

## 소 초기배의 분할후 생존율과 체외발생율에 관한 연구

김상근 · 이종진 · 이명현  
충남대학교 수의과대학

### Studies on the Survival and *In vitro* Developmental Rate of Bisected Bovine Embryos

Kim, Sang-Keun, Jong-Jin Lee and Myung-Hyun Lee

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

#### SUMMARY

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

The results are summarized as follows :

1. The survival rates of intact or free zona pellucida of bisected embryos were 30.3 and 25.0%, respectively. And the survival rates of bisected embryos by micromanipulator and micropipette were 33.3 and 26.7%, respectively. The survival rate of bisected embryos was significantly lower than that of non-bisection embryos (65.0%).
2. The survival rates of bisection embryos in cultured for 12, 24, 48, 72hrs with 20% FCS + TCM-199 medium were 40.0, 30.0, 23.3 and 13.3%, respectively.
3. The *in vitro* developmental rates of intact or free zona pellucida of bisected embryos by micromanipulator and micropipettes were 33.3 and 26.7%, respectively. The survival rate of bisection embryos was significantly lower than that of non-bisection embryos (45.0%).

#### I. 서 론

체외수정, 쌍태유기, 성 감별, 수정란의 동결 및 유전자와 핵 이식 등의 첨단기술들을 활용하여 산업화된 기술로 발전시키기 위해서는 수정란의 대량생산 체계의 확립과 생존성이 높은 보존기술 및 초기배의 분할 및 배양기술의 확립이 시급히 요청된다.

가축 초기배를 미세조작법에 의해 분할하여 일란성 쌍자의 생산 또는 분할배의 한쪽은 동결 보존하면서 다른 쪽은 염색체검사, 유전자조작 및 이식 등에 제공하기 위한 분할배의 동결이용이 보고되었다(Willad-

sen, 1979; Nagashima와 Ogawa, 1981; Lehn-Jenson과 Willadsen, 1983; Williams 등, 1984; Heyman, 1985; Takeda 등, 1987; Williams와 Moore, 1988; 윗와 숲, 1994; 김 등, 1995; 김과 이, 1995).

분할배의 작성은 생쥐 2세포기 배를 이용하여 성공한 Nicholas와 Hall(1942)에 이어, Tarkowski(1959a, b)는 생쥐의 2세포기 분할배중 하나를 이식하여 산자를 얻는데 성공하였으며, Willadsen 등(1981)은 분할배를 배양하여 57% 이상의 상실배와 배반포까지의 발생율과 2,4세포기의 수정란을 분리 배양후 이식하여 각각 68%와 50%의 임신율을 얻었으며, Mullen 등(1970)은 2세포기의 합구를 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 단일 할구(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 융해후 이식하여 각각 52.6, 52.4, 62.2 및 62.9%의 태아발생율을 보고하였다.

가축 수정란을 분할한 분할배의 작성은 현재로서는 기술의 확립이 이루어지지 않아 초보적 단계에 지나지 않는 실정이며, 가축 수정란은 체외 발생능력이 떨어질 뿐만 아니라 분할란은 생존성이 대단히 저조하여 이의 개선과 분할기술의 확립이 시급한 과제라고 생각된다.

이에, 본 연구는 소 초기배의 분할후의 생존성과 체외발생율을 구명하기 위하여 소 초기배를 미세조작에 의해 분할한 후의 생존성과 배양에 따른 체외발생율을 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재 료

#### 1) 난포란

도살우로부터 난소를 적출하여 100 IU/ml의 penicillin G와 100 µg/ml의 streptomycin sulfate를 첨가한 38℃의 생리식염수에 침지하여 실험실로 옮겨 주사기로 난포액을 흡입하여 petri dish에 채취한 후 실험현미경(20~40×) 하에서 형태적으로 우수한 난포란을 회수하였다.

#### 2) 배양액

TCM-199(Whittaker, M.A. Bio. Co., USA)의 기본 배양액에 20%(v/v)의 FCS(Sigma Co., USA)와 penicillin G 및 100 µg/ml의 streptomycin sulfate(Sigma Co., USA)를 첨가하여 이용하였다.

## 2. 방 법

### 1) 난포란의 체외성숙 및 수정

난포란의 체외성숙은 45 µl의 배양액에 난구세포가 충실하게 부착된 5개의 난포란을 주입하여 mineral oil(Squibb Co., USA)로 피복하여 20~24시간 동안 38℃, 100% 습도, 95% Air, 5% CO<sub>2</sub>로 조성된 CO<sub>2</sub> 배양기내에서 성숙배양하였다.

난포란의 체외수정은 체외성숙이 끝난 난포란을 45 µl의 배양액 소지에 5개씩 주입하고, 동결정액을 38℃의 온수에서 약 1분간 침지하여 융해한 후, BO액 1 ml에 융해한 정액 0.2 ml를 혼합하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 swim-up시킨 다음, 약 0.5ml의 상층액을 2,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 침전된 정자 pellets을 동량의 heparin 용액(100 µg/ml, Sigma Co., USA)과 함께 혼합하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 수정능획득을 유기시킨 정자부유액 2 µl(1~5 × 10<sup>6</sup>ml)을 주입하고 mineral oil로 피복후 CO<sub>2</sub> 배양기에서 5~7시간 동안 매정시켰다.

### 2) 초기배의 분할

초기배의 분할은 micromanipulator(Narishige Co., Japan)가 부착되어 있는 도립현미경 stage위에 petri dish내에 20% FCS + TCM-199 배양액의 소적중에 배를 넣어 보정용 pipette으로 배를 흡입 고정된 후 반대측에 15° 각도의 microblade(Feather Co., Japan)로 투명대로부터 배세포피가 나오지 않을 정도로 microblade를 눌러 배를 분할하거나, micro-fuser에 의해 제작한 micropipett으로 할구 1/2 정도를 분할하였다.

### 3) 수정율과 생존성의 판정

수정율은 동결 융해한 미성숙 난포란을 일정시간 체외성숙시킨 후 수정능획득 정자와 수정시켜 Shea 등(1976)과 Ball 등(1983)의 방법에 의해 수정 여부를 판정하였으며, 생존율은 융해한 난포란을 배양액으로 2~3회 세척한 다음 FDA(fluorescence diacetate) test에 의해 위상차 현미경하에서 생존 score를 산정하거나 배양을 통해 발생상태를 관찰하면서 판정하였다.

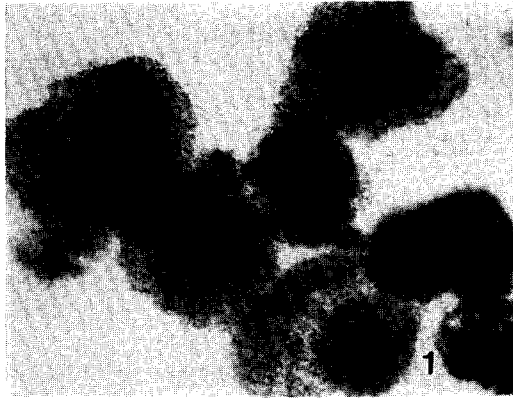


Fig. 1. Types of oocyte-cumulus complex at collection( $\times 60$ ).

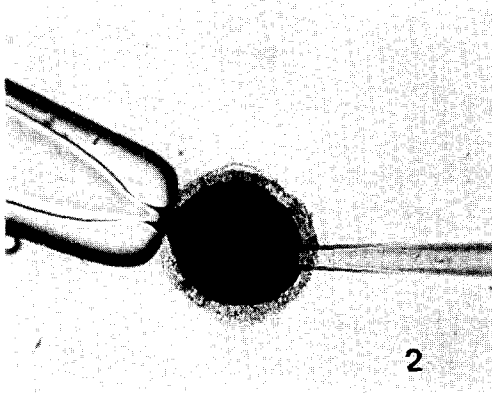


Fig. 2. Bisected 2 blastomeres by micropipettes( $\times 150$ ).



Fig. 3. Bisected embryos by micromanipulator ( $\times 150$ ).

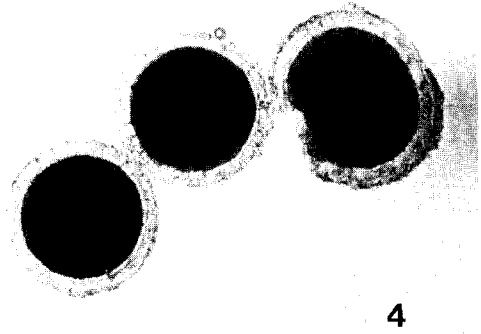


Fig. 4. Demi-embryos after bisection( $\times 150$ ).

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 분할 초기배의 생존율

소 수정란을 미세조작에 의해 분할한 후 공투명대에 주입한 분할 초기배와 pronase로 처리하여 투명대를 연화시켜 micropipette에 의해 분할한 후 분리할구를 공 투명대에 주입한 분할초기배의 생존율은 Table 1, 2와 같다.

초기배를 미세조작에 의해 분할한 후 배양하였을 때 투명대 부착 및 미부착배의 생존율은 각각 30.3 및 25.0%로서 미분할 대조군의 65.0%에 비해 저조한 생존율을 나타냈으며, 분할방법에 따른 생존율은 micromanipulator에 의한 미세조작과 micropipette에 의한 조작시의 생존율은 각각 33.3과 26.7%로서 micromanipulator에 의한 방법이 높은 생존율을 나타냈다.

본 시험결과는 오 등(1994)이 돼지 투명대 부착 및 미부착배의 분할 초기배를 배양하였을 때 26.1과 29.2%의 생존율을 나타냈다는 결과와 유사한 성적이었다. 한편, Hsu 등(1986)은 생쥐의 투명대 제거배 및 투명대내 귀난한 분할배를 동결 융해한 5개중 3개의 투명대 제거배와 2개의 분할배 모두를 배반포까지 발육시켰다고 보고하였다.

#### 2. 분할초기배의 배양시간에 따른 생존율

소 수정란을 미세조작에 의해 분할한 분할 초기배를

**Table 1. Effects of zona pellucida 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	20	1	2	2	2	8	5	13(65.0)
Demi-embryos								
Zona-intact	33	9	6	5	3	5	5	10(30.3)
Zona-free	33	9	7	4	5	5	3	8(25.0)

\* Control : Non-bisection

**Table 2. 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	
Bisection method								
Micromanipulator	30	4	4	6	6	6	4	10(33.3)
Micropipette	30	4	6	5	7	5	3	8(26.7)

20% FCS + TCM-199 배양액에서 12~72시간 배양하였을 때 배양시간에 따른 생존율은 Table 3에서 보는 바와 같이, 분할 초기배를 12, 24, 48, 72시간 배양하였을 때 생존율은 각각 40.0, 30.0, 23.3 및 13.3%로 나타났다.

이러한 결과는 김 등(1995)이 돼지 분할초기배를 12~72시간 배양하였을 때 26.9, 19.2, 19.2, 11.5%의 생존율을 나타냈다는 보고에 비해 약간 높은 성적이었다. 한편, 시험동물은 다르지만 mouse 4 세포기의 분할배를 체외배양하였을 때 배반포의 발생율은 81.4%였다고 보고한 Wilton과 Trounson(1989)의 결과와 비교할 때 저조한 성적이었으나, 생쥐의 8세포기 분할배의 체외배양율은 12.9%라고 보고한 Takeda 등(1989)의 결과와는 유사한 성적이었다.

한편, Tominaga 등(1991)이 소 수정란을 분할하여 excellent와 good, fair, poor, degeneration 등으

로 분류하여 excellent, good 분할배만을 선별하여 3~4 및 18~24시간 배양하였을 때 생존율은 각각 42.1과 55.3%, 17.6과 41.2%로 나타났으며, 한편 난관상피세포와 공배양하였을 때 생존율은 29.2와 54.2%였다고 한 보고와 비교할 때 낮은 성적이었다.

### 3. 분할 초기배의 체외발생을

소 수정란을 미세조작에 의해 분할한 분할 초기배와 pronase에 의해 투명대를 연화시킨 후 micropipette으로 환구를 흡입시킨 후 공투명대에 주입한 절단 2분배와 pipetting으로 투명대를 제거한 분리배의 체외발생율은 Table 4에서 보는 바와 같이, 분할 초기배의 투명대 부착 비부착배를 배양하였을 때 체외발생율은 각각 33.3과 26.7%로써 미분할 대조군의 45.0%에 비해 저조한 생존율을 나타냈다.

본 시험결과는 김 등(1995)의 돼지 초기배를 분할

**Table 3. Effects of culture time on the survival rate of bisected bovine embryos**

Culture time	No. of demi-embryos examined	Degree of FDA test						Survival rate(%)
		A	B	C	D	E	F	
12 hrs	30	3	4	5	6	7	5	12(40.0)
24 hrs	30	3	5	6	7	4	5	9(30.0)
48 hrs	30	5	5	6	7	5	2	7(23.3)
72 hrs	30	5	5	7	9	3	1	4(13.3)

**Table 4. *In vitro* developmental rate of intact and free-zona pellucida of bisected bovine embryos**

Culture of embryos	No. of demi-embryos	No. of embryos developed		No. of blasocyst developed(%)
		Normal(%)	Abnormal or degenerated	
Control	20	9(45.0)	11	3(15.0)
Demi-embryos				
Intact-zona	30	10(33.3)	20	4(13.3)
Free-zona	30	8(26.7)	22	2( 6.7)

한 후 공투명대에 주입한 투명대 부착 및 미부착배를 제외배양하였을 때 30.8 및 25.0%의 체외발생율을 나타냈다는 보고에 비해 약간 높은 성적이었다. 한편, Wilton과 Trounson(1989)의 mouse 분할배를 제외배양하였을 때 배반포로의 발생율 81.4%와 비교할 때 현저히 낮은 성적이었으나, Takeda 등(1989)의 8세포기 생쥐 분할배를 제외배양하였을 때 생존율 12.9%와 비교할 때 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 68와 50%의 임신율을 나타냈다고 보고하였으며, Mullen 등(1970)은 2세포기의 할구를 분리한 후 제외배양 중 재분리하여 산자를 얻는데 성공하였다.

#### IV. 적 요

본 연구는 소 초기배를 분할한 후의 생존성과 체외 발생율을 구명하기 위하여 소 분할 초기배를 미세조작에 의해 분할한 후의 생존성과 분할초기배의 체외발생율을 조사하고자 수행하였다.

1. 소 초기배를 미세조작에 의해 분할한 후 배양하였을 때 투명대 부착 및 미부착배의 생존율은 각각 30.3 및 25.0%로서 미분할 대조군의 65.0%에 비해 저조한 생존율을 나타냈으며, 분할방법에 따른 생존율은 micromanipulator에 의한 미세조작과 micropipette에 의한 조작시의 생존율은 각각 33.3과 26.7%로서 micromanipulator

에 의한 방법이 높은 생존율을 나타냈다.

2. 소 수정란을 미세조작에 의해 분할한 분할 초기배를 20% FCS + TCM-199 배양액에서 12, 24, 48, 72시간 배양하였을 때 생존율은 각각 0, 30.0, 23.3 및 13.3%로 나타났다.
3. 소 수정란을 pronase에 의해 투명대를 연화시킨 후 micropipette으로 할구를 흡입시킨 후 공투명대에 주입한 질단 2분배와 pipetting으로 투명대를 제거한 투명대 부착 및 미부착 분할배를 배양하였을 때 체외발생율은 각각 33.3과 26.7%로서 미분할 대조군의 45.0%에 비해 저조한 생존율을 나타냈다.

#### V. 인용문헌

1. Ball, G.D., M.L. Leibfried and W. Lenz. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. Biol. Reprod., 28:717-725.
2. Heyman, Y. 1985. Factors affecting the survival of whole and half embryos transferred in cattle. Theriogenology, 23:63-75.
3. 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.
4. Lehn-Jenson, H. and S.M. Willadsen. 1983. Deep-freezing of cow "half and quarter" embryos. Theriogenology, 19:49-54.
5. Mullen, R.J., W.K. Whitten and S.C. Carter. 1970. Annual report of the Jacson Laboratory, Bar. Harbor, Maine., 67.
6. 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.
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. 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.
  9. 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).
  10. Tarkowski, A.K. 1959a. Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. Nature, 184:1286-1287.
  11. Tarkowski, A.K. 1959b. Experimental studies on regulation in the development of isolated blastomeres of mouse egg. Acto. Theriogenology, 3:181-267.
  12. 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.
  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-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.
  15. Williams, T.J., R.P. Elsdon and G.E. Seidel, Jr. 1984. Pregnancy rates with bisected bovine embryos. Theriogenology, 22(5):521-531.
  16. Williams, T.J. and L. Moore. 1988. Quick-splitting of bovine embryos. Theriogenology, 29(2):477-484.
  17. 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.
  18. 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.
  19. 오원진, 김상근. 1994. 돼지 분할 수정란의 급속냉각 융해후 생존율에 관한 연구. 한국가축번식학회지, 18(1): 31-37.
  20. 김상근, 이명현, 서길웅. 1995. 돼지 분할 수정란과 미숙란의 생존율에 관한 연구. 한국가축번식학회지, 19(2):129-134.
  21. 김상근, 이종진. 1995. 돼지 분할 초기배와 호르몬, 난관상피세포 및 난구세포와의 공배양 이 생존율에 미치는 영향에 관한 연구. 한국가축번식학회지, 19(2):135-140.