

체외성숙용 배지에 혈청과 호르몬의 첨가가 한우 난포란의 핵성숙과 배발달 및 배반포의 세포수에 미치는 영향

박용수[†] · 김재명¹ · 박흠대²
경상북도축산기술연구소

Effects of Serum and Gonadotropins in *In-Vitro* Maturation Medium on Nuclear Maturation, Development and Cell Numbers of Korean Native Cow Embryos

Y. S. Park[†], J. M. Kim¹ and H. D. Park²

Kyongbuk Livestock Research Institute

SUMMARY

The main objective of this study was to examine the effects of serum and gonadotropins supplement during *in vitro* maturation(IVM) of bovine oocytes on nuclear maturation and embryo development, and we also examine the cell number.

1. The first polar body(PB) extrusion rates of Korean native cow(KNC) oocytes matured in medium with FBS or gonadotropins were similar among treatment groups. The development rate to the blastocyst stage was significantly higher in the group of both supplement FBS and gonadotropins(26.0%) than in the group of non-supplement(9.9%) and gonadotropins (12.0%). The numbers of inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) cells and total cell numbers of blastocysts were highest in the group of both supplement FBS and gonadotropins, and the number of ICM cells was increased by FBS supplementation ($p<0.05$).
2. The PB extrusion rates of KNC oocytes matured in medium with FBS in the different duration of IVM was significantly higher in the 0~18hr(63.1%) and in the 9~18hr(63.4%) group than in the 0~9hr(37.4%) group ($p<0.05$). The embryo development rates did not differ among treatment groups. The numbers of TE cells and total cell numbers of blastocysts were similar among treatment groups, but the number of ICM cells of the 0~18hr group were significantly higher than the other treatment groups ($p<0.05$).

The results indicate that although TCM199 alone can support bovine oocyte maturation and development to the blastocyst stage, a high quality of blastocysts can be produced from oocytes matured in medium containing serum and gonadotropins.

(Key words : *in vitro* maturation, 1st polar body, embryo development, cell number)

서 론

포유동물의 난자는 난포 환경으로부터 분리되

1 포천중문의과대학 생리학교실(College of Medicine, Pochon Cha University)

2 대구대학교 식품생명공학부(Division of Life Food and Biotech, Daegu University)

[†] Correspondence : E-mail : pys0112@chollian.net

면 자발적으로 성숙이 진행되므로(Edward, 1965; Eppig 등, 1992), 수정란의 체외생산에 관한 연구는 지금까지 주로 체외배양 방법에 관한 것이었다(Lee와 Fukui, 1996). 한편 소 난포란은 직경 2~8mm 정도의 난포로부터 회수하기 때문에 난포란의 발육 단계도 난포의 크기에 따라 다르다. 따라서 회수된 난포란이 동일한 환경에서 성숙이 유도되는 것은 적합한 방법이라고 할 수 없으며, 난포란의 성숙은 핵성숙과 세포질성숙이 같이 일어나야 한다(Sirard 등, 1989). 또한 체외에서 착상 전 단계의 배 발생에는 핵성숙과 더불어 세포질성숙이 수반되어야 하므로 단순한 배양체계의 개선으로는 그 한계가 있기 때문에 적절한 체외성숙법의 확립이 필요하다(Nagai, 2001).

소의 미성숙 난포란은 일반적으로 혈청과 성선 자극호르몬이 첨가된 TCM199 배지에서 성숙이 유도되며(Fukui 와 Ono, 1989), 제공된 난자의 약 90%가 체외에서 성숙되어지며 이중 70~75%가 정상적인 수정과정을 거쳐서 1-세포기에 도달한다(Watson 등, 2000). 이후 5~7일간의 배양과정을 통하여 체외에서 수정된 수정란의 20~30% 만이 이식 가능한 배반포까지 발달하여 이식에 제공된다(Lim 등, 1999). 그러나 지금까지의 연구에도 불구하고 체외성숙된 난자의 배 발생이 저조한 것은 난포란의 핵 성숙 및 세포질 성숙이 체내에서와 같이 정상적으로 일어나지 않을 뿐 아니라 수정 및 배발생의 조건이 적합하지 않기 때문이다(Iwasaki 등, 1990).

소 난포란의 체외성숙에는 도축장에서 난소 운반시간 및 온도(Yang 등, 1990), 체외성숙 시간(Park 등, 2003, Ward 등, 2002), 난포의 크기(Blondin와 Sirard, 1995), 배지의 구성성분(Sirard 등, 1989), 아미노산(Park 등, 2004), 성장인자(Watson 등, 2000), CO₂ 농도(Geshi 등, 1999) 및 체세포와의 공동배양(Hunter, 2000) 등의 요인들이 영향을 미친다. 특히, 체외성숙용 배지에 첨가하는 혈청은 전형적인 단백질원으로 배지에 첨가되어 배독소의 감소, 초기 배의 성장에 필요한 영양 제공 그리고 배발달을 촉진시키는 성장인자의 방출과 같은 중요한 역할을 한다(Nagai, 2001). 그러나 배발달에 있어서 혈청의 효과에 대해서는 상반된 보고가 있다(Khatir

등, 1998; Lonergan 등, 1994). 또한 성선자극호르몬인 FSH와 LH는 체외성숙용 배지에 공동 또는 단독으로 첨가되어 난포란의 세포질 성숙의 향상(Choi 등, 2001)과 응성전핵형성 촉진(Kito와 Bavister, 1991)에 효과적이었다. 그러나 지금까지 체외성숙시의 첨가물에 대한 연구는 핵성숙과 배발달에 관한 연구가 대부분으로, 생산된 배반포의 품질에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

본 연구는 한우 수정란의 체외생산에 있어서 체외성숙용 배지에 혈청과 호르몬의 첨가와 더불어 혈청의 첨가 시기에 대한 효과를 검토하기 위하여 난포란의 제1극체 출현, 배발달 및 배반포의 세포수를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 배양액

본 연구에 사용된 배양액 중 난소로부터 난포란의 세척 및 회수용은 25mM HEPES와 3mg/ml BSA(Sigma, A6003)가 첨가된 Hepes-buffered TALP(HbT)용액, 체외성숙용은 0.2mg/ml pyruvate(Sigma, P3662)가 첨가된 TCM-199(Gibco, 12340-030)용액을 기본 배지로 하여 실험 1에서는 기본 배지에 혈청(10% FBS, Sigma, F0643)과 성선자극호르몬(1 µg/ml FSH, Sigma, F8174 및 10 µg/ml LH, Sigma, L9773)을 공동 또는 단독 첨가하였고, 실험 2에서는 성선자극호르몬이 첨가된 기본 배지에 혈청을 각각 미첨가, 0~9시간, 9~18시간 및 0~18시간 동안 첨가하였다. 체외수정용은 6mg/ml BSA와 10 µg/ml heparin(Sigma, H3149)이 첨가된 TALP용액, 체외배양용은 3mg/ml BSA 그리고/또는 10% FBS가 첨가된 CR1aa용액을 각각 이용하였다. 그리고 실험에 제공되는 배양액의 미세소적은 mineral oil(Sigma, M8410)을 도포하여 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 최소한 4시간 이상 전 배양하였다.

2. 난포란의 회수 및 체외성숙

도축 한우에서 난소를 적출하여 25 µg/ml gentamycin(Sigma, G1264)이 첨가된 0.9% 생리식염수(25~28°C)가 들어있는 보온병에 담아 6~7시간에 실험실로 운반하였다. 수집된 난소는 penicillin G

(Sigma, P3032)가 첨가된 생리식염수로 3~4회 세척하여, 18G 주사침이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 직경 2~8mm의 가시난포로부터 난포란을 회수하였다. 회수된 난포란은 실체현미경하에서 난구세포의 부착상태가 치밀한 것만을 선별하여, 50 μ l의 체외성숙용 배지에 15개 난포란을 옮겨 18시간 동안 39°C, 5% CO₂ 배양기에 배양함으로써 체외성숙을 유도하였다.

1) 제1극체 출현율

제1극체는 체외성숙 후 난구세포가 확장된 난포란을 0.3% hyaluronadase(Sigma, H4272)가 함유된 PBS 용액으로 5분간 강하게 pipetting하여 난구세포를 제거하고 실체현미경하에서 제1극체의 출현을 관찰하였다.

3. 체외수정

한우 동결정액 1~2개를 실온에서 10초간, 37°C의 항온수조에서 30초간 처리하여 용해한 후 90% percoll(Sigma, P4937) 2 ml 용액이 담겨져 있는 15 ml 원심분리관(Corning, 430052)에 살며시 놓은 후 700g에서 20분간 원심분리 후 하층부의 정자괴만을 회수하여, 2 ml의 신선 체외수정용액으로 350g에서 다시 10분간 원심분리함으로써 정자를 세척하였다. 그리고 정자농도는 25×10^6 sperms/ml가 되도록 조절하여, 난포란이 함유되어 있는 46 μ l의 체외수정용액에 heparin 2 μ l와 정자 2 μ l를 첨가, 최종 정자농도 1×10^6 sperms/ml가 되도록 조정하고 39°C, 5% CO₂ 배양기에 배양함으로써 체외수정을 유도하였다.

4. 체외배양

체외수정 20시가 후 15개의 수정란(배양 1일)을 3mg/ml BSA가 첨가된 CR1aa 용액 50 μ l에 넣고, 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였으며, 배양 3일째부터 10% FBS가 첨가된 CR1aa 용액으로 난관상피세포와 공배양을 행하였으며(Park 등, 2004), 배양 5일 및 7일째에 50%씩 신선 배양액으로 교환하였다.

5. 배반포의 이중형광염색

배양 7, 8일째에 배반포의 세포수를 측정하기 위하여 propidium iodide (Sigma, P4170; PI)와 bis-Benzimide(Sigma, B2261)를 사용하여 이중형광염색을 실시하였다(Giles 등, 1995). 배반포의 투명대를 0.5% pronase(Sigma, P6911) 용액으로 처리하여 용해시킨 후, HbT로 3~5회 세척하였다. 그리고 rabbit anti-bovine whole serum(Sigma, B8270)이 1:5로 희석된 HbT 용액에서 1시간 배양한 후, HbT용액에 1:10으로 희석된 guinea pig complement(Sigma, S-1639; PI와 bisbenzimidazole이 각각 4 μ g/ml 첨가)에서 1시간 처리하여 염색을 행하였다. 배반포를 HbT로 5분간 세척한 후, slide glass에 whole mount하여 형광현미경하에서 배반포의 inner cell mass(ICM)와 trophectoderm(TE)의 세포 수를 각각 조사하였다.

6. 통계처리

실험 결과에 대한 통계학적 분석을 위해 제1극체 출현율과 배발달율은 χ^2 -test를, 배반포의 세포수는 Duncan's multiple range test를 이용하였다.

결 과

1. 혈청이 배발달과 세포수에 미치는 영향

1) 배발달율

체외성숙용 배지에 혈청 및 성선자극호르몬의 첨가가 한우 난포란의 제1극체 출현율과 체외수정 후 배 발달에 미치는 효과를 검토한 결과는 Table 1과 같다. 대조군은 TCM199 배지에 혈청과 성선자극호르몬을 공동 미첨가하였고, 실험군은 TCM199 배지에 혈청, 성선자극호르몬 및 혈청과 성선자극호르몬을 각각 첨가하였다. 제1극체 출현율은 대조군과 실험군에서 54.5~63.0%로서 비슷한 경향이였다. 수정율은 혈청 및 성선자극호르몬 공동 첨가군이 77.4%로서 다른 처리군의 60.9~68.2%보다 높았으나 유의성은 인정되지 않았다. 배반포기까지의 발달율은 혈청 및 성선자극호르몬 공동 첨가군이 26.0%로서 혈청 및 성선자극호르몬 공동 미첨가군의 9.9%와 성선자극호르몬 단독 첨가군의 12.0%보다 유의하게 높았다($p < 0.05$).

Table 1. Effects of serum and gonadotropin supplements in maturation medium on *in vitro* development of Korean Native Cow oocytes

Treatments	% of first polar body extrusion	No. of oocytes	No. (%) of embryos developed to	
			≥2-cell	Blastocyst
TCM199	54.5	126	80(65.5)	12(9.9) ^a
+Gonadotropins	57.8	119	83(68.2)	16(12.0) ^a
+Serum	60.0	107	66(60.9)	20(19.1) ^{ab}
+Serum, Gonadotropins	63.0	121	94(77.4)	31(26.0) ^b

^{ab}: Values in the same columns with different superscripts were significantly different($p<0.05$).

2) 세포수

체외성숙용 배지에 혈청 및 성선자극호르몬의 첨가에 의해 생산된 배반포의 품질을 평가하기 위하여 세포수를 검토한 결과는 Table 2와 같다. 총 세포수는 혈청 단독 첨가군과 혈청 및 성선자극호르몬 공동 첨가군이 각각 평균 122.0개와 132.4개로서 혈청 및 성선자극호르몬 공동 미첨가군의 평균 83.4개보다 유의하게 많았다($p<0.05$). ICM 세포수는 혈청이 첨가된 두 처리군(혈청 첨가군 평균 25.5개, 혈청 및 성선자극호르몬 공동 첨가군 평균 26.4개)이 혈청이 미첨가된 두 처리군(혈청 및 성선자극호르몬 공동 미첨가군 평균 8.9개, 성선자극호르몬 단독 처리군 평균 11.1개)에 비하여 유의하게 많았다($p<0.05$). TE 세포수는 혈청 및 성선자극호르몬 공동 첨가군이 평균 106.0개로서 가장 많았으며, 특히 혈청 및 성선자극호르몬 공동 미첨가

군의 평균 74.6개와는 유의성이 인정되었다($p<0.05$).

2. 혈청의 첨가 시기가 배발달과 세포수에 미치는 영향

1) 배발달을

체외성숙용 배지에 혈청의 첨가시기가 한우 난포란의 제1극체 출현율과 체외수정 후 배발달에 미치는 효과를 검토한 결과는 Table 3과 같다. 대조군은 체외성숙 전 기간 동안에 혈청이 미첨가되었고, 실험군은 각각 0~9, 9~18 및 0~18 시간 동안 혈청을 첨가하였다. 제1극체 출현율은 대조군이 56.1%였고, 실험군에서는 0~9 시간군이 37.4%로서 9~18 시간군(63.4%)과 0~18 시간군(63.1%)의 것에 비하여 유의하게 낮았다($p<0.05$). 수정율은 9~18 시간군이 75.5%로서 가장 높았고,

Table 2. Effects of serum and gonadotropin supplements in maturation medium on ICM, TE and total cell number of Korean Native Cow blastocysts

Treatments	N	No. (%) of cells		
		Total	ICM ¹	TE ²
TCM199	7	83.4±17.6(100) ^a	8.9±3.9(10.7) ^a	74.6±14.2(89.3) ^a
+Gonadotropins	18	106.6±11.0(100) ^{ab}	11.1±2.1(10.4) ^a	95.4±10.6(89.6) ^{ab}
+Serum	12	122.0±13.1(100) ^b	25.5±4.8(20.9) ^b	96.5± 9.9(79.1) ^{ab}
+Serum, Gonadotropins	16	132.4± 9.7(100) ^b	26.4±3.4(19.9) ^b	106.0± 8.7(80.1) ^b

¹ ICM: Inner cell mass.

² TE: Trophectoderm.

^{ab}: Values in the same columns with different superscripts were significantly different($p<0.05$).

Table 3. Effects of the duration of serum supplement in maturation medium on *in vitro* development of Korean Native Cow oocytes

Duration	% of first polar body extrusion	No. of oocytes	No. (%) of embryos developed to	
			≥2-cell	Blastocyst
Control ¹	56.1 ^{ab}	79	51(68.4)	16(27.9)
0~18	63.1 ^b	69	46(67.5)	22(33.7)
0~9	37.4 ^a	97	57(60.7)	27(30.1)
9~18	63.4 ^b	81	61(75.5)	20(28.9)

¹ Control: Non-supplement serum in maturation medium.

0~9 시간군이 60.7%로서 가장 낮았으나 유의차는 인정되지 않았다. 배반포기까지의 발달율은 0~18 시간군이 33.7%로서 가장 높았으나 다른 군과의 유의성은 인정되지 않았다.

2) 세포수

체외성숙용 배지에 혈청을 서로 다른 시기에 첨가함에 따라 체외 생산된 배반포의 품질을 평가하기 위하여 배반포의 세포수를 검토한 결과는 Table 4와 같다. 총 세포수는 각각 대조군이 평균 90.4개, 0~18 시간군이 평균 128.1개, 0~9 시간군이 평균 110.0개 및 9~18 시간군이 평균 117.8개로서 0~18 시간군이 가장 많았으나 각 군간의 유의차는 인정되지 않았다. ICM 세포수는 0~18 시간군의 평균 33.3개는 대조군의 평균 11.6개, 0~9 시간군

의 평균 15.3개 및 9~18 시간군의 평균 19.3개에 비하여 유의하게 많았다($p<0.05$). TE 세포수는 대조군이 평균 78.8로서 가장 낮았고, 9~18 시간군이 평균 98.5개로 가장 많았으나 유의차는 인정되지 않았다.

고 찰

본 연구는 한우 수정란의 체외생산에 있어서 체외성숙용 배지에 혈청과 호르몬의 첨가와 더불어 혈청의 첨가 시기에 대한 효과를 검토하기 위하여 난포란의 제1극체 출현과 배발달율을 조사하였고, 생산된 배반포의 품질을 평가하기 위하여 세포수를 검토하였다.

체외수정란 생산을 위한 배지에 첨가하는 혈청

Table 4. Effects of the duration of serum supplement in maturation medium on ICM, TE and total cell number of Korean Native Cow blastocysts

Duration	No. of blastocysts	No. (%) of cells		
		Total	ICM ¹	TE ²
Control ³	10	90.4± 9.1(100)	11.6±2.0(12.8) ^a	78.8± 8.8(87.2)
0~18	10	128.1±11.4(100)	33.3±2.6(26.0) ^b	94.8± 9.6(74.0)
0~9	10	110.0±15.3(100)	15.3±3.2(13.9) ^a	94.7±15.1(86.1)
9~18	10	117.8±12.5(100)	19.3±3.1(16.4) ^a	98.5±11.5(83.6)

¹ ICM: Inner cell mass.

² TE: Trophoctoderm.

³ Control: Non-supplement FBS in maturation medium.

^{a,b,c}: Values in the same columns with different superscripts were significantly different($p<0.05$).

은 hormones, growth factors, vitamins, 각종의 chelator 및 nondefined molecule가 함유되어 있어서 배 독소의 감소, 영양소 제공, 배 발달 촉진 등과 같은 중요한 역할을 하며(Gardner와 Lane, 1993), 착상 전 단계의 수정란에 고정질소원(fixed nitrogen source)으로 작용한다(Gardner, 1994). 여러 종류의 혈청이 사용되고 있으나 효과와 경제적인 측면에서 fetal bovine serum을 주로 이용하고 있으며 10~20%의 농도로 첨가하고 있다(Rebecca 등, 1999). Khatir 등(1998) 및 Pinyopummintra와 Bavister(1991, 1994)는 체외성숙 배지에 혈청의 첨가로 핵성숙율과 배발달율이 증가하였으나, Lonergan 등(1994) 및 Abeydeera 등(1998)은 상반된 결과를 보고하였다. 한편 체외성숙용 배지에 성선자극호르몬인 FSH와 LH의 첨가는 난구세포 팽창(Choi 등, 2001), 핵성숙율 향상(Ali와 Sirard, 2002) 및 응성전핵형성 촉진(Kito와 Bavister, 1991) 등의 효과를 가지고 있으나 배 발달에는 효과가 없었고(Ali와 Sirard, 2002), FSH와 LH의 단독 첨가보다는 공동 첨가시 난포란의 성숙율이 증가하였다(Kim 등, 2001; Trounson 등, 2001). 본 연구의 결과에서 체외성숙용 배지에 혈청과 성선자극호르몬의 단독 또는 공동 첨가는 Lonergan 등(1994)과 Abeydeera 등(1998)의 견해와 같이 핵성숙의 지표인 제1극체 출현율에는 차이가 없었다. 그러나 배반포까지 발달율은 혈청과 성선자극호르몬의 공동 첨가로 상승하여 Ali와 Sirard(2002)의 견해와는 반대였다. 이러한 결과는 혈청 및 성선자극호르몬 미첨가 배지에서도 핵성숙이 가능하지만, 혈청과 성선자극호르몬의 첨가는 배발달에 유효하다는 Pinyopummintra와 Bavister(1994) 및 Trounson 등(2001)의 보고와 유사한 결과로서, 혈청에 존재하는 성장인자와 같은 unknown factor가 난포란의 핵 성숙보다는 세포질 성숙에 유효한 것으로 사료된다.

여러 조건하에서 체외생산된 배반포의 품질 평가는 배반포의 현미경적 관찰(Linder와 Wright, 1983), 배반포의 분화(Behboo 등, 1995), 배반포의 세포수(Papaioannou와 Ebert, 1988), 배반포의 대리모에 이식 후 수태율 등으로 판정하고 있다. 이중 현미경적 관찰은 실험자의 경험에 의존하는 경

우가 많으며, 배반포의 분화는 배양 환경에 따라 달라지고, 수태율은 판정 기간이 오래 걸린다는 단점 등으로 인하여 가장 객관적인 방법은 배반포의 세포수의 측정이다(Papaioannou와 Ebert, 1988). 체내 유래 배반포의 세포수는 120~140개이고, 이중 ICM은 30~35%, 나머지는 TE 세포로서 이와 같은 세포수를 차지하고 있지 않은 배반포를 이식하였을 경우 수태율은 저하하였다(Park 등, 2003). Watson 등(2000)은 체외성숙에 이용한 배지에 따른 세포수의 차이가 있었으나, 동일한 배지에 혈청의 첨가는 세포수에 효과가 없었다. 그러나 Pinyopummintra와 Bavister(1991)은 혈청의 첨가로 배발달율의 향상과 더불어 세포수가 증가하였고, Choi 등(1999)은 체외성숙에서 혈청과 호르몬의 공동 첨가로 세포수가 증가하였다. 본 연구에서 체외성숙용 배지에 성선자극호르몬의 단독 첨가에 따른 세포수 증가의 효과는 없었으나, 혈청의 단독 첨가는 ICM 및 총세포수가 유의하게 상승하여 Watson 등(2000)의 보고와는 상반된 결과였다. 특히 성선자극호르몬의 첨가 유무에 관계없이 혈청 첨가는 ICM 세포수를 증가시켰으며, 이것은 혈청이 ICM 세포의 분화와 밀접한 관련이 있는 것으로 생각된다.

배반포의 체외생산에 있어서 혈청의 첨가시기에 관해서는 주로 체외배양에 관해서 연구가 이루어졌으며, 혈청의 효율적 사용을 위한 "two-step" 배양법이 개발되었다(Steeves와 Gardner, 1999). 본 연구에서(Fig. 9) 체외생산 과정 중 체외성숙시 혈청의 첨가시기가 체외성숙에 미치는 효과를 검토한 결과 혈청의 첨가는 제1극체 출현에 있어서 배양 9시간째까지는 효과가 없었지만, 배양 9시간 이후에서는 확인되었다. 그러나 배 발달율은 혈청의 첨가시기에 따른 차이가 없었다. 배반포의 TE 및 총세포수는 혈청 첨가시기에 따른 효과가 없었으나, ICM 세포수는 혈청이 전 기간동안 첨가된 실험군이 다른 군에 비하여 유의하게 많았다. 이와 같은 혈청에 의한 배반포의 세포수 상승효과는 혈청에 함유된 각종 성장인자와 같은 unknown factor들과 관련이 있을 것으로 생각되며, 배반포 품질의 척도라고 할 수 있는 세포수가 체외성숙 배지의 조성에 영향을 받는 것으로 미루어 적절한 수정과 배양 체계가 유지된다면 배반포의 품질은 성숙단

계에서 많은 영향을 받는 것으로 사료된다.

이전의 결과와 본 실험의 결과에서 혈청과 호르몬이 미첨가된 체외성숙 배지에서 성숙된 난포란은 핵성숙과 배반포 단계까지의 발달이 가능하였으나 생산된 배반포의 품질은 본 실험에서 낮다는 결과를 도출하였고, 이러한 결과는 혈청 미첨가 배지의 개발에서 ICM 세포의 수를 증가시키는 연구가 수반되어야 할 것으로 생각된다.

적 요

본 연구에서는 소 체외수정란 생산에 있어서 체외성숙용 배지에 첨가하는 혈청과 호르몬의 효과를 검토하기 위하여 제1극체 출현율과 배발달율을 조사하였고, 생산된 배반포의 품질을 평가하기 위하여 세포수를 검토하였다.

1. 체외성숙용 배지에 혈청 및 성선자극호르몬의 첨가에 따른 한우 난포란의 제1극체 출현율은 비슷한 경향이였다. 배반포까지의 발달율은 혈청 및 성선자극호르몬 공동 첨가군(26.0%)이 대조군과 성선자극호르몬 단독 첨가군보다 유의하게 높았다($p<0.05$). 혈청 및 성선자극호르몬 공동 처리군에서 생산된 배반포의 ICM, TE, 총 세포수가 가장 많았으며, ICM 세포는 혈청 첨가로 유의하게 증가하였다($p<0.05$).
2. 체외성숙용 배지에 혈청의 첨가시기에 따른 한우 난포란의 제1극체 출현율은 체외성숙 18시간 동안의 처리군과 체외성숙 9시간째부터 첨가한 처리군이 미첨가군보다 높았으며, 체외성숙 후 9시간까지의 처리군보다는 유의하게 높았다($p<0.05$). 체외성숙용 배지에 혈청의 첨가시기에 따른 한우 난포란의 배발달율은 전군에서 비슷한 수준이였다. 배반포의 TE와 총세포수는 비슷한 경향이였으나, ICM 세포수는 체외성숙 18시간 동안 처리군이 혈청 미첨가군보다 유의하게 높았다($p<0.05$).

참고문헌

Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A

and Day BN. 1998. Coculture with follicular shell pieces can enhance the developmental competence of pig oocytes after *in vitro* fertilization: relevance to intracellular glutathione. *Biol. Reprod.*, 58:213-218.

Ali A and Sirard MA. 2002. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during *in vitro* maturation. *Biol. Reprod.*, 66:901-905.

Behbooi E, Anderson GB, Bondurant RH, Cargill SL, Kreusher BR, Medrano JF and Murlay JD. 1995. Birth of large calves that developed from *in vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology*, 44:227-232.

Blondin P and Sirard MA. 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 41:54-62.

Choi SH, Ryu IS, Kim IH, Park SB, Yeon SH, Jin HJ, Suh CS and Son DS. 1999. Effects of *in vitro* maturation condition on bovine IVF embryos development. *Korean J. Emb. Trans.*, 14: 113-119.

Choi YH, Carnevale EM, Seidel GE and Squires EL. 2001. Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. *Theriogenology*, 56:661-670.

Edwards RG. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 208:349-51.

Eppig JJ, Schroeder AC and O'Brien MJ. 1992. Developmental capacity of mouse oocytes matured *in vitro*: effects of gonadotrophic stimulation, follicular origin and oocyte size. *J. Reprod. Fertil.*, 95:119-127.

Fukui Y and Ono H. 1989. Effects sera, hormone and granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 86:501-506.

Gardner DK. 1994. Mammalian embryo culture in

- the absence of serum or somatic cell support. *Cell Biol Int.*, 18:1163-1179.
- Gardner DK and Lane M. 1993. Embryo culture systems. In: Trounson A, Gardner DK (eds.), *Handbook of In vitro Fertilization*. Boca Raton, FL : CEC Press; 85-114.
- Geshi M, Yonai M, Sakaguchi M and Nagai T. 1999. Improvement of *in vitro* co-culture systems for bovine embryos using a low concentration of carbon dioxide and medium supplemented with β -mercaptoethanol. *Theriogenology*, 51:551-558.
- Hunter MG. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Rev. Reprod.*, 5:122-130.
- Iwasaki S, Yoshida N, Ushijima H, Watanabe S and Nakahara T. 1990. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. *J. Reprod. Fertil.*, 90:279-84.
- Khatir H, Lonergan P and Mermillod P. 1998. Kinetics of nuclear maturation and protein profiles of oocytes from prepubertal and adult cattle during *in vitro* maturation. *Theriogenology*, 50:917-929.
- Kim DJ, Chung HJ, Kim DH, Uhm SJ, Lee HT and Chung KS. 2001. Effects of FSH and LH on maturation of bovine preantral follicle. *Korean J. Animal Reprod.*, 25:101-111.
- Kito S and Bavister BD. 1991. Male pronuclear formation and early embryonic development of hamster oocytes matured *in vitro* with gonadotropins, amino acid and cysteamine. *J. Reprod. Fertil.*, 110:35-46.
- Lee ES and Fukui Y. 1996. Synergistic effect of alanine and glycine on bovine embryos cultured in a chemically defined medium and amino acid uptake by vitro-produced bovine morulae and blastocysts. *Biol. Reprod.* 55:1383-1389.
- Lim JM, Lee BC, Lee ES, Chung HM, Ko JJ, Park SE, Cha KY and Hwang WS. 1999. *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of bovine oocytes cultured in a chemically defined, protein-free medium: effects of carbohydrates and amino acids. *Reprod. Fertil. Dev.*, 11:127-132.
- Linder GE and Wright RW. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20:407-416.
- Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP and Gordon I. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 37:48-53.
- Nagai T. 2001. The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology*, 55:1291-1301.
- Papaioannou VE and Ebert KM. 1988. The preimplantation pig embryo: cell number and allocation to trophectoderm and inner cell mass of the blastocyst *in vivo* and *in vitro*. *Development*, 102:793-803.
- Park YS, Kim SS, Choi SH, Park NC, Byun MD and Park HD. 2004. Effects of amino acid in *in-vitro* maturation medium on nuclear maturation and embryo development of Korean Native Cow. *Reprod. Deve. Biol.*, 28:29-38.
- Park YS, Choi SH, Han JC, Park HD and Byun MD. 2002. Effects of maturation time on *in-vitro* production of Korean Native Cow embryos. *Korean J. Anim. Reprod.*, 27:35-44.
- Pinyopummintr T and Bavister BD. 1991. *In vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined protein-free culture medium. *Biol. Reprod.*, 45:736-742.
- Pinyopummintr T and Bavister BD. 1994. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology*, 41:1241-1249.
- Rebecca LK, Michelle L and Barry DB. 1999. Developmental competence and metabolism of

- bovine embryos cultured in semi defined and defined culture media. Biol. Reprod., 60:1345-1352.
- Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML and First NL. 1989. Timing for nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. Biol. Reprod., 40:1257-1263.
- Steeves TE and Gardner DK. 1999. Temporal and differential effects of amino acids on bovine embryo development in culture. Biol. Reprod., 61:731-740.
- Trounson A, Anderiesz C and Jones G. 2001. Maturation of human oocytes *in vitro* and their developmental competence. Reproduction, 121: 51-75.
- Ward F, Enright B, Riao D, Boland M and Lonergan P. 2002. Optimization of *in vitro* bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. Theriogenology, 57:2105-2117.
- Watson AJ, Sousa P, Caveney A, Barcroft LC, Natale D, Urquhart J and Westhusin ME. 2000. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. Biol. Reprod., 62:355-364.
- Yang NS, Lu KH and Gordon I. 1990. *In vitro* fertilization (IVF) and culture(IVC) of bovine oocytes from stored ovaries. Theriogenology, Abst., 33:352.
-

(접수일: 2004. 7. 12 / 채택일: 2004. 9. 30)