

돼지 난자의 직경이 체외성숙 및 체외발달에 미치는 영향

정기화 · 허태영 · 광대오* · 박충생** · BN Day***

축산기술연구소

Porcine Oocyte Diameter in Relation to Maturation and Developmental Competence

K. H. Chung, T. Y. Hur, D. O. Kwack*, C. S. Park** and B. N. Day***

National Livestock Research Institute, RDA

SUMMARY

To investigate the maturational and developmental competence of porcine oocytes of different diameter groups, oocytes were obtained by aspiration from slaughterhouse ovaries. After washing three times in NCSU23 medium, each cumulus-oocyte complex was transferred into a 8 μ l drop of the maturation medium (one oocyte per drop) under paraffin oil. The diameter without zona pellucida of oocytes was measured with micro-calibrator (Mikrometer, E. Leitz) on a screen connected to a VCR on an inverted microscope (200 \times). After being measured, the oocytes were divided into 6 groups according to their diameter size : <105, 105 to <110, 110 to <115, 115 to <120, 120 to <125 and >125 μ m, and *in vitro* maturation(IVM), fertilization(IVF) and production(IVP) of oocytes /embryo was performed.

The rates of *in vitro* maturation of oocytes in the greater 105 μ m size groups(91.8~100%) were significantly(P<0.05) higher than in the <105 μ m group(66.7%). The rates of sperm penetration were significantly(P<0.05) low in <105 μ m group(50.0%) than others groups (81.6~85.5%). But the polyspermic fertilization rate was significantly(P<0.05) higher in <110 μ m oocytes groups than in the 110 \leq μ m size groups. The rates of cleavage and development to blastocysts rose as oocytes diameter increased, however, while oocytes over 120 μ m in diameter failed to develop to blastocysts.

These results suggest that porcine oocytes have acquired full meiotic competence at a diameter of 105 μ m but not yet attended full developmental competence to blastocyst and that oocytes have acquired full developmental competence at a diameter of 110 μ m.

(Key wards : porcine oocyte, diameter, maturation, development)

서 론

최근 돼지난자의 체외성숙과 체외수정 및 체외발달 기술은 급속도로 발달되어 왔고 체외수정란을 이용한 산자도 생산하였다(Mattioli 등, 1989; Yo-

* 경상대학교 사범대학 과학교육과(Department of Science Education, Gyeongsang National University)

** 경상대학교 농과대학 축산학과(Department of Animal Science, Gyeongsang National University)

*** Department of Animal Science, University of Missouri-Columbia, Columbia, Missouri, USA

shida 등, 1993). 그러나 돼지 체외수정란의 배반포기까지의 발달율은 보고자에 따라 많은 차이가 있으며, 난자는 대부분 도축장에서 채집한 난소에서 채취하기 때문에 난자의 질과 체외수정 후 발달능력에 차이가 많다(Otoi 등, 1997). 최근 소에 있어서 체외수정란 생산능력에 난포의 크기와 난자의 크기가 체외발달에 영향을 미친다는 보고가 있으나 돼지의 경우 보고가 미미한 실정이다(Otoi 등, 1997; Fair 등, 1995; Lonergan 등, 1994; Pavlok 등, 1992).

난포의 크기가 체외에서의 난자 생존율에 미치는 영향에 대하여는 여러 축종에 대하여 많은 연구가 이루어져 왔다. 비록 작은 난포에서 채란한 난자도 GVBD가 일어나고 감수분열이 재개되더라도 metaphase II 상태로의 발달율은 매우 낮았다. Pavlok 등(1992, 1993)과 Lonergan 등(1994)은 소에 있어서 난포 크기에 따른 체외수정율과 발달율에 대한 조사에서 작은 난포에서 채취한 난자의 발달율이 낮았다고 보고하였다. 난자의 발달능력은 세포핵의 성숙뿐만 아니라 세포질의 성숙이 동시에 이루어져야 한다. Masui와 Markert(1971)는 성장중인 양서류의 난자는 감수분열을 재개할 수 없는데 이는 성숙촉진인자(MPF)에 coding할 messenger RNAs가 부족하기 때문이라 하였다. 성장중인 포유동물 난자의 MPF가 세포질내에 없거나, 비록 있더라도, 억제되어지기 때문이라는 보고(Motlik, 1989)가 있으며, Barnes 등(1991)도 작은 난포에서 유래된 난자는 비록 핵은 성숙되었더라도 세포질은 미성숙 상태로 남아있다고 하여 이를 뒷받침하였다. 따라서 수정 역시 이루어지지 않는다.

Crozet 등(1986)은 각각 다른 크기의 난포에서 유래한 미성숙 소의 난자를 형태학적 및 세포핵의 전사(轉寫)능력을 조사한 결과 난포의 크기가 증가할수록 핵의 형태가 점진적으로 좋았고 ^3H -uridine의 혼입이 적었다. 조기 폐쇄난포(0.5~1.6mm)의 난자에서 발견되는 섬유과립 다공 핵인(fibrillogranular multivacuolated nucleoli)은 RNA 합성에 관계한다. 난포의 크기가 1.8~3mm의 난자는 핵포가 크기는 하지만 숫자는 적고, 4mm 난포의 난자는 치밀한 원섬유 핵인 조직을 가지는데 이는 동시에 ^3H -uridine의 혼입도 감소되어진다. 그러므로 핵의

발육능 획득이 되는 시기는 RNA 전사(轉寫)가 확실하게 종료되고 핵인의 구조가 변화하는 난자의 성숙 말기에 해당된다(Crozet, 1989). 이상의 결과를 종합할 때, 난자의 수정능력은 난포의 크기와 관련이 있지만 이는 난자의 성숙과 발육능력과의 관계, 즉, 난자 성숙 말기에 발육능을 획득한다는 이론을 설명하는 간접적인 척도에 불과하며 난자 자체의 크기가 발육능과의 관계에 대하여는 알려진 바가 적다. 체외 수정란 생산을 위한 다량의 난자가 필요한 시점에서, 체외성숙 이전에 난자의 발생능력을 믿을 만한 방법으로 난자를 선별하는 것은 체외수정란 생산에 있어서 아주 효과적인 방법이다. 크기가 작은 난자의 발달능력을 안다는 것은 발달능을 가진 난자를 선별할 수 있도록 할 뿐만 아니라, 작은 난자의 발생능을 획득하게 하는 기초연구에도 이용할 수 있으며, 최종적으로 체외수정란 생산용 난자를 다수 확보할 수 있는 방법도 제기될 수 있다.

본 연구에서는 난자의 크기에 따른 체외성숙 및 체외수정란의 발생능을 구명하여 체외수정용 난자의 선별에 기초가 되고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 배양액

체외성숙용 배지는 NCSU 23을 기본배양액으로 하여 10% 돼지난포액, 0.1mg/ml cysteine, 10IU/ml eCG 그리고 10IU/ml HCG를 첨가하여 만들었다. 체외수정용 배지는 modified Tris-buffered medium(mTBM)을 기본배양액으로 이용하였으며, 체외배양액은 NCSU 23 용액에 BSA 0.4%를 첨가하여 만들었다. 돼지 난포액은 3~6 mm 크기의 난포에서 난포액을 채취하여 1900×g로 원심분리하고, 1.2 μm 필터로 거른 후 -20℃ 냉동고에 보관하면서 필요시 이용하였다.

2. 난자의 채취

도살장에서 수집한 난소를 항생제가 함유된 0.9% NaCl 생리식염수에 보관하여 25~30℃가 유지되도록 하여 실험실로 운반하였다. 난자는 10 ml 주사기에 18G 주사바늘을 부착하여 2~6 mm의 가시

난포를 흡입하여 채취하였다.

3. 난자의 분류

난구세포가 부착된 난자를 paraffin oil이 덮힌 성숙배지 8 μ l 소적에 넣고(소적당 난자 1개씩) 현미경(200 \times)에 연결된 VCR을 통하여 스크린 위에서 micro-calibrator (Mikrometer, E.Leitz)를 이용하여 투명대를 제외한 난자의 직경을 측정하였다. 직경에 따라 <105, 105~110, 110~115, 115~120, 120~125, 그리고 >125 μ m의 6 groups으로 나누었다.

4. 난자의 배양

난구세포가 3층 이상이고 세포질이 충실한 난자를 골라 체외성숙 배지에서 3회 세척한 후 40~50개씩 500 μ l 용액이 든 Nunc 4-well dish로 옮긴다. 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 20~22시간 동안 호르몬이 첨가된 체외성숙 배지에서 배양하고, 다음 20~22시간은 호르몬이 첨가되지 않은 배지에서, 총 40~44시간동안 배양하였다.

5. 체외수정

체외성숙 완료 후 0.1% hyaluronidase 가 함유된 NCSU 23 용액에서 난구세포를 제거하고 1mM caffeine과 0.1% BSA가 함유된 mTBM 용액으로 3회 세척하였다. 세척 후 미리 준비된 50 μ l drop에 30~40개의 난자를 넣고 정자가 준비될 때까지 인큐베이터에 보관하였다. 냉동정액을 0.1% BSA가 함유된 D-PBS에서 용해 후 1900 \times g로 3분간 3회 원심 분리하여 최종 0.5 \times 10⁶/ml 농도로 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 6시간 수정하였다.

6. 수정란 생산

체외수정 후 체외배양 배지에 3회 세척한 후 500 μ l 씩의 배양액이 들어있는 Nunc 4-well dish에 30~40개씩 넣어 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 수정 후 48시간에 난할과 144시간째에 배반포기 상태의 수정란을 검사하였다.

7. 수정란 염색

25% acetic acid가 함유된 ethanol 용액에 수정란을 넣어 고정시킨 후 45% acetic acid에 1% orcein을 희석한 용액으로 염색한 후 체외성숙, 침입정자수, 응성전핵 형성 등을 관찰하였다.

8. 통계학적 분석

실험결과와 통계학적 분석은 컴퓨터 프로그램인 SAS package를 이용하였고, General Linear Model Procedure를 적용하여 유의차를 검정하였다.

결 과

도축장에서 채집한 난소에서 총 1,583개의 난자를 채취하여 측정된 결과 투명대를 제외한 난자의 평균직경은 114.4 \pm 5.45 μ m로 나타났다. 난자의 직경을 <105, 105~110, 110~115, 115~120, 120~125, 125 μ m<의 6 group으로 나누어 분포비율을 조사한 결과, Fig. 1에 나타난 바와 같이, 각각 3.0, 11.0, 31.2, 41.5, 13.0 및 0.4%로 72.7%가 110부터 120 μ m 사이에 분포하였다.

난자 직경별 체외성숙율, 수정율에 대한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 체외성숙율에 있어서

Table 1. *In vitro* maturation and fertilization rates of porcine oocytes with different diameter

Oocyte diameter (μ m)	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes matured	No. (%) of oocytes penetrated	No. (%) of oocytes polyspermic	No. (%) of oocytes with male pronuclei
<105	12	8(66.7) ^a	6(50.0) ^a	1(16.7) ^{ab}	5(83.3) ^a
105~110	49	45(91.8) ^b	40(81.6) ^b	15(37.5) ^a	33(82.5) ^a
110~115	98	95(96.9) ^b	83(84.7) ^b	23(27.7) ^{ab}	73(88.0) ^a
115~120	117	111(94.9) ^b	100(85.5) ^b	20(20.0) ^b	90(90.0) ^a
120~125	53	53(100.0) ^b	45(84.9) ^b	8(17.8) ^b	38(84.4) ^a

^{a,b} : Values with different superscripts within a column are significantly different (P<0.05).

Table 2. Development rates of porcine oocytes with different diameter

Oocyte diameter (μm)	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes fertilized	
		cleaved	develop to blastocyst
<105	14	42 (8.6) ^a	0 (0.0) ^{bc}
105~110	84	39(46.6) ^a	6(7.1) ^c
110~115	279	170(60.9) ^b	35(12.5) ^{bc}
115~120	358	278(77.7) ^c	86(24.0) ^a
120~125	104	81(77.9) ^c	19(18.3) ^{ab}
125<	5	2(40.0) ^{abc}	0(0.0) ^{abc}

^{a,b,c} : Values with different superscripts within a column are significantly different ($P < 0.05$).

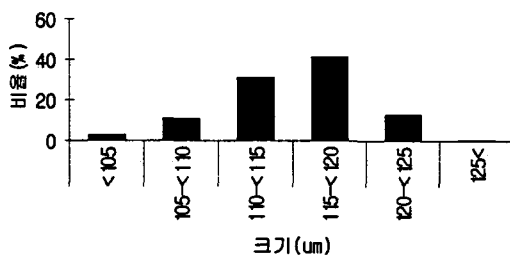


Fig. 1. Distribution of oocyte diameter.

크기가 105 μm 이상인 난자는 91.8~100%로 105 μm 미만 난자의 66.7% 보다 유의적으로 ($P < 0.05$) 높게 나타났으며, 수정율도 105 μm 미만의 난자에서는 50%의 낮은 수정율을 보인 반면, 105~125 μm 인 난자에서는 81.6~85.5%로 유의적으로 ($P < 0.05$) 높은 결과를 나타내었다. 직경 105~110 μm 의 난자에서 다정자침입율이 가장 높았으며(37.5%), 120~125 μm 의 난자에서는 17.8%로서 유의적으로 ($P < 0.05$) 낮았다. 응성전핵형성율은 난자의 크기와 관계없이 82.5~90%를 나타내었다. 난자당 정자침입수(표에 나타나지 않음)는 <105 μm 구가 2.0개로 가장 많았고 난자의 크기가 커짐에 따라 각각 1.63, 1.40, 1.28 및 1.20개로 침입수가 적었다.

Table 2는 돼지 난자 직경에 따른 난자의 분열과 배반포기까지의 발달율을 나타낸 것으로, 체외수정 후 난자의 분열율에서 110 μm 미만의 난자는 8.6~46.6%를, 110~115 μm 는 60.9%의 분열율을 나타내어 115~125 μm 사이의 77.7~77.9% 보다 유의적 ($P < 0.05$)으로 낮았다. 그러나 125 μm 이상의 난자는 공시난자가 적은 관계로 유의차가 없었다. 배반포기까지의 발달율에 있어서도 110 μm 미만의

난자는 0.0~7.1%를, 110~115 μm 는 12.5%의 발달율을 나타내어 115~125 μm 사이의 18.3~24.0% 보다 유의적 ($P < 0.05$)으로 낮았다

고 찰

총 1,583개 난자의 평균직경은 114.4 \pm 5.45 μm 이었으며, 그 중 72.7%가 110~120 μm 사이에 분포하였다. Wang 등(1998)은 돼지의 자연배란 난자는 115.5 \pm 5.2 μm 인 반면에 체외성숙란은 112.8 \pm 6.6 μm 라고 보고하여 본 연구 결과와 약간 차이가 있었다. 본 연구의 결과는 채란 직후의 미성숙 난자를 이용한 반면, 전자는 성숙난자를 이용하였으며 난자를 고정 후 슬라이드 그라스에 올려놓고 측정하였다. Suzuki 등(1994)은 소 난자의 경우 체외성숙 후 크기가 변할 수 있다고 하였고, Otoi 등(1997)도 소의 난자에서 성숙 후 제1극체의 방출로 난자의 크기가 변할 수 있다고 하였다. 따라서, 이러한 결과의 차이는 공시난자 성숙 여부에 따른 차이인지 측정방법의 차이인지 명확하지 않다. 소의 난자에 있어서 Otoi 등(1997)은 63.7%, Fair 등(1995)은 37.9%가 110~120 μm 크기에 속했다고 하여 보고자에 따라 약간의 차이가 있었다. 돼지난자에 대한 보고는 접하지 못했지만 본 연구에서는 72.7%가 110~120 μm 사이에 분포하여 소 난자와 비슷한 결과로 나타났다.

체외성숙된 난자에서 수정이 실패하는 이유는 주로 세포질 성숙이 충분하지 못한 때문일 것이라고 주장하였고(Pavlok 등, 1988), 다정자침입이 많이 발생하는 이유는 cortical granule의 분포가 알맞지 못하고 세포 바깥으로 나와서 방어막을 형성하지

못한 때문일 것이라고 하였다(Cran 등, 1986). 또 다른 수정 실패의 이유는 응성전핵의 형성이 부실하기 때문이라고 하였으나 본 연구결과는 응성전핵형성은 난자직경에 따른 차이가 없었다(Fulka 등, 1982). 체외수정시 난자가 MⅡ 단계까지 성숙되었다면 수정율과 배발달율은 높아질 것이다. 본 연구의 결과에서 105 μm 미만의 성숙율과 수정율이 낮았고, 분열과 배발달율은 110 μm 미만이 유의적으로($P < 0.05$) 낮았다. Fair 등(1995)은 소의 난자에서 110 μm 미만의 난자가 110 μm 이상 난자보다 ^3H -uridine incorporation이 높았다고 하였는데, 이는 난자가 RNA 합성을 계속하고 있고 성장 중에 있다는 것을 시사하고 있다. 따라서 본 연구 결과는 직경이 110 μm 미만의 난자는 RNA 합성이 완전히 끝나지 않았고 따라서 필수 단백질 합성이 부족되었기 때문으로 설명할 수 있겠다(Sirad, 1989).

배반포기까지의 체외발달율은 난자의 크기와 비례하여 높아지는 경향을 나타내었는데, 이러한 결과는 다른 보고자와 일치하는 경향이였다(Otoi 등, 1997; Pavlok 등, 1992). 그러나 125 μm 이상의 난자는 배반포기로 전혀 발달하지 않았는데, 이는 공시 난자수가 적어서 명확하지는 않지만, 발달능이 없기 때문인지, 아니면 다른 조건으로 배양해야 하는 것인지는 추후 밝혀져야 할 것이다.

이상의 결과들을 종합해 볼 때 돼지 난자의 직경이 체외성숙과 체외발달에 영향을 미친다고 할 수 있고, 체외수정용 돼지난자를 선별할 때는 직경 110 μm 이상의 난자를 선별하여야 배 발달율이 높아질 것으로 사료된다.

적 요

도축장에서 채취한 돼지난자를 직경별로 5 μm 간격으로 나누어, 난자의 크기에 따른 체외성숙과 발육능을 구멍코자 체외성숙과 체외수정 후의 배 발달율을 조사하였다. 채취한 난자의 투명대를 제외한 평균직경은 $114.4 \pm 5.45 \mu\text{m}$ 이었으며, 직경별 분포는 <105, 105~110, 110~115, 115~120, 120~125, 125 μm < 이 각각 3.0, 11.0, 31.2, 41.5, 13.0 및 0.4%로 72.7%가 110부터 120 μm 사이였다. 체외성숙율에 있어서 직경 105 μm 미만 난자는 66.7%

연 발된 105 μm 이상의 발률은 91.8~100%로 유의적($P < 0.05$)으로 높았다. 체외수정율도 직경 105 μm 미만인 난자는 50% 이었던 반면, 105 μm 이상은 81.6~85.5%로 유의적($P < 0.05$)으로 높았다. 다정자침입율에 있어서 110 μm 이상의 난자는 17.8~27.7%로 105~110 μm 의 37.5% 보다 낮았다. 난자의 직경별 배반포기까지의 발달율은 105 μm 이하는 전혀 발달하지 않았고(0%), 105~110 μm 는 7.1%, 110~115 μm 12.5%, 115~120 μm 24.0%, 120~125 μm 18.3%, 120 μm < 0%로, 115~120 μm 직경난자의 체외발달율이 유의적($P < 0.05$)으로 높았다.

이상의 결과를 종합할 때, 돼지의 체외수정용 난자는 직경 110 μm 이상을 이용하는 것이 생산성을 높일 수 있는 방법으로 사료된다.

참고문헌

- Abeydeera LR and Day BN. 1997. Fertilization and subsequent development *in vitro* of pig oocytes inseminated in a modified tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 57:729-734.
- Barnes FL, Looney CR and Westhusin ME. 1991. Embryo cloning in cattle: The current state of technology. *Embryo Transfer Newsletter*, 6:1-6.
- Cran DG and Cheng WTK. 1986. The cortical reaction in pig oocytes during *in vivo* and *in vitro* fertilization. *Gamete Res.*, 13:241-251.
- Crozet N, Kanka J, Moltik J and Fullka J. 1986. Morphological and functional changes accompanying the acquisition of meiotic competence in ovarian goat oocyte. *J. Exp. Zool.*, 269:128-139.
- Crozet N. 1989. Nucleolar fine structure and RNA synthesis in bovine oocytes from antral follicles. *J. Reprod. Fertil.*, 38: 9-16.
- Fair T, Hyttel P and Greve T. 1995. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol.*

- Reprod. Dev., 42:437-442.
- Fulka JJ, Pavlok A and Fulka J. 1982. *In vitro* fertilization of zona-free oocytes matured in culture. J. Reprod. Fertil., 64:495-499.
- Loneragan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP and Gordon I. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following oocyte maturation, fertilization and culture *in vitro*. Mol. Reprod. Dev., 37:48-53.
- Masui Y and Markert CL. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. J. Exp. Zool., 177:129-146.
- Mattioli M, Bacci ML, Galeati G and Seven E. 1989. Developmental confidence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. Theriogenology, 31:1201-1207.
- Motlik J. 1989. Cytoplasmic aspects of oocyte growth and maturation in mammals. J. Reprod. Fertil., 38: 17-25.
- Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S and Suzuki T. 1997. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. Theriogenology, 48:769-774.
- Pavolk A, KOpenecy V, Lucas-Hahn A and Niemann H. 1993. Transcriptional activity and nuclear ultrastructure of 8-cell bovine embryos developed by *in vitro* maturation and fertilization of oocytes from different growth categories of antral follicles. Mol. Reprod. Dev., 35:233-243.
- Pavolk A, Lucas-Hahn A and Niemann H. 1992. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. Mol. Reprod. Dev., 31:63-67.
- Sirad MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barns FL, Sims ML and First NL. 1989. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocyte. Biol. Reprod., 40: 1257-1264.
- Suzuki H, Yang X and Foote RH. 1994. Surface characteristic and size change of immature, *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine oocytes. Theriogenology, 41:307(abstr.).
- Yoshida M, Mizoguchi Y, Ishigaki K, Kojima T and Nagai T. 1993. Birth of piglets derived from *in vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro*. Theriogenology, 39:1303-1311.

(접수일 : 1999. 1. 23 / 채택일자 : 1999. 3. 4)