

aliquots of 10 μ l probe solution was added to the slide under a coverslip, and nuclear and probe DNA were denatured simultaneously for 3min, at 75°C. Slides were incubated at 37°C for overnight hybridization.

2. The biotin-labelled probes were detected by incubation with avidin-FITC and the signal was amplified by subsequent incubation with biotinylated goat-anti-avidin and a second layer of avidin-FITC. All incubations for the detection of the biotin-labelled probes were followed by washes with 4 \times SSC/0.05% Tween 20 at room temperature.

3. Finally, slides were mounted in antifade solution containing 0.5 μ g DAPI or 1 μ g/ml propidium iodide. Nuclei were examined with a Olympus microscope equipped for fluorescence with UV.

These results demonstrate that our bovine Y specific probe comprise a family clustered exclusively on the Y to metaphase, interphase nuclei, sperm and blastomere. Therefore, our 1.4 kilobase DNA probe specific for the Y chromosome can be used as a sensitive sexing method for bovine preimplantation embryos derived from IVF using FISH.

- 15 -

Cryopreservation of Mouse IVF/IVC Blastocysts by Vitrification

Maria Infertility Medical Institute
*Maria OB/GYN

Seun Eui Kim · Sang Jun Uhm ·
Eun Young Kim,
San Hyun Yoon* · Se Pill Park
and Jin Ho Lim

Vitrification, involves the addition of high concentrations of cryoprotectant and a very rapid freezing rate, circumvents intracellular ice formation, which is a major cause of cell death (Fahy et al., 1984). The first successful vitrification of mammalian embryos was achieved by Rall and Fahy (1985) with eight-cell mouse embryos.

This experiment was designed to find optimal conditions for obtaining high survival of mouse IVF/IVC blastocysts after vitrification. To produce blastocysts, B6CBA F1(C57BL/6, ♀ \times CBA/N, ♂) mouse eggs were inseminated with 1×10^6 spermatozoa/ml and cultured at 37°C in 5% CO₂ in air for 96 h. The rates of fertilization and development to blastocyst stage at day 4 of the eggs were 89.5% and 86.1%, respectively. The IVF/IVC blastocysts were divided into three stages of early, expanded and hatching at day, 4, individually. The vitrification solution used was EFS 40, contained 40% ethylene glycol diluted in DPBS medium containing 30% Ficoll plus 0.5 mol sucrose. The embryos were exposed to 20% ethylene glycol and EFS 40 in two steps at 25°C, vitrified in liquid nitrogen and warmed rapidly. To investigate the toxicity of vitrification solution, when embryos were exposed to the solution (EFS 40) at 25°C, 82.9~88.4% of blastocysts were re-expanded after 24 h of culture. And there were no significant differences between all three stages group and control group. When the expanded and hatching blastocysts were vitrified in EFS 40 and assessed by the re-expansion of the blastocoel after 24 h of culture, the postwarming survival rates of them (71.9% and 89.5%) were significantly higher than that of the early blastocysts (54.2%). The present result shows that vitrification can be routinely used to cryopreserve mouse embryos without loss of viability and it is expected that this simple and efficient

vitrification method using EFS 40 will be suitable for blastocysts produced *in vitro*.

- 16 -

소와 면양의 배아간세포 개발에 관한 연구

한국과학기술원 부설 생명공학연구소
Department of Animal Science,
Iowa State University, Ames, USA*

류재웅 · C. R. Youngs* · 한용만 · 이경광

배아간세포(embryonic stem cell, ES 세포)는 포유동물의 수정란으로부터 유래된 것으로 미분화 상태에서 무한히 증식할 수 있는 전능성을 지닌 세포이다. 생쥐에 있어서는 ES 세포주가 이미 확립되어 이를 이용한 질환모델동물개발 연구가 활발히 수행되고 있다. 그리고 일부 가축의 ES 유사세포 개발 연구가 보고되고 있지만, 이들 ES 세포주의 이용에 관한 연구보고는 아직 미미한 실정이다. 가축에 있어서 ES 세포주의 개발은 유용가축의 개량에 지대한 공헌을 할 것으로 기대된다. 이에 본 연구에서는 소와 면양의 수정란으로부터 배아간세포의 개발을 시도하였다.

도축장에서 채취된 소 난소의 2~6mm 가시 난포로부터 난포란을 회수한 다음, 10% FCS 가 첨가된 TCM199 배양액을 사용하여 22~24 시간 체외성숙을 실시하였다. 이들 난포란은 동결정자를 사용하여 10mM caffeine과 10 μ g/ml heparin이 첨가된 BO 배양액에서 6시간 체외수정을 유도하였다. 체외수정된 난자를 4~9일간 난구세포와 공동배양하여 상실배기에서 부화배반포기까지 발달시킨 다음, 이들 수정란을 실험에 공시하였다. 면양의 수정란을 얻기 위하여 발정주기 12일째 1200 IU PMSG를 각각의 암컷에 투여하여 다배란을 유도하였고 발정징후를 보이는 면양은 수컷과 아침, 저녁으로 자연교미를 실시한 후, 7~9일째 자궁으로부터 배반포기 배를 회수하였다.

ES 세포주 개발을 위한 배양액으로는 10%

FCS, 2mM L-glutamine, 0.1mM β -mercaptoethanol, 20 μ g/ml insulin이 첨가된 DMEM을 사용하였으며, mitomycin-C를 3시간 처리한 STO 단층배양세포에서 ICM 세포를 배양하였다. 또한 ICM 만을 직접 분리한 실험군과 Ionophore를 처리한 후 ICM을 분리한 실험군에서의 ES 유사세포 개발빈도를 비교 검토하였다.

소 및 면양의 수정란으로부터 분리한 내부세포괴를 STO 단층배양세포에서 5~10일간 배양한 후, ICM 만을 분리하여 신선한 STO 단층배양세포에서 반복하여 계대배양을 실시하였다. 그 결과, 소와 면양에 있어서 5~23대의 ES 유사세포주를 확립할 수 있었다. 이들 ES 유사세포에 대해 alkaline phosphatase(AP) 염색을 실시한 결과, 적색의 미분화 AP 양성반응이 확인되었다. 15~23대 계대배양한 소 ES 유사세포의 핵형을 분석한 결과, 70% 이상의 세포들이 정상적인 염색체수를 유지하고 있었으며, 소 23대 및 면양 20대 계대배양 ES 유사세포들의 체외 배분화 형성도 유도되었다. 이와 같이 소 및 면양의 ES 유사세포주에서 ES 세포주의 특성인 다능성을 확인할 수 있었다. 또한 ES 유사세포주 개발에 있어서 직접적으로 ICM 만을 분리하는 방법보다는 Inopohore의 처리후 ICM을 분리하여 배양한 실험군에서 유의적으로 높은 ES 유사세포 형성빈도를 보여주었다 ($P < 0.05$).

- 17 -

난포액이 생쥐난자의 체외성숙 및 시험관아기 임신율에 미치는 효과

한나여성의원, 건국대학교 동물자원연구센터*

지희준 · 구정진 · 김동훈 · 장상식 · 정길생*

시험관아기시술시 난자 및 수정란의 배양에 단백질원으로 널리 사용되어왔던 계대혈청은 그 준비과정 및 사용에 따르는 양적, 질적인 제한과 전염성질환 등의 감염위험성으로 다른 물질로