

생쥐 및 소 受精卵의 分割方法에 關한 研究

曹南基

朝鮮大學校 自然科學大學

A Study on the Splitting Methods in Mouse and Bovine Embryos

Cho, Nam Ki

Department of Biology, College of Natural Science, Chosun University

Summary

This study was carried out to obtain the basic information on splitting and culture of mouse and bovine embryos. Two-, four-, eight-, cell and morula mouse embryos were digested with pronase, splitted in vitro by micro-glass needle with hand, and bovine embryos were splitted by micro-manipulator. The splitted embryos were cultured under 5% of CO₂ gas in air at 37°C for 48-72 hours.

The results obtained in this study were summerized as follows:

1. The mouse and cattle were superovulated by 5IU of PMS and HCG, and 2500IU of PMS and 25mg of PGF₂α, respectively. The average number of embryos after superovulation were 32.5±8.2 and 7.5±3:1, respectively.
2. Out of total 122 embryos splitted, the successful splitting rate was 75.0%, 66.7%, 68.4% and 71.4% in 2-, 4-, 8- and morula embryos in mouse, respectively. There was no different splitting rate between mouse (71.4%) and bovine embryos (66.7%) in morula.
3. The successful culture rate of splitted embryos was 68.0% and 67.9% in mouse and bovine embryos, respectively.

I. 緒 論

受精卵에 關한 研究가 지난 20여年間 急進的으로 發展하면서 많은 研究者들에 의해 遺傳的 性的으로 똑같은 質質의 一卵性 雙仔를 生産하고 생쥐 및 소 受精卵의 融合 및 性鑑別을 위하여 受精卵의 體外 微細分離에 關한 研究가 活發히 進行되어 오고 있다.

Mintz(1962)는 생쥐 受精卵에 Pronase 處理에 의하여 透明帶를 除去하고 分割球를 分離하는데 成功하였고 Tarkowski와 Wrblewska(1967)은 생쥐의 4 및 8細胞期 受精卵를 分離하여 胚盤胞胚까지 培養하였다. 한편 受精卵 分離後 透明帶의 有無에 따른 分離割球의 發達에 關한 研究도 實驗動物別 즉 생

쥐(Bronson과 McLaren, 1970; Rossant, 1976; Kelly, 1978; Nagashima 등, 1982), 토끼(Edwards, 1964), 햄스터(Hoppe와 Bavister, 1983) 그리고 소(Willadsen과 Polge, 1981; Baker와 Shea, 1985) 등에서 試驗되었고 특히 Willadsen과 Polge(1981)는 소의 8細胞期 受精卵를 微細分離器(micro manipulator)로 4等分하여 移植하여 3頭의 一卵性 仔畜을 生産하여 受精卵의 分離로 一卵性 雙仔生産 技法을 受精卵移植 産業에 利用하기에 이르렀다(Baker와 Shea, 1985).

한편 受精卵의 分離方法은 Mintz(1962)와 Tarkowski(1959) 등과 같이 酵素處理에 의한 透明帶 除去後 손으로 分離하는 方法이 지금까지 主로 利用되어 왔으나(Rossant, 1976; Nagashima와 Og-

awa, 1981; 吳 等, 1983) 最近 微細分離器(micromanipulator)를 利用한 物理的 分離에 의하여 좋은 成績들을 報告하고 있다(Ozil, 1983; Baker 와 Shea, 1985). 그러나 微細分離器의 利用은 그 使用이 어렵고 透明帶 一部를 절단한 후 割球를 밖으로 꺼내 2 등분하고 다시 透明帶속으로 주입하는 일련의 過程이 매우 까다롭기 때문에 많은 숙련이 必要하나 正確한 分離 및 分離卵의 受胎成績이 양호하였다(Ozil, 1983; Baker 와 Shea, 1985).

이상과 같이 受精卵을 分離하여 一卵性 仔畜을 生産하는 研究가 優良家畜의 擴大 増殖에 利用되는 基礎資料 및 技術開發에 目的을 두고 있으나 現在 國內에서는 생쥐의 경우 一部 成功的인 報告가 있으나 吳等(1983) 소의 경우는 全無한 實情이다. 따라서 本 研究는 생쥐 및 소의 受精卵을 分離한 후 試驗管内에서 培養하여 家畜 受精卵 分離 및 培養에 대한 基礎資料를 얻고자 實施하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試動物

本 試驗의 供試動物은 8~15週齡의 ICR 系統의 생쥐 31頭 및 體重 415~450kg의 젖소 5頭를 供試하였다.

2. 多排卵 處理 및 受精卵 回收

생쥐는 5IU의 PMSG(Pregnant Mare's Serum Gonadotropin, Intervet, Holland)를 복강내 주사하고 48時間後 HCG(Human Chronic Gonadotropin,大成微生物,韓國)을 同一 方法으로 5IU 注射後 암수 1:1의 比率로 合舎시켰고 HCG 處理後 48~72時間内に 卵管 및 子宮에서 回收하였다.

소의 多排卵 誘起를 위하여 PMSG 2,500IU를 發情週期 9~13日 사이에 일차 筋肉注射하고 48時間後에 PGF_{2α} 25mg(Ujohn,美國)을 注射하고 發情時 3回 人工授精한 후 7일째에 Rowe等(1976)의 方法에 準하여 子宮角에서 採卵하였다. 回收된 受精卵은 實體顯微鏡(Leitz,西獨)에서 透明帶와 割球의 形態가 充實하고 正常的인 것만을 分離에 供試하였다.

3. 受精卵의 回收 및 培養液

卵管 및 子宮角에서 受精卵을 回收하기 위한 回收液은 인산완충액(Phosphate Buffer Solution, Gibco,美國)으로 그 조성은 Table 1과 같으며 回收液의 pH는 7.2~7.4, 滲透壓은 270~290mOsm/kg H₂O였고 使用前 0.2μm의 millipore filter(Gelman Sci, U.S.A.)로 여과하였다. 培養液은 回收液에 20%의 Fetal Calf Serum(Gibco, U.S.A.)을 添加하였다.

Table 1. Composition of flushing medium

Components	Concentration
CaCl ₂	0.1g
MgCl ₂ , 6H ₂ O	0.1
NaCl	80
KCl	0.2
Na ₂ HPO ₄	1.15
KH ₂ PO ₄	0.2
Sodium pyruvate	0.036
Glucose	1.0
Bovine serum albumin	10.0
Streptomycin sulfate	50μg/ml
Penicillin G	100IU/ml
Distilled water	1,000ml

(PBS, Gibco, U.S.A.)

4. 受精卵의 微細分離 및 培養

생쥐 受精卵의 分離를 위하여 蛋白質分解酵素인 Pronase(U.S.A.)를 0.5% 添加한 培養液에 受精卵을 5~8分間 침적시켜 透明帶를 除去한 후 3~5回 新鮮培養液으로 세척하여 分離에 供試하였다. 透明帶 除去된 受精卵은 직경이 10~20μm의 가는 유리침으로 현미경하에서 손으로 2 등분 하였다. 소의 受精卵의 微細操作器(micromanipulator, Leitz,西獨)로 透明帶 一部를 絶斷 割球를 꺼내고, 밖에서 이등분한 후 다시 透明帶 속으로 집어넣은 후 培養하였다.

分離된 受精卵은 Petri dish(Costar, U.S.A.)에 培養液 1cc와 Liquid Parafin oil 5cc를 넣어 5%의 CO₂, 95%의 空氣를 넣은 培養器에서 24~72時間 培養하였고, 正常發達된 것을 分離成功으로 調査하였다.

III. 結果 및 考察

1. 受精卵의 採卵

PMSG와 HCG를 各各 5 IU處理(생쥐)와 PM-SG 2,500IU PGF2 α 25mg(소)으로 多排卵 誘起後 排卵數 및 供試可能卵數를 調査하였다(Table 2).

생쥐에서 43두의 多排卵 處理를 하여 그중 31頭에서 平均 32.5 \pm 8.2個의 受精卵을 採卵하였으나 分離에 供試할 形態의으로 正常인 것은 平均 19.7 \pm 6.3個였고 소에서는 7頭 處理中 5頭가 採卵되었으며 頭當 平均 7.5 \pm 3.1個의 採卵成績을 얻었으나 使用 可能卵數는 頭當 平均 5.2 \pm 2.4個였다.

本 試驗의 多排卵 및 採卵數는 FoWler와 Edward(1957)이 생쥐에 1, 3 및 6 IU HCG 處理時 各各 23.8 \pm 6.0 \pm 20.7 \pm 5.4와 24.4 \pm 4.8個의 採卵成績보다는 有意의으로 높았으나 Wilson과 Zarrow(1962) 및 Gates(1971) 등의 5 IU의 PMSG와 HCG를 注射하여 44.5 \pm 6.9個 및 89.6 \pm 4.0個의 採卵結果보다는 상당히 적은 受精卵 回收成績이었다. 그러나 Gates(1971)는 21, 25 및 29日齡의 생쥐에 多排卵을 處理할 경우 28.7 \pm 2.4個에서 89.6 \pm 4.0個까지 採卵結果가 생쥐 日齡別로 相異함을 報告하였다.

한편 소에서는 本 試驗에서 頭當 平均 7.5 \pm 3.1個의 採卵成績을 얻었으나 Scanlon(1972)은 PMSG

3,000IU와 2,000IU를 處理한 結果 各各 10.5와 10.7個의 受精卵을 얻었고 Voss等(1983)은 11.9 \pm 0.9個의 受精卵을 回收했다는 報告보다 本 試驗의 結果가 다소 낮은 採卵數를 얻었다. 그러나 金(1985)은 産次別로 未經産牛에서는 8.5 \pm 1.79 經産牛에서는 6.6 \pm 1.34個를 採卵하여 本 結果와 一致된 報告를 하였다. 따라서 생쥐 및 소에서 多排卵 處理時 受精卵數는 年齡 호르몬水準 및 處理方法 等에 따라 다소 差異가 있는 것으로 思料된다.

2. 受精卵의 微細分離

受精卵의 細胞期別 微細分離 成績은 Table 3에서 보는 바와 같이 完全分離 成功率는 생쥐의 2細胞期에서 가장 높은 75.0%였고, 平均 70.5%였으나 分離에 실패한 것도 11.5%였다. 特히 Pronase를 利用 透明帶를 除去하여 손으로 分離한 생쥐 受精卵의 4, 8 및 桑實胚의 成績과 微細操作器를 利用한 소의 桑實胚分離結果와는 큰 差異가 없었으나 吳等(1983)이 報告한 생쥐에서 95%의 完全分離成績보다 상당히 낮은 結果였고 Ozil(1983)과 Willadsen等(1982)이 소에서 分離한 成績보다도 약간 낮은 傾向이 있었다. 이는 實驗者에 따라 다소 다른 숙련도 및 微細操作器 使用의 未確立에 기인된 것

Table 2. Number of embryos and ovulation rate after superovulation in mouse and cow

Animal	No. of animal treated	No. of animal ovulated	Average no. of embryos recovered	No. of transferable embryos
Mouse	43	31	32.5 \pm 8.2	19.7 \pm 6.3
Cow	7	5	7.5 \pm 3.1	5.2 \pm 2.4

Table 3. The result of embryo splitting in mouse and cattle

Animal	Cell stage	No. of embryos splitted	State of embryos after separation		
			Both halves undamaged	One half undamaged	Both halves damaged
Mouse	2-cell	32	24 (75.0)	6 (18.8)	2 (6.3)
	4-Cell	24	16 (66.7)	4 (16.7)	4 (16.7)
	8-cell	19	13 (68.4)	4 (21.1)	2 (10.5)
	Morular	35	25 (71.4)	6 (17.1)	4 (11.4)
	Average	110	78 (70.9)	20 (18.2)	12 (10.9)
Cattle	Morula	12	8 (66.7)	2 (16.7)	2 (16.7)
	Total	122	86 (70.5)	22 (18.0)	14 ()

() : %

Table 4. The results of in vitro culture of blastomeres splitted in mouse and cattle

Animal	Cell stage	No. of blastomeres cultured	No. of blastomeres developed to morula or blastocyst (%)
Mouse	2-cell	42	29 (69.1)
	4-cell	28	20 (71.4)
	8-cell	19	11 (57.9)
	Morula	39	27 (69.2)
	Average	128	87 (68.0)
Cattle	Morula	12	8 (66.7)
	Total	140	95 ()

으로 思料된다.

한편 本 研究에서 透明帶를 除去하기 위하여 Pronase 및 微細操作을 使用하여도 Mintz(1962), Tarkonski와 Wroblewska(1967), Ozil(1983), Willadsen等(1982), 그리고 吳等(1983)이 報告와 같이 受精卵의 割球에는 손상을 입히지 않았다.

3. 分離受精卵의 培養

생쥐 및 소 受精卵을 分離後 5%의 CO₂ 培養器에서 24~72時間 培養한 結果는 Table 4와 같다.

Table 4에서 보는 바와같이 分離된 생쥐 割球의 培養에 供試된 2細胞期, 4細胞期, 8細胞期 및 桑實胚가 各各 69.1%, 71.4%, 57.9% 및 69.2%로 平均 68.0%였고 소의 桑實胚도 66.7%로 비슷한 培養成績을 얻었으며, 생쥐 8細胞期를 除外한 모든 細胞期에서의 培養成績은 비슷한 結果였다. 이러한 結果는 Mintz(1962), Tarkowski와 Worblewska(1967) 등이 報告한 受精卵의 分割球는 適當한 培養條件만 갖춰지면 桑實胚까지 正常的으로 發達한다는 結果와 一致하였으며 Moore等(1968)이 初期胚에서 더 좋은 成績을 報告한 結果와도 같은 경향을 얻었다.

上記 結果로 생쥐 受精卵 및 소 受精卵의 分離 및 培養成績은 一般的으로 良好한 편이었으나 앞으로 分離培養된 受精卵을 移植하여 많은 一卵性 雙仔를 生産하기 까지의 過程에 대해서도 많은 研究가 必要할 것으로 思料된다.

IV. 摘 要

本 試驗은 受精卵의 微細分離 및 培養에 대한 基

礎資料를 얻고자 생쥐의 2細胞期, 4細胞期, 8細胞期 및 桑實胚와 소의 桑實胚를 供試하여 0.5%의 Pronase處理 및 微細操作器를 利用한 受精卵 分離 및 分離卵 培養試驗을 한 結果는 다음과 같다.

1. 多排卵 誘起를 위하여 생쥐는 PMSG와 H-CG를 各各 5IU, 소에서는 PMS 2,500IU와 PG-F2 α 25mg을 처리하여 各各 19.7 \pm 6.3個 및 7.5 \pm 3.1個의 正常受精卵을 回收하였다.

2. 供試된 總 個의 생쥐 受精卵中 2細胞期에서 完全分離率은 75.0%였고, 平均은 70.5%였으며 소의 桑實胚는 66.7%가 完全分離되었다.

3. 分離된 생쥐 受精卵을 培養하여 桑實胚까지 正常發達을 나타낸 것은 2細胞期, 4細胞期, 8細胞期 및 桑實胚에서 各各 69.1%, 71.4%, 57.9%, 및 69.2%였고 소의 桑實胚는 66.7%로 全體 平均 67.9%였다.

V. 引用文獻

1. Baker, R.D. and B.F. Shea, 1985. Commercial splitting of bovine embryos. Theriogenology. 23(1):3-12.
2. Bronson, R.A. and A. McLaren, 1970. Transfer to the mouse oviduct of eggs with and without the Zona pellucida. J. Reprod. Fert. 22:129-137.
3. Edwards, R.C. 1964. Cleavage of one-and two-celled rabbit eggs in vitro after removal of the zona pellucida. J. Reprod. Fert. 7:413-415.
4. Fowler, R.E. and R.C. Edwards, 1957.

- Induction of Superovulation and pregnancy in mature mice by gonadotropins. *J. Endocrin.* 15:374-394.
5. Gates, A.H. 1971. Maximizing yield and developmental uniformity of eggs, In: *Methods in mammalian embryology.* (Ed) Daniel, J.C., Jr. pp. 64-75. W.H. Freeman and Company.
 6. Hoppe, R.W. and B.D. Bavister, 1983. Effect of removing the zona pellucida on development of hamster and bovine embryos in vitro and in vivo. *Theriogenology.* 19:391-404.
 7. Kelly, S.J., J.G. Mulnard and C.E. Graham. 1978. Cell division and cell allocation in early mouse development. *J. Embryol. Exp. Morph.* 48:37-51.
 8. Mintz, B. 1962. Experimental study of the developing mammalian egg; Removal of the zona pellucida. *Nature.* 182:877-878.
 9. Moore, N.W., G.E. Adams and L.E.A. Rowson. 1968. Developmental potential of single blastomeres of the rabbit egg. *J. Reprod. Fert.* 17:527-531.
 10. Nagashima, H. and S. Oyawa. 1981. Studies on the developmental potential and the survival after the developmental potential and the survival after the deep freezing of microsurgically dichotomized morula embryos in rat and rabbit. *Japan J. Anim. Reprod.* 27:12-19.
 11. Nagashima, H.A., Fujikura and S. Ogawa. 1982. Studies on the developmental ability and the viability after deep freezing of the blastomeres isolated from 2-cell stage embryos in mice and rabbit. *Japan. J. Anim. Reprod.* 28:20-23.
 12. Ozil, J.P. 1983. Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. *J. Reprod. Fert.* 69:463-468.
 13. Rossant, J. 1976. Post implantation development of blastomeres isolated from 4- and 8-cell mouse eggs. *J. Embryol. Exp. Morph.* 36:283-306.
 14. Rowe, R.F., M.R. Del campo, C.L. Elit, L.R. French, R.P. Winch and O.J. Ginther. 1976. A single cannula technique for non-surgical collection ova from cattle. *Theriogenology,* 6:471-483.
 15. Scanlon, P.J. Sreenan and I. Gordon, 1968. Hormonal induction of superovulation in cattle. *J. Agri. Sci.* 70:179-182.
 16. Tarkowski, A.K. 1959. Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs, *Nature.* 184:1286-1287.
 17. Tarkowski, A.K. and J. Wroblewska. 1967. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J. Embryol. Exp. Morph.* 18:1550-180.
 18. Voss, H.J., M. Olivera, Angel and W. Joltz. 1983. Superovulation in beef cattle with PMSG and prostaglandin or progestins. *Theriogenology.* 20:615.
 19. Willadsen, S.M. and C. polge. 1981. Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle By blastomers separation. *Vet. Rec.* 108:211-213.
 20. Willadsen, S.M., H. Len-Jensen, C.B. Fehilly and R. Newcomb. 1981. The production of monozygotic twins of preselected percentage by micromanipulation of non-surgically collected cow embryos. *Theriogenology.* 15:23-29.
 21. Wilson, E.D. and M.X. Zarrow. 1962. Comparison of superovulation in the immature mouse and rat. *J. Reprod. Fert.* 3: 148-159.
 22. 吳成宗, 任京淳, 李用斌. 1983. 생쥐와 흰쥐 胚의 微細의 分離에 關한 研究. *韓畜誌* 25(4): 362~366.
 23. 金熙錫, 吳成宗, 梁甫錫, 李根常, 鄭吉生. 1985. 소에 있어서 非外科的 採卵 및 移植에 關한 研究. *韓畜誌* 27(4): 206~210.