

소 수정란의 검사와 선별

노 규 진

경상대학교 수의과대학

1. 서 론

소의 수정란의 채집은 주로 비외과적 관류법에 의하여 회수된다. 소의 난자는 수란관에서 수정후 접합체(zygote)로 된 다음 2분법에 의하여 분할하는 과정을 거치는데 2-세포기, 4-세포기, 8-세포기, 상실배(morula)기를 거쳐 배반포(blastocyst)기에 도달한다. 이때가 수정 후 약 7일이 경과하였을 때이다. 수정란은 통상적으로 8-세포기에서 16-세포기 때에 난관에서 자궁각으로 내려 온다. 회수된 배반포기의 수정란은 직경이 약 150 μm 이므로 실체현미경에서 채집 또는 검사할 수 있다. 수정란을 정확하게 검사하려면 우선 수정란의 발달 단계별 정확한 해부학적 지식이 필요하다. 그리고 정상적인 것과 비정상적인 것의 구별능력이 갖추어져야 한다. 회수된 수정란은 무균실 또는 세균오염의 염려가 없는 깨끗한 곳에서 채집 및 검사하여야 한다. 또한 수정란은 위생적이며 가능한 체내에서와 같은 조건으로 유지하면서 빠른 시간 내에 검사하는 과정을 마치는 것이 수정란의 사멸을 줄여서 수태율의 저하를 방지하는데 도움이 된다.

2. 기구 및 보존액

수정란의 회수, 채집 및 검사에 사용되는 모든 기구, 보존액 및 시약은 반드시 멸균된 것을 사용하고 독성이 없으며(toxicity-free) 독소가 없는(pyrogen-free) 것을 사용하여야 한다. 작업 또한 오염되지 않은 무균적 상태에서 수행되어야 하며 가능한 생체내와 같은 조건을 유지하도록 온도, 기압, 빛 또는 자외선의 차단, pH, 삼투압 등을 일정하게 유지하여야만 한다.

회수된 수정란을 채집 및 검사하기 위해서는 다음과 같은 기구와 보존액을 준비하여야만 한다.

1) 실체현미경(stereomicroscope) : 투과형 실체현미경을 사용하여 10~20배의 배율로 수정란 채집할 수 있으며, 20~40배의 배율로 수정란을 검사할 수 있다.

2) 무균작업대(clean bench or safety box) : 무균작업대에서 수정란을 채집 또는 검사하는 것이 작업중의 오염을 방지하는데 도움이 된다.

3) 건열멸균기(dry oven) : 수정란의 채집 및 검사에 소요되는 유리기구 및 철제기구는 180°C의 건열 멸균기에서 2시간이상 멸균 후 사용하는 것이 좋다.

4) CO₂ 배양기(CO₂ incubator) : 회수된 수정란이 즉시 이식되지 못 할 경우에는 수정란을 실험실로 옮겨 37°C로 유지되며 습도가 95% 이상인 CO₂ 배양기내에 넣어 CO₂ 농도를 5%로 유지하면서 배양 또는 보관하는 것이 필수적이다.

5) 플라스틱 접시(plastic petri dish) : 수정란을 채집, 검사 및 배양하기 위하여 일회용 멸균 플라스틱 접시를 많이 이용하고 있다. 크기는 직경이 100 mm 인 것과 30 mm인 것이 주로 사용되며, 세포배양용인 것을 구입하여 사용하는 것이 적합하고, 수정란의 회수를 위하여 바닥에 줄이 그어져 있는 것이 유리하다 (Quebec grid search plate; 100×15 mm).

6) 보존액(media); 실내에서 수정란을 채집하거나 단기간 보존하기 위하여 주로 인산완충액이 함유된 Dulbecco's-PBS 용액(D-PBS)에 항생제와 5~20 % 수준의 소태아 혈청(fetal calf serum)을 첨가하여 사용한다. 탄산가스 배양기에서 보존 또는 배양하기 위하여 중탄산완충액 또는 이 두가지 완충액이 일정한 비율로 함유된 Tissue Culture Medium-199(TCM-199), Brinster's Mouse Ova Culture Medium-3(BMOC-3), Ham's F-10 혹은 단순배양액 등을 이용하는 것이 좋다. 물론 배양액은 사용하기 전에 항생제와 소태아 혈청을 첨가한 다음 0.22 μm의 여과기로 제균하여 사용한다.

7) Em-Con 여과기(filter); 자궁관류액으로부터 수정란을 채집하기 위하여 여분의 관류액을 수정란과 분리하여 제거하는데 사용된다.

8) 체외수정용 카테타(IVF-catheter)가 장치된 튜브큐린 주사기 : 현미경 아래에서 수정란의 채집에 사용된다.

9) 슬라이드 가온기(slide warmer) : 배양액이나 용기를 일정한 온도로 유지하는데 사용된다.

10) 스텐드(stand); Em-Con 여과기를 고정시키는데 사용된다.

11) 이외에도 10 ml 주사기, 배양액을 담을 수 있는 100 ml 용량의 배양액용 유리병 또는 플라스틱병, 0.22 μm의 일회용 여과기, 유성펜, 메스실린더(100 ml), 일회용종이수건 등이 필요하다.

3. 수정란의 검사 및 분류

수정란을 정확하게 검사하려면 수정란에 대한 정확한 해부학적 지식 및 질적 판단 능력이 필요하다. 그러기 위하여서는 정상 및 비정상 상태의 수정란에 관한 사진, 그림 또는 슬라이드 등을 많이 보는 것이 도움되며 무엇보다도 많은 실물을 관찰하는 것이 필요하다. 실물을 관찰할 때에는 경험자의 조언이 매우 유익하다. 숙달된 사람은 30~40 배율의 실체현미경으로 수정란을 95% 이상 정확히 판정할 수 있다.

수정란의 채집 및 검사 절차를 기술하면 다음과 같다.

- 1) 검사자는 손을 깨끗이 씻고 말린다.
- 2) 실체현미경의 조명을 켜고, 슬라이드 가온기(slide warmer)의 온도를 점검한다.
- 3) 항생제(penicillin; 100 IU/ml, streptomycin; 100 μ g/ml)와 불활화된 FCS 10%가 첨가된 100 ml D-PBS 용액을 0.22 μ m의 멸균여과기로 여과시키고, 여과된 용액을 멸균된 유리 용기에 담는다.
- 4) 바닥에 줄이 그어진 수정란 채란용 플라스틱 접시(100×15 mm)와 소형의 플라스틱 접시(35×10 mm) 뚜껑에 유성 펜으로 A, B 및 C로 표시하고 슬라이드 가온기 위에 놓는다.
- 5) 1 ml 투브큐린 주사기에 멸균된 IVF 카테터를 장치하고 슬라이드 가온기 위에 놓는다.
- 6) Em-Con 여과기의 외부를 종이 타올로 닦은 다음 뚜껑을 벗긴다.
- 7) 한손으로는 여과기를 눈높이로 들고, 다른 손으로는 10 ml 주사기로서 여과기 내의 D-PBS 용액 상층에 있는 거품을 제거한다. 제거한 거품은 버리지 않고 다음에 플라스틱 접시에 옮겨 수정란이 있나 검사한다.
- 8) 여과기의 바닥으로부터 1.5 cm 높이에 도달할 때까지 여과기 밑에 있는 결쇠(clamp)를 열어 배양액을 제거한 다음 다시 잠근다.
- 9) 여과기를 약간 흔들면서 배양액을 채란용 플라스틱 접시에 붓는다. 다시 D-PBS 용액을 여과기에 붓고 10 ml 주사기를 여과기의 바닥에 대고 바닥에 있는 점액과 찌꺼기를 흡인하여 채란용 접시로 옮긴다. 여과기내의 배양액도 약간 흔들면서 모두 채란용 접시에 붓는다.
- 10) 채란용 접시를 실체현미경 아래에 놓고 1분간 정치시켜 수정란이 접시의

바닥에 가라앉으면 저배율(15배)로 현미경의 초점을 접시의 바닥에 맞춘 다음 접시의 한쪽 끝부분부터 순서대로 한손으로는 접시를 옮기면서 다른 손으로는 IVF 카테터가 장치된 튜브큐린 주사기로서 발견된 수정란을 채집한다. 접시의 가장자리 부분도 면밀히 검경한다. 주의할 것은 수정란을 채집하기 전에 튜브큐린 주사기는 0.2 ml 가량 공기를 흡인한 상태에서 채집이 시작되어야 하며 채집 중에 배양액이 주사기내로 들어가지 않아야 한다. 즉, 수정란과 같이 채집된 배양액은 IVF 카테터의 상부에서 주사기와 연결된 부위 전까지 차면 회수를 일시 중단하고 회수액을 A 접시에 일단 붓고 다시 채집을 실시하여야 한다.

11) 채집된 액이 담긴 주사기는 A 접시의 바닥 중앙에 대고 주사기내의 액 모두를 서서히 뽑아낸다.

12) A 접시를 실체현미경 아래에 다시 놓고 이제는 20~40배의 배율로 수정란의 형태를 자세히 검경한다. 검경요령은 아래에 기술된 내용을 참조하여 수정란이 정상인지, 질이 좋은 지 등을 구분한다.

13) 이들 중 이식이나 동결에 적합한 수정란은 다시 튜브큐린 주사기로 채집하여 준비하여 둔 B 접시에 옮기고, 미수정란이나 비정상적인 수정란은 C 접시로 옮긴다.

수정후 경과 일수에 따른 소 수정란의 정상적인 발달 상태는 표 1에 나타난 바와 같다. 수정후 7일에 회수된 수정란은 후기 상실배 또는 초기 배반포가 대부분이다. 발달 단계별 수정란의 특징은 다음과 같다.

1) 1-세포기배(1-cell embryo, zygote) : 수정직후에 나타나는 것으로 투명대내에 세포질이 충전되어 있고 웅성전핵(male pronucleus)과 자성전핵(female pronucleus)이 나타난 다음 서로 접합한다. 위난강 또는 세포질내에 정자의 두부가 보일 경우도 자주 있다. 투명대 밖으로는 난구세포들로 싸여 있다가 점차 떨어져 나간다.

2) 2-세포기배(2-cell embryo) : 수정 후 1~3일에 나타난다. 세포는 2개의 할구세포로 분할되어 있다.

3) 4-세포기배(4-cell embryo) : 수정 후 2~3일에 나타난다. 세포는 2-세포기에 비하여 조금 작은 4개의 할구세포로 분할되어 있고 원추모양으로 붙어있다.

4) 8-세포기배(8-cell embryo) : 수정 후 3~5일에 나타난다. 세포는 4-세포기에 비하여 더욱 작고 8개의 할구세포로 분할되어 있다.

5) 상실배(morula) : 수정 후 5~6일에 나타나는 수정란으로서 공모양의 세포

덩이로 보이며, 개개의 할구를 분별하는 것은 불가능하다. 세포덩이는 투명대 내강의 대부분을 차지하고 있다.

6) 후기 상실배(compact morula) : 수정 후 5~7일에 나타난다. 할구세포들의 결합이 강해져서 개개로 분리가 어려우며 소형화된 세포덩이를 이룬다. 할구세포 덩이는 투명대내강의 60-70%를 차지하며 위난강이 확대된 상태로 되어 있다.

7) 초기 배반포(early blastocyst) : 수정 후 7~8일에 나타난다. 수정란내에 난포강이 형성된다. 세포는 투명대내강의 70~80%를 점유한다. 세포는 영양배엽세포(trophoblast)와 배세포(embryonic cells)로 분화가 일어나지만 구분은 어렵다. 세포전체가 지문모양을 나타내는 것이 특징이다.

8) 확장된 배반포(expanded blastocyst) : 수정 후 8~10일에 주로 나타난다. 난포강의 형성이 두드러지고 영양배엽세포와 배세포와의 구분이 가능하고 배세포는 내부세포괴(inner cell mass)를 형성한다. 수정란은 점차 확장되어지며 그 크기가 이전에 비하여 1.2 - 1.5배에 달한다. 한편, 투명대의 두께는 점차 얇아진다.

9) 부화 배반포(hatched blastocyst) : 수정 후 9~11일에 주로 나타난다. 난포강이 매우 확장되어 짐으로써 투명대를 파열시켜 세포가 외부로 탈출한다. 부화가 끝난 것은 투명대가 보이지 않고 수정란은 매우 커져 있으며 난포강도 커져 있다. 내부세포괴와 영양배엽세포가 명료하게 관찰된다.

표 1. 수정후 경과 일수에 따른 수정란의 정상적인 발달 상태

수정후의 일수	수정란의 발달 상태
0 - 2	1-세포기배(1-cell embryo)
1 - 3	2-세포기배(2-cell embryo)
2 - 3	4-세포기배(4-cell embryo)
3 - 5	8-세포기배(8-cell embryo)
4 - 5	16-세포기배(16-cell embryo)
5 - 6	초기 상실배(early morula)
5 - 7	후기 상실배(compact morula)
7 - 8	초기 배반포(early blastocyst)
8 - 10	확장 배반포(expanded blastocyst)
9 - 11	부화 배반포(hatching blastocyst)

(Seidel, G.E, Jr. and Seidel, S.M. 1991)

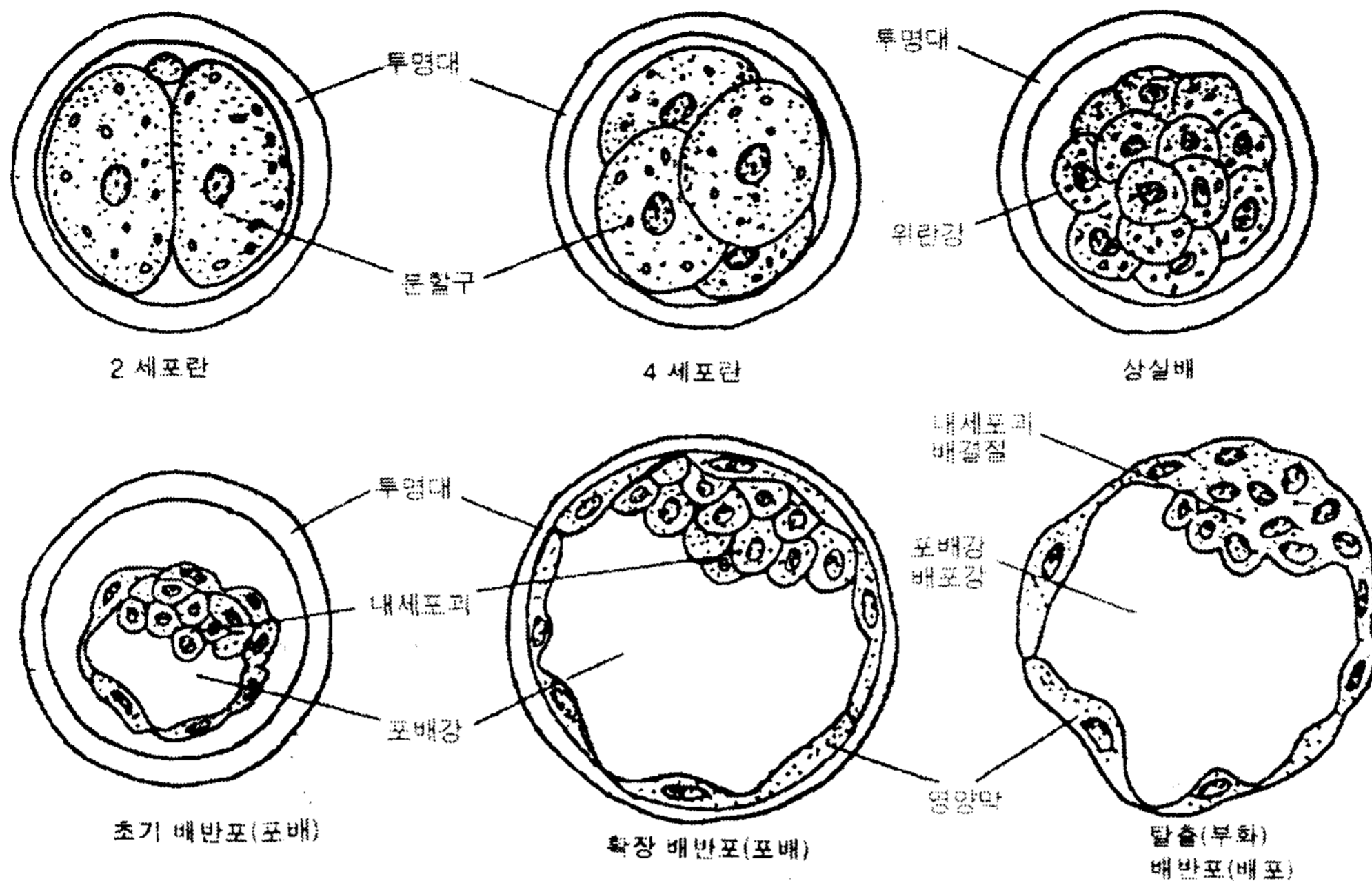


그림 1. 발달단계별 소 수정란의 모식도

4. 수정란의 감별검사 요령

수정란의 구분에 고려해야 할 사항은 1) 수정된 것과 수정되지 않은 것, 2) 수정 후 경과시간에 따른 수정란의 발달이 정상적인 것과 늦은 것, 3) 형태학적으로 이상이 있는 것과 정상인 것 등이 있다. 수정란의 해부학적 명칭과 그 특성을 더욱 상세하게 설명하면 다음과 같다.

1) 크기와 모양 : 정상적인 소 수정란의 크기는 직경이 150~190 μm 이다. 접합체에서 상실배기까지는 그 크기에 변화가 적지만 배반포기에서는 점차 커져서 확장배반포기에 도달하면 직경이 약 1.5배 증가한다. 모양은 구형을 이루고 있으며 윤곽이 명료한 것이 정상이며 한 쪽이 찌그러 들었거나 길게 늘어난 것 등은 비정상이다.

2) 색조 : 초기 수정란의 세포질은 어두운 색조를 나타내지만 발달하면서 점

차 밝아진다. 세포질이 너무 투명하거나 너무 어두우면 비정상이다. 핵은 관찰이 어렵다.

3) 할구(blastomere)의 수와 크기 그리고 세포질의 밀도 : 할구의 크기는 발달하면서 점차 작아지는 반면 할구의 수는 점차 많아진다. 각 세포기별로 2-세포기에는 2개의, 4-세포기에는 4개의 그리고 8-세포기에는 8개의 같은 크기의 분할구가 존재하는 것이 정상이다. 물론 분할구들은 하나의 수정란내에서도 세포주기(cell cycle)가 서로 약간 달라서 수정란이 발달할수록 정확한 2배수가 안되는 경우가 많다. 16-세포기 이후부터는 분할구의 수를 헤아리기 어려우며 뿔나무의 열매 모양을 하고 있으므로 상실배라고 부른다. 분할구들의 크기가 서로 다르거나 일부 분리된 것이 있다거나 파편(fragmented)이 있으면 좋지 않다. 분할구내에 많은 과립(granule)이 있다든지, 수포가 있다든지, 난황의 균질성이 일정하지 않으면 좋은 수정란으로 분류될 수 없다.

4) 투명대(zona pellucida)의 모양과 세포와의 간격 : 투명대의 두께는 12~15 μm 정도이다. 투명대는 구형의 모양과 일정한 두께로 수정란을 싸고 있어야 하며, 불규칙한 모양이나 손상된 부분이 없어야 하고 일정한 탄성을 지니고 있어야 한다. 투명대는 발달할수록 점차 얇아지며 확장배반포기에서는 투명대 역시 확장된다. 세포와 투명대와의 간격을 위란강(perivitelline space)이라 하며 이는 초기에는 간격이 좁으며 분할이 진행될수록 점차 넓어지다가 확장배반포기에 도달하면 분할구가 투명대내에 충만하게 되어 투명대와 분할구세포와는 간격이 거의 생기지 않는다.

5) 내부세포괴(inner cell mass)와 영양배엽세포(trophoblast) : 수정란은 배반포기에 도달하면 분할구 세포들은 분화되어 내부에 불투명한 세포덩이가 나타나는데 이를 내부세포괴라 하며 발달이 진행됨으로써 명료하게 구분이 된다. 이는 발달하여 후에 배엽을 형성하여 태아로 자라게 되는 부분을 구성하게 된다. 배반포기에 가장자리에 있는 불투명한 세포들은 투명대를 따라 한층의 막을 형성하는데 이를 영양배엽세포라 하고 이는 부화후 자궁에 착상하는데 중요한 역할을 하며 장차 태반이나 태아의 태막을 형성하게 된다.

6) 포배강(blastocoele 또는 blastocyst cavity) : 배반포기의 수정란에서는 내부에 투명한 공간이 나타나는데 이를 포배강이라 한다. 배반포가 발달할수록 포배강도 더욱 넓어진다.

표 2. 수정란의등급 분류표

등급	분류방법	특 징
1	우수란(excellent)	정상발육된 것으로 형태학적으로 이상이 없음
2	우량란(good)	양질 또는 보통의 수정란으로 세포에 경미한 불균형이 있음.
3	보통란(fair)	발육이 약간 늦은 것으로 세포에 중등도의 불균형이 있음.
4	불량란(poor)	발육이 현저히 늦은 것으로 세포가 적고 형태의 이상이나 변성이 있음.

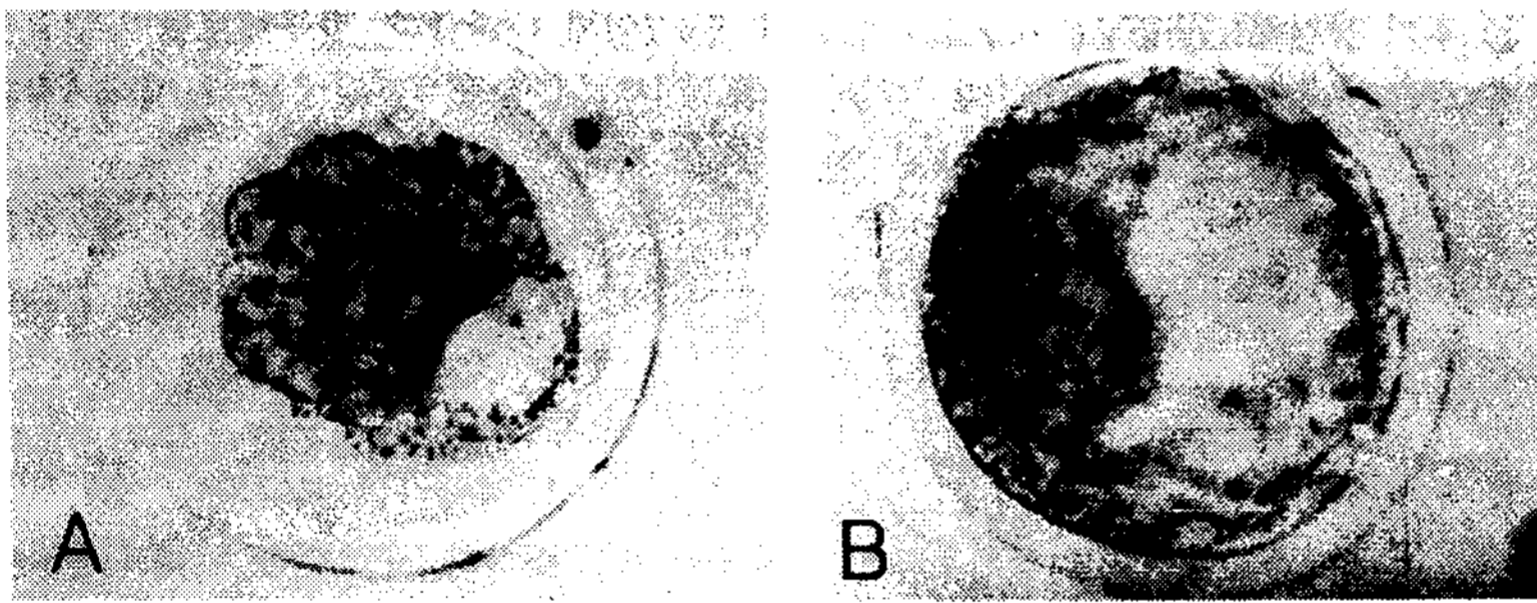


그림 2. 정상적인 초기 배반포기(A)와 배반포기(B) 수정란

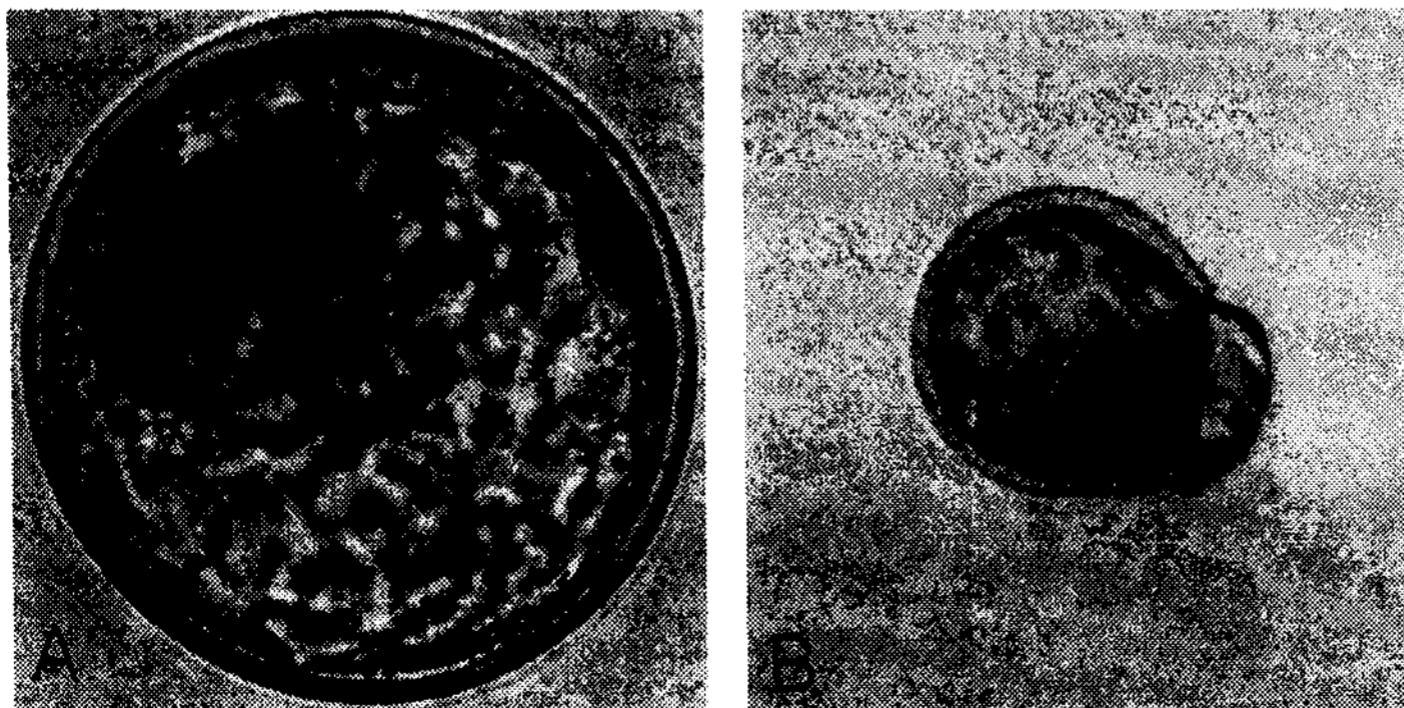


그림 3. 정상적인 확장 배반포기(A)와 부화 중인 배반포기(B)

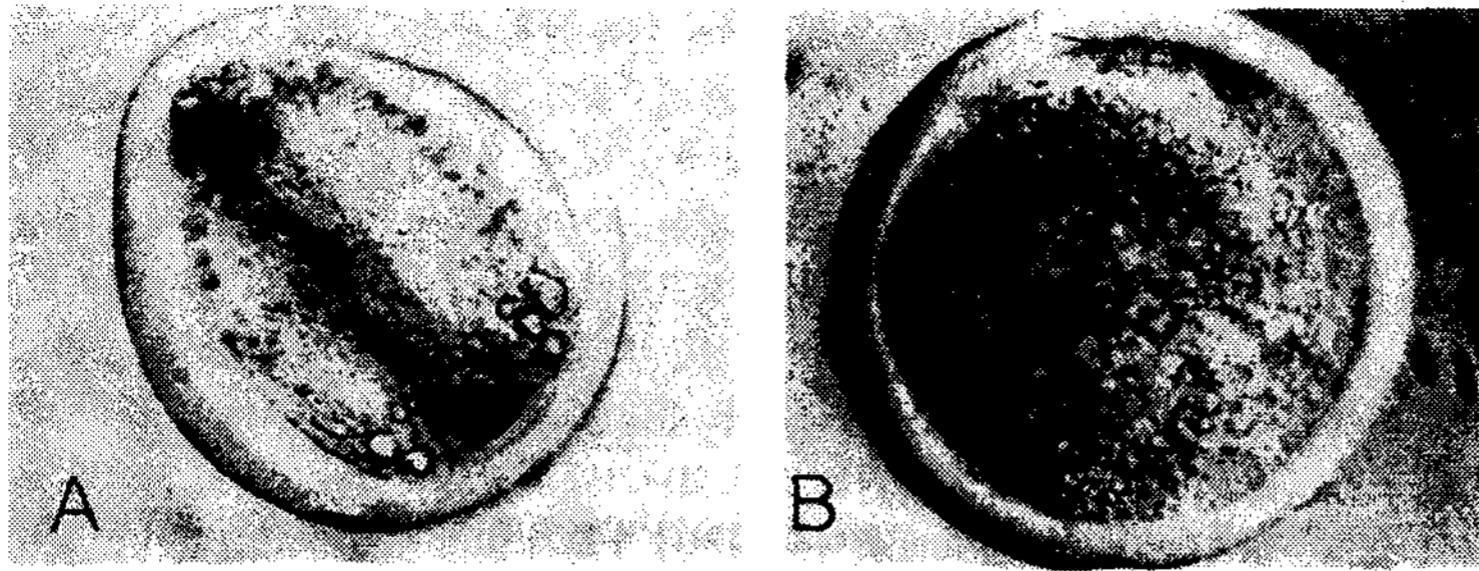


그림 4. 수정 후 제 12일에 회수한 미수정란(A)과 제 8일에 회수한 미수정란(B)

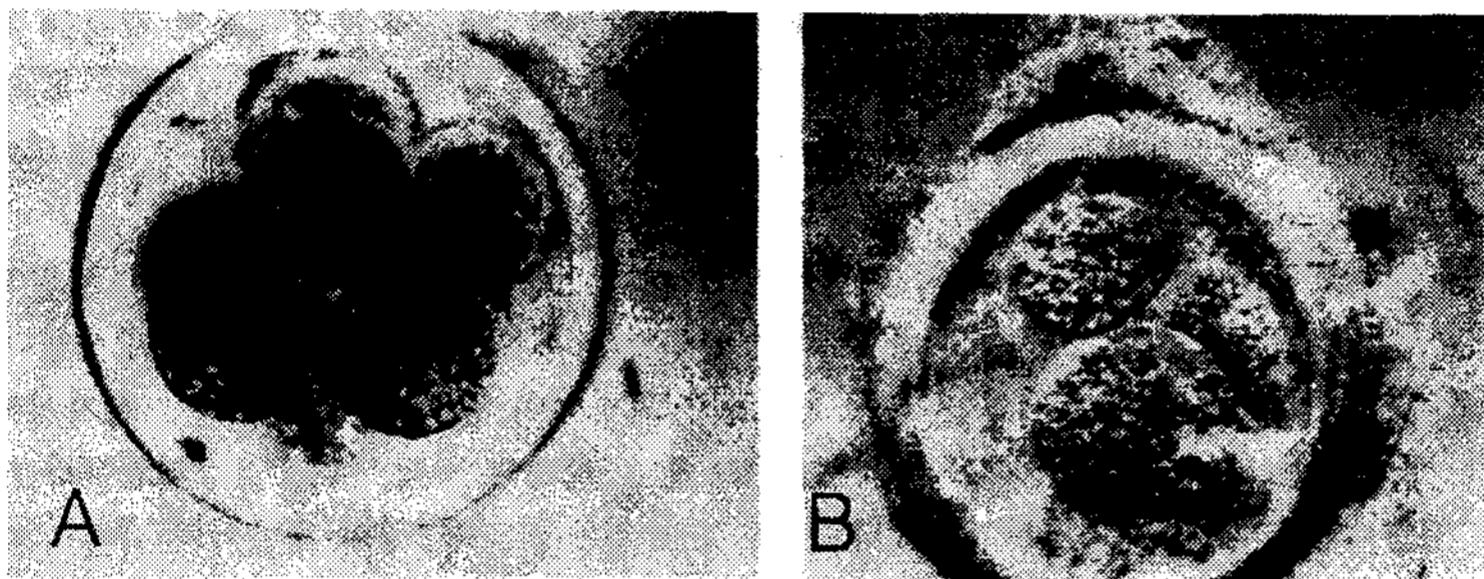


그림 5. 수정 후 제 8일에 회수한 8-세포기 수정란(A)과 제 7일에 회수한 4-세포기수정란(B)

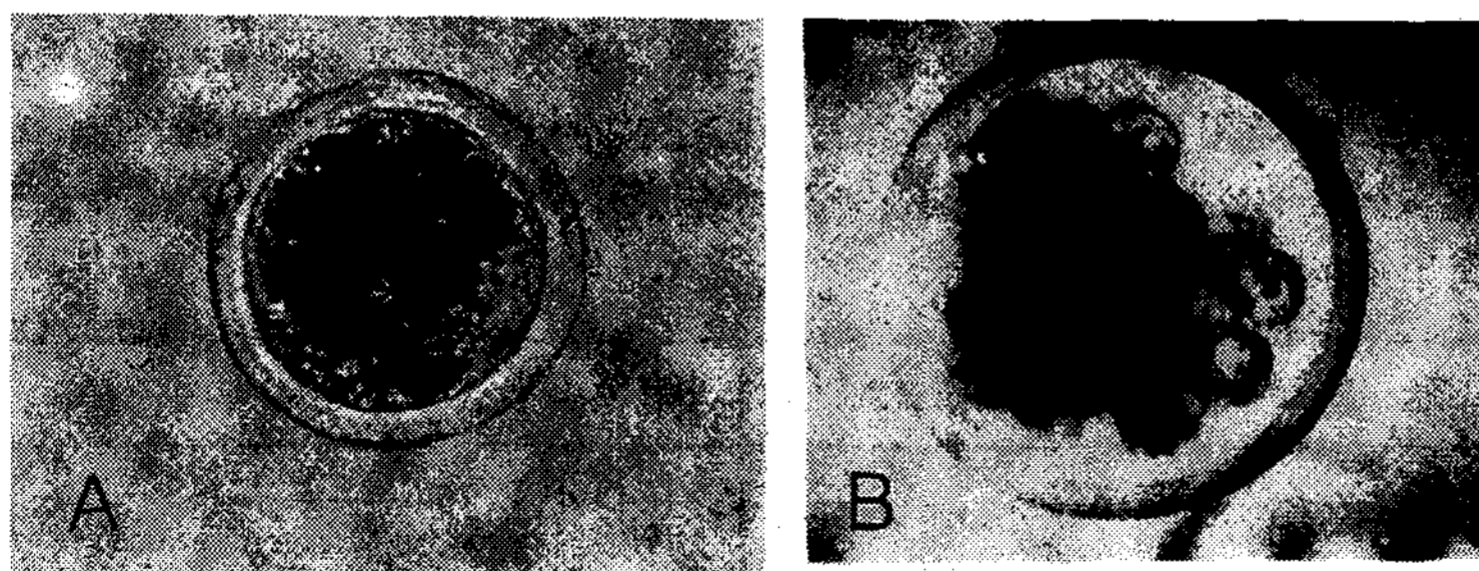


그림 6. 수정 후 제 7일에 회수한 비정상적인 상실배기 수정란(A, B)



그림 7. 수정 후 제 7일에 회수한 비정상적인 상실배기
수정란(A)과 초기 배반포기 수정란(B)

5. 수정란의 질과 수태율

수정란의 질은 수태율에 미치는 영향 중에서 가장 큰 비중을 차지하고 있으므로 정확한 질의 판단과 아울러 가능한 좋은 상태를 유지하여야 한다. 수정란은 위생적이며 가능한 체내에서와 같은 조건으로 유지하면서 빠른 시간 내에 검사하는 과정을 마치는 것이 수정란의 사멸을 줄여서 수태율의 저하를 방지하는데 도움이 된다.

이식된 수정란의 수태율에 미치는 영향은 수정란의 발달상태와 질 이외에도 이식기술, 이식시기, 이식부위, 수정란의 수, 수란우의 조건(발정동기화, 황체발달상태, 자궁의 발달과 감염여부, 영양상태, 나이, 체온 등), 기후 등 많은 요인이 작용한다.

표 3은 소 수정란의 질이 수태율에 미치는 영향을 조사한 것이다. 우수 수정란은 54%, 불량 수정란은 30%, 보통 수정란은 8% 및 불량 수정란은 역시 8%의 수태율을 나타내고 있다. 모체의 수태율에서도 우수 수정란은 63%, 불량 수정란은 58%, 보통 수정란은 31% 그리고 불량 수정란은 12%의 수태율을 나타내고 있다. 그러므로 우수 수정란을 이식하였을 경우에 가장 높은 수태율을 얻을 수 있으며 불량 수정란 역시 비교적 높은 수태율을 보이고 있으므로 이식에 사용되고 있다. 그러나 보통 수정란과 불량 수정란은 이식에 부적합한 것으로 알려져 있다.

표 3. 수정란의 질과 수태율

등 급	이식된 수정란수	수정란의 수태율(%)	모체의 수태율(%)
우수(excellent)	275	54	63 ^a
우량(good)	152	30	58 ^a
보통(fair)	42	8	31 ^b
불량(poor)	42	8	12 ^c

^{a,b,c}pregnancy rates with different superscripts differ, $P < 0.05$ (Seidel, Jr. and Seidel, 1991)

6. 참고문헌

- Curtis, J.L. 1990. Cattle embryo transfer procedure. Kansas State University, Manhattan.
- Seidel, G.E, Jr. and Seidel, S.M. 1991. Training manual for embryo transfer in cattle. FAO of the United Nations, Rome.
- 江口保暢 1979. 家畜發生學. 文永堂, 東京.
- 金相根. 1987. 家畜受精卵移植要論. 유한문화사, 서울.
- 金川弘司. 1984. 牛의 受精卵移植. 近代出版, 東京.
- 한국수정란이식학회. 1995. 소 수정란 이식. 정문각, 서울.