

난포크기 및 난자직경과 관련된 한우 체외배양 난자의 핵성숙에 관한 연구

용환율 · 김현일 · 이은송* · 이병천 · 황우석

서울대학교 수의과대학
日本帶廣畜産大學 肉畜増殖學研究室*
(1996년 6월 3일 접수)

Effects of follicle size and oocyte diameter on *in vitro* nuclear maturation of Korean native cattle oocyte

Hwan-yul Yong, Hyun-il Kim, Eun-song Lee*, Byeong-chun Lee, Woo-suk Hwang

College of Veterinary Medicine, Seoul National University
Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro 080 Japan*

(Received Jun 3, 1996)

Abstract : The present study was undertaken to establish a relationship between bovine follicle size and oocyte diameter, compare the nuclear maturation competence of oocytes of different diameter groups and the nuclear maturation changes in Korean Native Cattle according to *in vitro* maturation period.

To compare the relationship between follicle size and oocyte diameter, follicles were dissected, measured, and assigned to one of the following size categories($4 \geq$ mm, 3-4mm, 2-3mm, 1-2mm, and < 1 mm), investigate the maturation competence in the different-sized oocytes, which were divided into three groups($< 110\mu\text{m}$, $110 - < 120\mu\text{m}$, and $\geq 120\mu\text{m}$).

Oocytes were cultured in the culture medium during 0, 6, 12, 18, and 24hrs, respectively, stained, and measured the nuclear maturation degree according to period.

When compared the relationship between follicle size and intrafollicular oocyte diameter, oocyte diameters of three groups of ≥ 3 mm follicle-sized were significantly higher than < 3 mm ($p < 0.01$).

After *in vitro* maturation, the rates reached to MI stage of $< 110\mu\text{m}$ oocyte groups(25%) was higher than $110-120\mu\text{m}$ and $\geq 120\mu\text{m}$ oocyte groups(11 and 10%) reached to the same stage($p < 0.01$), and the rates throughout MII stage of $110-120\mu\text{m}$ and $\geq 120\mu\text{m}$ and $< 110\mu\text{m}$ (70 and 76%) groups were higher than $< 110\mu\text{m}$ (35%)($p < 0.01$).

When nuclear maturation rates were measured according to period, < 6 hr groups(7 and 10%)

showed lower rates reached to MI than ≥ 12 hr groups(100%), 24hr groups(76%) revealed higher rates throughout MII than 18hr groups(40%).

These results indicate that the preparation of oocyte for the production of *in vitro* fertilization embryos and nuclear transplantation ones could be adapted, as follicle increased up to appointed size there was a corresponding increase in oocyte diameter, and differences of nuclear maturation rate revealed according to oocyte diameter and maturation period.

Key words : Korea native cattle, follicle size, oocyte diameter, nuclear maturation, IVM.

서 론

대부분의 포유동물에서 난자는 태생기때 감수분열의 초기단계로 진입하고 배란 혹은 폐쇄에 이를 때까지 prophase I의 이동기(dictyate)기에서 정체된다¹. 포유동물 난자의 인위적인 감수분열 재개는 체외의 적절한 배지에서도 가능할 것이라고 제기된 이후^{2,3}, 여러동물 중(마우스⁴, 양⁵, 랫드⁶, 소^{7,8})에서 체외성숙, 수정 및 발육을 통해 체외수정란의 생산에 성공함으로써 이와같은 사실이 입증되었다.

종간의 차이는 있지만 난자는 과립막세포에 둘러싸인 채 수년간 제1차 감수분열에 진입하여 정지상태를 유지한다⁹. 이 발육말기에 있어서 각각의 난자는 germinal vesicle(이하 GV라 약함)상태를 유지하며, 성성숙후 LH 극기가 일어나면 선택된 난포내 난자들은 핵막의 용해 즉, germinal vesicle breakdown(이하 GVBD라 약함)이 일어나고 제1극체를 형성하는 감수분열을 거쳐 metaphase II에서 정체된다.

도축 난소에서 얻은 난자를 이용하여 체외수정란의 생산시에는 제한 배양조건 개선에도 불구하고 형태학적 기준에서 제외된 난자는 극히 일부분만이 수정란으로서 생존하므로¹⁰ 체외성숙에 참여되는 난자는 난포의 크기, 난구세포의 성장 및 세포질의 형태가 우수하여야 한다^{11,12}.

설치류의 난자는 난포강을 형성하기 전에 이미 충분한 크기로 성장하고 난포강 형성 이후에 감수분열능을 획득하지만^{13,14} 소와 돼지는 초기 난포강 단계에서 도달해도 난자가 발육중이고¹⁵ 난포강의 크기가 0.5mm 크기로 분화되었을 때 난자는 발육중으로 직경 110 μ m에 이르고 이중 일부만 감수분열을 재개한다고 하고¹⁶, 난포강의 충분한 세포분열후 난포는 직경 4-8mm에 이르며

투명대를 제외한 난포내 난자의 평균 직경은 소와 돼지에서 각각 110 및 100 μ m라고 하였으며^{17,18}, Arlotto *et al*¹⁹에 의하면 95-105 μ m 직경의 소 난자에서 감수분열의 재개를 관찰하였다고 한다. 감수분열재개능을 가진 난자의 경우, 난포의 크기와 난자의 직경이 연구자마다 상이함을 보였다.

난자의 체외성숙을 위해서는 직경 약 1-6mm의 난포에서 분리하여 체외성숙까지 24시간 체외배양하는 반면 체내에서의 감수분열 재개는 4mm의 난포가 15mm 크기의 우세난포에 도달하기까지 약 5일이 소요된다²⁰. 이러한 작은 난포로부터 분리된 난자는 체외성숙 24시간후 감수분열재개능에 제한적이어서 이들중 80% 이상이 GV단계에 머물러 있다¹⁷.

이상으로 보아 포유동물에서 감수분열재개능을 획득하기 위한 조건은 난포크기, 난자직경 및 체외성숙시간과 무관하지 않으며 연구자마다 차이를 나타내는 바에 본 연구자는 체외성숙에 참여되는 도축 한우 난자의 난포 크기, 난자 직경 및 체외성숙시간을 달리하여 핵성숙률을 비교 조사함으로써 체외성숙에 참여되는 난자의 적절한 조건을 도출하고자 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

난소 : 도살된 한우로부터 외과용 가위를 이용, 난소를 채취하여 100 IU/ml의 penicillin G(Sigma Chemical Co., USA)와 100 μ g/ml의 streptomycin(Sigma Chemical Co., USA)을 첨가한 32-37 $^{\circ}$ C 생리식염수에 보존하였다. 난소는 2시간 이내에 실험실로 운반하고 생리식염수로 2-3회 세정한 후 가온수조에 정치하였다.

난포크기와 난자직경의 측정 :

1) 난포크기의 측정 : 난소 표면을 알코올 스펀지로 닦아 내고 38 $^{\circ}$ C의 생리식염수로 세정한 후 Lu(1990)의

방법에 준하여 난소로부터 난포를 절제하여 실질조직을 제거하였다. 이후 실험현미경에 장착된 micrometer를 사용하여 직경을 측정하여 <1, 1-2, 2-3, 3-4 그리고 ≥4 mm의 5개군으로 분류하였다.

2) 난자직경의 측정 : 난포크기를 측정하여 5개군으로 분류한 난포의 벽을 파열시켜 분리해낸 미성숙난자를 5%의 비동화한(56℃, 30분) fetal calf serum(Sigma Chemical Co., USA ; 이하 FCS라 약함)이 첨가된 tissue culture medium 199(Life Technologies Inc., USA ; 이하 TCM 199이라 약함)에 수집하였다. 난자 주위의 난구세포를 1 mg/ml의 hyaluronidase(type I-S; Sigma Chemical Co.)를 함유한 Ca²⁺ 및 Mg²⁺은 첨가되지 않은 phosphate buffered saline(-)(Life Technologies Inc., USA ; 이하 PBS(-)라 약함)에 노출시켜 35mm petridish(Costar, USA)내에서 microburner를 사용하여 만든 길이 150µm의 마이크로 피펫으로 기계적인 mouse pipetting을 해서 벗겨 냈다. 투명대를 제외한 각군의 난자직경을 반복측정하였다.

직경이 다른 난자들의 핵성숙도를 조사하기 위한 실험에서는 0.4% bovine serum albumin(Sigma Chemical Co., USA ; 이하 BSA라 약함), 2mM NaHCO₃ 및 10mM HEPES(Sigma Chemical Co., USA)를 첨가한 세정용 TCM 199배지로 5ml 주사기의 내강을 세정한 후 18gauge 주사침을 부착하여 직경 3-8mm의 소난포로부터 난포액과 함께 미성숙난자를 흡인, 채취하였다. 난자를 포함하고 있는 난포액을 60mm petridish(Costar, USA)에서 5분간 정치시킨 후 상층액을 제거하고 다층의 치밀한 난구세포가 부착되어 있고 세포질이 균질한 난자를 선발하였다. 선발된 미성숙난자는 5% FCS가 첨가된 세정용 TCM 199에 옮기고 투명대를 제외한 난자의 직경을 실험현미경에 부착된 micrometer를 사용하여 측정하였다. 난자를 직경에 따라 <110, 110-120 및 ≥120µm의 3개군으로 분류하였다.

체외성숙 : 난포벽의 파열 및 천자 흡인한 난포란은 Wiemer 등의 기준에 준하여 실시하였다. 실험현미경

(Wild M8, Germany×50)하에서 난구세포가 치밀하게 부착되고 세포질이 균질한 것만을 선별하여 실험에 제공하였다. 선별된 미성숙난자를 10% FCS, 25mM NaHCO₃, 2.5µg/ml FSH(US Department of Agriculture, USA) 및 1µg/ml estradiol-17β (Sigma Chemical Co., USA)가 첨가된 성숙 배양용 TCM 199으로 옮기기 전에 세정용 TCM 199에서 2회 세정하였다. 체외성숙은 10% FCS가 첨가된 성숙 배양용 TCM 199을 0.5ml씩 분주한 4-well dish 각 well내에 각 군의 난자를 10-15개씩 첨가하여 39℃, 5% CO₂, 공기 및 습도가 포화상태인 CO₂ 배양기내에서 24시간동안 정치시켰다.

난자의 염색 : 미성숙난자를 24시간동안 및 6시간 간격으로 24시간까지 배양한 후 1mg/ml의 hyaluronidase(Type I-S; Sigma Chemical Co.)를 함유한 PBS(-)배지에 노출시켜 35mm petridish내에서 mouse pipetting을 하여 난구세포를 완전히 벗겨 냈다. 난구세포가 벗겨진 난자는 세정용 TCM 199에서 1회 세정한 후 Chandley(1987)의 방법에 준하여 basic fuchsin을 이용한 급속염색을 하였으며 도립현미경하에서 핵성숙의 정도를 조사하였다. 조사한 결과는 germinal vesicle(GV), germinal vesicle breakdown(GVBD), metaphase I, anaphase I, telophase I 및 metaphase II 단계로 분류하였다.

통계학적 분석 : 난포크기와 난자직경을 비교한 실험에서는 Duncan's multiple range test를, 난자직경에 따른 핵성숙도를 조사한 실험과 성숙배양시간에 따른 핵성숙도를 조사한 실험에서는 Chi-square test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

결 과

난포크기와 난자직경의 관계 : 난포크기와 난자직경과의 관계는 Table 1에 제시되어 있다. 난포가 3mm까지 증가함에 따라서 난자직경도 102.9±6.9, 109.9±7.0 및 114.4±7.0

Table 1. Distribution of oocyte diameters from follicles of different sizes in Korean native cattle

Follicle size(mm)	No. of oocytes used	No.(%) of different-sized oocytes(µm)				Mean ± SD
		< 100	100- < 110	110- < 120	≥120	
< 1	42	20(47)	17(40)	3(2)	2(1)	102.9 ^a ±6.9
1-2	51	5(10)	16(31)	24(47)	6(12)	109.9 ^b ±7.0
2-3	48	4(8)	9(19)	11(23)	24(50)	114.4 ^{cd} ±7.9
3-4	46	0	9(20)	12(25)	25(55)	116.8 ^{dc} ±5.9
≥4	54	1(2)	5(9)	13(24)	35(65)	118.3 ^c ±5.9

^{a,b,c,d} Means with different superscripts differ significantly, according to Duncan's Multiple Range Test.

고 찰

9 μ m로 이에 상응하여 유의적으로 증가하였으나 난포의 크기가 3mm 이상인 군에서는 각각 116.8 \pm 5.9 및 118.3 \pm 5.9 μ m로 유의적인 증가가 인정되지 않았다($p < 0.01$).

난자직경과 관련된 핵성숙률 : 체외성숙시 난자의 직경이 서로 다른 세 군의 핵성숙률은 다음과 같았다 (Table 2). 난자의 직경이 < 110 μ m인 군(25%)보다 110-120, \geq 120 μ m의 군(11 및 10%)이 유의적으로 높은 MI에 이르는 핵성숙률을 보였으며($p < 0.01$), 난자의 직경이 < 110 μ m의 군(35%)보다 110-120, \geq 120 μ m의 군(70 및 76%)이 유의적으로 높은 MII에 이르는 핵성숙률을 보였다($p < 0.01$).

Table 2. Nuclear maturation rates in relation to oocyte diameter in Korean native cattle

Diameter (μ m)	No. of oocytes used	No.(%) of oocytes at ^a					
		GV	GVBD	MI	AI	TI	MII
< 110	83	12(14)	7(8)	21(25) ^b	9(11)	5(6)	29(35) ^b
110-120	44	1(2)	2(5)	5(11) ^c	3(7)	2(5)	31(70) ^c
\geq 120	45	0	0	7(10) ^c	0	4(9)	34(76) ^c

^a GV : germinal vesicle, GVBD: germinal vesicle breakdown, MI: metaphase I, AI: anaphase I, TI: telophase I, MII: metaphase II

^{bc} Values in the same columns with different superscripts differ significantly($p < 0.01$).

성숙시간이 핵성숙에 미치는 영향 : 체외성숙과정을 거치면서 난자핵에서 일어나는 변화를 Table 3에 제시하였다. 체외성숙 개시후 6시간 미만인 군에서는 MI 이상 단계에 도달하는 난자가 10% 미만이며 12시간에 모든 난자들이 MI 단계를 거쳤고 18시간군에는 40%의 난자가 MII 단계에 도달하였으며 24시간군에는 76%의 난자가 MII 단계에 도달하는 것으로 나타났다.

Table 3. Effect of maturation period on nuclear status of oocytes in Korean native cattle

Time (hr)	No. of oocytes used	No.(%) of oocytes at ^a					
		GV	GVBD	MI	AI	TI	MII
0	41	31(75)	7(17)	3(7)	0	0	0
6	48	24(50)	19(40)	4(8)	1(2)	0	0
12	36	0	0	29(80)	5(14)	2(6)	0
18	37	0	0	5(14)	8(22)	9(24)	15(40)
24	45	0	0	6(13)	1(2)	4(9)	34(76)

^a GV: germinal vesicle, GVBD: germinal vesicle breakdown, MI: metaphase I, AI: anaphase I, TI: telophase I, MII: metaphase II

본 실험에서 얻은 한우 난포의 크기와 난자의 직경과의 관계가 확인하진 않지만 난포직경 3mm까지 증가함에 따라 난자의 직경도 함께 증가하여 Motlik과 Fulka¹⁵의 결과치와 유사한 경향을 보였다. 이들에 의하면 난포의 크기가 3mm에 이를 때 상응하는 난자는 최대 크기에 도달한다고 하였으나 본 실험에서는 3mm이상인 군에서 직경 120 μ m이상인 난자가 발견되었다. 직경 1mm미만의 난포내에서도 110 μ m 이상의 성숙난자가 발견되었는데 이는 우세난포에서 분비된 inhibin에 의해 폐쇄가 진행 중이기 때문이다²⁰. 또한 많은 연구자들이 직경 5mm미만의 난포중에서도 폐쇄난포가 높은 비율로 발견되었다고 보고하였다^{21,22}.

본 실험에서는 난포의 크기가 1mm미만인 경우, 난자의 직경은 약 103 μ m에서 난포의 크기가 4mm이상일 때의 118 μ m까지였으며 이러한 측정결과는 Suzuki *et al*²³의 결과와 유사하였다. 하지만 Motlik와 Fulka¹⁵는 0.4-0.9mm의 난포에서 난자의 평균 직경이 110-130 μ m이라 하여, 본 실험의 결과인 직경 1mm미만의 난자평균직경(102.69 \pm 6.9)보다 다소 크게 보고하였다. 또한 Fuhrer²⁴는 3-8mm의 난포에서 난자의 직경을 132.6 \pm 6.5 μ m로 보고하였는데 본 실험의 4mm이상인 군에서의 평균난자직경인 118.3 \pm 5.9 μ m보다 큰 측정치를 보였다. 이처럼 본 실험에서 난포크기에 따른 난자직경이 여러 연구자들과 다른 것은 난자채취시 난소의 상태, 황체의 존재여부 및 우세난포의 출현시기와 관련있기 때문이라 사료된다.

난자의 직경이 서로 다른 군의 핵성숙능을 비교 조사하였을 때 난자의 성숙률은 Thibault *et al*²⁵이 측정된 결과와 유사하였다. 이들의 보고에 의하면 직경 105-115 μ m의 난자의 핵성숙률은 87.7%라고 하였는데 본 실험에서는 110-120 μ m에서 70%가 metaphase II에 도달하였으며 110-120 μ m와 120 μ m간의 metaphase II 성숙률의 차이는 6%로서, 난자직경이 110 μ m미만인 경우 metaphase II에 이르는 성숙은 점진적으로 얻어지나 120 μ m이상인 군에서는 일정한 성숙률을 보이는 것으로 판단되었다. 본 실험에서는 110 μ m미만인 난자의 22%가 GVBD에 도달하였고 57%가 metaphase I에 이르렀으며 35%만이 metaphase II에 도달하였으나 난자의 직경이 110 μ m이상인 경우 대부분의 난자들이 metaphase II에 이르는 핵성숙능은 직경 110 μ m에서

획득되는 것으로 생각되었다.

Fair *et al*²⁶은 직경 1mm미만 난포의 난자도 GVBD가 일어날 수 있고 감수분열을 재개하지만 metaphase II에 이르는 난자는 극히 적었다고 보고하였다. 그리고 Fuhrer *et al*²⁵은 소에서 0.9mm미만의 난포내 난자의 1.4%만이 metaphase II까지 성숙되었고 2-8mm 난포내 난자의 47.8%가 체외성숙후 metaphase II에 이르렀다고 보고하였다. 또 Motlik *et al*¹⁷은 24시간 배양후 0.7mm미만 난포내 소난자의 80% 이상이 GV단계에 남아 있었다고 보고하였는데 유사한 예로 1.0-1.8mm크기의 난포내 산양난자는 metaphase I에 도달할 수 있었고 3mm이상 크기의 난포내 난자는 metaphase II에 도달하였다²⁷. 또한 Motlik *et al*¹⁷은 난포의 크기가 3mm이상으로 증가하면 체외성숙을 거쳐 metaphase II에 도달하는 감수분열능을 획득하는 난자의 비율도 증가한다고 하였는데 본 실험에서는 난포의 크기와 핵성숙률을 비교하진 않았지만 난포크기와 난자직경 및 난자직경에 따른 핵성숙률의 결과를 통해 Motlik *et al*¹⁷의 보고치와 유사하다고 생각된다. 이로 미루어 보아 난자가 감수분열을 마칠 수 있는 난포의 크기에는 어떤 분기점이 있는 것으로 생각되어지며 난포의 크기가 3mm이상으로 증가하면 난자의 직경도 110 μ m에 이르며 충분한 감수분열재개능을 획득하는 것으로 추론해 볼 수 있었다.

난포의 크기와 후기배발육률과의 관계를 조사한 실험에서 Lonergan *et al*²⁸은 직경 6mm이상의 난포내 난자와 2-6mm 직경의 난포내 난자에서의 상실패, 배반포로의 발육률은 각각 65.9% 및 34.3%라고 보고하였으며 이로써 체외로 난자를 흡입하기 전의 난포의 크기가 후기배발육률에 영향을 미친다는 것을 알 수 있다. 즉, 배란전 크기로 성장한 체내난포에서 핵과 세포질의 충분한 성숙을 통해 후기배로의 높은 발육률에 영향을 미친다고 추측된다.

또한 Lonergan *et al*²⁸에 의하면 회수방법에 따라 난자의 양과 질적인 차이가 있다고 보고하였는데 본 실험에서는 난소절개에 의한 난자회수법을 통해 천자 흡입보다 많은 난자를 채취할 수 있었고 감수분열재개능이 획득 가능한 난자도 상대적으로 많음을 알 수 있었다.

시간에 따른 핵성숙률 조사에서 각 시간대별로 염색한 난자의 수는 변성으로 인해 염색이 불분명하게 된 난자들을 제외한 것이다. 대부분의 난자들은 체외성숙 6시간 후에 GVBD를 하였고 12시간 후에 MI에 이르며 24시간 후에 MII에 도달하는 것으로 나타났다. 각 시간대별

로 핵내의 성숙 변화는 여러 보문과 유사하였는데²⁹⁻³¹, 6시간 간격으로 실험을 수행하였기 때문에 대략적인 핵내 변화는 관찰이 가능하였지만 핵성숙의 변화를 자세하게 얻기 위해서는 짧은 시간간격으로 관찰하는 것이 필요하다고 사료된다. 체내성숙에서는 GVBD가 LH 크기 4-8시간 내에 일어나고³² 과배란처치된 동물에서는 6-9시간내에 일어나며³³, 제 1극체는 LH 크기 19시간 후에 관찰되는 것으로 보아, 체내의 경우 MII에 도달하는 시간은 LH 크기후 20시간에 불구하다는 것을 알 수 있다. 반면 체외성숙의 경우 약간의 시간이 더 소요되는 것으로 보아 체내와 거의 일치하는 환경에 영향을 미치는 체외조건이 더 있는 것으로 생각되며 난포로부터 난자를 분리해 내는 시각이 LH 극기와 거의 일치할 한다면 체내상태와 유사하게 핵성숙이 진행된다고 생각할 수 있었다.

이상의 결과로 볼 때 난포로부터 난자를 분리해내는 시각은 난포크기와 난포내 난자의 직경 및 이에 따른 핵성숙률의 차이와 관련이 있고 세포질의 성숙도 고려해야 될 것으로 생각된다. 본 실험에서는 한우에서 난포크기 및 난자직경이 핵성숙에 미치는 영향과 성숙시간과 핵성숙도의 관련을 조사함으로써 이러한 조건이 난자의 선발에 유용할 수 있음을 증명하였고, 직경 3mm미만의 난포와 100 μ m미만의 난자가 체외성숙에 효과적이지 않음도 알 수 있었다. 또한 난포크기와 난자직경 및 성숙시간에 대해서만 조사하였으나, 한우에서의 난자의 회수방법, 세포질과 난구세포의 성장, 난소주기 등 다른 요인들에 대한 연구를 보다 많이 진전시켜야 할 것으로 생각된다.

결 론

한우에서 난포크기와 난자직경과의 관계를 조사하고 난자의 직경이 서로 다른 군들의 체외성숙률을 비교하며 시간경과별 핵성숙률을 검토하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 난포의 크기와 난포내 난자의 직경과의 관계를 비교하였을 때, 난포의 크기가 3mm까지 증가함에 따라서 난자직경도 이에 상응하여 증가하였다. 난포의 크기가 각각 < 1, 1-2, 및 2-3mm인 군(102.9 \pm 6.9, 109.9 \pm 7.0 및 114.4 \pm 7.9 μ m)에서 3-4 및 \geq 4mm인 군(116.8 \pm 5.9 및 118.3 \pm 5.9 μ m)에 비해 유의적인 증가가 인정되었다(p <

0.01).

2. 직경이 서로 다른 세 난자군의 24시간 체외성숙시 핵성숙률을 비교조사하였을 경우, MI에 이르는 < 110 μ m의 난자군(25%)이 같은 단계에 이르는 110- < 120 및 \geq 120 μ m의 난자군(11 및 10%)에 비해 유의적으로 높은 핵성숙률을 보였으며, MII에 이르는 110- < 120 및 \geq 120 μ m의 난자군(70 및 76%)이 같은 단계에 이르는 < 110 μ m미만의 난자군(35%)에 비해 유의적으로 높은 핵성숙률을 보였다($p < 0.01$).

3. 난자를 24시간동안 체외성숙을 시키면서 핵성숙률을 비교조사하였을 경우, 체외성숙 개시후 0 및 6시간 미만인 군에서는 MII 이상 단계에 도달하는 난자는 각

각 7 및 10%이며 12시간에 모든 난자들이 MI 단계를 거쳤고 24시간경과군(76%)이 18시간경과군(40%)보다 MII에 이르는 도달률이 높았다.

이상의 결과로 미루어, 한우 난자에서는 난포의 크기가 3mm이하인 경우 그에 상응해서 난자의 직경도 커지고 3mm이상인 경우 일정한 난자직경을 유지하며, 24시간의 체외성숙을 하는 경우 MII에 이르는 난자의 최적의 직경은 110 μ m이상으로 추정되며 체외성숙 6시간이 경과하면 대다수의 난자가 GVBD를 하고 12시간이 경과하면 MI에 도달, 18시간 이상 경과시 MII에 이르는 것으로 여겨진다.

Legends for figures

Fig 1. Germinal vesicle stage. Arrow indicates oocyte nuclear membrane($\times 400$).

Fig 2. Germinal vesicle breakdown stage. Arrow indicates that oocyte nucleus membrane disappeared($\times 400$).

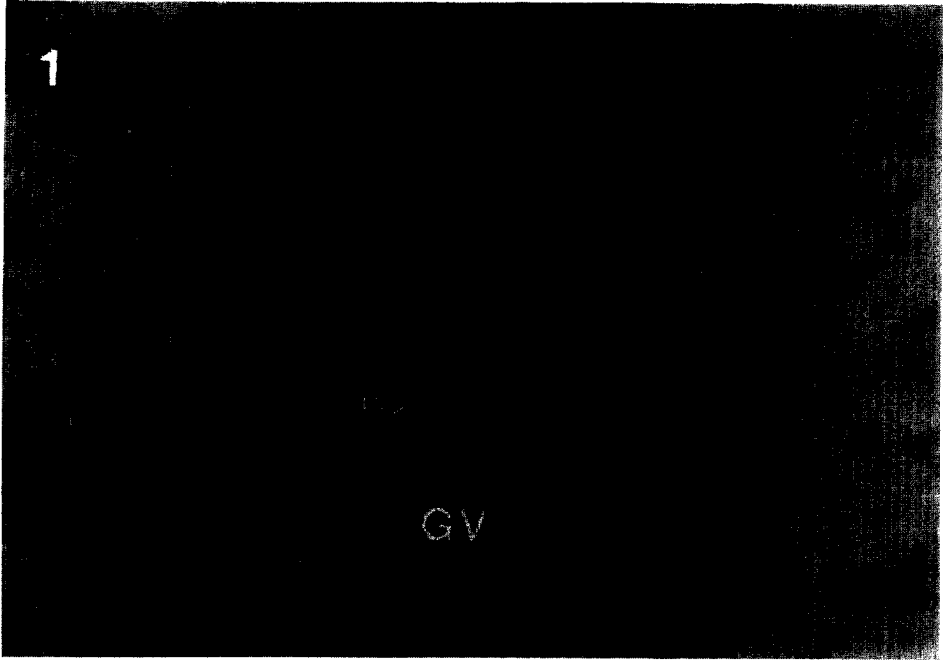
Fig 3. Before metaphase I stage. Arrow indicates that chromatin condensation characterized by a cluster of DNA material without indivisual chromosomes($\times 400$).

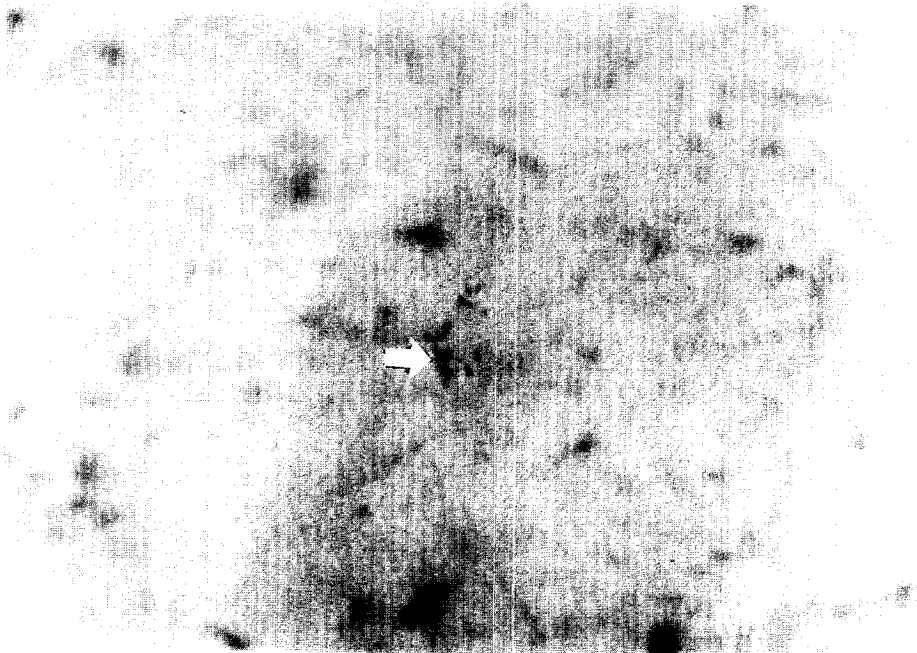
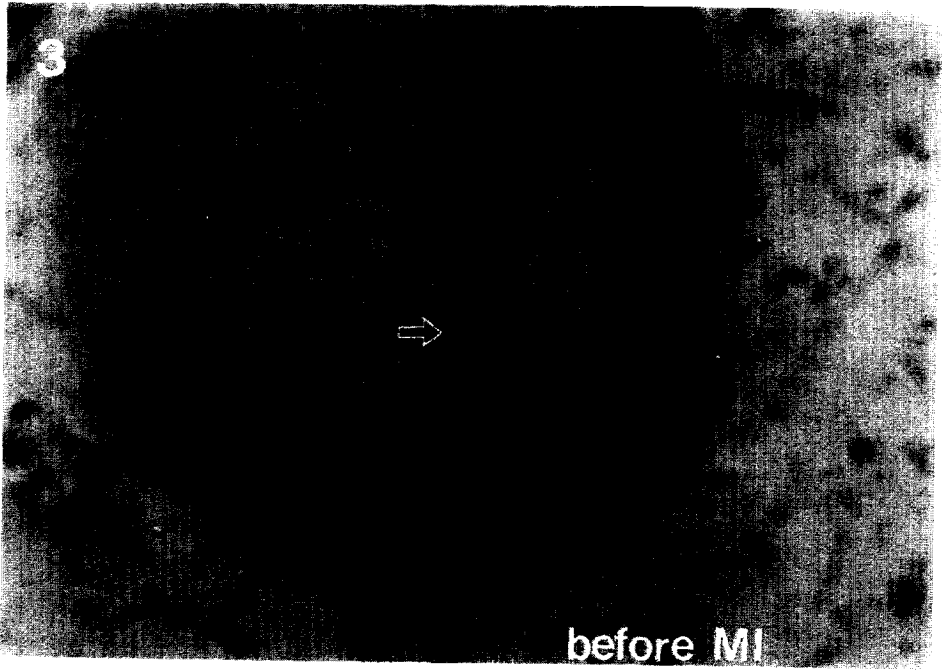
Fig 4. Metaphase I stage. Arrow indicates that chromosomes line up in the equatorial plane, and their doubled structure is clearly visible($\times 400$).

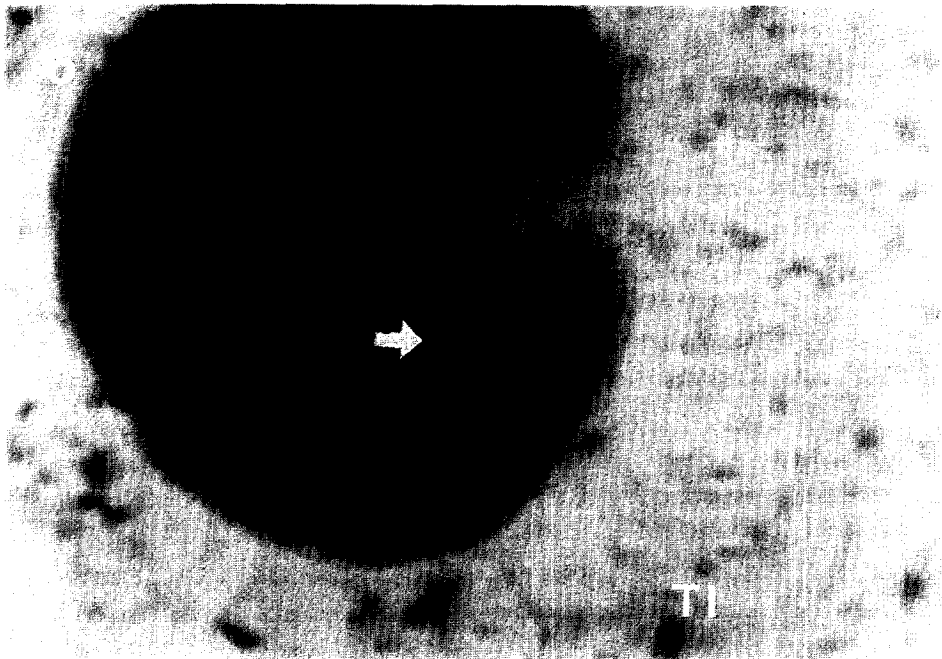
Fig 5. Anaphase I stage. Arrow indicates that migration of chromatids to opposite poles of the spindle($\times 400$).

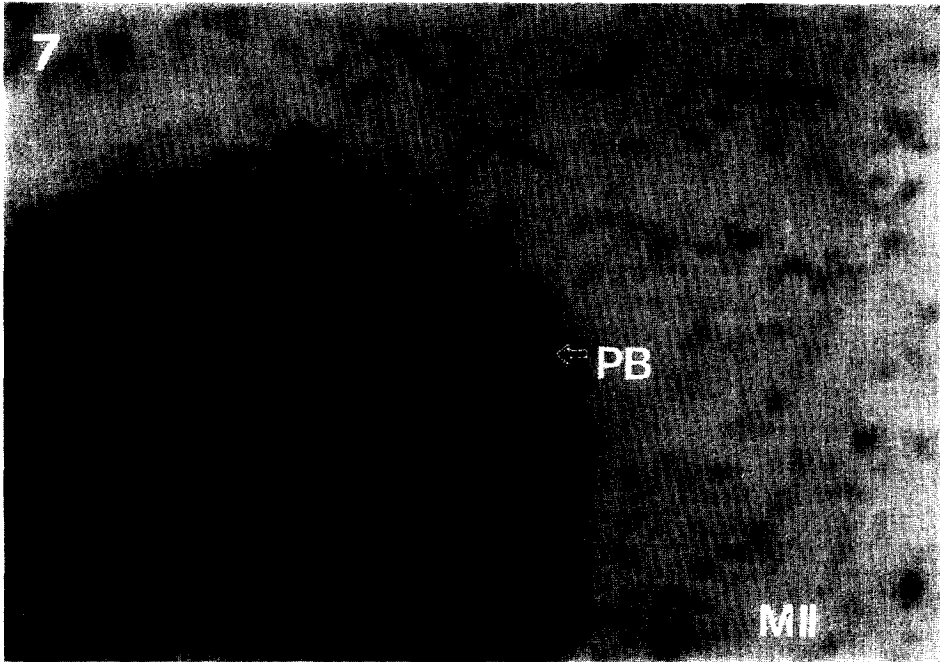
Fig 6. Telophase I stage. Arrow indicates that chromosomes uncoil and lengthen, the nuclear envelope reforms, and division of the cytoplasm occurs($\times 400$).

Fig 7. Metaphase II stage. Arrow indicates 1st polar body($\times 400$).









참 고 문 헌

1. Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge L, *et al.* Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod*, 40:1257~1263, 1989.
2. Pincus G, Enzmann EV. The comparative behaviour of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. *J Exp Med*, 62: 665-675, 1935.
3. Edwards RG. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 196:349-351, 1965.
4. Schroeder AC, Eppig JJ. The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously *in vitro* is normal. *Dev Biol*, 102:393-397, 1984.
5. Staigmiller RB, Moor RM. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocyte matured outside the follicle. *Gamete Res*, 9:221-229, 1984.
6. Fleming AD, Evans G, Walton EA, *et al.* Development capability of rat oocytes matured *in vitro* in defined medium. *Gamete Res*, 123:255-263, 1985.
7. Christer ES, Leibfried-Rutledge ML, First NL. Influence of cumulus cell association during *in vitro* maturation of bovine oocytes on embryonic development. *Biol Reprod*, 34 (Suppl. 1):192, 1986.
8. Sirard MA, First NL. *In vitro* inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biol Reprod*, 39:229-234, 1988.
9. Wassarman, PM. The mammalian ovary. In the physiology of reproduction (Knobil, E., Neill, J.D. eds). *Raven Press*, 69-102, 1988.
10. Gordon I, Lu KH. Production of embryos *in vitro* and it's impact on livestock production. *Theriogenology*, 33:77-87, 1990.
11. Ayouh MA, Hunter AG. Parthenogenetic activation of *in vitro* matured bovine oocytes. *J Dairy Sci*, 76:421-

- 429, 1993.
12. Yang X, Presicce GA, Moraghan L, *et al.* Synergistic effect of ethanol and cycloheximide on activation of freshly matured bovine oocytes. *Theriogenology*, 41: 395-403, 1994.
 13. Chuinard LA. A light- and electron-microscopic study of the nucleolus growth of the oocyte in the pre-pubertal mouse. *J Cell Sci*, 9:637-663, 1971.
 14. Erickson GF, Sorensen RA. *In vitro* maturation of mouse oocytes from late, middle and preantral Graafian follicles. *J Exp Zool*, 190:123-127, 1974.
 15. Motlik J, Fulka J. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology*, 25: 87-96, 1986.
 16. Motlik J. Cytoplasmic aspects of oocyte growth and maturation in mammals. *J Reprod Fert*, 38(suppl):17-25, 1989.
 17. Motlik J, Crozet N, Fulka J. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J Reprod Fert*, 72:323-328, 1984.
 18. Niwa K, Miyake M, Iritani A, *et al.* Fertilization of rat oocytes cultured *in vitro* from various stages of maturation. *J Reprod Fert*, 47:105-106, 1976.
 19. Arlotto TM, Leibfried-Rutledge ML, First NL. Size distribution and meiotic competence of bovine primary oocytes from two locations in the ovary. *Theriogenology*, 33:188(abst), 1990.
 20. Driancourt MA. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology*, 35:55-79, 1991.
 21. Scaramuzzi RJ, Turnbull KE, Nancarrow CD. Growth of graafian follicles in cows following luteolysis induced by the prostaglandin F_{2α} analogue cloprostenol. *Aust J Biol Sci*, 33:63-69, 1980.
 22. Macnatty KP, Heath DA, Henderson KM, *et al.* Some aspects of thecal and granulosa cell function during follicular development in the bovine ovary. *J Reprod Fert*, 72:39-53, 1984.
 23. Suzuki H, Yang X, Foote RH. Surface characteristics and size changes of immature, *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine oocytes. *Theriogenology*, 41: 307(abst), 1994.
 24. Fuhrer F, Mayr B, Schellander K, *et al.* Maturation competence and chromatin behavior in growing and fully grown cattle oocytes. *J Vet Med*, 36:285-291, 1989.
 25. Thibault C, Szollosi D, Gerard M. Mammalian oocyte maturation. *Reprod. Nutr Dev*, 27:865-896, 1987.
 26. Fair T, Hyttel P, Greve T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev*, 42:437-442, 1995.
 27. De Smedt V, Crozet N, Gall L. Morphological and functional changes accompanying the acquisition of meiotic competence in ovarian goat oocyte. *J Exp Zool*, 269:128-139, 1994.
 28. Lonergan P, Monaghan D, Rizos D, *et al.* Effect of follicle size on bovine oocyte quality and development competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, 37:48-53, 1994.
 29. Sreenan J. *In vitro* maturation and attempted fertilization of cattle follicular oocytes. *J Agric Camb*, 75: 313-396, 1970.
 30. Motlik J, Koefoed-Johnson HH, Fulka J. Breakdown of the germinal vesicle in bovine oocytes cultivated *in vitro*. *J Exp Zool*, 205:377-384, 1978.
 31. Assey RJ, Hyttel P, Greve T, *et al.* Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Mol Reprod Dev*, 37:335-344, 1994.
 32. Kruip TA, Cran DG, Van Beneden TH, *et al.* Structural changes in bovine oocytes during final maturation *in vivo*. *Gamete Res*, 8:29-47, 1983.
 33. Hyttel P, Callesen H, Greve T. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. *J Reprod Fert*, 76:645-656, 1986.