

소 단위발생란과 체외수정란의 세포질내 칼슘농도 및 아미노산 대사능에 관한 연구

정 연 길

한경대학교 낙농기술지원센터

포유동물이 수정 할 때, 정자가 난자에 부착·결합 시에, 처음으로 일어나는 반응은 난 세포질내의 칼슘농도의 상승이다. 이 칼슘 상승은 정자의 부착부위로부터 칼슘이 증가하여 calcium wave가 일어나고, 이 현상은 포유동물의 전체적으로 일어난다. 또한, 칼슘농도는 수정후 장시간으로 calcium oscillation으로 관찰되고, 난자와 정자의 전핵이 융합 될 때까지 주기적으로 반복된다고 보고되고 있다. 이 현상은 수정으로 인한 난세포내의 칼슘상승은 표층과립분비, 투명체반응 현상과, 그 후의 발생과정에서 중요한 억제인자의 역할을 한다. 또한, 정자의 자극으로부터 난 세포질내 칼슘증가는 MPF의 활성화를 저하시켜 감수분열을 재현한다고 보고되고, 간 유전자인c-mos단백질이 미수정란에 CSF를 활성화시켜, MPF을 안정되면서 제 2감수분열 중기에 중지가 일어난다고 보고되었다. 제2감수분열중기에 MPF와 CSF는 c-mos단백질에 안정화가 되었지만, 수정에 의해서 난 세포질내 칼슘농도의 상승으로 c-mos단백질이 분해하여, MPF가 작용하여 난자는 감수분열을 개시한다.

인위적 활성화 처리에는 물리적인 처리는 전기자극과 화학적인 처리로서 ethanol, Ca-ionosphere등이 있고 이 방법으로 단위발생이 이루어졌다. 인위적으로 난 세포질내 칼슘 농도를 상승시켜, 발생을 개선하기 위한 연구가 진행되었고, 칼슘증가로 인한 초기발생대한 칼슘의 중요성을 말해주고 있다. 또한 수정 시에 일어나는 칼슘진동을 인위적으로 토끼의 난자에 4분 간격으로 22회 직류펄스를 자극하여 높은 발생률을 나타냈다. 또한, 66%가 착상하여 태아가 관찰되었다. 그 후, 마우스, 면양, 돼지에서도 착상하여 태아까지 관찰되었어나 지금까지 포유동물에서 분만까지 이루어진 보고 없다.

이것은 정상적으로 수정과정에서 일어나고 있는 현상을 인위적으로 유발하여 칼슘 진동의 강도를 조절하는 것이 매우 중요하다고 생각된다.

소 수정란은 체외에서 생산되어지고 있으나, 이식후의 수태율은 체내 생산된 배와 비교하면 저조하고, 동결·융해 후 수태율은 더욱더 낮다(30~40 vs 60~70). 최근, 마우스, 면양 그리고 소의 배의 발육에 따른 여러 가지 영양소 (glucose, pyruvate, amino acid 등)의 대사능(섭취 및 합성)이 검토되었고, 배의 생존성과 관련성이 중요시되어지고 있다. 특히, 아미노산은 에너지의 물질과 pH의 조절, 단백질과 핵산의 전구물질로 역할이 있고, 이것을 외인적으로 첨가로 인해 배의 발육, 핵수 및 배 이식율을 상승시킨다. 그러나, 배에서 아미노산 요구량은 동물종류, 발육단계, 배양조건에 따라 다르며, 각각의 아미노산종류에 어떤 아미노산이 발육에 좋은 영향을 미치는지, 억제효과가 있는지는 아직 명확하게 밝혀지지 않았다.

본 연구에서는 체외성숙 난자를 이용하여 인위적인 활성화 자극과 수정시의 칼슘농도, 단위발생율, 동결 전 후의 아미노산 대사능을 조사한 결과를 보고한다.

Table 1. Cell number in fresh or frozen-thawed blastocyst derived from IVF or parthenogenesis (PT)

Treatment	Number of blastocyst	No. of cells per blastocyst (Mean ± s.e.m)
IVF fresh EAA + NEAA	250	124 ± 6.7 ^a
IVF fresh EAA	250	112 ± 7.2 ^a
IVF frozen EAA + NEAA	250	83 ± 4.5 ^b
IVF frozen EAA	250	72 ± 5.4 ^b
PT fresh EAA + NEAA	250	75 ± 4.4 ^b
PT fresh EAA	250	74 ± 6.3 ^b
PT frozen EAA + NEAA	250	53 ± 4.6 ^c
PT frozen EAA	250	54 ± 5.6 ^c

Five replicates.

*Fresh blastocysts, 180 h of age after IVF or PT activation, and frozen-thawed blastocysts, 168 h of age and cultured for 12 h post-thawing, were cultured in synthetic oviduct fluid medium (SOFM) containing polyvinyl alcohol (PVA) supplemented with essential amino acid (EAA) only or EAA plus nonessential amino acid (NEAA) for 10h.

^{a, b, c} (p < 0.001)

Table 2. The rate of uptake or synthesis of amino acids (mean \pm pmol/embryos/h) per fresh or frozen-thawed blastocyst derived from IVF or parthenogenesis^{*1}

Amino acids	IVF		Parthenogenesis	
	Fresh (n=250)	Frozen (n=250)	Fresh (n=250)	Frozen (n=250)
<i>Essential amino acids</i>				
1. Arginine	3.91 \pm 0.24 ^a	4.22 \pm 1.17 ^a	5.07 \pm 0.10 ^b	3.79 \pm 1.43 ^a
2. Cystine	0.32 \pm 0.05 ^a	0.27 \pm 0.18 ^a	0.35 \pm 0.09 ^a	0.43 \pm 0.16 ^a
3. Glutamine	-0.23 \pm 0.02 ^a	-0.19 \pm 0.01 ^a	-0.39 \pm 0.03 ^b	-0.23 \pm 0.10 ^a
4. Histidine	0.41 \pm 0.05 ^a	0.36 \pm 0.28 ^a	0.27 \pm 0.09 ^a	0.49 \pm 0.16 ^a
5. Isoleucine	1.25 \pm 0.13 ^a	1.14 \pm 0.65 ^a	1.16 \pm 0.24 ^a	1.44 \pm 0.56 ^a
6. Leucine	1.18 \pm 0.16 ^a	1.06 \pm 0.66 ^a	0.96 \pm 0.22 ^a	1.29 \pm 0.51 ^a
7. Lysine	0.71 \pm 0.09 ^a	0.94 \pm 0.70 ^a	0.88 \pm 0.07 ^a	1.51 \pm 0.43 ^a
8. Methionine	0.30 \pm 0.01 ^a	0.26 \pm 0.23 ^a	0.26 \pm 0.14 ^a	0.35 \pm 0.13 ^a
9. Phenylalanine	0.41 \pm 0.11 ^a	0.37 \pm 0.30 ^a	0.29 \pm 0.09 ^a	0.51 \pm 0.19 ^a
10. Threonine	0.25 \pm 0.16 ^a	0.86 \pm 0.73 ^b	0.36 \pm 0.29 ^{ac}	1.01 \pm 0.37 ^{bc}
11. Tyrosine	0.42 \pm 0.04 ^a	0.43 \pm 0.33 ^a	0.32 \pm 0.13 ^a	0.53 \pm 0.21 ^a
12. Valine	1.01 \pm 0.04 ^a	0.89 \pm 0.64 ^a	0.69 \pm 0.27 ^a	1.19 \pm 0.45 ^a
<i>Nonessential amino acids</i>				
13. Alanine	-3.04 \pm 0.46 ^a	-2.42 \pm 0.05 ^a	-5.81 \pm 0.58 ^b	-2.62 \pm 1.25 ^a
14. Asparagine	-0.15 \pm 0.01 ^a	-0.10 \pm 0.02 ^a	-0.24 \pm 0.01 ^b	-0.16 \pm 0.09 ^a
5. Aspartate	0 \pm 0 ^a	0 \pm 0 ^a	0 \pm 0 ^a	-0.01 \pm 0.07 ^a
16. Glycine	-0.07 \pm 0.01 ^{ab}	-0.07 \pm 0.01 ^{ab}	-0.10 \pm 0.01 ^b	-0.06 \pm 0.04 ^a
17. Proline	0 \pm 0 ^a	0 \pm 0 ^a	-0.02 \pm 0.02 ^a	0 \pm 0 ^a
18. Serine	-0.20 \pm 0.01 ^{ab}	-0.10 \pm 0.01 ^a	-0.27 \pm 0.02 ^b	-0.10 \pm 0.06 ^a
19. Glutamate	-0.01 \pm 0.01 ^a	-0.01 \pm 0.01 ^a	-0.06 \pm 0.01 ^b	-0.05 \pm 0.16 ^a

^{*1}The concentrations of each amino acid were measured in the medium supplemented with EAA only and the figures show depleted or produced (-) concentrations of amino acids.

^{a,b}The mean concentrations with different superscripts in the lines are significantly different (p < 0.05).