

상실배 및 포배기에 분할한 생쥐 수정란의 체외발달 속도 및 이식 후 수태율

박희성 · 박준규* · 정장용 · 박충생*
진주산업대학교 축산학과

***In Vitro* Development and Conception Rate after Transfer of Mouse Embryos Bisected at Morula or Blastocyst Stage**

H.S. Park, J.K. Park*, J.Y. Chung and C.S. Park*
Department of Animal Science, Chinyu National University

SUMMARY

These experiments were carried out to determine the effect of pregnancy in bisected embryo. The embryos of ICR mouse were microsurgically bisected at morula and blastocyst stage using microsurgical blade attached a micromanipulator. These bisected embryos without zona pellucida were cultured up to blastocyst stage and cell count and diameter of stained blastomere, and transferred pseudopregnant mice. And the development of these bisected embryos was compared with the results of production of young of the corresponding intact embryos or cell stage.

When the bisected mouse embryos were cultured *in vitro* for 20 to 24 hours in morula stage(77.2%) or 3 to 6 hours in blastocyst stage(84.1%), they were developed to the expanded blastocyst stage. There were no significant($P < 0.05$) differences in the development rate of bisected embryos between in morula and blastocyst stages.

The embryo size of blastocyst developed *in vitro* from bisected embryo was small($P < 0.05$) than intact embryo. However, the number of blastomeres with bisected embryo(24.7+1.3 and 21.5+1.2 respectively) were significantly($P < 0.05$) reduced, compared with that of intact embryos(36.3+1.1 and 41.4+1.2 respectively).

When compared with the result of pregnancy rate(63.6%) after surgical transfer of bisected morulae, a similar result(65.4%) was obtained with bisected blastocyst stage($P < 0.05$). However, production of youngs (38.8%) after transfer of bisected morula, a similar result(38.1%) was obtained with bisected blastocyst stage($P < 0.05$).

서 론

수정란의 분할은 인위적인 방법으로 수정란을 양

분하여 수정란의 수를 증가시킬 뿐 아니라 분할란을 수란축에 이식함으로써 유전적으로 동일한 성을 가진 일란성 쌍자생산과 번식율의 증가로 가축의 증식에도 크게 기여할 수 있을 것이다.

* 경상대학교 농과대학(College of Agriculture, Gyeongsang National University)

최초의 쌍자생산은 1979년 Willadsen이 면양에서 8-세포기에 있는 수정란의 할구를 분리하여 투명대에 주입한 다음 이를 한천으로 embedding 하여 토끼의 난관에 假이식하여 상실배기까지 발달시킨 다음 수란축에 이식하여 일란성 면양생산에 성공한 이래 1980년에는 동일한 방법으로 소에서 Willadsen이 성공하였다고 보고하였다. 근년에 와서는 보다 간편한 방법인 상실배기 또는 포배기 수정란을 양분하여 단시간 체외배양 후 수란축에 이식하는 방법으로 소(Ozil, 1983), 면양(Gatica 등, 1984), 산양(Tsunoda 등, 1985) 및 생쥐(Nagashima 등, 1984; Park, 1988)에서 각각 높은 수태율을 얻었다고 보고하였다.

또한 McEvoy 와 Sreenan(1987)은 상실배기 및 포배기 수정란을 투명대를 제거하지 않고 분할하여 3~6시간 체외배양을 시킨 후 곧바로 수란축에 이식하는 방법으로 양호한 수태성적을 얻었다고 보고하였다. 이러한 쌍자생산 기술은 30~40%의 성공율로서 아직도 정상적인 수정란의 수태율에 비하여 낮은 편이며, 앞으로의 양분기술의 개발 및 수태율 향상을 위한 연구가 요구된다.

본 연구에서는 분할란의 수태율에 미칠 수 있는 요인을 규명하고자 상실배기 및 포배기에 있는 수정란을 분할하여 단시간 체외배양 후 이들 분할란을 핵염색을 실시하여 할구의 크기 및 할구수를 조사하여 이들 분할란의 수태성적을 비교조사하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물

공시동물은 ICR 계통의 생쥐로서 공란생쥐는 4~6주령의 미성숙 암컷과 수란생쥐는 10~12주령의 성숙한 암컷을 사용하였으며, 위임신유기를 위하여 10~12주령의 정관결찰 기술을 받은 수컷을 실험에 공시하였다. 한편 공시동물의 사육환경으로 실내온도는 20~23℃로 유지하였으며, 조명은 1일 14시간(07:00~21:00)으로 조절하였고, 불과 표준사료(생쥐용 펠릿사료)는 자유로이 급식시켰다.

2. 과배란 유기 및 수정

과배란 유기는 PMSG(Sigma, U.S.A.) 5IU를 복강주사하고 48시간 후에 hCG(Sigma, U.S.A.) 5IU를 동일한 방법으로 주사함과 동시에 수컷 생쥐와 1:1의 비율로 합사시켜 자연교미를 유도하였다. 다음날 아침 질전 유무를 확인하여 질전이 형성되어 있는 것만을 실험에 사용하였으며, 질전이 확인된 날을 수정 제 1일로 하였다.

3. 수정란의 회수

수정 후 상실배 및 배반포기 수정란은 3.0~3.5일 및 3.5~4.0일에 도살하여 자궁을 적출한 후 flushing 하여 회수하였으며, 이때 flushing 용 배양액은 0.5% BSA(Sigma, U.S.A.)가 첨가된 Hepes-BMOC-3 를 사용하였다. 회수한 수정란은 신선한 배양액으로 3~4회 세척한 후 형태학적으로 정상적인 수정란만을 골라 본실험에 사용하였다.

4. 수정란의 분할

수정란의 분할조작은 유동 paraffin이 덮혀진 소립배양액내에 수정란을 옮긴 다음 inverted microscope(Olympus, Japan)하에서 micromanipulator(Goodfellow, England)에 장치된 holding pipet으로 수정란을 고정시킨 다음 수정란의 분할은 다른 한쪽 micromanipulator에 장치된 microblade(WE-CK, U.S.A.)로 Park 등(1988)의 수직분할 방법으로 분할을 실시하였다. 수정란의 분할시 damage 여부는 분할 직후에 판정하였다.

5. 분할란의 체외배양

분할란의 체외배양은 NaHCO₃-BMOC-3를 배양액으로 사용하였으며, pH는 7.4로 조정하였다. 배양액은 사용 직전에 0.2 μm의 millipore filter로 여과시켜 2시간 동안 incubator내에서 평형시켜 사용하였다. 배양시간에 있어서 상실배는 약 20~24시간 동안 체외배양을 실시하였고 배반포기는 3~6시간 동안 배양을 실시하여 reformation된 것만을 정상적인 배양란으로 판정하였다.

6. 분할란의 크기 및 할구수

분할란의 체외발달에 따른 형태학적 조사를 위하

여 수정란의 염색은 상실배는 reformation 후 배반포기까지 정상적으로 발달한 수정란과 배반포기 수정란은 reformation된 수정란만을 골라 fluorescent dye인 Hoechst 33342(Sigma, U.S.A.)를 이용하여 Pusel 등(1985)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉 2.3% sodium citrate dihydrate 0.75ml 과 ethanol 0.25ml 및 1mg Hoechst 15 μ l 를 혼합하여 제조한 염색액을 사용하였다.

실리콘(Sigma, U.S.A.) 처리를 한 slide glass에 trypan blue 15 μ l를 떨어뜨려 소적액을 만들어 수정란을 30~60초간 소적액내에 두었다가 내경이 수정란보다 작은 pipet 으로 trypan blue 만 완전히 제거한 다음 Hoechst 염색액을 15 μ l 가하여 3~5분간 배양시킨 후에 다시 Hoechst 염색액만을 제거하여 곧바로 Polymount(Polyscience, U.S.A.)를 15 μ l 떨어뜨린 후 cover glass 를 덮어 Fig. 1 에서 보는 바와 같이 200~400 배의 형광현미경(Nikon, Japan)에서 핵의 수와 분할란의 크기를 조사하였다. 할구의 크기는 위상차현미경(Nikon, Japan)하에서 ocular micrometer를 이용하여 투명대를 제거한 할구의 직경을 측정하였다.

7. 분할란의 이식

수정란의 이식을 위하여 마취는 위임신이 유기된

수란생쥐에 Xylazine (바이엘, 한국)과 Ketamin (유한양행, 한국)을 1:1의 비율로 희석하여 개체당 0.1~0.12ml 씩 근육주사하여 마취를 유도하였다. 이식은 Hogan 등(1986)의 방법을 일부 개선하여 위임신 제 3.5~4.0일된 수란생쥐의 배정중선을 절개하고 양쪽 겹부를 절개하여 자궁을 노출시킨 다음 26 gauge needle로 puncture하여 transfer pipet이 자궁강내에 완전히 삽입된 것을 확인한 다음 배반포까지 발달한 수정란만을 골라 한쪽 자궁에 2~6개씩 주입하였다. 이때 이식용 pipet은 내경이 120~180 μ m 의 크기로 제작하여 수정란과 배양액의 양이 1~2 μ l 로 되게 조작하였다.

8. 통계학적 분석

통계학적 분석은 MICROSTAT Statistical program package(Ecosoft, Inc., 1984)를 사용하여 분할란의 배양 및 이식 후의 산자 생산 성적은 χ^2 -test 를 실시하였고, 할구의 크기 및 핵의 수는 분산분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 수정란의 분할 및 분할란의 체외배양

상실배 및 배반포기 수정란의 분할 및 체외발달

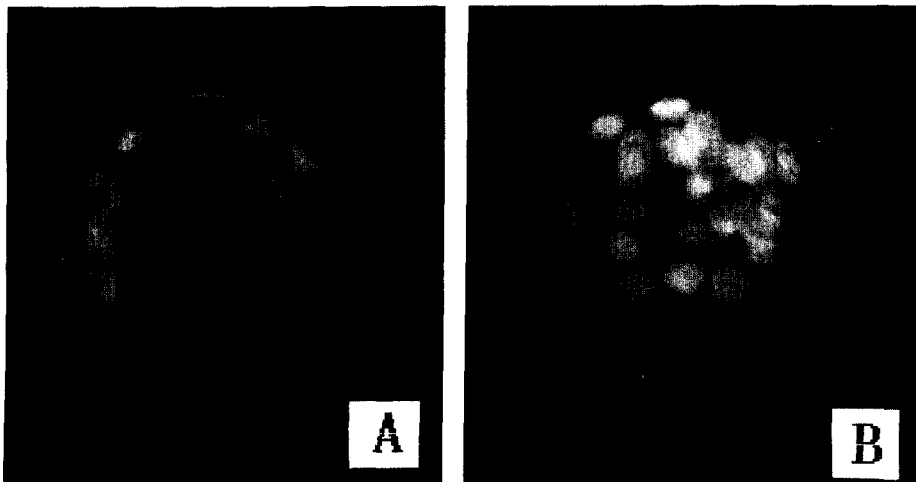


Fig. 1. Intact(A) and bisected(B) blastocyst counterstained with trypan blue and stained with hoechst 33342.(X200).

성적은 Table 1에서 나타난 바와 같다. 상실배 및 배반포기 수정란의 분할시 아무런 손상없이 분할한 것은 82.7 및 84.8%로서 발달단계간에 유의적($P < 0.05$)인 차이가 없었으며, 이들 분할란의 체외발달율은 상실배가 77.2% 였고 배반포기 수정란이 84.1%로서 체외발달율도 발달단계간에 유의적($P < 0.05$)인 차이가 없었다.

이러한 결과는 Nagashima 등(1984)의 80.4%와 Park 등(1987), Park(1988), 이 등(1989) 및 강 등(1989)의 성적과 대체로 일치한다. 본 연구에서는 Park(1988)의 수직분할방법으로 분할을 실시하였으며, 이러한 방법은 pronase와 같은 분해효소를 이용하여 투명대를 제거한 후 할구를 분할하는 방법(Nagashima, 1984)보다는 훨씬 간편함으로서 짧은 시간에 많은 수의 수정란을 분할할 수가 있었다. 또한 상실배와 배반포기 수정란의 발달 단계간에도 분할성공율에는 유의적($P < 0.05$)인 차이가 없었다.

분할한 수정란의 체외발달율에 있어서도 Nagashima 등(1984)의 상실배기 분할란의 57.3%보다는 월등히 높은 결과이며, McEvoy와 Sreenan(1987)이 소의 상실배기 수정란을 분할하여 86%가 정상적으로 발달하였다는 보고와도 큰 차이가 없었다. 분할시 blade에 의한 부분적인 손상이 체외발달에 다소 영향을 미치는 것으로 생각되며, Matsumoto 등(1989)은 수정란의 분할조작시에 cytochalasin B를 배양액에 1ng/ml을 첨가함으로써 수정란의 손상을 다소 막을 수 있다고 하였다.

2. 분할 수정란의 크기 및 할구수

분할 수정란의 크기 및 할구수가 수태율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 상실배 및 배반포기 수정란의 크기 및 할구수를 조사한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같다. 수정란의 크기는 상실배 및 배반포기 모두 분할한 수정란이 분할하지 않은 정상적인 수정란보다 유의적($P < 0.05$)으로 작았다. 할구의 수는 상실배의 경우 분할한 수정란은 24.7 ± 1.3 개로서 정상적인 수정란의 36.3 ± 1.1 개보다 유의적($P < 0.05$)으로 적었다. 또한 배반포기의 경우도 분할한 수정란은 21.5 ± 1.2 개로서 분할하지 않은 수정란의 41.4 ± 1.2 개보다 유의적($P < 0.05$)으로 적었다. 상실배기에 분할한 수정란의 할구수가 배반포기에 분할한 수정란보다 유의적($P < 0.05$)으로 많았다. 분할하지 않은 수정란은 상실배기에서 채란하여 배반포기까지 체외발달시킨 수정란이 배반포기에서 채란한 수정란보다 할구수가 유의적($P < 0.05$)으로 적었다.

본 연구에서 분할한 수정란이 분할하지 않은 정상적인 수정란보다 할구수가 적은 것은 분할시에 다소의 할구가 손상을 받았고 이런 수정란을 단시간 체외에서 배양을 시켰기 때문일 것으로 생각되며, 분할한 상실배기 수정란이 배반포기 수정란보다 할구수가 많은 것은 상실배기는 약 24시간 정도 체외에서 배양을 실시하였고 배반포기 수정란은 분할후 약 6시간 동안 배양하여 reformation 만 확인되었기 때문에 체외배양 시간이 너무 짧았기 때문

Table 1. Production of Demi-embryos and *in vitro* development of demi-embryos on mouse

Items	Number	Percentage
Morula		
No. of embryos	191	—
No. of embryos bisected without damage	158	82.7
No. of twin embryos developed for culture period	122	77.2
Blastocyst		
No. of embryos	132	—
No. of embryos bisected without damage	112	84.8
No. of twin developed for culture period	94	84.1

There are no significant ($P < 0.05$) differences in successfully bisected and *in vitro* developed from demi-embryos between the cell stages.

Table 2. Comparison of embryo size and number of blastomeres nuclei in half or intact embryos of morula and blastocyst stage

Stage of embryos	Embryos developed	Examined embryos	Diameter of embryos(μ m)	No. of blastomeres
Morula	Half	30	89.3 \pm 1.2 ^b A	24.7 \pm 1.3 ^b A
	Intact	30	118.3 \pm 1.2 ^a A	36.3 \pm 1.1 ^a A
Blastocyst	Half	30	86.8 \pm 1.4 ^b A	21.5 \pm 1.2 ^b B
	Intact	30	124.5 \pm 1.2 ^a B	41.4 \pm 1.2 ^a B

1) Mean \pm S.E.M.

2) There are no significant ($P < 0.05$) differences in embryo development between morula or blastocyst cell stages with the same small letters within intact or half embryo, and between cell stages of embryo with the same capital letters within the intact.

일 것으로 생각된다.

3. 분할 수정란의 이식후 수태율

상실배 및 배반포기에 분할한 수정란을 상실배는 배반포기 단계까지 발달시키고 배반포기는 reformation 후에 위임신이 유기된 수란생쥐에 이식하여 그 수태율을 조사한 결과는 Table 3에 나타난 바와 같다. 162개의 상실배기에 분할한 수정란을 22마리의 수란생쥐에 이식하여 이중 63.6%인 14마리가 임신하여 63마리(38.8%)의 산자를 생산하여 분할하지 않은 정상적인 수정란과 유의적($P < 0.05$)인 차이가 없었으며, 배반포기에 분할한 수정란에 있어서도 임신을 및 산자수가 각각 64.3 및 41.7%로서 분할하지 않은 정상적인 수정란의 65.6 및 38.8%로서 유의적($P < 0.05$)인 차이가 없었다. 또한 상실배

및 포배기에 분할한 수정란의 발달 단계간에도 각각 60.0~63.6% 및 34.0~38.8%로서 유의적($P < 0.05$)인 차이가 없었다.

이러한 결과는 Nagashima등(1984)과 Park(1988)의 상실배기에 분할한 수정란을 이식한 착상을 41.7%와 대체로 비슷하며, Park 등(1987)도 상실배기 및 포배기에 분할한 수정란을 수란 생쥐에 이식하였을때 수태율은 분할하지 않은 정상적인 수정란을 이식하였을때의 성적과 대등하다고 보고한 내용과 일치한다. Tsunoda등(1985)은 상실배는 분할시에 할구의 부분적인 파괴에 의하여 cell수의 감소가 일어나며, 이로 인하여 수태율이 감소된다고 보고하였다.

본 연구에서는 분할한 수정란과 정상적인 분할하지 않은 수정란간에 수태율에 차이가 없었으며, 상

Table 3. Production of live youngs after transfer of bisected morula or blastocyst embryos into recipient mice

Stage of embryos	Embryos transferred	No. of embryos transferred	No. of recipient	No. of pregnant recipients(%)	No. of developed to youngs(%)
Morula	Half	162	22	14(63.6)	63(38.8)
	Intact	235	28	18(64.3)	98(41.7)
Blastocyst	Half	188	25	15(60.0)	64(34.0)
	Intact	210	26	17(65.4)	80(38.1)

The percentages with the different superscripts denote significant ($P < 0.05$) difference between the cell stages of embryos.

실배 및 배반포기간에도 수태율의 차이가 없었다. 비록 Table 2에서 보는 바와 같이 할구수의 차이는 다소 있었으나 수태율에 차이가 없는 것은 상실배기는 배반포기 단계까지 발달을 시켜서 수란 생쥐에 이식하였기 때문인 것으로 생각되며, 분할란과 정상적인 수정란간에도 차이가 없는 것은 발달단계보다는 수란생쥐와의 동기화 및 이식시의 숙련도에 영향이 있는 것으로 생각된다.

적 요

가축의 일란성 쌍태 생산에 있어서 분할 수정란의 수태율을 향상시키고자 상실배 및 포배기에 있는 ICR 계통의 생쥐 수정란을 micromanipulator을 분할 수정란을 작출하여 이를 체외배양을 실시하여 발달성적을 조사하였으며, 체외발달 및 수태율에 관계하는 할구의 크기, 핵의 수 및 핵의 크기를 조사하였다. 또한 이를 수란생쥐에 이식을 실시하여 산자생산 성적을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 분할 수정란중 상실배는 20~24시간 및 포배기는 3~6시간 배양을 실시한 결과 분할 수정란중 한쌍이 모두 정상적으로 배양된 것은 각각 77.2% 및 84.1% 로써 이들 발달단계 간에 유의적($P < 0.05$)인 차이가 없었다.
2. 분할된 상실배 및 포배기 수정란을 체외 배양 후 배반포의 크기는 유의적($P < 0.05$)인 차이가 없었으나 할구의 수는 각각 24.7 ± 1.3 및 21.5 ± 1.2 로써 포배기에 분할한 수정란이 유의적($P < 0.05$)으로 할구수가 많았다. 또한 핵의 크기는 유의적($P < 0.05$)인 차이가 없었다.
3. 분할된 상실배 및 포배기 수정란의 이식 후 수태율은 각각 63.6% 및 60.0% 로써 유의적($P < 0.05$)인 차이가 없었으며, 산자생산율에 있어서도 각각 38.8 및 34.0%로써 유의적($P < 0.05$)인 차이가 없었다.

참고문헌

Gatica R, Boland MP, Crosby TS, and Gordon I. 1984. Micromanipulation of sheep morulae

to produce monozygotic twins. *Theriogenol.* 21:555-560.

Hogan B, Constantini F and Lacy E. 1986. embryo. In : *Manipulating the mouse embryo: A Laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press in New York.

Kang DJ, Park HS, Lee HJ and Park CS. 1989. Studies on culture and transfer of mouse embryos bisected at various cell stages. *Korean J. Emb. Trans.* 4:28-34.

Lee HJ, Park HS, Kim TS, Choe SY and Park CS. 1989. Study on improvement of viability of mouse embryos after bisection. *Korean J. Vet. Res.* 29:123-128.

Matsumoto K, Miyake M, Utsumi K and Iritani A. 1989. Production of identical twin by separating two-cell stage embryos. *Gamete Res.* 22:257-263.

McEvoy TG and Sreenan JM. 1987. The survival of bisected cattle embryos without zonae pellucidae. *Theriogenol.* 27:257.

Nagashima H, Matsui K, Sawasaki T and Kano Y. 1984. Production of monozygotic mouse twins from microsurgically bisected morulae. *J. Reprod. Fert.* 70:357-362.

Ozil JP. 1983. Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. *J. Reprod. Fert.* 96:463-468.

Park CS, Choe SY, Lee HJ, Lee JS and Park HS. 1987. Studies on the technological development of embryos transfer and manipulation in goat. II. Production of monozygotic twins by bisection of embryos. *Proc. 2nd Conf. Mol. Biol. & Gen. Engin.*, Seoul, Oct. 16-17. pp. 157-164.

Park HS. 1988. Surgical and non-surgical transfer of mouse embryos bisected at developmental stage of morula and blastocysts. M. S. thesis. Gyeongsang National University, Chinju, Korea.

- Pursel VG, Wall RJ, Rexroad CE, Jr., Hammer RE and Brinster RL. 1985. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenol.* 24:687-700.
- Tsunoda Y, Tokunaga T, Sugie T and Katsumata M. 1985. Production of monozygotic twins following the transfer of bisected embryos in the goats. *Theriogenol.* 24:337-343.
- Willadsen SM. 1979. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature.* 227:298-300.
- Willadsen SM, Lehn-Jensen G, Fehilly CB and Newcomb R. 1981. The production of monozygotic twins of preselected parentage by micromanipulation of non-surgically collected cow embryos. *Theriogenol.* 15:23-29.