색체 내 - 유전자 도입의 성공 유·무를 southern blot 방법으로 확인한 결과, 동결 수정란 처리구에서 1마리(6.6%)의 Tg 마우스가 획득된 반면에, 체외수정란 처리구에서의 경우 3마리(5.5%)의 Tg 마우스를 얻었다. 이런 결과들로부터 체외수정란 및 동결수정란을 이용한 Tg 마우스 제작효율에는 유의적으로 차이가 없는 것으로 확인하였고, 이는 Tg 마우스 제작을 위해서 체외수정란을 대체해 초급속 동결수정란을 사용하는 것도 가능하다는 것을 시사하였다.

초급속 동결수정란의 미세조작 후, 그 생존율과 이식 후의 산자 생산율은 체외수정란을 이용한 처리구와 비교해서 통계상의 유의적인 차이는 없고, 오히려 태어난 산자수에 대해서 Tg 마우스의 제작효율도 거의 차이가 나지 않음을 확인하였다. 이에 반해 Leibo 등(1991)의 보고에 의하면 완전 동결법을 이용해 동결한 배아 처리구에 있어서도 Tg 마우스의 제작효율은 체외수정란구와 거의 동일한 결과를 얻었지만, 산자 생산율이 낮다는 것이 보고되었다. 따라서 초급속 동결법으로 동

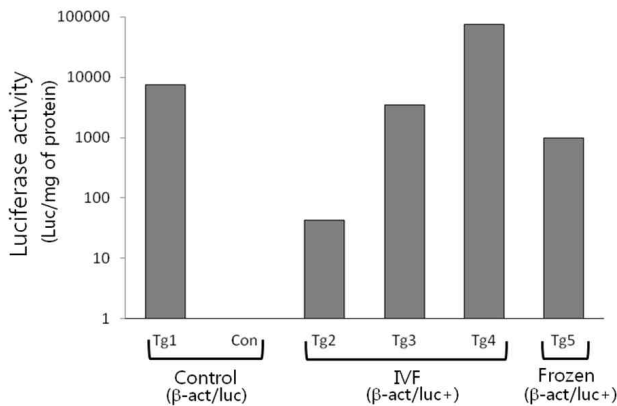


Fig. 2. Analysis of the transgenic mice by the luciferase reporter gene activity assay.

Table 2. Viability of frozen- and IVF-derived embryos after micro-injection

No. of donors	No. (n) of transferable oocyte	No. (%) of normal oocyte
Frozen	139	101(72.6)
IVF	450	338(75.1)

결한 전핵기란을 공시한 경우, 완전동결법과 비교해서 미세조작 후의 높은 발생률을 얻기 위해 본 실험에서 사용한 초급속 동결법은 효율적으로 Tg 마우스 제작에 활용할 가능성이 기대된다. 또한, 본 실험에서 유전자의 도입이 확인된 Tg 마우스 전 개체에 루시페라제 활성을 확인한 결과, 개체 간에 있어 도입 유전자의 발현량에 차이가 확인되었다. 이러한 차이는 두 가지의 가능성을 생각할 수 있다. 첫째, Tg 마우스에 도입 유전자의 발현이 도입된 염색체의 위치에 의해서 도입된 유전자의 메틸화의 정도가 다를 가능성이 있을 것으로 생각된다. 두 번째는 주위의 염기배열에 의해서도 발현의 정도에 영향을 받았을 가능성도 생각된다(Soriano *et al.*, 1986). 이상의 결과들로부터 체외수정란 초급속 동결법을 사용한 Tg 마우스 제작방법의 확립을 확인하였고, 이러한 결과들로부터 실험기간의 단축과 작업의 간소화에 크게 이바지할 것으로 사료된다.

요약

미세주입법에 의한 형질전환 마우스 제작에는 대량의 전핵기란을 필요로 한다. 본 실험에서는 심플한 형질전환 마우스 제작방법을 확립하기 위해 초급속 동결한 전핵기란을 공시했다. 초급속 동결법으로 동결한 전핵기 체외수정란 139개를 용해 후 공시하고, β-actin/luc<sup>+</sup> 융합유전자를 미세주입하였다. 주입 조작 후, 형태학적으로 정상적인 수정란 101개(72.6%)를 5마리의 수란암컷 마우스에 이식하였다. 그 결과, 이식한 모든 마우스가 임신하고, 최종적으로 15마리(14.8%)의 산자가 태어났다. 한편, 450개의 체외수정란에 대해 동일한 배아조작 후에 338개(75.1%)가 생존하고 14마리의 수란암컷 마우스에 이식하였다. 그 중에 78%의 수정암컷 마우스가 임신하고, 54마리(19.1%)의 산자가 태어났다. 태어난 산자에 대해서는 southern

Table 3. The efficiency of production of transgenic mice from cryopreserved- and IVF derived eggs

No. of donors	No. of transferred embryos	Recipients		No. (%) of offspring	No. of Tg mouse		
		No. of recipients	No. of pregnancy		Total (%)	Male	Female
Frozen	101	5	5	15(14.8)	1(6.6)	1	0
IVF	282	14	11	54(19.1)	3(5.5)	0	3

blot 법에 의해 염색체 내의 도입유전자의 도입을 확인한 결과, 동결수정란 처리구와 체외수정란구에서 각각 6.6%(1/15), 5.5%(3/54)의 마우스에서 도입유전자의 도입이 확인되었다. 더욱이 두 처리구 전부의 형질전환 마우스의 미부조직에서 도입유전자인 루시페라제 유전자의 발현이 관찰되었다. 이상의 결과에 의해 체외수정란 초급속 동결보존법을 사용한 Tg 마우스 제작 방법의 확립을 확인하였고, 이러한 결과들로부터 실험기간의 단축과 작업의 간소화에 크게 이바지할 것으로 사료된다.

(중심 단어: 형질전환 마우스, 루시페라제 유전자, 초급속 동결법, 서던블랏)

## REFERENCES

- Anzai M, Nakagata N, Matsumoto K, Ishikawa T, Takahashi Y and Miyata K. 1994. Production of transgenic mice from *in vitro* fertilized eggs cryopreserved by ultrarapid freezing. *Exp. Anim.* 43:445-448.
- Brinster RL, Chen HY, Warren R, Sarthy A and Palmiter RD. 1982. Regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion plasmids injected into mouse eggs. *Nature.* 296:39-42.
- Fregien N and Davidson N. 1990. Activating elements in the promoter region of the chicken beta-actin gene. *Gene.* 48:1-11.
- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA and Ruddle FH. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:7380-7384.
- Hogan B, Constantini F and Lacy E. 1986. *Manipulating the Mouse Embryo.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 157-173.
- Leibo SP, DeMayo FJ and O'Malley B. 1991. Production of transgenic mice from cryopreserved fertilized ova. *Mol. Reprod. Dev.* 30:313-319.
- Matsumoto K, Anzai M, Nakagata N, Takahashi A, Takahashi Y and Miyata K. 1994. Ont of paternal gene activation in early mouse embryos fertilized with transgenic mouse sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 39:136-140.
- Nakagata N. 1990. Cryopreservation of unfertilized mouse oocytes from inbred strains by ultrarapid freezing. *Exp. Anim.* 39:303-305.
- Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME, Rosenfeld MG, Birnberg NC and Evans RM. 1982. Dramatic growth of mice that development from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature.* 300:611-615.
- Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryo at  $-196^{\circ}\text{C}$  by vitrification. *Nature.* 313:573-575.
- Soriano P, Cone RD, Mulligan RC and Jaenisch R. 1986. Tissue-specific and ectopic expression of genes introduced into transgenic mice by retroviruses. *Science.* 234:1409-1413.
- Stringfellow DA and Seidel SM. 1998. *Manual of the international embryo transfer society.* 3<sup>rd</sup> International Embryo Transfer Society Inc Illinois. pp 165-170.
- Tada N, Sato M, Kasai K and Ogawa S. 1995. Production of transgenic mice by microinjection DNA into vitrified pronucleate stage eggs. *Transgenic Res.* 4:208-213.
- Toyoda T, Yokoyama M and Hoshi T. 1971. Studies on the fertilization of mouse eggs *in vitro*. *J. Anim. Reprod.* 16:147-151.
- Whittingham DG, Leibo SP and Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to  $-196$  degrees and  $-269$  degrees. *Science.* 178:411-414.
- Wilmut I. 1972. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sci.* II. Nov. 11:1071-1079.

---

Received February 9, 2015, Revised July 3, 2015, Accepted September 9, 2015