

체외성숙 배지에 아미노산의 첨가가 한우 난포란의 핵성숙과 배발달에 미치는 영향

박용수 · 김소섭¹ · 최수호 · 박노찬 · 변명대² · 박흠대^{3†}

경상북도 축산기술연구소

Effects of Amino Acid in *In-vitro* Maturation Medium on Nuclear Maturation and Embryo Development of Korean Native Cow

Park, Y. S., S. S. Kim¹, S. H. Choi, N. C. Park, M. D. Byun² and H. D. Park^{3†}

Kyungbuk Livestock Research Institute

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the effects of amino acid supplementation of oocyte maturation medium on 1st polar body(PB) extrusion, embryo development and blastocyst cell number. In experiment 1, Cumulus oocyte complexes(COCs) were matured in *in vitro* maturation(IVM) medium supplemented with 1, 2, or 4-fold of 10 μ l/ml MEM non-essential amino acid(NEAA) and 20 μ l/ml BME essential amino acid(EAA). The PB extrusion rate of oocytes matured in 1-fold amino acid group was significantly higher than that matured in medium without amino acid ($p < 0.05$), but it was decreased by the increase of the dosage of amino acid. There were no difference in the percentage of embryos reaching 2-cell, 8-cell and blastocyst in all treatments. The number of trophectoderm(TE) cells and total cell number of blastocysts were highest in 2-fold amino acid group, and the number of inner cell mass(ICM) cells was increased by the increase of the dosage of amino acid. In experiment 2, COCs were matured in IVM medium with 1, 5, or 10 mg/ml lactalbumin hydrolysate(LAH). The PB extrusion rate of oocytes matured in medium with 5 mg LAH was significantly higher than that matured in medium with 1 mg LAH ($p < 0.05$). The development rate to the blastocyst stage was significantly higher in non-supplement and 1 mg LAH group than in 5 mg and 10 mg LAH group ($p < 0.05$). The number of TE cells and total cell number did not differ among treatment groups, but the number of ICM cells was increased by the increase of LAH supplement. These results suggested that the supplement of certain group of amino acid in IVM medium effective on the quality of blastocyst, and further studies will be accompany with the search of new sources of amino acid used for the use of *in vitro* embryo production.

(Key words : *In vitro* maturation, Amino acid, 1st Polar body, Cell number)

I. 서 론

체외에서 소 난포란의 핵성숙은 일반적으로 TCM199 배지에 혈청, 성선자극호르몬, estradiol 및 각종 성장인자들을 첨가(Ho 등, 1995; Fukui와 Ono, 1989)함으로써 90% 이상 일어난다(Watson 등, 2000). 그러나 배반포로의 발달율은 10~20%로서 한정되어져 있고, 그 재현성도 낮은 수준이다(Do-

minko와 First, 1997). 이러한 이유는 체외에서 난포란의 부적합한 성숙조건(Ward 등, 2002) 때문일 것으로 미루어 볼 때 체외성숙에 사용되는 각종 배지와 첨가물이 난포란의 성숙과 배발달 능력에 많은 영향을 미칠 것이다(Rose 등, 1998; Watson 등, 2000). 따라서 체외에서 배발달율을 향상시키기 위해서는 난포란과 수정란의 대사에 적합한 배지의 구성성분이 필요하다(Zheng 등, 2002). 특히 배지의 첨가물 중에서

† Corresponding author : Hum Dae Park, Ph.D. Division of Food and Biotech., Daegu University Tel : (053) 850-6554.

¹ 충북대학교 수의과대학(College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University).

² 경북대학교 수의과대학(College of Veterinary Medicine, Kyungbuk National University).

³ 대구대학교 식품생명공학부(Division of Food and Biotechnology, Daegu University).

아미노산은 소 수정란의 체외발달과 대사에 많은 영향을 미친다고 하였지만(Avery 등, 1998; Hill 등, 1997), 난포란의 체외성숙에 미치는 효과에 대한 연구보고는 소수에 불과하며, 또한 그 첨가량에 따른 핵성숙과 체외생산된 배반포의 품질에 대한 연구보고는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 한우 수정란의 체외생산에 있어서 체외성숙용 배지에 MEM 배지의 non-essential amino acids와 BME 배지의 essential amino acids 첨가와 더불어 새로운 아미노산원으로 유청 중의 lactalbumine hydrolysate 첨가효과를 검토하기 위하여 난포란의 제1극체 출현, 배발달 및 배반포의 세포수를 이용하여 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 배양액

본 연구에 사용된 배양액 중 난소로부터 난포란의 세척 및 회수용은 25mM Hepes(Sigma, H3375)와 3 mg/ml BSA(Sigma, A6003)가 첨가된 Hepes-buffered TALP(HbT) 용액, 체외성숙용은 0.2 mg/ml pyruvate(Sigma, P3662), 10% FBS(Sigma, F0643), 1 µg/ml FSH(Sigma, F8174), 10 µg/ml LH(sigma, L9773), 1 µg/ml estradiol-17β(Sigma, E2758)가 각각 첨가되는 한편 아미노산이 미 첨가된 CR1aa 용액, 체외수정용은 6 mg/ml BSA와 10 µg/ml heparin(Sigma, H3149)이 각각 첨가된 TALP 용액, 체외배양용은 3 mg/ml BSA 또는 10% FBS가 첨가된 CR1aa 용액을 각각 이용하였다. 그리고 실험에 제공되는 배양액의 미세소적은 mineral oil(Sigma, M8410)을 도포하여 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 최소한 6시간 이상 평형시켜 이용하였다.

2. 아미노산 첨가

실험 목적에 따라 체외성숙용 배지에 10 µl/ml의 MEM 배지 함유 non-essential amino acids(NEAA, Gibco, 11140-050)와 20 µl/ml의 BME 배지 함유 essential amino acids(EAA, Gibco, 11130-010)를 각각 1, 2, 4배 첨가하였으며, 한편 유청 중의 lactalbumine hydrolysate(LAH)는 각각 1, 5, 10 mg/ml를 첨가하였다.

3. 난포란의 회수 및 체외성숙

도축된 한우로부터 난소를 적출하여 25 µg/ml gentamycin(Sigma, G1264)이 첨가된 0.9% 생리식염수(25~28°C)에 담아 6~7시간 내에 실험실로 운반하였다. 회수된 난소는 penicillin G(Sigma, P3032)가 첨가된 생리식염수로 3~4회 세척한 후, 18G가 부착된 10 ml 1회용 주사기를 이용하여 직경 2~6 mm의 가시난포로부터 난포란을 회수하였다. 회수된 난포란은 체외성숙용 배지로 3회 세척하여 실험현미경하에서 난구 세포의 부착상태가 치밀한 것만을 선별하여, 50 µl의 체외성숙용 배지에 15개 난포란을 옮겨 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 20시간 배양함으로써 체외성숙을 유도하였다.

4. 체외수정

한우 동결정액 1개를 실온에서 10초간, 37°C에서 30초간 처리하여 용해한 후, 90% percoll(Sigma, P4937) 2 ml 용액이 담겨져 있는 15 ml 원심분리관(Coming, 430052)에 살며시 넣고, 700 g, 20분간 원심분리 후 하층부의 정자괴만을 회수하여, 2 ml의 체외수정용 용액으로 다시 350 g, 10분간 원심분리함으로써 정자를 세척하였다. 그리고 정자농도는 25×10⁶ cells/ml가 되도록 조절·회석하였다. 15개의 난포란이 함유되어 있는 46 µl의 체외수정용 배지에 10 µg/ml로 조정된 heparin 용액 2 µl와 준비된 정자 2 µl를 각각 첨가하여(최종 정자농도 1×10⁶ cells/ml), 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 20시간 배양함으로써 체외수정을 유도하였다.

4. 체외수정

5. 체외배양

체외수정 후 15개의 수정란(배양 1일)을 3 mg/ml BSA가 첨가된 체외배양용 배지 50 µl에 넣어, 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였으며, 배양 3일째부터 10% FBS가 첨가된 체외배양용 배지로의 교환과 더불어 미리 준비된 난관상피세포와 공동배양하였으며, 배양 5일 및 7일째에 각각 50%씩 신선 체외배양용 배지로 교환하였다.

5. 체외배양

6. 난관상피세포

도축 한우의 난관을 4°C 상태로 운반한 후 난관 주위의 다른 조직을 제거하여 TCM199 용액으로 3회 세척하였다. 그리고 난관의 양쪽 끝 부분을 자른 후 난관 점막조직을 유리관의 끝으로 압착하여 분리하였다. 회수된 점막조직은 5ml TCM199 용액으로 550 g, 5분간 2회 세척하였다. 침강된 조직을 다시 5 ml의 TCM199 용액에 혼합하여 끝이 잘 마모된 20G 주사침이 부착된 5 ml 1회용 주사기를 이용하여 반복 흡입함으로써 세포피를 단일세포로 분리한 후 4-well dish(Nunc, 176740)에 500 µl씩 분주하여 48시간 동안 10% FBS가 첨가된 TCM199 용액으로 배양하였다. 배양 후 아주 작은 vesicle를 형성한 상피세포를 체외배양용 용액으로 세척한 후, 40~50개씩 50 µl의 신선 체외배양용 용액으로 배양하여

6. 난관상피세포

도축 한우의 난관을 4°C 상태로 운반한 후 난관 주위의 다른 조직을 제거하여 TCM199 용액으로 3회 세척하였다. 그리고 난관의 양쪽 끝 부분을 자른 후 난관 점막조직을 유리관의 끝으로 압착하여 분리하였다. 회수된 점막조직은 5ml TCM199 용액으로 550 g, 5분간 2회 세척하였다. 침강된 조직을 다시 5 ml의 TCM199 용액에 혼합하여 끝이 잘 마모된 20G 주사침이 부착된 5 ml 1회용 주사기를 이용하여 반복 흡입함으로써 세포피를 단일세포로 분리한 후 4-well dish(Nunc, 176740)에 500 µl씩 분주하여 48시간 동안 10% FBS가 첨가된 TCM199 용액으로 배양하였다. 배양 후 아주 작은 vesicle를 형성한 상피세포를 체외배양용 용액으로 세척한 후, 40~50개씩 50 µl의 신선 체외배양용 용액으로 배양하여

수정란과의 공동배양세포로써 준비하였다.

7. 난포란의 제1극체(PB) 출현 관찰

체외성숙이 완료된 난포란의 난구세포는 0.03% hyaluronidase(Sigma, H4272) 함유 PBS 용액으로 5분간 vortex하여 제거하였으며, 위상차 현미경을 이용하여 난포란의 PB 출현을 조사하였다.

8. 배반포의 이중형광염색

배양 8일째에 확장배반포의 세포수를 측정하기 위하여 propidium iodide (Sigma, P4170; PI)와 bisBenzimide(Sigma, B2261)를 사용하여 이중형광염색을 실시하였다(Giles 와 Foote, 1995). 먼저 배반포의 투명대를 0.5% pronase(Sigma, P6911) 용액으로 처리하여 용해시킨 후, HbT 용액으로 3회 세척하였다. 그리고 rabbit anti-bovine whole serum(Sigma, B8270)이 1:5로 희석된 HbT 용액에서 1시간 배양한 후, guinea pig complement(Sigma, S-1639; PI와 bisBenzimide가 각각 4µg/ml 첨가)가 1:10으로 희석된 HbT 용액으로 1시간 처리하여 염색을 행하였다. 그리고 염색된 배반포를 HbT 용액으로 5분간 세척한 후, slide glass에 whole mount하여 형광 현미경하에서 배반포의 inner cell mass(ICM)와 trophoblast (TB) 세포수를 각각 조사하였다.

9. 통계처리

실험 결과에 대한 통계학적 분석은 χ^2 -test를 이용하였으며, 배반포의 세포수는 Duncan's multiple range test를 이용하여 검정하였다.

III. 결 과

1. NEAA와 EAA의 첨가

1) PB 출현율

한우 난포란의 체외성숙용 배지에 NEAA와 EAA 첨가량이 PB 출현율에 미치는 효과를 검토한 결과는 Fig. 1과 같다. NEAA와 EAA가 첨가되지 않은 대조군의 PB 출현율은 29.9%로써 1배 첨가군의 46.4%, 2배 첨가군의 37.4% 및 4배 첨가군의 34.5%보다 낮았으며, 특히 1배 첨가군보다 유의하게 낮았다($p < 0.05$).

2) 배발달율

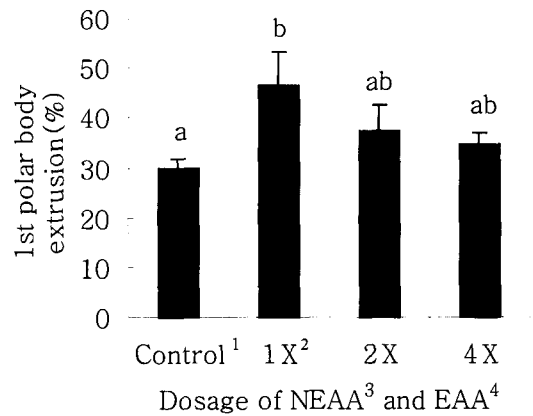


Fig. 1. Effects of the dosage of NEAA and EAA in maturation medium on 1st polar body extrusion of Korean Native Cow oocytes.

¹ Control: Non-supplement NEAA and EAA.

² 1x: Supplement 10µl/ml NEAA and 20µl/ml EAA.

³ NEAA: Non-essential amino acid.

⁴ EAA: Essential amino acid.

^{ab}: Differ significantly($p < 0.05$).

체외성숙용 배지에 NEAA와 EAA 첨가량이 한우 난포란의 체외성숙 및 체외수정 후 배발달에 미치는 효과를 검토한 결과는 Table 1과 같다. 수정율과 8세포기까지의 발달율은 대조군이 각각 72.2%와 29.4%, 1배 첨가군이 66.9%와 36.1%, 2배 첨가군이 71.9%와 33.8% 및 4배 첨가군이 70.5%와 27.0%로써 모든 군이 유사하였으며, 배반포의 발달율도 모든 군에서 21.0%~25.0%로써 유사한 경향이였다. 한편 8세포기로부터 배반포의 발달율은 4배 첨가군이 87.8%로써 다른 군의 62.3%~67.9%보다 높았으나, 유의차는 인정되지 않았다.

3) 배반포의 세포수

체외성숙용 배지에 NEAA와 EAA 첨가량에 따라 체외생산된 배반포의 품질을 평가하기 위하여 배반포의 세포수를 검토한 결과는 Table 2와 같다. 총 세포수는 2배 첨가군이 115.0±4.7개로써 대조군의 107.4±6.8개, 1배 첨가군의 88.5±3.5개 및 4배 첨가군의 105.1±3.4개보다 각각 많았으며, 특히 1배 첨가군보다 유의하게 많았다($p < 0.05$). 한편 총 세포수중 ICM 세포수는 대조군이 14.8±2.5개, 1배 첨가군이 20.6±1.9개, 2배 첨가군이 22.9±3.2개 및 4배 첨가군이 23.9±3.9개로써 아미노산의 첨가량이 증가함에 따라 세포수도 많아지는 경향이였으며, 특히 4배 첨가군이 대조군보다 유의하게 많았다($p < 0.05$). 그러나 총 세포수중 TB 세포수는

Table 1. Effects of the dosage of NEAA and EAA in maturation medium on *in vitro* development of Korean Native Cow oocytes

Dosage of NEAA ¹ and EAA ²	No. of embryos examined	No. (%) of embryos developed to			
		≥2-cell	8-cell	BL ³	BL ³ /8-cell
Control ⁴	83	61(72.2)	24(29.4)	17(21.4)	17/24(67.9)
1× ⁵	102	69(66.9)	36(36.1)	21(25.0)	21/36(65.7)
2×	91	64(71.9)	29(33.8)	16(21.0)	16/29(62.3)
4×	95	70(70.5)	25(27.0)	20(22.0)	20/25(87.8)

¹ NEAA: Non-essential amino acid.² EAA: Essential amino acid.³ BL: Blastocyst.⁴ Control: Non-supplement NEAA and EAA.⁵ 1×: Supplement 10 μl/ml NEAA and 20 μl/ml EAA.**Table 2. Effects of the dosage of NEAA and EAA in maturation medium on ICM, TB and total cell number of Korean Native Cow blastocysts**

Dosage of NEAA ¹ and EAA ²	No. of blastocysts examined	No. (%) of cells		
		Total	ICM ³	TB ⁴
Control ⁵	11	107.4±6.8(100) ^{ab}	14.8±2.5(13.8) ^a	92.6±6.0(86.2) ^b
1× ⁶	12	88.5±3.5(100) ^a	20.6±1.9(23.3) ^{ab}	67.9±2.9(76.7) ^a
2×	12	115.0±4.7(100) ^b	22.9±3.2(19.9) ^{ab}	92.1±3.4(80.1) ^b
4×	16	105.1±3.4(100) ^{ab}	23.9±3.9(22.7) ^b	81.2±7.6(77.3) ^{ab}

¹ NEAA: Non-essential amino acid.² EAA: Essential amino acid.³ ICM: Inner cell mass.⁴ TB: Trophoblast.⁵ Control: Non-supplement NEAA and EAA.⁶ 1×: Supplement 10 μl/ml NEAA and 20 μl/ml EAA.^{ab}: Values in the same columns with different superscripts are significantly different($p < 0.05$).

대조군이 92.6±6.0개로써 다른 처리군의 보다 많았으며, 특히 1배 첨가군의 67.9±2.9개보다 유의하게 많았다($p < 0.05$).

44.5%, 10 mg 첨가군이 39.9%로써 5 mg 첨가군이 가장 높았으며, 특히 1 mg 첨가군보다 유의하게 높았다($p < 0.05$).

2. LAH 첨가

1) PB 출현율

체외성숙용 배지에 LAH의 첨가량이 한우 난포란의 PB 출현에 미치는 효과를 검토한 결과는 Fig. 2와 같다. PB 출현율은 대조군이 36.9%, 1 mg 첨가군이 24.6%, 5 mg 첨가군이

2) 배발달율

체외성숙용 배지에 LAH의 첨가량이 한우 난포란의 체외성숙 및 체외수정 후 배발달에 미치는 효과를 검토한 결과는 Table 3과 같다. 수정율과 8세포기까지의 발달율은 대조군이 각각 81.8%와 44.4%, 1 mg 첨가군이 69.5%와 35.7%, 5 mg 첨가군이 73.3%와 36.2%, 10 mg 첨가군이 60.1%와 26.3%로써

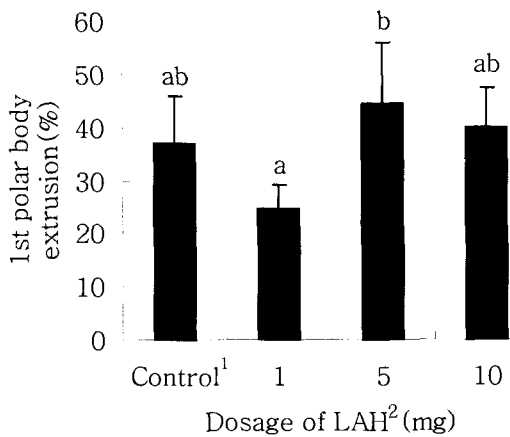


Fig. 2. Effect of the dosage of LAH in maturation medium on 1st polar body extrusion of Korean Native Cow oocytes.

¹ Control: Non-supplement LAH.

² LAH: Lactalbumin hydrolysate.

^{ab}: Differ significantly ($p < 0.05$).

대조군이 가장 높았으며, 특히 10 mg 첨가군보다 유의하게 높았다($p < 0.05$). 배반포로의 발달율은 대조군이 26.3%, 1 mg 첨가군이 25.9%, 5 mg 첨가군이 14.1%, 10 mg 첨가군이 14.2%로써 대조군과 1 mg 첨가군이 5 mg 첨가군과 10 mg 첨가군보다 유의하게 높았다($p < 0.05$). 한편 8세포기로부터 배반포로의 발달율은 대조군이 59.8%, 1 mg 첨가군이 74.1%, 5 mg 첨가군이 39.4%, 10 mg 첨가군이 54.1%로써 1 mg 첨가군이 가장 높았으며, 특히 5 mg 첨가군보다 유의하게 높았다($p < 0.05$).

3) 배반포의 세포수

체외성숙 배지에 LAH 첨가량에 따라 생산된 배반포의 품질을 평가하기 위하여 배반포의 세포수를 검토한 결과는 Table 4와 같다. 총세포수는 대조군이 140.4 ± 6.8 개, 1 mg 첨가군이 125.2 ± 3.5 개, 5 mg 첨가군이 108.8 ± 4.7 개, 10 mg 첨가군이 129.4 ± 3.4 개로써 대조군이 가장 많았으나, 각 군 간의 유의차는 인정되지 않았다. 한편 총 세포수중 ICM 세포수는 대조군이 12.6 ± 2.5 개, 1 mg 첨가군이 16.2 ± 1.9 개, 5 mg 첨가군이 8.8 ± 3.2 개, 10 mg 첨가군이 26.0 ± 3.9 개로써 10 mg 첨가군이 가장 높았으며, 다른 군보다 유의하게 많았다($p < 0.05$). 그러나 총 세포수중 TB 세포수는 대조군이 127.8 ± 6.0 개, 1 mg 첨가군이 109.0 ± 2.9 개, 5 mg 첨가군이 100.0 ± 3.4 개, 10 mg 첨가군이 103.4 ± 7.6 개로써 대조군이 가장 많았으나, 각 군 간의 유의차는 인정되지 않았다.

IV. 고 찰

본 연구는 한우 수정란의 체외생산에 있어서 체외성숙용 배지에 MEM 배지의 NEAA와 BME 배지의 EAA의 첨가와 더불어 새로운 아미노산원으로 유청 중의 LAH 첨가효과를 검토하기 위하여 난포란의 제1극체 출현, 배 발달 및 배반포의 세포수를 이용하여 조사하였다.

소 체외수정란 생산용의 각종 배지에 첨가되는 아미노산은 pH(Edwards 등, 1998)와 삼투압(Van Winkle, 2001) 조절 및 에너지원과 단백질 합성의 전구체로서 이용됨으로써(Lee와 Fukui, 1996; Hill 등, 1997), 난포란의 핵 성숙을(Zheng 등, 2002), 응성전핵형성(Lim 등, 1999), 배 발달을(De Matos 등, 1996; Zheng 등, 2002), 생산된 배반포의 세포수(Watson 등,

Table 3. Effect of LAH in maturation medium on *in vitro* development of Korean Native Cow oocytes

Dosage of LAH ¹ (mg)	No. of oocytes examined	No. (%) of embryos developed to			
		≥2-cell	8-cell	① BL ²	BL ² /8-cell
Control ³	92	72(81.8) ^b	42(44.4) ^b	23(26.3) ^b	23/42(59.8) ^{ab}
1	95	67(69.5) ^{ab}	36(35.7) ^{ab}	25(25.9) ^b	25/36(74.1) ^b
5	96	72(73.3) ^{ab}	37(36.2) ^{ab}	14(14.1) ^a	14/37(39.4) ^a
10	95	60(60.1) ^a	28(26.3) ^a	14(14.2) ^a	14/28(54.1) ^{ab}

¹ LAH: Lactalbumin hydrolysate.

² BL: Blastocyst.

³ Control: Non-supplement LAH.

^{ab}: Values in the same columns with different superscripts are significantly different($p < 0.05$).

Table 4. Effect of LAH in maturation medium on ICM, TB and total cell number of Korean Native Cow blastocysts

Dosage of LAH ¹ (mg)	No. of blastocysts examined	No. (%) of cells		
		Total	ICM ²	TB ³
Control ⁴	10	140.4±6.8(100)	12.6±2.5(9.0) ^a	127.8±6.0(91.0)
1	10	125.2±3.5(100)	16.2±1.9(12.9) ^a	109.0±2.9(87.1)
5	10	108.8±4.7(100)	8.8±3.2(8.1) ^a	100.0±3.4(91.9)
10	10	129.4±3.4(100)	26.0±3.9(20.1) ^b	103.4±7.6(79.9)

¹ LAH: Lactalbumin enzymatic hydrolysate.

² ICM: Inner cell mass.

³ TB: Trophoblast.

⁴ Control: Non-supplement LAH.

^{a,b}: Values in the same columns with different superscripts are significantly different($p<0.05$).

2000) 그리고 이식 후 착상에 효과적으로 작용(Lane 와 Gardner, 1994; Hill 등, 1997)한다는 보고가 있는 반면 배 발 달을에는 차이가 없다는 보고(Avery 등, 1998)도 있다. 이와 같이 많은 연구자들은 소 배반포의 체외생산에 있어서 배지 에 아미노산 첨가가 효과적이라고 보고하였으며, 이러한 효 과는 아미노산의 종류(Hill 등, 1997)와 동물의 종(Lee 와 Fukui, 1996; Meyen 등, 1989)에 따라 다소간의 차이가 있지 만, 주로 사용되는 아미노산의 종류는 대부분 체세포 배지용 으로서 MEM 유래 non-essential amino acids와 BME 유래 essential amino acids 이다(Rosenkrans와 First, 1994; Devreker 등, 1998). 특히 아미노산의 첨가에 의해 난포란의 난구세포 팽창과 더불어 핵 성숙율의 증가와 더불어 본 연구에서도 난포란의 PB 출현율은 아미노산을 첨가함으로써 상승하였 지만, 농도 의존적이라는 것을 확인하였다(Fig. 1). 그러나 아 미노산원으로써 LAH는 첨가농도에 따라 차이가 있었으나, 5mg 첨가시에는 효과적이었다(Fig. 2). 따라서 한우 난포란의 체외성숙용 배지에 적정 농도의 아미노산 첨가는 난포란의 핵성숙율을 증가 시킬 수 있으며, 이러한 원인은 Watson 등 (2000)의 보고와 같이 아미노산에 의한 난자내의 mRNA 수 준의 증가와 관련되어져 있을 것으로 사료된다.

그리고 체외성숙용 배지에 아미노산을 첨가하였을 경우 수정 후 배발달에 미치는 영향에 대해서는 사용하는 아미노 산의 종류에 따라 약간의 차이가 있으나 효과적이라는 보고 (Watson 등, 2000)와 비효과적이라는 상반된 보고(Avery 등, 1998)가 있으며, 본 연구의 결과(Table 1)는 Avery 등(1998)의 보고와 같이 아미노산의 첨가량에 따른 배발달율은 차이가

없었으며, 아미노산원으로써 LAH는 난포란의 성숙과는 반 대로 5 mg 첨가시에는 오히려 배발달율이 저하하였다(Table 3). 그러나 8세포기로부터 배반포로의 발달율은 4배의 아미 노산 첨가군과 1 mg LAH 첨가군이 가장 높았다. 이러한 아 미노산의 첨가농도에 따른 차이에 대해서는 확실하게 보고 된 바가 없으며, 특히 LAH는 일반 체세포배양용 배지에 이 용되며(Park 등, 2000), 혈청의 대체물질(Young, 1976) 과 mitogenic factor의(Chou 등, 1979) 작용을 가지고 있으나, 배 발달과 관련된 전혀 보고된 바가 없다. 그러나 이러한 원인 은 아마도 체외성숙시 난포란이 배지에 아미노산의 종류와 첨가량에 따라 흡수하는 물질의 차이가 세포질내 새로운 단 백질의 합성과 축적되는 종류 및 양이 배발달에도 어떤 영 향을 미쳤을 것이라고 추정된다.

한편 여러 조건하에서 체외생산된 배반포의 품질평가는 배반포의 현미경적 관찰(Linder와 Wright, 1983), 배반포의 부화(Behbooi 등, 1995), 배반포의 세포수(Papaioannou와 Ebert, 1988), 배반포의 대리모에 이식 후 수태율 등으로 판 정하고 있다. 이중 현미경적 관찰은 연구자의 경험에 의존하 는 경우가 많으며, 배반포의 부화는 배양환경에 따라 차이가 있으며, 수태율은 판정 기간이 오래 걸린다는 단점 등으로 인하여 가장 객관적인 방법은 배반포의 세포수의 측정이라 고 하였다(Papaioannou와 Ebert, 1988, Du 등, 1996). 체외성 숙시 아미노산의 첨가는 배반포의 세포수를 증가시킨다고 하였으며(Watson 등 2000), 본 연구에서도 아미노산의 종류 와 관계없이 첨가량이 증가할수록 총 세포수에는 큰 차이가 없었지만, 특히 ICM의 세포수가 증가되는 경향이었다(Table

2, 4). 이러한 원인은 Lane과 Gardner(1994)의 견해와 같이 체외성숙 과정에서 난자의 세포질내에 축적된 아미노산이 배발달 과정에서 ICM 세포의 분화·발달을 촉진시키는 것으로 생각된다.

이상의 결과로부터 체외성숙용 배지에 아미노산의 첨가는 그 종류에 관계없이 핵성숙율을 향상시켰으나, 배반포로의 발달에는 효과가 없었다. 그러나 적정농도의 아미노산 첨가는 배반포의 세포수를 증가시킬 수 있기 때문에 체세포 배양용 배지에 첨가하는 아미노산의 종류만을 이용하는 것이 아니라 배반포의 체외생산에 이용할 수 있는 새로운 아미노산원을 탐색할 필요가 있다고 사료된다.

V. 요약

본 연구는 체외에서 한우 난포란의 핵성숙과 그 후의 초기 배발달에 있어서 체외성숙 배지에 아미노산의 첨가가 난포란의 제1극체(PB) 출현율, 배발달을 그리고 배반포의 세포수에 미치는 영향을 검토하였다. 첨가하는 아미노산의 종류와 농도는 각각 MEM 배지의 non-essential amino acids (NEAA)와 BME 배지의 essential amino acids(EAA)는 1, 2, 4 배 및 유청중의 lactalbumine hydrolysate(LAH)는 1, 5, 10 mg/ml이었다. 그 결과 NEAA와 EAA의 경우 PB 출현율은 1배 첨가군이 미첨가군보다 유의하게 높았지만($p < 0.05$), 첨가량이 증가할수록 오히려 감소하였다. 그러나 배반포로의 배발달율은 모든 군에서 비슷한 경향이었다. 그리고 배반포의 총 세포수와 총 세포수중 TE 세포수는 2배 처리군이 가장 높았으며, ICM 세포수는 아미노산 첨가량이 증가할수록 많아졌다. 한편 LAH의 경우 PB 출현율은 5 mg 첨가군이 가장 높았으며, 배반포로의 발달율은 미첨가군과 1 mg 첨가군이 5 mg 첨가군과 10 mg 첨가군보다 각각 유의하게 높았다($p < 0.05$). 그리고 배반포의 세포수는 NEAA와 EAA를 이용하였을 경우와 비슷한 경향이었다. 이상의 결과로부터 체외성숙용 배지에 아미노산의 첨가는 생산된 배반포의 품질을 향상시킬 수 있기 때문에 배반포의 체외생산에 이용할 수 있는 새로운 아미노산의 종류 및 농도를 탐색할 필요가 있다고 사료된다.

VI. 인용문헌

- Avery, B., Bavister, B. D. and Greve, T. 1998. Development of bovine oocytes, *in vitro* matured in a chemically defined protein-free medium, supplemented with different amino acid formulations. *Theriogenology* 49:306(abstr).
- Behbooi, E., Anderson, G. B., Bondurant, R. H., Cargill, S. L., Kreusher, B. R., Medrano, J. F. and Murlay, J. D. 1995. Birth of large calves that developed from *in vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology* 44:227-232.
- Chou, I. N., Prezyne, C. and Black, P. H. 1979. Isolation from lactalbumin hydrolysate of a high molecular weight mitogenic factor. *J. Biol. Chem.* 254:10588-10591.
- De Matos, D. G., Furnus, C. C., Moses, D. F., Martinez, A. G. and Matkovic, M. 1996. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol. Reprod. Dev.* 45: 451-457.
- Devreker, F., Winston, R. M. L. and Hardy, K. 1998. Glutamine improves hman preimplantation development *in vitro*. *Fertil. Steril.* 69:293-299.
- Dominko, T. and First, N. L. 1997. Timing of Meiotic progression in bovine oocytes and its effect on early embryo development. *Mol. Reprod. Dev.* 47:456-467.
- Du, F., Looney, C. R. and Yang, X. 1996. Evaluation of bovine embryos produced *in vitro* vs. *in vivo* by differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells. *Theriogenology* 45:211(abstr).
- Edwards, L. J., Williams, D. A. and Gardner, D. K. 1998. Intracellular pH of the mouse preimplantation embryo: amino acids act as buffers of intracellular pH. *Human Reprod.* 13:3441-3448.
- Fukui, Y. and Ono, H. 1989. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 86:501-506.
- Giles, J. R. and Foote, R. H. 1995. Rabbit blastocyst: Allocation of cells to the inner cell mass and trophectoderm. *Mol. Reprod. Dev.* 41:204-211.
- Hill, J. L., Wade, M. G., Nancarrow, C. D., Kelleher, D. L. and Boland, M. P. 1997. Influence of ovine oviducal amino acid concentrations and ovine oestrus-associated glycoprotein on development and viability of bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 47:164-169.
- Ho, Y., Wigglesworth, K., Eppig, J. J., and Schultz, R. M. 1995. Preimplantation development of mouse embryos in

- KSOM: augmentation by amino acids and analysis of gene expression. *Mol. Reprod. Dev.* 41: 232-238.
13. Lane, M. and Gardner, D. K. 1994. Eagle's essential amino acids stimulate development of inner cell mass cells of cultured mouse embryos. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.* 24:53(abstr).
 14. Lee, E. S. and Fukui, Y. 1996. Synergic effect of alanine and glycine on bovine embryos cultured in a chemically defined medium and amino acid uptake by *in vitro* produced bovine morulae and blastocyst. *Biol. Reprod.* 55:1383-1389.
 15. Lim, J. M., Lee, B. C., Lee, E. S., Chung, H. M., Ko, J. J., Park, S. E., Cha, K. Y. and Hwang, W. S. 1999. *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of bovine oocytes cultured in a chemically defined, protein-free medium: effects of carbohydrates and amino acids. *Reprod. Fertil. Dev.* 11:127-132.
 16. Linder, G. E. and Wright, R. W. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20:407-416.
 17. Meyen, B. A., Rosenkrans, C. F. and Davis, D. L. 1989. Development of pig blastocysts *in vitro* is altered by serum, bovine serum albumin and amino acids and vitamins. *Theriogenology* 31:463-471.
 18. Papaioannou, V. E. and Ebert, K. M. 1988. The preimplantation pig embryo: cell number and allocation to trophectoderm and inner cell mass of the blastocyst *in vivo* and *in vitro*. *Development* 102:793-803.
 19. Park, S. C., Lee, S. H. and Han, S. S. 2000. Establishment of a phagocytic cell line from *Bombina orientalis*. *Methods in Cell Science* 22:1-7
 20. Rose, T. A., Libersky, E. A. and Bavister, B. D. 1998. Energy substrates and amino acids provided during *in vitro* maturation of bovine oocytes alter acquisition of developmental competence. *Zygote* 6:285-294.
 21. Rosenkrans, C. F. and First, N. L. 1994. Effect of free amino acid vitamins of cleavage and development rate of bovine zygotes *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 72:434-437.
 22. Van Winkle, L. J. 2001. Amino acid transport regulation and early embryo development. *Biol. Reprod.* 64:1-12.
 23. Ward, F., Enright, B., Riaos, D., Boland, M. and Lonergan, P. 2002. Optimization of *in vitro* bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology* 57:2105-2117.
 24. Watson, A. J., Sousa, P. D., Caveney, A., Barcroft, L. C., Natale, D., Urquhart, J. and Westhusin, M. E. 2000. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number and apoptosis. *Biol. Reprod.* 62:355-364.
 25. Young, D. V. 1976. The partial replacement of the serum growth factor requirement of SV3T3 cells by lactalbumin hydrolyzate. *J. Cell Physiol.* 89:133-141.
 26. Zheng, P., Bavister, B. D. and Wz, J. I. 2002. Amino acid requirements for maturation of rehesus monkey(*Macacca mulatta*) oocytes in culture. *Reproduction* 124:515-522.
- (접수일자: 2004. 2. 4. / 채택일자: 2004. 2. 28.)