韓國受精卵移植學會誌(1996) 第 11 卷 第 3 號
Korean J. Emb. Trans. (1996) Vol. 11, No. 3 pp. 259~269

Ca^{2+} 농도가 체외성숙 유래 한우 난자의 전기적 활성화에 미치는 영향

송길영 · 이은송* · 이병천 · 황우석
서울대학교 수의과대학

Effect of Ca^{2+} Concentration on Electric Activation of *In Vitro* Matured Oocytes of Korean Native Cattle

K. Y. Song, E. S. Lee*, B. C. Lee and W. S. Hwang
Department of Theriogenology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University

SUMMARY

The present study was undertaken to examine the critical effect of Ca^{2+} concentration on electrostimulation and post-electrostimulation media for electric activation of *in vitro* matured oocytes of Korean Native Cattle.

Oocytes collected from slaughterhouse ovaries were matured in TCM 199 containing FSH, estradiol-17β and FBS with granulosa cell monolayer for 24 hours and denuded with hyaluronidase. And then cumulus-free oocytes were submitted to a DC field of 1.0 kV/cm for 60 μsec in electroporation media(0.28 M mannitol and PBS) with different Ca^{2+} concentations (0.00, 0.05, 0.10 and 0.15 mM). Stimulated oocytes were stained and examined for pronuclear formation after incubation in SOF for 12 hours.

The rates of pronuclear formation in bovine oocytes electrically stimulated in 0.28 M mannitol with 0.05, 0.10 and 0.15 mM Ca^{2+}(60.3, 82.2 and 75.0%) were significantly higher than without Ca^{2+}(6.3%) at 12 hours after an electric pulse($p<0.005$). The activation rates of Korean Native Cattle oocytes stimulated in PBS supplemented with 0.05, 0.10 and 0.15 mM Ca^{2+}(71.0, 75.8 and 75.4%) were significantly higher than without Ca^{2+}(23.5%) after post-stimulation incubation($p<0.005$). After incubation of oocytes in SOF with and without Ca^{2+} following electric stimulation in 0.28 M mannitol with 0.10 mM Ca^{2+}, the rates of pronuclear formation of bovine oocytes in Ca^{2+}-free SOF(85.7%) was significantly higher than in SOF with 1.71 mM Ca^{2+}(62.5%, $p<0.05$). When oocytes were stimulated in two electrostimulation media supplemented with Ca^{2+} and incubated in Ca^{2+}-free SOF, there were no significant differences in the rates of pronuclear formation between 0.28 M mannitol and PBS.

These results indicate that a single electric pulse could induce activation of Korea Native Cattle oocytes in 0.28 M mannitol and PBS supplemented with Ca^{2+}. Furthermore,

* Lab. of Animal Genetics and Reproduction, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Japan (日本 帶廣畜産大學 家畜育種增殖學講座)

to improve the activation rates, it was better that stimulated oocytes were incubated in Ca^{2+}-free SOF after electric stimulation than in SOF with Ca^{2+}.

(Key words : oocyte activation, electric pulse, Ca^{2+}, Korean Native Cattle)

서 론

각종 동물에서 핵이식에 의한 수정란의 클론화 및 산자생산이 보고된 이래(마우스: McGrath와 Solter, 1983; 토끼: Stice와 Robl, 1988; 돼지: Prather 등, 1989; 면양: Willadsen, 1986; 소: Prather 등, 1987), 소 핵이식 수정란의 생산효율 및 발육능을 증진시키기 위하여 핵이식 기법의 각 단계들을 검토해 왔다(Barnes 등, 1993; Stice 등, 1993; Powell과 Barnes, 1992; Robl과 Stice, 1989). 특히 수핵난자의 활성화는 핵이식 수정란의 융합, 분할 및 후기배로의 발육에 중요한 요인으로 인정되고 있다(Mitani 등, 1993; Yang 등, 1993; Prather 등, 1987).

체외성숙 난자는 성숙이 완료된 시점에도 제 2차 감수분열 중기에서 발육이 정지되어 있어 정자침투나 인위적 자극을 통해 활성화되어야 수핵난자로 이용될 수 있다(Yang 등, 1994; Ayoub과 Hunter, 1993). 인위적인 난자 활성화 유도에는 hyaluronidase(O'neill과 Kaufman, 1989), Ca-ionophore (Aoyagi 등, 1992; Ware 등, 1989), ethanol(Ushijima와 Eto, 1994; Minamihashi 등, 1993), cycloheximide(Presicce와 Yang, 1994b) 등의 처리 및 삼투압조절(Rickords와 White, 1992)과 같은 화학적 방법 그리고 미세조작(Reimann과 Miller, 1939), 온도변화(Stice 등, 1994; Powell과 Barnes, 1992), 전기자극(Vitullo와 Ozil, 1992; Collas 등, 1989; Onodera와 Tsunoda, 1989) 등과 같은 물리적 방법을 적용해 왔다.

난자의 활성화에 주로 이용되어 온 ethanol이나 Ca-ionophore 처리법은 높은 활성화율을 얻을 수 있으나(Aoyagi와 Konishi, 1994; Mitani 등, 1993) 세포내 Ca^{2+} 농도를 수회 증가시킬 수 없다는 단점을 지닌다(Vitullo와 Ozil, 1992; Cuthbertson 등, 1981). 반면, 전기자극법은 난자의 성숙도(Ware 등, 1989), 전류의 종류(Ozil, 1990), 전압강도(Onodera와 Tsunoda, 1989), 통전시간(Aoyagi와 Konishi, 1994), 통전횟수(Collas 등, 1989) 및 통전배지의 종류(Robl 등, 1987) 등의 영향요인에 따라 세포내 Ca^{2+} 농도 조절이 가능해지므로 난자 활성화율을 향상시킬 수 있다. 또한 전기자극법은 핵-세포질의 융합에 있어 처리가 간편하고 반복재현성이 높으며 타기법에 비해 효율적이기 때문에 핵이식 기법에 많이 응용되어 왔다(Collas 등, 1989; Willadsen, 1986; Kubiak과 Tarkowski, 1985).

배지내의 Ca^{2+}이 난자 활성화에 미치는 영향에 대해, Whittingham과 Siracusa(1978)는 마우스 난자를 Ca^{2+} 비첨가 배지에 노출시켰을 때 제 2차 감수분열이 재개되었다고 하였고, Meyerhof와 Masui(1977)는 배지내 Ca^{2+}이 세포내로 유입되어 난자의 활성화를 유도한다고 하였다. 이에 반해, Robl 등(1992)은 배지내 Ca^{2+} 농도가 난자 활성화에 유효한 영향이 없다고 하였고, Vitullo와 Ozil(1992)은 마우스에서 반복적 전기자극시 일정수준 이상의 배지내 Ca^{2+} 농도는 오히려 유해하다고 하였다.

이상과 같이 전기자극법을 통한 난자의 활성화 유도에 있어 전압의 강도, 통전시간 및 통전횟수 등에 따른 영향에 관해서는 보문이 있으나, 소에서의 배지내 Ca^{2+} 농도의 영향, 특히 한우 난자를 이용한 보문은 접할 수 없었다.

이에 본 연구자는 체외성숙 유래 한우 난자의 전기적 활성화 유도에 적절한 배지내 Ca^{2+} 농도를 확립하고자, 전기자극 배지의 종류를 달리하여 다양한 Ca^{2+} 농도에서 통전한 후 Ca^{2+} 첨가 및 비첨가 배지에서 배양함으로써 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 난 소

도축된 한우 암소로부터 외관상 병변이 없는 난소만을 채취하여 표면에 부착되어 있는 혈액 및 지방조직을 제거한 후 100 IU/ml penicillin G(Sigma Chemical Co., USA)와 100 μg/ml streptomycin(Sigma Chemical Co., USA)을 첨가하고 37℃로 보온한 생리식염수에 보존하였다. 채취한

난소는 2시간 이내에 실험실로 운반하여 생리식염수로 수회 세정한 후 가온수조에 정치하였다.

2. 체외성숙

1) 성숙배양액

배양액은 Tissue Culture Medium 199(Life Technologies Inc., USA; 이하 TCM 199)을 기본으로, 여기에 미성숙난자의 채취 및 세정용에는 0.4% bovine serum albumin(Sigma Chemical Co., USA; 이하 BSA), 2 mM $NaHCO_3$(Sigma Chemical Co., USA) 및 10 mM HEPES(Sigma Chemical Co., USA)를, 성숙배양용에는 10%의 비동화한(56℃, 30분) fetal bovine serum(Life Technologies Inc., USA; 이하 FBS), 25 mM $NaHCO_3$, 2.5 μg/ml FSH(U.S. Department of Agriculture, USA) 및 1 μg/ml estradiol-17β(Sigma Chemical Co., USA)를 첨가하였다. 성숙배양에는 4-well dish(Nunclon, USA)를 사용하였으며 배양개시 전 각 well에 성숙배양용 TCM 199 0.5 ml를 넣어 39℃, 5% CO_2, 공기 및 습도가 포화상태인 배양기 내에 정치시켰다.

2) 과립막세포

실험에 사용한 과립막세포의 준비는 Moor와 Trounson(1977)의 방법에 준하였다. 즉, 난소로부터 직경 10~15 mm의 혈관이 잘 분포되고 탄력성이 있는 난포를 적출하여 주위 결제직을 제거한 후 난포막을 파열, 내강을 노출시켜 세정용 TCM 199 내에서 핀셋으로 과립막세포를 박리하고 큰 조직편을 제거하였다. 채취한 과립막세포는 세정용 TCM 199으로 2회 원심(500×g, 5분) 세정한 후 50×10^6개/ml의 세포부유액을 만들어 성숙배양시 최종농도가 2×10^6개/ml가 되도록 0.5 ml의 성숙배양액 내에 첨가하였다.

3) 미성숙난자

세정용 TCM 199을 2 ml 흡입하여 5 ml 주사기의 내강을 세정한 다음 18 gauge 주사침을 부착하여 직경 3~8 mm 소난포로부터 난포액과 함께 미성숙난자를 흡인, 채취하였다. 난자를 포함하고 있는 난포액을 60 mm petridish(Costar, USA)에서 5분간 정치시킨 후 상층액을 제거하고 실체현미경(Wild M8, Germany, ×50) 하에서 de Loos 등(1989)의 기준에 준하여 다층의 치밀한 난구세포가 부착되어 있고 세포질이 균질한 난자를 선별하여 실험에 공여하였다.

4) 성숙배양

선별된 미성숙난자는 세정용 TCM 199으로 3회, 성숙배양용 TCM 199으로 1회 세정하여 과립막세포가 첨가된 4-well dish에 각 well당 10~15개씩 넣어 39℃, 5% CO_2, 공기 및 습도가 포화상태인 배양기 내에서 24시간동안 성숙배양하였다.

3. 난자의 전기적 활성화

1) 배양액

난자의 전기적 활성화에는 비전해질 배지인 0.28 M mannitol(Sigma Chemical Co., USA) 및 전해질 배지인 phosphate buffered saline(Life Technologies Inc., USA; 이하 PBS)에 0.05% BSA와 0.10 mM $MgSO_4$(Sigma Chemical Co., USA)를 첨가하고 $CaCl_2$(Sigma Chemical Co., USA)를 첨가하지 않거나 0.05, 0.10 및 0.15 mM의 농도로 첨가하였으며 pH 7.0~7.3으로 적정하여 이용하였다. 삼투압 충격을 감소시키기 위하여, 10%의 FBS가 첨가되고 Ca^{2+} 및 Mg^{2+}은 첨가되지 않은 PBS(이하 PBS(−))와 활성화용 배지의 1:1 혼합액 및 활성화용 배지로 60 mm petridish에 각각 20 μl 미소적을 만들고 mineral oil(Sigma Chemical Co., USA)을 도포하였다. 전기자극후 배지는 0.8% BSA가 첨가된 synthetic oviductal fluid(Tervit 등, 1972; 이하 SOF) 배지에 Ca^{2+}을 1.71 mM의 농도로 첨가하거나 첨가하지 않고 사용하였다.

모든 배양액은 0.22 μm의 1회용 filter(Acrodisc^R, Gelman Sciences, USA)로 여과멸균하였으며, SOF는 39℃, 5% CO_2, 공기 및 습도가 포화상태인 배양기 내에서 8~18시간동안 가스평형한 후 사용하였다. 각 실험에 따라 전기자극을 위하여 Ca^{2+} 첨가 또는 비첨가 0.28 M mannitol 또는 PBS 배지로 60 mm petridish에 미소적을 만들고 min-

eral oil을 도포하였으며, 전기자극후 배양을 위하여 Ca^{2+} 첨가 및 비첨가 SOF 배지로 35 mm petridish에 미소적을 만들었다.

2) 난자의 준비

난자는 체외성숙 24시간후에 0.5% hyaluronidase(Sigma Chemical Co., USA)가 첨가된 PBS(−)를 2 ml 분주한 35 mm petridish(Costar, USA)에서 mouth pipetting을 하여 난구세포를 완전히 벗겨내었고, 실체현미경하에서 검경하여 제 1 극체가 보이는 것만을 선별한 후 PBS(−) 미소적내에서 수회 세정하였다. 선별된 난자는 삼투압평형을 위한 미소적내에서 각각 5분씩 평형시킨 후 Ca^{2+} 농도별로 작성된 전기자극용 미소적에 옮겨 differential interference contrast(DIC)가 장착된 도립현미경(×250, Leitz, Germany) 하에서, 전기세포융합기(Eyela, Japan)에 연결된 전극을 이용하여 1.0 kV/cm, 60 μsec의 직류전기(direct current, 이하 DC로 약함)로 1회 전기자극하였다. 자극이 완료된 난자는 PBS(−) 미소적내에서 1회 세정하고 Ca^{2+} 비첨가 SOF 배지로 만든 미소적에 옮겨 3회 세정하였다.

3) 전기자극후의 배양

전기자극이 완료된 난자는 Ca^{2+} 비첨가 SOF 미소적에 옮겨 5% CO_2 배양기에서 12시간동안 배양하였으며, 전기자극후 배양시의 Ca^{2+} 농도 영향을 조사하는 실험에서는 Ca^{2+} 첨가 및 비첨가 SOF 군으로 나누어 배양하였다. 난자는 Chandley(1987)의 방법에 준해 basic fuchsin을 이용한 급속염색을 하였으며, 도립현미경하에서 검경하여 Mitani 등(1993)의 기준에 따라 전핵이 형성된 것만 활성화된 것으로 평가하였다.

4. 통계학적 분석

각 실험에서 Ca^{2+} 첨가군과 비첨가군의 결과치는 Chi-square test로 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 한우 난자의 전기적 활성화시 Ca^{2+} 농도의 영향

Table 1. Effect of Ca^{2+} concentration on 0.28 M mannitol for the electric activation of *in vitro* matured oocytes of Korean Native Cattle

Ca^{2+} concentration (mM)	No. of oocytes used[a]	No. of oocytes arrested	No.(%) of activated oocytes with[b]		
			1-PN	2-PN	Total
0.00	80	75	4(5.0)	1(1.3)	5(6.3)[c]
0.05	78	31	36(46.2)	11(14.1)	47(60.3)[d]
0.10	79	14	40(50.6)	25(31.6)	65(82.2)[d]
0.15	76	19	43(56.6)	14(18.4)	57(75.0)[d]

[a] A single pulse of DC 1.0 kV/cm for 60 μsec was applied.

[b] 1-PN: one pronucleus, 2-PN: two pronuclei.

[cd] Different superscripts were significantly different($p<0.005$).

1) Mannitol(0.28M)

한우 난자의 체외성숙 24시간후에 비전해질 통전배지인 0.28 M mannitol에 0.05%의 BSA 및 0.10 mM의 $MgSO_4$를 첨가하고 $CaCl_2$를 첨가하지 않거나 또는 0.05, 0.10 및 0.15 mM의 농도로 첨가하여 1.0 kV/cm, 60 μsec의 DC로 1회 전기자극한 후 Ca^{2+} 비첨가 SOF에서 12시간동안 배양함으로써 난자의 활성화를 유도한 실험결과는 Table 1과 같다.

즉, 난자 활성화의 지표가 될 수 있는 전핵형성률

Table 2. Effect of Ca^{2+} concentration on phosphate buffered saline for the electric activation of *in vitro* matured oocytes of Korean Native Cattle

Ca^{2+} concentration (mM)	No. of oocytes used[a]	No. of oocytes arrested	No.(%) of activated oocytes with[b]		
			1-PN	2-PN	Total
0.00	64	49	14(21.9)	1(2.6)	15(23.5)[c]
0.05	62	18	31(50.0)	13(21.0)	44(71.0)[d]
0.10	66	16	37(56.1)	13(19.7)	50(75.8)[d]
0.15	69	17	38(55.1)	14(20.3)	52(75.4)[d]

[a] A single pulse of DC 1.0 kV/cm for 60 μsec was applied.

[b] 1-PN: one pronucleus, 2-PN: two pronuclei.

[cd] Different superscripts were significantly different($p<0.005$).

은 Ca^{2+}이 첨가되지 않은 군에서는 6.3%, 농도가 0.05, 0.10 및 0.5 mM인 군에서는 각각 60.0, 82.6 및 75.0%로 나타나 Ca^{2+} 첨가군이 비첨가군에 비해 유의적으로 높은 난자 활성화율을 나타내었다($p<0.005$).

2) PBS

체외성숙 유래 한우 난자를 비전해질 배지인 PBS에 0.05% BSA 및 0.10 mM $MgSO_4$을 첨가하고 $CaCl_2$을 첨가하지 않거나 0.05, 0.10 및 0.15 mM의 농도로 첨가하여 1.0 kV/cm, 60 μsec의 DC로 1회 전기자극한 후, Ca^{2+} 비첨가 SOF 배지에서 12시간동안 배양하여 난자 활성화를 검사한 결과는 Table 2와 같다.

즉, PBS내에 Ca^{2+}이 첨가되지 않은 군에서는 23.8%, 0.05, 0.10 및 0.15 mM의 농도로 첨가된 군에서는 각각 71.0, 75.8 및 75.4%의 난자가 전핵을 형성하여 Ca^{2+} 첨가군이 비첨가군에 비해 유의적으로 높은 난자 활성화율을 나타내었다 ($p<0.005$).

2. 한우 난자의 전기자극후 Ca^{2+} 농도가 활성화에 미치는 영향

한우 난자를 체외성숙 24시간후에 0.05% BSA, 0.10 mM $MgSO_4$ 및 0.10 mM $CaCl_2$가 첨가된 0.28 M mannitol에서 1.0 kV/cm, 60 μsec의 DC로 1회 전기자극하고 Ca^{2+}을 첨가하지 않거나 1.71 mM의 농도로 첨가한 SOF 미소적에서 배양하여 활성화를 유도한 결과는 Table 3과 같다.

Table 3. Effect of Ca^{2+} concentration on synthetic oviduct fluid for the activation of *in vitro* matured oocytes of Korean Native Cattle

Ca^{2+} concentration (mM)	No. of oocytes used[a]	No. of oocytes arrested	No.(%) of activated oocytes with[b]		
			1-PN	2-PN	Total
1.71	72	27	28(38.9)	17(23.6)	45(62.5)[c]
0.00	70	10	50(71.4)	10(14.3)	60(85.7)[d]

[a] A single pulse of DC 1.0 kV/cm for 60 μsec was applied.

[b] 1-PN: one pronucleus, 2-PN: two pronuclei.

[cd] Different superscripts were significantly different ($p<0.005$).

추가배양한 난자를 염색한 결과, Ca^{2+}을 1.71 mM의 농도로 첨가한 군에서는 62.5%, 첨가하지 않은 군에서는 85.7%의 난자가 전핵을 형성하여 Ca^{2+} 비첨가군이 첨가군에 비해 유의적으로 높은 활성화율을 나타내었다($p<0.05$).

고 찰

성숙난자는 세포내에서 합성되는 cytostatic factor(이하 CSF)와 maturation promoting factor(이하 MPF)에 의해 제 2차 감수분열 중기에서 발육이 정지되어 있으며, 정자가 침투하거나 인위적 자극이 가해지면 세포내 유리 Ca^{2+} 농도가 증가하여 CSF 및 MPF가 불활화됨으로써 난자의 활성화가 유도되고 수정 및 이후단계로의 난 발육이 가능해지는 것으로 알려져 있다(Yang 등, 1994; Meyerhof와 Masui, 1977). 활성화된 난자는 처녀발생을 통하여 후기배로의 발육 및 수태에까지 이어질 수 있고(Ozil, 1990), 또한 핵이식 기법의 수핵난자로 이용되어 핵이식란의 발육능을 높이는 데 중요한 역할을 하게 된다.

인위적 자극에 의한 소 난자의 활성화율은 난자의 aging에 좌우된다고 하며(Presicce와 Yang, 1994a; Ware 등, 1989), Barnes 등(1993)은 체외성숙 26~32시간의 난자에서 활성화가 잘 유도된다고 하였다. 그러나 본 실험에서는, 소 난자가 체외성숙 18시간후부터 제 2차 감수분열 중기에 도달한다는 Sirard 등(1989)의 관찰과 체외성숙 22~24시간째의 수핵난자에서 탈핵률이 유의적으로 높았다는 Takano 등(1993)의 보고를 기반으로 핵이식에 유용한 난자 활성화 조건을 찾고자 하였다.

체외성숙 24시간후의 한우 난자를 전기자극한 결과 최고 85.7%(0.10 mM의 Ca^{2+}이 첨가된 0.28 M mannitol)의 난자 활성화율이 나타났는데, 이는 성숙배양 24시간후의 난자는 전기자극후 30% 미만이, 32시간후의 난자는 80% 이상이 활성화되었다고 한 First 등(1992)의 연구와는 상이한 결과이었다. 이러한 차이는 전압의 강도 및 통전시간 등 자극조건의 상이에서 기인되는 것이 아닌가 추측된다.

난자의 활성화를 유도할 수 있는 인위적 수단인

전기자극법은 Signoret과 Jaguier(1962)가 양서류에서 제시한 이래, 마우스(Tarkowski 등, 1970), 햄스터(Kaufman 등, 1975), 토끼(Fissore와 Robl, 1992; Ozil, 1990), 돼지(Procházka 등, 1992; Collas 등, 1989) 및 소(Collas 등, 1993; Ware 등, 1989) 등에서 연구가 이루어져 왔으며, 이러한 전기자극법을 통한 난자의 활성화 유도에 있어서는 전기자극배지가 중요한 영향을 미칠 수 있는 것으로 알려져 있다(Onodera와 Tsunoda, 1989). 본 실험에서는 체외성숙된 한우 난자를 비전해질 배지인 0.28 M mannitol과 전해질 배지인 PBS내에서 전기자극한 결과, 각각 55.6%(174/313)와 62.3%(149/239)의 난자가 전핵을 형성하여 배지의 종류에 따른 차이는 인정되지 않았으며, 이런 성적은 Rickords와 White(1992)가 0.3 M mannitol 및 PBS 배지에서 마우스 난자를 전기자극하여 얻은 42.8 및 54.8%의 활성화율과 유사한 수준이었다. 이러한 결과로 보아 한우 난자의 전기적 활성화 유도에는 mannitol과 PBS 배지가 모두 유용한 것으로 사료된다.

또한 세포융합에서도 전기자극배지의 종류가 중요하게 관여되어, Kubiak과 Tarkowski(1985)가 마우스에서 PBS와 0.3 M mannitol을 비교하였을 때 세포융합률에는 유의적인 차이가 없었다고 한 반면, Robl 등(1987)은 소에서 비전해질 배지인 Zimmermann Cell Fusion medium이 전해질 배지인 TL-HEPES보다 더 높은 융합률을 나타내었다고 하였다. 이러한 상이한 결과에 대해, Zimmermann과 Vienken(1982)은 배지내의 전해질이 융합과정을 방해하고 발열이라는 문제를 초래한다고 하였으며, Robl 등(1992)은 전도율이 낮은 당류 배지가 이러한 발열을 감소시킬 수 있다고 하였다.

전기자극법의 적용시 높은 난자 활성화율과 후기배 발육률을 얻는 데에는 배지의 종류뿐만 아니라 Ca^{2+} 농도가 중요하게 작용한다고 한 바(Collas 등, 1992; Collas와 Robl, 1991), 본 실험의 결과, 0.28 M mannitol과 PBS 배지 모두에서 Ca^{2+} 농도가 증가함에 따라 난자 활성화율이 증가하여 0.10 mM에서 가장 높았으며, 0.15 mM인 군에서는 오히려 낮아졌다. 이와 유사하게, Vitullo와 Ozil(1992)은 마우스 난자의 반복적 자극에 인한 활성화 유도시 배지내 Ca^{2+} 농도를 증가시킬수록 전핵형성률이 높아지다가 16 μM 이상에서는 오히려 낮아졌다고 하였고, Fissore와 Robl(1992)은 토끼 난자에서 Ca^{2+} 비첨가군에서는 세포내 Ca^{2+} 농도의 변화가 없었고 배지내 100 μM일 때 가장 높았으며 이보다 낮거나 높은 농도에서는 유의적으로 낮아졌다고 하여 본 실험결과에 일치되는 경향이었다. 그러나, Rickords와 White(1992)은 Ca^{2+} 비첨가군이나 농도가 0.05 mM인 군에 비해 0.9 mM인 군에서 활성화가 더 잘 이루어졌다고 하여 상이한 결과를 보고하였다.

전기자극배지내 Ca^{2+} 첨가의 필요성에 대해, Collas 등(1993)은 배지에 Ca^{2+}이 첨가되지 않아도 전기자극한 소 난자의 15%가 전핵을 형성하고 Ca^{2+} 농도가 높아지면 전핵형성률도 상승한다고 하였으며, Rickords와 White(1992)는 Ca^{2+}이 첨가되지 않은 0.3 M mannitol과 PBS에서 각각 28.2 및 35.6%의 전핵형성률을 제시하였다.

본 실험에서도 한우 체외성숙난자의 전기자극시 Ca^{2+}이 첨가되지 않은 0.28 M mannitol 및 PBS 배지에서 각각 6.3% 및 23.5%의 난자 활성화율을 얻었으며, 이때 PBS가 0.28 M mannitol에 비해 높은 결과를 나타낸 것은 PBS내에 존재하는 다른 양이온에 기인된 것이 아닌가 추정된다. 그러나 Ozil(1990) 및 Whittingham과 Siracusa(1978)가 전기자극배지내 Ca^{2+} 대신 Sr^{2+}, Ba^{2+}, Mn^{2+} 등의 2가 양이온을 첨가하면 세포내에 결합되어 있는 Ca^{2+}을 치환시켜 난자 활성화를 유도할 수 있다고 한 반면, PBS내에는 K^{+}이나 Na^{+}과 같은 1가 양이온이 들어있으므로 동일한 기전에 의한 결과라고 볼 수는 없다.

전기자극에 의한 난자의 활성화 유도는 원형질막에 생긴 pore를 통한 외부 Ca^{2+}의 세포내 유입에 기인되는 것으로 설명되고 있다(Chang 등, 1992). 이러한 pore 형성기전에 대해, Benz와 Zimmermann(1981)은 세포를 높은 전압에 짧은 시간동안 노출시키면 원형질막의 일부가 일시적인 막전위의 변화로 불안정해져 파손되었다가 시간이 지나면 다시 회복된다고 하였으며, Chang(1989)은 세포막의 국소부위가 비가역적으로 파손되어도 세포내의 cytoskeletal protein network에 의해 세포막이 유지될 수 있다고 하였다.

세포내로의 Ca^{2+} 유입에 대한 명확한 기전은 아

직 확립되지 않았으나, 일정기간동안 열려 있는 pore로 인해 세포막 투과성이 증가하고 농도차에 의해 배지내 Ca^{2+}이 세포내로 확산된다는 주장(Zimmermann과 Vienken, 1982)이 지배적이다. 이외, 세포막 투과성의 증가로 세포내 유리 Ca^{2+} 균형에 일시적인 변화가 일어나 Ca^{2+}이 세포내 저장고로부터 방출된다는 학설(Whittingham, 1980), 전압으로 조절되는 channel을 통해 Ca^{2+}이 세포내로 유입된다는 주장(Fasolato 등, 1990; Holliday와 Spitzer, 1990) 및 세포막의 파손이 인지질 대사물의 생성을 자극하여 세포내 Ca^{2+}의 방출을 유도한다는 학설도 있다(Berridge와 Irvine, 1989; Collas 등, 1989).

일반적으로 난자의 세포내 Ca^{2+} 농도는 1~2 mM로서 10^{-4} mM 정도만 유리상태로 존재하고 대부분은 단백질과 같은 세포내 저장고에 결합되어 있으며(Alberts 등, 1989), 세포의 체외배양에 있어 배지내 Ca^{2+}은 삼투압을 조정하고 세포의 응집성과 부착성을 높여 주며 세포막전위를 조절하는 기능이 있다고 한다(Freshney, 1994).

본 실험에서 이러한 Ca^{2+}이 전기자극후 배양시 난자의 전핵형성 및 활성화에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 전기자극한 한우 난자를 Ca^{2+}을 첨가하지 않거나 1.71 mM의 농도로 첨가한 SOF 미소적에서 12시간 배양한 결과, 오히려 Ca^{2+} 첨가군(62.5%)이 비첨가군(85.7%)에 비해 활성화율이 더 낮게 나타내었다. 이로써 전기자극후 배양에 있어서 배지에 Ca^{2+}을 첨가하지 않는 것이 난자의 활성화 유도에 효과적임을 알 수 있었으며, 이러한 결과는 전기자극에 의해 형성된 pore가 일정기간이 지나면 다시 회복된다는 가역적 파손설을 뒷받침하는 근거가 될 수 있다고 생각된다. 그러나, 전기자극후 배양에서 Ca^{2+}이 미치는 영향에 대한 보분은 접할 수가 없어 명확한 기전을 설명할 수 없었기에 이에 관한 심도깊은 추가연구가 필요하다고 사료된다.

본 실험에서 체외성숙 유래 한우 난자를 1회 전기자극하여 활성화를 유도함으로써, 전기자극법이 수핵난자 처리법으로 유용할 수 있음을 증명하였고, 전기자극배지로는 0.28 M mannitol과 PBS가 모두 유용하며 자극후 SOF에서의 배양에는 Ca^{2+}을 첨가하지 않는 것이 효과적임도 알 수 있었다. 또한 배지의 종류 및 Ca^{2+}의 영향에 관해서만 조사하였으나, 한우에서의 핵이식에 있어 전기자극법을 수핵난자의 활성화 유도에 적용하기 위해서는 이미 다른 보문에서 검토된 바 있는 난자의 성숙도, 전압강도 및 통전시간 등과 이외 전류의 종류 및 통전횟수 등의 다른 요인들에 대한 연구를 보다 많이 진전시켜야 할 것으로 여겨진다.

적 요

핵이식시 수핵난자로서의 체외성숙 유래 한우 난자의 활성화 유도에 있어 배지의 종류 및 Ca^{2+}농도의 영향을 구명하기 위하여 Ca^{2+} 첨가 및 비첨가 0.28 M mannitol과 PBS 배지에서의 전기자극 그리고 SOF를 이용한 자극후 배양을 통해 얻은 연구결과는 아래와 같다.

1. 체외성숙 유래 한우 난자를 0.05% BSA 및 0.10 mM $MgSO_4$가 첨가된 0.28 M mannitol에서 전기자극하였을 경우, $CaCl_2$이 각각 0.05, 0.10 및 0.15 mM의 농도로 첨가된 군(60.3, 82.2 및 75.0%)이 첨가되지 않은 군(6.3%)에 비해 유의적으로 높은 활성화율을 나타내었다 ($p<0.005$).
2. 체외성숙 24시간후의 한우 난자를 0.05% BSA 및 0.10 mM $MgSO_4$가 첨가된 PBS에서 전기자극하였을 경우, $CaCl_2$을 각각 0.05, 0.10 및 0.15 mM의 농도로 첨가한 군(71.0, 75.8 및 75.4%)이 첨가하지 않은 군(23.5%)에 비해 유의적으로 높은 난자 활성화율을 나타내었다 ($p<0.005$).
3. 체외성숙 유래 한우 난자를 0.05% BSA, 0.10 mM $MgSO_4$ 및 0.10 mM $CaCl_2$가 첨가된 0.28 M mannitol에서 전기자극한 후 Ca^{2+} 농도를 달리한 SOF에서 배양하였을 경우, Ca^{2+} 비첨가군(85.7%)이 첨가군(62.5%)에 비해 유의적으로 높은 활성화율을 나타내었다($p<0.05$).
4. 체외성숙 24시간후 한우 난자의 전기자극시, 비전해질 배지인 0.28 M mannitol과 전해질 배지인 PBS에 따른 난자 활성화율의 유의차는 인정되지 않았다.

5. 이상의 결과로 미루어, 체외성숙 24시간후 한우 난자는 Ca^{2+}이 첨가된 0.28 M mannitol 또는 PBS 배지에서 1회 전기자극을 통한 난자 활성화가 이루어질 수 있고, 전기자극후 배양시에는 SOF내에 Ca^{2+}을 첨가하지 않는 것이 첨가하는 것에 비해 난자의 활성화 유도에 더 유효한 것으로 여겨진다.

참고문헌

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watwson JD. 1989. Membrane transport of small molecules. In Molecular biology of the cell. Garland Publishing Inc., New York, pp. 300-323.

Aoyagi Y, Kameyama K and Takeda T. 1992. Artificial activation of bovine oocytes matured in vitro by electric shock or exposure to ionophore A23187. Theriogenology, 37: 188(Abstr).

Aoyagi Y and Konishi M. 1994. Studies on development into blastocyst of *in vitro* matured and artificial activated bovine oocytes-mixed activation method by use of electric pulse, Ca ionophore and cycloheximide. J. Reprod. Dev., 40:5-11.

Ayoub MA and Hunter AG. 1993. Parthenogenetic activation of *in vitro* matured bovine oocytes. J. Dairy Sci., 76:421-429.

Barnes FL, Endebrock M, Looney C, Powell R, Westhusin M and Bondioli K. 1993. Embryo cloning in cattle: the use of *in vitro* matured oocytes. J. Reprod. Fert., 97:317-320.

Benz R and Zimmermann U. 1981. The resealing process of lipid bilayers after reversible electrical breatdown. Biochim. Biophys. Acta, 640:169-178.

Berridge MJ and Irvine RF. 1989. Inositol phosphates and cell signalling. Nature, 341: 197-205.

Chandley AC. 1987. Meiotic analysis in germ cells of man and the mouse. In Mammalian development: A practical approach(Monk, M., ed.). IRL Press Ltd., Oxford, pp. 73-74.

Chang DC, Saunders JA, Chassy BM and Sowers AE. 1992. Overview of electroporation and electrofusion. In Guide to electroporation and electrofusion(Chang, D. C., Chassy, B. M., Saunders, J. A. and Sowers, A. E. eds.). Academic Press, San Diego, pp. 1-6.

Chang DC. 1989. Cell poration and cell fusion using an oscillating electric field. Biophys. J., 56:641-652.

Collas P, Balise JJ, Hofmann GA and Robl JM. 1989. Electrical activation of mouse oocytes. Theriogenology, 32:835-844.

Collas P, Fissore R, Robl JM, Sullivan EJ and Barnes FL. 1993. Electrically induced calcium elevation, activation, and parthenogenetic development of bovine oocytes. Mol. Reprod. Dev., 34:212-223.

Collas P, Pinto-Correia C, Ponce de Leon FA and Robl JM. 1992. Effect of donor cell cycle stage on chromatin and spindle morphology in nuclear transplant rabbit embryos. Biol. Reprod., 46:501-511.

Collas P and Robl JM. 1991. Development of rabbit nuclear transplant embryos from morula and blastocyst stage donor nuclei. Theriogenology, 35:190(Abstr).

Cuthbertson KSR, Whittingham DG and Cobbold PH. 1981. Free Ca^{2+} increases in exponential phases during mouse oocyte activation. Nature, 294:754-757.

de Loos F, Van Vliet C, Van Maurik P and Kruip ThAM. 1989. Morphology of immature bovine oocytes. Gamete Res., 24:197-204.

Fasolato C, Pizzo P and Pozzan T. 1990. Receptor mediated calcium influx in PC12 cells. J. Biol. Chem., 265:20351-20355.

First NL, Leibfried-Rutledge ML, Northey DL and Nuttleman PR. 1992. Use of in vitro matured oocytes 24h of age in bovine nuclear transfer. Theriogenology, 37:211 (Abstr)

Fissore RA and Robl JM. 1992. Intracellular Ca^{2+} response of rabbit oocytes to electrical stimulation. Mol. Reprod. Dev., 32:9-16.

Freshney RI. 1994. The culture environment: substrate, gas phase, medium, and temperature. In Culture of animal cells: A manual of basic technique. Wiley-Liss Inc., New York, pp. 85-90.

Holliday J and Spitzer NC. 1990. Spontaneous calcium influx and its roles in the differentiation of spinal neurons in culture. Dev. Biol., 141:13-23.

Kaufman MH, Huberman E and Sachs L. 1975. Genetic control of haploid parthenogenetic development in mammalian embryos. Nature, 254:694-695.

Kubiak JZ and Tarkowski AK. 1985. Electrofusion of mouse blastomeres. Exp. Cell Res., 157:561-566.

McGrath J and Solter D. 1983. Nuclear transplantation in mouse embryos. J. Exp. Zool., 228:355-362.

Meyerhof PG and Masui Y. 1977. Ca and Mg control of cytostatic factors from Rana pipiens oocytes which cause metaphase and cleavage arrest. Dev. Biol., 61:214-229.

Minamihashi A, Watson AK, Watson PH, Church RB and Schultz GA. 1993. Bovine parthenogenetic blastocysts following *in vitro* maturation and oocyte activation with ethanol. Theriogenology, 40:63-76.

Mitani T, Utsumi K and Iritani A. 1993. Developmental ability of enucleated bovine oocytes matured *in vitro* after fusion with single blastomeres of eight-cell embryos matured and fertilized *in vitro*. Mol. Reprod. Dev., 34:314-322.

Moor RM and Trounson AO. 1977. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in vitro* and their subsequent developmental capacity. J. Reprod. Fert., 49:101-109.

O'neill GT and Kaufman MH. 1989. Cytogenetic analysis of ethanol-induced parthenogenesis. J. Exp. Zool., 249:182-192.

Onodera M and Tsunoda Y. 1989. Parthenogenetic activation of mouse and rabbit eggs by electric stimulation *in vitro*. Gamete Res., 22:277-283.

Ozil JP. 1990. The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation. Development, 109: 117-127.

Powell R and Barnes FL. 1992. The kinetics of oocyte activation and polar body formation in bovine embryo clones. Mol. Reprod. Dev., 33:53-58.

Prather RS, Barnes FL, Sims MM, Robl JM, Eyestone WH and First NL. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryo: Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. Biol. Reprod., 37:859-866.

Prather RS, Sims MM and First NL. 1989. Nuclear transplantation in early porcine embryos. Biol. Reprod. , 41:414-418.

Presicce GA and Yang X. 1994a. Nuclear dynamics of parthenogenesis of bovine oocytes matured *in vitro* for 20 and 40 hours and activated with combined ethanol and cycloheximide treatment. Mol. Reprod. Dev., 37:61-68.

Presicce GA and Yang X. 1994b. Parthenogenetic development of bovine oocytes matured *in vitro* for 24 hr and activated by ethanol and cycloheximide. Mol. Reprod. Dev., 38:380-385.

Procházka R, Kaňka J, Sutovský P, Fulka J and

Motilk J. 1992. Development of pronuclei in pig oocytes activated by a single electric pulse. J. Reprod. Fert., 96:725-734.

Reimann SP and Miller BJ. 1939. Studies of human ova. I. Description of artificially induced parthenogenetic activities in one. Arch. Path., 27:412-418.

Rickords LF and White KL. 1992. Electrofusion-induced intracellular Ca^{2+} flux and its effect on murine oocyte activation. Mol. Reprod. Dev., 31:152-159.

Robl JM, Collas P, Fissore R and Dobrinsky J. 1992. Electrically induced fusion and activation in nuclear transplant embryos. In Guide to electroporation and electrofusion (Chang, D. C., Chassy, B. M., Saunders, J. A. and Sowers, A. E. eds.). Academic Press, San Diego, pp. 535-551.

Robl JM, Prather R, Barnes F, Eyestone W, Northey D, Gilligan B and First NL. 1987. Nuclear transplantation in bovine embryos. J. Anim. Sci., 64:642-647.

Robl JM and Stice SL. 1989. Prospects for the commercial cloning of animals by nuclear transplantation. Theriogenology, 31:75-84.

Signoret J and Jagnier J. 1962. Activation experimentale de l'oeuf de Pleurodile. CR. Acad. Sci., 254:4079-4080.

Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML and First NL. 1989. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. Biol. Reprod., 40:1257-1263.

Stice SL, Keefer CL, Maki-Laurila M and Matthews L. 1993. Donor blastomere cell cycle stage affects developmental competence of bovine nuclear transfer embryos. Theriogenology, 39:318(Abstr).

Stice SL, Keefer CL and Matthews L. 1994. Bovine nuclear transfer embryos : Oocyte activation prior to blastomere fusion. Mol. Reprod. Dev., 38:61-68.

Stice SL and Robl JM. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. Biol. Reprod., 36:657-664.

Takano H, Koyama K, Kozai C, Kato Y and Tsunoda Y. 1993. Effect of aging of recipient oocytes on the development of bovine nuclear transfer embryos *in vitro*. Theriogenology, 39:909-917.

Tarkowski AK, Witkowska A and Nowicka J. 1970. Experimental parthenogenesis in the mouse. Nature, 226:162-165.

Tervit HR, Whittingham DG and Rowson LEA. 1992. Successful culture of *in vitro* of sheep and cattle ova. J. Reprod. Fert., 30:493-497.

Ushijima H and Eto T. 1994. Bovine nuclear transplantation using a parthenogenetically activated oocyte as the recipient cytoplast. J. Reprod. Dev., 40:117-124.

Vitullo AD and Ozi, JP. 1989. Repetitive calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear development during mouse oocyte activation. Dev. Biol., 151:128-136.

Ware CB, Barnes FL, Maiki-Laurila M and First NL. 1989. Age dependence of bovine oocyte activation. Gamete Res., 22:265-275.

Whittingham DG and Siracusa G. 1978. The involvement of calcium in the activation of mammalian oocytes. Exp. Cell Res., 113: 311-317.

Whittingham DG. 1980. Parthenogenesis in mammals. Oxford Rev. Reprod. Biol., 2:205-231.

Willadsen SM. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. Nature, 320:63-65.

Yang X, Jiang S, Farrell P, Foote RH and McGrath B. 1993. Nuclear transfer in cattle: Effect of nuclear donor cells, cytoplast age, co-culture, and embryo transfer. Mol. Reprod. Dev., 35:29-36.

Yang X, Presicce GA, Moraghan L, Jiang S and

Foote RJ. 1994. Synergistic effect of ethanol and cycloheximide on activation of freshly matured bovine oocytes. Theriogenology, 41:395-403.

Zimmermann U and Vienken J. 1982. Electric field-induced cell-to-cell fusion. J. Memb. Biol., 67:165-182.