

재조합유전자의 미세주입이 소 난포란의 체외발생에 미치는 영향

이철상 · 한용만 · 박정선 · 강용국 · 김선정 · 유대열 · 이경광

한국과학기술연구원, 유전공학연구소

The Effect of Pronuclear Injection of Recombinant DNA on the Developmental Potential of Bovine Follicular Oocytes *In Vitro*

Lee, C.S., Y.M. Han, J.S. Park, Y.K. Kang, S.J. Kim, D.Y. Yu and K.K. Lee

Genetic Engineering Research Institute, KIST

SUMMARY

Bovine follicular oocytes were matured in two different conditions, TCM 199 + 10% FBS with or without hormones (0.01 unit/ml ovine follicle stimulating hormone, 0.01 unit/ml ovine luteinizing hormone and 1 μ g/ml β -estradiol). There was no significant difference in maturation and fertilization rates of the oocytes between two groups. The result indicates that hormonal treatment does not have beneficial effect on *in vitro* maturation and fertilization of follicular oocytes.

IVF-derived one-cell bovine embryos were injected with foreign DNA (CChcLf) by microinjection method and then co-cultured with bovine oviductal epithelial cells. Developmental rate of microinjected embryos to blastocyst stage (21%) was similar to that of non-injected embryos (29%). This result represents that microinjected bovine embryos produced *in vitro* have a potential of development to normal blastocysts.

I. 서 론

외래유전자의 미세주입을 통한 형질전환동물 (transgenic animal)의 생산기법이 1980년 Gordon 등에 의해 개발된 이래, 유전자 발현기작, 유전병에 대한 치료법 개발을 목적으로한 질환모델 동물개발, 질병에 대한 저항성 증진, 동물 생산 효율 개선, 가축의 유증을 통한 유용 유전자산물의 생산 등 여러 연구에 널리 이용되고 있다. 형질전환기법을 가축에 적용하고자 할 때 가장 먼저 접하게 되는 문제는 수정란의 확보에 따른 어려움일 것이다. 이를 극복하기 위해 과거 10여년에 걸쳐, 도축된 소의 난포란을 배반포기배로 발

달시키기 위한 체외성숙, 수정 및 공동배양 기법에 대한 연구가 활발하게 진행되어, 난포란으로부터 다수의 체외수정란을 얻을 수 있는 기술을 확립하였으며, 나아가 이들 체외수정란을 이식하여 산자를 생산함으로써 체외수정란의 발생능력도 확인할 수 있었다 (Goto 등, 1988 ; Lu 등, 1988 ; Fukuda 등, 1990).

이상의 연구를 바탕으로 Krimpenfort (1991) 등은 난포란에서 얻은 소의 체외수정란에 α_{SI} -casein/human lactoferrin 재조합유전자를 미세주입한 후, 이식하여 재조합유전자가 자신의 염색체상에 삽입된 두 마리의 송아지를 생산함으로써, 난포란으로부터 형질전환 소의 생산을 최초로 보고하였다. 그러나, 소의 난포란을 대상으로 체외배양기술과 유전자 미세주입 기

* 본 연구는 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업 (BSN 80710-534-4)의 연구결과입니다.

술을 병용하여 형질전환 소를 생산하려는 연구는 국내 외적으로 매우 드물다.

이에 본 연구에서는 도축된 한우의 난소에서 회수한 난포란의 체외성숙, 수정 및 난관상피세포와의 공동배양을 통한 배반포기배로의 발생능력에 관한 실험을 수행하였으며, 아울러 이들 체외수정란에 재조합유전자 (CChcLf)를 미세주입하므로써 미세주입과정이 체외수정란의 배반포기배로의 발생에 미치는 영향을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난포란의 회수와 체외성숙

1) 난포란의 회수

도축된 한우로부터 적출한 난소는 100 unit/ml penicillin G와 100 μ g/ml streptomycin sulfate (Sigma, USA)가 함유된 30~33 $^{\circ}$ C의 생리식염수에 침적하여, 도축 후 3시간 이내에 실험실로 옮겼다. 생리식염수로 난소를 세정하고, 18 gauge 주사침이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 직경 2~6 mm의 난포로부터 난포액과 함께 난포란을 흡입, 회수하였다. 회수한 난포란 중 난구세포가 치밀하고, 균질의 난세포질을 가진 난포란만을 실체현미경하에서 선별하여 회수용 배지로 3회, 배양용 배지로 1회 세정한 후 성숙배양을 실시하였다.

회수용 배지는 2mM NaHCO₃, 10mM HEPES (N'-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid), 50 μ g/ml gentamycin (이상 Sigma, USA)이 포함된 TCM199 (Gibco 400-1100, USA)에 비동화시킨 fetal bovine serum (FBS; Gibco, USA)을 2% 첨가하여 사용하였다. 배양용 배지는 TCM199 (Gibco 380-2340, USA) 배양액에 FBS를 10% 첨가한 것으로, 체외성숙뿐만 아니라 난관상피세포의 배양 및 수정란과의 공동배양에도 공히 사용하였다.

2) 체외성숙

배양용 배지 0.5 ml을 넣은 4-well dish (Nunc, Denmark)를 2시간 이상 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 평형시킨 후, 각 well에 20~30개의 선별된 난포란을 옮기고 24시간 배양을 실시하였다. 이때 0.01 unit

/ml ovine LH (luteinizing hormone)와 0.01 unit/ml ovine FSH (follicle stimulating hormone)와 1 μ g/ml β -estradiol (이상 Sigma, USA)을 첨가하므로써 호르몬의 첨가가 난포란의 성숙에 미치는 영향을 조사하였다.

2. 정자의 세정 및 체외수정

유우개량 사업소에서 구입한 한우 동결정액 straw를 30초간 흔들며 용해하였다. 용해한 정액을 1 ml의 정자세정용 배지 (Parrish 등, 1986)가 들어있는 6 ml tube (Falcon, USA)의 바닥에 0.2 ml씩 넣고 1시간 배양하므로써 정자의 swim-up을 유도하였다 (Parrish 등, 1986). Swim-up 유도 후, 0.8 ml의 상층액을 15 ml conical tube (Falcon, USA)에 모아 약 450 g으로 15분간 원심처리하였다. 침전된 정자는 10 ml의 정자세정용 배지로 1회 세정하고, 최종 약 1 ml의 정자세정용 배지에 부유시켰다. 정자의 세정과 동시에 성숙배양한 난포란을 난자세정용 배지로 3회 세정한 후, light mineral oil (Sigma, USA)로 피복된 50 μ l 수정용 배지에 5~10개씩 옮겼으며, 여기에 준비해 둔 정자를 최종농도가 1~2 \pm 10⁶/ml 되도록 첨가하므로써 체외수정을 유기하였다.

체외수정용 배지는 glucose를 뺀 TALP (Bavister 등, 1983, 1992)배지에 10 μ g/ml heparin (Sigma, USA)을 첨가하였으며, 난자세정용은 체외수정용 배지의 NaHCO₃ 농도를 2 mM로 낮추고, HEPES 농도를 10 mM로 조정하였다.

3. 난포란의 성숙 및 수정을 조사

성숙 또는 수정을 유도한 난포란의 핵상을 관찰하기 위해, 성숙 또는 수정 후 24시간제에 일부의 난포란을 취하여 0.1% hyaluronidase (Sigma, USA)를 처리하고, vortex 하므로써 난구세포를 제거하였다. 난구세포가 제거된 난포란을 acetic-alcohol (1 : 3, v/v) 용액에서 24시간 이상 고정된 뒤, 1% orcein 용액으로 염색하였다. 성숙도는 핵상을 관찰하여 난핵포기(germinal vesicle, GV), 제1감수분열 중기 (metaphase I, MI), 제2감수분열 중기 (metaphase II, MII)난포란 또는 염색체 이상을 보이는 이상성숙란(Abnormal)으로 구분하여 조사하였으며, 체외수정 여부는 형성된 전핵을 관찰하여 확인하였다.

4. 재조합 유전자의 미세주입(microinjection)

본 연구에서는 사람 lactoferrin cDNA를 rat β -casein 유전자의 5' flanking, 3' flanking sequence에 연결한 CChcLf 재조합유전자(유 등, 1993)를 미세주입에 이용하였다. 즉, 체외수정 후 24~28시간째, micropipet을 이용하여 난구세포를 제거한 난포란을 12,000 g으로 5분간 원심처리한 다음, 미분간섭 현미경하에서 두 개의 전핵이 관찰되는 수정란만을 골라 미세조작기를 이용하여 재조합유전자를 전핵내로 도입하였다(Hogan 등, 1986).

5. 난관상피세포의 준비 및 공동배양

1) 난관상피세포의 준비

난관상피세포는 Xu 등(1992)의 방법에 따라 준비하였다. 즉, 황체에 있는 소의 난관을 얼음에 없어 실험실로 운반하고, 이를 생리식염수로 세정한 다음, 난관내벽의 상피세포층을 2 ml의 난자회수용 배지가 든 petri dish에 핀셋을 이용하여 훑어 내렸다. 3 ml 주사기로 수회 반복 흡입하여 잘게 부순 난관상피세포를 1 ml의 배양용 배지가 든 4-well dish에 옮겨 24시간 배양하였다. 배양 후, 소량의 난관상피세포를 mineral oil로 피복한 100 μ l의 배양용 배지에 옮겨 24시간 배양하여, 이를 수정란과의 공동배양에 사용하였다.

2) 난관상피세포와의 공동배양

재조합유전자를 도입한, 또는 도입하지 않은 체외수정란을 앞서 준비해 둔 난관상피세포와 함께 48시간 간격으로 배지를 절반씩 교체하면서 8일간 공동배양을 실시하였다. 배발달의 판정을 위해 공동배양 2일째 난할율을 조사하였으며, 8일째에는 배반포기배로의 발달율을 조사함과 아울러, 일부의 expanded blasto-

cyst는 세포수를 조사함으로써 체외발달된 blastocyst의 생존능을 간접적으로 평가하였다. 세포수의 조사는 Ushijima 등(1988)의 방법을 기초로 배반포기 배를 0.9%(w/v) sodium citrate 용액에 10분간 침적한 후, slide glass에 올려 놓고 고정액(alcohol : acetic acid : water = 3 : 2 : 1)을 떨어뜨려 고정하였다. 이를 1시간 동안 상온에서 건조시킨 다음, Giemasa 염색하여 사진 촬영 후 세포수를 조사하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 난포란의 성숙에 미치는 호르몬의 영향

난포란을 24시간 성숙배양하였을 때, 호르몬의 첨가는 난구세포의 확장을 현저히 촉진하였으나, metaphase II로의 성숙율은 대조구와 호르몬 첨가구에서 각각 63%와 67%로써 큰 영향을 미치지 못하였다(Table 1).

호르몬이 난포란의 성숙을 촉진하는 효과가 있다는 다수의 보고도 있으나(First와 Parrish, 1987 ; Sirard 등 1988), 본 연구 결과와 같이 호르몬이 난구세포의 확장을 촉진시킴에도 불구하고, 난포란의 성숙에는 유의적인 영향을 미치지 못한다는 연구 결과도 다수 보고되어 있음을 볼 때(Fukui와 Ono, 1989 ; Saeki 등, 1991 ; Yang 등, 1993), 호르몬에 의한 성숙 촉진 효과는 아직 불명확한 것으로 판단된다. 그리고 본 연구에서의 성숙율이 앞서 언급한 연구자들의 연구 결과와 비슷하거나(Fukui와 Ono 등, 1989), 다소 낮은 성적을 보이는 것은(Sirard 등, 1988 ; Yang 등, 1993) 난포란의 선별기준의 차이에 의한 결과로 판단된다.

Table 1. The effect of hormonal treatment on *in vitro* maturation of bovine follicular oocytes

Maturation condition	No. of oocytes examined	Developmental stage			
		germinal vesicle	metaphase I	metaphase II(%) ^a	abnormal
TCM 199+10% FBS	46	4	12	29(63)	1
TCM 199 + 10% FBS +Hormone ^b	42	0	10	28(67)	4

a : % of examined, b : 0.01 unit /ml o-FSH, 0.01 unit / ml o-LH, 1 μ g /ml β -estradiol

2. 성숙시 호르몬의 첨가가 체외수정에 미치는 영향

전핵의 존재로 체외수정 여부를 판정한 결과를 살펴 보면 (Table 2), 두 전핵을 가지는 정상수정란은 기본 배지성숙군(TCM199+10% FBS)과 호르몬첨가성숙군(TCM199+10% FBS+Hormone)에서 각각 64%와 62%로써, 성숙시 호르몬의 첨가가 체외수정에 영향을 미치지 못하였다. 최근 Yang 등(1993)은 체외성숙시 호르몬의 첨가가 체외수정율을 촉진시키지 못한다고 보고하였으며, Fukui와 Ono(1989)는 난할 및 배반포기배 형성에도 촉진효과가 없는 것으로 보고하였다. 그러나 많은 연구에서는 성숙시 LH, FSH, estrogen 등의 호르몬 첨가가 난포란의 발달능력을 증진시키는 것으로 보고하고 있다(First와 Parrish, 1987; Brackett 등, 1989; Younis 등, 1989).

3. 난관상피세포와의 공동배양을 통한 소 체외수정란의 발생능력 및 미세주입에 따른 영향

난관상피세포와의 공동배양을 통해 체외수정란의

체외발생능력을 조사한 결과는 Table 3과 같다.

미세주입을 실시하지 않은 대조구에서는 체외수정란의 50%(112/223)에서 난할이 일어났으며, 이들 난할란의 29%(32/112)가 배반포기배로 발달하였다 (Fig. 1-A). 또한, 이들 배반포기배에는 XB(expanding or expanded blastocyst; 8/32)와 HB(hatching or hatched blastocyst; 4/32)가 다수 포함되어 있었을 뿐 아니라, XB의 세포수를 조사하였을 때, 적게는 90개에서 많게는 250개로 평균 140개로 나타났다.

체외배양한 배반포기배의 세포수에 대해 Fukui와 Ono(1989)는 expanding/expanded blastocyst에서 124 ± 16 으로, Xu 등(1992)은 blastocyst에서 101.5 ± 3.05 , hatching blastocyst에서 174.7 ± 5.87 로 보고하였으며, 동시에 이들 배반포기배를 이식하여 각각 33%와 63%의 임신율을 보고하였다. 따라서 본 연구에서 체외발달시킨 배반포기배의 세포수도 전술한 연구자들의 연구 결과와 유사할 뿐만 아니라, 형태적으로 뚜렷한 inner cell mass가 관찰되었으며

Table 2. The effect of hormonal treatment on *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes

Maturation condition	No. of examined	No. of penetrated(%) ^a			
		1PN ^b	2PN	3PN	total
TCM 199 + 10% FBS	28	2	18(64)	1	21(75)
TCM 199 + 10% FBS + Hormone ^c	26	1	16(62)	0	17(65)

a : % of examined

b : pronucleus

c : 0.01 unit / ml o-FSH, 0.01 unit / ml o-LH, 1 µg / ml β-estradiol

Table 3. *In vitro* development of bovine embryos co-cultured with bovine oviductal epithelial cells after maturation and fertilization *in vitro*

	No. of embryos	No. of cleaved	No. of blastocyst (%) ^a	Stage of blastocyst ^b			Cell number of XBs
				BL	XB	HB	
Injected	42	24(57%) ^c	5(21)	2	2	1	
Non-injected	223	112(50%) ^d	32(29)	10	18	4	90, 99, 133, 250

a : % of cleaved

b : BL, blastocyst; XB, expanding or expanded blastocyst; HB, hatching or hatched blastocyst

c : % of injected embryos

d : % of follicular oocytes

(Fig. 1), expansion 및 hatching이 이루어지는 것으로 보아, 본 연구에서 확립된 배양 기술을 통해서도 난포란으로부터 산자 생산이 가능할 것으로 판단된다.

그리고 미세주입을 실시한 체외수정란의 발생능력을 살펴보면(Table 3), 미세주입한 체외수정란의 난할율은 57%(24/42)이었다. 이는 두 전핵이 뚜렷이 관찰되는 체외수정란만을 선별하여 미세주입을 실시한 결과로써, 두 전핵을 가지는 체외수정란의 비율이 64%(Table 2)임을 고려할 때, 난포란으로부터의 난할율은 약 30%임을 추정할 수 있다. 이에 반해 미세주입을 실시하지 않은 대조구에서 난포란의 난할율은 50%로써, 미세주입한 난포란의 난할율이 대조구의 난할율보다 현저히 낮음을 알 수 있다. 또한, 배반포기배로의 발달율도 미세주입한 경우에는 난할란의 21%

로써, 역시 대조구의 29%에 비해 다소 저조한 것을 알 수 있다.

이에 대해 형질전환 소의 생산을 최초로 보고한 Krimpenfort 등 (1991)도 본 연구의 결과와 유사하게, 미세주입란의 난할율이 60%, 난할란중 이식 가능한 상실배 및 배반포기배의 발생율이 19%로써, 대조구 (20~25%)에 비해 다소 낮음을 지적하고 있다. 따라서, 재조합유전자의 미세주입기법은 체외수정란의 체외발생능력을 저하시키는 것으로 판단된다. 그럼에도 불구하고, 재조합유전자가 미세주입된 체외수정란도 정상배반포기배로 발달할 뿐만 아니라 (Fig. 1-B), expansion 및 hatching이 일어나는 것으로 보아 정상발생능력을 가진 것으로 판단된다.

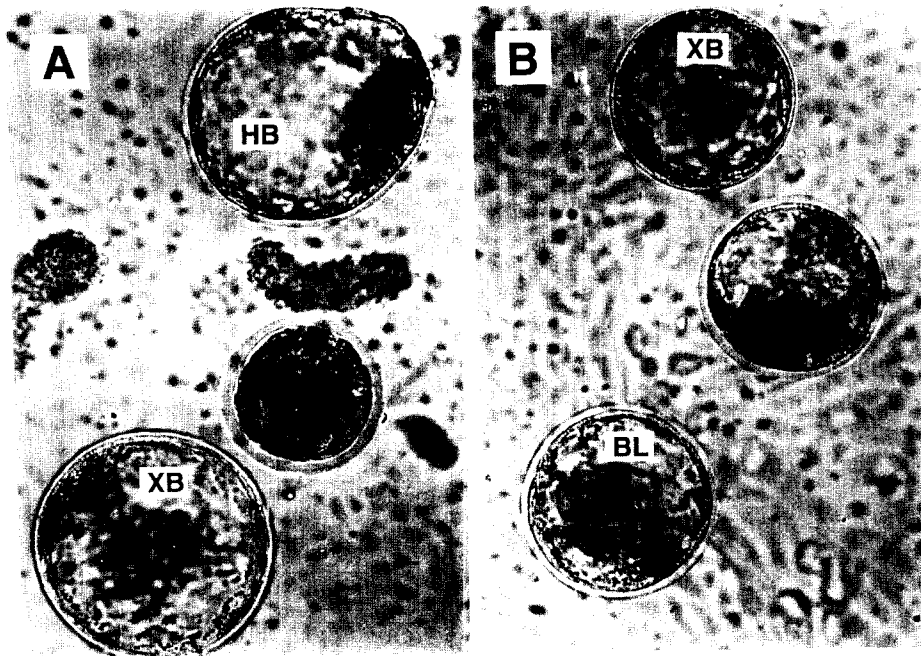


Fig. 1. *In vitro* developed bovine embryos. A) Non-injected embryos. Bovine follicular oocytes were matured, fertilized and co-cultured *in vitro* for 7 days with bovine oviductal epithelial cells. B) Injected embryos. CChcLf DNA fragments were injected into the pronucleus of one-cell fertilized eggs and the eggs were then co-cultured for 7 days. BL, blastocyst; XB, expanding or expanded blastocyst; HB, hatching or hatched blastocyst

IV. 적 요

난포란에서 배반포기배로의 발생과정 중, 체외성숙 시 호르몬의 첨가가 난포란의 체외성숙 및 체외수정에 미치는 영향을 조사함과 아울러, 재조합유전자의 미세주입이 체외수정란의 배반포기배로의 발생에 미치는 영향을 난관상피세포와의 공동배양하에서 조사하였다. 체외성숙시 호르몬을 첨가한 실험구와 대조구에서 metaphase II 로의 성숙율은 각각 67%와 63%, 두 전핵을 가지는 정상 수정란의 비율은 각각 62%, 64%로써, 체외성숙시 호르몬의 첨가는 난포란의 체외성숙 및 수정에 영향을 미치지 못하였다. 체외수정란에 재조합유전자 (CChcLf)를 주입한 후, 난관상피세포와의 공동배양을 통해 배반포기 배로의 배발생을 유도하였을 때, 난할란 중 배반포기배로의 발생율이 21%로써, 대조구의 29%에 비해 낮은 배발생율을 보였다. 이상의 결과는 외래유전자의 미세주입이 체외수정란의 배발생 능력을 다소 저하시킴에도 불구하고, 난포란으로부터 재조합유전자가 미세주입된 정상 배반포기배를 생산할 수 있음을 보여 주고 있다.

V. 인용문헌

1. Bavister, B.D., M.L. Leibfried and G. Leiberman. 1983. Development of Preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. Biol. Reprod., 28 : 235-247.
2. Bavister, B.D., T.A. Rose-Hellekant and T. Pinyopumminter. 1992. Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. Theriogenology, 37 : 127-146.
3. Brackett, B.G., A.I. Younis and R.A. Fayer-Hosken. 1989. Enhanced viability after *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured with high concentrations of LH. Fertil. Steril., 52 : 319-324.
4. First, N.L. and J.J. Parrish. 1987. *In vitro* fertilization in ruminants. J. Reprod. Fert., 34(Suppl) : 151-165.
5. Fukui, Y. and H. Ono. 1989. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for *in-vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. J. Reprod. Fert., 86 : 501-506.
6. Fukuda, Y., M. Ichikawa, K. Naito and Y. Toyoda. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. Biol. Reprod., 42 : 114-119.
7. Gordon, J.W., G.A. Scangos, D.J. Plotkin, J. A. Barbosa and F.H. Ruddle. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 : 7380-7384.
8. Goto, K., Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba, Y. Nakanishi and K. Ogawa. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in-vitro* fertilization of *in-vitro* matured follicular oocytes. J. Reprod. Fert., 83 : 753-758.
9. Hogan, B., F. Costantini and E. Lacy. 1986. Manipulating the mouse embryo, A laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab. Press, New York.
10. Krimpenfort, P., A. Rademakers, W. Eye-stone, A. Van der Schans, S. Van der Broek, P. Kooiman, E. Kootwijk, G. Platenburg, G. Pieper, R. Strijker and H. de Boer 1991. Generation of transgenic dairy cattle using '*in vitro*' embryo production. Bio/Technology, 9 : 844-847.
11. Lu, K.H., I. Gordon, H.B. Chen, M. Gallagher and H. McGovern. 1988. Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by *in vitro* techniques. Vet. Rec., 122 : 539-540.
12. Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish, M.L.

- Leibfried-Rutledge, E.S. Critser, W.H. Eyestone and N.L. First. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25 : 591-600.
13. Saeki, K., M. Hoshi, M.L. Leibfried-Rutledge and N.L. First. 1991. *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biol. Reprod.*, 44 : 256-260.
14. Sirard, M.A., J.J. Parrish, C.B. Ware, M. L. Leibfried-Rutledge and N.L. First. 1988. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally, competent embryos. *Biol. Reprod.*, 39 : 546-552.
15. Ushijima, M., T. Okuda, A. Nakayama, K. Moji, K. Ishida, M. Murata, A. Iguchi and T. Etoh. 1988. Relationship between the cell number and quality of Day-8 bovine blastocysts. *Proc. 3rd East. Jpn. Soc. Anim. Embryo Trans.* No. 9, pp. 37-38(In Japanese).
16. Xu, K.P., B.R. Yadav, R.W. Rorie, L. Plante, K.J. Betteridge and W.A. King. 1992. Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized *in vitro* and co-cultured with bovine oviducal epithelial cells, *J. Reprod. Fert.*, 94 : 33-43.
17. Yang, X., S. Jiang and R.H. Foote. 1993. Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. *Mol. Reprod. Dev.* 34 : 94-100.
18. Younis, A.I., B.G. Brackett and R.A. Fayrer-Hosken. 1989. Influence of serum and hormones on maturation and fertilization of bovine oocytes *in vitro*. *Gamete Res.*, 23 : 189-201.
19. 유대열 외 11인. 1993. Transgenic 동물생산 기법에 의한 포유동물 유증의 성분조절에 관한 연구. 과학기술처 특정연구개발사업 보고서, BSG 70540-535-4.