韓國家畜繁殖學會誌 16(3) : 209~215(1992)
Korean J. Animal Reprod.

생쥐 體外受精卵의 超急速凍結 및 移植에 關한 硏究
Ⅱ. pH, 滲透壓 및 精子 前培養處理가 생쥐 體外受精卵의 發達에 미치는 影響

張奎泰 · 閔觀植 · 吳錫斗* · 姜大珍 · 尹昌鉉
慶尙大學校 農科大學

Studies on Transfer of *In Vitro* Fertilized Mouse Embryos Following Ultrarapid Freezing
Ⅱ. Effect of Treatment of pH, Osmolality and Sperm Preincubation on Development of *In Vitro* Fertilization Mouse Embryos

Chang, K.T., K.S. Min, S.D. Oh*., D.J. Kang and C.H. Yun
College of Agriculture, Gyeongsang National University

SUMMARY

These studies were carried out to overcome 2-cell block and *in vitro* development to blastocysts *in vitro* fertilization of mouse embryos. The unfertilized ova were obtained by superovulation in ICR mice of 4 to 6 weeks old. Tyrode's 280 solution was used as basal media, and the pH range of media examined was designed from 6.5 to 7.5 with 0.2 interval and the range of osmolality from 250 to 370 mOsm with 20 interval, and the period of sperm preincubation examined was 30, 60, 120, and 180 minutes. The ova developed to 2-cell embryos after 26hrs of incubation with preincubated sperm were evaluatated as *in vitro* fertilized ones.

The results obtained were summarized as follows:

1. The optimal ranges of pH and osmolality of culture media and of sperm preincubation time for *in vitro* development of *in vitro* fertilized ova to blastocyst were pH 7.1 to 7.3, 250 to 350 mosmol and 60 to 180min, respectively.
2. With the media of pH 7.1, 310 mOsm and sperm preincubation period of 120min in another experiment of large sample size, the *in vitro* fertilized ova was found 66.5% and the *in vitro* development of *in vitro* fertilized ova to blastocyst was found 35.8%.

From the above results it was concluded that the optimal conditions of pH and osmolality of the media for mouse IVF and embryo culture, and the period of sperm preincubation might be 7.1, 310 mOam and 120min, respectively.

(key words : IVF, 2-cell embryos, pH, osmolality, sperm preincubation, EDTA-2NA)

*晉州農林專門大學(Chinju Nat'l Agriculture & Forestry Junior College)

Ⅰ. 緖 論

體外受精 되어진 受精卵을 培養液에서 體外 培養 시킬 때의 環境은 胚發育 程度에 따라 助成分은 달라지게 되는데, 이러한 現狀은 受精卵 自體도 成熟 및 分裂 等의 過程을 거치면서 여러 가지 重要한 生物學的 變化를 隋伴하기 때문이다(Bondioli와 Wright, 1983; Farrell과 Bavister, 1984). 따라서 體外 培養에 必要한 培養液의 助成分이나 環境條件은 胚發育 程度에 따라 달라져야 하는데 이러한 原因은 初期胚일 境遇는 卵胞液 및 卵胞液內의 助成과 電解質이 거의 같게 助成 되어져야만 發育이 可能할뿐 아니라 主代謝原인 乳酸(Lactic acid), 피루부산(Pyruvic acid)및 葡萄糖이 包含 되어져야만 계속적인 發育을 할 수 있다고 한다(Biggers와 Mastroianni, 1985; Quinn等, 1985). 特히, 생쥐 受精卵의 初期胚 發達은 이러한 要因들이 體外 培養時 胚盤胞까지 發達 되어지는데 미치는 影響은 매우 重要하며 그 外에 培地內의 pH 및 滲透壓도 큰 影響을 미칠 수 있다고 한다(Farrel과 Bavister, 1984). ICR系統(F_1 inbreed) 생쥐의 境遇에 있어서는 正常的으로 受精이 되어졌다 하더라도 2細胞期 後半期에서 胚發育이 中斷 또는 退化 되는데 이러한 現狀을 "Intermitotic 2-cell block"이라 하였고, 이러한 現狀을 克服하기 爲하여 EDTA-2Na(ethylene diamine tetraacetic acid, 以下 EDTA)를 培養液 助成分中에 添加하여 初期胚 發達을 어느 정도 克服할 수 있었다고 한다(Abramczuck等, 1977). 그러나 이러한 物質이 2-cell block 克服에 왜 도움을 주는지에 關한 그 mechanism은 究明치 못하였고, 다만 初期胚에서 즉 1細胞 後半期로부터 2細胞 後半期까지 胚發育이 中斷 또는 退化하는 現狀의 原因을 培養液內의 必要 物質의 缺乏 내지 精子側이 아닌 母體側에서 由來 되어지는 特種 品種의 遺傳的 現狀으로만 推測 되어져 報告 되고 있으며(Fraser, 1987), 반면 Lawitts와 Biggers(1991a)는 Fraser의 報告와는 달리 遺傳的 現狀이 아닌 旣存의 培養液에 그 原因을 두어 報告하고 있다. 즉 旣存의 培養液은 受精은 充分하지만 後期 2細胞期로의 克服이 旣存 培養液內의 EDTA 添加 없이 NaCl, K 및 $NaHCO_3$만의 濃度를 調節함으로써 2-cell bolck 現狀을 克服하여 4細胞期까지의 發育率이 60% 以上이었다고 하였다. 그러나 4細胞期後의 胚盤胞까지의 發達은 30% 以下로 低調하였다고 하였다. 생쥐卵의 初期胚 發育, 즉 2-cell block 現狀은 特種 品種의 遺傳的 現狀인지 아니면 旣存 培養液內의 必要物質의 缺乏에 依한 것인지는 現在로선 明確한 究明이 되어 있지 않는 狀態이며 이러한 "Intermitotic 2-cell block"에 대하여는 계속 硏究 되어지고 있다(Bavister, 1981; Quinn等, 1985; Lawitts와 Biggers 1991b).

따라서 本 實驗은 ICR系統 생쥐卵의 體外受精時 培地의 條件과 受精이 確認된 受精卵의 體外培養時 EDTA 添加가 "2-cell block"을 克服하는데 어느 정도의 影響을 미치는지를 檢討코져 本 實驗을 修行하였다.

Ⅱ. 材料 및 方法

1. 供試動物 및 供試材料의 準備

本 實驗에 使用된 供試動物은 ICR系統 F_1 생쥐로써 供卵 생쥐는 4~6週齡의(體重 15~20g), 수컷 생쥐는 10~12週齡(體重 30~35g)의 생쥐를 供試하였다. 飼育管理는 一般 慣行法(溫度 : 21~24℃, 點燈 : 14時間, 消燈 : 10時間)에 따라 管理 하였으며 飼料와 물은 自由給食 시켰다. 한편, 過排卵 誘起 및 卵子의 回收, 受精液의 製造, 精子의 準備와 受精能獲得, 體外受精卵의 判定은, 本報 생쥐 體外受精卵의 超急速凍結 및 移植에 關한 硏究(Ⅰ. pH. 滲透壓 및 精子 前培養處理가 생쥐 體外受精率에 미치는 影響)에 記載된 材料및 方法에 準하였다.

2. 體外受精卵의 培養

體外受精後 正常的으로 2細胞期까지의 發達이 進行되어져 受精이 確認된 受精卵은 滅菌 liquid paraffin oil이 被覆된 50μM의 EDTA가 添加된 新鮮한 培養液(D-PBS+3mg/ml BSA) 小適(0.4ml)에 5個 以上씩 넣어 培養하였으며, 4細胞期까지 發達이 進行된 受精卵은 繼續的인 胚發育을 爲하여 24時間마다 新鮮한 培養液으로 交替하여 桑實胚 및 胚盤胞胚까지의 發育을 調査하였다.

3. 統計學的 分析

體外受精되어진 2細胞期를 CO_2培養器內에서 繼續的인 胚發育을 실시 하면서 4, 8, 桑實胚 및 胚盤胞胚까지의 發生率을 調査하여 各 處理群들의 data는 Mimitab Computer Statiscal Program Package (Minitab Inc. 1989)를 利用하여 χ^2-Test에 依한 有意性($P<0.05$)을 檢定하였다.

Ⅲ. 結果 및 考察

1. 受精液의 pH, 滲透壓 및 精子 前培養 處理에 依한 體外受精卵의 發生率

pH, 滲透壓 및 精子 前培養 處理時間에 따른 受精

Table 1. Effect of pH value of culture media on embryo development *in vitro* followed by *in vitro* fertilization of mouse eggs

pH value	No. of embryos examined(2-cell)[1]	Development of embryos[2]			
		4-cell	8-cell	Morulae	Blastocysts
6.5	22	10(45.5)^{ab}	9(40.9)^{ab}	7(31.8)^{a}	5(22.7)^{a}
6.7	19	9(47.4)^{bc}	9(47.4)^{b}	6(31.6)^{a}	5(26.3)^{ab}
6.9	24	12(50.0)^{bc}	10(41.7)^{ab}	8(33.3)^{ab}	7(29.2)^{ab}
7.1	33	18(54.5)^{c}	14(42.4)^{ab}	13(39.4)^{c}	12(36.4)^{c}
7.3	29	4(48.3)^{bc}	13(44.8)^{b}	11(37.9)^{bc}	9(31.0)^{bc}
7.5	28	13(46.4)^{ab}	11(39.3)^{ab}	9(32.1)^{ab}	8(28.6)^{ab}
7.7	28	11(39.3)^{a}	10(35.7)^{a}	8(28.6)^{a}	7(25.0)^{ab}

( ) : Percentage.

1) To use of medium(D−PBS+3mg/ml BSA+50μM EDTA) for overcome 2-cell block.

2) Changes fresh medium(D−PBS+3mg/ml BSA)for *in vitro* culture to continue under 37℃, 5% CO_2 and 95% air condition.

Figures in columns with different superscripts were significantly different($p<0.05$).

Table 2. Effect of osmolality of culture media on embryo development *in vitro* followed by *in vitro* fertilization of mouse eggs

Osmolality (mOsm)	No. of embryos examined(2-cell)[1]	Development of embryos[2]			
		4-cell	8-cell	Morulae	Blastocysts
250	23	9(39.1)^{a}	8(34.8)^{a}	7(30.4)^{a}	6(26.1)^{ab}
270	26	13(50.0)^{b}	10(38.5)^{a}	8(30.8)^{a}	7(26.9)^{ab}
290	27	14(51.9)^{b}	11(40.7)^{a}	9(33.3)^{ab}	9(33.3)^{b}
310	33	18(54.5)^{b}	14(42.4)^{a}	13(39.4)^{b}	12(36.4)^{b}
330	34	18(52.9)^{b}	13(38.2)^{a}	12(35.3)^{ab}	10(29.4)^{ab}
350	28	12(42.9)^{ab}	10(35.7)^{a}	9(32.1)^{ab}	7(25.0)^{ab}
370	29	11(37.9)^{a}	10(34.5)^{a}	9(31.0)^{ab}	7(24.1)^{a}

( ) : Percentage.

1) To use of medium(D−PBS+3mg/ml BSA+50μM EDTA) for overcome 2-cell block.

2) Changes fresh medium(D−PBS+3mg/ml BSA)for *in vitro* culture to continue under 37℃, 5% CO_2 and 95% air condition.

Figures in columns with different superscripts were significantly different($p<0.05$).

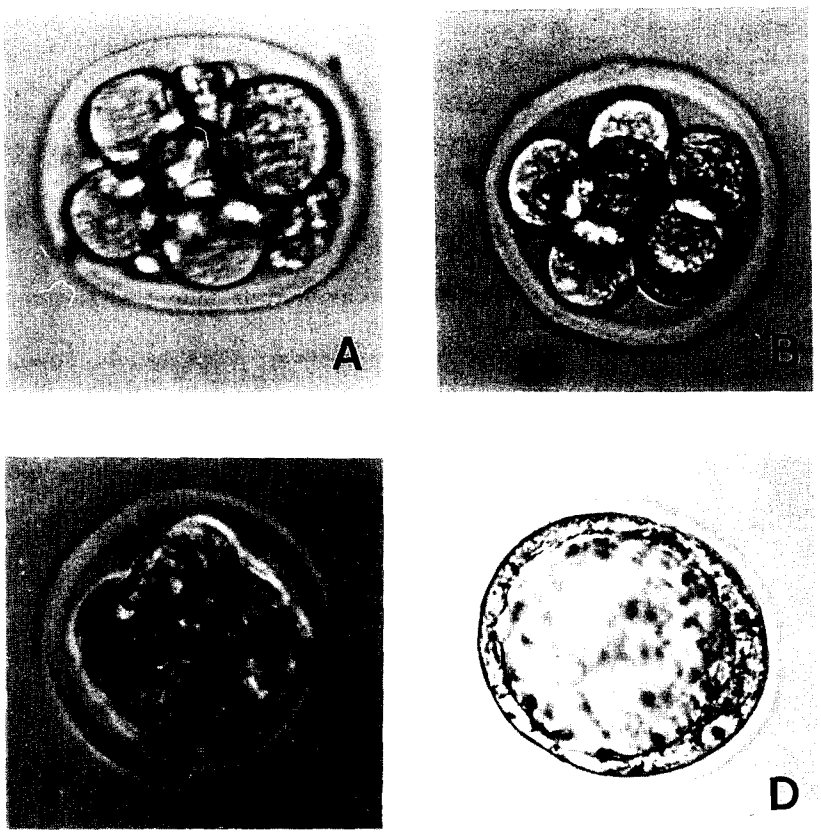

Fig. 1. A, B, C) and D) 4-cell, 8-cell, morulae and blastocysts embryo after fertilization and culture *in vitro*(A, B, C and D×200).

後 胚盤胞胚까지의 胚發生率은 Table 1, 2, 3에서 보는 바와 같으며, 特히 pH 7.1, 滲透壓 310 mOsm 및 精子 前培養 時間을 120分으로 하였을때 胚發生率은 各各 54.5, 42.4, 39.4% 및 36.4%로서 體外受精液의 條件이 생쥐卵 體外培養時 가장 良好하게 나타났다. 이러한 結果들은 Abramczuck等(1977)이 ICR系統 생쥐 初期胚를 體外 培養時 EDTA-2Na를 添加하여 胚盤胞까지의 發育成績(60%)보다는 낮은 成績이었는데, 이러한 結果는 旣存 培養液의 助成 또는 供試動物의 種에 따르는 差異로 生覺되며 또한 培養液 製造時 使用되어진 水分의 蒸溜 回數 程度에 따른 差異로 推測된다.

Whittingham(1971)은 생쥐 1細胞 및 2細胞 受精卵의 體外 培養時 培養液內 98% 以上을 차지하는 水分을 初期 受精卵의 胚發育에 아주 큰 影響을 미친다고 하였다. Wales등(1970)과 Mather等(1986)은 培養液에 使用되어지는 水分을 이온교환수지 및 membrane을 여러 차례 通過한 後 다시 蒸溜한 다음 使用하여 胚發育 成功에 좋은 結果를 얻을 수 있다고 하였으며, Milli-Q water 等의 利用도 바람직하다고 하였다(Fukuda 等, 1987). Lawitt와 Biggers(1991a)는 體外 受精後 胚盤胞胚까지의 높은 發育率을 얻기 爲해서는 體外 受精時 培養液의 助成分과 胚 發達 段階에 따른 培養液의 助成分이 달라져야 한다고 主張 하였으며, 그들은 現在까지의 2-cell block에 對한 槪念으로 母體 또는 特異 品種의 遺傳的 現狀이 아닌 培地內의

Table 3. Effect of sperm preincubation in culture media on embryo development *in vitro* followed by *in vitro* fertilization of mouse eggs

Sperm preincubation	No. of embryos examined(2-cell)[1]	Development of embryos[2]			
		4-cell	8-cell	Morulae	Blastocysts
30	23	9(39.1)[a]	8(34.8)[a]	6(26.1)[a]	6(26.1)[a]
60	26	12(46.2)[ab]	9(34.6)[a]	9(34.6)[b]	8(30.8)[ab]
120	33	18(54.5)[b]	14(42.4)[a]	13(39.4)[b]	12(36.4)[b]
180	37	17(45.9)[ab]	15(40.5)[a]	13(35.1)[b]	11(29.7)[ab]

( ) : Percentage.

1) To use of medium(D-PBS+3mg/ml BSA+50μM EDTA) for overcome 2-cell block.

2) Changes fresh medium(D-PBS+3mg/ml BSA)for *in vitro* culture to continue under 37℃, 5% CO_2 and 95% air condition.

Figures in columns with different superscripts were significantly different($p<.05$).

助成分 差異에 依한 現狀이었다고 報告하였으며, 體外受精時 NaCl, K^+ 및 $NaHCO_3$의 濃度를 調節하고 EDTA 添加없이 4細胞까지의 높은 發生率을 얻을 수 있었으나 그러나 受精當時의 培養液으로 胚盤胞胚까지의 發生率은 低調하였다고 報告함으로서 追試에 對한 結果가 注目되고 있다. Brinster(1965)는 體外 受精時 培養液內의 pH 및 滲透壓은 初期 卵子의 發生에 아주 有意的으로 效果가 있으며, 胚盤胞胚까지의 發達을 돕는데 큰 影響을 미친다고 報告하였다. 本 實驗에서 體外 受精時 pH 및 滲透壓, 그리고 精子 前培養 處理時間에 따라 受精이 確認된 2細胞卵이 4細胞卵으로의 發育 도중 急減하는 理由는 pH, 滲透壓等이 有意的으로 作用 하였기 때문이며, 初期胚 發生의 條件은 後期胚 發育에까지 影響을 미치는 것으로서 體外 受精時 受精液內의 pH 및 滲透壓은 매우 重要하리라 思料되어진다.

2. 最適 條件의 受精液 및 精子 前培養 處理에 依한 體外受精率 및 發生率

體外培養時 培養液의 pH, 滲透壓 및 精子 前培養處理에 依한 胚盤胞까지의 發生率을 基礎로 實驗을 遂行한 結果, 本 實驗에서 最適의 條件은 pH 7.1, 滲透壓

Table 4. Results of *in vitro* fertilization and culture of mouse eggs in the optimal condition found in the present study[1]

No. of eggs examined	No. of eggs recoved	No. of eggs fertilized[2]	Development of embryos[3]			
			4-cell	8-cell	Morula	Blastocyst
1080	1033 (95.6)	687 (66.5)	371/685 (54.2)	288/685 (42.0)	156/395 (39.5)	34/95 (35.8)

( ) : Percentage.

1) pH 7.1, osmolality 310, sperm preincubation 120 minutes, under 37℃, 5% CO_2 and 95% air condition.

2) Number of 2-cell developed *in vitro*/number of recovery eggs×100.
Eggs were incubated after removed spermatoza for 20 hrs.

3) Changes fresh mddium(D-PBS+3mg/ml BSA) for *in vitro* culture to continue under 37℃, 5% CO_2 and 95% air condition.

Figures in columns with different superscripts were no significantly different($p>0.05$).

310 mOsm 및 精子 前培養 處理를 120分으로 하였을 때 受精率 및 胚盤胞胚까지의 發生率이 가장 良好하였다. 以上의 條件으로 體外受精을 實施한 結果 Table 4에서 보는 바와 같이 受精率은 66.5%로 나타났으며, 體外 受精되어진 2細胞胚를 4細胞胚, 8細胞胚, 桑實胚 및 胚盤胞胚까지의 體外 發生한 結果는 各各 53.7,41.1, 38.8% 및 35.8%의 發生率을 나타내었다. 이러한 成績은 Massip等(1984)이 생쥐의 卵子를 凍結한 後 體外受精하여 胚盤胞胚까지 體外發生한 40~50%의 成績 과는 類似한 成績이었고, 反面 Abramczuck等(1977)이 報告한 結果보다는 多少 낮은 成績이었다. 이러한 結果의 差異는 本 實驗에서는 생쥐의 境遇 2-cell block現狀을 克服하기 爲한 培養液의 助成分인 EDTA의 添加 時期를 卵子와 精子를 受精用 petridish內 넣은지 6時間後 卵子만을 採取하여 胚發育하기 爲한 培養液에만 使用하였고 Abramczuck等(1977)은 EDTA의 添加 時期를 體外受精液에 添加하여 보다 나은 成績을 얻을수 있었던 것으로 思料된다.

Ⅳ. 要 約

本 硏究는 4~6週齡의 ICR系統 생쥐로부터 過排卵을 誘起한 後 未受精卵을 回收하여 體外受精을 實施하고 受精이 確認된 2細胞胚를 胚盤胞胚까지 發育시키때 體外受精時의 條件이 2-cell block의 克服 및 胚發達에 어는 정도 影響을 미치는지를 檢討하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 體外 受精時 受精液의 pH, 滲透壓 및 精子 前培養 處理時間에 따라 가장 높은 受精率을 얻을 수 있고, 大體的으로 體外 培養時 胚盤胞胚까지 良好한 結果를 얻을 수 있는 條件은 pH 7.1에서 3까지, 滲透壓은 250에서 350 mOsm까지, 精子 前培養 處理時間은 60分에서 180分까지로 나타났다. 그러나 胚盤胞胚까지 가장 良好한 結果를 얻을 수 있는 最適의 條件은 pH 7.1, 滲透壓 310 mOsm 및 精子 前培養 處理 時間은 120分으로 나타났다.
2. 한편, 體外受精에 있었서 胚盤胞까지 가장 良好한 結果를 얻을 수 있었던 最適의 條件은 pH 7.1, 滲透壓 310 mOsm 및 精子 前培養 處理 時間을 120分으로 하여 體外受精을 實施한 結果 2細胞胚까지 正常的으로 體外 發生된 體外受精率은 66.5%로 나타났고, 胚盤胞胚까지의 體外發生率은 35.8%로 나타났다.

Ⅴ. 引用文獻

1. Abramczuck, J., D. Solter and H. Koprowski. 1977. The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. Develop. Biol. 61:378-383.
2. Bavister, B. D. 1981. Fertilization and embryonic development *in vitro*; Analysis of culture media for *in vitro* fertilization and criteria for success. Plenum press. New York. 41-48.
3. Biggers, J. and L. Mastroianni. 1985. Fertilization and embryonic development *in vitro*; *In vitro* culture of zygotic and embryos. Plenum press. New York. 66-69.
4. Bondioli, K. P. and R. W. Wright. 1983. *In vitro* fertilization of bovine oocytes by spermatozoa capacitated *in vitro*. J. Anim. Sci. 57(4):1001-1005.
5. Brinster, R. L. 1965. Studies on the development of mouse embryos *in vitro*. I : The effects of osmolality and hydrogen ion concentration. J. Exp. Zool. 158:49-58.
6. Farrell, P. S. and B. D. Bavister. 1984. Shorten exposure of two-cell hamster embryos to cellection in detrimmented to viability. Biol. Reprod. 31:109-114.
7. Fraser, L. R. 1987. Minimum and maximum extracellular Ca^{2+} requirement during mouse sperm capacitation and fertilization *in vitro*. J. Reprod. Fert. 81:77-89.
8. Fukuda, A., Y. Noda, S. Tsukui, H. Matsumoto, J. Yano and T. Mori. 1987. Influence of water quality on *in vitro* fertilization and embryo development for the mouse. J. *In*

Vitro Fert Embryo Transfer. 4(1):40-45.

9. Lawitts, J. A. and J. D. Biggers. 1991a. Overcoming the 2-cell block by modifying standard components in a mouse embryos culture medium. Biol. Reprod. 45:245-251.
10. Lawitts, J. A. and J. D. Biggers. 1991b. Optimization of mouse embryo culture media using simplex method. J. Reprod. Fert. 91:543-566.
11. Massip, A., P. Van Der Zwalmen, F. Pussand, M. Camus and F. Leroy. 1984. Effect of *in vitro* fertilization, culture, freezing and transfer on the ability of mouse embryos to implant and survive. J. Reprod. Fert. 71:199-204.
12. Mather, J., F. Kaczarowski, R. Gabler and F. Wilkins. 1986. Effects of water purity and addition of common water contaminations on the growth of cell in serum-free media. Biotechniques. 4:56-63.
13. Quinn, P., J. F. Kerin and G. M. Warnes. 1985. Improved pregnancy rate in humen *in vitro* fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. Fertil Steril. 44(4):493-498.
14. Wales, R. G. 1970. Effects of ions on the development of the preimplantation mouse embros *in vitro*. Aust. J. Biol. Sci. 23:421-429.
15. Whittingham, D. G. 1971. Culture of mouse ova. J. Reprod. Fert. (Supple). 14:7-21.