韓國受精卵移植學會誌(1995) 第 10 卷 第 2 號
Korean J. Emb. Trans. (1995) Vol. 10, No. 2, pp. 163~169

화학적 단순배양액에서의 소 초기배의 발생능력†

이홍준 · 서승운 · 정 용 · 변태호 · 이상호 · 송해범*
고려대학교 응용동물과학과

Developmental Ability of Bovine Early Embryos in Chemically Defined Media†

H. J. Lee, S. W. Seo, Y. Jung, T. H. Byun, S. H. Lee and H. B. Song*
Dept. of Animal Science, Korea Univ.,

SUMMARY

In the experiment Ⅰ for maas production of bovine early embryos, 18~20hpi fertilized eggs(756 eggs) and parthenogenic eggs(618 eggs) which were treated by 10% ethanol were cultured in both TCM and CZB. In the experiment Ⅱ, supplment effects each in CZB and CR_{1aa} were tested by matured and fertilized oocytes which were after 18~20hpi. In the case of experiment Ⅰ after 48hr, the cleavage rates of normally fertilized eggs were 66.6% in TCM treatment and 77.7% in CZB treatment, and after 240h the blastocysts were 7.5% in TCM and 14.1% in CZB. In the parthenogenic eggs, the cleavage rates at 48hr were 39.6% in TCM and 57.5% in CZB, and at 240h, the blastocysts were 0.9% in TCM and 4.4% in CZB. These results showed that the effects of CZB on developmental ability to parthenogenic eggs as well as nomally fertilized eggs are relatively high. In experiment Ⅲ, the effect of exposing the cleaved embryos to CZB for 30h on the blastocyst formation was examined. Similar rates of blastocyst formation were obtained both in TCM and CZB, suggesting that CZB exposure during ealry development is critical. In experiments Ⅲ ~ Ⅴ, the effects of supplements were examined. The cleavage rates of CZB treatments at 48h were 83.8% in control, 78.1% in BSA+A.A+SIT, 75% in 5% FCS+A.A.+SIT, 88.6% in BSA+A.A+SIT and not co-cultured BSA+A.A.+SIT had 85.7% and in the case of 240h blastocysts showed 22.6, 0.0, 11.1, 6.5 and 0%, respectively. As a result, this study showed that CZB was effective culture system for *in vitro* development, and that CZB and CR_{1aa} had no significant differences and effects between them. It may be concluded that in the simple media containing supplements could replace the co-culture systems of bovine early embryo development.

서 론

현재 소 체외수정체계는 체내 또는 체외에서 성숙된 난자들을 체외배양할 경우 초기배발생에 제한된 결과를 보여주고 있다. 즉, 소 초기배의 체외발생 경우에 8, 16세포에서 일반적으로 대다수의 난자에서 발생중지가 일어나고 있다(Eyestone등, 1987

† 본 연구는 한국과학재단의 지원에 의해 수행되었음.
* 대구대학교 축산학과(Dept. of Animal Science, Daegu Univ.)

). 최근에는 소 난관상피세포를 이용하여 단순배양액 및 복합배양액으로 CZB, CR_1배양액 및 TCM 등을 이용하여 배양한 결과 일부 발생중지란의 발생을 개선하여 보다 많은 배반포가 생산되고 있으며(Chatot 등, 1989; Rosenkrans 등, 1991), 특히 화학적으로 정의된 무혈청 배양액에서 selenium, insulin, transferrin (SIT)을 첨가할 경우 배반포까지의 발생비율을 증가시켰다는 보고가 있지만 이들의 각 성분의 구체적인 개선효과가 있는지는 여러가지 다른 요인 등에 의한 차이에 의해 개선된 배양체계인지가 보다 집중적으로 조사되어야 할 것이다(Ellington 등, 1990; Ellington 등, 1990; Kim 등, 1990). 본 실험은 복합배양액과 단순배양액을 비교검토하여 체외발생능력을 조사하며, CZB와 CR_1 단순배양액에 첨가물질을 첨가했을 때의 배발달 영향에 대해서 조사를 하여, 궁극적으로는 소 초기배의 단순배양액의 이용 가능성에 대해서 타진하여 배양체계를 개선하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 체외성숙

체외성숙에 이용되는 난자는 도살장에서 난소를 채집하여 3~5mm되는 난포를 18G needle이 부착된 10mL 주사기를 이용하여 흡입·채취하였다. 난구세포가 균일하게 분포된 것만을 모아서 Wash 배양액으로 3회 세정, TCM 199 + 20% FCS + PMSG, hCG(10 IU/mL)배양액으로 3회 세정한 후, 35mL dish에 2mL 배양액을 넣어 22~24시간 체외성숙 배양하였다(Yoo, 1993).

2. 체외수정

22~24시간 배양한 난자 중에서 난구세포가 잘 퍼져있는 난자만을 hyaluronidase로 난구세포를 제거한 후에 3% sodium citrate로 남아 있는 난구세포를 완전히 제거를 하였다. 난구세포가 제거된 난자를 Wash 배양액과 Fert 배양액으로 3회 세정한 후 60mm dish에 Fert 배양액 25μL drop을 만들어 5개 난자를 넣은 후, Percoll 90%와 45%를 2,000rpm 30분동안 원심분리한 후, 상징액을 제거하고 Fert 배양액을 8mL 넣어 희석한 후, 800rpm 10분간 원심분리 하였다. 상징액을 제거하여 약 100μL의 정자 pellet과 Fert 배양액을 희석하였다(Florence 등, 1992). 희석정액을 25μL drop당 2.5μL을 넣어 1.5×10^6cell/mL 농도의 정자로 매정하였다.

3. 처녀발생유기

30시간 이상 체외성숙 배양하여 hyaluronidase로 난구세포를 제거한 후, 3% sodium citrate로 잔여 난구세포를 완전히 제거를 하였다. 난구세포가 제거된 난자를 Wash 배양액으로 3회 세정을 하였다. Ethanol 활성은 60mm dish내에 900μL의 TCM199을 만든 후, mineral oil로 drop전체을 덮고, 100μL ethanol을 900μL TCM drop에 혼합시킨 후 난구세포가 완전하게 제거된 난자를 넣어, 10분간 CO_2 incubator에서 배양을 하여 처녀발생을 하였다. 처리난자는 흡입하여 Wash배양액 5mL이 들어 있는 watch glass에 일시에 넣은 후 수차례 세정하였다. (Lee 등, 1992)

4. 체외배양

1) 실험 Ⅰ. 체외에서 생산된 수정란

화학적 복합배양액인 TCM과 단순배양액인 CZB에서의 초기배 발생율을 검토하기 의해서 실험Ⅰ을 하였다. 18~20시간 매정된 정자를 제거한 후에 각 처리구인 TCM과 CZB에서 난할율과 10일째까지 배양하여 배반포 형성율을 비교 조사하였다.

2) 실험 Ⅱ. 체외에서 생산된 처녀발생란

30시간 이상 체외성숙배양한 난자를 10% ethanol로 10분간 처리를 한 후에 화학적 복합배양액인 TCM과 단순배양액인 CZB에서 ethanol로 처녀발생을 유기하여 초기배 발생율을 조사하였다.

3) 실험 Ⅲ. CZB배양액에 노출된 체외수정란을 TCM과 CZB배양액에 비교 배양

단순배양액 CZB에서 단시간 노출을 한 후에 화학적 복합배양액인 TCM과 CZB에서 초기배 발생 차이를 검토하기 위해서 단기간 다른 배양액에 노출효과를 조사하였다. 즉, 18~20시간 매정된 정자를 제거한 후에 28~30시간 동안 CZB배양액에서

단시간 노출시키고 다시 각 처리구인 TCM과 CZB 배양액에서 10일간 배양을 한 후에 배반포 형성율을 비교 조사하였다.

4) 실험 Ⅳ. CZB와 CR_{1aa}배양액에 SIT첨가 효과

단순배양액인 CZB와 CR_{1aa}에 SIT을 첨가시 초기배 발생에 개선효과를 검토하기 위해 CZB, CR_{1aa} 배양액에 sodium selenite(5ng/mL), insulin(5㎍/mL) 그리고 transferrin(5㎍/mL : SIT)을 첨가하여 사용하기 12시간 전에 CO_2 배양기에 넣은 후 48시간에 난할율을 조사하고, 10일째에는 배반포 형성율을 조사하였다.

5) 실험 Ⅴ. CZB와 CR_{1aa}배양액에 SIT, amino acid 첨가 효과

단순배양액인 CZB와 CR_{1aa}에 animo acid, SIT와 혈청을 첨가시 초기배 발생의 개선효과를 검토하기 위해 CZB, CR_{1aa}배양액에 sodium selenite (5ng/mL), insulin(5㎍/mL) 그리고 transferrin (5㎍/mL : SIT)을 첨가하면, amino acid는 ME-M essential amino acid(20㎕/mL), MEM non-essential amino acid(10㎕/mL)을 사용하였으며 serum에서는 FCS 5, 15%, BSA 4mg/mL을 첨가하여 사용하기 12시간 전에 CO_2 incubator에 넣어 둔다. 48시간째에는 난할율을 조사하면, 10일째에는 배반포 형성율을 조사하여 CZB와 CR_{1aa}간에 비교 조사하였다.

결과 및 고찰

1. TCM과 CZB 배양액에서 배발생 비교

체외수정후 10일째까지 체외발생 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다.

난자는 총 756개를 사용하여 TCM에서 293개, CZB에서는 457개를 이용하였다. 48시간째 난할율은 66.6% vs 77.7%의 차이를 나타냈으며, 배반포 형성율에 밀접한 관계가 있는 3세포 이상 비율은 CZB에서 약간 높은 것으로 나타내고 있다. 10 일째 배반포 형성율은 CZB 배양액에서 배양한 배아가 TCM보다는 약 2배가 높은 14.1%의 결과를 가져왔으며, 이 실험에서 나타내고 있는 것와 마찬가지로 Kim 등(1990) 연구에서도 CZB배양액에서 배양한 것이 배반포 형성율에 높은 것으로 보고되고 있다.

2. 처녀발생 초기배의 TCM과 CZB배양액에서 배발생 비교

30시간 체외성숙한 난자를 10% ethanol에서 10분간 처리한 난자를 각 배양액에서 48시간째 난할율과 10일째까지 배반포형성율에 대한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같다.

난자 총 사용은 618개를 이용하여 TCM에서 298개, CZB에서는 320개를 사용하였다. 48시간째 난할율을 각각 보게 되면, Table 1에 나온 결과와 마찬가지로 39.6% vs 57.6%로 CZB배양액에서 배양난자가 높은 난할율을 보여주었고, 배반포 형성율에 밀접한 관계가 있는 3세포 이상의 비율은 30.5% vs 37.5%로 CZB배양액에서 배양한 것이 높은 결과를 보여 주었으며, 10일째 배반포 형성율은 CZB

Table 1. *In-vitro* production of cattle embryos by IVMFC[1]

Treatments[2]	No. of the oocytes used	No. of the oocytes cleaved at 48 hpi(%)	No. of embryos developed to the following stages			
			48 hpi[3](%)		240 hpi(%)	
			≥2-cell	≥3-cell	M-B[4]	Blastocyst
TCM	299	199(66.6)	117(58.8)	82(41.2)	47(23.6)	15(07.5)
CZB	457	355(77.7)	181(51.0)	174(49.0)	104(29.3)	50(14.1)

[1] Bovine oocytes were cultured for 24h, and coincubated with capacitated spermatozoa for 18h. The attached spermatozoa and cumulus cells were removed by sodium citrate solution.

[2] Either TCM and CZB contained 15% FCS+BOEC.

[3] hpi ; hour postinsemination.

[4] M-B ; morula and blastocyst.

Table 2. *In-vitro* production of parthenogenetic cattle embryos[1]

Treatments[2]	No. of the oocytes used	No. of the oocytes cleaved at 48 hpi(%)	No. of embryos developed to the following stages			
			48 hpi[3](%)		240 hpi(%)	
			≥2-cell	≥3-cell	M-B[4]	Blastocyst
TCM	298	118(39.6)	82(69.5)	36(30.5)	11(9.3)	1(0.9)
CZB	320	184(57.5)	115(62.5)	69(37.5)	15(8.2)	8(4.4)

[1] Bovine oocytes were cultured for 30h. The attached cumulus cells were removed by sodium citrate solution.

[2] Either TCM and CZB contained 15% FCS+BOEC.

[3] hpi ; hour postinsemination.

[4] M-B ; morula and blastocyst.

가 TCM보다 3.5%가 높은 4.4% 결과를 보여 주었다. Table 1, 2를 종합적으로 보게 되면 단순배양액이 난할율, 3세포 이상 비율 및 배반포 형성율에서 복합배양액보다 좋은 결과를 보여 주었으며, 단순배양액내에서도 가능성이 있는 것을 제시해 주었다.

3. CZB배양액에서 단시간 노출한 배아를 각 배양액에서 배발생 비교

실험에 사용한 난자는 786개를 이용하였는데 TCM처리구에서는 343개, CZB처리구에는 443개를 사용하였다.

수정후 28~30시간 동안 CZB배양액에서 노출시킨 후에 각 처리구인 TCM과 CZB에서 배양한 결과는 Table 1, 2에서 CZB배양액에서 배양한 것이 좋게 나왔으나, 이 실험에서는 TCM과 CZB 배양액에서 배양할 경우 배반포 형성율은 15.5%, 15.8%로 차이가 없는 것을 보아, 수정을 한 후에 단시간 동안 CZB배양액에 노출시키면, TCM에서도 CZB와 같은 배반포 형성율을 가져올 수 있다는 것을 제시해 주었다.

4. 각 단순배양액에 SIT 첨가시 배발생 비교 효과

단순배양액에 selenite insulin transferrin(SIT)을 첨가시 배반포 형성에 대한 비교효과에 대한 결과는 Table 4에 나타난 바와 같다. 본 실험은 단순배양액은 소에서 가장 많이 이용되고 있는 CR_{1aa} (First 등, 1991)와 생쥐 inbred계통에서 배양시 세포분열중지 현상을 극복하는 CZB 배양액(Chatot 등, 1989)을 기초로 배양액을 사용하였다. 실험에 사용한 총 난자는 474개를 이용하여, CZB처리구에서는 265개, CR_1에서는 209개를 사용하였다. CZB와 CR_1간의 전체 난할율은 69.1% vs 72.2%로 별 차이가 없으며, 배반포 형성율에 밀접한 관계가 있는 3세포 이상의 비율에서는 44.8% vs 39.1%로 차이가 없었다. 이때 CZB, CR_1의 각 처리구중 높은 난할율을 보여 주는 것은 CZB+BSA+BOEC-SIT-(73.9%), CR_1+5% FCS- BOEC-SIT(77.2%) 처리구가 가장 좋은 결과를 보여 주었다. 10일째까지 배양하여 생산된 배반포 결과를 보게 되면, CZB처리구에는 CZB+15%FCS+BOEC+SIT(5.6%)이며, CR_1처리구에서는 CR_1+5% FCS-BOEC+SIT

Table 3. Effects of TCM and CZB medium on the development of the cleaved cell embryos derived from *in vitro* fertilization into blastocyst

Treatments[1]	No. of the oocytes used	No of embryos developed to the following stages at 240 hpi[2](%)	
		Morula-Blastocyst	Blastocyst
TCM	343	102(29.7)	53(15.5)
CZB	443	146(32.9)	70(15.8)

[1] Either TCM and CZB contained 15% FCS+BOEC.

[2] hpi ; hour postinsemination.

Table 4. The effect of selenite insulin transferrin(SIT) in either CZB and CR_1 on development of bovine oocytes produced by IVMFC

Media		BOEC	SIT	No. of the oocytes used	No of embryos cleaved at 48h(%)	No. of embryos developed to following stages at 48 hpi[1](%) ≥2cell	≥3cell	240 hpi(%) M-B[2]	Blastocyst
CZB	15% FCS	+	−	57	38(66.7)	24(63.2)	14(36.8)	3 (7.9)	1 (2.6)
	15% FCS	+	+	52	36(69.2)	21(61.5)	15(39.5)	6(16.7)	2(5.6)
	5% FCS	+	+	58	39(67.2)	24(62.5)	15(38.5)	(12.8)	0(0.0)
	BSA	+	+	52	36(69.2)	16(44.4)	20(55.6)	4(11.1)	1(2.8)
CR_1	BSA	+	−	46	34(73.9)	16(47.1)	18(52.9)	5(14.7)	1(2.9)
	5% FCS	−	+	45	31(68.9)	16(51.7)	15(48.3)	5(16.1)	3(9.7)
	5% FCS	−	−	57	44(77.2)	28(63.6)	16(36.4)	2(4.6)	1(2.3)
	BSA	−	+	56	39(69.6)	22(56.4)	17(43.6)	2(5.1)	0(0.0)
	BSA	−	−	51	37(72.6)	26(70.3)	11(29.7)	2(5.4)	1(2.7)

[1] hpi : hour postinseminations.

[2] M-B : morula and blastocyst.

(9.7%)로 높은 결과를 보여 주었다. 이 결과로 볼 수 있는 것은 단순배양액내에서는 SIT효과는 뚜렷하지 않으나, CZB처리구에서는 15% FCS+SIT가 다른 처리구보다 높았으며, CR_1처리구 경우에는 공배양을 하지 않고 SIT첨가시 높은 결과를 나타내므로써 CR_1경우에는 공배양을 하지 않아도 배반포 형성을 가져오는 것을 제시해 주었다.

5. 단순배양액에 amino acid, SIT첨가시 배발달 비교 효과

본 실험은 단순배양액에 amino aicd, SIT첨가시 배발달에 대한 효과를 보기 위한 결과로서 Table 5에 나타난 바와 같다.

총난자는 268개를 이용하여 CZB처리구에는 168개, CR_1처리구에서는 100개를 사용하였다. 48시간째 난할율은 CZB처리구중 BSA+A.A+SIT(88.6%), CR_1처리구에서는 BSA+A.A+SIT(90.9%)의 결과를 보여주었으며, 전체적인 난할율 차이는

Table 5. The effects of amino acids and selenite-insulin-transferrin(SIT) and protein in either CZB and CR_1 on development of bovine oocytes produced by IVMFC

Media		BOEC	Amino acids	SIT	No. of the oocytes used	No of embryos cleaved at 48h(%)	No. of embryos developed to following stages at 48 hpi[1](%) ≥2cell	≥3cell	240 hpi(%) M-B[2]	Blastocyst
	15% FCS	+	−	−	37	31(83.8)	13(41.9)	18(58.1)	13(41.9)	7 (22.6)
	BSA	+	−	+	32	25(78.1)	14(56.0)	11(44.0)	2 (8.0)	0 (0.0)
CZB	15% FCS	+	+	+	36	27(75.0)	16(59.3)	11(40.7)	9(33.3)	3(11.1)
	BSA	+	+	+	35	31(88.6)	16(51.6)	15(48.4)	6(19.4)	2 (6.5)
	BSA	−	+	+	28	24(85.7)	10(41.7)	14(58.3)	1 (4.2)	0 (0.0)
	5% FCS	+	+	+	34	28(82.4)	14(50.0)	14(50.0)	12(42.9)	7(25.0)
CR_1	BSA	+	+	+	33	30(90.9)	12(40.0)	18(60.0)	9(27.3)	4(13.3)
	BSA	−	+	+	33	26(78.8)	17(66.7)	9(33.3)	0 (0.0)	0 (0.0)

[1] hpi : hour postinseminations.

[2] M-B : morula and blastocyst.

없었다. 배반포 형성율에 매우 밀접한 관계가 있는 3세포 이상의 비율을 보게 되면, CZB처리구에서는 BSA+A.A+SIT중 공배양을 하지 않은 처리구에서 58.3%을 가져왔으며, CR_1처리구에서는 BSA+A.A+SIT (60.0%)의 결과를 가져왔으며, 전체적인 3세포 이상의 비율은 그다지 차이가 없었다. 10일째까지의 배반포 형성율을 보게 되면, CZB처리구에는 control처리구(15% FCS-A.A-SIT)가 22.6% 결과를 가져왔으며, CR_1처리구에서는 5% FCS+A.A+SIT(25.0%) 결과를 보여 주었다. 이 결과를 알 수 있는 것은 단순배양액에 첨가되는 혈청 종류 중에서 BSA보다는 FCS를 첨가한 처리구에서 배반포형성율이 높았으며, amino acid첨가 실험에서는 초기배 발생효과를 보여주지 못하였다.

적 요

본 실험은 목적은 TCM과 CZB간 체외발생능력을 비교하는데 있으며, CZB와 CR_1에 SIT, amino acid을 첨가시 배발생 비교효과를 조사하였으며, 궁극적으로 단순배양액의 이용 가능성에 대해서 조사한 결과 채외수정 및 처녀발생 배반포 형성은 단순배양액 CZB에서 배양이 가능하며 TCM보다 높았다. 한편 난할된 초기배의 배양은 수정후 단시간 CZB에 28~30시간 동안 노출후 TCM에서 배양할 경우에도 CZB와 같은 효과를 보여 단순배양액 내에서의 노출은 단시간인 경우에도 초기배 발생에 개선된 효과를 주었다. 개선효과가 있다고 알려진 단순배양액에 SIT첨가는 뚜렷하지 않았으나, CR_1+15% FCS+SIT에서 9.7%의 가장 높은 초기배 발생율을 보여주었다. 이와 더불어 amino aicd 첨가 실험에서는 초기배 발생의 개선효과를 보여 주지 못하였다. 결론적으로 무혈청 단순배양액 또는 복합배양액 내에서의 소 초기배 발생보다는 난관상피세포와의 공배양에 의한 CZB 배양액과 또는 CR_1+SIT는 현단계에서 이용될 수 있지만 전적으로 무혈청의 공배양을 이용하지 않는 배양체계의 확립은 보다 세밀한 연구를 요한다.

참고문헌

Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL and Torres I. 1989. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. J. Reprod. Fertil., 86, 679-688.

Ellington JE, Farrell PB, Foote RH. 1990. Comparision of six-day bovine embryo development in uterine tube(oviduct) epithelial cell co-culture versus *in vivo* development in the cow. Theriogenology, 34, 837-844.

Ellington JE, Farrell PB, Simkin ME, Foote RH, Goldman EE and McGrath AB. 1990. Development and survial after transfer of cow embryos cultured from 1~2 cells to morulae or blastocysts in rabbit oviducts or in a simple medium with bovine oviduct epithelial cells. J. Reprod. Fertil., 89, 293-299.

Eyestone WH, Vignierri J. and First NL. 1987. Co-culture of early bovine embryos with oviductal epithelium. Theriogenology, 27, 228(Abstr.).

Florence LHN, Liu DY and Baker HWG. 1992. Comparision of percoll, mini-percoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen sample. Human Reprod., 7, 261-266.

Kim CI, Ellington JE and Foote RH. 1990 Maturation, fertilization and development of bovine oocytes *in vitro* using TCM199 and a simple defined medium with co-culture. Theriogenology, 33, 433-440.

Lee SH, Ko TH, Monaghan P, Lonergan P, Gallagher M and Gordon I. 1992. Successful *in vitro* development of ethanol-activated bovine oocyte to the blastocyst stage following *in vitro* maturation. J. Reprod. Fert. Abstr. Ser., 9, 56. (Abstr).

Rosenkrans CF and First NL. 1991. Culture of

bovine zygotes to the blastocyst stage : Effects of amino acids and vitamins. Theriogenology, 35, 266(Abstr.).

Yoo HJ, Choi SC and Lee SH. 1993. Maximization of the number of follicularoocytes recovered from the bovine ovaries. Korean J. Anim. Reprod., 17, 149-157.