

ORIGINAL ARTICLE

## 랫드 배아 조작 효율 향상을 위한 배양 조건

이지민\*

서울대학교 수의과대학 실험동물의학교실

## Culture Conditions for Improving Manipulation Efficiency of Rat Embryo

Ji Min Lee\*

Department of Laboratory Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 08826, Korea

### Abstract

Rats are one of the most widely used animals in biomedical sciences because their metabolism and physiology are comparable to humans. In recent years, gene-targeted models have been developed using various animal species utilizing engineered nucleases such as clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated gene (Cas). It has recently become possible to efficiently transfect CRISPR/Cas into embryos via electroporation. However, electroporation can damage fertilized eggs; therefore, it is important to determine the optimal embryo culture conditions. A standardized approach for routine and reproducible rat transgenesis will render rat models more accessible for research. We performed experiments to obtain rat embryos with efficient superovulation and synchronization, and to investigate the appropriate medium conditions for pronuclear stage embryos subjected to electroporation stimulation for the introduction of engineered nuclease.

**Key words** : Rat, Embryo Manipulation, Superovulation, Culture efficiency, Electroporation

### 1. 서 론

랫드(Rat)는 고혈압, 암, 신경변성, 색소성 망막염, 사구체 경화증과 같은 다양한 인간 질병의 연구에 있어 매우 유용한 동물모델이다(Gordon et al., 2017; Homberg et al., 2017). 질병의 중요한 요인이 되는 350개 이상의 랫드 유전자가 밝혀져 있어, 질환 모델로서의 랫드의 가치가 증명되었다. (Szpirer, 2020). 많은 장점에도 불구하고 랫드 모델의 개발이 마우스(Mouse)에 비해 드문 이유로 랫드 배아의 투명도가 마우스보다

유연하고 미세주사 바늘로 타공하여 유전체를 주입하는 것이 어렵기 때문이다(Cozzi et al., 2009). 또한, 배아줄기세포주 확립과 같은 고전적인 유전자변형 동물 생산 기술이 랫드에서는 잘 재현되지 않는 것으로 보고되고 있다(Mashimo, 2014). 그러나 이와 같은 형질전환 동물 생산에 대한 문제는 최근에 개발된 Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated gene과 같은 유전자 편집 기술과 전기천공으로 배아를 타공하여 유전체를 도입하는 기술로 극복할 수 있게 되었다(Kaneko et

Received 12 March, 2023; Revised 20 March, 2023;

Accepted 21 March, 2023

\*Corresponding author : Ji Min Lee, Department of Laboratory Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 08826, Korea

Phone : +82-2-880-1182

E-mail : jmlee@snu.ac.kr

© The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.

© This is an Open-Access article distributed under the terms of the

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits

unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction

in any medium, provided the original work is properly cited.

본 논문은 2021년도 서울대학교의 박사 학위논문의 일부내용이 포함되어 있습니다.

**Table 1.** Comparison of LHRH and PMSG for estrus synchronization

Treat <sup>a</sup>	Injection Time <sup>b</sup>	No. of Animals examined	No.(%) of Mated Animals <sup>c, d</sup>
LHRH	- 4d 12:00	21	10(48)
PMSG	- 3d 12:00	21	19(95)*

<sup>a</sup> Females were treated with LHRH or PMSG to synchronize estrus and mated with males.

<sup>b</sup> The day of checking vaginal plug is regarded as day 0.

<sup>c</sup> Successful mating was considered when vaginal plug was found.

<sup>d</sup> Calculated from the number of animals examined.

\*, *P* 0.05 compared each other.

**Table 2.** Comparison of superovulation treatments in SD Rats

Treat <sup>a</sup>	Injection Time <sup>b</sup>	No. of Animal examined	No. of Mated Female <sup>c</sup>	No. of Total Embryo Collected
LHRH	- 4d 12:00	20	11	175
LHRH/HCG	- 4d 12:00 / -1d 12:00	20	11	224
PMSG/HCG	- 3d 12:00 / -1d 12:00	20	19 <sup>*, †</sup>	433 <sup>*, †</sup>
PMSG/HCG	- 3d 17:00 / -1d 17:00	20	13	261

<sup>a</sup> See Methods for description of superovulation methods

<sup>b</sup> The day of checking vaginal plug is regarded as day 0.

<sup>c</sup> Successful mating was considered when vaginal plug was found.

\**P* 0.05 compared to LHRH; †*P* 0.01 compared to LHRH/HCG; ‡*P* 0.01 compared to PMSG/HCG (early treatment).

al., 2014; Shao et al., 2017; Tesson et al., 2011). 다만, 투명대를 포함하여 배아 전체에 가해진 전기자극이 배아발생에 영향을 줄 수 있어, 이식 효율을 높이기 위한 배아의 배양 조건 연구가 필요하다. 또한, 랫드에서 과배란을 유도하기 위한 다양한 방법은 Pregnant Mare Serum Gonadotropin(PMSG)과 Human Chorionic Gonadotropin(HCG)의 주사, Folicle Stimulating Hormone(FSH)의 지속적인 주입, 그리고 Luteinizing Hormone Releasing Hormone(LHRH)의 주사 등이 있다(Corbin and McCabe, 2002; Filipiak and Saunders, 2006; Kito et al., 2010; Kon et al., 2014). 이러한 방법들은 동일한 결과를 나타내지 못하거나 많은 용량을 사용하는 것으로 확인이 되어 효율적이고 표준화된 기술확립을 위한 연구가 필요하다. 이처럼, 효율적인 배아의 확보와 배양 기술을 확립하는 것은 랫드 질환 모델의 생산성을 더 향상시켜 준다는 것을 의미한다. 따라서 본 연구에서는 유전자편집기술 적용을 위해 효율적인 랫드 난자의 과배란 및 배아의 배양 조건을 조사하였으며, 향후 랫드 질환모델 생산기술의 고도화에 기여할 것으로 기대한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 실험동물

모든 동물실험은 서울대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받고 위원회의 지침에 따라 수행하였다 (Approval number: SNU-140313-3). 실험에 사용된 랫드는 Sprague-Dawley(SD; Orientbio, Seoul, Korea)로 6주령 암컷과 9주령 수컷이 사용되었다. 실험조건 외의 사육환경은 모든 개체에게 동일하게 적용되었으며, 항온 22±1°C, 항습 55±5%를 유지하고 12시간 간격으로 명암주기를 일정하게 유지하였다. 랫드에게 멸균된 깔짚과 물, 사료를 제공하였고, 식이와 음수를 자유롭게 섭취하도록 하였다.

### 2.2. 발정동기화와 과배란 유도

발정동기화를 유도하기 위해 생후 6주령 SD 암컷 랫드를 2개 군(n=20)으로 나누어 교배 4일 전 25IU의 LHRH(Sigma, St. Louis, MO, USA) 또는 교배 3일 전 25IU의 PMSG(Sigma)를 정오에 투여하였다. 오후 5시에 9주령의 수컷과 합사하고 다음날 오전 9시에 암컷

**Table 3.** Comparison of Media for embryo developed to 2-cells

Medium	No. of Cultured Embryos <sup>a</sup>	No.(%) <sup>b</sup> of Embryos developed to 2-cells
M2	100	79 (79) <sup>†</sup>
M16	100	65 (65)
mR1ECM	100	90 (90) <sup>* †</sup>

<sup>a</sup> Embryos were examined at 20 h after cultured in each media.

<sup>b</sup> Calculated from the number of embryos examined.

<sup>\*</sup>P<0.01 compared to M2; <sup>†</sup>P<0.01 compared to M16; <sup>†</sup>P<0.001 compared to M16.

에서 질전이 확인된 경우를 발정동기화가 유발된 것으로 간주하였다.

또한, 생후 6주령 SD 암컷 랫드를 4개 군(n=20)으로 나누어 과배란을 유도하였다. 4개의 실험 군은 1) 교배 4일 전 25 IU의 LHRH를 정오에 투여한 군, 2) 교배 4일 전 25 IU의 LHRH를 정오에 투여한 뒤, 72시간 후에 25IU의 HCG(Sigma)를 투여한 군, 3) 교배 3일 전 25 IU의 PMSG를 정오에 투여한 뒤, 48시간 뒤에 25IU의 HCG를 투여한 군, 4) 교배 3일 전 25 IU의 PMSG를 오후 5시에 투여하고, 48시간 뒤에 25IU를 투여한 군으로 분류하였다. HCG를 투여 30분 뒤에 9주령의 수컷과 합사하고, 다음날 오전 9시에 질전이 확인된 암컷은 교배한 것으로 간주하였다. 모든 호르몬은 복강으로 주사하였다.

### 2.3. 배아 채란 및 배양

배양환경 확인을 위한 배아의 수집을 위해서는 교배 3일전과 1일전 정오에 PMSG(25IU)와 HCG(25IU)를 각각 투여하였다. 질전이 확인된 암컷은 CO<sub>2</sub>로 안락사한 뒤 난관에서 전핵 단계의 배아를 확보하였다. 안락사한 랫드의 복부를 70% 알콜로 소독한 뒤 개방하여 난관을 분리하고, M2(Sigma) 배지로 난관을 관류하여 난관 팽대부에 위치한 전핵 단계 배아를 확보하였다. 1% hyaluronidase가 함유된 M2 배지에서 배아를 15분 동안 반응시켜 난구세포를 제거하였다. 난구세포가 제거된 배아를 IVF Center Well Dish(SPL Life Science Co., Korea) 에서 M2, M16(Sigma), mR1ECM(Cytospring, CA, USA), BSA 첨가 mR1ECM(mR-BSA; R0101 Cytospring) 그리고 PVA 첨가 mR1ECM(mR-PVA; R0201 Cytospring) 등에 담아 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 인큐베이터 내에서 배양하였는데, IVF Center Well Dish의 중심 공간에는 200 uL의 배지와 배아를, 주변 공간에는 1

mL의 PBS를 분주하였다. Mineral oil(Sigma)로 배아와 배지를 도포하는 경우, 60 mm Dish(SPL)에 200 uL의 배지와 배아를 먼저 소적한 후 Mineral oil 1 mL을 도포하였다. 배양 첨가물로서의 BSA 와 PVA가 랫드 배아의 발생에 미치는 효과를 비교하는 경우, 전핵 단계 배아를 BSA가 첨가된 mR1ECM 배지(mR-BSA) (R0101 Cytospring)와 PVA가 첨가된 mR1ECM 배지(mR-PVA) (R0201 Cytospring)에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 배양 20시간 동안 배양 후, 실체현미경(OlympusAX70, Tokyo, Japan)으로 2세포기로의 분열 정도를 관찰하였다.

### 2.4. 배아 전기천공

NEPA21 electroporator(NEPA GENE Co. Ltd, Japan)을 이용하여 전핵 단계의 배아에 전기천공 자극을 주었다. 전기 자극은 투명대 및 세포질 막에 미세한 구멍을 만드는 '타공 자극'과 유전체 등의 유기물이 배아 내로 이동하도록 유도하는 '수송 자극'으로 구성되었다. 5 mm 간격으로 놓인 두개의 금속 전극(CUY520P5, NEPA GENE Co. Ltd) 사이에 50 ul Opti-Mem(Gibco, NY, USA)을 채우고 전핵 단계 배아를 한 줄로 배치하였다. 타공자극은 전압 225 V, 펄스 폭 2.5 ms, 펄스 간격 50 ms, 펄스 수 4로 설정하였고, 수송자극은 전압 20 V, 펄스 폭 50 ms, 펄스 간격 50 ms 및 펄스 수 5로 설정하였다. 전기천공 후 모든 배아는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 인큐베이터 내에서 20시간 배양하였다.

### 2.5. 통계처리

통계적 유의성(P < 0.05)은 Student's t-test를 사용하여 분석하였다.

**Table 4.** Formulations of M2, M16, and mR1ECM (g/L)

Component	mR1ECM	M2	M16
Sodium chloride	6.428	5.532	5.532
Potassium chloride	0.239	0.356	0.356
Potassium Phosphate (Monobasic)		0.162	0.162
Glucose	1.352	1	1
Calcium chloride dihydrate	0.294	0.251	0.251
Magnesium chloride hexahydrate	0.102		
Magnesium Sulfate (anhydrous)		0.165	0.164
Sodium bicarbonate	2.1	0.35	2.101
Sodium lactate	1.12		
Sodium pyruvate	0.055		
Pyruvic Acid		0.036	0.036
L-Glutamine	0.146		
MEM AA(x50) <sup>a</sup>	2%		
MEM NEAA(x100) <sup>b</sup>	1%		
Albumin, Bovine Fraction V		4	4
DL-Lactic Acid		2.95	2.95
Penicillin G	0.075	0.06	0.06
Streptomycin	0.05	0.05	0.05
Phenol Red		0.011	0.011
HEPES		5.427	

<sup>a</sup> Minimal essential medium (MEM) amino acid solution (GIBCO BRL).

<sup>b</sup> MEM nonessential amino acid solution (GIBCO BRL).

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 호르몬에 의한 랫드 발정동기화와 과배란 유도 효율 비교

Table 1 실험결과는 LHRH 보다 PMSG를 투여한 경우, 더 많은 암컷이 수컷과 교미하는 것으로 나타났다 ( $P < 0.05$ ). 발정동기화를 위해 3마리의 암컷에게 LHRH 또는 PMSG를 투여하고 실험을 총 7회 반복하여 LHRH는 Filipiak and Saunders (2016) 방법에 따라 짝짓기 4일 전에 투여했고 PMSG는 3일전에 투여한 결과로 발정동기화의 성공여부는 투여 다음날 아침 질전 형성으로 판단하였다. 실제로 여러 연구에서 LHRH의 효과는 일정하지 않는 것으로 보고되고 있다 (Corbin and McCabe., 2002; Filipiak and Saunders, 2006; Kito et al., 2010). 이러한 결과는 PMSG의 발정동기화 효과가 LHRH보다 더 효과적임을 시사한다. Table 2는 발정동기화 후 과배란의 효율을 평가하기 위해, 4

마리의 암컷을 대상으로 5반복 실험을 진행한 결과를 제시하였다. 먼저 발정동기화를 위해 LHRH(25 IU)는 교배 4일 전에, PMSG(25 IU)는 교배 3일 전에 투여하였고, 배란을 유도하기 위해 HCG(25 IU)를 교배 1일 전에 복강 내 투여하였고, 호르몬 작용시간과 배란과의 관계를 알아보기 위해 투여시간을 정오(12:00)와 늦은 오후(17:00)로 구분한 결과 HCG에 의해 유도된 과배란 효율은 정오에 PMSG와 HCG를 투여한 군에서 가장 높게 나타났다 ( $P < 0.05$ ). 우리의 결과에서는 25 IU의 저용량을 이용한 과배란도 효율적인 방법임을 밝혔다. 이는 HCG에 의한 과배란 작용이 교배 전 충분한 작용 시간을 필요로 하며 LHRH보다 PMSG와 함께 투여했을 때 효율을 증대시킬 수 있음을 시사한다. 과배란법은 이미 보고된 바 있으나 (Cornejo-Cortes et al., 2006; Kon et al., 2014), 우리의 연구에서 사용된 용량보다 많은 양(PMSG 50~150 IU, HCG 50~75 IU)의 호르몬을 주입한 결과로 차이가 있음을 보여주었다.

**Table 5.** Comparison of BSA and PVA in mR1ECM for embryo development

Medium	No. of Cultured Embryos <sup>a</sup>	No.(%) <sup>b</sup> of Embryos developed to 2-cells
mR-BSA	277	209 (75.5)
mR-PVA	361	231 (64.0)

<sup>a</sup> Embryos were examined at 20 h after cultured in each media.

<sup>b</sup> Calculated from the number of embryos examined.

**Table 6.** Comparison of covering medium with mineral oil and surrounding with PBS for electroporated embryo development

Medium		No. of Cultured Embryos <sup>a</sup>	No.(%) <sup>b</sup> of Embryos developed to 2-cells
Condition	Medium		
PBS	mR-BSA	34	31 (91)
	mR-PVA	33	26 (79)
Mineral Oil	mR-BSA	33	29 (88)
	mR-PVA	21	15 (71)

<sup>a</sup> Embryos were examined at 20 h after cultured in each media.

<sup>b</sup> Calculated from the number of embryos examined.

### 3.2. 배양배지의 조성이 랫드 배아의 발생에 미치는 영향

Table 3은 전핵단계 배아를 M2, M16 및 mR1ECM 배지에서 배양되었을 때 결과로 mR1ECM 배지가 가장 많은 2세포기 배아가 관찰되었다( $P < 0.01$ ). 2세포기로 분화된 배아의 수는 M16 조건에서 유의하게 가장 낮은 것으로 관찰되었다. mR1ECM에서 배양된 배아는 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 최대 7일 동안 2세포기 상태를 유지했다. 그러나, M2 및 M16 배지에서 배양한 2개의 세포는 배양 3일째부터 자가분해 되었다. 그 이유는 저산소 환경이 조성되지 않으면 난할정지 및 배아발달 정지를 유발할 수 있기 때문이다(Quinn and Harlow, 1978). 이러한 현상은 본 연구의 5% CO<sub>2</sub> 배양조건에서도 관찰되었다.

각 배지의 조성은 Table 4와 같다. 이 결과에서는 Potassium Phosphate, Magnesium chloride hexahydrate, Sodium lactate, Sodium pyruvate 등의 성분에서 차이가 있다(Oh et al., 1998; Popova et al., 2011). 이는 각 배지의 조성이 랫드의 전핵단계 배아의 분열에 영향을 미치며 mR1ECM의 조성이 랫드 배아의 생리적 항상성을 유지하는데 적합함을 시사한다.

배양 첨가물로서의 BSA와 PVA가 랫드 배아의 발생에 미치는 효과를 비교하기 위한 결과는 Table 5에 요약하였다. BSA가 첨가된 mR1ECM 배지에서 배양한

경우 PVA가 첨가된 경우 보다 2세포기로 분열하는 비율이 더 높았다. 이 결과는 PVA보다 BSA가 마우스 배반포 발생율을 더 향상시킨다는 Biggers et al.(1997) 연구와 일치한다. Brinster (1965) 연구에서도 2세포기 마우스 배아가 배반포로 발달하기 위해서는 고정된 질소원이 필요하다는 것을 보고하였다. 예를 들면, 혈청, albumin, BSA와 PVA 등이 질소원으로 공급될 수 있어 본 연구결과는 전기 천공자극을 받은 랫드 전핵단계 배아에 대한 질소원으로서 BSA가 PVA보다 더 적합함을 보여 주었다.

### 3.3. 배양환경이 전기 천공된 랫드 배아의 발생에 미치는 영향

Table 6은 배아의 체외 발육 시, 소적한 배양배지에 mineral oil을 도포하는 전통적인 방식과 IVF Center Well을 이용하여 oil을 도포하지 않고 소적한 배양배지 주변을 PBS로 채워 습도를 유지하는 방식을 비교한 결과를 제시하였다. IVF Center Well을 이용한 경우에서 더 많은 2세포기 배아가 관찰되었다. 일반적으로 체외 배아의 조작과정에서 외부 자극으로부터 배아 또는 난자를 보호하기 위해 mineral oil을 사용하는 방법이 사용되고 있다(Morbeck et al., 2010). Mineral oil은 온도, 습도, pH 및 삼투압 등의 변화를 억제시킴으로써 배아에 영향을 줄 수 있는 자극을 제한하는 역할을 하는

**Table 7.** Comparison of BSA and PVA in mR1ECM for electroporated embryo development

Medium		No. of Cultured Embryos <sup>a</sup>	No.(%) <sup>b</sup> of Embryos developed to 2-cells
Washing	Culture		
mR-BSA	mR-BSA	92	78 (85)
mR-BSA	mR-PVA	98	61 (62)
mR-PVA	mR-BSA	106	71 (67)

<sup>a</sup> Embryos were examined at 20 h after cultured in each media.

<sup>b</sup> Calculated from the number of embryos examined.

것으로 알려져 있다(Otsuki et al., 2007). 그러나 mineral oil은 석유의 부산물로 세포배양에 적합하지 않은 물질들이 함유되어 있어 배아에 독성을 나타낼 수 있다(Morbeck et al., 2010). 또한 전기천공을 이용한 형질주입의 원리는 먼저 배아의 투명대와 세포질막에 전기자극으로 미세한 구멍을 형성하고 전류를 흘려 보내 전극을 띄는 유전체가 배아내로 이동하도록 유도하는 원리이다. 전기자극은 배아에 손상을 줄 수 있어 적절한 배양 및 자극 정도를 찾는 것이 중요하다. 그러므로 본 연구 결과를 바탕으로 하면 전기자극으로 취약해진 배아의 배양에는 mineral oil의 유해한 요인을 감소시키는 방법이 더 적절함을 반영한다.

배양첨가물로서의 BSA와 PVA가 랫드 배아의 발생에 미치는 효과는 Table 7에 나타내었다. mR-BSA 배지에서 정치한 후 mR-BSA 배지에서 배양한 경우 2세포기로 분열하는 비율이 가장 높은 것으로 확인되어 BSA가 PVA에 비해 손상된 배아에 대한 보호능력이 더 효과적이라는 것을 시사한다.

#### 4. 결론

본 연구는 효율적인 랫드에서의 과배란과 동기화로 배아를 확보하고 유전자가위의 도입 등을 위해 전기천공 등의 자극을 받은 전핵단계 배아의 적절한 배지조건을 조사하는데 있다. 결과를 종합하면, 사용된 저용량의 PMSG와 HCG는 효과적으로 과배란을 유도하였으며 과배란에 대한 HCG의 효과는 PMSG와 함께 이른 오후에 주사했을 때 가장 높은 것으로 나타나 교배 전에 충분한 호르몬의 작용시간이 필요한 것을 입증하였다. PVA보다 BSA가 랫드 전핵단계 배아의 발생율을 더 향상시키는 것을 확인되어 전기천공 자극을 받은 랫드 배아 발생과정에 필요한 질소원으로서 BSA가 PVA보다 더 적합함을 보여주었다. 향후 이 연구 결과는 형질전환

랫드모델을 생산하기 위한 기술표준화에 기여할 것으로 기대가 된다.

#### 감사의 글

본 연구는 한국연구재단 연구사업(과제명: 유전자가위 기술을 활용한 랫드 형질전환 모델 기반의 전립선암 발병 기전 분석, 과제번호: NRF- 2016R1D1A1A02937331)의 지원에 의해 이루어진 것임.

#### REFERENCES

- Biggers, J. D., Summers, M. C., McGinnis, L. K., 1997, Polyvinyl alcohol and amino acids as substitutes for bovine serum albumin in culture media for mouse preimplantation embryos, *Hum. Reprod. Update.*, 3, 125-35.
- Brinster, R. L., 1965, Studies on the development of mouse embryos in vitro. III. The effect of fixed-nitrogen source, *J. Exp. Zool.*, 158, 69-77.
- Corbin, T. J., McCabe, J. G., 2002, Strain variation of immature female rats in response to various superovulatory hormone preparations and routes of administration, *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.*, 41, 18-23.
- Cornejo-Cortes, M., Sanchez-Torres, C., Vázquez-Chagoyán, J., Suarez-Gomez, H., Garrido-Farina, G., Meraz-Rios, M., 2006, Rat embryo quality and production efficiency are dependent on gonadotrophin dose in superovulatory treatments, *Lab. Anim.*, 40, 87-95.
- Cozzi, J., Anegón, I., Braun, V., Gross, A. C., Merrouche, C., Cherifi, Y., 2009, Pronuclear DNA injection for the production of transgenic rats, *Methods. Mol. Biol.*, 561, 73-88.
- Filipiak, W. E., Saunders, T. L., 2006, Advances in transgenic rat production, *Transgenic Res.*, 15, 673-86.

- Gordon, T., Borschel, G. H., 2017, The use of the rat as a model for studying peripheral nerve regeneration and sprouting after complete and partial nerve injuries, *Exp. Neurol.*, 287, 331-47.
- Homberg, J., Wöhr, M., Alenina, N., 2017, Comeback of the Rat in Biomedical Research, *ACS. Chem. Neurosci.*, 8, 900-3.
- Kaneko, T., Sakuma, T., Yamamoto, T., Mashimo, T., 2014, Simple knockout by electroporation of engineered endonucleases into intact rat embryos, *Sci Rep.*, 4, 6328
- Kito, S., Yano, H., Ohta, Y., Tsukamoto, S., 2010, Superovulatory response, oocyte spontaneous activation, and embryo development in WMN/Nrs inbred rats, *Exp. Anim.*, 59, 35-45.
- Kon, H., Hokao, R., Shinoda, M., 2014, Fertilizability of superovulated eggs by estrous stage-independent PMSG/hCG treatment in adult Wistar-Imamichi rats, *Exp. Anim.*, 63, 175-82.
- Mashimo, T., 2014, Gene targeting technologies in rats: zinc finger nucleases, transcription activator-like effector nucleases, and clustered regularly interspaced short palindromic repeats, *Dev. Growth. Differ.*, 56, 46-52.
- Morbeck, D. E., Khan, Z., Barnidge, D. R., Walker, D. L., 2010, Washing mineral oil reduces contaminants and embryotoxicity, *Fertil. Steril.*, 94, 2747-52.
- Oh, S. H., Miyoshi, K., Funahashi, H., 1998, Rat oocytes fertilized in modified rat 1-cell embryo culture medium containing a high sodium chloride concentration and bovine serum albumin maintain developmental ability to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.*, 59, 884-9.
- Otsuki, J., Nagai, Y., Chiba, K., 2007, Peroxidation of mineral oil used in droplet culture is detrimental to fertilization and embryo development, *Fertil. Steril.*, 88, 741-3.
- Popova, E., Bader, M., Krivokharchenko, A., 2011, Effect of culture conditions on viability of mouse and rat embryos developed in vitro, *Genes*, 2, 332-44.
- Quinn, P., Harlow, G. M., 1978, The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro, *J. Exp. Zool.*, 206, 73-80.
- Shao, Y., Guan, Y., Wang, L., Qiu, Z., Liu, M., Chen, Y., 2014, CRISPR/Cas-mediated genome editing in the rat via direct injection of one-cell embryos, *Nat. Protoc.*, 9, 2493-512.
- Szpirer, C., 2020, Rat models of human diseases and related phenotypes: a systematic inventory of the causative genes, *J. Biomed. Sci.*, 27, 84.
- Tesson, L., Usal, C., Ménoret, S., Leung, E., Niles, B. J., Remy, S., 2011, Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs, *Nat. Biotechnol.*, 29, 695-6.
- 
- Post-doctoral. Ji-Min Lee  
Department of Laboratory Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Seoul National University  
jmlee@snu.ac.kr