

## 생쥐卵자의 試驗管内 受精과 發達

全承宰·鄭吉生  
建國大學校畜産大學

### In Vitro Fertilization and Development of Mouse Eggs

Seung Jae Jeon · Kil Saeng Chung

College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

#### SUMMARY

These experiments were carried out to obtain the information about the optimal pH and osmolality affecting in vitro fertilization of the mouse eggs, to elucidate the 2-cell block to development in vitro and to find out the method of controlling the subsequent embryo development in vitro.

pH and osmolality was adjusted by adding NaCl or NaHCO<sub>3</sub> to the basic salt solution.

In vitro fertilization were carried out by introducing the cumulus masses to the suspension of epididymal spermatozoa at each pH, osmolality, and 10 $\mu$ M-EDTA medium.

The results obtained in these experiments were summarized as follows:

1. The fertilization rates in vitro at each medium of 235, 252, 269, 286, 306, 323, 345, 368, 393 mosmol were 15.6, 38.2, 65.7, 75.6, 80.9, 74.3, 58.1, 35.1, 24.3, 11.1%, respectively.
2. The fertilization rates in vitro at each medium of pH 6.1, 6.4, 6.7, 7.0, 7.3, 7.6, 7.9, 8.1 were 11.8, 17.9, 32.4, 61.9, 79.5, 76.7, 53.5, 13.6%, respectively.
3. In case of ICR female  $\times$  ICR male embryos, the development rate of 2-cell embryos to 4-8 cell embryos was 16.2% at normal medium, but the rate was increased to 49.3% in medium containing 10  $\mu$ M-DETA; In case of C3H female  $\times$  ICR male embryos, the development rate was 41.0% at normal medium, but the rate was increased to 71.7% at 10  $\mu$ M-EDTA-medium.

#### I. 緒論

Iwamatsu와 Chang(1969)이 최초로 精巢上體尾部の 精子를 使用하여 생쥐卵자의 試驗管内 受精을 成功시킨 以後, 생쥐卵자의 試驗管内 受精system은 哺乳動物 受精生理와 初期胚의 發達에 관한 깊은 理解를 可能하게 하였으며, 畜産分野에서도 家畜의 體外受精에 應用할 수 있는 基礎知識과 技術을 攄得케 할 수 있는 有用한 道具가 되고 있다. 그러나 Yanagimachi와 Chang(1964)이 golden hamster 卵자의 體外受精時 2-8細胞期의 胚發達이 抑制된다는 2-cell block現象을 처음으로 報告한 以後, 일부 系統의 생쥐卵자의 體外受精時에도 이러한 2-cell block現象이 나타난다는 報告가 提出되었다. 즉, To-

yoda와 Hosi(1983)는 ICR系統의 생쥐卵자의 試驗管内 受精 및 培養에 2-cell block이 나타나며, 培養液에 極微量의 EDTA-2Na(Ethylenediaminetetraacetic Acid)添加가 2-cell block을 克服하는데 有效하다고 發表하였다.

本宅驗은 생쥐卵자의 試驗管内 受精에 影響을 미치는 環境要因 중에서 最摘의 pH와 滲透壓을 檢討하는 한편(Bavister, 1969; Iwamatsu와 Chang, 1971; Miyamoto와 Chang, 1973; Miyamoto等, 1974; El-Badrawi와 Hafez, 1982), 培養液의 造成을 任意로 變化시켜, 必要로 하는 pH와 滲透壓을 維持하는 培養液의 製造에 관한 基礎知識과 技術을 攄得하기 위하여 實施하였으며(Brinster, 1965; Hoppe와 Pitts, 1973; Kane, 1974), ICR과 C3H 系統의 생쥐卵자의 in vitro 受精時에 나타나는 2-Cell bl-

ock을 克服하여 胚發達을 계속시키는 方法을 開發하고, 그 現象에 대한 原因을 究明하고자 하였다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 供試動物

實驗動物로서 암컷은 inbred ICR, C3H系統의 6-8週齡(體重21-30g)의 생쥐와, 수컷은 inbred ICR系統의 12週齡以上(體重31-40g)의 생쥐를 供試하였다.

### 2. 受精液의 製造

Hoppe와 Pitts(1973) 培養液의 造成 中에서 NaCl의 濃度를 調節하여 각기 다른 滲透壓의 受精液(pH7.4±0.05)을 製造하였으며, 同一한 培養液의 造成 中에서 NaHCO<sub>3</sub>의 濃度調節로 각기 다른 pH의 受精液을 製造하였으며 이 때 각 受精液의 滲透壓이 공히 310mosmol (calculated)이 되도록 NaCl의 濃度를 調節하였다. 그리고 10μM의 EDTA-2Na (Ethylenediaminetetraacetic Acid)을 同一한 培養液에 添加하여 滲透壓 290mosmol (calculated), pH 7.4±0.05의 受精液 및 培養液을 製造하였다.

製造된 모든 受精液들은 使用 12時間前에 0.2μm milipore filter (Gelman Sciences, Inc, U. S. A.) 로 濾過 除菌하였고, disposable petridish에 0.4ml (精子浮游 및 受精用 小滴), 0.05ml (培養用 小滴)의 受精液을 點滴한 다음, 그 위에 liquid paraffin oil (Junsei Chemical Co. Ltd.)을 부어서 5% CO<sub>2</sub>, 95% air, 37°C의 條件下에서 平衡을 시켰다. Paraffin oil은 150°C에서 40分間 滅菌시킨 다음 少量의 saline으로 平衡을 시켜 使用하였다.

### 3. 精子準備와 受精能獲得

頸椎切斷으로 屠殺한 생쥐의 精巢上體尾部를 外科的인 方法으로 切取하여, 準備된 Petridish 內의 Paraffin oil 아래에서 Cannula로 一定量의 精子塊 (dense mass of spermatozoa)를 回收하여 培養液에 옮겨 精子가 完全히 游游되도록 10分間 培養시킨 후, 이 中에서 micropipette으로 0.02ml를 취하여 受精液에 옮겨 80分間을 培養시킴으로써 精子가 受精能力을 獲得하게 하였으며, 이 때 精子의 濃度は 1.63~2.89×10<sup>5</sup>개/ml였다.

### 4. 多排卵誘起

午後 6時에 首當 5IU의 PMSG (Serotropin, 帝國臟器製藥, 日本)를 腹腔內 注射하였으며, 48時間後에 同一한 方法으로 5IU의 HCG (Chorulon, Intervet, Holland)를 注射하여 多排卵을 誘起시켰다.

### 5. 未受精卵의 回收

HCG를 投與한 지 14時間後에 頸椎切斷으로 屠殺, 外科的으로 卵管을 積出, paraffin oil아래에서, 卵管膨大部로부터 cannula로 未受精卵(cumulus mass)을 回收하였다.

### 6. 試驗管內 受精 (insemination) 및 受精率의 決定

回收된 未受精卵(cumulus mass)을 精子가 浮游되어 있는 受精小滴(0.4ml)에 cannula 끝으로 옮겨담아 受精을 시켰다. 이로부터 6時間동안 5% CO<sub>2</sub>, 95%air, 37°C의 條件下에서 培養시킨 후, Pipetting操作으로 卵子를 新鮮한 培養液으로 옮겨 3回洗滌하여 培養小滴(0.05ml culture drop)으로 옮겼다. 이 때 退行되는 卵子는 除去하였으며, 한개의 培養小滴에 10개 以內의 卵子를 넣어 주었다. 이 時刻부터 24時間동안 5%CO<sub>2</sub>, 95%air, 37°C의 條件下에서 培養시킨 後에 供試卵子數에 대한 2細胞期까지 發達이 進行된 胚의 數字를 計算하여 受精率을 決定하였다.

### 7. 胚의 發達과 EDTA

Hoppe와 Pitts(1973)의 培養液과 同一한 培養液에 10μM의 EDTA를 添加한 각각의 培養液에서 2細胞期까지 發達이 進行된 胚들(ICR female×ICR male)을 供試하여 48時間동안 5%CO<sub>2</sub>, 95%air, 37°C의 條件下에서 培養시켜 4-8細胞期까지 發達이 進行된 胚를 觀察하여 胚發達率을 計算하였다.

## III. 結果 및 考察

### 1. 滲透壓別 受精率

NaCl의 濃度調節로 각각의 滲透壓이 維持되는 受精液에서 생쥐卵子의 受精率은 Table 1에 提示한 바와 같이 滲透壓 306mosmol에서 80.9%로 가장 높았으며, 269-345mosmol에서 비교적 높은 受精率(58.1~80.9%)이 얻어졌다. 그러나 252mosmol以下와 368mosmol以上에서는 受精率이 急減하였다.

Table 1. Effect of osmolality on in vitro fertilization of mouse eggs.

Osmolalities (mosmol)		No. of eggs examined	No. of eggs developed to 2-cell stage	Fertilization Rate (%)
Calculated	Measured <sup>1.</sup>			
230	235±1.4	32	5	15.6
250	252±1.2	34	13	38.2
270	269±1.8	35	23	65.7
290	286±0.6	45	34	75.6
310	306±1.2	47	38	80.9
330	323±0.4	35	26	74.3
350	345±1.4	31	18	58.1
370	368±1.2	37	13	35.1
390	392±2.4	37	9	24.3
410	412±1.8	36	4	11.1

1. Mean Value±S. E.

이러한 결과는 CD-1 시스템의 생쥐卵자를 in vitro에서受精시켜 5-7시간을培養시킨 후 卵자를染色·固定하여 卵자內的精子頭部的 swelling, 前核의形成, 精子尾部的存在를顯微鏡으로觀察하여受精率을決定한 Miyamoto와 Chang(1973)의研究報告보다는滲透壓의各區間別受精率이 다소 낮은데, 그理由는精子가卵자에侵入하여精子頭部的 Swelling이 일어나고前核이形成되었다고해서만드시 2細胞期의胚까지發達이 계속되는 것이 아닌 때문인 것으로 생각된다.

Pursley와 Herman(1950)은牛精자의活力이滲透壓 235-360mosmol에서 계속維持되며, Olds와 VanDemark(1957)는牛의子宮液, 卵管液 및 卵胞液의滲透壓이 각각 353, 350 및 287mosmol이라고報告하였는데, 이는精子가암컷의生殖器道내에서는 비교적 넓은範圍의滲透壓의變化속에서도受

精能을獲得한다는 점을示唆한다. 특히牛精자의試驗管内受精能獲得은滲透壓 370-380mosmol의高獎培養法(HIS)으로可能하였다고 Brackett等(1980)과 Bondioli와 Wright(1983)는報告하였다. 이러한研究結果는 같은哺乳動物인 생쥐卵자의 in Vitro受精에 있어서도滲透壓 270-350calculated mosmol에서 비교적 높은受精率을 얻을 수 있었던理由를說明하는結果로思料된다.

2. pH別受精率

Bicarbonate의濃度を調節하여受精液의 pH를 0.3정도의間隔으로調整할 수 있었다(단, pH 7.9와 8.1區間의間隔은 0.2로調節하였다).

Table 2의成績이提示하는 바와 같이 pH6.1~8.1의區間에서受精이可能하였는데, pH7.0-7.9에서 비교적 높은受精率(53.5-79.5%)을, pH7.3

Table 2. Effect of pH on in vitro fertilization of mouse eggs.

pH of medium	No. of eggs examined	No. of eggs developed to 2-cell stage	Fertilization Rate (%)
6.11±0.02 <sup>1</sup>	34	4	11.8
6.39±0.03	28	5	17.9
6.72±0.02	37	12	32.4
7.02±0.04	42	26	61.9
7.27±0.03	44	35	79.5
7.58±0.03	43	33	76.7
7.89±0.02	43	23	53.5
8.06±0.02	44	6	13.6

1. Mean Value±S. E.

-7.6에서 가장 높은 受精率(76.7-79.5%)을 얻을 수 있었다.

Bishop(1957)에 의하면 家兔 卵管液의 pH가 發精期에는 7.75이지만, 妊娠중에는 7.43으로 維持되며, Blandau等(1958)은 rat 卵管膨大部의 卵管液의 pH가 7.3-8.5사이라고 報告하였는데, 本實驗에서 비교적 높은 受精率을 나타낸 pH7.0-7.9區間은 發精期の 家兔卵管液의 pH7.75 및 rat의 卵管膨大部(受精部位) 卵管液의 pH7.3-8.5와 상당히 一致하고 있음을 알 수 있다. 그리고 Hamner와 Williams(1964 a, b)에 의하면, 家兔卵管液의 pH는 28.3mM의 bicarbonate( $\text{HCO}_3^-$ )의 濃도에 基因한다고 報告하였는데, 바로 그 濃度(28.3mM-bicarbonate)는 本實驗에서 製造한 受精液에서도 가장 높은 受精率을 얻을 수 있었던 區間인 pH7.3-7.6사이의 pH를 維持시킬 수 있는 bicarbonate의 濃度였음을 注目할만 하였다. 또한 Mahi와 Yanagimachi(1973)는 pH7.2-7.8사이에서 hamster 精子가 높은 尖體反應을 나타냈으며, 그 중 pH7.53에서 가장 높은 尖體反應(88.5%)을 나타냈다고 報告하였다. 精子의 受精能獲得과 함께 受精前 必須過程인 尖體反應이 pH7.53에서 가장 높게 나타난 사실은 本實驗에서 pH7.3-7.6사이에서 가장 높은 受精率을 얻을 수 있었던 점과도 깊은 關聯이 있을 것으로 생각된다.

### 3. 微量의 EDTA添加와 2-cell block

이 ICR系統에서는 49.3%(33.1%增加), C3H 系統에서는 71.7%(30.7%增加)였다. 이러한 結果로 培養液에 極微量(10-100 $\mu\text{M}$ )의 EDTA-2Na 添加가 생쥐胚의 2-cell block을 克服하는데 有效하다고 報告한 Toyoda와 Hosi(1983)의 研究結果를 確認할수 있었다. 또한 本實驗에서는 숫생쥐를 ICR系統으로 固定시키고, 암생쥐를 ICR系統에서 C3H 系統으로 바꾸었을 때, 微量의 EDTA를 添加하지 않았을 때는 胚發達率이 24.8% 增加하였으며, 微量의 EDTA를 添加하였을 때에도 胚發達率이 22.4%增加한 事實은 有意할만하다고 思料된다. Goddard와 Pratt(1983)는 생쥐卵子の 遺傳子型(genotype)이 2-cell block의 發現與否를 決定하는 役割을 한다고 報告하였는데 그들은 이 主張을 2-cell blocking strain과 non blocking  $F_1$  strain을 供試하여 相反交配(reciprocal cross)를 實施함으로써 證明하였다. 그리고, Farrel과 Bavister(1984)는 2-cell block이 體外培養液의 毒性내지는 缺陷에 그 原因이 있다고 報告하였다.

本實驗에서는 培養液中の 微量(10-100 $\mu\text{M}$ )의 EDTA가 생쥐胚의 2-cell block에 어떤 作用을 하는지 그 mechanism을 밝힐 수는 없었지만, 上記者들의 研究(Toyoda와 Hosi, 1983; Goddard와 Pratt, 1983; Farrel과 Bavister, 1984)와 本實驗에서 얻은 약간의 結果를 考察하여 볼 때, 2-cell block 現象이 體外培養液의 缺陷과 關聯하여 精子則이 아

Table 3. Effect of EDTA on in vitro development of 2-cell mouse embryos.

Egg	Spermatozoa	Strain	with(+)or without(-)	No. of 2-cell embryos obtained 30 hrs. after insemination	No. of 4-8 cell embryos obtained 78hrs. after insemination	Development Rate(%)
		ICR	10 $\mu\text{M}$ -EDTA			
ICR	ICR	--		68	11	16.2
		+		73	36	49.3
C3H	ICR	--		39	16	41.0
		+		46	33	71.7

10 $\mu\text{M}$ 의 EDTA-2Na을 培養液(Hoppe와 Pitts, 1973)에 添加하여 in vitro受精에 의하여 發達된 생쥐의 2細胞期胚를 4-8細胞期胚까지 發達시킨 實驗의 結果는 Table 3 과 같았다.

ICR系統의 생쥐와 C3H系統의 생쥐에는 각각 2-cell block이 있었는데, 10 $\mu\text{M}$ 의 EDTA를 培養液에 添加하여 胚發達을 試圖하였을 때에는 胚發達率

는 卵子側(母體側)에서 由來하는 遺傳的인 現象으로 思料된다.

### IV. 摘要

本實驗은 생쥐卵子の 試驗管内 受精에 큰 影響을 미치는 pH와 滲透壓을 檢討하고, 培養液에 微量의 EDTA를 添加하여 2-cell block을 克服, 胚發達을

계속 進行시키고자 實施하였다. Hoppe와 Pitts (1973)의 培養液 造成 中에서 NaCl과 NaHCO<sub>3</sub>의 濃度調節로 각각의 pH와 滲透壓이 維持되는 受精液 및 培養液을 製造하였다. pH別, 滲透壓別 受精率은 供試卵子數에 대한 2細胞期까지 發達이 進行된 胚의 數字로서 決定하였다. 그리고 胚의 發達率은 2細胞期胚의 數에 대한 4-8細胞期까지 發達이 進行된 胚의 數字로서 決定하였다. 本實驗은 모두 5% CO<sub>2</sub>, 95%air, 37°C의 條件下에서 實施하였다. 實驗結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 受精液의 滲透壓이 235, 252, 269, 286, 306, 323, 345, 368 및 393mosmol일 때 in vitro에서의 受精率은 각각 15.6, 38.2, 65.7, 75.6, 80.9, 74.3, 58.1, 35.1, 24.3, 11.1%였다.

2. 受精液의 pH가 6.1, 6.4, 6.7, 7.0, 7.3, 7.6, 7.9 및 8.1일 때 in vitro에서의 受精率은 각각 11.8, 17.9, 32.4, 61.9, 79.5, 76.7, 53.5, 및 13.6%였다.

3. 2細胞期에서 4-8細胞節까지의 胚發達率은 ICR female×ICR male의 경우에는 16.2%, 10μM-EDTA를 受精液(培養液)에 添加하였을 때는 49.3%로서 33.1%가 增加하였으며, C3H female×ICR male의 경우에는 41.0%, 10μM-EDTA를 受精液(培養液)에 添加하였을 때는 71.7%로서 30.7%가 각각 增加하였다.

1. Bavister, B.D. 1969. Environmental factors important for in vitro fertilization in the hamster. *J. Reprod. Fert.*, 18:544-545.
2. Bishop, D.W. 1956. Active secretion in the rabbit oviduct. *Amer. J. Physiol.*, 187: 347.
3. Blandau, R., L. Jensen and R. Rmmery. 1958. Determination of the pH values of the reproduction tract fluids of the rat during heat. *Fart. Steril.*, 9:207.
4. Bondioli, K.R. and R.W. Wright, Jr. 1983. In vitro fertilization of bovine oocytes by spermatozoa capacitated in vitro. *J. Ani. Soi.*, Vol. 57, No. 4, 1001-1005.
5. Brackett, B.G., Y.K. Oh, J.F. Evans and W.J. Donawick. 1980. Fertilization and early development of cow ova. *Biol. Re-*

*prod.*, 23:189.

6. Brinster, R.L. 1965. Studies on the development of mouse embryos in vitro. *J. Exp. Zool.*, 158:49-58.
7. El-Badrawi, H.H. and E.S.E. Hafez. 1982. In vitro fertilization and embryo transfer. 361-379 (MTP Press, England)
8. Farrell, P.S. and B.D. Bavister. 1984. Short-term exposure of two-cell hamster embryos to collection media is detrimental to viability. *Biol. Reprod.* 31:109-114.
9. Goddard, M.J. and H.P.M. Pratt. 1983. Control of events during early cleavage of the mouse embryo: and analysis of the 2-cell block. *J. Embryol. exp. Morph.*, 73:111-133.
10. Hoppe, P.C. and S. Pitts. 1973. Fertilization in vitro and development of mouse ova. *Biol. Reprod.*, 8:420.
11. Hamner, C.E. and W.L. Williams. 1964 a. Effect of bicarbonate on the respiration on spermatozoa. *Fed. Proc.*, 23:430.
12. Hamner, C.E. and W.L. Williams. 1964 b. Identification of sperm stimulating factor of rabbit oviduct fluid. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 117:240.
13. Iwamatsu, T. and M.C. Chang. 1969. In vitro fertilization of mouse eggs in the presence of bovine follicular fluid. *Nature (London)*, 224:919.
14. Iwamatsu, T. and M.C. Chang. 1971. Factors involved in the fertilization of mouse eggs in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 26:197-208.
15. Kane, M.T. 1974. The effect of pH on culture of one-cell rabbit ova to blastocyst in bicarbonate-buffered medium. *J. Reprod. Fert.*, 38:477-480.
16. Mahi, C.A. and R. Yanagimachi. 1973. The effect of temperature, osmolality and hydrogen ion concentration on the activation and acrosome reaction of golden hamster spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 35:55-66.
17. Miyamoto, H. and M.C. Chang. 1973. Effect of osmolality on fertilization of

- mouse and golden hamster eggs in vitro. J. Reprod. Fert., 33:481-187.
18. Miyamoto, H., Y. Toyoda and M.C. Chang. 1974. Effect of hydrogen ion concentration on in vitro fertilization of mouse, golden hamster, and rat eggs. Biol. Reprod., 10:487-493.
  19. Olds, D. and N.L. VanDemark. 1957. Composition of luminal fluids in bovine female genitalia. Fert. Steril., 8:345.
  20. Pursley, G.R. and H.A. Herman. 1950. Some effect of hypertonic and hypotonic solutions on viability and morphology of bovine spermatozoa. J. Dairy Sci., 33:220.
  21. Toyoda, Y. and M. Hosi. 1983. Cell Technology. Vol. 2, No. 10, 1180-1184.
  22. Yanagimachi, R. and M.C. Chang. 1964. In vitro fertilization of golden hamster ova. J. Exp. Zool., 156:361-376.