

돼지 분할 수정란 및 미성숙란의 생존율에 관한 연구

김상근 · 이명현* · 서길웅**

충남대학교 수의과대학

Studies on the Survival Rate of Bisected Porcine Embryos and Immature Oocytes

Kim, S. K., M. H. Lee* and K. W. Suh**

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University

SUMMARY

This study was carried out to investigate on the survival rate and *in vitro* developmental rate of bisected porcine embryos and immature oocytes by manipulator and micropipette. Bisected embryos and immature oocytes cultured for 1~5 days in TCM 199 medium with 20% FCS. Survival rate was defined as development rate on *in vitro* culture or FDA-test.

The results are summarized as follows :

1. The survival rate of bisected porcine embryos and oocytes were 26.1%, 22.7%, respectively. The survival rate of bisected embryos and oocytes was significantly lower than that of non-bisection embryos(62.5%).
2. The survival rate of bisected porcine embryos in cultured for 12, 24, 48, 72hrs with 20% FCS + TCM-199 medium were 26.9%, 19.2%, 19.2% and 11.5%, respectively.
3. The *in-vitro* developmental rate with and without zona pellucida of bisected porcine embryos by micromanipulator were 30.8%, 25.0%, respectively.

I. 서 론

최근 수정란 이식분야의 연구에 유전공학적 기법이 도입됨에 따라 체외수정, 쌍태유기, 성 감별, 수정란의 동결 및 유전자와 핵 이식, 그리고 복제동물의 생산등 여러 분야에서 활발한 연구가 수행되어 괄목할 만한 연구결과들을 제시하고 있다. 이러한 첨단기술들을 활용하여 수정란이식 기술의 이용분야를 넓히고 산업화된 기술로 발전시키기 위해서는 수정란의 대량 생산체계의 확립과 체외발생율이 높은 분할배의 생산 및 생

존성이 높은 보존기술의 확립이 시급히 요청된다.

가축 수정란을 이용한 분할배의 작출에 관한 연구는 최근에 이르러 수정란이식의 실용성을 확대시키기 위한 방안으로 미세조작법에 의해 수정란을 분할하여 일란성 쌍자의 생산 또는 분할배의 한쪽은 동결 보존하면서 다른 쪽은 염색체 검사, 유전자 조작 및 이식 등에 제공하기 위한 분할배의 동결 이용이 보고되었다(Nagashima와 Ogawa, 1981 ; Lehn-Jenson과 Willadsen, 1983; Heyman, 1985; 吳와 金, 1994).

수정란을 분리한 분할배의 작성은 생쥐 2세포기 배를 이용하여 성공한 Nicholas와 Hall(1942)에 이어,

* 충남대학교 대학원(Graduate School, Chungnam Nat'l. Univ.)

** 충남대학교 농과대학(Coll. of Agri., Chungnam Nat'l. Univ.)

*** 이 연구는 1994년도 충남대학교 자체연구비의 지원에 의하여 연구되었음.

Tarkowski(1959a,b)는 mouse의 2세포기 수정란을 분리한 후 하나를 이식하여 산자를 얻는데 성공하였으며, Willadsen 등(1981)은 분리한 수정란을 배양하여 57% 이상의 상실배와 배반포까지의 발생율과 2, 4세포기의 수정란을 분리 배양후 이식하여 각각 68%와 50%의 임신율을 얻었으며, Mullen 등(1970)은 2세포기의 할구를 분리한 후 체외배양중 재분리하여 산자를 얻는데 성공하였다. Wilton과 Trounson(1989)은 생쥐의 4세포기 배를 aspiration pipette을 이용하여 하나의 할구를 분리하여 조작된 초기배(biopsied embryo)와 분리한 단일할구(biopsied blastomere)를 배양한 결과 조작된 초기배는 94.4%가 배반포까지 발생하였으며 분리한 단일할구는 81.4%가 10개 이상의 세포를 포함하는 초기배로 발생하였다고 보고하였으며, Wilton 등(1989)은 생쥐의 4세포기 배에서 하나의 할구를 분리한 biopsied embryo와 대조구를 배반포까지 배양 또는 동결 용해후 이식하여 각각 52.6%와 52.4% 및 62.2%와 62.9%의 태아발생율을 보고하였다. 이외에도 생쥐의 초기배를 절단한 분할배를 체외배양한 다음 이식하여 개체발생에 대한 보고는 다수의 연구자들에 의해 보고(Tarkowski, 1959a,b; Nagashima 등, 1984; Willadsen 등, 1981; Ozil 등, 1982; Williams 등, 1982; Lehn-Jensen과 Willadsen, 1983) 되었으나, 가축 수정란을 이용한 분할배의 작성에 의해 염색체 분석 또는 일란성 쌍자에 성공한 예는 있으나 현재로서는 기술의 확립이 이루어지지 않아 초보적 단계에 지나지 않는 실정이다. 그러나 돼지 수정란은 다른 가축 수정란에 비하여 체외발생능력이 떨어질 뿐만 아니라 분할란은 생존성이 대단히 저조하여 이의 개선과 분할기술의 확립이 시급한 과제라고 생각된다.

이에, 본 연구는 돼지 수정란과 미숙 난포란을 미세조작에 의해 분할후의 분할배의 생존율과 체외배양에 따른 체외발생율을 구명하고자 본 연구를 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 난포란의 회수

도살 직후의 자돈으로부터 난소를 적출하여 100 IU

/ml의 penicillin G와, 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate를 첨가한 38°C의 생리식염수에 침지하여 실험실로 옮긴 다음 19-gauge 주사기로 2~5mm 크기의 정상 난포로부터 난포액을 흡입하여 petri dish에 채취한 후 실체현미경(20~40 \times) 하에서 형태적으로 우수한 난포란을 선별하여 회수하였다.

2) 배양액

TCM-199(Whittaker, M.A. Bioproducts Co., USA)를 기본 배양액으로 하여 배양액에 20%(v/v)의 FCS(Sigma Co., USA)와 1 μ g/ml의 FSH(Sigma Co., USA), 2 IU/ml의 hCG(Sigma Co., USA), 1 μ g/ml의 17 β -estradiol(Sigma Co., USA), 100 IU/ml의 penicillin G 및 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate(Sigma Co, USA)를 첨가하여 이용하였으며 사용하기전 멸균 여과시킨 후 사용하였다.

2. 방 법

1) 난포란의 체외수정

난포란의 체외수정은 40~48시간 배양에 의해 체외 성숙이 끝난 난포란을 수정용 배양액으로 3회 세척한 후 45 μ l의 배양액 소적에 5개의 난포란과, 숫돼지의 정소로부터 정소상체를 적출한 후 세척하여 얻은 정자 부유액 0.01 ml와 BO액 2 ml를 시험관에서 잘 혼합하여 배양기에서 1시간 swim up 시킨 다음 약 0.5 ml의 상층액을 2,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 침전된 정자 pellets을 같은 양의 heparin 용액(100 μ g/ml, Sigma Co., USA)과 함께 혼합하여 CO₂ 배양기에서 수정능획득을 유기시킨(Fukui, 1988) 정자 부유액 2 μ l(1~5 \times 10⁶ml)을 주입하고 mineral oil로 피복한 다음 6~7시간 동안의 매정으로 수정시켰으며 수정의 판정은 배양을 계속하면서 12~24시간 간격으로 발생상태를 관찰하면서 할구수 또는 형태학적 관찰에 의해 배 발생을 판정하거나, 체외수정후 24~32시간에 Shea 등(1976)과 Ball 등(1983)의 방법에 따라 수정 여부를 판정하였다.

2) 분할 초기배의 생산

초기배의 분할방법은 수정란과 미성숙란을 미세조

작법에 의해 분할하여 분할배를 작성하거나, 수정란을 0.03%의 pronase로 처리하여 투명대를 연화시켜 pipetting으로 투명대를 제거한 후 micromanipulator에 의해 분할한 후 각각 투명대를 둘러싼 분할배로서 정상적인 발생을 나타내는 분할배를 이용하였으며, 미숙 분할란은 공투명대로 둘러싼 후 제외배양을 통해 생존성을 조사하였다. 이때 초기배의 분할방법은 micromanipulator(Narishige Co., Japan)가 부착되어 있는 독립현미경 stage위에 pertri dish내에 20% FCS + TCM-199 배양액의 소적중에 배를 넣어 보정용 pipette으로 배를 흡인 고정한 후 반대측에 15° 각도의 microblade(Feather Co., Japan)로 투명대로부터 배세포괴가 나오지 않을 정도로 microblade를 눌러 분할하였다.

3) 분할배의 배양

미세조작에 의해 분할한 분할배와 미숙란을 배양액으로 2회 세척후 20%(v/v)의 FCS와 1 mg/ml의 β -estradiol, 100 IU/ml의 penicillin G 및 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate가 첨가된 배양액으로 24~120시간 배양하면서 체외발생 상태를 관찰하였다.

4) 분할배의 생존성 판정

분할 초기배 및 분할 미숙란을 호르몬 및 혈청 등과

공배양후 신선한 배양액으로 2~3회 세척한 다음 FDA(fluorescence diacetate) test에 의해 생존 여부를 판정하거나, 배양을 통해 발생상태를 관찰하면서 생존성을 판정하였다(Schilling 등, 1982).

III. 결과 및 고찰

1. 분할 초기배의 생존율

돼지 수정란을 미세조작에 의해 분할한 후 공투명대에 주입한 분할 초기배와 pronase로 처리하여 투명대를 연화시켜 micropipette에 의해 분할한 후 분리할구를 흡입시킨 후 공투명대에 주입한 분할 초기배 및 분할 미숙란의 생존율은 Table 1, 2와 같다.

분할 초기배와 분할 미숙란을 배양했을 때 생존율은 각각 26.1% 및 22.7%로서 미분할 대조군의 62.5%에 비해 저조한 생존율을 나타냈으며, 분할방법에 따른 생존율은 micromanipulator에 의한 미세조작과 micropipette에 의한 조작시의 생존율은 각각 29.2%와 23.8%로서 micromanipulator에 의한 방법이 높은 생존율을 나타냈다.

본 시험결과는 시험동물은 다르지만 생쥐 수정란을 이용하여 투명대 제거배에서 VS-3용액으로 동결 융해하였을 때 48%의 생존율을 나타냈다는 Bielanski (1987)의 결과에 비해 저조한 성적이었다. 한편, Hsu 등(1986)은 생쥐의 투명대 제거배 및 투명대내 귀납

Table 1. Effects of bisection on the survival rate of bisected porcine embryos and immature oocytes

Culture of embryos	No. of oocytes examined	Degree of FDA test						Survival rate(%)
		A	B	C	D	E	F	
Control	16	1	1	2	2	6	4	10(62.5)
Demi-embryos	23	4	5	4	4	3	3	6(26.1)
Immature oocytes	22	4	4	5	4	3	2	5(22.7)

* Control : Non-bisection

Table 2. Effects of bisection on the survival rate of bisected porcine embryos

Culture of embryos	No. of oocytes examined	Degree of FDA test						Survival rate(%)
		A	B	C	D	E	F	
Bisection method								
Micromanipulator	24	3	5	4	5	4	3	7(29.2)
Micropipette	21	4	4	4	5	3	1	5(23.8)

Table 3. Effects of culture time on the *in vitro* developmental rate of bisected porcine embryos

Culture of embryos	No. of oocytes examined	Degree of FDA test						Survival rate(%)
		A	B	C	D	E	F	
12 hrs	26	5	7	3	4	3	4	7(26.9)
24 hrs	26	6	5	5	5	2	3	5(19.2)
48 hrs	26	5	5	5	6	3	2	5(19.2)
72 hrs	26	5	7	6	5	2	1	3(11.5)

한 분할배를 동결 용해한 바, 5개중 3개의 투명대 제거 배와 2개의 분할배 모두를 배반포까지 발육시켰다고 보고하였다. 한편 분할 미숙란의 생존율에 대한 연구 보고는 접할 수 없어 정확히 비교하기는 어렵지만 미숙 난포란을 분할했을 때 생존율과 체외성숙율은 극히 저조하였다.

2. 분할초기배의 배양시간에 따른 생존율

돼지 수정란을 미세조작에 의해 분할한 분할 초기배를 20% FCS + TCM-199 배양액에서 12~72시간 배양했을 때 배양시간에 따른 생존율은 Table 3에서 보는 바와 같이, 분할 초기배를 12, 24, 48, 72시간 배양했을 때 생존율은 각각 26.9, 19.2, 19.2 및 11.5%로 나타났다.

이러한 결과는 시험동물은 다르지만, mouse 4세포기의 분할배를 체외배양했을 때 胚盤胞의 발생율은 81.4%였다고 보고한 Wilton과 Trounson(1989)의 결과와 비교할 때 저조한 성적이었으나, 생쥐의 8세포기 분할배의 체외배양율은 12.9%라고 보고한 Takeda등(1989)의 결과와는 유사한 성적이었다. 한편, 소 수정란을 분할하여 excellent와 good, fair, poor, degeneration 등으로 분류하여 excellent, good 분할배를 선별하여 3~4시간 배양했을 때 excellent, good 배는 각각 42.1%와 55.3%, 18~24시간 배양시에는 17.6%와 41.2%로 나타났으며, 난관 상피세포와

공배양했을 때 29.2%와 54.2%였다고 한 Tominaga 등(1991)의 보고와 비교할 때 낮은 성적이었다.

3. 분할 초기배의 체외발생율

돼지 수정란을 미세조작에 의해 분할한 분할 초기배와 pronase에 의해 투명대를 연화시킨 후 micropipette으로 할구를 흡입시킨 후 공투명대에 주입한 절단 2분배와 pipetting으로 투명대를 제거한 분리배의 체외발생율은 Table 4에서 보는 바와 같이, 분할 초기배의 투명대 부착 미부착배를 배양했을 때의 체외발생율은 각각 30.8%와 25.0%로서 미분할 대조군의 43.8%에 비해 저조한 생존율을 나타냈다.

본 시험결과와 시험 대상동물은 다르지만, Wilton과 Trounson(1989)의 mouse 분할배의 배반포로의 발생율 81.4%와 비교할 때 현저히 낮은 성적이었으나, Takeda등(1989)의 8세포기 분할배의 체외배양율 12.9%와는 유사한 성적이었다. 한편, 수정란을 분리한 분할배의 작성은 생쥐의 2세포기 배를 이용하여 성공한 Nicholas와 Hall(1942)에 이어, Tarkowski(1959a)는 생쥐의 2세포기 수정란을 분리한 후 하나를 이식하여 산자를 얻는데 성공하였으며, Willadsen(1979)과 Willadsen 등(1981)은 분리한 수정란을 배양하여 57%이상의 상실배와 배반포까지의 발생율을 얻었으며, 아울러 2, 4세포기의 수정란을 분리 배양 후 이식하여 각각 68%와 50%의 임신율을 나타냈

Table 4. *In vitro* development rate with and without zona pellucida of bisected porcine embryos

Culture of embryos	No. of demiembryos	No. of embryos developed	
		Normal	Abnormal or degenerated
Control	16	7(43.8)	9(56.3)
Demi-embryos			
Intact-zona	13	4(30.8)	9(69.2)
Free-zona	12	3(25.0)	9(75.0)

다고 보고하였으며, Mullen 등(1970)은 2세포기의 할구를 분리한 후 체외배양중 재분리하여 산자를 얻는데 성공하였다.

IV. 적 요

본 연구는 돼지 분할란의 생존성을 구명하기 위하여 수정란과 미숙란을 각각 미세조작에 의하여 분할한 후 분할방법과 배양시간에 따른 생존율을 조사하였다.

1. 분할 초기배와 분할 미숙란을 배양했을 때 생존율은 각각 26.1 및 22.7%로서 미분할 대조군의 62.5%에 비해 저조한 생존율을 나타냈으며, 분할방법에 따른 생존율은 micromanipulator에 의한 미세조작과 micropipette에 의한 분할시의 생존율은 각각 29.2%와 23.8%였다.
2. 수정란을 미세조작에 의해 분할한 분할 초기배의 배양시간에 따른 생존율은 12, 24, 48, 72시간 배양시 각각 26.9, 19.2, 19.2 및 11.5%로 나타났다.
3. 분할 초기배의 투명대 부착 및 미부착배를 배양했을 때의 체외발생율은 각각 30.8%와 25.0%로서 미분할 대조군의 43.8%에 비해 저조한 생존율을 나타냈다.

V. 인용문헌

1. Ball, G.D., M.L. Leibfried, W. Lenz. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. Biol. Reprod., 28:717-725.
2. Bielanski, A. 1987. Survival *in vitro* of zona pellucidate-free mouse embryos after cooling conventional two step or vitrification methods. Cryo-Letters, 8:294-301.
3. Fukui, Y. and H. Ono. 1988. *In vitro* development to blastocyst of *in-vitro* matured and fertilized bovine oocytes. Vet. Rec., 122:282.
4. Heyman, Y. 1985. Factors affecting the survival of whole and half embryos transferred in cattle. Theriogenology, 23:63-75.
5. Hsu, T.T., H. Yamanoi and S. Ogawa. 1986. Survival and transfer test of mouse early embryos frozen by vitrification method. Japan, J. Anim. Reprod., 32:29-32.
6. Lehn-Jenson, H. and S.M. Willadsen. 1983. Deep-freezing of cow "half and quarter" embryos. Theriogenology, 19:49-54.
7. Mullen, R.J., W.K. Whitten and S.C. Carter. 1970. Annual report of the Jacson Laboratory, Bar. Harbor, Maine., 67.
8. Nagashima, H. and S. Ogawa. 1981. Studies on the developmental potential and survival after the deep freezing of microsurgically dichotomized morula embryos in rats and rabbits. Jap. J. Anim. Reprod., 27:12-19.
9. Nagashima, H., K. Matsui, T. Sawasaki and Y. Kano. 1984. Production of monozygotic mouse twins from microsurgically bisected molurae. J. Reprod. Fert., 70:357-362.
10. Nicholas, J.S. and B.V. Hall. 1942. Experiments on developing rats. II. The development of isolated blastomeres and fused eggs. J. Exp. Zool., 90:441-459.
11. Ozil, J.P., Y. Heyman and J.P. Renard. 1982. Production of monozygotic twins by micro-manipulation and cervical transfer in the cow. Vet. Med., 110:126-127.
12. Schilling, E., H. Niemann and D. Smidt. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. Cryobiology, 15:245-248.
13. Shea, B.F., J.P.A. Latour, K.N. Berdin and R.D. Baker. 1976. Maturation *in vitro* and the subsequent fertilizability of extra follicular bovine oocytes. J. Anim. Sci., 43:809-815.
14. Takeda, T., T. Takedomi and T. Onihara. 1987. Development blastomeres isolated at the 4-cell or 8-cell stage and embryos after bisection at the morulae and blastocyst stage in the mouse. Theriogenology, 31(1):262 (Abstracts).
15. Tarkowski, A.K. 1959a. Experiments on the

- development of isolated blastomeres of mouse eggs. *Nature*, 184:1286-1287.
16. Tarkowski, A.K. 1959b. Experimental studies on regulation in the development of isolated blastomeres of mouse egg. *Acta. Theriogenology*, 3:181-267.
 17. Tominaga, K., M. Fukushima and Y. Hataya. 1991. Influence of culture condition before freezing on developmental capacity *in vitro* and *in vivo* of bovine frozen-thawed split embryos. *Jap. J. Reprod. Tech.*, 13(2):65-74.
 18. Willadsen, S.M. 1979. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature*, 277:298-300.
 19. Willadsen, S.M., H. Lehn-Jensen, C.B. Fehilly and R. Newcomb. 1981. The production of monozygotic twins of preselected parentage by micromanipulation of non-surgically collected cow embryos. *Theriogenology*, 15: 23-29.
 20. Williams, T.J., R.P. Elsdon and G.E. Seidel, Jr. 1982. Identical twin bovine pregnancies derived from bisected embryos. *Theriogenology*, 17:114.
 21. Wilton, L.T., J.M. Shaw and A.O. Trounson. 1989. Successful single-cell biopsy and cryopreservation of preimplantation mouse embryos. *Fert. Steril.*, 51:513-517.
 22. Wilton, L.J. and A.O. Trounson. 1989. Biopsy of preimplantation mouse embryos : Development of micromanipulated embryos and proliferation of single blastomeres *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 40:145-152.
 23. 오원진, 김상근. 1994. 돼지 분할 수정란의 급속동결 융해후 생존율에 관한 연구. *한국가축번식학회지*, 18(1): 31-37.