

## 생쥐의 인공수정법 개발에 관한 연구

김재환 · 정형민 · 승경록\* · 이훈택 · 정길생

건국대학교 동물자원연구센터

## The Development of Artificial Insemination in Mouse

Kim, J. H., H. M. Chung, K. R. Seong\*, H. T. Lee, and K. S. Chung

Animal Resources Research Center, Kon-Kuk University

### SUMMARY

The development of efficient method for the production of transgenic mice has been investigated in our laboratory. This study was conducted to develop the artificial insemination in the mouse. Spermatozoa were collected from the cauda epididymis of ICR males (age: 12~15 weeks, Body weight :  $\geq 30$ g) and artificially inseminated into the intrauterine via cervix of hormone-primed ICR females (age: 6~8 weeks, body weight : 25g) using the capillary tube, 200~300  $\mu\text{m}$  in inner diameter. The effect of concentration of sperm ( $80 \times 10^4$ ,  $40 \times 10^4$ ,  $20 \times 10^4$ ,  $10 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^4 / 20 \mu\text{l}$ ) on fertilization rate was examined and compared to that of natural mating. After insemination of various concentrations of spermatozoa, we found the fertilization rate was significantly increased in inseminated sperm concentration dependent manner. The highest rate (100%) was found at concentration of  $80 \times 10^4 / 20 \mu\text{l}$ . The artificial insemination was succeeded but fertilization rate showed slightly lower than that of natural mating (86.5% versus 93.8%). However, The pregnancy rate was very low (5~15%) compared to the natural mating and 59 normal youngs born from 60 females. Therefore, our findings suggest that it is possible to produce the great number of mice from the same origin of male by artificial insemination. However, the lower pregnancy rate has to be solved to use broadly the artificial insemination in mouse.

### I. 서 론

최근 분자생물학의 발달에 따라 포유동물에 있어서 형질전환동물(transgenic animal)을 생산하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있는데, 이를 생산하기 위한 방법으로는 수정란의 핵에 외래유전자를 미세주입하는 방법(Gordon 등, 1980; Brinster 등, 1981; Hogan 등, 1986), 외래유전자가 삽입된 embryonic stem cell을 확보한 뒤 이를 배반포단계의 수정란에 주입하여 chimaera를 생산하는 방법(Evans &

Kaufman, 1981; Martin, 1981)과 retroviral vector infection(Jaenisch, 1976; Soriano 등, 1986) 방법 등이 있다. 그러나 상기 서술한 방법들은 고가의 장비와 숙련된 기술 및 경비가 소요되며 또한 그 효율도 상당히 저조한 실정이다. 따라서 보다 간편한 방법을 통해 형질전환 동물을 생산하기 위해 Lavitrano 등(1989)은 체외수정용 배양액에 외래유전자를 첨가한 뒤 생쥐난자를 수정시키고 이들 수정란을 체외배양 후 이식하여 얻은 산자의 30%에서 유전자의 발현을 확인하였다고 보고하였다.

또한 Bachiller 등(1991)은 cationic liposome을

\*건국대학교 의과대학 (College of Medicine, Kon-Kuk University)

이용하여 정자에 외래유전자를 흡착시킴으로서 외래 유전자를 난자에 도입시킬 수 있었다는 보고를 하였다. 만약 이러한 연구가 성공적으로 이루어질 경우 정자를 vector로하여 간편하게 인공수정 방법에 의하여 형질전환 동물의 생산이 가능해진다는 점에서 그 의의는 매우 크다고 하겠다.

따라서 본 연구는 정자 vector의 개발에 관한 기초 연구로 생쥐에 대해 인공수정을 실시하는데 있어 Leckie 등(1973)이 restraining board, artificial penis, vaginal tampon을 이용하여 자연발정이 유지된 생쥐를 인공수정을 실시하여 수정율과 임신율을 조사했던 것과 달리 보다 손쉽고 효율적인 인공수정법을 개발하고 또한 주입하는 정자의 농도가 수정율과 임신율에 미치는 영향을 조사하고자 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재 료

#### 1) 공시동물

본 연구에 사용한 동물은 ICR계통의 생쥐를 사용하였는데 자성생쥐의 경우 6~8주령이고 체중은 약 25g이었으며, 웅성생쥐의 경우 생식능력이 확인된 12~15주령, 체중 30g 이상의 것만을 사용하였다. 사육조건은 일조시간을 14시간으로 조정하였으며, 고형사료와 물은 무제한으로 급여하였다.

#### 2) 배양액

정액의 채취와 회석을 위한 배양액은 Whittingham's T6(Quigley 등, 1982)배양액에 3mg/ml의 BSA(bovine serum albumin, Sigma, USA)를 첨가하여 사용하였다. 제조된 배양액은 0.22 $\mu$ m의 membrane filter(Gelman Co., USA)를 이용하여 제균한 다음 사용하였다.

#### 3) 인공수정기의 제작

정액주입을 위한 주입기는 길이가 75mm인 plain capillary tube(Chase, USA)를 내경을 200~300 $\mu$ m로 제작한 다음 선단부를 microforge(Alkatel, France)를 이용하여 마모시켜 제작하였다.

### 2. 방 법

#### 1) 다배란 유기

자성생쥐에 PMSG(pregnant mare's serum

gonadotropin, Holland)와 hCG(human chorionic gonadotropin, USA)를 각각 48시간 간격으로 5IU를 복강에 투여함으로써 다배란을 유도하였다.

#### 2) 정액의 채취 및 수정능 획득

웅성생쥐를 경추분리법에 의하여 도살한 직후 외과적으로 정소상체 미부를 직출하여 실체현미경하에서 paraffin oil이 피복된 400 $\mu$ l의 배양액 소적에 정자괴를 회수하였다. 회수한 정자는 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>배양기에서 1시간동안 배양을 실시함으로써 수정능 획득을 유도하였으며, 정자의 운동성이 80%이상인 정자만을 선별하여 공시하였다.

#### 3) 자연교배 및 인공수정

대조구로 자연교배는 다배란이 유지된 자성생쥐를 웅성생쥐와 합사시켜 자연교배를 유도하였다. 인공수정은 hCG투여후 15시간째의 자성생쥐를 Fig. 1에서 보는 바와 같이 보정한 다음 silicon tube에 기 제작한 plain capillary tube를 장착하여 여러 농도의 정액 20 $\mu$ l를 흡인한 다음 비외과적으로 자궁내에 주입하였다.

#### 4) 수정 확인 및 산자 생산

주입한 정액의 수정 여부를 확인하기 위하여 일부는 인공수정을 실시하고 27시간후에 자성생쥐를 도살한 다음 난관을 관류하여 2세포기 수정란을 회수함으로써 수정율을 조사하였으며, 일부(60수)는 산자생산을 유도하여 산자수를 비교하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 인공수정의 효율

수정능이 획득된 정자중 운동성이 80% 이상을 나타내는 정자만을 선별하여 주입농도는 40~50 $\times$ 10<sup>4</sup>/20 $\mu$ l로 하여 인공수정을 실시한 다음 27시간 후에 수정란을 회수하여 이들의 수정율을 조사한 결과는 Table 1과 같다.

Table 1에서 보는 바와 같이 인공수정에 의한 평균 수정율은 86.5%였으며, 이는 다배란이 유지된 생쥐를 웅성생쥐와 1:1로 합사시켜 자연교배를 유도하여 얻은 수정율 평균 93.8%의 결과와 비교할 때 유의한 차이가 없었다. 또한 체외수정시 적정농도(10 $\times$ 10<sup>4</sup>~63 $\times$ 10<sup>4</sup>/ml)로 체외수정을 유도한 결과, 수정율이 평균 78%(Tsunoda & Chang, 1975)인 것과 비교하여 볼 때 보다 높은 수정율을 나타내었다.



Fig. 1. Operation of artificial insemination

Table 1. Fertilization rate 27 hrs after artificial insemination.

Exp. No.	No. of mouse inseminated	No. of eggs recovered	No. of eggs fertilized(%)
Control*	12	338	317(93.8)
I	4	81	71(87.7)
II	4	143	131(91.6)
III	4	65	48(73.8)
Total	12	289	250(86.5)

\* Natural mating

## 2. 정자의 농도에 따른 수정율

인공수정시 주입하는 정자의 농도에 따른 수정율을 조사한 결과는 Fig. 2에 제시한 바와 같다. 정액의 주입량을 20  $\mu$ l로 고정된 뒤 정자의 농도가  $80 \times 10^4$ ,  $40 \times 10^4$ ,  $20 \times 10^4$ ,  $10 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^4$ 일때의 수정율은 각각 100%, 77.3%, 50.8%, 67.6%, 50%, 18% 및 7.9%로 정자농도가 증가함에 따라 수정율도 증가하였다.

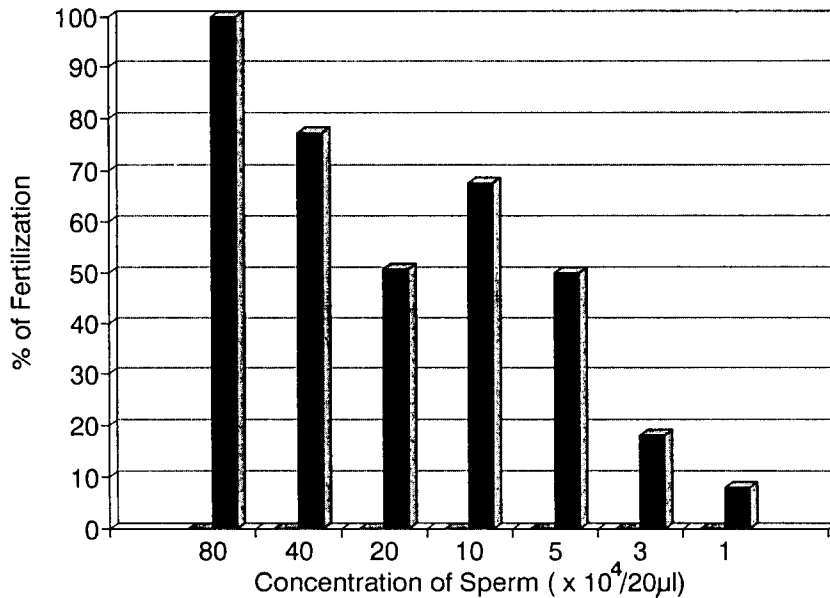
가장 높은 수정율은  $80 \times 10^4 / 20 \mu$ l 농도로 주입하였을 때 나타났으며, 이러한 결과는 Robl 등(1987)이 다배란이 유기된 ICR계통의 자성생쥐를 이용하여 DBA/2N, C57BL/6N 및 CF1계통 웅성생쥐의 정액을  $50 \times 10^6 / 50 \mu$ l 농도로 인공수정을 실시하여 인공

수정후30시간째(2-세포기)에 도살하여 수정율을 조사한 결과 수정율이 50, 26, 45%인 것과 비교할 때 매우 높은 수정율을 나타낸 것이었다.

또한, Leckie 등(1973)이  $1 \times 10^5 / 50 \mu$ l 농도로 인공수정을 실시할 경우에는 수정이 거의 이루어지지 않는다는 보고와는 달리 본 연구에서는  $5 \times 10^4 / 20 \mu$ l 이상의 농도에서도 50%이상의 수정율을 나타내었다. 그러나 정액의 농도가  $3 \times 10^4 / 20 \mu$ l 이하의 경우 수정율은 급격히 저하됨을 확인할 수 있었다.

## 3. 임신율과 산자생산

본 연구에서 사용한 인공수정법에 의해서 정상적인 개체발생이 이루어지는지를 확인하기 위하여 임신율과 산자 생산율을 조사한 결과는 Table 2에서 보는 바



**Fig. 2. Fertilization rate 27 hrs after artificial insemination with various concentrations of sperm in the mouse.**

와 같다.

Table 2에서 보는 바와 같이 정자의 농도를 각각 달리하여 주입한 생쥐들의 임신율은  $80 \times 10^4/20\mu\text{l}$  농도를 주입한 경우 15.0%로서 50,  $20 \times 10^4/20\mu\text{l}$  농도를 주입한 것보다 유의하게 높은 임신율을 나타내었다. 또한 평균 산자수의 경우에도  $80 \times 10^4/20\mu\text{l}$ 의 경우 13수로서  $50 \times 10^4/20\mu\text{l}$ 의 12수나  $20 \times 10^4/20\mu\text{l}$ 의 8수에 비하여 높은 평균 산자수를 나타내었다.

위의 결과는 Leckie 등(1973)이 주입농도를  $3 \sim 10 \times 10^5/50\mu\text{l}$ 로 자연발정이 유기된 생쥐를 restraining board, artificial penis, vaginal tampon을 이용하여 인공수정을 실시한 결과 임신율이 69~87%인 것과 비교하여 볼 때 매우 낮은 임신율을 나타내었다. 이와 같이 임신율이 진저리구에서 5~15%로서 극히 저조하였는데 이러한 원인은 다배란 유도시 호르몬 투여 또는 정액을 인공주입하는데 있어 생식기도내의 물리적 손상 및 stress 등에서 기인하는 것으로 사료되

**Table 2. Pregnancy rates in the mouse by the artificial insemination.**

Sperm concentration ( $\times 10^4/20\mu\text{l}$ )	No. of mouse	No. (%) of mouse pregnant	No. of offspring produced
80	20	3(15.0)	39
50	20	1( 5.0)	12
20	20	1( 5.0)	8

며, 앞으로 자연발정이 유지된 생쥐를 이용하여 비교 검토를 실시하여야 할 것으로 본다. 또한 산자수에 있어서도 주입하는 정자의 농도의 감소에 따라 점차 감소하는 경향을 나타내었는데 이러한 원인은 수정율에서 기인된다고 사료된다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 본 연구에서 사용한 인공수정법은 수정율에 있어서 체외수정율보다 높고 자연교배의 결과와 대차가 없는 결과를 나타내었다. 따라서 이 기술을 이용함으로써 외래유전자가 도입된 정자를 인공수정법을 통하여 쉽게 형질전환 생쥐를 생산할 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 이 기술을 이용하여 임신율과 산자생산율의 제고를 위해서 자연발정이 유지된 생쥐의 이용과 정액주입시 생식기도내의 물리적 손상 및 stress 등을 최소화 시킬 수 있는 방법을 구체적으로 검토해야할 것으로 사료된다.

#### IV. 적 요

본 연구는 형질전환 생쥐의 생산을 위한 인공수정법을 개발하기 위해 실시하였다. 정액은 ICR 계통 웅성 생쥐의 정소상체 미부로부터 채취하여 내경이 200~300  $\mu\text{m}$ 인 capillary tube를 사용하여 다배란이 유지된 ICR계통 자성생쥐의 자궁내로 주입하여, 주입하는 정액의 농도(80, 40, 20, 10, 5, 3,  $1 \times 10^4 / 20 \mu\text{l}$ )에 따른 수정율과 자연교배를 실시하였을 때의 수정율을 비교하였다. 여러 농도의 정액을 주입 후 수정율은 주입하는 정액의 농도가 증가함에 따라 증가하는 것을 알 수 있었으며,  $80 \times 10^4 / 20 \mu\text{l}$ 의 농도에서 가장 높은 수정율(100%)을 나타내었다. 인공수정을 실시함으로써 수정율은 자연교배시와 대차가 없었으며, 비록 임신율(5~15%)은 저조하였으나 60수의 자성생쥐로부터 59수의 산자를 얻을 수 있었다. 따라서 이러한 결과는 인공수정을 통해 동질의 형질을 갖는 다수의 생쥐를 생산하는 것이 가능하다는 것을 알 수 있었다. 그러나 생쥐에 있어서 인공수정법을 효율적으로 이용하기 위해서는 보다 높은 임신율을 얻을 수 있는 방법을 검토되어야 할 것으로 사료된다.

#### V. 참고문헌

1. Bachiller, D., K. Schellander, J. Peli and U. Rütther. 1991. Liposome-mediated DNA uptake by sperm cells. *Mol. Reprod. Dev.* 30:194-200. *Fert.*,36:101-106.
2. Barwin, B.N. 1974. Intrauterine insemination of husband's semen. *J. Reprod. Fert.*, 36:101-106.
3. Brinster, R.L., H.Y Chen, M. Trumbauer, A. W. Senear, R. Warren and R.D. Palmiter. 1981. Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell*, 27:223-231.
4. Evans, M.J. and M.H. Kaufman. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature, Lond.*, 292: 154-156.
5. Gordon, J.W., G.A. Scangos, D.J. Plotkin, J. A. Barbosa and F. Ruddle. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:7380-7384.
6. Hogan, B., F. Costantini and E. Lacy. 1986. *Manipulating the Mouse Embryo: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
7. Jaenisch, R. 1976. Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73:1260-1264.
8. Krzanowska, H. 1970. Relation between fertilization rate and penetration of eggs by supplementary spermatozoa in different mouse strains and crosses. *J. Reprod. Fert.*, 22:199-204.
9. Lavitrano, M., A. Camaioni, V.M. Fazio, S. Dolci, M.G. Farace and C. Spadafora. 1989. Sperm cells as vectors for introducing foreign

- DNA into eggs: Genetic transformation of mice. *Cell*, 57:717-723.
10. Leckie, P.A., J.G. Watson and S. Chaykin. 1973. An improved method for the artificial insemination of the mouse (*Mus musculus*). *Biol. Reprod.*, 9:420-425.
  11. Marsk, L. and K.S. Larsson. 1974. A simple method for non-surgical blastocyst transfer in mice. *J. Reprod. Fert.*, 37:393-398.
  12. Martin, G.R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78:7634-7638.
  13. Niwa, K. and M.C. Chang. 1974. Optimal sperm concentration and minimal number of spermatozoa for fertilization *in vitro* of rat eggs. *J. Reprod. Fert.*, 40:471-474.
  14. Olds-Clarke, P. and R. Sego. 1992. Calcium alters capacitation and progressive motility of uterine spermatozoa from +/+ and congenic  $t^{w32}/+$  mice. *Biol. Reprod.*, 47:629-635.
  15. Olds-Clarke, P. and W. Wivell. 1992. Impaired transport and fertilization *in vivo* of calcium-treated spermatozoa from +/+ or congenic  $t^{w32}/+$  mice. *Biol. Reprod.*, 47:621-628.
  16. Quigley, M.M., D.P. Wolf, N.F. Maklad, P. V. Dandeker and J.E. Sokoloski. 1982. Follicular size and number in human *in vitro* fertilization. *Fertil. Steril.*, 38:678.
  17. Robl, J.M. and P.J. Dziuk. 1987. Penetration of mouse eggs at various intervals after insemination as influenced by concentration of sperm and strain of male. *J. Exp. Zool.*, 242:181-187.
  18. Soriano, P. and R. Jaenisch. 1986. Retroviruses as probes for mammalian development: allocation of cells to the somatic and germ cell lineages. *Cell*, 46:19-29.
  19. Tsunoda, Y. and M.C. Chang. 1975. Penetration of mouse eggs *in vitro*: Optimal sperm concentration and minimal number of spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 44:139-142.
  20. Wilmut, I., M.L. Hooper and J.P. Simons. 1991. Genetic manipulation of mammals and its application in reproductive biology. *J. Reprod. Fert.*, 92:245-279.