

돼지에 있어서 4-세포기 분할구의 체외발생능과 난모세포의 활성화에 미치는 전기자극의 효과

이상진 · V. G. Pursel* · 정순영 · 박홍대**

삼육대학교 병설전문대학 생활환경과

Effects of Electrostimulation on *In Vitro* Developmental Ability of Single 4-cell Blastomeres and Oocyte Activation in Porcine

Lee, S. J., V. G. Pursel, S. Y. Chung* and H. D. Park**

Department of Life-Environment, Korean Sahmyook Junior College

SUMMARY

The objective of the present experiments were to determine whether micromanipulative and electro-stimulation conditions for blastomere survival overlapped those for oocyte activation in porcine. Eggs selected for *in vitro* developmental potential of blastomeres isolated from 4-cell embryos and oocyte activation by electrostimulation were equilibrated for 5~10 min. in 0.3M sucrose solution containing 7.5 μ g/ml cytochalasin B, and then electrostimulated for 30 μ sec using one pulse of 100, 120, 150 or 180 volts DC with electrodes 0.2mm apart. Single blastomeres were inserted into empty zona pellucida prior to electrostimulation. Then they were cultured in 20 μ l drops of fresh BECM to observe their developmental ability *in vitro* in a humidified incubator at 38.5 $^{\circ}$ C. The results obtained from these experiments are as follows :

1. When one pulse of 100, 120, 150 or 180 volts DC for 30 μ sec were applied to porcine oocytes having the slit formed on zona pellucida for activation, activation rates were 65.1, 66.7, 70.7 and 91.7%, respectively. Higher activation rate was observed in 180V.
2. Intact oocytes incubated for 30 min. in 0.3M sucrose solution after electrostimulation were significantly different from control group with increasing of voltages($p < 0.05$). When voltages used for electrostimulation were increased, activation rates of oocytes were improved in all treatment groups.
3. When zona punctured-oocytes were only electrostimulated, or incubated in 0.3M sucrose solution for 30 min. after electrostimulation at 180 volt DC, activation rates were 90.5 and 95.5%, respectively. And activation rates of zona punctured-oocytes were significantly different from the groups for which zona pellucida was not punctured($P < 0.05$).

* 미국 농무성 농업연구소 유전자조작연구실(U. S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Reproduction Lab.)

** 대구대학교 공과대학 생물공학과(Department of Biotechnology, College of Engineering, Tae-Gu University)

4. When single blastomeres from 4-cell transferred into empty zona pellucida were incubated for 0, 15 and 30 min. in 0.3M sucrose solution after electrostimulation using one pulse of 180 volt DC for 30 μ sec, developmental rates of electrostimulated-single blastomeres to blastocyst were 72.5, 59.0 and 51.2%, respectively, and the ratio of control group developed to blastocyst were 80.0%.
5. The average cell number in electrostimulated-blastomeres developed to blastocyst were 7.9~10.8, and reduced than the cell number in diploid control ; Also cell number decreased with increasing of voltages.

The results of these experiments indicate that the optimal condition for achieving *in vitro* developmental ability of single 4-cell blastomeres and oocyte activation is 1 pulse, duration 30 μ sec. in 180 volt, and incubation of blastomeres and oocytes in 0.3M sucrose solution after electrostimulation was not significantly different from another treatment groups. The results also show that this condition is suitable for nuclear transplantation using porcine eggs.

I. 서 론

제 2 감수분열의 중기에 핵성숙을 정지하고 있는 포유동물 난모세포의 핵성숙 재개를 위한 인위적인 난모세포의 활성화(단위발생) 유도는 전기자극, 온도충격, Ca^{2+} , inositol triphosphate, alcohol 및 puromycin 등(Whittingham, 1980)과 같은 여러가지 물리적, 화학적인 자극에 의해 유도될 수 있다. 따라서 이들 인위적인 활성화가 유도된 난모세포들은 염색체 수가 정확하게 주어진다면 정상적인 체외발생에 참여할 수 있게 된다. 즉 핵치환에 의해 정자세포에서 파생된 웅성 전핵을 이식받은 단위발생이 유도된 생쥐의 난모세포는 정상적인 체외발생을 통하여 산자까지 생산할 수 있다(Surani 등, 1987). 그러므로 적절한 단계의 수정란에서 분리한 공여핵을 핵적출된 난모세포의 세포질 속으로 이식함과 동시에 난모세포의 활성화를 유도시키는 세포융합기법과 핵치환 기법으로 이미 sheep, cattle, pigs 및 rabbit에서 성공적인 산자의 생산이 보고(Willadsen, 1986, 1989; Prather 등, 1987, 1989; Stice와 Robl, 1988; Robl 등, 1988, 1992)되었다. 그러나 돼지의 경우, 핵치환에 의한 산자의 생산 효율이 다른 종에 비해 그다지 높지 않고 전적으로 체외에서 생산된 난모세포와 수정란을 이용해서 성공적으로 산자를 생산하였다는 보고는 없는 실정이다. 이것은 현재 핵치환에 사용되고 있는 난모세포의 활성화 기법과 세포융합기법, 핵치환에 관련된 제반기술들의

복잡성 및 핵치환 조작배의 배양체계가 아직 확립되어 있지 않은 결과이다. 따라서 성공적인 핵치환에 의한 산자의 생산을 위해서는 현재 난모세포의 활성화에 이용되고 있는 전기자극에 의한 세포융합법을 이용하여 먼저 자연적인 체내 및 체외수정에서 정자가 난자에 침입하는 것과 같은 정도의 난자 활성화를 유도하는 것이 필수적이다. 따라서 정상적인 체외발생능을 가질 수 있도록 난모세포가 활성화되면 주입된 공여핵이 세포질과 융합된 후, 세포질 속으로 도입된 공여핵은 세포융합 바로 직후에 MPF(maturation promoting factor)의 활성화를 위한 핵치환 배의 활성화가 유도됨으로써, 핵의 형태학적, 기능적인 변화 즉 핵의 remodeling 과정과 핵의 reprogramming 과정을 경험하게 되고, 핵치환 배는 1-세포기 수정란의 핵과 같이 전능성을 가진 정상적인 핵으로서 개체로의 발생능을 가지게 된다(Stice와 Robl, 1988; Collas 등, 1991, 1992a, b). 그러나 핵치환배의 활성화가 일어나지 않는다면, 핵치환배의 발생은 지속되지 않고, 발생을 정지하게 된다(Uehara 등, 1976; Komar, 1982; Stice 등, 1988; Prather와 First, 1990; Henery와 Kaufman, 1993). 그러므로 핵치환에 앞서 정상적인 발생능을 가진 활성화된 난모세포를 확보하는 것이 핵치환 연구를 위해 무엇보다도 중요하다. 한편으로는 전기자극에 의한 세포융합 기법을 활용할 때, 공여핵이 전기자극에 공시되어도 그 발생능에는 아무런 영향을 받지 않고, 또 같은 범위에서 난모세포도 활성화 시킬 수 있는 방법이 개발되어야만 연구자들이 추구하는 목적을

달성할 수 있게 된다. 따라서 이러한 문제는 인위적으로 적절하게 전기자극의 강도, 지속시간, 통전회수 및 핵치환 배의 체외배양체계를 구축하면 정상적인 공여 핵의 생존성 및 난모세포의 활성화를 유도할 수 있는 적절한 방법을 확립할 수 있게 된다(Witkowska, 1973; Kaufman 등, 1975; Collas 등, 1989).

이에 본 연구에서는 핵치환을 위한 기초연구로서, 돼지의 4-세포기 분할구의 전기자극후 체외발생능과 난모세포의 활성화에 필요한 최적의 전기융합 조건 즉 전장의 강도, 통전지속시간, 통전회수 및 세포융합용 배양액에서의 배양조건 등을 구명하기 위하여 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 배양액

본 연구에 사용된 기초배양액은 Table 1에 제시된 Beltsville Embryo Culture Medium (BECM)이었다.

먼저 난자의 회수를 위한 관류 및 전기자극 처리된 난자의 배양을 위한 배양액은 상술한 기초배양액을 사

용하였고, 회수된 난모세포의 난구세포를 제거하는 데에는 기초배양액에 1mg/ml의 hyaluronidase를 첨가하여 사용하였다. 또한 4-세포기 분할구의 분리를 위해서는 Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 을 제거한 기초배양액을 사용하였고, 투명대의 제거를 위한 배양액은 acidified tyrode's 용액(pH 2.5)을 사용하였다. 그리고 전기자극에 의한 수정란의 할구융합과 난모세포의 활성화를 위한 전기자극을 위해서 사용된 용액은 0.05M $CaCl_2$ 와 0.1mM $MgSO_4$ 가 첨가된 0.3M sucrose 용액을 사용하였다. 그리고 배반포기까지 발달한 분할구의 핵을 관찰하기 위하여 기초배양액에 1mg/ml의 Hoechst 33342를 첨가하여 사용하였다.

이들 모든 배양액의 pH는 7.2~7.4, 삼투압은 280~290mOsm.로 조정하였고, 사용직전에 0.2 혹은 0.4 μ m의 millipore filter(German Science Inc., U. S. A.)를 사용하여 여과, 제균한 다음, 소량으로 분주하여 4℃의 냉장고에서 보관하면서 사용하였다.

한편 배양조건은 38.5℃, 공기조건하의 배양기에서 수정란의 경우 96시간, 난모세포의 활성화 경우에는 24시간 동안 배양하면서 배의 발달상태를 24시간 간격으로 관찰하였다.

Table 1. Composition of Beltsville Embryo Culture Medium(BECM)

Constituents	M. W.	mM	g /liter
Na lactate syrup(60%)	112.10	19.3	3.6ml
Ca lactate · 5H ₂ O	308.30	2.14	0.66
NaCl	58.44	90.0	5.26
KCl	74.55	4.83	0.36
MgCl ₂ · 6H ₂ O	203.30	0.54	0.11
NaHCO ₃	84.01	2.14	0.18
Hepes(freed acid)	238.30	10.91	2.6
Glucose	180.20	0.55	0.1
Mannitol	182.2	11.0	2.0
L-Glutamine	146.1	1.0	0.15
Taurine	125.1	7.0	0.88
Na pyruvate	110.0	0.27	0.03
EDTA	372.24	0.08	0.03
Phenol red	376.40		0.01
Gentamycin sulfate			0.05
BSA			10.0

2. 과배란처리 및 난자의 회수

난자를 회수하기 위하여 발정주기 14일 혹은 15일째에 1,200~1,500IU의 PMSG(Intervet America Inc., Holland)와 10mg의 Lutalyse를 근육주사한 후, 77~83시간째에 hCG(Intervet America Inc., Holland)를 처리함으로써 과배란을 유도하였다. 먼저 난자의 활성화 실험을 위한 미수정란은 hCG처리 후, 45~47시간째에 laparotomy에 의해서나 혹은 도축한 다음, 그들의 난관으로부터 배란된 난모세포를 관류액인 BECM(Beltsville Embryo Culture Medium)으로 관류하여 회수하였고, 전기자극에 의한 4-세포기 분할구의 체외발생능을 조사하기 위한 4-세포기 수정란은 PMSG, Lutalyse 및 hCG를 처리하지 않은 돼지에서 자연발정 개시 후, 자연교미 혹은 인공수정을 실시하고난 4일째에 laparotomy에 의해서나 혹은 도축한 다음, 그들의 난관으로부터 4-세포기 수정란을 BECM으로 관류하여 회수하였다.

3. 4-세포기 분할구의 체외 생존성에 미치는 전기자극의 효과

1) 4-세포기 분할구의 준비

Laparotomy 혹은 도축된 돼지의 난관에서 회수한 4-세포기 수정란은 투명대를 제거하기 위하여 형태학적으로 정상적인 것만을 선별하여 acidified tyrode's 용액(pH 2.5)으로 투명대를 제거한 다음, 신선한 BECM으로 3회 세척하였다. 투명대가 제거된 4-세포기 수정란은 그들의 개개의 할구를 분리하기 위하여 Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 이 함유되어 있지 않은 BECM에서 20분 동안 배양하여 세포와 세포의 결합력을 약화시킨 다음, mouth pipette으로 반복적인 pipetting을 실시하여 개개의 할구들을 분리하였다. 분리된 개개의 할구는 신선한 BECM에서 3회 세척하여 20 μ l의 배양액 소적(BECM)으로 옮긴 후, 사용할 때까지 38.5 $^{\circ}C$, 습도가 포화상태인 배양기에서 배양하였다.

2) 빈 투명대의 준비

개개의 할구가 전기자극을 받을 때, 할구가 양전극의 어느 한쪽에 붙어서 할구가 소실되는 것을 막고, 또한 핵치환시의 할구와 세포질 융합시의 조건과 유사한 조건을 부여하기 위하여 세포질이 제거된 투명대에 각각의 할구를 주입하여 전기자극 처리를 실시하였다.

먼저 전기자극 처리를 실시하기 전에 모든 개개의 4-세포기 수정란의 할구 각각은 미세조작기(Narishige Co., Japan)를 사용하여 미리 준비된 빈투명대 속으로 주입하였다. 이때 사용된 빈 투명대는 도살된 돼지의 난소에 존재하는 난포에서 난자를 회수하거나 혹은 난소 자체를 잘게 세절하여 난포속에 있는 미수정란을 회수하였다. 회수된 난자는 1mg/ml의 hyaluronidase(sigma)가 함유된 centrifuge vial에 옮겨서 3분 동안 vortex mixer를 사용하여 난자의 주위에 붙어 있는 대다수의 난구세포와 방사관세포를 제거하였다. 그리고 완전히 제거되지 않은 세포들은 mouth pipette을 사용하여 완전히 제거한 다음, 신선한 BECM에서 3회 세척하였다. 난구세포와 방사관세포가 제거된 난자는 7.5 μ g/ml의 cytochalasin B가 첨가된 50 μ l의 미세조작용 배양액으로 옮긴 다음, 고정용 pipette으로 난자를 고정하고 33 μ m의 핵적출용 피

펫으로 세포질을 제거하였다. 이렇게 준비된 빈투명대는 신선한 BECM에서 수회 세척한 다음, 20 μ l의 배양액 소적(BECM)으로 옮긴 후, 사용할 때까지 38.5 $^{\circ}C$, 습도가 포화상태인 배양기에서 배양하였다.

3) 빈 투명대 속으로 분리된 개개의 할구를 주입하기 위한 미세조작

개개의 할구를 투명대 속에 주입하는데 필요한 기기는 Hoffman Modulation Contrast가 장착된 Nikon Diaphot Inverted Microscope(Nikon Inc., Garden City, NY)에 Narishige micromanipulator (Medical Systems Co., Great Neck, NY)를 부착하여 사용하였다.

먼저 상술한 바와 같이 미리 준비된 개개의 4-세포기 할구들과 빈 투명대를 미세조작을 수행하기 전에 7.5 μ g/ml의 cytochalasin B가 첨가된 BECM 50 μ l의 소적에 옮긴 다음, 5분동안 배양하였다. 배양후 고정피펫을 사용하여 빈투명대를 고정한 다음, 할구 각각을 50 μ m의 주입용 피펫을 사용하여 투명대 속으로 할구를 주입하였다. 이때 할구의 주입방향은 빈 투명대를 준비하기 위하여 세포질을 제거할 때 생긴 구멍을 통하여 할구를 주입하였다. 할구의 주입이 완료된 투명대는 신선한 배양액 소적으로 옮겨 수회 반복하여 세척한 후, 전기자극에 공여할 때까지 38.5 $^{\circ}C$ 의 습도가 포화상태인 배양기에서 배양하였다.

4) 할구에 대한 전기자극

빈 투명대 속으로 주입된 4-세포기 할구에 대한 전기처리에는 BTX Optimizer(r)-Graphic Analyzer가 결합된 BTX Electro Cell Manipulator 200를 사용하였으며, Fusion Chamber는 두 전극 사이의 거리가 약 1mm인 것을 사용하였다.

할구에 대한 전기자극은 통전전압 100, 120, 150 및 180V에서 각각 통전지속시간 30 μ s, 통전회수는 1회로 고정하였으며, 전기자극 후, 각각의 할구는 0.3M sucrose 용액에서 5분동안 배양하였다. 그리고 배양후 전기처리된 할구는 신선한 배양액으로 옮겨 3회 세척한 다음 배양액 소적(30 μ l)에서 배양하였다.

5) 전기자극 처리된 4-세포기 분할구의 배양

전기자극을 받은 각각의 4-세포기 분할구는 배양용

배양액 소적(10~20 μ l)에서 72시간동안 38.5 $^{\circ}$ C, 습도가 포화상태인 배양기에서 배양하면서 24시간 간격으로 배의 발생율을 조사하였다. 그리고 전기자극 처리된 난모세포의 경우도 신선한 배양액으로 3회 세척한 다음, 배양용 배양액 소적(10~20 μ l)에서 24시간 동안 배양하여 난자의 활성화 여부를 염색을 통하여 핵상을 관찰하거나 배의 난할율로 조사하였다.

4. 배양된 난자의 염색과 결과의 판정

전기자극을 받은 4-세포기 분할구를 72시간 동안 배양 후, 배반포 단계까지 발달한 난자의 정상성 여부를 확인할 목적으로 20 μ g/ml의 Hoechst 33342로 5~10분간 37 $^{\circ}$ C에서 염색한 다음, 형광현미경하에서 배반포의 핵의 수를 조사하였고, 한편으로는 전기자극 처리된 난모세포의 활성화의 여부를 조사할 목적으로 난모세포에 전기자극을 가한 후, 24시간동안 난자를 배양하여 위상차 현미경하에서 관찰하고, 활성화의 여부는 20 μ g/ml의 Hoechst 33342와 aceto-orcein 염색을 실시하여 핵상을 판정하여 활성화를 조사하였다.

전기자극 처리된 난모세포는 핵의 상태에 따라 Meta. II, Ana. II, Telo. II 및 Pronucleus 단계로 구분하였으며, Meta. II의 핵상을 가진 난자는 활성화가 유도되지 않은 난자로 판정하고, Ana. II, Telo. II 및 Pronucleus 단계의 핵상을 가진 난자는 활성화가 유도된 난자로 판정하였다.

5. 통계분석

수정란의 세포융합율과 배발생율 및 난모세포의 활성화 비율은 모두 χ^2 검정으로 통계처리를 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

돼지 4-세포기 분할구의 분리와 체외배양에 의한 분할구의 배 발생과 전기자극 처리된 난모세포의 활성화에 대한 결과는 다음과 같다.

1. 전기자극에 의한 돼지 난모세포의 활성화에 미치는 전압과 배양체계의 효과

난모세포의 활성화에 최적인 전기자극의 조건을 확립하기 위하여 통전전압은 100, 120, 150 및 180V로 조절하여 사용하였고, 통전 지속시간은 30 μ s, 통전횟

수는 1회로 고정하였으며, 전기자극후 sucrose 용액에서 적절한 시간동안 배양함으로써 전기자극에 의한 난모세포의 활성화 정도를 조사하여 그 결과를 Table 2에 제시하였다.

Table 2에서 보는 바와 같이, 사용된 통전 전압(100, 120, 150 및 180V)에 따라 전기자극 후 세포융합 배양액에서 배양하지 않은 구(대조구)와 30분 배양한 구 및 30분동안 세포융합 배양액에서 배양된 투명대에 구멍이 형성된 처리구(M)의 난모세포 활성화 비율은 먼저 100V 처리구에서 각각 38.7, 58.1 및 65.1%였고, 120V 처리구에서는 각각 45.8, 62.1 및 66.7%이며, 150V 처리구에서는 각각 46.8, 78.1 및 70.7%였고, 180V 처리구에서는 40.0, 87.5 및 91.7%였다. 이상의 결과에서 100V구와 120V구에서는 세포융합 배양액에서의 배양효과가 인정되지 않았으나, 150V와 180V 처리구에서는 난모세포의 활성화에 미치는 세포융합 배양액에서의 배양효과가 인정되었으며, 150V 보다는 180V 처리구의 성적이 양호하였다. 이러한 성적은 전기자극에 사용하는 통전전압의 강도가 증가할수록 난모세포의 활성화 비율도 증가하는 경향을 보였다. 그리고 전기융합 후 30분동안 세포융합 배양액에서 배양된 구와 투명대에 구멍이 형성된 구의 난모세포 활성화 비율은 사용된 전압이 같은 구간의 성적은 각 처리구마다 유의한 차이가 인정되지 않았으나, 통전전압을 증가시킬수록 통계학적으로 각 구에서 유의한 차이가 인정되었다. 즉 통전전압을 100, 120, 150 및 180V로 증가시켰을 때, 각 처리구의 대조구 사이에는 유의한 차이가 인정되지 않았으나, 전기자극 후 30분 동안 세포융합 배양액에서 배양된 구에서는 통전전압이 증가할수록 양호한 성적을 얻었다. 그리고 투명대에 구멍이 형성된 구에서도 같은 경향을 보였는데, 특히 이 구에서는 사용된 통전전압에 따라 다른 처리구보다도 훨씬 양호한 성적을 얻었으며, 180V에서는 97.1%의 난모세포 활성화를 얻음으로써 다른 구보다 고도의 유의한 차이가 인정되었다.

이와 같은 본 연구의 난자 활성화에 대한 성적은 Onodera와 Tsunoda(1989)가 생쥐에서 얻은 78%보다는 유사하거나 높은 성적이었으며, 토끼에서 Stice와 Robl(1988)이 배란 후 6시간동안 노화시켜 얻은 52%보다는 훨씬 양호한 성적이었으며, Collas 등(1989)의 32%, Didion 등(1990)이 85V, 30 μ sec에

Table 2. Effects of various voltage, manipulation of oocytes, and incubation times in fusion solution used to electrostimulation for artificial activation of porcine oocytes**

Voltage used	Treat	Incubation times in sucrose solution	No. of oocytes examined	No. of nuclei of activated oocytes					No. of unidentifed oocytes	No. of not activated	
				Total	All-TII	1PN	2PN	3~4PN			5~8PN
100V	I*	0 min	62	^a 24(38.7)	1(1.6)	8(12.9)	7(11.3)	2(3.2)	6(9.7)	4(6.5)	34(54.8)
	I	30 min	31	^{ab} 18(58.1) ^a	—	8(25.8)	7(22.6)	2(6.9)	1(3.2)	2(6.5)	11(35.5)
	M**	30 min	43	^b 28(65.1) ^A	2(4.7)	9(20.9)	13(30.02)	4(9.3)	—	1(2.3)	14(32.6)
120V	I	0 min	59	^a 27(45.8)	—	11(18.6)	9(15.3)	4(6.8)	3(5.1)	1(1.7)	31(52.5)
	I	30 min	29	^{ab} 18(62.1) ^a	1(3.4)	8(27.6)	5(17.2)	2(6.9)	2(6.9)	—	11(37.9)
	M	30 min	39	^b 26(66.7) ^A	—	9(23.1)	14(35.9)	3(7.7)	—	2(9.1)	11(28.2)
150V	I	0 min	62	^a 29(46.8)	—	12(19.4)	10(16.1)	4(6.5)	3(4.8)	2(3.2)	31(50.0)
	I	30 min	32	^b 25(78.1) ^{ab}	—	7(21.9)	12(37.5)	3(9.4)	3(9.4)	—	7(21.9)
	M	30 min	41	^b 29(70.7) ^A	—	10(24.4)	16(39.0)	2(4.9)	1(2.4)	4(9.8)	8(19.5)
180V	I	0 min	69	^a 29(40.0)	1(1.4)	16(23.2)	11(15.9)	1(1.4)	—	1(1.4)	39(56.5)
	I	30 min	32	^b 28(87.5) ^b	—	13(40.6)	9(28.1)	3(9.4)	3(9.4)	—	4(12.5)
	M	30 min	36	^b 33(91.7) ^B	1(2.8)	3(8.3)	18(50.0)	8(22.2)	3(8.3)	—	3(8.3)

* Intact oocytes.

** Manipulated oocytes that zona was punctured by 50 μ m enucleation pipette in 0.3M sucrose solution before electrostimulation.

1. The setting for electrostimulation was fixed : align 5, time 5sec, pulse 30 μ sec, pulse 1, and voltage 100, 120, 150, and 180V, respectively.

2. All oocytes after electrostimulation were cultured in BECM for 24 hrs, and then stained 1% aceto-orcein stains.

^{ABab} : Within each column, values with different superscripts between groups are significantly different. (P<0.05)

서 얻은 30%보다는 상당히 높은 성적이었다.

Collas 등(1989)과 Henery 등(1993)은 난모세포의 전기적 활성화에서 이러한 차이가 발생하는 원인은 전기자극에 사용되는 전압의 강도, 통전시간, 통전회수, 난자의 노화정도 및 배양액의 차이에 기인하는 것이라고 보고하였으며, Kaufman(1973)과 Webb 등(1986)은 배란과 난모세포의 활성화 사이의 최적시간은 20시간이라고 보고한 바 있다. 따라서 난자의 노화는 보다 쉽게 난자를 활성화시킬 수 있다. 그러나 hCG 주사후 25시간째에 전기자극에 의해 난자가 활성화될 때, 난자의 파편화 비율은 더욱 높아지게 되며, 그의 발생능도 저하된다(Austin, 1961; Kaufman, 1978; Collas 등, 1989). 그러므로 본 연구의 성적이 다른 연구자들에 비해 양호한 성적을 얻은 이유는 본 연구에 사용된 체내성숙 돼지 난모세포의 경우 발정후 45시간 정도 경과한 난모세포로서 아직 노화가 진행되지 않은 신선한 난자에서 얻은 성적이었다. 따라서 적절한 연령의 난모세포를 난자의 활성화에 공여하는 것이 무엇보다도 중요하다는 것을 알 수 있었다. 그리고 난모세포의 활성화를 위한 최적의 전기자극 조건은 통전전압을 180V로 결정하고, 전기자극시 투명대에 약 30~50 μ m 정도의 구멍이 형성된 난모세포를 사용하고, 통전 후에는 세포융합용 배양액에서 약 30분 정도 배양하는 것이 난모세포의 활성화 효율을 높일 수 있는 유효한 방법이라고 생각한다. 따라서 향후 난모세포의 활성화를 위한 본 실험에서는 본 Table 2에서 얻은 결과를 중심으로 수행할 예정이다.

2. 난모세포의 활성화에 미치는 zona puncture의 효과

Table 2의 결과, 난모세포의 활성화 비율을 향상시킨 것이 zona puncture의 효과인지 그렇지 않으면 전기자극 후 세포융합용 배양액에서의 배양효과 때문인지를 조사하기 위하여 zona puncture의 유무, 전기자극의 유무 그리고 세포배양용 배양액에서의 배양 유무가 난모세포의 활성화에 미치는 영향을 조사하였다(Table 3). 이때 사용된 통전전압은 180V, 통전지속시간 30 μ s, 통전횟수는 1회로 고정하여 사용하였다.

Table 3에서 보는 바와 같이, zona puncture의 유무, 전기자극의 유무 그리고 세포배양용 배양액에서의 배양 유무에 따른 난모세포의 활성화 비율은 zona

puncture의 유무와 세포융합용 배양액에서의 배양 유무에 관계없이 전기적 자극이 가해지지 않은 구에서는 난모세포의 활성이 유도된 구는 관찰되지 않았다. 그러나 전기자극(180V)이 가해진 구에서는 처리구에 관계없이 모든 구에서 100% 난모세포의 활성이 관찰되었다. 난모세포에 별다른 처리없이 180V의 전기자극을 가했을 때 55%의 난모세포가 활성이 유도되었고, 전기자극후 30분동안 세포융합용 배양액에서 배양된 난모세포에서는 85.7%로 상당히 높은 성적을 얻었다. 이러한 결과는 전기자극후 세포융합용 배양액에서 적절한 시간동안 세포를 배양하는 것이 난모세포의 활성화 효율을 높일 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 zona puncture 처리를 받은 난모세포에 전기자극을 가한 후 세포융합용 배양액에서 난자를 배양하지 않은 구의 난모세포 활성화 비율은 90.5%였고, 세포융합용 배양액에서 30분동안 배양된 구에서는 95.5%로서 zona puncture 처리를 수행한 구가 그렇지 않은 구보다 유의하게 높은 성적을 나타내었다.

이와 같은 본 연구의 결과는 전기자극에 의한 인위적인 난자의 활성화 후 난자의 난할율이 67%, ethanol에서 45%의 난할이 이루어지고, 최대 9~12%의 배반포로의 발생율을 보고한 Saito 등(1993)과 체외에서 성숙한 돼지의 난모세포가 전기자극을 위한 세포융합용 배양액에서 배양될 때, protein phosphatase type 1a와 2b의 특이적인 억제제인 okadaic acid가 89%까지 돼지 난모세포의 단위발생을 유도하였다고 보고한 Rickords 등(1993)의 성적보다는, 본 연구에서 180V에서 zona를 puncture하고 전기자극 처리한 모든 구에서 높은 성적을 나타내었다. 그러나 본 연구의 결과는 난자의 활성화 처리후 난할율을 관찰한 것이 아니라 염색후 핵을 관찰한 성적이었기 때문에 이들의 성적과 직접적으로 비교할 수는 없으나, 본 연구에서 사용된 난모세포의 활성화 방법이 유난자의 활성화 비율을 높일 수 있는 유효한 방법이라고 생각된다. 그리고 cytochalasin B에 의해 자극된 약 10%의 소난모세포가 배반포기까지 발달했다고 보고(Fukui 등, 1992)하였다.

본 연구에서 높은 난자의 활성화를 얻을 수 있었던 zona puncture 처리를 수행할 때, 대다수의 모든 난모세포들은 활성화가 유도된다는 것을 알 수 있었고, 특히 난모세포의 활성화에 따른 작은 핵들이 zona pu-

Table 3. Effects of zona puncture, electrostimulation, and incubation time in sucrose solution for artificial activation of porcine oocytes

Zona puncture	Electro-stimulation	Incubation times in sucrose	No. of oocytes examined	No. of nuclei of oocytes activated					No. of not activated	
				Total	AII-TII	1PN	2PN	3~4PN		5~8PN
-	-	-	20	-a	-	-	-	-	-	20(100)
-	-	30MIN	20	-a	-	-	-	-	-	20(100)
+	-	-	21	-a	-	-	-	-	-	21(100)
+	-	30MIN	20	-a	-	-	-	-	-	20(100)
-	+	-	20	11(55.0) ^b	-	9(45.0)	2(10.0)	-	-	9(45.0)
-	+	30MIN	21	18(85.7) ^c	-	8(38.1)	6(28.6)	2(9.5)	2(9.5)	3(14.3)
+	+	-	21	19(90.5) ^c	-	6(28.6)	12(57.1)	-	1(4.8)	2(9.5)
+	+	30MIN	21	21(95.5) ^d	3(13.6)	4(18.2)	9(40.9)	4(18.2)	1(4.5)	1(4.5)

* Micromanipulation for zona puncture of oocytes prior to electrostimulation were carried out in 0.3M sucrose solution supplemented to 7.5µg/ml cytochalasin B.

* All electrostimulated-oocytes were applied with a DC pulse of 180 volts during 30µsec pulse 1.

* All oocytes that manipulation had finished were cultured for 24hr in 20µl drops of BECM.

* Oocytes were stained with 1% aceto-orcein stained after of culture.

^{abcd} : Values within columns with different superscripts are significantly different (P<0.05).

ncture 처리의 유무에 관계없이 다수 관찰되었다. 따라서 핵치환과 동일한 조건에서 본 연구의 Table 3에서 얻어진 결과로 생각할 때, 활성화된 난모세포가 배반포기까지의 정상적인 발생능을 가지고 있는지에 대해서는 본 연구에서는 활성화 후 24시간 동안만 배양하여 염색하였기 때문에 정확히 알 수 없으나 정상적인 2개의 전핵만을 가진 활성화된 난모세포의 비율을 생각할 때, zona puncture 처리를 하지 않은 구에서는 처리에 따라 각각 10와 28.6%였으나 zona puncture 처리를 받은 구에서는 57.1와 40.9%로서 zona puncture 처리된 구에서 유의하게 높은 성적을 나타냄으로써, zona puncture 처리가 난모세포의 활성화를 증가시키는 한가지 요인이라는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구의 결과 난모세포의 활성화 효율을 증가시키기 위해서는 통전지속시간을 $30\mu\text{s}$ 로 통전횟수를 1회로 고정할 때, 통전전압을 180V로 사용하는 것이 효과적이며, 이때 zona puncture 처리 혹은 전기자극 후 세포융합용 배양액에서 적절한 시간동안 배양하는 것을 병용하거나 각각 사용하는 것이 난모세포의 활성화 비율을 높일 수 있는 유효한 방법이라고 사료된다. 그러나 보다 많은 정상적인 발생능을 가진 난모세포의 활성화 방법은 zona puncture 처리된 난모세포에 전기자극을 가한 다음, 세포융합용 배양액에서 배양하지 않고, 신선한 배양액에서 3회 세척하여 바로 배양에 공시하는 것이 효과적이라고 생각된다.

3. 전기자극 후 4-세포기 분할구의 체외발생능에 미치는 세포융합용 배양액에서의 배양효과

분리된 4-세포기 분할구에 전기자극을 가한 다음, 세포융합용 배양액에서의 배양효과를 조사하기 위하여 전기자극 방법은 난모세포의 활성화 실험에서 결정된 통전전압 180V, 통전지속시간을 $30\mu\text{s}$, 통전횟수를 1회로 고정하여 사용하였고, 대조구로서 전기자극을 가하지 않은 구와 일반적으로 전기융합시 주로 사용되고 있는 통전전압 120V를 사용하였으며, 전기자극 후, 0, 15 및 30분동안 전기처리된 분할구를 각각 세포융합용 배양액에서 배양한 다음, 신선한 배양액에서 3회 세척하여 체외발생능을 조사한 결과를 Table 4에 제시하였다.

Table 4에서 보는 바와 같이 전기자극을 가하지 않고 세포융합용 배양액에서 배양하지 않은 대조구에서

는 시험된 40개의 분할구 중에서 32개가 배반포로 발달하여 평균 80.0%의 성적이었고, 전기처리는 하지 않고 세포융합용 배양액에서 30분동안 배양된 분할구는 41개중에서 34개가 배반포로 발달하여 평균 82.9%의 양호한 성적을 나타내어 두 대조구 사이에는 유의한 차이가 인정되지 않았으나 세포융합용 배양액에서 배양된 구의 성적이 다소 양호한 성적을 나타내었다. 그리고 120V의 전기처리를 받고 배양된 분할구는 42개중에서 32개가 배반포로 발달하여 평균 76.2%의 성적을 나타내었고, 180V의 전압이 처리된 후 세포융합용 배양액에서 0분 배양된 분할구의 배반포로의 체외 발생능은 공시된 40개 중에서 29개가 발달하여 72.5%의 성적이었고, 15 및 30분동안 세포융합용 배양액에서 배양된 분할구의 발생능은 각각 59%(23/39) 및 51.2%(21/41)로 대체로 전 구에서 양호한 체외발생율을 얻었다. 이와 같은 성적은 전기자극 후 세포융합용 배양액에서 각각 15분과 30분 배양된 두 구에서는 유의한 차이가 인정되지 않았으나 이 두 구와 세포융합용 배양액에서 배양하지 않은 구와 비교할 때, 전기자극 후 세포융합용 배양액에서 배양하지 않은 구가 15분과 30분 동안 각각 배양된 구보다 유의하게 높은 성적을 보였다. 그리고 전기처리가 되지 않은 두 대조구에서 가장 높은 체외발생율을 얻었고, 그 다음이 세포융합용 배양액에서 배양되지 않은 120V 전기처리구 및 180V 전기처리구의 순으로 성적이 높았다. 그러나 전기자극을 가하지 않은 두 대조구와 120V와 180V에서 전기처리 후 세포융합용 배양액에서 배양하지 않은 구들 간에는 서로 유의한 차이가 인정되지 않았다. 따라서 이들 4가지 시험구와 180V에서 전기처리된 후 세포융합용 배양액에서 15분과 30분동안 배양된 시험구들 간에는 서로 유의한 차이가 인정되었다.

본 연구에서 얻은 분할구의 체외발생능은 Menino와 Wright(1983)의 성적 4~13와 40~50%의 발생율을 보고한 Saito 등(1991) 및 Saito와 Niemann(1991)의 성적보다는 월등히 높은 성적이었다. 이와 같은 성적의 차이는 사용되는 배양액과 배양조건의 상이한 차이에 기인하며, 특히 본 연구에서 사용한 배양 조건은 다른 연구자들과는 달리 탄산가스를 사용하지 않고 배양하는 것이었다. 따라서 분할구의 배양에 사용된 본 연구의 배양액과 배양조건이 다른 연구자들의 것보다 훨씬 양호한 성적을 얻을 수 있는 조건이었다

Table 4. Effects of incubation times in sucrose solution on *in vitro* developmental ability after electrostimulation of single 4-cell blastomeres

Electrostimulation	Incubation time in sucrose solution	No. of BM. examined	No. of blastomeres developed to:			Cell no. of blastocyst
			Total	Molura	Blastocyst	
—	—	40	33(82.5)	1(2.5)	32(80.0) ^a	10.0±3.2
—	30min	41	36(87.8)	2(4.9)	34(82.9) ^a	9.9±3.0
120V	0min	42	35(83.3)	3(7.1)	32(76.2) ^a	10.8±3.3
180V	0min	40	34(85.0)	5(12.5)	29(72.5) ^a	8.8±2.7
180V	15min	39	30(76.9)	7(17.9)	23(59.0) ^b	7.9±2.5
180V	30min	41	30(73.2)	9(22.0)	21(51.2) ^b	8.3±2.0

1. The setting for electrostimulation was fixed: alignes, time 5sec., pulse width 30 μ sec., pulse 1, and voltage 120, and 180V, respectively.
2. All blastomere after electrostimulation were cultured in BECM for 96hrs, and then with 1% acto-orcein stain-s fluorescent dye(Hoechst33342).

^{ABab} : Within each column, values with different superscripts between treatment group are significantly different (p<0.05).

고 생각한다.

한편, 배반포기까지 발생된 4-세포기 분할구의 핵의 수를 조사한 결과, 세포융합용 배양액에서 각각 0, 15, 및 30분동안 배양하였을 때, 세포수는 각각 8.8, 7.9 및 8.3개로 각 구간에는 유의한 차이가 인정되지 않았으나 대조구의 10개와 120V의 10.8개보다는 떨어지는 성적이었다. 이러한 결과는 사용되는 전압이 높을수록 세포수는 감소하는 경향을 보이고 세포의 핵의 크기는 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 이러한 현상이 핵치환시 발생하는 생식체중이 큰 개체와 기형의 발생 원인인지는 아직 알 수 없다.

이상의 본 연구의 결과를 고찰하여 볼 때, 120V에서나 혹은 180V에서 전기처리된 분할구가 배반포로 발생하는 비율에 있어서 본 연구에서 사용된 통전전압의 범위내에서는 유의한 차이가 없고, 전기자극 후 세포융합용 배양액에서 배양하지 않고 바로 신선한 배양액으로 세척하여 체외배양에 공여하는 것이 전기처리된 4-세포기 분할구의 배반포로의 체외발생의 효율을 높일 수 있는 유용한 방법이라고 사료된다.

이상의 본 연구에서 난모세포의 활성화를 위한 최적의 방법과 전기처리된 분할구의 체외발생의 효율을 높일 수 있는 최적의 방법을 생각할 때, 통전전압은 180V, 통전지속시간은 30 μ s, 통전횟수는 1회로 결정하고, 정상적인 배발생을 위해서는 세포융합용 배양액에서 배양을 하지 않고 바로 체외발생에 공여하는 것이 바

람직하다고 생각한다. 따라서 본 연구에서 얻은 이러한 기본적인 결과를 핵치환 기술에 도입하여 향후 돼지 난자의 핵치환 연구를 수행할 예정이다.

IV. 적 요

본 연구는 돼지의 4-세포기 분할구와 미수정란을 이용하여 핵치환시 세포융합과 난자의 활성화에 적용할 최적의 전기자극 방법과 체외발생을 얻는데 필요한 실험조건을 설정하기 위하여 실시하였다. 먼저 난자의 활성화에 제공되는 미수정란은 전기자극 처리전에 0.3M sucrose 용액(세포융합용 배양액)에서 5~10분간 평형을 실시한 다음, 30 μ s동안 100, 120, 150 및 180V의 직류전압에서 1회 통전처리하였으며, 한편으로는 전기처리된 분할구의 체외발생에 미치는 세포융합용 배양액에서의 배양 효과를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 미수정란을 각각 다른 전압으로 전기자극을 유도하였을 때, 모든 처리구에서 난자의 활성화가 일어났으며, 사용된 통전 전압(100, 120, 150 및 180V)에 따라 전기자극 후, 30분동안 세포융합용 배양액에서 배양된 투명대에 구멍이 형성된 처리구(M)의 난모세포 활성화 비율이 각각 65.1, 66.7, 70.7 및 91.7%로 대조구와 다른 처리구에 비해 유의하게 양호한 성적을 얻었으며, 특히

180V 처리구에서 가장 높은 성적을 얻었다.

2. 전기자극에 사용하는 통전전압의 강도가 증가할수록 난모세포의 활성화 비율도 증가하는 경향을 보였는데 통전전압을 100, 120, 150 및 180V로 증가시켰을 때, 각 처리구의 대조구 사이에는 유의한 차이가 인정되지 않았으나, 전기자극후 30분동안 세포융합용 배양액에서 배양된 구에서는 통전전압이 증가할수록 유의하게 양호한 성적을 얻었다. 그리고 투명대에 구멍이 형성된 구에서도 같은 경향을 보였다.
3. Zona puncture 처리를 받은 난모세포에 전기자극을 가한 후 세포융합용 배양액에서 난자를 배양하지 않은 구의 난모세포 활성화 비율은 90.5%였고, 세포융합용 배양액에서 30분동안 배양된 구에서는 95.5%로서 zona puncture 처리를 수행한 구가 그렇지 않은 구보다 유의하게 높은 성적을 나타내었다.
4. Zona puncture 처리를 수행할 때, 대다수의 모든 난모세포들이 높은 비율로 활성화가 유도된다는 것을 알 수 있었고, 특히 난모세포의 활성화에 따른 작은 핵들이 zona puncture 처리의 유무에 관계없이 다수 관찰되었다.
5. 시험된 4-세포기 분할구가 배반포기까지 발생하는 비율은 먼저 전기자극을 가하지 않고 세포융합용 배양액에서 배양하지 않은 대조구에서는 평균 80.0%(32/40)이었고, 180V의 전기자극을 가한 후에 세포융합용 배양액에서 각각 0, 15 및 30분동안 배양한 다음, 배반포기까지의 체외발생능은 각각 72.5%(29/40), 59%(23/39) 및 51.2%(21/41)로 전기자극 후 세포융합용 배양액에서 배양하지 않은 구의 체외발생율이 가장 높은 성적을 보였다.

본 연구에서 얻어진 난모세포의 활성화와 4-세포기 분할구의 체외발생에 미치는 전기자극의 효과에 관한 결과를 종합하여 볼 때, 핵치환시 적용할 수 있는 최적의 전기자극 조건과 핵치환배의 배양 조건은 통전지속시간을 30 μ s로 통전횟수를 1회로 고정하고 통전전압을 180V로 사용하는 것이 효과적이며, 보다 많은 정상적인 체외발생능을 가진 난자의 조작 방법은 zona puncture 처리된 난모세포에 전기자극을 가한 다음, 세포융합용 배양액에서 배양하지 않고, 신선한 배양액

에서 3회 세척하여 바로 배양에 공시하는 것이 핵치환 실험을 위한 최적의 조건이라고 생각된다.

V. 인용문헌

1. Collas, P., J. J. Balise, G. A. Hofmann and J. M. Robl. 1989. Electrical activation of mouse oocytes. *Theriogenology*, 32:835-844.
2. Collas, P. and J. M. Robl. 1991. Relationship between nuclear remodeling and development in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 45:455-465.
3. Collas, P., Clara Pinto-Correia, F. Abel Ponce De Leon and J. M. Robl. 1992. Effect of donor cell cycle stage on chromatin and spindle morphology in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 46:501-511.
4. Collas, P., J. J. Balise and J. M. Robl. 1992. Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 46:492-500.
5. Didion, B. A., M. J. Martin and C. L. Markert. 1990. Parthenogenetic activation of mouse and pig oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 33:1165-1175.
6. Fukui, Y., K. Sawai, M. Furudate, N. Sato, Y. Iwazumi and K. Ohsaki. 1992. Parthenogenetic development of bovine oocytes treated with ethanol and cytochalasin B after *in vitro* maturation. *Mol. Reprod. Dev.*, 33:357-362.
7. Henery, C. C. and M. H. Kaufman. 1993. The incidence of aneuploidy after single pulse electroactivation of mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 34:299-307.
8. Kaufman, M. H. 1973. Parthenogenesis in the mouse. *Nature* 242:475-476.
9. Kaufman, M. H., E. Huberman and L. Sachs. 1975. Genetic control of haploid parthenogenetic development in mammalian embryos. *Nature*, 254:694-695.

10. Kaufman, M. H. 1978. The experimental production of mammalian parthenogenetic embryos. *In*: Daniel, J. C.(ed). Methods in mammalian reproduction, Academic press, New York, pp. 21-47.
11. Komar, A. 1982. Fertilization of parthenogenetically activated mouse egg: 1. Behaviour of sperm nuclei in the cytoplasm of parthenogenetically activated egg. *Exp. Cell Res.*, 139:361-367.
12. Menino A.R. and Wright R.W. 1983. Effect of pronase treatment, microdissection and zona pellucida removal on the development of porcine embryos and blastomeres *in vitro*. *Biol. reprod.* 28:433-446.
13. Onodera, M. and Y. Tsunoda. 1989. Parthenogenetic activation of mouse and rabbit eggs by electric stimulation *in vitro*. *Gamete Res.*, 22:277-283.
14. Prather, R. S., F. L. Barnes, M. M. Sims, J. M. Robl, W. H. Eyestone and N. F. First. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryo : assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.*, 37:859-866.
15. Prather, R. S. and N. L. First. 1990. Cloning of embryos. *J. Reprod. Fert.*, Suppl. 40:227-234.
16. Rickords L. F., M. S. Peters, R. A. Schoenback, T. T. Stumpf and R. S. Prather. 1993. Okadaic acid increases rate of activation of electrically activated *in vitro* matured porcine oocytes. *Theriogenology*. 39:296(Abstract).
17. Robl, J. M., B. Gilligan, E. S. Critser and N. L. First. 1986. Nuclear transplantation in mouse embryos : Assessment of recipient cell stage. *Biol. Reprod.*,34:733-739.
18. Robl, J. M., R. Fissore, P. Collas and R. T. DUBY. 1992. Cell fusion and oocyte activation. *In* G. E. Seidel(ed) : "Proc. Symb. Cloning Mammalian Embryos". Jan. Fort Collins, pp. 24-25. Sowers(eds). Handbook of Electroporation and Electrofusion, Academic Press, San Diego.
19. Saito S. and H. NiemannH. 1991. Effects of extracellular matrices and growth factors on the development of isolated porcine blastomeres. *Biol. Reprod.* 44:927-936.
20. Saito, S., P. Nienhaus and H. Niemann. 1991. Developmental ability of bisected and aggregated porcine embryos *in vitro*. *Theriogenology*. 35:267(Abstract).
21. Saito, S., Y. H. Choi and N. Oguri. 1993. The parthenogenetic development of porcine oocytes matured *in vitro* after electrical, ionophore A and ethanol stimulation. *Theriogenology*. 39:303(Abstract).
22. Stice, S. L. and J. M. Robl. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 39:657-664.
23. Surani, M. A. H., S. C. Barton and M. L. Norris. 1987. Experimental reconstruction of mouse eggs and embryos : An analysis of mammalian development. *Biol. Reprod.* 36:1-16.
24. Uehara, T. and R. Yanigimachi. 1976. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol. Reprod.*, 15:467-470.
25. Webb, M., S. Howlett and B. Maro. 1986. Parthenogenesis and cytoskeletal organization in aging mouse eggs. *J. Embryol. Exp. Morph.* 95:131-145.
26. Whittingham, D. G. 1980. Parthenogenesis in mammals. *Oxford Rev. Reprod. Biol.* 2:205-231.
27. Willadsen, S. M. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, 320:63-65.
28. Witkowska, A. 1973. Parthenogenetic development of mouse embryos *in vivo*. : I. Preimplantation development. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 30:519-545.