

채취 방법에 따른 소 난포란의 회수율 및 수정란의 발달율

조상래¹ · 강태영 · 박종식 · 허창기¹ · 송상현¹ · 이효종 · 최상용[†]
경상대학교 수의과대학

Rates of Recovery and of Development *In vitro* of Follicular Oocytes Collected by Aspiration and Slicing Method in Cattle

S. R. Cho¹, T. Y. Kang, J. S. Bhak, C. G. Hur¹, S. H. Song¹,
H. J. Lee and S. Y. Choe[†]

Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

SUMMARY

This study was undertaken to compare the efficiency of recovery rate and development rate of follicular oocytes collected either by aspiration or by slicing method. The follicular oocytes collected by the two methods matured in TCM199 supplemented with 10% steer serum at 39°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. After 22 h of culture, the oocytes were inseminated with frozen-thawed semen (2 × 10⁶ sperm/ml of final concentration) prepared with Percoll-density gradient in IVF-TALP medium for 16 h. Later, sets of 15 presumptive zygotes were transferred into 50 μl droplets of CR1aa medium. On day 4 of the culture, embryos were transferred to TCM199 until day 9.

The percentages of nuclear maturation to pre-metaphase II in the oocytes collected by aspiration are significantly (P<0.05) higher than that by slicing (83% vs. 62%, respectively). The mean number of oocytes recovered by slicing per ovary is significantly (P<0.05) higher than that by aspiration (15.1 vs. 6.7, respectively). Although the rates of cleavage and development to blastocyst of oocytes collected by aspiration are significantly (P<0.05) higher than that by slicing, the number of transferable embryos obtained by slicing method is significantly (P<0.05) higher than that by aspiration. From the results, we may conclude that slicing method is better than aspiration method for obtaining large number of transferable embryos per ovary.

(Key words: aspiration, slicing, oocyte collection, cattle)

서 론

최근 미성숙 난포란은 생식세포의 기초 연구뿐만 아니라 산업적으로도 다양하게 이용되어져 오

고 있다. 체외수정 및 체외배양을 통한 수정란 이식산업과 유용 유전자를 이용한 질환모델 동물개발 등의 생명공학 분야에서 활발한 연구가 진행되면서 다량의 난포란이 필요하여, 도축난소로부터 많은 난포란을 채취하고자 여러 가지 방법들이 보

본 연구는 2000년 농림부 농림기술개발사업 기획연구과제의 연구비(MAF-SGRP, 300012-5)로 수행되었음.

¹ 경상대학교 응용생명과학부(Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University)

[†]Correspondence : sychoe@nongae.gsnu.ac.kr.

고되었다 (Xu 등, 1988, 1987; Mayr 등, 1986; Leibfried and First, 1979; Hunter 등, 1972; Sreenan, 1968).

현재, 난소로부터 미성숙 난자의 채란법으로 aspiration법 (Mayr 등, 1986; Xu 등, 1988)이 가장 일반적으로 사용되어 왔으나, 회수율이 적고, aspiration 과정 중에 난자로부터 난구세포가 쉽게 떨어지는 단점 때문에 dissection 또는 난소의 표면을 칼로 긁는 slicing 방법을 이용하여 난자를 채란하고 있다 (Wahid et al., 1992; Jiang et al, 1991; Lu K, 1990; Staigmiller and Moor 1984a,b; Suss and Madison, 1983). 특히, Suss와 Madison(1983)은 난소 한 개에서 채란한 난포란의 수는 slicing 방법에서는 20~30개였고, aspiration법으로는 11.5개를 채란하였다. aspiration법과 slicing법에 의한 난포란의 채란율과 채란된 난자의 난구세포의 치밀도 및 난세포질의 형태적 변화를 비교 연구한 결과 채란된 난포란의 품질은 aspiration법보다 slicing법이 더 좋았으며, 체외성숙 후 이들의 성숙능력은 서로간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다 (Carolan 등, 1994). 따라서, 난포란의 회수율을 향상시키기 위해서는 aspiration법보다 slicing법이 권장되고 있으나, 두 방법에 의해서 채란된 난자의 품질에 대한 비교 연구가 필요하다고 사료된다.

따라서, 본 연구에서는 도축된 소의 난소로부터 난포란을 회수하기 위한 방법으로 18G needle이 부착된 주사기를 이용한 aspiration 방법과 면도날을 장착하여 제작된 기구를 이용한 slicing 방법으로 난포란을 회수하여, 난포란의 회수율과 채란된 난포란의 핵 성숙율을 조사하고 체외수정 후 수정란의 발달율을 조사하여, 보다 효율적인 난포란의 회수 방법을 확립하여 여러 가지 연구에 활용하고자 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

본 실험에 사용된 모든 배양액은 초 순수장치 (Millipore S.A. 67120, France)에서 생산된 Milli-Q water를 사용하여 배양액을 제조하였다. 배양액 제조 후 pH는 7.2~7.4 및 삼투압은 $280 \pm 5\%$ mOsm/kg로 조정된 후 사용하였으며, 언급하지 않은 시

약과 배양액은 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였다.

1. 난포란의 채취

도축 유래 소 난소를 penicillin-streptomycin (Gibco, Pen-Strep)이 0.6 ml/L 함유된 $30 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 PBS (Phosphate Buffered Saline)로 3~4회 세척하였다. 실험군 I (aspiration 방법)은 18 G needle이 부착된 20 ml 주사기로 2~7 mm의 가시난포로부터 난포란을 채취하였고, 실험군 II (slicing 방법)는 면도날 다섯개를 조립하여 특수 제작된 기구를 사용하여 난포란을 채란하였으며, 채란방법은 제작된 기구 한쪽 모서리를 사용하여 난소 10개를 slicing하고 하나의 기구를 가지고 네모서리를 돌려가면서 40개의 난소를 slicing하였다 (Fig. 1). 한번 조립한 기구의 면도날로 약 40개의 난소를 slicing한 후 새로운 면도날로 교체 또는 멸균된 새로운 기구를 사용하였다. 1/4로 cutting 된 면도날 한 조각이 부착된 기구와 면도날 다섯개로 조립 부착된 기구를 이용해서 난포란의 회수율 및 회수 속도에 대한 예비 실험에서 면도날 다섯 조각이 부착된 기구를 이용하는 것이 유의적 ($P < 0.05$)으로 많은 난포란의 회수율을 보였고, 또한 slicing 속도도 빨랐다.

난포란의 채란에 사용한 배양액은 2% FCS (fetal calf serum)가 첨가된 Ham's F-10 배양액을 사용하였다. 채취된 난포란 및 난포액을 50 ml tube에 넣어 10분간 정치시킨 후, 침전된 pellet을 일회용 1 ml 피펫으로 흡입하여 직경 60 ml 배양접시에 옮겨 40배의 실체 현미경 (Olympus Co, Japan)에서 난포란을 수집한 후, Ham's F-10 배양액을 사용하

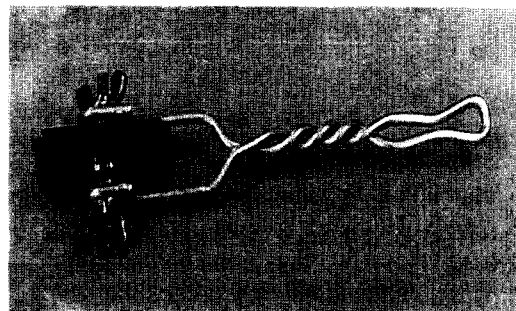


Fig. 1. A device designed to collect follicular oocyte.

여 2~3회 세척하여 난포란을 회수하였다.

2. 난포란의 체외성숙

난포란의 체외성숙용 배양액은 25 mM HEPES가 함유된 TCM199 배양액(Earle's salt)에 25 mM sodium bicarbonate, 0.11 g/L sodium pyruvate, 0.6 ml Pen-strep 및 10% steer serum (TerraCell, Canada)을 첨가하여 사용하였다.

난포란의 체외배양은 체외성숙 배양액 50 μ l에 15개의 난포란을 넣고 CO₂ 배양기 (5% CO₂, 98~99% 습도, 39°C)에서 22시간 동안 배양하여 일부는 난포란의 핵 성숙율을 조사하였고, 나머지는 체외수정에 공시하였다.

난포란의 핵 성숙을 조사는 22시간 체외배양된 난자를 3% sodium-citrate 용액에서 vortexing시켜 난구세포를 제거하고, 고정액 (acetic acid: methanol = 1 : 3)에 24시간 고정 한 후, 1% aceto-orcein으로 염색하였다. 난포란의 핵상은 400배 현미경하에서 germinal vesicle (GV), germinal vesicle break down (GVBD), prophase I (PI), metaphase I (MI), anaphase I (AI), telophase I (TI), prophase II (P II), metaphase II (M II) 및 unknown 등으로 구분하여 핵상을 조사하였다.

3. 난포란의 체외수정

정자의 처리 및 체외수정에 이용된 배양액은 Tyroid albumin lactate pyruvate (TALP) 배양액을 기본으로 하여 10 μ g/ml heparin이 첨가된 배양액을 체외수정용 배양액 (IVF-TALP)으로 이용하고, heparin이 첨가되지 않은 배양액을 정자세척용 (sperm-TALP)으로 이용하였다.

난포란의 체외수정은 본 실험실에서 동결보존한 정자를 사용하였으며, Rho 등 (1998)의 방법에 준하여 Percoll density gradient 방법으로 실시하였다. Percoll gradient의 준비는 100% percoll 용액(S-1644)에 10배 salt 용액(NaCl, 2.889 g; KCl, 0.238 g; KH₂PO₄, 0.116 g; CaCl₂, 0.112 g; HEPES, 0.163 g; Milli-Q 물, 50 ml)을 첨가하여 90% percoll 용액을 제조하였으며, 90% percoll 용액에 동량의

sperm-TALP을 첨가하여 45% percoll 용액을 준비하였다. 15 ml conical plastic tube의 아래층에 90% percoll 용액 2 ml을 넣고 그 상층에 45% percoll 용액 2 ml을 두 층이 섞이지 않도록 조심스럽게 분주하고, 45% percoll 용액 상층부위에 용해된 동결정액 0.5 ml을 넣어 1000×g에서 15분 동안 원심 분리시켜 정자 pellet을 회수하였다. 회수된 정자 pellet을 10 ml의 sperm-TALP 용액에 넣어 350×g에서 10분간 원심 분리시켜 세척하였다.

체외수정은 체외성숙된 난포란을 sperm-TALP 배양액으로 vortexing하여 난구세포층의 일부를 제거한 다음, IVF-TALP 배양액에서 2~3회 세척하였다. 수정용 50 μ l의 IVF-TALP 배양액의 미세소체에 15개의 난자를 옮긴 다음, percoll gradient에 의해서 준비된 정자를 최종농도가 2×10⁶ sperm/ml이 되도록 첨가하여 CO₂ 배양기에서 16~18시간 체외수정을 유도하였다.

4. 수정란의 체외배양

체외수정된 수정란은 sperm-TALP에서 vortexing시켜 난구세포와 정자를 완전히 제거한 후, CR1aa 배양액 (CR1 salts; sodium chloride 114.7 mM, potassium chloride 3.1 mM, sodium bicarbonate 26.2 mM, Hemicalcium lactate 5 mM, sodium pyruvate 0.4 mM; Rosenkrans 등, 1990)에서 배양 제 72시간까지 배양시키고 그 후 배양 제 216시간까지는 10% FCS가 첨가된 TCM 199 (without HEPES) 배양액에서 배양하였다.

체외수정란의 분할율은 체외수정 후 48시간째 확인하였으며, 배반포 수정란과 부화중인 수정란은 각각 수정 후 192과 216시간째에 각각 비교 조사하였다.

5. 통계학적 분석

실험결과와 통계적 분석은 SAS package(version 6,12)를 이용하여 실시하였으며, GLM(General Linear Model) Procedure를 적용하여 각 요인의 Least square means를 구하여 요인간의 유의성(P<0.05)을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 채란 방법에 따른 채란율 및 핵 성숙도 조사

Aspiration법과 slicing법으로 채란된 난자의 체외성숙도를 알아보기 위해 aceto-orcein 염색을 하여 핵 성숙율을 조사한 결과는 Table 1과 같다. Aspiration법과 slicing법으로 채란된 난자를 22시간 체외배양 후 난자의 핵 성숙율은, 수정적기에 있는 제 2감수분열 중기 상태인 것이 aspiration법은 83%이었으며, slicing법은 62%로 두 군간에 유의적인 ($P<0.05$) 차이를 보였다. GV-GVBD 상태의 비율은 aspiration법이 3.5%, slicing법이 13.0%로서 slicing법이 aspiration법 보다 유의적 ($P<0.05$)으로 높게 나타났다. 이러한 결과는 slicing을 함으로써 가시난포 뿐만 아니라 원시난포에서도 난자가 채란됨을 시사한다.

81개의 난소를 aspiration법으로 채란하였고, 80개의 난소를 slicing법으로 채란한 바 aspiration법에서는 546개, 그리고 slicing법에 의해서는 1,211개의 난자를 채란하게 되었다. 이러한 결과로 난소 1개에서 회수된 평균 난자의 수는 aspiration법은 6.7개, 그리고 slicing법에 의해서는 15.1개로 slicing법이 유의적 ($P<0.05$)으로 높은 회수율을 보였다. 이러한 차이는 같은 방법이라도 채란상에 문제가 있는 것으로 사료되며 본 실험에서 강조하고자 하는 것은 aspiration법과 slicing법과의 차이로서 채란 시 어느 방법이 더욱 많은 수의 난자를 회수되는가 하는 것이다. 소를 이용한 실험에서 Suss와 Madision (1983)은 slicing법으로 난포란을 회수한

바 난소 한 개당 20~30개의 난포란을 채란하여 본 연구 결과에서 얻은 15개보다도 다소 높은 결과를 나타내었다. 이와는 직접적인 비교할 수는 없지만, Mayr 등 (1986)과 Xu 등 (1988)은 aspiration법을 이용하여 난소 당 평균 11개 난포란을 채란하였으며, 그 중 약 50%가 체외수정에 공시할 수 있는 난자라고 보고하였다. 이는 aspiration법이 slicing법보다 채란율이 저조함을 시사한다. 또한, 양 (Kay와 Frylinck, 1992)과 염소 (Mogas 등, 1992)에서도 slicing을 함으로써 aspiration 보다 많은 난포란을 채란하여 slicing 방법으로 채란하는 것이 수정란 생산에 효과적이라고 보고하였다. 본 연구 결과 체외배양 후 수정 가능한 제 2감수분열 중기 상태의 난자수는 난소 한 개 당 aspiration법에 있어서는 5.6개 였으나, slicing법에 있어서는 9.4개를 보였다. 따라서 난포란을 slicing법으로 채란하는 것이 aspiration법으로 채란하는 것보다 유의적으로 ($P<0.05$) 많은 제 2 감수분열 중기 상태의 난자 확보를 할 수 있으며, 수정란 생산성 향상에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

2. 채란 방법에 따른 발달을 조사

Aspiration법과 slicing법으로 채란된 난포란을 체외성숙시킨 다음, 체외수정에 공시하고, 그에 따른 분할율과 배반포기배의 발달율을 각각 비교 조사한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 체외성숙된 난자의 2 세포기 배 분할율은 aspiration법에 의해서 채란된 난포란의 경우 84%로 slicing법에 의한 67% 보다 유의적 ($P<0.05$)으로 높은 결과를 보였는데, 본 연구와 유사한 결과로서 Takagi 등

Table 1. Nuclear status of bovine oocytes matured *in vitro* for 22h after collection by two methods

Collection method	Ovaries	Recovered oocytes (oocytes/ovary)	Nuclear status (%)**					MII/ovary
			GV-GVBD	P-MI	A-T II	P-M II	Unknown	
Aspiration	81	546 (6.7) ^a	19 (3.5) ^a	38 (7.0)	10 (1.8)	453 (83) ^a	23 (4.2)	5.6 ^a
Slicing	80	1211 (15.1) ^b	159 (13.0) ^b	117 (9.7)	64 (5.2)	748 (62) ^b	123 (12.3)	9.4 ^b

* Percentages with different superscripts within columns indicate significant differences ($P<0.05$).

** GV: Germinal Vesicle, GVBD: Germinal Vesicle Breakdown, MI: metaphase I, AI-TI: anaphase I- telophase I, P-M II: prophase II- metaphase II, unknown : un-determination. ***4 replicates.

Table 2. Comparison of developmental rates of oocytes collected by two different methods

Collection method	Ovaries used	Oocyte collected	Developed to (%)		
			2-cell	Blastocyst	Blastocyst/ovary
Aspiration	152	1317	1106 (84) ^a	320 (24.3) ^a	2.1 ^a
Slicing	168	2563	1718 (67) ^b	474 (18.5) ^b	2.8 ^b

* Percentages with different superscripts within columns indicate significant differences (P<0.05).

** 4 replicates

(1992)은 aspiration에 의해 채란된 난포란의 체외 수정율이 mincing에 의해 채란된 난포란의 수정율보다 유의적으로 높았다고 보고한 바 있다. 그러나, 이와는 반대로 Carolan 등(1994)은 aspiration과 Dissection 시 각각 82.3%와 84.7%의 수정율을, Hamano와 Kuwayame(1993)도 Aspiration과 Cutting시 79.7%와 82.4%의 수정율로 유의적인 차이가 없었다고 보고하였다.

본 연구에서는 수정란을 체외발달시킨 결과 채란방법에 따른 배반포기배까지 발달율에 있어서 aspiration법에 의해서 채란된 난포란의 배반포기까지 발달율은 24.3%로 slicing법에 의해서 채란된 난포란의 발달율, 18.5%보다 유의적인 (P<0.05) 차이를 보였다. 그러나 이러한 결과와는 반대로 난소 한 개당 생산된 배반포기 수정란의 수는 slicing법에 있어서 2.8개로 aspiration법의 2.1개보다 유의적인 (P<0.05) 증가를 보였다. 이는 aspiration법이나 slicing법에 의해서 채란된 난자의 발달율이 차이가 없다는 Carolan 등(1994)의 결과와는 상반되지만, slicing법으로 난포란을 채란한 경우 aspiration법보다 3배 이상의 배반포기배를 생산할 수 있었다는 Hamano와 Kuwayame (1993)의 보고와 일치하였다. Carolan 등(1993)도 난포란의 채란에 있어서 aspiration법보다 오히려 slicing법이 배반포기배의 생산량이 많으며, aspiration법이 시간적인 면에서는 다소 빠를 수 있지만 slicing법은 적은 수의 난소를 이용하여 같은 수의 난자를 획득할 수 있다는 장점을 지니고 있다고 보고하여 slicing법의 이용을 권장하기도 하였다.

따라서, 본 연구에서 제작된 기구를 사용하여 slicing법으로 난포란 채란하는 것이 이식 가능한 체외수정란의 대량생산을 위해서 유리하다고 사료

된다.

적 요

본 연구에서 도출된 한우 난소를 aspiration법과 면도날 장착으로 제작된 기구를 이용해서 slicing법으로 난포란을 회수하여 그에 따른 난포란의 회수율과, 난포란을 체외에서 22시간 성숙시킨 후 난포란의 핵 성숙 및 체외수정 후 수정율과 발달율을 요약하면 다음과 같다.

1. 난포란의 회수율에 있어서 각 난소당 회수는 aspiration법이 6.7개, slicing법이 15.1개의 결과를 나타내어 난소에 대한 난포란의 회수율은 slicing법이 유의적 (P<0.05)으로 높은 결과를 나타내었다.
2. Aspiration법과 slicing법으로 채란된 난자를 체외에서 22시간 성숙시킨 후, 제 2감수분열 중기까지의 핵 성숙율은 각각 83%와 62%로 유의적인(P<0.05) 차이를 보였으나, 난소 한 개당 제 2감수분열 중기까지 성숙된 난포란수는 aspiration과 slicing법이 각각 5.6개와 9.4개로 slicing법에 의해서 유의적 (P<0.05)으로 많았다.
3. Aspiration법과 slicing법으로 채란된 난포란의 발달율 조사결과를 살펴보면 분할율과 배반포기까지의 발달율에서 aspiration법이 유의적 (P<0.05)으로 높게 나타났으나, 이와 상반되게 난소 한 개당 생산된 배반포기 수정란의 수는 slicing법에 있어서 2.8개로 aspiration법의 2.1개보다 유의적인 (P<0.05) 증가를 보였다.

이상의 결과에 따라 많은 난자를 이용하기 위한 목적과 혹은 이식 가능한 다수의 수정란

생산을 위해서는 본 연구에서 고안 제작된 기구를 이용하여 slicing 방법으로 난포란을 채란하는 것이 효과적인 방법이 될 것으로 사료된다.

참고문헌

- Carolan C, Monaghan P, Gallagher M and Goden I. 1993. Developmental capacity of unselected bovine oocytes recovered from individual pairs of ovaries by surface dissection. Proceeding of the Ninth Congress of the European Embryo Transfer Association (Lyon), 180.
- Carolan C, Monaghan P, Gallagher M and Goden I. 1994. Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Theriogenology*, 41:1061-1068.
- Hamano S and Kuwayama M. 1993. *in vitro* fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donor. *Theriogenology*, 39:703-712.
- Hunter RHF, Lawson RAS and Rowson LEA. 1972. Maturation, transplantation and fertilization of ovarian oocytes in cattle. *J. Reprod. Fertil.*, 30:325-328.
- Jiang HS, Wang WL, Lu KH, Gorden I and Polge C. 1991. Roles of different cell monolayers in the co-culture of IVF bovine embryos. *Theriogenology*, 35:216.
- Kay GW and Frylinck S. 1992. Recovery of ovine follicular oocytes: effect of different methods on yield and quality. Proceedings of the Twelfth International Congress on Anim. Reprod. (Hague) 1:345-347.
- Leibfried L and First NL. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 48:76-86.
- Lu K. 1990. Studies related to the *in vitro* maturation and fertilization of ovarian oocytes in cattle. PhD Thesis, National University of Ireland, Dublin.
- Mayr B, Schellander K, Schleger W and Fuher F. 1986. Bovine oocytes: *in vitro* maturation and IVF study. Proceeding of Congress on Future Aspects in Human *in vitro* Fertilization (Vienna). *J. In vitro Fert. Embryo Trans.*, 3:76-77.
- Mogas TA, Maritino MF, Palomo MJ and Paramio MT. 1992. Effect of method of recovery on the number and type of oocytes obtained for IVM. *J. Reprod.*, 52:90 (abst.).
- Rho GJ, Johnson WH and Betteridge KJ. 1998. Cellular composition and viability of demi-embryos made from bisected bovine morulae and blastocysts produced *in vitro*. *Theriogenology*. 50:558-895.
- Rosenkrans C, Jr GZ, Zeng PK, Schoff and First NL. 1990. A simple medium for *in vitro* development of bovine embryos. *J. Anim. Sci* 68 (suppl.1): 430.
- Sreenan JM. 1968. *In vivo* and *In vitro* culture of cattle eggs. Proceeding of the Sixth International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination (Paris) 1:577-580.
- Staigmiller RB and Moor RM. 1984a. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. *Gamete Research*. 9:221-229.
- Staigmiller RB and Moor RM. 1984b. *In vitro* maturation of extrafollicular ovine oocytes. Proceedings of the Tenth International Congress on Anim, Reprod, and Artifi Ins. (Illinos) 2: 43.
- Suss U and Madison. 1983. Morphology and meiotic development of bovine oocytes cultured *in vitro*. *Archives of Andrology* 11:217-218.
- Takagi T, Mori K, Takahashi T, Sugawara S and Masaki J. 1992. Differences in development of bovine oocytes recovered by aspiration or by mincing. *J. Anim. Sci.*, 70:1923-1927.
- Wahid H, Monaghan P and Gorden I. 1992. *In*

vitro maturation (IVM) of the sheep follicular oocytes. J. Reprod. Fertil., 52:89(abst.).

Xu K, Heier R and Greve T, 1987. Dynamic changes of estradiol concentration in two culture systems for bovine oocytes maturation *in vitro*. Theriogenology, 27:297(abst.).

Xu K, Greve T, Callesen H and Hyttel P. 1988. Birth of a calf following *in vitro* fertilization of *in vitro* matured oocytes. J. Reprod. Fertil., 1:18(abst.).

(접수일: 2001. 5. 18 / 채택일: 2001. 6. 8)