

소 초기배 분할후 생존성과 체외발생율에 관한 연구†

김상근 · 山田倫子* · 석호봉**

충남대학교 수의과대학

Studies on the Survival and *In Vitro* Developmental Rates after Bisection of Bovine Embryos

Kim, S. K., Y. Noriko* and H. B. Seok**

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University

SUMMARY

This study was carried out to investigate on the survival and *in vitro* developmental rates of bisected bovine embryos by microblade, micropipette and pronase methods. Bisected embryos cultured for 1~7 days in TCM-199 media with 10 FCS + hormones. Survival and *in vitro* developmental rates was defined on *in vitro* culture or FDA-test.

The results are summarized as follows :

1. The survival and *in vitro* developmental rates of bisected bovine embryos by microblade, micropipette and pronase methods were 22.2, 16.7, 15.0% and 22.2, 23.3, 18.8%, respectively. *In vitro* developmental rate of bisected bovine embryos was significantly lower than that of non-bisection embryos(27.8% and 25.0%).
2. *In vitro* developmental rates of bovine embryos bisected for 1, 2, 4, 8, 16 cells stages during *in vitro* culture in 10% FCS + TCM-199 media were 25.0, 20.0, 20.0, 15.0 and 6.7%, respectively.
3. *In vitro* developmental rates of intact and free-zona pellucida of bisected demi-embryos during *in vitro* culture in 10% FCS + TCM-199 media were 25.6, 16.7%, respectively.
4. *In vitro* developmental rates of biopsied embryos and biopsied blastomeres during *in vitro* culture in 10% FCS + TCM-199 media were 20.0, 11.1%, respectively.

(Key words : Bisection, Demi-embryos, *In vitro* culture, Survival rates, *In vitro* developmental rates)

I. 서 론

최근 수정란 이식분야의 연구에 유전공학적 기법이 도입됨에 따라 체외수정, 쌍태유기, 성 판별, 수정란의

동결, 유전자와 핵 이식 및 복제동물의 생산 등 여러 분야에서 활발한 연구가 수행되어 괄목할 만한 연구결과들을 제시하고 있다. 이러한 첨단기술들을 활용하여 수정란 이식술의 이용분야를 확대하고 산업화된 기술로 발전시키기 위해서는 수정란의 대량생산, 보존기술

† 이 논문은 과학재단 핵심연구(961-0607-169-2) 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

* 일본 帶廣畜産大學 獸醫學科(Department of Veterinary Medicine, Obihiro University of Veterinary Medicine)

** 단국대학교 농과대학(College of Agriculture, Dankook University)

과 분할배의 생산에 의한 쌍자생산 및 복제동물의 생산 등 유전공학적 기술 개발이 절실히 요청된다 하겠다.

근래에는 초기배의 분할과 이식에 관한 연구가 실험동물을 위주로 이루어지고 있으나 소나 돼지와 같은 경제가축의 분할배의 배양방법과 배양체계 및 분할후 체외발생율과는 큰 차이가 있기 때문이다. 초기배의 미세조작에 의한 분할배의 작출과 관련한 연구는 초기배를 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, 1968; Heyman, 1989; 김 등, 1995). 초기배를 미세조작에 의해 분리한 분할배의 작성은 생쥐 2세포기 배를 이용하여 성공한 Nicholas와 Hall(1942)에 이어, 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 얻었다고 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-Jenson과 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 소 수정란은 다른 가축에 비하여 체외발생 능력이 떨어질 뿐만 아니라 분할란은 생존성이 저조하여 이의 개선이 시급한 과제라고 생각된다.

이에, 본 연구는 소 초기배를 미세조작에 의해 분할시 분할방법, 분할시 cell stage, 투명대 부착 여부 및 할구상태 등이 생존율과 체외발생율에 미치는 영향을 조사하고자 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 난포란의 회수

도축장의 도살 한우로부터 난소를 적출하여, 100 IU/ml의 penicillin G와, 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate를 첨가한 38 $^{\circ}$ C의 생리식염수에 침지하여 실험실로 옮긴 다음 난포액을 흡입하여 petridish에 채취한 후 실험현미경(20~40 \times)하에서 난포란을 회수하였다.

2) 난포란의 배양

배양액은 10%(v/v)의 FCS(Sigma, USA)와 1 μ g/ml의 FSH(Sigma, USA), 2 IU/ml의 HCG(Sigma, USA), 1 μ g/ml의 β -estradiol(Sigma, USA), 100 IU/ml의 penicillin G 및 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate가 첨가된 TCM-199(Whittaker, USA) 배양액으로 배양하였다.

2. 방 법

1) 난포란의 체외성숙

난포란의 체외성숙은 배양액 50 μ l 소적을 mineral oil(Squibb Co., USA)로 피복하여 배양 2~3시간전에 CO₂ 배양기내(5% CO₂, 95% air, 38.5 $^{\circ}$ C)에서 5~6시간 평형시킨 후 5개의 난포란을 주입하여 24시간 성숙배양하였다.

2) 체외수정

체외수정은 성숙배양한 난포란을 45 μ l의 수정용 배양액 drop에 5개의 난포란을 주입한 후, 시험관내에서 BO액 1 ml에 용해한 정액 0.2 ml를 혼합하여 CO₂ 배양기에서 swim-up 처리후, 상층액을 배양액으로 500 rpm, 10분간 2회 원심분리하여 세척하고 정자괴를 동량의 100 μ g/ml의 heparin(Sigma, USA)과 희석하여 15분간 CO₂ 배양기에서 수정능획득을 유지시킨 정자부유액 2 μ l(1.5 \times 10⁶/ml)로 매정하여 수정으로 판정된 배를 이용하였다.

3) 수정란의 분할

초기배의 분할은 micromanipulator(Narishige Co., Japan)가 부착되어 있는 도립현미경 stage위 petri dish내에 10% FCS + TCM-199배양액 drop

중에 배를 넣어 보정용 pipette으로 배를 흡인 고정한 후 반대측에서 투명대로부터 배세포피가 나오지 않을 정도로 15° 각도의 microblade (Feather Co., Japan)로 눌러 배를 분할하거나, 제작한 micropipette을 이용하여 분할하거나, 초기배를 0.03%의 pronase로 처리하여 투명대를 연화시켜 제거한 후 micropipette으로 분할하고 공투명대에 주입후 배양하였다. 분할배는 배의 크기와 배륜부의 선명도 등의 형태적 관찰에 의해 발생상태를 관찰하면서 excellent, good으로 판정된 분할배만을 선별하여 시험에 이용하였다.

4) 생존성 및 체외발생율의 검사

분할 초기배를 배양액으로 3회 세척후 10% FCS + TCM-199 배양액으로 배양하면서 배의 발생상태를 관찰하거나, FDA(fluorescence diacetate) test에 의해 생사 여부를 판정하였다(Schilling, 1982).

III. 결과 및 고찰

1. 분할방법에 따른 초기배의 생존율과 체외발생율

소 초기배를 microblade와 micropipette의 미세 조작에 의해 분할한 후 공 투명대에 주입한 분할초기배

와, pronase를 처리하여 투명대를 연화시킨 후 분할한 다음 공투명대에 주입한 분할배를 각각 배양하였을 때 생존율과 체외발생율은 Table 1, 2와 같다.

초기배의 분할시 분할방법에 따른 생존율은 microblade과 micropipette 및 pronase법에 의해 미세조작 후 공 투명대에 주입하여 배양하였을 때의 생존율은 각각 22.2, 16.7, 15.0%였으며, 또한 상실배 및 배반포로의 체외발생율은 각각 22.2, 13.3, 18.8%로서 microblade에 의한 방법이 가장 높은 생존율과 체외발생율을 나타냈다. 이러한 결과는, 시험동물은 다르지만 mouse 4세포기의 분할배를 체외배양하였을 때 상실배 또는 배반포까지의 체외발생율은 81.4%였다고 보고한 Wilton과 Trounson(1989)의 결과와 비교할 때 저조한 성적이었으나, 생쥐의 8 세포기 분할배의 체외배양율은 12.9%라고 보고한 Takeda 등(1989)의 결과와는 유사한 성적이었다. 한편, Willadsen(1979), 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 나타냈다고 보고하였으며, 또한, Willadsen(1979)은 면양의 8 세포기의 분할배를 상실배까지 유기배양에 성공하였

Table 1. Effects of bisection method on the survival rate of bisected bovine embryos

Culture of embryos	No. of oocytes examined	Degree of FDA test						Survival rate(%)
		A	B	C	D	E	F	
Control	18	0	5	5	2	3	3	5(27.8)
Bisection method								
Microblade	18	2	5	4	3	2	2	4(22.2)
Micropipette	18	3	5	4	3	2	1	3(16.7)
Pronase method	20	2	6	5	2	2	1	3(15.0)

Table 2. Effects of bisection method on *in vitro* developmental rate of bisected bovine embryos

Culture of embryos	No. of demi-embryos	No. (%) of embryos developed		No. (%) of blastocyst developed
		Normal	Abnormal or degenerated	
Control	20	8(40.0)	12(60.0)	5(25.0)
Bisection method				
Microblade	18	7(38.9)	11(61.1)	4(22.2)
Micropipette	15	5(33.3)	10(66.7)	2(13.3)
Pronase method	16	4(25.0)	12(75.0)	3(18.8)

Table 3. Effects of bisection cell stages on *in vitro* developmental rate of bisected bovine embryos

Culture of embryos	No. of demi-embryos	No. (%) of embryos developed		No. (%) of blastocyst developed
		Normal	Abnormal or degenerated	
Control	20	9(45.0)	11(55.0)	6(30.0)
Cell stage				
1 cell	20	8(40.0)	12(60.0)	5(25.0)
2 cells	20	7(35.0)	13(65.0)	4(20.0)
4 cells	20	5(25.0)	15(75.0)	4(20.0)
8 cells	15	3(20.0)	12(80.0)	2(15.0)
16 cells	15	2(13.3)	13(86.7)	1(6.7)

Table 4. Effects of intact and free-zonea pellucida on *in vitro* developmental rate of bisected bovine embryos

Culture of embryos	No. of demi-embryos	No. (%) of embryos developed		No. (%) of blastocyst developed
		Normal	Abnormal or degenerated	
Control	20	6(30.0)	14(70.0)	6(30.0)
Demi-embryos				
Intact zona	20	6(30.0)	14(70.0)	5(25.0)
Free-zonea	18	5(27.8)	13(72.2)	3(16.7)

으며, 한편, McEvoy와 Sreenan(1987)은 토끼에 있어서 투명대를 제거하지 않고 분할하여 이식에 성공하였다고 보고하였다.

2. 초기배의 분할시 cell stage별 체외발생율

1-32 세포기의 초기배를 cell stage별로 micromanipulator에 의해 분할한 다음 공투명대에 주입하여 각각 배양하였을 때 분할배의 상실배 또는 배반포로의 체외발생율은 Table 3과 같다.

초기배를 1, 2, 4, 8, 16 cell stage별로 micromanipulator로 미세조작하여 분할하였을 때의 체외발생율은 각각 25.0, 20.0, 20.0, 15.0, 6.7%로서 cell stage가 빠를수록 체외발생율이 높게 나타났다. 이러한 결과는 시험동물은 다르지만 분할시 cell stage에 있어서는 초기배를 이용하는 것이 생존율과 체외발생율이 높다는 Takeda 등(1989), Wilton과 Trounson(1989) 등의 보고들과 유사한 결과이었으며, 대체로 1~16 cell stage 이내의 배를 이용하여 분할하는 것이 가장 높은 체외발생율을 얻을 수 있을 것으로 사료되었다.

3. 투명대 부착 및 미부착 분할배의 체외발생율

소 초기배를 미세조작에 의해 분할후 공투명대에 주입한 절단 투명대 부착 분할배와 pronase처리 또는 pipetting으로 투명대를 제거한 투명대 미부착 분리배를 배양하였을 때 체외발생율은 Table 4와 같다.

분할 초기배를 투명대 부착 또는 미부착배를 각각 배양하였을 때 체외발생율은 각각 25.0%와 16.7%로서 미분할 대조군의 30.0%에 비해 저조한 체외발생율을 나타냈다. 본 시험결과는 소 초기배를 분할한 후 공투명대에 주입한 투명대 부착 및 미부착배를 체외배양하였을 때 30.8% 및 25.0%의 체외발생율을 나타냈다는 김 등(1996)의 보고에 비해 약간 높은 성적이었다. 한편, Wilton과 Trounson (1989)의 mouse 분할배를 체외배양했을 때 배반포로의 발생율 81.4%와 비교할 때 현저히 낮은 성적이었으나, Takeda 등(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)

Table 5. Effects of biopsied embryos and blastomeres on *in vitro* developmental rate of bovine embryos

Culture of embryos	No. of demi-embryos	No.(%) of embryos developed		No.(%) of blastocyst developed
		Normal	Abnormal or degenerated	
Control	20	6(30.0)	14(70.0)	6(30.0)
Demi-embryos				
biopsied embryos	20	6(30.0)	14(70.0)	4(20.0)
biopsied blastomeres	20	6(30.0)	14(70.0)	3(15.0)

은 분리한 수정란을 배양하여 57%이상의 상실배와 배반포까지의 발생율을 얻었으며, 아울러 2, 4세포기의 수정란을 분리 배양후 이식하여 각각 68%와 50%의 임신율을 나타냈다고 보고하였으며, Mullen 등 (1970)은 2세포기의 할구를 분리한 후 체외배양중 재분리하여 산자를 얻는데 성공하였다.

4. 할구상태

소 초기배를 aspiration pipette을 이용하여 할구를 분리하여 조작한 초기배(biopsied embryos)와 micromanipulator에 의해 분리한 단일할구(biopsied blastomere)를 배양하였을 때 체외발생율은 Table 5와 같다.

초기배를 aspiration pipette을 이용하여 할구를 분리하여 조작한 초기배(biopsied embryos)와 micromanipulator에 의해 분리한 단일할구(biopsied blastomere)를 배양하였을 때 체외발생율은 각각 20.0%와 15.0%로서 저조한 체외발생율을 나타냈다. 본 시험결과와 시험 대상동물은 다르지만, 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 한 Wilton과 Trounson (1989)의 보고에 비해 현저한 차이가 있었다.

한편, Mullen 등(1970)은 생쥐 2세포기의 할구를 분리한 후 체외배양중 재분리하여 산자를 얻는데 성공하였으며, 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 보

고하였다. 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) 되었다.

IV. 적 요

본 연구는 소 초기배의 분할후의 생존성과 체외발생율을 구명하기 위하여 초기배를 미세조작에 의해 분할시 분할방법, cell stage, 투명대 부착과 미부착 및 할구상태가 생존율 및 체외발생율에 미치는 영향을 조사하였다.

1. 소 초기배를 microblade, picropipette, pronase법에 분할후 공투명대에 주입후 배양하였을 때 생존율과 체외발생율은 각각 22.2, 16.7, 15.0 및 22.2, 13.3, 18.8%로서 미분할배의 생존율과 체외발생율에 비해 현저하게 낮았다.
2. 소 초기배를 1~16 cell stage별로 micromanipulator로 미세조작하여 분할후 배양했을 때 체외발생율은 각각 25.0, 20.0, 20.0, 15.0, 6.7%로서 cell stage가 빠를수록 체외발생율이 높게 나타났다.
3. 소 초기배를 미세조작에 의해 분할한 초기배의 투명대 부착 미부착배를 배양하였을 때 체외발생율은 각각 25.6%와 16.7%로서 미분할 대조군의 30.0%에 비해 저조한 체외발생율을 나타냈다.
4. 소 초기배를 aspiration pipette을 이용하여 할구를 분리하여 조작한 초기배(biopsied embryos)와 micromanipulator에 의해 분리한 단일할구(biopsied blastomere)를 배양하였을 때

각각 20.0%와 15.0%의 체외발생율을 나타냈다.

V. 인용문헌

1. Heyman, Y. 1989. Factors affecting the survival of whole and half embryos transferred in cattle. *Theriogenology*, 23:63-75.
2. Lehn-Jenson, H. and S. M. Willadsen. 1983. Deep-freezing of cow "half and quarter" embryos. *Theriogenology*, 19:49-54.
3. McEvoy, T. G. and J. M. Sreenam. 1987. The survival of bisected cattle embryos without zona pellucida. *Theriogenology*, 27:257 (Abstracts).
4. Mullen, R. J., W. K. Whitten and S. C. Carter. 1970. Annual report of the Jacson Laboratory. Bar. Harbor, Maine., 67.
5. Nagashima, H. and S. Ogawa. 1981. Studies on the developmental potential and survival after the deep freezing of microsurgically dichotomized morulae embryos in rats and rabbits. *Jap. J. Anim. Reprod.*, 27:12-19.
6. Nagashima, H., K. Matsui, T. Sawasaki and Y. Kano. 1984. Production of monozygotic mouse twins from microsurgically bisected morulae. *J. Reprod. Fert.*, 70:357-362.
7. 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.
8. Ozil, J. P., Y. Heyman and J. P. Renard. 1982. Production of monozygotic twins by micromanipulation and cervical transfer in the cow. *Vet. Med.*, 110:126-127.
9. Schilling, E., H. Niemann and D. Smidt. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. *Cryobiology*, 15:245-248.
10. Takeda, T., T. Takedomi and T. Onihara. 1989. Development blastomeres isolated at the 4-cell or 8-cell and 16 cell stage embryos after bisection at the morulae and blastocyst stage in the mouse. *Therio.*, 31(1):262 (Abstracts).
11. Tarkowski, A. K. 1959a. Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. *Nature*, 184:1286-1287.
12. Tarkowski, A. K. 1959b. Experimental studies on regulation in the development of isolated blastomeres of mouse egg. *Acto. Theriogenology*, 3:181-267.
13. Willadsen, S. M. 1979. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature*, 277:298-300.
14. Willadsen, S. M., H. Lehn-Jenson, 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.
15. Williams, T. J., R. P. Elsdon and G. E. Jr. Seidel. 1982. Identical twin bovine pregnancies derived from bisected embryos. *Theriogenology*, 17:114.
16. 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.
17. 김상근, 이명현, 서길웅. 1995. 돼지 분할 수정란 및 미성숙란의 생존율에 관한 연구. *한국가축번식학회지*, 19(2):129-134.
18. 김상근, 이종진, 이명현. 1996. 소 초기배의 분할 후 생존율과 체외발생율에 관한 연구. *한국가축번식학회지*, 19(4):265-270.

(접수일자 : 1997. 8. 25. / 채택일자 : 1997. 9. 26.)