

Phytohemagglutinin-P 添加에 따른 생쥐胚의 試驗管内 凝集과 培養에 관하여

朴恒均 · 柳在雄

慶北大學校 農科大學 酪農學科

Study on In Vitro Aggregation and Culture of Mouse Embryos
by Phytohemagglutinin-P

Park, Hang Kyun · Ryou, Zae Yoong

Dept. of Dairy Science, Coll. of Agric., Kyungpook Natl. Univ.

Summary

This study was carried out to obtain basic information necessary for aggregation and in-vitro culture of mouse embryos by treating phytohemagglutinin-p (PHA-P).

The 4-, 8-cell and morula embryos were obtained from female mice of albino BALB/C, CBA and C57BL strains, those were injected 5 i.u. pregenant mare serum gonadotrophin and 5 i.u. human chorionic gonadotrophin to superovulation. The zona pellucidia was removed by placing the embryos in Acidic Tyrode solution containing 1.0% protease or/and 5 ug/ml PHA-P.

The pairs of zona free embryos were subjected to aggregation by glassneedle in BMOC-3 containing 5 ug/ml PHA-P. The aggregation embryos were cultured in Brinster's mouse ova culture-3(BMOC-3) medium under the gas phase of 5% CO₂ in air 37°C for 13 to 50 hours.

The results obtained in this study are summarised as follows :

1. When 4-, 8-cell and morula embryos were zona-freed in acidic Tyrode solution containing 1.0% protease or/and 5 ug/ml PHA-P, and cultured in vitro to blastocysts, the 4- and 8-cell embryos showed slightly less development rates than the morula one did, and solution of 5 ug/ml PHA-P brought some higher development rate than negative control.
2. As 2, 5 or 10 ug/ml PHA-P was added to the solution to aggregate 4-, 8-cell or morula embryos, 2 ug/ml solution represented slightly lower aggregation rate than the higher levels solutions, and 4- and 8-cell embryos showed higher rates than morula one did ($P < .05$).
3. In respect to the development rates of aggregated embryos to morula no significant difference was found among PHA-P levels and between 4-and 8-cell embryos. With respect to those of aggregated embryos to blastocysts the different levels of PHA-P showed similar results, however, the 4- and

- 8-cell embryos represented higher rates than the morula one did ($P<.05$).
4. The mean time necessary for development of aggregated 4-, 8-cell and morula embryos to blastocysts were 38.5-40, 26-27 and 19-20hrs. Respectively in solution for aggregation.
 5. The aggregation rates of embryos were 34–94%, when treated protease or/and PHA-P. Supplementation of 5 ug/ml PHA-P to the solution for aggregation showed a trend demonstrating higher aggregation rate compared to negative control, although no significance was found. However, 4- and 8-cell embryos represented significantly higher aggregation rates than the morula one did ($P<.05$).
 6. The development rates of 4- and 8-cell embryos to morula were 52.7-84.7 and 73.8-87.2%, respectively, showing no significant difference between two cell stages. However, the aggregation rates of embryos treated with solution containing PHA-P were higher than negative control ($P<.05$).
 7. The development rates of 4- and 8-cell and morula embryos to blastocysts were 41.7–77.7 78.7–83.0 and 0–19.2%, respectively. The rates of 4-cell embryos treated with PHA-P were significant higher than the negative control ($P<.05$). The 8-cell and morula embryos also showed more rates when treated PHA-P.

緒 論

受精卵을 응집시켜 Chimera를 생산하는 연구에 대하여는 1942년 Nicholas와 Hall이 흰쥐의 1세포 기배를 in vitro에서 응집시켜 응집배의 발생을 조사하는 이래, Tarkowski(1961)와 Mintz(1962)는 同種의 相異한 개체에서 얻어진 8세포기배의 투명대를 除去, 裸化된, 2個의 수정배를 물리적 압력을 가한 방법으로 최초의 Chimera생취를 분만시키는데 성공하였다.

이러한 수정란의 응집에 의한 Chimera생산의 연구는 가축에 있어 相異한 2個以上の 개체에서 由來한 조직, 세포, 핵, 염색체 혹은 유전자 등을 하나의 개체내에 응집시킴으로서 표현형의 변형을 誘導하여 가축개량을 촉진하는 새로운 기술을 개발하는 수단이 될 수 있다.

또한 세포분화, 발생유전, 生理, 면역학적 측면에서의 연구 등에도 여러가지로 이용될 수 있다.

이 작성기술을 가축생산에 응용하면 모색이 다른 兩系統의 Chimera체를 生産할 수 있어 고급의 모피동물을 생산할 수 있는 방법도 개발될 것이며, 또한 乳牛의 수정란과 肉牛의 수정란을 接合시켜

Chimera牛을 생산한다면 兩品種의 特徴을 살린 생산성이 높은 새로운 가축의 作出도 가능할 것으로 생각된다.

한편 응집 Chimera배의 作成에 있어서 Tarkowski (1962)는 8세포기 수정배의 투명대를 micropipet으로 吸引하는 물리적인 방법으로 투명대를 除去했으며, Mintz(1962)는 단백질 분해효소인 Pronase를 사용 투명대를 제거한 후, 裸化된 배를 응집시킬 때 phytohemagglutinin-P(PHA-P) 存在下에서 실행하면 매우 잘 응집할 수 있음을 보고했다.

단백질 분해효소를 사용한 투명대 제거와 畜 세포 분할구에 응집력을 주는 PHA-P의 사용은 생쥐와 같은 실험소동물의 응집 Chimera胚을 이용한 Chimera 응용연구에 많은 보탬이 되어왔다. (Awata 등, 1984; Onishi와 Mikami, 1985, 1987).

Ogawa等(1984)은 수정란에 대한 지식과 미세조직 및 분할구의 發達에 대한 지식과 기술의 축적을 바탕으로 투명대를 除去後 受精卵을 兩分하여 同種의 相異한 胚를 凝集하여 Chimera胚를 생산하였고 Markert와 Petters(1978), Ahn等(1986)은 3개 이상의 수정란을 응집시켜 multiple Chimera 생취를

생산하였다.

또한 Chimera 胚作成의 初期에는 同種 胚間의 융집 Chimera 胚가 연구의 주된 대상이었으나(McLaren과 Bowman, 1969; Gearheart와 Granite, 1981; Buehr와 McLaren, 1984; Mikami와 Onishi, 1985), 최근에는 이종에서 유래한 胚를 융집시켜 이종 Chimera 胚를 作成하여 이종 Chimera 체를 생산하기까지 이르렀다.

즉, 생쥐와 흰쥐의 受精卵를 융집시켜 in vitro에서 胚盤胞까지 培養하여 異種 Chimera 胚를 생산하였으며(stern와 Drew, 1973; Zeilmaker, 1973), 山羊과 綿羊의 受精卵를 융집하여 이종 Chimera를 생산하게 되었다.(Fehilly等, 184, 1985).

그런데 융집에 의한 Chimera 胚 作成操作은 胚의 細胞期가 2~8細胞期의 胚로 거의 限定되어 있기 때문에 micromanipulator를 이용하여 하나의 개체에서 얻은 胚를 胚盤胞까지 발달시킨 다음 이 배반포의 胚腔內에 따른 개체에서 由來한 2세포기로부터 배반포기까지의 분할구를 注入하는 注入 Chimera 胚의 작성과 in vitro배양에 관한 연구가 활발히 進行되고 있다. (Peterson, 1974; Gardner와 Munro, 1974; McLaren, 1975; Papaioannou等, 1975; Rossant와 Frels, 1980; Buehr와 McLaren, 1984; Iannaccone, 等 1985).

그러나 국내의 경우, Lee와 Chung(1984)이 생쥐 수정란을 융집시켜 Chimera 배를 생산한 사례와 Ahn等(1986)과 金等(1988)에 의해 생쥐 胚를 in vitro에서 융집, 배양한 후 假妊娠생쥐의 子宮에 이식하여 약간의 Chimera 생쥐의 생산에 성공을 거두었 을 뿐이다.

本 연구는 실험동물인 생쥐에 수정란의 투명대 제거시 PHA-P첨가가 배의 발생에 미치는 영향, 胚의 융집률과 발달에 미치는 두 영향 및 標化 胚의 융집에 필요한 PHA-P의 적절한 첨가농도를

조사하여 Chimera 胚 생산에 必要한 기초지식을 얻고 지 실시되었다.

材料 및 方法

供試動物

실험동물은 6~10주령의 생쥐 들쥐색 CBA계통과 黑色인 C57BL계통 및 albino BALB/C계통을 利用하였으며 每日 明14時間, 暗10時間의 광선조절 下에서 사료 및 음수를 자유 섭취케하여 사육하였 다.

과배란 유기

과배란처리는 오후 5시에 5IU의 pregnant mare serum gonadotropin (PMSG, Folligon, Intervet, Holland)를 복강내 1회 주사하여 48시간후에 同一方法으로 human chorionic gonadotropin (hCG, Chorulon, Intervet, Holland) 5IU를 1회 주사하였다.

hCG주사후 바로 자궁 1:1로 同一系統의 숫쥐와 암수시켜 익일 아침 10시에 질전이 확인된 암컷만을 採란용으로 供試하였다.

수정란의 回收 및 관류액

hCG주사후 各 발달단계 즉 4세포기(53~57時間), 8세포기(62~66時間), 桑實胚期(72~78時間)에 생쥐를 도살하여 자궁과 난관을 꺼내어 50배의 실체 현미경(Olympus Optical Co., Japan)아래에서 Brinster's mouse ova culture-3(BMOC-3) 배양액으로 관류하여 수정란을 回收하였다. 수정란의 回收와 융집 및 융집배의 배양용으로는 BMOC-3 배양액(Brinster, 1971)을 使用하였으며 그 화학적 조성은 Table 1과 같다.

배양액은 0.2 μ m의 Millipore filter(Gelman Science Inc, U. S. A)로 여과하여 使用前 2~3시간 37°C, 5% CO₂, 95% 공기상태인 배양기내에서 CO₂평형을 시켰다.

Table 1. Chemical composition of Brinster's mouse ova culture-3

Component	Concentration
NaCl	5.546 g/l
KCl	0.356
KH ₂ PO ₄	0.162
CaCl ₂	0.189
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.294
NaHCO ₃	2.106
Glucose	1.000
Na-pyruvate	0.056
BSA	5.000
Streptomycin	50 ug/ml
Penicillin	100 IU/ml
PH	7. 2-7. 4

투명대 제거

회수된 수정란중 정상발달한 4세포기와 8세포기 및 桑實胚期の 胚만을 골라 1.0% protease(Papaya, Sigma, U. S. A; Pr액)과 1.0% protease에 5ug/ml phytohemagglutinin-P(PHA-P, phaseolus Vulgaris, Sigma, U. S. A; Prph액)가 함유한 투명대제거용 산성 Tyrode액(Hogan 등, 1986)에서 各各 5~7분간 노출시킨 상태로 관찰하면서 투명대가 軟化되었을 때 新鮮한 배양액으로 수정란을 옮겨 3~4회반복 세척

Table 2. Acidic Tyrode Solution for removing zonae

NaCl	0.800 g/100ml
KCl	0.020
0 CaCl ₂ · 2H ₂	0.024
0 NgCl ₂ · 6H ₂	0.010
Glucose	0.100
Polyvinylpyrrolidone(PVP)	0.400

하였다.

그후 완전히 제거되지 않은 투명대는 3~4회 반복세척중 pipetting조작을 약간 강하게 하거나, 직경 5um以上の 미세한 硝子棒으로 殘存 투명대를 압박함으로써 물리적으로 除去하였다.

나화배의 배양

나화된 胚의 배반포까지 배양에 있어서 PHA-P첨가의 영향을 보기위하여 Pr액 및 PrPh액에서 裸化된 胚를 조직배양용 35mm petridish(Costar Cat No. 3035, U. S. A)에 BMOC-3배양액 小滴(0.05~0.06ml)을 만들고 paraffin oil(Sigma, U. S. A)을 피복하여 배양전 1~2시간 CO₂평형을 시켜놓은 소적 내에 넣고 37°C 5% CO₂, 95% 공기상태의 배양기에서 배양하였다.

PHA-P의 첨가농도

裸化胚의 응집과 응집된 胚의 培養에 있어 PHA-P의 적절한 첨가농도를 찾기위해 1.0% protease로 투명대를 除去시킨 胚를 BMOC-3배양액에 PHA-P 첨가농도를 달리한 2, 5 또는 10ug/ml액의 小滴을 만들어 계통이 다른 2個의 수정배를 그들 소적으로 옮기고 硝子棒을 이용하여 裸化된 胚를 응집시켜 純淨한 방법으로 CO₂ incubator內에서 배양하였다.

裸化胚의 응집

Protease첨가와 PHA-P첨가에 따른 胚의 응집을 검토하기 위하여 제1의 처리(pr-0처리區)는 1.0% protease액에서 투명대를 除去시킨, 系統이 다른 各 세포기의 배를 BMOC-3배양액 小滴에 2個 옮겨 응집시켰으며, 제2의 처리(Pr-Ph처리區)는 5ug/ml-PHA-P가 BMOC-3액 小滴에 各 細胞期の 배를 응집시켰다.

제3의 처리(PrPh-Ph처리구)는 1.0% protease와 5 ug/ml PHA-P를 첨가한 액에서 투명대를 除去한 各

세포기의 배를 5ug/ml PHA-P가 첨가된 BMOC-3 배양액 小滴에 옮겨 응집시켰다.

응집방법으로는 先端을 등글게한 직경이 100um 이상의 미세한 硝子棒을 이용하여 胚를 接近시켜 압박을 加하였다.

응집배의 배양

응집된 胚는 新鮮한 BMOC-3배양액으로 옮겨 2~

3회 반복 세척한 후에 Petridish에 BMOC-3배양액 小滴(0.02~0.03ml) 8~10個를 만들어 小滴 하나에 응집배 1개를 넣어 Paraffin oil을 피복하여 37°C, 5% CO₂ 95% 공기상태의 incubator内에서 13~50時間 동안 배양하면서 응집배의 발달상태를 관찰하였다.

本 실험의 전 과정은 Figure 1과 같으며 수정란의 回收로부터 배양까지의 모든 操作은 37°C下에서 實施하였다.

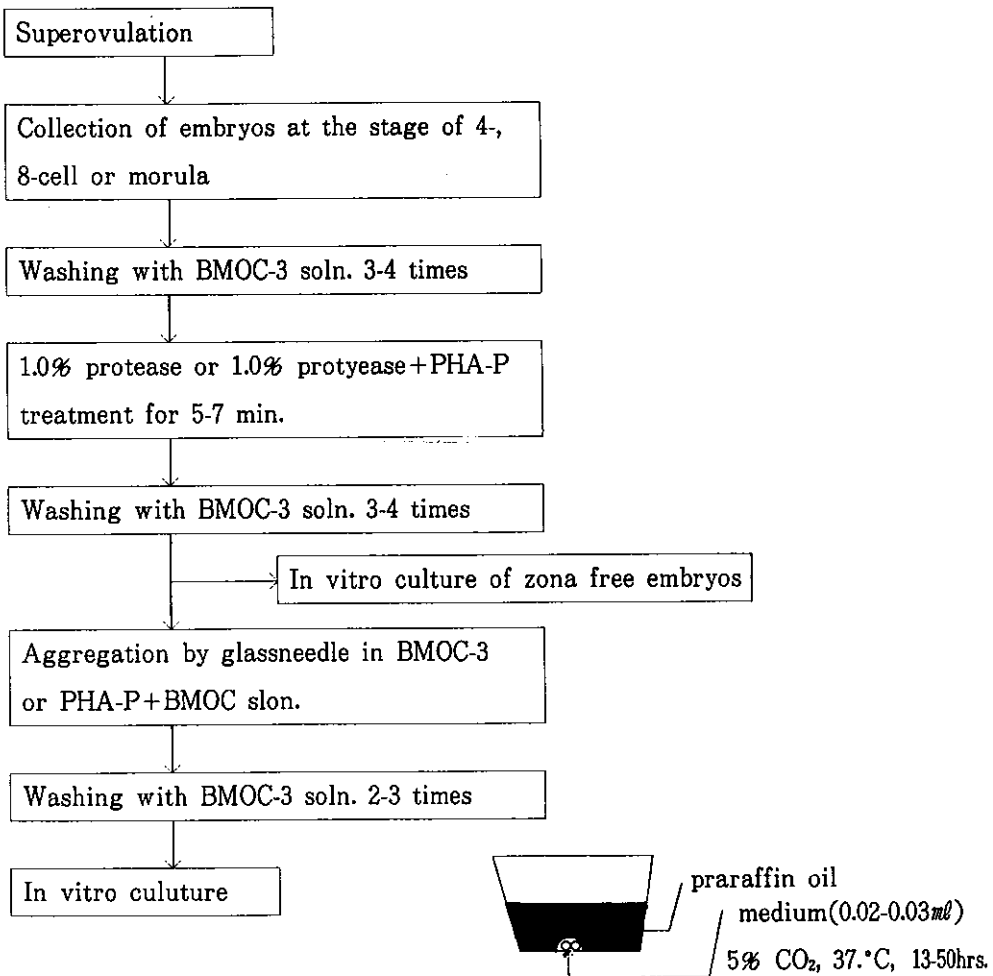


Fig. 1. Procedure of in vitro aggregation and culture of mouse embryos

結果 및 考察

PHA-P첨가와 裸化胚의 발달

4세포기, 8세포기 및 상실기 胚를 1.0% Protease 또는 1.0% Protease 및 5ug/ml PHA-P를 첨가한 액에서 各各 투명대를 除去한 後 BMOC-3배양액에서 배양한 성적은 Table3와 같다.

생쥐 수정란의 투명대는 1.0% Protease액에서 4

세포기, 8세포기 및 상실배기 모두 5~7分이내에 軟化 혹은 除去되었다. 그리고 투명대 除去用 산성 tyrode액에 1.0% protease만을 첨가하여 투명대를 제거한 나화배를 BMOC-3액에서 배반포까지 배양했을 때 各 세포기 배의 胚盤胞까지의 발달성적은 각각 81.6, 89.1 및 92.3%로 유의차는 없었으나 상실배기胚가 가장 좋았다.

Table 3. In vitro development of zona free embryos by treating with protease or/and phytohemagglutinin- P

Cell stage	No. of zona free embryos		No. of blastocyst developed from zona free embryos(%)		
	Pr *	PrPh**	Pr	PrPh	Total(Mean)
4-cell	38	36	31(81.6)	32(88.9)	63(85.1)
8-cell	46	47	41(89.1)	43(91.5)	84(90.3)
Morule	26	28	24(92.3)	26(92.9)	50(92.6)
Total(mean)	110	111	96(87.7)	101(91.1)	197(89.1)

* 1.0% protease treatment

** 1.0% protease + 5ug/ml PHA-P treatment

또한 1.0%Protease에다 5ug/ml PHA-P를 첨가하여 배양했을때에는 各各 88.9, 91.5 및 92.9%로 유의차는 없었으나 역시 상실배기 胚의 발달성적이 가장 좋았다.

한편 Tyrode액에 1.0%Protease 첨가액 또는 1.0%Protease 및 5ug/ml PHA-P를 첨가한 액란에 있어서는 전자의 平均87.7%에 비해 후자가 91.9%로 다소 높게 나타났다.

Bigger等(1971)과 Yang等(1985)은 1.0% Protease를 Standard egg culture medium에 첨가하여 8분간 방치하였을 때 투명대가 용해된다는 보고와 본 실험결과와는 비슷한 경향을 나타내었다.

한편 Fiser와 Macpheson(1976(1976), Yang等(1985)은 생쥐胚의 세포기가 진행된 胚일수록 분리할

구에서의 발달 가능성과 배반포까지의 발달 비율이 어린 胚에 비해 떨어진다는 報告와는 달리 본 연구에서는 생쥐의 裸化胚는 세포기가 진행될수록 배반포까지의 발달비율이 증가되었다.

PHA-P의 첨가농도에 따른 응집율

PHA-P 첨가농도에 따른 응집율은 Table 4와 같다.

즉 배양액에 PHA-P 2ug/ml을 첨가했을때의 4세포기배, 8세포기배 및 상실기배의 응집율은 各各 76.0, 82.0 및 40.4%로서 4세포기 또는 8세포기 胚의 응집율이 상실기배 보다 높았고(P<.05), 5ug/ml PHA-P를 첨가했을때의 응집율은 各各 86.0, 94.0 및 52.0%였고, 10ug/ml을 첨가했을때는 84.0, 96.0

Table 4. Aggregation rates of 4-, 8-cell and morula embryos by treating with different concentration of phytohemagglutinin-p

Stage of embryos subjected to aggregation	No. of pairs			No. of pairs aggregated(%)			
	subjected to						
	aggregation			2*	5	10	Total(mean)
4-cell	50	50	50	38(76.0) ^a	43(86.0) ^a	42(84.0) ^a	123(82.0)
8-cell	50	50	50	41(82.0) ^a	47(94.0) ^a	48(96.0) ^a	136(90.7)
Morula	50	50	50	20(40.0) ^b	25(52.0) ^b	24(48.0) ^b	70(46.7)
Total(mean)	150	150	150	99(66.0)	116(77.4)	114(76.0)	329(73.1)

* 2 ug/ml PHA-P in BMOC-3 medium

** 5 ug/ml PHA-P in BMOC-3 medium

*** 10 ug/ml PHA-P in BMOC-3 medium

^{a, b} Significantly different within columns (P < .05)

및 48.0%로서 2, 5 및 10ug/ml 공히 4세포기 또는 8세포기배의 응집율이 상실기배 보다 높았다. (P < .05). 그리고 2, 5 및 10ug/ml PHA-P의 各添加區別 모든 胚의 평균응집율은 66.0, 77.4 및 76.0%로서 서로간 유의성은 인정되지 않았으나 5 또는 10ug/ml PHA-P첨가구가 응집율을 나타낸다.

한편 朴(1988)은 할구의 접착면이 많은 胚를 증가시키고 투명대제거에 의해 보여지는 할구배열의 혼란을 방지하고 배세포의 compaction을 촉진하기 위한 최적 PHA-P의 첨가농도는 1ug/ml로 보고하여 本 실험의 裸化胚를 응집시킬때 최적 PHA-P의 첨가농도 5ug/ml와는 多少 다른 성적을 보였다.

응집배의 배양율

응집된 胚를 in vitro에서 상실배까지 배양하였을 때 그 발달율은 Table 5와 같다.

4세포기와 8세포기의 응집배의 발달율은 2ug/ml PHA-P 첨가구에서 各各 78.9, 82.6%이고 5ug/ml PHA-P첨가구에서는 83.9, 89.6%로서 유의차는 없었지만 공히 8세포기배의 발달이 다소 좋았으며 모든 응집배가 상실배로 발달한 성적에 있어서는 유의치는 인정되지 않았으나 5 및 10ug/ml PHA-P 첨가구가 各各 평균 85.5, 85.5%로 2ug/ml PHA-P 첨가구의 80.9%보다 多少 良好하였다.

그리고 응집된 胚를 in vitro에서 배반포까지 培養하였을때 그 발달율은 Table 6과 같다.

즉 4세포기, 8세포기 및 상실배의 발달율은 2ug/ml PHA-P 첨가구에서 各各 71.1, 75.6 및 5.0%였으며 5ug/ml PHA-P 첨가구에서는 各各 76.7, 83.0 및 12.0%였고, 10ug/ml PHA-P 첨가구에서는 各各 78.6, 79.1 및 16.7%로서 各 처리구 공히 4세포기와 8세포기의 응집배가 상실배기의 응집배보다 월등히 우수하였

Table 5. Development rates of 4- and 8-cell embryos to morula by treating with different concentration of phytohemagglutinin-p

Stage of embryos subjected to aggregation	No. of pairs			No. of pairs aggregated(%)			
	subjected to aggregation						
	2*	5**	10***	2	5	10	Total(mean)
4-cell	38	38	42	30(78.9)	36(83.7)	35(83.3)	101(82.1)
8-cell	41	47	48	34(82.6)	41(87.2)	43(89.6)	118(86.8)
Total(mean)	79	90	90	64(80.9)	77(85.5)	78(86.5)	219(84.6)

* 2 ug/mlPHA-P in BMOC-3 medium

** 5 ug/mlPHA-P in BMOC-3 medium

*** 10 ug/mlPHA-P in BMOC-3 medium

Table 6. Development rates of 4- and 8-cell embryos to morula by treating with different concentration of phytohemagglutinin-p

Stage of embryos subjected to aggregation	No. of pairs			No. of blastocyst developed(%)			
	subjected to aggregation						
	2*	5**	10***	2	5	10	Total(mean)
4-cell	38	43	42	27(71.1) ^a	33(76.7) ^a	33(78.6) ^a	93(75.6)
8-cell	41	47	48	39(75.6) ^a	39(83.0) ^a	38(79.1) ^a	108(79.4)
Morula	20	26	24	1(5.0) ^b	3(12.0) ^b	4(16.7) ^b	8(11.4)
Total(mean)	99	116	114	59(50.6)	75(57.2)	75(58.1)	209(63.5)

* 2 ug/mlPHA-P in BMOC-3 medium

** 5 ug/mlPHA-P in BMOC-3 medium

*** 10 ug/mlPHA-P in BMOC-3 medium

^a ^bSignificantly different within columns (P<.05)

다(P<.05)

따라서 응집배의 발달을 향상시키기 위해서는 發達段階가 낮은 4細胞期胚와 8細胞期胚를 응집하여 배양하는 것이 좋다고 할 수 있다.

또한 PHA-P를 5~10ug/ml 첨가구가 各各 평균 57.2, 58.1%로 2ug/ml 첨가구의 50.6%보다 多少 좋았으나 유의차는 나타나지 않았다.

胚의 응집 및 발달성적

裸化된 胚의 응집은 各 처리구 모두 3時間이내에 완료되었으며, 서로 비슷하여 胚의 완료된 시점으로 부터 상실배까지 발달하는데 소요되는 평균시간은 Table 7에서 보는 바와 같이 1.0% protease액에서 투명대를 제거후 신선한 BMOC-3 배양액에서 응집시켜 배양한 처리구(Pr-O구)는 4세포기배와 8세포기배에서 各各 30, 14.5시간으로 발달이 진행된 배가 그후 桑實胚에 到達하는 시간이 짧았다.

1.0% Protease액에서 투명대를 除去한 胚를 5 ug/ml PHA-P가 첨가된 배양액에 응집시켜 배양한 처리구(Pr-Ph구) 및 1.0% protease에 5ug/ml PHA-P가 첨가된 액에 투명대를 제거후 5ug/ml PHA-P가 첨가된 배양액에서 응집시켜 배양한 처리구(PrPh-Ph구)에서 各各 4세포기배는 29, 29.5시간이었고 8세포기배는 各各 13.5, 14時間이었으며 各 처리구 간에는 유의차가 인정되지 않았다.

배반포까지 발달하는데 소요되는 평균 시간은 44세포기에서 38.5, 38.5 및 40時間간이었으며 8세포기에서는 27, 27.5 및 26시간이었으며 各 처리구 간 유의차는 인정되지 않았다.

상실배기에서는 Pr-Ph구 및 PrPh-Ph구에서 各各 20 및 19시간으로 PHA-P 첨가에 의한 發達段階別 胚의 培養速度에는 큰 영향을 미치지 않았다.

Table 7. The development speed of aggregated embryos by treating with protease or/and phytohemagglutinin-p

Stage of embryos subjected to aggregation	From aggregation to morula(hr)			From aggregation to blastocyst (hr)			
	*	**	PrPh- ^{***} Ph	Pr-0	PrPh	PrPh-Ph	Mean
	4-cell	30.0	29.0	29.5	38.5	38.5	40.0
8-cell	14.5	13.5	14.0	27.0	27.5	26.0	26.8
Morula	-	-	-	-	20.0	19.0	19.5
Mean	22.3	21.3	21.8	32.8	28.7	28.3	28.3

* Embryos zona-freed in solution of 1.0% protease and aggregated in BMOC-3 medium

** Embryos zona-freed in solution of 1.0% protease and aggregated in BMOC-3 medium containing 5 μg/ml PHA-P

*** Embryos zona-freed in solution of 1.0% protease and 5 μg/ml PHA-P, and aggregated in BMOC-3 medium containing 5 μg/ml

세포기의 발달이 진행된 裸化胚를 응집시켜 배양했을때의 발달속도가 더 빠르게 나타났으나 유의차는 없었다.

이러한 결과는 Lee와 Chung(1984)이 4세포기 및 8세포기 胚를 응집시켜 상실배까지에 소요되는 각각의 평균시간 30 및 13.5시간, 배반포까지에 소요되는 각각의 평균시간이 39 및 27시간이었다는 보고와 本 실험의 결과와는 대체로 일치하였다.

胚의 發達段階別 응집율

胚의 發達段階別 응집율은 Table 8에서 보는 바와 같이 처리방법을 달리한 Pr-O, Pr-Ph 및 PrPh-Ph 처리구의 각각의 평균응집율은 63.3, 77.3 및 78.0%로 Pr-Ph 및 PrPh-Ph처리구가 Pr-O처리구 보다는 대체로 양호한 응집율을 보였으나 유의차는 인정되지 않았다.

그리고 세포기별 응집율은 Pr-O, Pr-Ph 또는 PrPh-Ph 처리에 따라 4세포기에서 72.0, 86.0 및 90.0, 8세포기에서 84.0, 94.0 및 94.0%, 상실배기에서는 34.2, 52.0 및 50.0%로서 응집에 공시된 胚가 4세포기와

8세포기일때 그 응집율은 상실기배를 응집시킨 응집을 보다 유의적으로 높았다($P < .05$).

이러한 결과는 2세포기와 4세포기 배보다는 8세포기 배에서 응집이 가장 잘 일어난다고 보고한 Gardner(1971), Lee와 Chung(1984) 및 Ahn等(1986)과 一致하는 것이었다.

2세포기 및 4세포기 胚가 8세포기胚보다 응집율이나 그후의 발달성적이 나쁜 이유에 대해 Lee와 Chung(1984)은 4세포기배의 분할구와 2세포기배의 분할구가 8세포기배 보다는 크기 때문에 상호 응집되는 표면적의 比率이 낮고 응집율도 떨어진다고 보고하였는데 이는 本 실험결과와 비슷하였다.

Mintz(1971)와 Goodall等(1982)은 胚의 粘着性과 운동성 그리고 할구사이의 전기적 성질이 2-, 4- 및 8세포기로 발달할수록 강해진다고 보고하였다.

한편 PHA-P의 첨가유무에 상관없이 서로 相異한 胚를 응집시킬때 4세포기 및 상실배기의 응집성보다 8세포기 胚를 응집시켰을때 그 성적이 우수했으며, 8세포기에서 PHA-P를 첨가한 Pr-Ph와 PrPh-Ph처

Table 8. Aggregation rates of 4-, 8-cell and morula embryos by treating with protease or / and phytohemagglutinin-p

Stage of embryos subjected to aggregation	No. of pairs subjected to aggregation			No. of pairs aggregated(%)			
	Pr-O	Pr-Ph	PrPh-Ph	Pr-O	Pr-Ph	PrPh-Ph	Total (mean)
	4-cell	50	50	50	36 (72.0) ^a	43 (86.0) ^a	45 (90.0) ^a
8-cell	50	50	50	42 (84.0) ^a	47 (94.0) ^a	47 (94.0) ^a	136 (90.6)
Morula	50	50	50	17 (34.0) ^b	26 (52.0) ^b	25 (50.0) ^b	68 (45.3)
Total (mean)	150	150	150	95 (63.3)	116 (77.3)	117 (78.0)	328 (72.9)

^{a, b} Significantly different within columns ($P < .05$)

리구가 각각 94.0 및 94.0%로서 PHA-P를 첨가하지 않은 Pr-O처리구 84.0%보다 성적이 우수한 점으로 보아 두개의 胚를 응집시켜 Chimera胚를 만들때는 5ug/ml를 첨가하는 것이 좋을것 같으나 앞으로 더 연구해 봐야 할 것으로 생각된다.

응집배의 배양성적

4세포기, 8세포기 및 상실기 배를 각각 응집한 後 그 胚를 in vitro에서 배양하여 상실배로 발달한 비율은 Table 9에서 보는 바와 같다.

Table 9. Development rates of 4-, 8-cell embryos aggregated to morula by treating with protease or / and phytohemagglutinin-p

Stage of embryos subjected to aggregation	No. of pairs aggregated			No. of pairs developed to morula (%)			
	Pr-0	Pr-Ph	PrPh-Ph	Pr-0	Pr-Ph	PrPh-Ph	Total (mean)
4 - cell	36	43	45	19(52.7) ^m	36(83.7) ⁿ	38 (84.4) ⁿ	93 (75.0)
8 - cell	42	47	47	31(73.8)	42(87.7)	40 (85.1)	113 (83.1)
Total (mean)	78	90	92	50(63.3)	78(86.6)	78 (84.8)	206 (79.2)

^{m, n} Significantly different within row (P < .05)

4세포기 胚에 있어서는 Pr-O, Pr-Ph 및 PrPh-와 PrPH-Ph 처리구는 Pr-O처리구 보다 유의적으로 높았다(P<.05).

그리고 8세포기 胚에 있어서는 Pr-O, Pr-Ph 및 PrPh-Ph 처리구의 발달율이 각각 73.8, 87.7 및 85.1%로서 Pr-Ph, PrPh-Ph처리구가 Pr-O처리구 보다 대체로 그 비율이 높았다. 발달단계별 胚의 배반포까지 발달율은 Table 10과 같다.

4세포기는 Pr-Ph처리구에서 76.7%, PrPh-Ph처리구에서 77.7%로 Pr-O처리구의 41.7%보다 높았으며 유의성이 인정되었다(P<.05).

또한 8세포기 배의 배반포까지의 발달율은 Pr-O, PrPh 및 PrPh-Ph처리구에서 각각 64.3, 78.7 및 83.0%였으며 상실배기의 胚의 그것은 각각 0, 19.2 및

12.0%로서 PHA-P를 첨가하지 아니한 때는 상실배가 배반포까지의 발달배는 하나도 없었으나 PHA-P를 첨가할 때는 낮기는 하였으나 12.0~19.2%의 발달율을 나타내었다.

한편 Pr-O처리구에서 8세포기胚의 발달율 64.3%가 4세포기 및 상실기 胚의 각각 발달율 41.7%보다도 배반포로 발달하는 발달율이 유의적으로 높았다(P<.05).

또한 Pr-Ph 및 PrPh-Ph처리구에서는 4세포기배, 8세포기배의 76.7, 77.7%와 78.7, 83.0%로 상실기배의 19.2, 12.0%보다 배반포로 발달하는 성적이 높았다(P<.05).

위의 결과에서 볼때 1.0%Protease를 사용하여 투명대를 除去한 後 신선한 BMOC-3 배양액에 응

Table 10. Development rates of 4-, 8-cell and morula embryos aggregated to blastocyst by treating with protease or / and phytohemagglutinin - p

Stage of embryos subjected to aggregation	No. of pairs aggregated			No. of pairs developed to blastocyst (%)			
	Pr-0	Pr-Ph	PrPh-Ph	Pr-0	Pr-Ph	PrPh-Ph	Total (mean)
4 - cell	36	43	45	15(41.7) ^{a,m}	33(76.7) ^{a,n}	35(77.7) ^{a,n}	83(66.9)
8 - cell	42	47	47	27(64.3) ^b	37(78.7) ^a	39(83.0) ^a	103(75.7)
Morula	17	26	25	0(0) ^a	5(19.2) ^b	3(12.0) ^b	8(11.8)
Total (mean)	95	116	117	42(35.2)	75(58.2)	77(57.6)	194(59.1)

^{a, b} Significantly different within column (P < .05)

^{m, n} Significantly different within rows (P < .05)

집시킨 Pr-O처리구에 배양하는 것 보다 10% protease액에 투명대를 제거 후 5ug/mlPHA-P가 첨가되어 있는 배양액에 응집시킨 Pr-Ph처리구와, 10% Protease와 5ug/ml PHA-P가 첨가되어 있는 액에 투명대를 제거후 5ug/ml PHA-P가 첨가되어 있는 배양액에 응집시킨 PrPh-Ph처리구가 응집배를 in vitro에서 배반포까지 배양하였을때 배양율이 대체로 양호하게 나타났다.

그리고 상실배까지 발달한 배가 배반포로移行하는 과정에서 상당수가 발달이 중지되었는데 이는 protease에 의한 침해로인한듯 하며 이와같은 사실은 Lee와 Chung(1984)도 인정하였다.

本 실험에서 얻은 결과를 종합해 볼때 Chimera胚作出을 위하여서는 胚의 응집 및 응집배의 배양에 있어서는 PHA-P를 첨가하는 것이 첨가하지 않은것

보다 양호하여 發達段階別 胚에 있어서는 PHA-P를 첨가할때나, 하지 않을 때는 8세포기배가 4세포기배와 상실기배 보다 응집 및 응집배의 그후 발달 성적이 良好하게 나타났다.

또한 系統이 다른 2個의 胚를 응집시켜 Chimera胚를 만들때는 응집용 BMOC-3 배양액에 PHA-P 첨가농도를 5ug/ml로 첨가함이 좋으며 응집에 공시할 胚의 發達段階는 8細胞期에 있는 胚가 가장 좋은 성적을 얻을 수 있다고 본다.

摘 要

本 실험은 일정한 發達段階에 잇는 생쥐胚를 응집시킬때 세포응집소인 Phytohemagglutinin-P(PHA-P)를 첨가 裸化胚의 응집율과 응집된 胚를 in vi-

tro에서 배양하였을때의 배양을 및 적당한 PHA-P의 첨가농도를 조사하여 Chimera胚를 생산하는데 필요한 기초치식을 얻기 위하여 實施하였다.

Albino BALB/C와 CBA계통 및 C57BL 계통의 생쥐에 pregnant mare Serum gonadotropin와 human chorionic gonadotropin를 투여하여 과배란 생쥐에 PMSG와 hCG를 투여하여 과배란을 유도, 회수된 생쥐의 4세포기, 8세포기 및 상실배기 수정란을 1.0% Protease 용액으로 투명대를 除去하고 PHA-P를 첨가한 배양액에서 미세한 硝子棒으로 系統이 다른 두 系統의 생쥐의 胚를 응집시킨 다음 응집된 배를 37°C, 5% CO₂, 95% Air의 배양기 조건하에서 13~50시간 배양하면서 Chimera胚의 발달상태를 조사하였다.

本 실험에서 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 1.0% Protease 또는 1.0% Protease 및 5ug/ml PHA-P가 첨가된 산성 Tyrode액에서 투명대를 제거한 裸化胚를 배반포까지 배양했을때 유의차는 없었으나 4세포기배와 8세포기배 보다 상실기배가 더 잘 발달되었으며 또한 PHA-P를 첨가하였을때가 첨가하지 아니한 때 보다 다소 좋은 경향을 보였다.
2. PHA-P 2ug/ml첨가시 4세포기, 8세포기 및 상실기배의 응집율은 40.0~82.0%, 5ug/ml첨가시에는 52.0~94.0%, 10ug/ml첨가시에는 48.0~96.0%로 胚의 發達段階에 따라서는 4세포기, 8세포기가 상실배기 보다 유의적으로 높았다(P<.05). PHA-P의 처리수준에 의한 응집율에 있어서는 5 또는 10ug/ml첨가구가 2ug/ml첨가구 보다 조금 높게 나타났으나 유의차는 없었다.
3. 응집배의 상실배까지의 배양율은 PHA-P의 각 수준간 및 각 세포기간에 유의차가 인정되지 않았다. 응집배의 배반포까지의 배양율은 PHA-P 수준사이에는 유의차가 없었으나 4세포기와 8세포기의 胚는 상실기 胚보다 유의적으로 높은

배양율을 보였다(P<.05).

4. 응집된 胚가 배반포까지 발달하는데 소요되는 평균시간은 4세포기배가 38.5~40시간, 8세포기배가 26~27시간, 상실기배가 19~20시간이었다.
5. 응집율은 34.0~94.0%의 범위로서 PHA-P를 첨가할때 응집율이 더 좋은 경향을 보였으나 유의성은 인정되지 않았다. 4세포기와 8세포기의 胚가 상실기배 보다 유의적으로 높았다(P<.05).
6. 응집배의 상실배까지의 발달율은 4세포기배가 52.7~84.7%, 8세포기배가 73.8~87.2%였으며 세포기 사이에는 유의차는 나타나지 않았다. 그러나 PHA-P를 첨가한 것이 발달이 더 좋았다.
7. 응집배의 배반포까지의 발달율은 4세포기의 胚가 41.7~77.7%, 8세포기의 胚는 78.7~83.0%, 상실기배가 0~19.2%였으며 4세포기의 PHA-P 처리가 未處理 보다 유의적으로 높았다(P<.05). PHA-P를 처리했을 때 4세포기와 8세포기 상실기의 胚 보다 더 높은 발달율을 보였다.

引用文獻

1. Ahn, C. Y., S. C. Rho, J. J. Ko, K. S. Chung and K. K. Lee : 1986, Production of chimeric mouse, Korean J. Anim. Sci., 28 : 535-541.
2. Awata, T., A. Onishi and S. Muramatus : 1984, A simple technique for production of chimeric mouse embryos, Proceeding of the Japan Academy, 60 : 253-256.
3. Biggers, J. D., W. K. Whitten and D. G. Whittingham : 1971, The culture of mouse embryos in vitro. In : Methods in mammalian embryology, ed. J. C. Daniel, W. H. Freeman Co., San Francisco, p. 86-116.
4. Brinster, R. L. : 1971, In : Pathway to conception, Sherman, A. I. (ed.), Charles C. Thomas

- Publ. U. S. A. p. 245-277.
5. Buehr, M. and A. McLaren : 1984, Interlitter Variation in Progeny of chimaeric male mice, *J. Reprod. Fert.*, 72 : 213-221.
 6. Fehilly, C. B., S. M. Willadsen, A. R. Dain and E. M. Tucker : 1985, Cytogenetic and blood group studies of sheep/goat chimaeras, *J. Reprod. Fert.*, 74 : 215-221.
 7. Fehilly, C. B., S. M. Willadsen and E. M. Tucker : 1984, Interspecific chimaerism between sheep and goat, *Nature*, 307 : 634-636.
 8. Fiser, P. S. and J. W. Macpherson : 1975, Development of embryonic structures from isolated mouse blastomeres, *Can. J. Anim. Sci.*, 56 : 33-36.
 9. Gardner, R. L. and A. J. Munro : 1974, Successful construction of chimaeric rabbit, *Nature*, 250 : 146.
 10. Gardner, R. L. and M. F. Lyon : 1971, X-Chromosome inactivation studied by injection of a single cell into the mouse blastocyst, *Nature*, 231 : 385-386.
 11. Gearhart, J. and M. L. O. Granite : 1981, Reproduction in a population of chimeric mice : Relationship of chromosomal sex to functional germ cells and proportions of chimeric components in several tissues, *Biology of Reproduction*, 24 : 713-722.
 12. Goodall, H. and M. H. Johnson : 1982, Use of carboxy-fluorescein diacetate to study formation of permeable channels between mouse blastomeres, *Nature*, 295 : 524-526.
 13. Hogan, B., F. Costantini and E. Lacy : 1986, Manipulating the mouse embryo, *CSH Lab. U. S. A.* p. 276-283.
 14. Iannaccone, P. M., E. P. Evans and M. D. Burtenshaw : 1985, Chromosomal sex and distribution of functional germ cells in a series of chimeric mice, *Exp. cell Res.*, 156 : 471-477.
 15. Lee, S. J. and K. S. Chung : 1984, In vitro aggregation and culture of mouse embryos, *Korean J. Anim. Sci.*, 8 : 29-35.
 16. Markert, C. L. and R. M. Petters : 1978, Manufactured hexaparental mice show that adults are derived from three embryonic cells, *Science*, 202 : 56-58.
 17. McLaren, A. : 1975, Sex chimaerism and germ cell distribution in a series of chimaeric mice, *J. Embryol. Exp. Morph.*, 33 : 205-216.
 18. McLaren, A. and P. Bowman : 1969, Mouse chimaeras derived from fusion of embryos differing by nine genetic factors, *Nature*, 224 : 238-240.
 19. Mikami, H. and A. Onishi : 1985, Heterosis in litter size of chimeric mice, *Genet. Res., Camb.*, 46 : 85-94.
 20. Mintz, B. : 1962, Experimental study of the developing mammalian egg : Removal of the zona pellucida, *Science*, 138 : 594-595.
 21. Mintz, B. : 1971, Allophenic mice of multi-embryo origin. ed. J. C. Daniel, W. H. Freeman Co., San Francisco, p. 186-214.
 22. Nicholas, J. S. and B. V. Hall : 1942, Experiments on developing rats 2. The development of isolated blastomeres and fused eggs, *J. Exp. Zool.*, 90 : 441-459.
 23. Ogawa, S., A. Mizuno, T. Hirashima and J. Mizuno : 1984, In vitro development of aggregate embryos obtained by pairing the microsurgically halved morulae of mice and rats, and observa-

- tions on their aggregation process in scanning electron and fluorescence microscopies, *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 30 : 186-193.
24. Onishi, A. and H. Mikami : 1985, The productive performance of XX/XY male chimeric mice, *Exp. Anim.*, 34 : 433-437.
 25. Onishi, A. and H. Mikami : 1987, Chimeric heterosis for body weight in mice, *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 58 : 259-264.
 26. Papaioannou, V. E., M. W. McBurney, R. L. Gardner and Mi. J. Evans : 1975, Fate of teratocarcinoma cells injected into early mouse embryos, *Nature*, 258 : 70-73.
 27. Peterson, A. C. 1974, Chimaera mouse study shows absence of disease in genetically dystrophic muscle, *Nature*, 248 : 561-564.
 28. Rossant, J. and W. I. Frels : 1980, Interspecific chimeras in mammals : Successful production of live chimeras between *Mus musculus* and *Mus caroli*, *Science*, 208 : 419-421.
 29. Stern, M. S. : 1973, Chimaerases obtained by aggregation of mouse eggs with rat eggs, *Science*, 243 : 472-473.
 30. Tarkowski, A. K. : 1961, Mouse chimeras developed from fused eggs, *Nature*, 198 : 857-868.
 31. Yang, B. S., K. S. Im and Y. B. Lee : 1985, Studies on the solubility of zona pellucida and developmental potency of isolated blastomere in mouse, *Korean J. Anim. Sci.*, 27 : 705-710.
 32. Zeilmaker, C. H. : 1973, Fusion of rat and mouse morulae and formation of chimaeric blastocysts, *Nature*, 242 : 115-116.
 33. 김재영, 지선준, 정길생. 1988. Mouse에 있어서 Chimera생산에 관한 연구. 한국가축번식학회 학술발표 논문초록, p. 29-30.
 34. 박흥대. 1988. Mouse 초기배의 체외배양을 위한 배양액 조성에 관한 연구. 한국가축학회 학술발표 논문초록, p. 8-11.