

분할방법 및 투명대 부착 여부가 분할 초기배의 체외발생에 미치는 영향에 관한 연구

이종진 · 남윤이 · 김상근
충남대학교 수의과대학

Studies on the Effects of Bisection Method and With and Without-Zona Pellucida of Bovine Embryos on *In Vitro* Developmental Rates

J. J. Lee, Y. Y. Nam and S. K. Kim

Coll. of Vet. Med., Chungnam Natl. Univ.

SUMMARY

The studies were carried out to investigate the effects of bisection method and with and without-zona pellucida of embryos on *in vitro* developmental rate bisected embryos by micromanipulator, micropipette and pipetting. The ovaries were obtained from slaughtered Korean native cows. The follicular oocytes were cultured in TCM-199 medium containing 10 IU/ml의 PMSG(Sigma, USA), 10 IU/ml의 hCG, 1 μ g/ml의 β -estradiol(Sigma, USA) and 10% FCS for 24~48 hrs in incubator with 5% CO₂ in air at 38.5 $^{\circ}$ C and then, matured oocytes were again cultured for 12~18 hrs with motile capacitated sperm by preincubation of heparin. Bisected embryos cultured for 1~5 days in 20% FCS + TCM-199 medium. Survival rate was defined as developmental rate on *in vitro* culture or FDA-test.

The results are summarized as follows :

1. The survival rates of bisected bovine embryos by micromanipulator and micropipett were 29.2% and 19.1%, respectively. The rates of non-bisection embryos(46.7%) were significantly higher than those of bisection embryos.
2. The *in vitro* developmental rates of bisected bovine embryos by micromanipulator, micropipett and pipetting method were 32.4%, 19.4% and 25.6%, respectively.
3. The *in vitro* developmental rates of with and without-zona pellucida of bisected bovine embryos by micromanipulator were 30.8% and 25.0%, respectively. The rates of nonbisection embryos(53.1%) were significantly higher than those of bisection embryos.

(Key words : bovine embryos, bisection method, zona pellucida, *in vitro* development)

서 론

수정란 이식분야의 연구에 유전공학적인 기법이 도

입됨에 따라 체외수정, 수정란의 동결, 쌍태유기, 성 감별, 유전자와 핵 이식 및 복제동물의 생산 등의 분야에서 활발한 연구들이 수행되고 있다. 이러한 첨단기술들을 활용하여 산업화된 기술로 발전시

키기 위해서는 가축수정란의 대량생산 체계의 확립과 생존성이 높은 동결보존 및 분할기법의 확립이 시급히 요청된다.

수정란을 이용한 분할배의 작출은 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(Lehn-Jenson과 Willadsen, 1983; 오와 김, 1994; 김 등, 1996). 수정란을 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 상심배와 배반포까지의 발생률과 2, 4세포기의 수정란을 분리 배양 후 이식하여 각각 68%와 50%의 임신율을 얻었으며, Mullen 등(1970)은 2세포기의 할구를 분리한 후 체외배양중재분리하여 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 용해 후에 이식하여 각각 52.6%와 52.4% 및 62.2%와 62.9%의 태아발생률을 보고하였다. 초기배를 이용한 분할배의 작성에 의해 염색체 분석 또는 일란성 쌍자에 성공한 예는 있으나, 현재로서는 기술의 확립이 이루어지지 않아 초보적 단계에 지나지 않는 실정이다.

이에, 본 연구는 소 수정란을 micromanipulator와 micropipette에 의해 분할 후 배양에 따른 생존률과 체외발생률에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

1) 난포란의 회수

도살한우의 난소를 적출하여, 100 IU/ml의 penicillin G와 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate를 첨가한 38 $^{\circ}$ C의 생리식염수에 침지하여 실험실로 운반한 다음, 난포액을 흡입하여 petri dish에 채취한 후 실체현미경(20~40 \times)하에서 난포란을 회수하여 배양액으로 3회 세척 후 CO₂ 배양기내(5% CO₂, 95% air, 38.5 $^{\circ}$ C)에서 배양하였다.

2) 배양액

기본배양액은 10%(v/v)의 FCS와 100 IU/ml의 penicillin G 및 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate가 첨가된 TCM-199(Bioproducts Co., USA) 배양액을 이용하였으며, 사용전 0.2 μ m millipore filter로 여과 멸균 후 사용하였다.

2. 방 법

1) 난포란의 체외성숙 및 체외수정

난포란의 체외성숙은 배양액 50 μ l의 drop을 mineral oil(Squibb Co., USA)로 피복하여 drop당 5개의 난포란을 침지하여 24시간 성숙배양하였다. 체외수정은 주위의 난구세포를 pipetting에 의하여 일부 제거한 다음 mineral oil로 피복한 45 μ l의 drop에 5개의 난포란을 주입한 후, 수정용 TCF액 1 ml에 정액 0.2 ml를 혼합하여 CO₂ 배양기에서 swim-up 처리 후, 상층액을 2,000 rpm으로 10분간 2회 원심 분리하여 세척한 다음 정자 pellets를 동량의 100 μ g/ml의 heparin(Sigma, USA)이 첨가된 BO액으로 희석하여 15분간 CO₂ 배양기에서 수정능획득을 유지시킨 정자부유액 2 μ l(1.5 \times 10⁶ cells/ml)로 매정하였다.

2) 수정란의 분할

초기배의 분할방법은 micromanipulator(Narishige Co., Japan)가 부착되어 있는 도립현미경 stage위 샤프레대의 10% FCS + TCM-199 배양액 drop중에 배를 넣어 보정용 pipette으로 배를 흡인 고정된 후 반대측에서 투명대로부터 배세포피가 나오지 않을 정도로 15 $^{\circ}$ 각도의 microblade(Feather

Co., Japan)로 눌러 embryo를 분할하거나, 수정란을 0.03%의 pronase로 처리하여 투명대를 연화시켜 투명대를 제거한 후 micropipette으로 분할하고 공투명대에 주입후 배양하였다. 분할배는 배의 크기와 배륜부의 선명도 등의 형태적 관찰에 의해 발생상태를 관찰하면서 excellent, good 분할배만을 선별하여 시험에 이용하였다.

3) 생존성 및 체외발생률의 판정

생존성 및 체외발생의 판정은 수정란을 신선한 PBS로 3회 세척하고 TCM-199 배양액으로 배양하면서 상실배 후기 및 배반포기로의 발생상태를 관찰하거나, FDA-test에 의해 생존 여부를 판정하였다(Schilling 등, 1982).

결과 및 고찰

1. 수정란의 분할 후의 생존률과 체외발생률

1) 초기배의 분할 후의 생존률

소 수정란을 micromanipulator에 의해 분할한 후 공투명대에 주입한 분할 초기배와, pronase처리에 의해 투명대를 연화시켜 micropipette에 의해 분할한 후 분리할구를 흡입하여 공투명대에 주입한 분할 초기배를 FDA-test에 의해 판정한 생존률은

Table 1과 같다.

초기배를 micromanipulator에 의한 미세조작과 micropipette에 의한 조작후 공투명대에 주입한 분할 초기배의 생존률은 각각 29.2%와 19.1%로서 micromanipulator에 의한 방법이 높은 생존률을 나타냈으나, 미분할 대조구의 46.7%에 비해 낮은 생존률을 나타냈다. 이러한 시험결과는 대상동물은 다르지만 생쥐 수정란을 이용하여 투명대 제거배에서 VS-3용액으로 동결 융해했을 때 48%의 생존률을 나타냈다는 Bielanski(1987)의 결과에 비해 저조하였으나 김* 등(1996)의 33.3%와 26.7%와 유사한 결과이었다. 한편, Hsu 등(1986)은 생쥐의 투명대 제거배 및 투명대내 귀납한 분할배를 동결 융해한 바, 5개중 3개의 투명대 제거배와 2개의 분할배 모두를 배반포까지 발육시켰다고 보고하였다.

2) 분할 초기배의 체외발생률

소 초기배의 분할후의 배양시 체외발생률은 Table 2에서 보는 바와 같이, 초기배를 micromanipulator에 의해 분할후 공투명대에 주입한 분할 초기배와, pronase에 의해 투명대를 연화시킨 후 micropipette으로 할구를 흡입시킨 후 공투명대에 주입한 절단 2분배와 pipetting으로 투명대를 제거 후 분리한 분할 초기배의 체외발생률은 32.4, 19.4, 25.6%로서 분할법에 따라 체외발생률에 차이가 있

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

Culture of embryos	No. of embryos examined	Degree of FDA test						Survival rate(%)
		A	B	C	D	E	F	
Control	30	2	4	4	6	5	9	14(46.7)
Bisection method								
Micromanipulator	48	6	10	8	10	8	6	14(29.2)
Micropipett	42	8	8	8	10	6	2	8(19.1)

Table 2. Effects of bisection methods on the *in vitro* develop mental rates of bisected bovine embryos

Culture of embryos	No. of demiembrs	No. of embryos developed	
		Normal	Abnormal or degeneration
Control	32	17(53.1) ^a	15(46.9)
Micromanipulator	34	11(32.4)	23(67.6)
Micropipetts	36	7(19.4) ^b	29(80.6)
Pipetting	32	5(15.6)	27(84.4)

a, b : Percentage followed by different letters within the same column differ significantly ($p < 0.05$)

Table 3. Effects of with and without-zona pellucida on the *in vitro* developmental rates of bisected bovine embryos

Culture of embryos	No. of demiembryos	No. of embryos developed	
		Normal	Abnormal or degeneration
Control	32	17(53.1) ^a	15(46.9)
Demi-embryos			
Intact-zona	26	8(30.8) ^b	18(69.2)
Free-zona	24	4(25.0)	20(83.3)

a, b : Percentage followed by different letters within the same column differ significantly ($p < 0.05$)

었다. 이러한 결과는 시험 대상동물은 다르지만, Wilton과 Trounson(1989)의 mouse 분할배의 배반포로의 발생률 81.4%와 비교할 때 현저히 낮은 성적이었으나, Takeda 등(1984)의 8세포기 분할배의 체외배양률 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, Mullen 등(1970)은 2세포기의 할구를 분리한 후 체외배양중 재분리하여 산자를 얻는데 성공하였다.

3) 투명대 부착, 미부착 분할배의 체외발생률

투명대 부착 및 미부착 분할 초기배의 체외발생률은 Table 3에서 보는 바와 같이, 분할 초기배의 투명대 부착 및 미부착배를 배양하였을 때의 체외발생률은 각각 30.8%와 16.7%로서 투명대 부착 여부에 따라 체외발생률에 차이가 있었으며, 또한 미분할 대조군의 53.1%에 비해 저조한 체외발생률을 나타냈다. 이러한 관련한 연구보고는 주로 mouse를 대상으로한 결과이므로 상대적으로 비교하기는 어렵지만 투명대 부착 여부가 차이가 있다는 결과와는 일치되는 경향이였다. Willadsen(1979)과 Willadsen 등(1981)은 분리한 수정란을 배양하여 57% 이상의 상실배와 배반포까지의 발생률을 얻었으며, 아울러 2, 4세포기의 수정란을 분리 배양후 이식하여 각각 68%와 50%의 임신율을 나타냈다고 보고하였다.

적 요

본 연구는 소 초기배를 micromanipulator와 micropipett 및 pipetting에 의해 분할 후 배양에 따른 생존성과 체외발생률을 조사하였다.

1. 초기배를 micromanipulator와 micropipette에 의해 분할 후 배양하였을때 생존률은 각각 29.2%와 19.1%로서 대조군의 46.7%에 비해 낮은 생존률을 나타냈다.
2. 소 초기배를 micromanipulator에 의해 분할후 공투명대에 주입한 분할 초기배와, pronase에 의해 투명대를 연화시킨 후 micropipette으로 할구를 흡입시킨 후 공투명대에 주입한 절단 2분배와 pipetting으로 투명대를 제거후 분리한 분할 초기배의 체외 발생률은 각각 32.4%, 19.4%, 25.6%이었다.
3. 투명대 부착 및 미부착 분할 초기배를 각각 배양하였을때 체외발생률은 30.8%와 25.0%로서 미분할 대조군의 53.1%에 비해 낮은 생존률을 나타냈다.

참고문헌

- Bielanski A, 1987. Survival *in vitro* of zona pellucida-free mouse embryos after cooling conventional two step or vitrification methods. *Cryo-Letters*, 8:294-301.
- Hsu TT, Yamakawa H, Yamanoi H and Ogawa J. 1986. Survival and transfer test of mouse embryos frozen by vitrification method. *Japan J. Anim. Reprod.*, 32:29-32.
- Lehn-Jenson H and Willadsen SM. 1983. Deep-freezing of cow "half and quarter" embryos. *Theriogenology*, 19:49-54.

- Mullen RJ, Whitten WK and Carter SC. 1970. Annual Report of the Jacson Laboratory, Bar. Harbor, Maine., 67.
- Nicholas JS and Hall BV. 1942. Experiments on developing rats. II. The development of isolated blastomeres and fused eggs. J. Exp. Zool., 90:441-459.
- Schilling E, Niemann H and Smidt D. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorecence microscopy. Cryobiology, 15: 245-248.
- Takeda T, Elsdén RP and Seider GE Jr. 1984. Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen. Theriogenology, 21:266(Abstract).
- Tarkowski AK. 1959a. Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. Nature, 184:1286-1287.
- Tarkowski AK. 1959b. Experimental studies on regulation in the development of isolated blastomeres of mouse egg. Acto. Theriogenology, 3:181-267.
- Willadsen SM. 1979. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. Nature, 277: 298-300.
- Willadsen SM, Lehn-Jensen H, Fehilly CB and Newcomb R. 1981. The production of monozygotic twins of preselected parentage by micromanipulation of non-surgically collected cow embryos. Theriogenology, 15:23-29.
- Wilton LT, Shaw JM and Trounson AO. 1989. Successful single-cell biopsy and cryopreservation of preimplantation mouse embryos. Fertil. Steril., 51:513-517.
- Wilton LJ and Trounson AO. 1989. Biopsy of preimplantation mouse embryos : Development of micromanipulated embryos and proliferation of single blastomeres *in vitro*. Biol. Reprod., 40: 145-152.
- 오원진, 김상근. 1994. 돼지 분할 수정란의 급속동결 융해후 생존율에 관한 연구. 한국가축번식학회지, 18(1):31-37.
- 김상근, 이종진, 이명현. 1996. 소 초기배의 분할후 생존율과 체외발생율에 관한 연구. 한국가축번식학회지, 19(4):265-270.