

한우 체외 수정란의 체외 배양 조건에 따른 염색체 분석

최선호[†] · 조상래 · 한만희 · 김현종 · 최창용 · 손동수 · 정연길¹ · 김상근² · 손시환³
축산과학원 가축유전자원시험장

Chromosomal Analysis of Hanwoo Embryos by *In Vitro* Culture Condition

S. H. Choi[†], S. R. Cho, M. H. Han, H. J. Kim, C. Y. Choe, D. S. Son,
Y. G. Chung¹, S. K. Kim² and S. H. Sohn³

Animal Genetic Resources Station, NIAS, RDA

SUMMARY

Antioxidants were well known to be essential supplements in the complex media and serve as a reservoir of oxygen. In this study, Hanwoo COCs (cumulus oocytes complexes) were matured and developed in L-cysteine-TCM199 and analyzed metaphase chromosome. Maturation rate of Hanwoo COCs were 73.4%, 94.6% in 0.1% PVA, 0.1 mM L-cysteine, respectively and showed significantly different between the treatments ($p < 0.05$). Blastocyst formation were revealed 20.3%, 10.0% in 5% FBS+TCM199, 0.1 mM L-cysteine+1% BSA, respectively. There were no significant difference among treatment groups. Metaphase chromosome were showed 18.3%, 12.0% in 5% FBS-TCM199, 0.1 mM L-cysteine, respectively and analyzable chromosome were 6.1%, 4.0% and had no differences between the treated groups. In the case of *in vitro* developmental stages, metaphase chromosome were showed 18.3%, 12.0% in 4~16 cell stage, 43.1%, 13.0% in morulae stage and 94.8%, 100.0% in blastocyst stage. These results suggested L-cysteine has beneficial role for *in vitro* maturation and development in Hanwoo COCs.

(Key words : *in vitro*, embryo, chromosome, Hanwoo)

서 론

소 체외 수정란의 생산은 폐기되는 유전자원의 재활용과 생산된 수정란의 이식은 한우 가격의 안정을 이루어 한우산업 기반구축에 기여하고 있으며, 농가 소득 향상이 기대됨으로 연구의 중요성이 강조되고 있다고 하겠다. 그러나 오랜 기간 동안 체외 수정란의 생산을 위하여 체외 성숙 및 체외 발달에 대한 연구가 다양하게 실시되었으며, 체외 수정란의 배양에 있어서 항산화제는 중요한 cysteine의 공급원으로서 세포가 산소의 충격으로부터 보호하며(Meister와 Tate, 1976), 무혈청과 거대 분자를 제거한 배양액에서 작용하고 있다고 알려져 있다(Ali 등, 2003). 또한, 소(Miyamura 등, 1995; Meister와 Tate, 1976) 이외에 마우스(Calvin 등, 1996), 햄스터(Perreault 등, 1988), 돼지(Yoshida 등, 1992) 등에서 항산화제는 난자의 체외 성숙에 중요한 작용을 한다고 보고하였다. 항산화제 중 glutathione(GSH)(de Matos 등, 1996; Luvoni 등, 1996)은 소 난자의 체외 성숙과 발달에 중요한 작용을 한다고 하였

고, 고농도의 GSH는 소 난자의 체외 성숙에 있어서 더 효과가 높다고 하였다(de Matos와 Furnus, 2000). 특히 cysteine은 소 수정란의 발달 과정에서 β -mercaptoethanol 첨가시 생산이 된다고 보고하여 cysteine이 항산화제 중 소 난자의 체외 발달에 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있다(Takahashi, 등 2002). 그 밖에 저산소 농도(Lim 등, 1996; Yoshida 등, 1992), 각종 성장인자(Choi 등, 2006; Hoshi, 2003; Abe 등, 2002; Einspigner 등, 2002) 등의 첨가가 체외 배양 시스템의 개선에 효과가 있음을 보고하고 있다.

그에 따라 생산량은 증가되는 개선점을 보였으나, 질적 향상에 대한 과학적인 분석이 미미한 실정이다. 이러한 질적인 차이는 대부분이 체외 수정란의 배양 조건에 따라 차이를 보이며, 염색체 분석을 한 결과 많은 차이를 보인다. Iwasaki 등(1989) 및 Iwasaki와 Nakahara(1990)는 2~4세포기 및 배반포에서 염색체 이상을 확인하였고, Kawarsky 등(1996)은 체외 배양 2일째 및 체외 배양 5일째에서 염색체 이상을 확인하였다. Yoshizawa 등(1999)은 5~10세포기의 수정란에서 80%의

¹ ET 바이오텍(ET Biotech)

² 충남대학교(Chungnam National University)

³ 진주산업대학교(Jinju Industrial University)

[†] Correspondence : E-mail : sunho@rda.go.kr

염색체 이상을 확인하였다고 보고하였다. 이에 따라 체외에서 생산된 소 수정란의 염색체 이상(Viuff 등, 2000, 1999)이 보고된 바 있으며, 체외 수정 후 배양 조건에 따른 소 배반포의 염색체이상(Lonergan 등, 2004)을 보고하였다. 따라서 본 연구는 한우 난구 복합체를 L-cysteine을 이용하여 체외 성숙 후 체외 발달 조건을 달리하여 염색체 분석을 통해 체외 배양 시스템을 개선하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 소 난구 복합체의 채취 및 체외 성숙, 발달

도축 한우 암소의 난소로부터 난구 복합체를 채취하여 TCM 199(Tissue culture medium 199)를 기본 배양액으로 0.1% PVA (poly vinyl alcohol) 또는 0.1 mM L-cysteine를 첨가하여 5% CO₂, 95% 공기, 39°C에서 24시간 동안 체외 성숙을 유도하였다. 난구 복합체의 핵형을 조사하기 위하여 0.5% hyaluronidase 용액으로 난구세포를 용해하고, 난자는 1:3 acetic acid, ethanol 용액에 30초간 고정하고, 3% basic Fuchsin을 염색하여 핵형을 관찰하였다. 체외 성숙된 난포란의 체외 수정은 동결 한우 정액을 10 mM caffeine이 든 BO(Brackett & Oliphant, 1975) 배양액으로 2회 이상 세정하여, 체외 수정능 획득을 유도하였고, 5 mM caffeine+1 ug/ml heparin이 포함된 BO 배양액으로 체외 수정을 실시하였다. 체외 수정은 8시간을 실시한 후 방사관 세포가 부착된 상태까지 난구세포를 피펫으로 제거하였다. 체외 발달은 TCM199를 기본 배양액으로 5% FBS, 또는 0.1mM L-cysteine+0.3% BSA를 함유한 배양액에서 약 2~6일간 체외 배양을 실시하여 염색체 분석에 공시하였다.

2. 수정란의 염색체 분석

염색체 분석은 4세포기의 수정란으로부터 초기 배반포 단계의 수정란에 0.1 ug/ml의 demecolcin을 첨가하여 중기상을 유도하였고, 중기상을 유도한 수정란은 0.1% protease를 1분간 처리하여 투명대를 연화하였고, 세포의 붕괴를 위한 저장액으로 0.66 M sodium citrate : 0.07 M KCl = 1 : 3 의 용액에 10~20분간 처리하였으며, 염색체 표본 제작을 위하여 저장액에 처리한 수정란을 슬라이드에 정착한 후 1차 고정액(5:1:4 = methanol : acetic acid : 증류수) 처리, 2차 고정액(3:1=methanol : acetic acid) 그리고 3차 고정액(4:3:1= methanol : acetic acid : 증류수)으로 처리하여 핵으로부터 염색체가 슬라이드에 부착되도록 하였으며, 건조 후 20% Leishman's staining solution으로 염색을 실시하였다. 염색체상의 조사는 400× 광학현미경으로 조사하여 염색체의 정상 유무를 확인하였다.

3. 통계 분석

체외 성숙 및 발생의 결과와 처리간의 수정란의 염색체 분

석 결과는 Satview program을 이용한 χ^2 test로 실시하였다.

결 과

1. 한우 난포란의 체외 성숙 및 체외 발달

한우 난포란의 체외 성숙은 Table 1에 나타난 것과 같이 0.1% PVA, 0.1 mM L-cysteine 첨가시 체외 성숙율은 73.4%, 94.6%으로 각각 나타났으며, 처리간에 유의적인 차이를 보였다($p<0.05$). 체외 발달율은 20.3%, 10.0%로 5% FBS+TCM199, 0.1 mM L-cysteine+1%BSA 첨가구에서 각각 나타났으며, 처리간에 유의적인 차이는 보이지 않았다.

2. 배양액의 종류에 따라 생산된 수정란의 염색체 분석 결과

배양액의 종류에 따른 염색체 분석 결과는 Table 3과 같으며, 중기상의 수정란은 18.3%, 12.0%를 보였으며, 분석 가능 수정란 수는 6.1%, 4.0%로 5% FBS+TCM199, 0.1 mM L-cysteine 첨가구에서 각각 나타났고, 60,XX 2개, 60,XY 1개가 5% FBS+TCM199 처리구에서, 60,XX 2개가 0.1 mM L-cysteine 처리구에서 확인되었고, 처리간에 유의적인 차이가 없었다. 이상의 결과에서 L-cysteine은 체외 성숙에 중요한 역할을 하는 것으로 나타났으며, 체외 배양 조건에 따른 한우 체외 수정란의 염색체 이상을 확인할 수 없었으나, 처리 수정란의 수가 적어 명확히 확인할 수 없어, 더욱 많은 시도가 요구된다고 하겠다.

3. 세포기별 수정란의 염색체 분석 결과

수정란의 발달 단계별 염색체 분석 결과는 Table 4와 같다.

Table 1. Maturation rate of Hanwoo COCs on *in vitro* culture condition

Media	No. of oocytes	
	Matured	Metaphase II (%)
0.1% PVA	65	48 (73.4) ^a
0.1 mM L-cysteine	37	35 (94.6) ^b

^{a,b} Values with different superscript in the same column means much significant different ($p<0.05$).

Table 2. Developmental rate of matured Hanwoo COCs developed in different media

Media	No. of	
	Fertilized COCs	Blastocyst (%)
5% FBS-TCM199	123	25 (20.3)
0.1mM L-cysteine	80	8 (10.0)

Table 3. The results of chromosome analysis in Hanwoo embryos derived from IVF cultured different media

Media	Em-bryos	No. of embryos			Chromo-some (No. of embryos)
		Treated	of meta-phase	Analy-zable chromo-some	
5% FBS -TCM199	56	123	9	3	60,XX (2)
		(87.5)	(18.3)	(6.1)	60,XY (1)
0.1mM L-cysteine	57	80	6	2	60,XX (1)
		(87.7)	(12.0)	(4.0)	

Table 4. Chromosome preparation from *in vitro* fertilized bovine embryos

Em-bryonic stage	Media	No. of		Embryos with metaphase spreads	Karyo-type
		Em-bryos	Analy-zable embryos		
4-16 cells	A	56	49 (87.5%)	9 (18.3%)	60,XX 60,XY
	B	57	50 (87.7%)	6 (12.0%)	60,XX 60,XY
	Sub-total	113	99 (87.6%)	15 (15.2%)	
Moru-lar	A	59	51 (86.4%)	22 (43.1%)	60,XX 60,XY
	B	33	31 (93.9%)	13 (42.0%)	60,XX 60,XY
	Sub-total	92	82 (89.1%)	35 (42.7%)	
Blasto-cyst	A	28	19 (67.9%)	18 (94.8%)	60,XX 60,XY
	B	12	7 (58.3%)	7 (100.0%)	60,XX 60,XY
	Sub-total	40	26 (65.0%)	25 (96.2%)	

A: 5% FBS-TCM199, B: 0.1 mM L-cysteine.

4~16세포기는 5% FBS-TCM199 배양액과 0.1 mM L-cysteine 을 첨가한 배양액에서 18.3, 12.0%의 염색체 중기상을 확인할 수 있었고, 상질기에서는 43.1, 13.0%의 염색체 중기상을 보였으며, 배반포기의 경우는 94.8, 100.0%의 염색체 중기상을 보여 발달 단계가 진행될수록 염색체 중기상을 확인하기가 용

이하였으며, 두 가지의 배양액에 따른 염색체 중기상은 유의적인 차이를 보이지는 않았다. 이는 세포수가 많을수록 중기상의 염색체를 확인할 수 있는 확률이 높음을 확인한 결과였다. 또한, 수정란 발달 단계별 염색체상에서 확인된 것은 모두 정상 염색체를 확인하였다.

고찰

혈청은 세포 배양에 있어서 중요한 역할을 하며, 특히 알부민 등의 거대분자가 중요한 작용을 하는 것으로 알려져, PVP (polyvinyl pyrrolidone), PVA 등을 대체로 이용하기도 하였다. 혈청으로 생산된 수정란을 이식하여 거대 양의 생산이 보고 (Sinclair 등, 1998)되는 등, 물리적 조건의 조절에 의한 배양 체제에는 한계가 있으며, 수정란의 생산성에 있어서도 큰 변화를 보이지는 못했다. 일반적으로 세포의 발달에 있어서 항산화제는 cysteine의 보관고로서 세포의 외적인 산소 스트레스를 억제하여 주는 역할을 하는 것으로 알려져 있으며(Meister와 Tate, 1976), β -mercaptoethanol, cysteine, cystine 등의 첨가에 의해 glutathione 생산율이 cystine이 가장 높게 나타났다(de Matos와 Furnus, 2000). 이는 cystine이 체내 성숙에서도 배란시기와 밀접한 관계가 있다는 것을 의미한다. 또한, 수정 후 정자 두부가 전핵으로 변환하는데도 관여하는 것으로 알려져 있다(Perreault 등, 1988; Calvin 등, 1996; Miyamura 등, 1995; Yoshida 등, 1992). 또한 착상 전 단계의 모든 난자에서 GSH 생산은 미성숙 난자와 배반포기 난자와는 10배의 차이가 있다고 하였으며, Lim 등(1996)은 GSH의 생산은 9~16세포기에 증가하면서 산소 스트레스에 대한 저항성이 생기기 시작하며, 배반포기보다도 더 산소 스트레스에 저항성이 강하다고 하였다. 즉, 항산화제는 배반포기에 비하여 초기 수정란에 유효하게 작용을 한다는 것을 시사한다고 하겠다. 이를 보충하는 결과로, Luvoni 등(1996)은 SOD(superoxide dismutase)가 GSH의 생성을 억제한다고 하였으며, 난자의 분할율과 발달율에 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다. de Matos 등(1996)도 체외 성숙시 GSH의 증가가 수정란의 발달을 및 질적 향상을 나타내는 것으로 보고하였고, 동결성도 우수하다고 하였다. 이와 같이 항산화제는 소 난자의 성숙 및 발달에 매우 중요한 역할을 하는 것을 확인할 수 있다. 본 연구에서도 L-cysteine 을 이용하여 한우 난포란의 체외 성숙에서는 탁월한 효과를 보였으나, 배반포기 수정란을 생산에서는 항산화제의 효과를 확인할 수는 없었다. 이러한 결과는 항산화제는 배반포기에 비하여 초기 수정란에 유효하게 작용을 한다고 한 것과 유사한 결과로 여겨진다.

체외 수정란의 염색체 이상에 대한 결과는 Iwasaki 등(1989) 및 Iwasaki와 Nakahara(1990)는 2~4세포기 수정란에서 13.7%, 배반포기에서는 38%의 염색체 이상을 확인하였고, Kawarsky 등

(1996)은 체외 배양 2일째 수정란에서 36.3%, 체외 배양 5일째에서 39.2%의 염색체 이상을 확인하였다. Yoshizawa 등(1999)은 5~10세포기의 수정란에서 80%의 염색체 이상을 확인하였다고 보고하였다. 이에 따라 체외에서 생산된 소 수정란의 염색체 이상(Viuff 등, 2000, 1999)이 보고된 바 있으며, 체외 수정 후 배양 조건에 따른 소 배반포의 염색체 이상(Lonergan 등, 2004)을 보고하였다. 본 연구에서는 염색체 증기상을 확인할 수 있었으나, 염색체 이상에 대해서는 확인할 수 없었다. 염색체 분석의 숙련도에 따라 분석 가능 난자수가 제한적이기 때문이다. 체외 수정란의 염색체 이상에 대해서는 많은 연구가 필요하며, 체외 수정란의 배양 시스템의 확립을 위해서도 중요한 판단 기준으로 생각되므로, 향후 더욱더 과학적인 수정란의 분석 방법을 통해 소 수정란의 배양 시스템 확립에 이용되어야 한다고 사료된다.

적 요

항산화제는 산소의 저장고로서 무혈청 배양액에서 주요한 작용을 하며, 복합배지에서 유용한 첨가제로 알려져 있다. 따라서 본 연구는 한우 체외 수정란의 배양에 있어서 항산화제인 L-cysteine의 작용과 수정란의 발달 단계별 염색체의 분석을 통하여 체외 수정란의 배양 체계를 수립하고자 실시하였다. 한우 난포란의 체외 성숙은 0.1% PVA, 0.1 mM L-cysteine 첨가 시 체외 성숙율은 73.4%, 94.6%으로 각각 나타났으며, 처리간에 유의적인 차이를 보였다($p < 0.05$). 체외 발달율은 20.3%, 10.0%로 5% FBS+TCM199, 0.1 mM L-cysteine+1% BSA 첨가구에서 각각 나타났으며, 처리간에 유의적인 차이는 보이지 않았다. 배양액의 종류에 따른 염색체 분석 결과는 증기상의 수정란은 18.3%, 12.0%를 보였으며, 분석 가능 수정란 수는 6.1%, 4.0%로 5% FBS+TCM199, 0.1 mM L-cysteine 첨가구에서 각각 나타났고, 60,XX 2개, 60,XY 1개가 5% FBS+TCM199 처리구에서, 60,XX 2개가 0.1 mM L-cysteine 처리구에서 확인되었고, 처리간에 유의적인 차이가 없었다. 수정란의 발달 단계별 염색체 분석 결과는 4~16세포기는 5% FBS+TCM199 배양액과 0.1 mM L-cysteine을 첨가한 배양액에서 18.3, 12.0%의 염색체 증기상을 확인할 수 있었고, 상실기에서는 43.1, 13.0%의 염색체 증기상을 보였으며, 배반포기의 경우는 94.8, 100.0%의 염색체 증기상을 보여 발달 단계가 진행될수록 염색체 증기상이 많이 나타났다. 이상의 결과로 항산화제인 L-cysteine은 한우 난포란의 체외 성숙 및 발달에 중요한 인자임을 확인하였다.

참고문헌

Abe H, Yamashita S, Satoh T and Hoshi H. 2002. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and

cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum containing media. *Mol. Reprod. Dev.*, 61:57-66.

Calvin HI, Grosshans K and Blake EJ. 1986. Estimation and manipulation of glutathione levels in prepuberal mouse ovaries and ova: relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. *Gamete Res.*, 14:265-275.

de Matos DG and Furnus CC. 2000. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cystein and cystine. *Theriogenology*, 53:761-771.

de Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Martinez AG and Matkovic M. 1996. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol. Reprod. Dev.*, 45:451-457.

Einspanier R, Schonfelder M, Muller K, Stojkovic M, Kosmamm M, Wolf E and Schams D. 2002. Expression of the vascular endothelial growth factor and its receptors and effects of VEGF during *in vitro* maturation of bovine cumulus-oocyte complexes (COC). *Mol. Reprod. Dev.*, 62:29-36.

Hoshi H. 2003. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology*, 59:675-685.

Iwasaki S and Nakahara T. 1990. Incidence of embryos with chromosomal anomalies in the inner cell mass among bovine blastocysts fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 34:683-690.

Iwasaki S, Shioya Y, Masuda H, Hanada A and Nakahara T. 1989. Incidence of chromosomal anomalies in early bovine embryos derived from *in vitro* fertilization. *Gamete Res.*, 22:83-91.

Kawarsky SJ, Basurur PK, Stubbings RB, Hansen PJ and King WA. 1996. Chromosomal anomalies in bovine embryos and their influence on development. *Biol. Reprod.*, 54:53-59.

Lim JM, Liou SS and Hansel W. 1996. Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of β -mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. *Theriogenology*, 46:429-439.

Lonergan P, Pedersen HG, Rizos D, Greve T, Thomsen PD, Fair T, Evans A and Boland MP. 2004. Effect of the post-fertilization culture environment on the incidence of chromosome aberrations in bovine blastocysts. *Biol. Reprod.*, 71:1096-1100.

Luvoni GC, Keskinetepe L and Brackett BG. 1996. Improvement in bovine embryo production *in vitro* by glutathione-

- containing culture media. *Mol. Reprod. Dev.*, 43:437-443.
- Mayor P, Lopez-Bejar M, Rodriguez-Gonzalez E and Paramio MT. 2001. Effects of the addition of glutathione during maturation on *in vitro* fertilization of prepubertal goat oocytes. *Zygote*, 9:323-330.
- Meister A and Tate SS. 1976. Glutathione and the related γ -glutamyl compound: biosynthesis and utilization. *Ann. Rev. Biochem.*, 45:559-604.
- Miyamura M, Yoshida M, Hamano S and Kuwayama M. 1995. Glutathion concentration during maturation and fertilization in bovine oocytes. *Theriogenology*, 43:282 (abstr.).
- Perrault SD, Barbee RR and Slott VI. 1988. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev. Biol.*, 125:181-186.
- Sinclair KD, McEvoy TG, Carolan C, Maxfield EK, Maltin CA, Young LE, Wilmut I, Robinson JJ and Broadbent PJ. 1998. Conceptus growth and development following *in vitro* culture of ovine embryos in media supplemented with bovine sera. *Theriogenology* 49(1):218 abstr.
- Sinclair KD, McEvoy TG, Maxfield EK, Maltin CA, Young LE, Wilmut I, Broadbent PJ and Robinson JJ. 1999. Aberrant fetal growth and development after *in vitro* culture of sheep zygotes. *J. Reprod. Fertil.*, 116:177-186.
- Takahashi M, Nagai T, Okamura N, Takahashi H and Okano A. 2002. Promoting effect of β -mercaptoethanol on *in vitro* development under oxidative stress and cysteine uptake of bovine embryos. *Biol. Reprod.*, 6:562-567.
- Viuff D, Greve T, Avery B, Hytell P, Brockhoff PB and Thomsen PD. 2000. Chromosome aberration in *in vitro* produced bovine embryos at days 2~5 post-insemination. *Biol. Reprod.*, 63:1143-1148.
- Viuff D, Rickords L, Pffenberg H, Hytell P, Avery B, Greve T, Olsaker I, Williams JL, Callesen H and Thomsen PD. 1999. A High proportion of bovine blastocysts produced *in vitro* are mixploid. *Biol. Reprod.*, 60:1273-1278.
- Yoshida M, Ishigaki K and Purcel VG. 1992. Effects of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 31:68-71.
- Yoshizawa M, Konno H, Zhu S, Kageyama S, Fukui E, Muramatsu S, Kim S and Araki Y. 1999. Chromosomal diagnosis in each individual blastomere of 5~10 to 10 cell bovine embryos and their influence on derived form *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, 51:1239-1250.
- 최선호, 조상래, 김현중, 최창용, 한만희, 손동수, 정연길, 星宏良. 2006. 한우 난구 복합체의 체외발생에 있어서 FGF(Fibroblast Growth Factor)가 미치는 영향. *한국수정란이식학회지*, 21:157-162.

(접수일: 2007. 6. 24 / 채택일: 2007. 6. 27)