

## 兩分한 생쥐 胚의 體外 및 體內 發生에 관한 研究

全益秀 · 朴修奉\* · 徐泰光 · 朴恒均 · 崔光洙

慶北大學校 農科大學 酪農學科

\*慶北大學校 農業科學技術研究所

### Development of Mouse Embryos in Vitro and Vivo by Quick-splitting

Jeon, Ik Soo · Park, Soo Bong\* · Suh, Tae Kwang · Park, Hang Kyun · Choi, Kwang Soo

Dept. of Dairy Sci., Coll. of Agric., Kyungpook Natl. Univ.

\*Inst. of Agric. Sci. & Tech., Kyungpook Natl. Univ.

### Summary

The study was carried out to investigate the viability of mouse embryos bisected at the stages of 8-cell, morula and blastocyst and, also, to find out the feasibility of offspring production by transfer of the bisected blastocysts with Quick-splitting.

The results obtained are summarized as follows:

1. The mouse embryos were bisected with bio-cut blade at the stages of 8-cell and morula, and cultured in Medium 2. The bisected embryos were developed to blastocyst stage by 64% and 81%, respectively.

2. The blastocysts which were cultured in Medium 2 after being bisected at the stages of 8-cell and morula were observed normal outgrowth in Ham's F-10 medium by 86% and 90%, respectively.

3. The blastocysts which were Quick-splitting in Medium 2 were observed normal outgrowth by 97%, however, no offspring was obtained by transfer of Quick-splitting blastocysts.

(Key words: bio-cut blade, embryo transfer, micromanipulator, morula, outgrowth, Quick-splitting).

### 緒 論

遺傳的으로 優秀한 家畜의 增殖과, 染色體 分析에 의한 性判別등 加畜改良 및 유전에 관한 연구등에 이용하기 위하여 一卵性 雙仔 또는 三仔 생산에 관한 연구가 많이 진행 되고 있다.<sup>1, 2, 3, 7, 8, 13, 14, 16, 17).</sup>

受精卵 兩分에 관하여, 현재까지는 8細胞 期胚, 桑實胚, 胚盤胞期胚를 兩分하고 배양한 후 자궁에 非外科的 혹은 外科的으로 移植하는 방법으로 일란성 쌍자를 생산 해 내는 연구가 수행되었다.<sup>1, 8, 9, 14)</sup>

Nagashima 등<sup>9)</sup>은 micromanipulator를 이용

하여 생쥐의 상실패를 양분한 결과 79.5%가 배반포기배로 발달했다고 보고하였으며 Kazuya 등<sup>6)</sup>은 흰쥐, 산양, 소의 胚盤胞期胚에 대하여 각각 91%, 100%, 100%의 양분율을 보고 하였으며, Goto 등<sup>3)</sup>은 體外受精후 胚盤胞期까지 發達한 受精卵을 兩分하여 移植한 결과 30%가 수태되었다고 보고하였다.

국내에서는 Kim 등<sup>8)</sup>이 micromanipulator를 이용하여 생쥐의 상실패를 양분한 결과 64.9%가 배반포기배로 발달하였다고 보고하였으며 Baik 등<sup>1)</sup>과 Suh 등<sup>14)</sup>은 미세유리봉을 이용하여 생쥐의 상실패를 양분한 결과 각각 67.2% 및 76.5%가 배반포기배로 발달했다고 보고하였다.

그리고 Chung 등<sup>23)</sup>이 소의 胚盤胞期胚를 micromanipulator로서 양분이식하여 33.3%의 임신율을 보고한 바있으나, Williams 등<sup>17)</sup>은 손쉽게 이용할 수 있는 간단한 미세조작기구(simple micromanipulator)를 이용하여 양분후 배양 과정없이 이식하는 방법인 Quick-splitting으로 소의 胚盤胞期胚를 양분하여 이식한 결과 양분 하지않은 胚盤胞期胚인 대조구와 거의 동일한 45%의 임신율을 보고하였다.

한편 Randall 등<sup>12)</sup>에 의하면 배반포기배의 영양배엽에는 착상에 관여하는 인자가 존재한다고 했으며 Heap 등<sup>4)</sup>과 Willaderson 등<sup>16)</sup>은 수정란의 세포 하나하나에서 분비하는 물질이 착상에 기인한다고 하여 수정란의 미세조작은 착상부전의 원인이 될 수 있음을 보고하였다.

이에 본 연구에서는 생쥐의 8細胞期胚와 桑實胚 및 胚盤胞期胚를 micromanipulator를 이용하여 양분 한후 分割球의 체외생존성을 검토하고, 受精卵 이용의 극대화를 위해 胚盤胞期胚를 양분한 후 배양 및 선별과정없

이 受卵 생쥐에 이식하는 방법으로 쌍자 생산의 가능성 여부를 검토하고자 본 실험을 실시하였다.

## 材料 및 方法

### 1. 供試動物

實驗動物은 albino BALB/C의 생쥐로서 供卵생쥐는 4-6주령의 생쥐를 이용하였으며, 受卵생쥐는 16-20주령으로서 최소 한번 이상 분만 경험이 있는 생쥐를 사용하였다.

供卵생쥐와 교미를 위한 숫쥐는 12주령의 생쥐를 사용하였으며 受卵생쥐의 發情同期化를 위한 숫쥐는 精管을 切除한 후 다른 암쥐와 습습시켜 불임을 확인한후 사용하였다.

공시동물은 경북대학교 농과대학 실험동물 사육실에서 사육되었는데 1일 조명시간 14시간, 실온 25-30°C의 조건하에서 1989년 5월 부터 9월까지 사육하면서 사용하였다.

Table 1. Composition of culture media (M2)

1. Stock solution for making M2		Component	g /100ml					
Stock A:(10×conc)		NaCl	5.534					
		KCl	0.360					
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.162					
		Na lactate (60% syrup)	2.608(3.2ml)					
		MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.294					
		Glucose	1.000					
		Penicillin(10 <sup>5</sup> IU)	0.060					
		Streptomycin	0.050					
Stock B:(10×conc)		NaHCO <sub>3</sub>	2.106					
Stock C:(10×conc)		Na pyruvate	0.360					
Stock D:(10×conc)		CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	2.520					
Stock E:(10×conc)		Hepes	5.957					
2. To make up 10ml of M2+BSA from stock solutions								
Stock (ml)	A	B	C	D	E	Water (ml)	BSA (mg)	pH
M2	1.0	0.16	0.1	0.1	0.84	7.8	40	7.4

## 2. 過排卵 誘起와 發情同期化

공란생쥐의 발정 주기에 관계없이 오후 2시에 PMSG(Folligon, Intervet, Holland) 5IU를 복강내 1회 주사하고 48시간후에 동일한 방법으로 hCG(Chorulon, Intervet, Holland) 5IU를 주사하여 과배란을 유도하였으며<sup>14)</sup> hCG주사직후 雌雄 1:1로ผสม시켜 다음날 아침 10시 이전에 臌栓이 확인된 암쥐를 채란용으로 공시하였다.

兩分分割球(Quick-splitted embryo)와 대조구(intact embryo)의 이식을 위한 수란생쥐는 공란생쥐에서 採卵한 受精卵보다 하루 늦은 자궁상태의 유지를 위해 공란생쥐보다 하루늦게 숫쥐와 5:1의 비율로 합사시켜 익일 아침 10시 이전에 臌栓이 확인된 암쥐를 사용하였다.

## 3. 培養液

受精卵의 回收와 微細操作에 사용한 배양액은 Quinn<sup>10)</sup>의 방법에 따라 製造한 M2배양액으로서 그 化學的 조성과 제조법은 Table 1과 같다.

그리고 8細胞期, 桑實胚, 胚盤胞期胚의 體外에서 着床여부 검토를 위한 배양에는 Ham's F-10(GIBCO, Life Technologies, INC., U.S.A.)을 이용하였다.

본 실험에 사용한 모든 배양액은 사용직전 0.2 $\mu$ m millipore filter(Gelman Science Inc., U.S.A.)를 사용하여 濾過제균하였으며 사용 1-2시간전에 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 습도포화상태인 배양기내에 정지하여 CO<sub>2</sub> 평형을 시켰다.

## 4. 受精卵의 回收

수정란을 회수하기 위해서 8세포기배는 hCG주사 62-66시간후에, 상실배는 72-78시간 후에, 배반포기배는 92-96시간 후에 각각 공란생쥐를 屠殺하여 자궁과 난관부위를 꺼내어 30배 실체현미경(Olympus Optical CO., Japan)하에서 前述한 培養液을 이용하여 30G 주사침이 부착된 1ml의 주사기로 卵管採에서 자궁으로 0.1-0.2ml 灌流시켜 受精卵을 回收하였다. 回收된 受精卵은 80배의 실체현미경하에서 정상적으로 발달한 것만

을 선별하여 본 실험에 공시하였다.

## 5. 微細操作(micromanipulation)

Micromanipulator(Curtin Matheson Scientific, Inc., France)에 holding pipette과 bio-cut blade(Feather, Inc., Japan)를 부착시키고 8細胞期胚와 桑實胚, 胚盤胞期胚를 holding pipette으로 흡착 고정시킨 후 受精卵의 정중앙을 bio-cut blade로써 양분하였다(Fig.1).

## 6. 兩分分割球의 培養

8細胞期胚와 桑實胚를 兩分 후 전술한 배양액 소적내에 넣어 8세포기배 양분 분할구는 36시간 그리고 상실배 양분 분할구는 24시간 배양하여, 배반포기까지의 발달을 관찰하였으며 정상적으로 발달한 胚盤胞期胚를 선별하여 Ham's F-10배양액 소적내에 넣어 72시간 배양하여 outgrowth를 관찰하였다.

## 7. 移 植

양분된 배반포기 배와 대조구를 상술한 수란생쥐에 이식하였다. 이식은 수란생쥐에 sodium pentobarbital(Somnopentyl, Pitman-Moore INC., U.S.A.)을 복강내에 투여 마취시킨후 背側 정중앙선을 절개한 다음 난소, 난관및 자궁을 노출시키고 멸균된 26G 주사침을 이용하여 자궁각선단에 小孔을 만들었으며 이 소공에 micropipette을 삽입하여 Hogan등<sup>5)</sup>의 방법에 따라 소량의 배양액과 함께 수정란을 이식하였다.

본 실험의 전 과정은 Fig. 2와 같다.

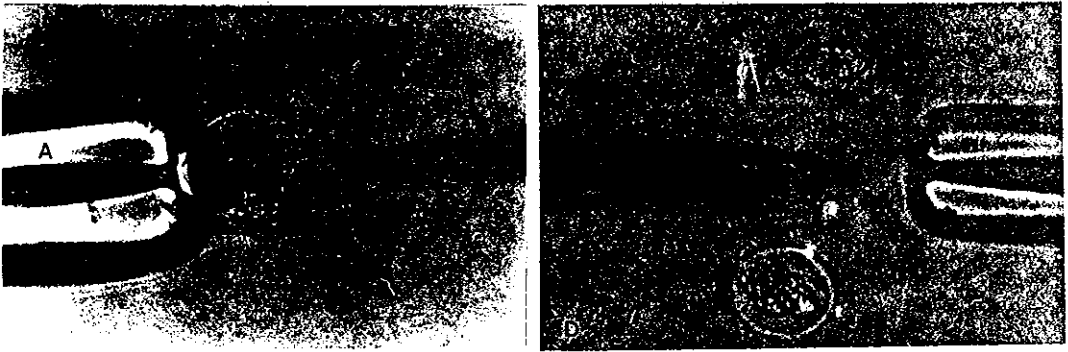


Fig. 1. Bisection of embryos at the stage of blastocyst by bio-cut blade  
 A:holding pipette, B:embryo, C:bio-cut blade  
 D:Demi-blastocyst immediately after bisection

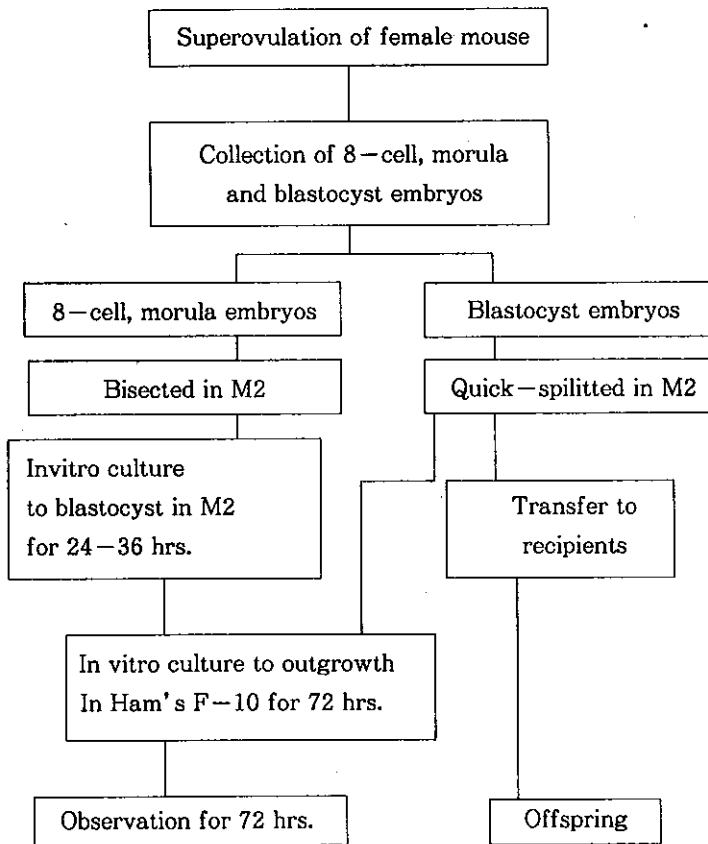


Fig. 2. Experimental procedure

## 結果 및 考察

### 1. 양분 분할구의 培養

8세포기배와 상실배를 양분하여 얻어진

분할구의 체외 배양후 발달 및 배반포기배를 양분한 분할구의 outgrowth 결과는 Table 2.와 같다.

Table 2. In-vitro development of embryos bisected at the stages of 8-cell, morula and blastocyst

Embryo	Stage of embryo	No. of embryo(A)	No. of embryos developing to blastocyst(B)*		No. of embryos developing to outgrowth(C)**	
			B	A/B×100	C	B/C×100
Intact embryo	8-cell	15	11	73%	10	91%
	Morula	33	32	97	30	94
	Blastocyst	52	—	—	50	95
Bisected embryo	8-cell	22	14	64	12	86
	Morula	26	21	81	19	90
	Blastocyst	66	—	—	64	97

\* In-vitro culture in M2

\*\* In-vitro culture in Ham's F-10

8細胞期와 桑實胚를 兩分하여 배양한 결과 8細胞期胚는 64%, 桑實胚는 81%가 胚盤胞期胚로 發達하여 대조구의 8細胞期胚 73%, 桑實胚 97%에 비해 발생율이 약간 낮게 나타났는데 이는 양분시 약간의 세포손상이 있었음을 나타낸다.

본 연구에서 양분된 상실배의 발생 결과인 81%는 Nagashima등<sup>9)</sup>이 보고한 성적과는 유사하였으나, Kim등,<sup>8)</sup> Baik등<sup>14)</sup>의 결과보다는 약간 높았다.

이와같이 연구자에 따라 차이가 나는것은 발생된 分割球의 분류기준 및 배양방법 차이등에 기인하는 것으로 思料된다.

본 실험에서 8세포기배에서 양분한 분할구의 발생율이 64%인데 비해 상실배에서 양분한 분할구의 발생율이 81%로 높게 나타난것은 Suh등<sup>14)</sup>이 미세유리봉으로 양분한 결과 8세포기배는 60.9%, 상실배는 76.5%가 배반포기배로 발달한 결과와 비슷한 성

적으로 상실배의 발생율이 높게 나타난것은 양분시 8세포기배의 할구가 상실배보다 더많은 세포손상을 가져왔기때문이며(Suh등<sup>14)</sup>) 본 실험에서 투명대가 존재하는 8세포기배를 bio-cut blade로 양분시 상실배보다 세포가 bio-cut blade에 접하는 면이 넓으므로해서 양분후 발생 성적이 저조해진것으로 사료된다.

한편, 각 단계별 생쥐배의 배양결과 배반포기까지 발달한 胚와, 양분된 胚盤胞期胚를 Ham's F-10에서 outgrowth 실험을 실시한 결과 8세포기 86%, 상실배 90%, 배반포기배 97%의 발생율을 보였는데 시간별 outgrowth 상태는 Fig. 3과 같다.

이는 체외에서 배양시간이 짧을 수록 outgrowth 상태가 양호함을 나타내는 것이며 따라서 생쥐의 8세포기배와 상실배를 양분하여 배양 과정을 거쳐 이식하는 것보다 배반포기배를 양분하여 배양과정없이 이식하

는 것이 좋다는 것을 나타낸다.

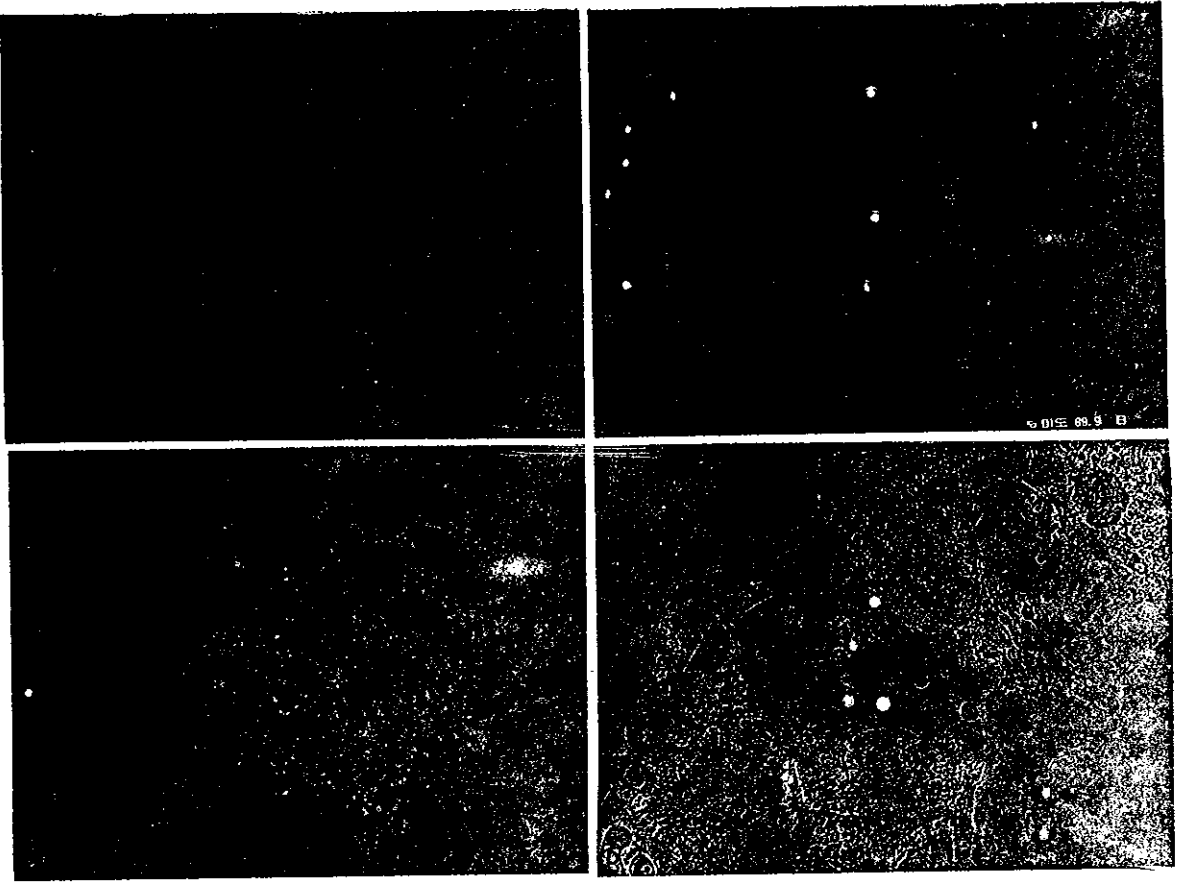


Fig. 3. Photomicrographs of blastocysts cultured in ham's F-10 for 24hrs(A), 36hrs(B), 48hrs (C), and 72hrs(D)

## 2. 새끼쥐 생산율

양분된 胚盤胞期胚 189개를 18마리의 受卵생쥐에 이식하고 대조구인 양분하지 않은 胚盤胞期胚를 6마리의 受卵생쥐에 이식한

결과 대조구에서는 30마리(71.4%)의 산자를 획득했으나 兩分된 胚盤胞期胚에서는 산자를 획득하지 못하였다(Table 3).

Table 3. Production of offspring by embryo transfer

Embryo	No. of embryos transferred	No. of recipient	No. of offspring(%)
Intact embryo	42	6	30(71.4)
Quick-splitted embryo	189	18	0(0)

## 摘 要

Suh 등<sup>14)</sup>에 따르면 양분하지 않은 8세포기 배에서는 37.6%, 상실배에서는 43.4%의 산 자율을 보고한 것에 비해 본 실험의 결과는 71.4%로 높게 나타났다.

그러나 배반포기배의 outgrowth 결과가 8세포기와 상실배의 경우보다 높게 나타났음에도 불구하고 배반포기배의 양분분할구를 이식한 경우 산자를 얻어내지 못하였다.

이와같은 이유는 Randall 등<sup>12)</sup>, Heap 등<sup>4)</sup>과 Willaderson 등<sup>15)</sup>이 수정란의 미세조작은 착상부전현상을 초래 한다고 보고한 바와같이 착상에 관여하는 luteotrophic signal의 작용에 악영향을 끼친 것으로 사료되며, 선별의 과정없이 Williams 등<sup>16)</sup>의 방법과 동일하게 양분 즉시 이식하였기 때문에 영양배엽의 회복이 이루어지지 않은 데에 따른 착상부전 현상으로 사료된다.

本 연구는 micromanipulator를 이용하여 생쥐의 8세포기배와 상실배 그리고 배반포기배를 兩分후 생존성을 검토하고, 또한 배반포기배를 양분후, 選別및 배양 과정없이 암컷 생쥐에 移植하는 경우 새끼쥐 생산의 가능성을 검토하고자 수행된 것이다.

그 결과를 요약해 보면 다음과 같다.

1. 생쥐의 8細胞期胚와 桑實胚를 兩分하여 M2에 배양한결과 각각 64%, 81%가 胚盤胞期胚까지 發生하였다.

2. M2 배양액에서 발생시킨 배반포기배를 Ham's F-10에서 배양한 결과 8세포기배에서는 86%, 상실배에서는 90%가 정상적으로 outgrowth 되었다.

3. 배반포기배를 배양 과정없이 바로 兩分하여 Ham's F-10에서 배양한 결과 97%가 정상적으로 outgrowth 되었으나 암컷생쥐에 이식한 결과 산차는 얻지 못하였다.

## 引用文獻

1. Baik, C. S., Y. M. Han, K. K. Lee, K. S. Chung, J. B. Kim and D. W. Ko. 1986. Sexing mouse demi-embryos by chromosomal analysis. Korean J. Anim. Sci. 28:708-713.
2. Chung, B. H., H. J. Chi, S. J. Lee, D. H. Lee, T. Y. Chung and K. S. Chung. 1989. Studies on bisection of bovine embryos and embryo transfer. Korean J. Anim. Reprod. 13(3):164-170.
3. Goto, K., Y. Kajihara, M. Koba, Y. Nakanishi and K. Ogawa. 1988. Pregnancy in cattle after transfer of bisected blastocysts obtained in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. Jpn. J. Anim. Sci. 1:153-156.
4. Heap, R. B., A. P. F. Flint, J. E. Gadsby and C. Rice. 1979. Hormones, the early embryo and the uterine environment. J. Reprod. Fertil. 55:267-275.
5. Hogan, B., F. Constantini and E. Lacy. 1986. Manipulating the mouse embryos. CSH Lab., U.S.A. p.106.
6. Kazuya, M., M. Miyake and K. Utsumi. 1987. Bisection of rat, goat and cattle blastocysts by metal blade. Jpn. J. Anim. Reprod. 33(1):1-5.
7. Kendall Ash, G. B. Anderson, R. H. BonDurant, R. L. Pashen, K. M. Parker and Trish Berger. 1989. Competition between split and nonmanipulated embryos in the production of identical piglets. Theriogenology. 31(4):903-910.
8. Kim, N. H., K. S. Chung, H. C. Rho, U. H. Pek and K. K. Lee. 1986. Production of monozygotic twin mice by bisecting morula. Korean J. Anim. Sci. 28:527-532.
9. Nagashima H., K. Matsui, T. Sawasaki and Y. Kano. 1984. Production of monozygotic mouse twins from

- microsurgically bisected morulae. *J. Reprod. Fertil.* 70:357-362.
10. Quinn, P., C. Barros and D. G. Whittingham. 1982. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 66:161-168.
  11. Rho, H. C. and K. S. Chung, 1983. In vitro culture of blastomere separated from mouse embryo. *Korean J. Anim. Reprod.* 7(1):24-29.
  12. Randall, D., H. A. Kaplan and W. J. Lennarz. 1986. Fibronectin and Laminin promote in vitro attachment and outgrowth of mouse blastocysts. *Development Biology* 116:519-523.
  13. Seike, N., K. Saeki, K. Utaka, M. Sakai, R. Takakura, Y. Nagao and H. Kanagawa. 1989. Production of bovine identical twins via transfer of demi-embryos without zonae pellucida. *Theriogenology* 32(2):211-220.
  14. Suh, T. K. and H. K. Park. 1988. Studies on offspring production by transfer of bisected demi-embryos in mice. *Agric. Res. Bull. Kyungpook Natl. Univ.* 6:145-156.
  15. Willadsen, S. M., H. Lehn-Jensen, C. B. Fehilly and R. Newcomb. 1981. The production of monozygotic twins of preselected percentage by micromanipulation of non-surgically collected cow embryos. *Theriogenology* 15:23.
  16. Williams, T. J., and L. Moore. 1988. Quick-splitting of bovine embryos. *Theriogenology* 29(2):477-484.
  17. Yang, B. S., K. S. Im and Y. B. Lee. 1985. Studies on the solubility of zona pellucida and developmental potency of isolated blastomere in the mouse. *Korean J. Anim. Sci.* 27:705-710.