pISSN 1225-4991, eISSN 2288-0178
J. Emb. Trans. (2014) Vol. 29, No. 1, pp. 91～99
http://dx.doi.org/10.12750/JET.2013.28.4.91

Scanning Electrochemical Microscopy를 이용한 한우 체내 수정란의 호흡률 조사

김 현[1] · 복난희[1,2] · 김성우[1] · 도윤정[1] · 김민규[3] · 조상래[2] · 성환후[1] · 김동훈[1] · 고응규[1,†]

[1]농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장, [2]농촌진흥청 국립축산과학원 난지축산시험장
[3]충남대학교 동물자원생명과학과

Respiration Rates of Individual Bovine *In Vivo*-Produced Embryos Measured with a Novel, Scanning Electrochemical Microscopy

Hyun Kim[1], Nan-Hee Bok[1,2], Sung-Woo Kim[1], Yoon-Jung Do[1], Min-Kyu Kim[3], Sang-Rae Cho[2], Hwan-Hoo Seong[1], Dong Hun Kim[1] and Yeoung-Gyu Ko[1,†]

[1]*Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science, R.D.A., Namwon 590-832, Korea*
[2]*Subtropical Genetics Resources Station, National Institute of Animal Science, R.D.A., Jeju 690-150, Korea*
[3]*Department of Animal Science, Graduate School of Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea*

ABSTRACT

Oxygen consumption is a useful parameter for evaluating mammalian embryo quality, since individual bovine embryos was noninvasively quantified by scanning electrochemical microscopy (SECM). Recently, several approaches have been used to measure the oxygen consumption rates of individual embryos, but relationship between oxygen consumption and pregnancy rates of Hanwoo following embryo transfer has not yet been reported. In this study, we measured to investigate the correlation between oxygen consumption rate and pregnancy rates of Hanwoo embryo using a SECM. In addition to, the expression of pluripotent gene and anti-oxidant enzyme was determined using real-time PCR by extracting RNA according to the oxygen consumption of *in vivo* embryo. First, we found that the oxygen consumption significantly increased in blastocyst-stage embryos (blastocyst) compared to early blastocyst stage embryos, indicating that oxygen consumption reflects the embryo quality (Grade I). Oxygen consumption of blastocyst was measured using a SECM and total cell number of *in vitro* blastocyst was enumerated by counting cells stained by propidium iodide. The oxygen consumption or GI blastocysts were significantly higher than those of GII blastocysts (10.2×10^{15}/mols^{-1} versus 6.4×10^{15}/mols^{-1}, $p<0.05$). Total cell numbers of *in vitro* blastocysts were 74.8, 90.7 and 110.2 in the oxygen consumption of below 10.0, 10.0～12.0 and over 12.0～10^{15}/mols^{-1}, respectively. Pregnant rate in recipient cow was 0, 60 and 80% in the transplantation of embryo with the oxygen consumption of below 10.0, 10.0～12.0 and over 12.0×10^{15}/mols^{-1}, respectively. GPX1 and SOD1 were significantly increased in over －10.0 group than below 10.0 groups but in catalase gene, there was no significant difference. On the other hand, In OCT-4 and Sox2, pluripotent gene, there was a significant difference ($p<0.05$) between the below-10.0 (0.98 ± 0.1) and over 10.0 (1.79 ± 0.2). In conclusion, these results suggest that measurement of oxygen consumption maybe help increase the pregnant rate of Hanwoo embryos.

(Key words : oxygen consumption, Korean cattle, pregnancy, pluripotent gene, anti-oxidant enzyme)

서 론

가축 인공 수정은 수컷의 우수 형질을 이어 받을 수 있는 제한된 기술인데 비해, 수정란 이식 기술은 우수 종축생산의 기반 구축과 동시에 우수한 종축의 유전 능력을 신속히 확대 보급할 수 있고, 한우의 개량과 번식 효율 증진 및 최근에는 멸실 위험이 있는 유전자원의 보존을 위한 매우 적합한 방법으로 인식되고 있다. 이와 같은 수정란 이식이 산업적으로 성

* This work was carried out with the support from the Agenda Program (No. PJ008632) Rural Development Administration, Republic of Korea.
* This work was supported by 2013 PostDoctoral Fellowship Program of National Institute of Animal Science, Rural Development Adminstration, Republic of Korean.
† Correspondence : E-mail : kim7268@korea.kr

공하기 위해 해결할 당면 과제 중 하나가 우수한 수정란의 대량 생산과 산자 생산을 위한 수태율의 향상인데, 우리나라의 수정란 이식 수태율이 40% 내외로 미국, 일본 등의 축산 선진국에 비해 상대적으로 수태율이 낮고, 현재까지 수태율을 높일 수 있는 최적의 조건은 명확하게 확립되어 있지 않다.

수정란 이식 수태율에 영향을 미치는 요인으로 수정란의 품질, 수정란 이식 시술자의 숙련도, 수란우의 상태 등 크게 3 가지로 정리될 수 있는데, 이들 중 가장 중요한 요인을 차지하는 것 중의 하나가 이식할 수정란의 품질이라고 할 수 있다. 아무리 기술이 좋은 시술자가 건강 상태가 좋은 수란우에 이식하더라도 이식될 수정란의 품질이 좋지 않다면, 성공적인 수정란 이식 결과를 가져올 수 없으므로, 품질 좋은 수정란을 선택하는 것이 무엇보다 선행되어야 한다. 수태율을 높이기 위해서는 품질 좋은 수정란을 선택하여 이식하는 기술이 선행되어야 하는데, 지금까지 일반적으로 사용하고 있는 수정란의 등급 판정 기준은 국제수정란 이식학회(International Embryo Transfer Society, IETS)에서 규정하고 있는 수정란의 현미경 관찰에 의한 형태학적 등급 판정 기준에 따라 실시하고 있다. 그러나 이와 같은 형태학적인 등급 판정은 그 결과가 검사자의 주관적으로 이루어질 수 있으므로, 수정란의 생리학적 근거에 기반을 둔 객관적인 등급 판정 기준이 필요하다. 수정란의 생리학적인 대사 활성에 기반을 두면서 수정란 자체에 손상을 주지 않는 객관적인 등급 판정이 요구되는데, Overstrom 등(Overstrom *et al.*, 1989; 1992)은 수정란의 호흡율(산소 소비량)이 생존성과 밀접한 상관관계가 있다고 하였다. 따라서 살아있는 수정란과 죽은 수정란, 품질이 좋은 수정란과 좋지 않은 수정란은 대사 활성에 따른 세포의 산소 소비량도 차이가 있는 것이 확인되었다. 수정란의 산소 소비량 측정은 Spectrophotometer(Magnusson *et al.*, 1986), Flurescence(Houghton *et al.*, 1996), Electrochemical(Takahashi *et al.*, 1993) 등 여러 가지 기술을 이용하다가 Shiku 등(Shiku *et al.*, 2001)이 Scanning electrochemical microscopy(SECM)를 이용하여 수정란의 산소 소비량을 측정하는데 활용하기 시작하여, Abe 등(Abe *et al.*, 2004; 2006), Agung 등(Agung *et al.*, 2005), Lopez 등(Lopez *et al.*, 2005; 2007a; 2007b), Choe 등(Cho *et al.*, 2010), Sakagami 등(Sakagami *et al.*, 2007)이 수정란에 응용하고 있다. 국내에서도 SECM를 이용하여 한우 체내외 수정란의 발달 단계별 산소 소비량을 확인하였다(Cho *et al.*, 1998). 이상과 같이 수정란의 품질을 산소 소비량을 측정하여 등급 판정한 것이 우수하다고만은 볼 수 없기 때문에, 수정란의 세포질 내 특정 유전자의 발현량을 판단해야 할 필요성이 있다.

Oct-4는 POU family의 일원으로 전능성과 다능성(Pluripotency)을 갖고 있는 난자, 착상 전 수정란들 그리고 배반포의 내부 세포괴(Inner cell mass, ICM)에서 특이적으로 발현하는 중요 전사인자이다(Okamoto *et al.*, 1990). 마우스에서 Oct-4를 Knock-out시켰을 때, ICM은 전능성과 다능성을 잃고, 발달 증식이 멈추게 된다(Niwa, 2001). Nordhoff 등은 소 orthologue에 있어서 Oct-4 단백질 수준의 homology는 사람에서 90.6%이고, 마우스에서 81.7%라고 보고했다(Nordhoff *et al.*, 2001). 게다가 소 Oct-4 단백질은 13일령 배반포 out growth의 모든 세포뿐만 아니라, 배반포의 ICM과 영양막 세포에서 존재한다(Kirchhof *et al.*, 2000).

일반적인 체외 배양 환경에서는 산소 농도 포화도가 매우 높아(20%), 배아의 세포질 내에 활성 산소종(reactive oxygen species; ROS)이 체내 환경보다 많이 축적됨으로써 배발달 저해의 원인이 된다. 활성 산소종은 세포질 내의 단백질, 지질과 DNA와 같은 거대 분자와 반응하여 효소 활성 저해, 미토콘드리아 기능 이상과 같은 중요한 기능 이상을 일으키고, DNA 파편화를 야기한다. 살아있는 유기체는 이러한 ROS를 청소하는 항산화 물질이 세포질 내에 존재하나, 체외 배양 환경에 노출된 난자나 배아는 과도한 산소 농도를 막아낼 방법이 없으므로 항산화제를 배양액에 첨가하여 사용하게 되면 배발달능을 개선시킬 수 있다는 연구가 보고된 바 있다. 그 예로 superoxide dismutases나 catalase는 생쥐와 소 배아에서, cysteine이나 β-mercaptoethanol은 소 배아 배양에서 glutathione 합성을 증가시켜 환원 환경을 조절하여 배발달을 개선시키는 것으로 알려져 있다(Caamano *et al.*, 1998; Lim and Hansel, 1998; Renard *et al.*, 1980). 결과적으로 체외 배양 환경에서 배양액 내에 항산화제의 첨가는 매우 중요하다.

본 연구에서는 한우 수정란의 발달 단계별로 수정란이 소비하는 산소 소비량을 측정하여 수정란의 품질을 객관적으로 판정하는 방법을 확립하고, 수정란 이식을 통해 그 수태율을 확인하였다. 그리고 각각의 산소 소비량 농도에 따라 발생한 수정란의 특성을 검토하기 pluriporent 유전자인 *Oct-4*, *Nanog*, *Sox2* 유전자 그리고 항산화효소인 *Catalase*, *GPX1*, *SOD1*의 발현량을 각각 조사하여, 한우의 수정란 이식율을 높이기 위해 객관적인 수정란 품질 판정 방법의 체계를 제시하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 수정란의 산소 소비량 측정 및 수정란 이식

1) 공시 동물

(1) 공란우

본 실험에 공시된 공란우는 국립축산과학원 가축유전자원 시험장(전라북도, 남원시소재)에서 사육되고 있는 암컷 한우

중 난소 및 자궁질환이 없는 건강한 한우 공란우를 선발하여 실시하였다.

(2) 수란우

발정동기화와 수정란 이식에 이용된 수란우는 한우 미경산우를 대상으로 선발하여 실험에 공시하였다.

(3) 공시 정액

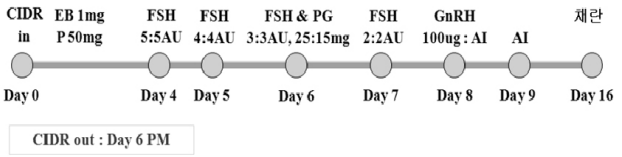
공란우의 인공수정에 이용된 정액은 농협중앙회 한우개량사업소에서 생산하여 판매하고 있는 후대 검정을 필한 종모우 정액을 사용하였다.

2) 체내 수정란의 생산

한우 체내 수정란의 생산은 day 0에 CIDR®(InterAg, New Zealand)를 삽입하고, estradiol benzoate(EB) 1 mg(SY Esrone, Samyang, Seoul, Korea) 및 progesterone(SY Ovaron, Samyang) 50 mg을 근육주사한 후, day 4부터 FSH 제제인 Antorin®R·10(Kawasaki Pharm, Japan) 28 mg을 4 일간 12 시간 간격으로 감량 분할(5, 5, 4, 4, 3, 3, 2, 2) 주사하였고, day 6 오전과 오후에 dinoprost(Lutalyse™, Pharmacia & Upjohn)를 각각 25 mg과 15 mg 주사하고, day 6 오후에 CIDR® 제거하여 과배란을 유기하였다. Dinoprost 2차 투여 후 36 시간에 gonadorelin 100 μg을 주사하였고, gonadorelin 주사 후 8시간과 24시간 후에 각각 동결 정액 2 straws 씩을 융해하여, 2회 인공수정을 실시하였다(Scheme 1). 수정란 회수는 1차 인공수정 7~8 일 후 3 way Foley catheter를 이용하여, 수정란 회수컵에서 수정란의 회수는 실체 현미경(Olympus, Japan)을 이용하여 실시하였다.

3) 체외 수정란의 생산

한우 체외 수정란의 생산은 도축장의 도축 난소를 이용하여 난자를 채취하였다. 채취한 난포란은 체외 성숙을 위하여 TCM 199(Sigma, U.S.A) 배양액에 FSH(10 μg/ml), LH(10 μg/ml)와 5% FBS(GIBCO)를 첨가하여 5% CO_2조건에서 22시간 체외 성숙 후 체외 수정에 공시하였고, 체외 수정은 BO 배양액에서 6시간 동안 체외 수정을 실시하였으며, 체외 배양은 serum free 배양액에서 배양하여 7, 8일째까지 수정란을 발달시켰다.



Scheme. 1. Procedures and time schedules for superovulation, A.I and embryo collection in Hanwoo.

4) 수정란의 산소 소비량 측정

생산된 수정란의 산소 소비량 측정은 수정란 호흡 장치(FHK, HV-405. Japan)를 이용하였다. 수정란 호흡 장치는 주사형 전기 화학 현미경(Scanning Electrochemical Microscopy, SECM)을 이용하여 전극 표면에 용존 산소의 환원 반응을 조사하고, 수정란 부근의 산소 농도 분포를 측정하였다. 측정 순서는 먼저 산소 소비량을 측정하기 위한 배양액(ERAM-2, IFP, Japan)을 6개의 역원추형 plate(RAP-1, IFP, Japan)에 5 ml를 넣고, 수정란을 well에 한 개씩 주입한 후 주사 속도 10 μm/s의 속도로 미세 전극이 160 μm 범위로 수정란 주변을 3회 반복하여 수정란 주변의 산소 소비량을 측정하였다. 측정된 산소 소비량은 구면 확산 방법으로 자동해석 프로그램에 의해 자동으로 산출되었다.

5) 수정란의 총 세포 수 조사

체외 배양 7일째 생산된 배반포 수정란은 Propidium iodide (PI)로 염색을 하여 총 세포수를 조사하였다. 염색법은 PI 염색을 실시하기 전, 배반포를 4% paraformaldehyde에 30분간 정치시켜 고정시킨 후, 고정된 배반포를 유리 슬라이드에 올려놓고, PBS로 배반포를 세정한 후 PI와 RNase를 함께 처리하여 30분간 배양하였다. PBS로 수정란을 세정한 후, 커버를 덮어 배반포가 움직이지 않도록 눌러서 공초점 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 총 세포수를 계산하였다.

6) 수정란 이식

발정이 발현된 수란우는 발정 발현 후 6~7 일령에 직장 검사와 초음파 진단기를 이용하여, 황체와 자궁각의 크기를 측정하고, 황체 발육이 양호한 개체 만을 선발하여 수정란 이식에 이용하였다. 체내에서 생산된 상실배기 또는 배반포기 단계의 수정란을 20% FBS가 첨가된 D-PBS 배양액과 함께 0.25 ml french straw에 흡입하여 수정란 이식기(FHK, Japan)에 삽입하고, sheath(Agtech, Inc U.S.A)와 cover sleeve를 장착하여 수란우의 질 내로 삽입하였다. 수정란 이식기 끝이 자궁경관 입구에 도달하면 cover sleeve을 당겨서 파열시킨 후, 이식기의 선단부가 질 점막에 접촉되지 않은 상태로 자궁경관에 삽입, 통과하여 황체가 존재하는 자궁각 선단부에 수정란을 주입하였다.

7) 수란우 임신 진단

수정란 이식 수란우의 임신 진단은 이식 후 2 개월째에 직장 검사법에 의한 태막 및 양막낭 촉진과 초음파 진단기를 통하여 임신 여부를 판정하였다.

2. 수정란의 산소 소비량 측정 및 유전자 발현

1) 공시 재료

산소 소비량을 측정한 배반포 체내 수정란을 1개씩 각각 1.5 ml tube에 옮겨 Dynabead mRNA DIRECT™ Kit(DYNALBIOTECH, #61012) 내 Lysis/Binding buffer 80 μl를 첨가하여 실온에서 5분간 흔들어 준 후 RNA 추출 및 cDNA 합성 전까지 −80℃에 보관하였다.

2) Totall RNA 추출 및 cDNA 합성

Total RNA 추출은 Dynabead mRNA DIRECT™ Kit(DYNALBIOTECH, #61012)를 사용하였다. −80℃ 보관된 샘플을 녹여 4℃ 얼음 위에 두고, Dynabead + Lysis/binding buffer 20 μl씩 첨가하여 실온에서 5분간 섞어준 후 Dynabead를 결합시킨다. 실온에서 magnet rack에 꼽아 결합된 mRNA와 Dynabead만 남기고 상층액 제거 후, Washing buffer A 300 μl 첨가 후 magnet rack에서 tube를 꺼내 손으로 tapping mixing하고, 가볍게 원심분리 후 5분 가량 magnet rack에 꼽아둔다. 10 mM Tris-HCl(elution buffer) 10 μl 첨가하여 pipetting 후 준비된 65℃ Heating Block에서 3분간 두어 mRNA와 Dynabead를 분리시킨 후 차가운 얼음에 즉시 옮긴다. Magnet rack으로 옮겨 상층 10 μl PCR tube로 옮긴 후 cDNA 합성에 이용하였다. 합성된 cDNA는 소에 특징적으로 작용하는 프라이머를 이용하여 증폭되었다(Table 1). cDNA 합성은 First strands cDNA Synthesis kit(Roche, Mannheim, Germany)를 이용하며, oligo (dT) primer를 이용하여 제공된 방법에 준하여 분석하였다.

3) Real-Time PCR에 의한 정량적인 유전자 분석

Real-time PCR 반응은 Rotor-Gene6500(Corbett, Australia)의 manual에 준하여 수행되었다. Target 유전자들은 cDNA가 Table 1과 같이 각각의 유전자 특이적인 primer와 annealing 온도 조건에 따라 분석되었다. 각각의 유전자에 대하여 β-actin은 inter standard로 이용되었다. Rotor-Gene™ SYBR® Green (QIAGEN, Netherlands)은 Taq DNA polymrease와 reaction mixture(optimized PCR buffer, 5 mM $MgCl_2$ and a dNTP mix that included dUTP)로 구성되었다.

각각의 실험에서 reaction mixture와 온도의 준비는 Robotics CAS1200(Corbett, Australia) 자동분주 장비를 이용하였다. PCR은 증폭 조건은 95℃에서 5분간 pre-denaturation 반응 후, 95℃에서 15초, 각각의 유전자의 annealing 온도에 맞춰 60～62℃ 45초, 60℃ 20 초 45 cycle에서 분석하였다. 형광 data의 검출은 장비 내에서 자동 검출되었고, β-actin에 대한 각 유전자의 정량적인 분석은 장비 내 보유 프로그램을 이용 Rotor Gene Q series software(QIAGEN, Netherlands)를 이용하여 분석하였다.

3. 통계 분석

본 시험의 성적은 SAS package program(2000)를 이용하여 분산 분석을 실시하였으며, 처리 간의 유의성 검정은 Duncan's multiple range test를 이용하여 실시하였다.

결 과

1. 수정란의 산소 소비량 측정 및 수정란 이식

Table. 1. Bovine-specific primer sequence used for real-time PCR

Gene	Primer sequence	Annealing temp (℃)	GenBank accession number
Catalase	5'-ccacagccagaagagaaacc-3' 5'-ggaatccctcgatcactgaa-3'	60	BC103066.1
GPX1	5'-gattttgcccatgaaggtgt-3' 5'-tcatgaggagctgtggtctg-3'	60	NM174076.3
SOD1	5'-agaggcatgttggagacctg-3' 5'-cagcgttgccagtctttgta-3'	60	NM174615.2
OCT-4	5'-acactcggaccacgtctttc-3' 5'-agtgagaggcaacctggaga-3'	60	NM174580
Nanog	5'-gtcccggtcaagaaacaaaa-3' 5'-tctggaaccaggtcttcacc-3'	60	NM174582
Sox2	5'-cacaactcggagatcagcaa-3' 5'-cggggccggtatttataatc-3'	60	NM174586
β-actin	5'-atgaggctcagagcaagaga-3' 5'-atctgggtcatcttctcacg-3'	60	AY141970

1) 체내 수정란의 등급별 산소 소비량 비교

체내 수정란의 형태학적 등급별 산소 소비량을 비교한 결과, Table 2와 같이 조사되었다. 초기 배반포 수정란의 경우, 1등급 수정란에서 8.2 × 10^{15}/mols^{-1}을 나타낸 반면, 2등급 수정란에서 7.2 × 10^{15}/mols^{-1}을 나타내어 유의적인 차이는 없었으나, 1등급 수정란에서 높은 경향을 보였으며, 배반포 단계에서는 1등급 수정란 10.2 × 10^{15}/mols^{-1}, 2등급 수정란 6.4 × 10^{15}/mols^{-1}로 1등급 수정란의 산소 소비량이 2등급 수정란에 비해 유의적으로 높게 나타났다.

2) 체외 수정란의 산소 소비량과 총 세포 수 비교

Fig. 1은 총 세포 수를 조사하기 위하여, 체외 배양 7일째 생산된 배반포 수정란은 Propidium iodide(PI)로 염색한 결과이다. 체외 수정란의 배반포 산소 소비량(10^{15}/mols^{-1})에 따른 총 세포 수를 조사한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. 산소 소비량이 10.0 미만, 10.0～12.0 미만 및 12.0 이상에서 총 세포 수는 각각 74.8개, 90.7개 및 110.2개를 나타내어 산소 소비량이 높을수록 총 세포 수도 증가하는 것이 확인되었다.

Table. 2. Oxygen consumption rates of *in vitro* derived bovine embryos according to the morphological quality

Quality of embryos		No. of embryos examined	Oxygen consumption rate (F × 10^{14} mol s^{-1})
Early blastocyst	Grade I	15	8.2 ± 2.8^{a}
	Grade II	4	7.2 ± 2.5^{a}
Blastocyst	Grade I	24	10.2 ± 1.6^{b}
	Grade II	3	6.4 ± 0.6^{a}

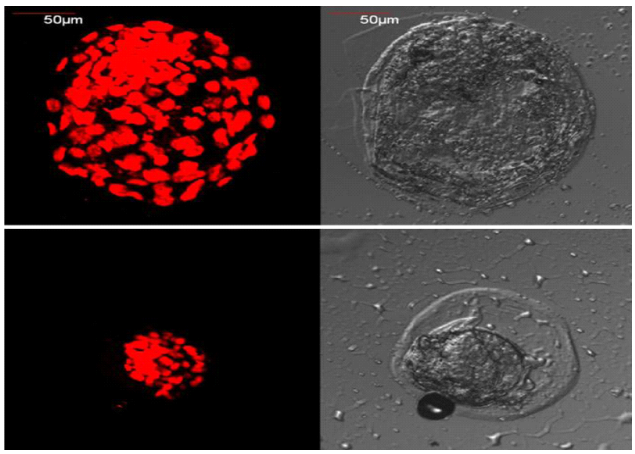


Fig. 1. Analysis of total cell number using propidium iodide (PI) staining. Scale bars = 400 μm.

Table. 3. Relationship of oxygen consumption and total cell number of *in vitro* produced bovine embryos. Data are represented as mean ± S.D(n=3-4)

Embryo stage	No. of embryos	Oxygen consumption (10^{15}/mols^{-1})	Total cell number
Blastocyst	9	Below 10.0	74.8 ± 9.5^{a}
	3	10.0～12.0	90.7 ± 31.6^{a,b}
	5	Over 12.0	110.2 ± 15.2^{b}

* Different super scripts indicate significant difference (p< 0.05).

3) 체외 수정란의 산소 소비량에 따른 수정란 이식 수태율

한우 체내 수정란의 산소 소비량(10^{15}/mols^{-1})을 측정하고, 이를 수란우에 이식한 후 수태율을 조사하여 Table 4와 같은 결과를 나타내었다. 산소 소비량이 10.0 미만에서 임신된 두수가 없는 반면, 10.0～12.0 미만에서 60.0%의 수태율을 나타내었고, 산소 소비량이 가장 높은 12.0 이상에서는 80.0 %의 높은 수태율을 나타내었다.

2. 수정란의 산소 소비량 측정 및 유전자 발현

1) Pluripotent Gene

한우 체내 수정란의 산소 소비량(10^{15}/mols^{-1})을 측정하고, 이를 각각 mRNA를 추출하여 Real time PCR로 분석하며, pluripotent 유전자인 *Oct-4*, *Nanog*, *Sox2*가 발현되는지를 Fig. 2(A)에 결과를 나타내었다. *Oct-4*에서는 산소 소비량이 10.0 미만에서 0.98 ± 0.1, 10.0 이상에서 1.79 ± 0.21로 유의적인 차이가 나타났다(p<0.05). 또한, *Sox2*도 10.0 미만에서 0.43 ± 0.15, 10.0 이상에서 1.29 ± 0.1로 유의적인 차이가 나타났다

Table. 4. Pregnant rates according to oxygen consumption (high versus medium versus low) of bovine *in vivo*-produced embryos.

Oxygen consumption category (F × 10^{14}/mols^{-1})	No. of	
	Recipient	Pregnant (%)
Low (Below 10.0)	5	0(0.0)
Medium (10.0～12.0)	10	6(60.0)
High (Over 12.0)	10	8(80.0)

* Values for oxygen consumption rate are presented as mean ± S.D (n=3~4). Values with different superscripts within the same column are significantly different (p<0.05).

(p<0.05).

2) Anti-Oxidant Enzyme

한우 체내 수정란의 산소 소비량(10^{15}/mols^{-1})을 측정하고, 이를 각각 RNA로 추출하여, Real-time PCR로 유전자 분석하였다. Anti-oxidant enzyme인 *Catalase*, *GPX1* 그리고 *SOD1*이 발현하는지를 분석하여, Fig. 2(B)와 같은 결과를 나타내었다. *GPX1*에서는 산소 소비량이 10.0 미만 그룹에서 1.39 ± 0.1, 10.0 이상 그룹에서 2.21 ± 0.21로 유의적인 차이가 나타났다(p<0.05). 또한, *SOD1*도 10.0 미만에서 1.25 ± 0.13, 10.0 이상에서 1.79 ± 0.1로 유의적인 발현의 차이가 나타났다(p<0.05).

고 찰

고능력 한우 증식을 위한 수정란 이식 기술의 접목이 요구되고 있으며, 한우의 능력 개량 및 브랜드 추진을 위한 우수 한우 수정란의 수요가 급증하고 있다. 그러나 이식 가능 체내 수정란 회수율, 수정란 이식 수태율 등과 같은 국내 소 수정란 이식 기술 성적이 선진국에 비하여 저조한 실정이다. 수정란의 질을 판단하는 등급 판정의 기준은 국제수정란이식학회(IETS)의 형태학적인 등급 판정에 의하여 이루어지고 있으나, 그 판정이 검사자의 따라 주관적으로 이루어질 수 있다. 수정란이 배반포까지 발달하면서 세포 수가 증가함에 따라 수정란의 산소 소비량도 증가하게 되므로 수정란의 산소 소비량을 측정할 수 있다면 객관적인 수정란의 질을 판정할 수 있을 것이다.

수정란을 검사하는 방법으로 수정란을 직접 염색(Kardymowicz, 1972)하거나, 효소 활성도 측정(Schilling *et al.*, 1979) glucose 소비량을 측정(Renard *et al.*, 1980)하는 방법을 이용하여 왔으나, 위의 방법들은 대부분 수정란에 직접 손상을 줄 수 있으며, 단일 수정란에 대한 평가가 어려운 편이다. 수정란의 생리학적인 대사 활성에 기반을 두면서 수정란 자체에 손상을 주지 않는 객관적인 등급 판정이 요구되는데, Overstrom 등(Overstrom *et al.*, 1989; 1992)은 수정란의 호흡율(산소 소비량)이 생존성과 밀접한 상관관계가 있다고 하였다. 따라서 살아 있는 수정란과 죽은 수정란, 품질이 좋은 수정란과 좋지 않은 수정란은 대사 활성에 따른 세포의 산소 소비량도 차이가 있는 것이 확인되었다. 수정란의 산소 소비량 측정은 Spectorphotometer(Magnuson *et al.*, 1986), Fluorescence(Houghton et al, 1986), Electrochemical(Trimarchi *et al.*, 2000) 등 여러 가지 기술을 이용하다가 Shiku et al(Shiku *et al.*, 2001; 2004)이 Scanning electrochemical microscopy(SECM)를 이용하여 수정란의 산소 소비량을 측정하는데 활용하기 시작하여 Abe *et al.*(2004, 2006), Agung *et al.*(2005), Lopez *et al.*(2005, 2007a, b)이 수정란에 응용하고 있다.

Cho *et al.*(2010)은 수정란의 산소 소비량이 높을수록 배반포 수정란의 발달률이 증가한다고 하였으며, Abe *et al.*(2006)과 Lopez *et al.*(2007)은 수정란의 산소 소비량이 높을수록 수태율이 높아진다고 보고하였다. 또한 수정란이 발달하면서 할구의 수도 많아지고, 대사 활성도 증가함에 따라 산소 소비량도 증가하는 것이 여러 연구자들(Abe *et al.*, 2006; Lopez *et al.*, 2007b)에 의해 보고되고 있는데, 최근에 Cho 등(Cho *et al.*, 2010)은 배반포 이후의 후기배 수정란으로 발달될수록 수정란의 산소 소비량이 월등히 높아진다고 보고하였다. 최근의 연구 결과에 의하면, 수정란의 형태학적 등급이 국제수정란 이식학회의 등급 판정 기준 3등급(fair), 4등급(poor)의 경우, 1등급

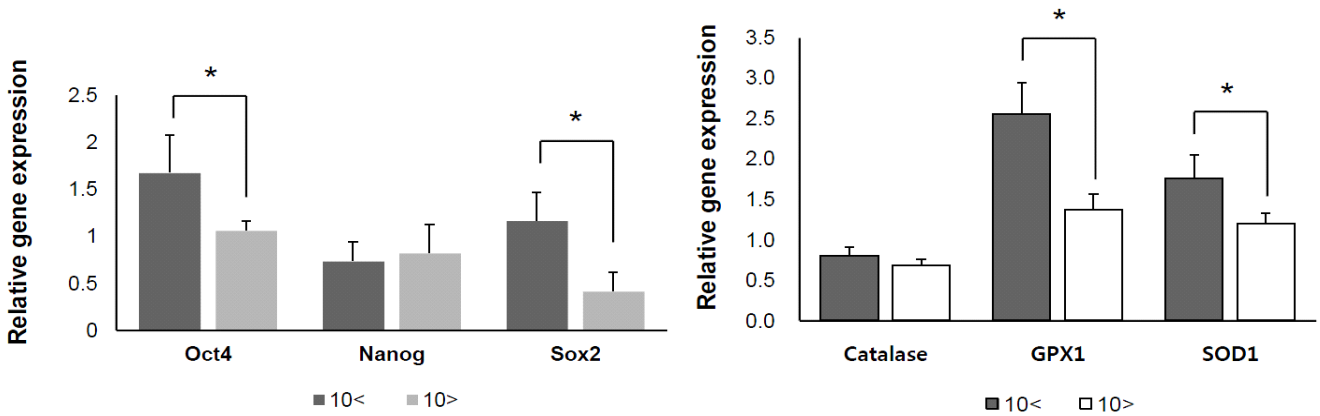


Fig. 2. Relationship between oxygen consumption rate (F x 10^{14}/mols^{-1}) and mRNA expression of (A) pluripotent and (B) anti-oxidant transcript *in vivo*-produced bovine embryos. Data are represented as mean ± S.D (n=3～4). [a,b] Different superscripts indicate significant difference (p<0.05).

(excellent)과 2등급(good)에 비해 산소 소비량이 낮다고 하였다(Abe *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 1998; Cho *et al.*, 2010).

수정 후 7일째 생산된 초기 배반포 수정란은 산소 소비량이 형태학적 1등급 수정란이 약간 높은 경향을 나타내었으나, 유의적인 차이는 보이지 않은 반면, 배반포 수정란은 1등급 수정란이 2등급 수정란에 비해 산소 소비량이 유의적으로 높게 나타났는데, 이는 Agung 등(Agung *et al.*, 2005)이 수정 후 7일째의 소 체외 수정란에서 1등급 수정란이 2등급 수정란에 비해 산소 소비량이 유의적으로 차이가 없고, 3등급 수정란은 낮은 수치를 나타내었다는 보고와 Overstrom 등(Overstrom *et al.*, 1992)이 형태학적 등급이 다른 수정란에서 산소 소비량이 달리 나타나지 않았다는 보고와는 배반포 수정란에서 상이한 결과를 나타내었다. 그러나 Cho 등(Cho *et al.*, 1998; Houghton *et al.*, 1996)의 보고와 일치한다. Abe 등(Abe *et al.*, 2006)은 수정란의 할구 수가 많아질수록 산소 소비량도 증가한다고 하였고, Cho 등(Cho *et al.*, 1998; Houghton *et al.*, 1996)은 수정란이 체외에서 발달함에 따라 산소 소비량도 높아지며, 체외 수정란의 형태학적 등급이 좋을수록 산소 소비량도 높다고 보고하였다. 즉, 산소 소비량이 높다는 것은 그만큼 세포의 수도 많은 것으로 추측된다. 수정란의 산소 소비량이 높을수록 수정란 이식 수태율이 높아진다(Cho *et al.*, 1998; Houghton *et al.*, 1996; Sakagami *et al.*, 2007)고 하였는데, 본 실험에서도 산소 소비량이 높은 수정란을 이식할수록 수정란 이식 수태율이 높은 것으로 확인되었다. 이상의 결과들로부터, 수정란의 세포 수가 많다면 산소 소비량도 증가할 것이라는 추측을 객관적인 수치로 확인하였고, 수정란 이식 시술자의 기술과 수란우의 상태가 일정한 상태에서 산소 소비량이 높은 수정란을 이식할 경우, 수태율을 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다.

Takahashi와 First(Takahashi *et al.*, 1992)은 Anti-oxidant enzyme은 활성산소가 만들어지는 과정에서 어떤 화학 작용을 하여 활성산소를 제거하는 효소로 free radical과 반응 산소화합물에 대한 세포의 보호 작용 등 많은 생물학적 기작에 있어 중요한 역할을 한다고 보고하였다. Umaoka 등(Umoako *et al.*, 1992)은 체외 배양 시 수정란에서 생산된 과잉의 oxygen radical은 SOD 첨가에 의해 제거된다고 보고하였고, Catalase는 모든 동물조직에서 발견되고 있으며, H_2O_2를 H_2O로 환원시킴으로써 과산화지질에 의한 세포 손상을 방어하는 효소로 알려져(Legge and Sellens, 1991), 본 연구에서도 산소 소비량이 높으면 anti-oxidant enzyme도 많이 발현될 것이라는 가설과 일치해, 산소 소비량이 10.0 이상 그룹이 10.0 미만 그룹에 비해 유의적으로 높았으나, Catalase는 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 이는 수정란의 산소 소비량 농도와 GPX1 그리고 SOD1의 발현량과는 상관관계가 있을 가능성이 사료된다.

Oct-4는 배의 발달(Boiani *et al.*, 2003)과 더불어 포유동물의 다분화 능력을 가진 세포의 조절 인자(Kirchhof *et al.*, 2000)이며, 배반포의 ICM의 정상적인 분화를 조절한다고 알려졌다(Bortvin *et al.*, 2003). 본 실험에서는 Oct-4와 SOX2에서 10.0 이상 그룹이 10.0 미만 그룹에 비해 유의적으로 발현량이 높은 것을 확인할 수 있었다($p<0.05$). 이러한 결과로부터 산소 소비량이 높을수록 다분화 능력을 가진 세포 조절 인자들이 많이 포함되어 있을 가능성이 생각된다. 이를 바탕으로 지속적이고, 다양한 연구를 수행하여 품질이 좋은 수정란을 선택하고, 이를 이식하여 수정란 이식 수태율을 향상시킴으로써 축산 농가의 경제성을 높을 수 있는 좋은 활용 방안이 될 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 한우 수정란의 체내 수정란의 산소 소비량과 총 세포 수의 상관관계를 확인하고, 산소 소비량이 수태율에 미치는 영향을 확인하였으며, 이를 바탕으로 체내 수정란의 산소 소비량 농도에 따른 유전자 발현에 미치는 영향을 규명하고자 수행되었다. 체내 수정란의 형태학적 등급별 산소 소비량을 비교한 결과, 배반포 단계의 1등급 수정란 10.2×10^{15} /mols^{-1}, 2등급 수정란 6.4×10^{15}/mols^{-1}을 나타내어 형태학적 등급이 좋을수록 수정란의 산소 소비량도 높아지는 것으로 조사되었다. 체외 수정란의 산소 소비량에 따른 총 세포 수는 산소 소비량이 10.0 미만, 10.0～12.0 미만 및 12.0 이상에서 각각 74.8개, 90.7개 및 110.2개의 총 세포 수를 나타내어 산소 소비량이 높을수록 총 세포 수도 증가하였다. 체내 수정란의 산소 소비량을 측정하고, 이를 수란우에 이식한 후 수태율을 확인한 결과, 산소 소비량이 10.0 미만에서 임신된 두수가 없는 반면, 10.0~12.0 미만에서 60.0 %의 수태율을 나타내었고, 산소 소비량이 가장 높은 12.0 이상에서는 80.0%의 높은 수태율을 나타내었다. 체내 수정란의 산소 소비량을 측정하여 이를 각각 RNA를 추출하고, Real time PCR로 분석한 결과, Oct-4에서는 산소 소비량이 10.0 미만에서 0.98 ± 0.1, 10.0 이상에서 1.79 ± 0.21로 유의적인 차이가 나타났다($p<0.05$). 또한, Sox2도 10.0 미만에서 0.43 ± 0.15, 10.0 이상에서 1.29 ± 0.1로 유의적인 차이가 나타났다($p<0.05$). GPX1에서는 산소 소비량이 10.0 미만 그룹에서 1.39 ± 0.1, 10.0 이상 그룹에서 2.21 ± 0.21로 유의적인 차이가 나타났다($p<0.05$). 또한, SOD1도 10.0 미만에서 1.25 ± 0.13, 10.0 이상에서 1.79 ± 0.1로 유의적인 발현의 차이가 나타났다($p<0.05$).

참 고 문 헌

Abe H, Shiku H, Aoyagi S and Hoshi H. 2004. *In vitro* cul-

ture and evaluation of embryos for production of high quality bovine embryos. J. Mamm. Ova. Res. 21: 22-30.

Abe H, Shiku H, Yokoo M, Aoyagi S, Moriyasu S, Minamihashi A, Matsue T and Hoshi H. 2006. Evaluting the quality of individual embryos with a non-invasive and highly sensitive measurement of oxygen consumption and by scanning electrochemical microscopy. J. Reprod. Dev. 52: 55-64.

Agung B, Otoi T, Abe H, Hoshi H, Murakami M, Karja NWK, Murakami MK, Wongsrikeao P, Wateri H and Suzuki T. 2005. Relationship between oxygen consumption and sex of bovine *in vitro* fertilizwd embryos. Reprod. Dom. Anim. 40: 51-56.

Boiani M, Eckardt S, Leu NA, Scholer HR and McLaughlin KJ. 2003. Pluripotency deficit in clones overcome by clone-clone aggregation: epigenetic complementation. Embo. J. 22: 5304-5312.

Bortvin A, Eggan K, Skalesky H, Akutsu H, Berry DL, Yanagimachi R, Page DC and Jaenisch R. 2003. Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei cell. 2003. Mol. Reprod. Dev. 130: 1673-1680.

Caamano JN, Ryoo ZY and Youngs CR. 1998. Promotion of development of bovine embryos produced *in vitro* by addition of cysteine and beta-mercaptoethanol to a chemically defined culture system. J. Dairy Sci. 81: 369-374.

Cho C, Son JK, Cho SR, Son JK, Choi SH, Cho CY, Kim JB, Kim SJ, Kang D and Son DS. 1998. Changs in oxygen consumption rates of embryos in Korean cattle. J. Emb. Trans. 24: 231-235.

Cho C, Son JK, Cho SR, Kang D, Yeon SH, Choi SH, Choi SH, Kim NT, Kim JB, Kim SJ, Jung JW, Bok NH, Yoo YH and Son DS. 2010. Effect of pregnant rate after embryo transfer in oxygen consumpution of embryo in Korean cattle. J. Emb. Trans. 25: 145-148.

Houghton FD, Thompson JG, Kennedy CJ and leese HJ. 1996. Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. Mol. Reprod. Dev. 44: 476-485.

Kirchhof K, Carnwath JW, Lemme E and Anastassiadis. 2000. Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. Biol. Reprod. 63: 1698-1705.

Kardymowicz O. 1972. A method of vital staining for determining the viability of fertilized sheep ova stored *in vitro*. Proc 7th International Congress on Animal Reprodution & AI, Munich. 1: 503-506.

Legge M and Sellens MH. 1991. Free radical scavengers ameliorate the 2-cell block in mouse embryos culture. Hum. Reprod. 5: 867-871.

Lim JM and Hansel W. 1998. Improved development of *in vitro*-derived bovine embryos by use of a nitric oxide scanvenger in a cumulus-granulosa cell culture system. Mol. Reprod. Dev. 50: 45-53.

Lopez AS, Larsen LH, Ramsing N, Lovendahl P, Raty M, Peippo J, Greve T and Callesen H. 2005. Respiration rates of individual bovine *in vitro*-produced embryos measured with a novel, non-invasive and highly sensitive microsensor system. Reproduction 130: 669-679.

Lopez AS, Greve T and Callesen H. 2007a. Quantification of embryo quality by respirometry. Theriogenology. 67: 21-31.

Lopez AS, Madsen SE, Ramsing NB, Lovendahl P, Greve T and Callesen H. 2007b. Investigation of respiration of individual bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro* and correlation with viability following transfer. Hum. Reprod. 22: 558-566.

Magnusson C, Hillensjo T, Hamberger L and Nilsson L. 1986. Oxygen consumption by human oocytes and blastocysts grown *in vitro*. Hum. Reprod. 1: 183-184.

Niwa H. 2001. Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. Cell Struct. Funct. 26: 137-148.

Nordhoff V, Hübnerm K, Bauerm A, Orlova I, Malapetsa A and Schöler HR. 2001. Comparative analysis of human, bovine, and murine Oct-4 upstream promoter sequences. Mamm. Genome. 12: 309-17.

Okamoto K, Okazawa H, Okuda A, Sakai M and Muramatsu M. 1990. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. Cell. 60: 461-472.

Overstrom EW, Burke PA, Hagopian SS and Selgraph JP. 1989. Blastocyst oxidative metabolism and embryo viability. J. Cell. Biol. 107: 607.

Overstrom EW, Duby RT, Dobrinsky J, Roche JF and Boland MP. 1992. Viablity and oxydative metabolism of the bovine blastocyst. Theriogenology 37: 269.

Renard JP, Philippon A and Menezo Y. 1980. *In vitro* uptake of glucose by bovine blastocysts. J. Reprod. Fertil. 58: 161-164.

Sakagami N, Akiyama K and Nakazawa Y. 2007. The relationship between oxygen consumption rate and pregnancy rate of bovine embryos. Reprod. Fertil. Dev. 19: 225.

Sakagami N, Yamamoto Y, Akitama K, Nakazawa Y, Kojima N, Nishida K and Yoshioka K. 2010. Viability of porcine films. J. Reprod. Dev. 56: 279-284.

Shiku H, Shiraishi T, Aoyagi S, Utsumi Y, Matsudaira M, Abe H, Hoshi H, Kasai S, Ohya H and Matsue T. 2004. Respiration activity of single bovine embryos entrapped in a cone-shaped microwell monitored by scanning electrochemical microscopy. Analytica Chimica Acta. 522: 51-58.

Shiku H, Shiraishi T, Ohya H, Matsue T, Abe H, Hoshi H and Kobayashi M. 2001. Oxygen consumption of single bovine embryos probed with scanning electrochemical microscopy. Anal. Chem. 73: 3751-3758.

Schilling EE, Goldenberg H, Morré DJ and Crane FL. 1979. Distribution of insulin receptor among mouse liver endomembranes. Biochim. Biophys. Acta. 23: 504-11.

Takahashi Y and First NL. 1992. *In vitro* development of bovine one-cell embryo : influence of glucose, lactose, pyruvate, amino acids and vitamine. Theriogenology 37: 963- 978.

Takahashi M, Nagai T, Hamano S, Kuwayama M, Okamura N and Okano A. 1993. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. Biol. Reprod. 49: 228-32.

Trimarchi JR, Liu L, Smith PJ and Keefe DL. 2000. Noninvasive measurement of potassium efflux as an early indicator of cell death in mouse embryo. Biol. Reprod. 63: 851-857.

Umoako Y, Noda Y, Narimoto K and Mori T. 1992. Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. Mol. Reprod. Dev. 31: 28-33.

(접수: 2014. 1. 7/ 심사: 2014. 1. 31/ 채택: 2014. 3. 25)