

Cysteamine 첨가가 희소한우 OPU 및 도축난소 유래 난자의 발생에 미치는 영향

김성우[†], 김민수, 김찬란, 김동교, 김남태, 성환후

농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원센터

The effects of cysteamine on in vitro production of embryos from rare breed hanwoo (albino White and Black) ovum pick-up and slaughterhouse derived oocytes

Sung Woo Kim[†], Min Su Kim, Chan-Lan Kim, Dongkyo Kim, Namtae Kim, Hwan-Hoo Seong

Animal Genetic Resources Research Center, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon, 55717, Korea

ABSTRACT

Historically, Korea old cattle had been consisted with various lines of coat color brindle, black and white-brown breeds or more. The two rare lines of black and white coat color are maintained for animal resources and preserved critically. The present study was carried out to evaluate potential usage of cysteamine supplementation during in vitro maturation (IVM) and in vitro culture/production of embryo (IVP) by transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration (Ovum Pick-Up: OPU) for the establishment of cryo-banking system. Immature slaughterhouse-derived cumulus-oocyte complexes (SL-COCs) were matured in IVM medium supplemented with 0, 0.1, 0.3 or 0.9 mM cysteamine, and then cultured in mSOF-BAS for 8 days after *in vitro* fertilization. The treatment of 0.1 mM cysteamine on SL-COCs showed higher rate of blastocyst, so OPU-derived COCs from rare breeds were matured in TCM media supplemented with or without 0.1 mM cysteamine, FSH and 5% FBS. The embryos were evaluated their developmental stages on day 8. During IVM, cysteamine treatment significantly increased the embryo production rate of slaughterhouse-derived COCs (19.6% vs. 30.5%). The presence of cysteamine during IVM of OPU-derived COCs from rare Korean cattle breeds (albino white and black line) also increased embryo production rates than those from SL-COCs (27.4% vs. 41.9% and 36.4%). With these results, cysteamine treatment during IVM is one of key factors IVP of blastocysts to establish banking system of endangered rare Koarean cattle with OPU derived transferable blastocysts.

(Key word: OPU, *in vitro* embryo, cysteamine)

서 론

초음파 탐지방법을 활용하여 암컷 개체의 난포로부터 난자를 흡입하는 방법을 OPU (Ovum Pick-Up) 기법이라고 부르는데 소에 있어서 과배란 유도에 의한 수정란 생산 기법을 대체하는 방법으로 각광받고 있다. 그러므로 가축유전자원으로서 희소한우를 증식하고 유전적 다양성을 확보함과 동시에 우수한 개체를 검증하기 위하여 하나의 개체에서 단기간에 많은 후대를 생산하는 목적에 적합한 기술이라고 판단된다.

OPU 기법은 초음파 장비의 발달과 더불어 더욱 세밀하게 질벽을 가로질러 난소를 영상 촬영 할 수 있게 되어 최근 많은 성과를 얻고 있다. 암컷 유전자원을 후대에 전달하는 방법은 인공수정을 이용한 개체 증식법도축장 유래 난자를 활용하여 체외에서 수정을 실시하여 배반포를 생산하는 기법

컷에게 호르몬을 처리하고 많은 수의 난자를 배란시켜 인공수정을 통하여 배반포를 생산기법이 존재한다고 중 OPU 기법은 단기간에 가장 많은 배반포를 생산할 수 있기 때문에 기술이 점차 보편화되고 확산되고 있다. 특히 암컷의 번식 생리적 상태와 상관없이 균일한 체외 수정란을 얻을 수 있기 때문에, 많은 장점이 존재한다고 알려져 있다. 즉 과배란 처리에 대하여 호르몬 반응성이 없거나 낮은 개체에도 적용이 가능하며, 심지어 임신한 상태에서도 난자채취가 가능하며(Kruip 등, 1994, 1991) 발정기가 오지 않은 개체에서도 미성숙 난자를 채취할 수 있어 생산된 수정란을 이식할 수 있는 것으로 알려져 있다. 또한 내부생식기의 감염에 의하여 자궁내막염이나 난관협착증이 발생한 개체에서도 난자 생검 체외수정을 통하여 배반포를 생산할 수 있어 과배란 처리에 의한 체내 수정란 생산기법보다 우수한 점이 존재한다. 그러나 OPU 기법

[†] Correspondence : Sung Woo Kim
Tel: +82-63-620-3524
E-mail: sungwoo@korea.kr

은 체외에서 난자의 체외수정 및 수정란 체외 발생 기술이 선행되어야 하며, 고도의 훈련된 현장 연구원과 실험실 내 체외 수정팀의 협조가 조화를 이루어야 확립될 수 있는 기법으로 연속적인 수정란 생산을 위하여 고려해야 할 점이 많은 연구 영역이다(Boni, 2012).

OPU기법은 오랜 역사를 가진 연구로 Raoul Palmer에 의하여 1961년 시도되어 사람 난소에서 난자를 회수하는 연구가 시작 되었다(Edward RG, 1965; Litynski GS 1997; Steptoe와 Edwards, 1970). 초기에는 복강경을 이용하여 난소를 직접 관찰하고 난소 내 난포의 발육에 관한 정보와 함께 난자를 회수하였는데, 이러한 방법은 전신 마취가 필요하며 시술의 복잡성 때문에 부작용을 일으키는 단점이 있었다 그러나 초음파 장치의 발명과 해상도가 우수한 장비의 발달로 난소의 영상 촬영이 질을 통하여 가능하게 되어 난자난구세포과(COCs, cumulus oocyte complex)를 연속적으로 흡입하는 방법이 가능하게 되었다(Lenz와 Lauritsen, 1982). 소의 난자를 처음 회수한 연구는 덴마크의 Callesen 등(1987)에 의하여 실시되었는데, 직장 검사를 통하여 난소를 배치하여 초음파 검사로 난포를 관찰하였다. 소에서 OPU연구는 네덜란드 연구팀에 의하여 확립되었다고 보고되었으며 주당 1회의 방법으로 10마리의 암소에서 약 36번의 시술로 약 54개의 난소를 회수할 수 있었다고 보고하였다(Pieterse 등, 1988). 그럼에도 불구하고 OPU 기법은 최근 10년에 이르러 상업화가 되기 시작하였는데 이는 안정적인 난소 회수방법이 초음파 장치의 급속한 발달과 소의 체외 수정기법의 확립과 연관성이 있는 것으로 추정된다(Bousquet 등, 1999). 특히, 난소에서 OPU시술 주기에 관한 연구로서 주 2회의 OPU시술 방법이 효율적임이 밝혀짐에 따라 체외 수정란의 지속적인 생산에 적합한 수의 난자를 회수할 수 있게 되었다(van der Schans 등, 1991; Pieterse 등, 1991; Boni 등, 1992; Simon 등, 1993; Kruip 등, 1994).

소에 있어서 수정란 생산 기법도 많은 연구를 통하여 효율성이 증진되어져 왔는데 체외에서 발생하는 수정란에서 생산되는 활성산소종(ROS, reactive oxygen species)의 악영향을 막기 위한 연구가 중요하다고 판단된다 세포 내 glutathione (GSH)의 생합성이 난자의 성숙 과정 중에서 일어난다는 사실이 널리 알려졌는데 이는 소 수정란의 발생 과정 중 ROS에 의한 세포 손상을 억제하는데 매우 중요하다고 알려졌다(de Matos 등, 1996; de Matos 와 Furnus, 2000). 또한, 소와 면양에 있어서 난자 성숙과정에서 cysteamine을 첨가하는 방법은 GSH의 세포 내 농도를 증가시켜 배반포 발달율이 증가하게 되는데 이는 성숙된 정자를 받아들인 난자가 수정과정에서 세포질로 받아들인 정자의 팽화 현상에도 역시 GSH가 필요하다고 알려져 있어 이는 체외 성숙과 발생에 도움이 되는 것으로 알려져 왔다 (Takahashi 등, 1993; de Matos 등, 1996, 1995; Nagai, 2001).

또한 최근 연구에 따르면 OPU유래 난자의 배반포 생산의 효율도 증진 시키는 것으로 보고되었으며 내동성과 임신율에 영향을 주지 않는 것으로 알려졌다(Merton 등, 2013). 그러므로 본 연구에서는 회소난우의 수정란을 대량생산함과 동시에 생축가축유전자원을 확보하고 동결유전자원으로 활용하기 위하여 cysteamine이 회소난우(흑우, 흰소)의 OPU유래 수정란 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

본 연구에 사용된 cysteamine, TCM 199, sodium pyruvate, glutamine, fatty acid free bovine serum albumin (FAF-BSA), antibiotics antimicrobics, MEM-nonessential aminoacids, BME-essential amino-acid, thiophylline 와 FSH는 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) 제품을 사용하여 실험을 실시하였다

1. 시험축 선정

본 연구에 사용된 한우는 국립축산과학원의 실험동물윤리위원회의 승인을 얻어 실시하였다(승인번호 NIAS-2015159). OPU대상축으로 황우 2, 백우 1, 및 흑우 3마리를 선정하여 실험을 공시하였고 4~8세 범위의 개체를 사용하였다 OPU를 실시하는 1달 전, 국립축산과학원이 정한 표준사양법에 따라 사육하였으며 건조로 사육을 실시하였다

2. 난자 채취와 체외 성숙

도축장에서 난소를 채취하고 0.85% 생리식염수에 세척하였으며 100U/ml penicillin과 100µg/ml streptomycin이 첨가된 동일한 용액에서 23~28℃에서 보존하여 실험실로 이송하였다. 도축후 6시간 안에 난소를 처리하였으며 난포에서 난자난구세포 복합체(COCs)를 18G 주사침으로 흡입하여 회수하였다. 회소난우(백우, 흑우)와 황우의 개체에서 OPU방법은 COCs를 주간 2회 초음파도구(MyLab 3D, Esate corp. Spain)를 이용하여 COCs를 흡입하였으며 이 때 7.5MHz의 질검용 프루브를 장착한 OPU가이드를 이용하여 난소를 관찰하였다 OPU시술 전 2% lidocaine용액(DAIHAN Pharm. Co. Ltd, Korea)을 이용하여 경막마취를 실시하였다그림 1에서 보는 바와 같이 시험에 공시된 난자는 세포질이 균일하고 난구세포가 온전한 난자(grade A and B)와 난구세포가 일부 떨어져 있으나 세포질이 균일한 난자(grade C)를 선별하였다 난자를 흡입하는 압력은 40~80mmHg 음압을 이용하였으며 난포액은 50ml 플라스틱 튜브에 회수하였고, 100µm 수정란 회수용 미세망으로 혈액과 세포 부유물은 제거하고 난자를 선별하였다 25mM Hepes를 함유한 TCM199 5~10ml로 흡입하였고, 5%

FBS 및 10IU/ml heparin이 포함되도록 조제하였다

성숙 배양액은 TCM199을 100ml 당 Hepes 0.298g, NaHCO₃ 0.22g을 정량하여 기본배양액으로 준비하고 항생제는 penicillin 50U/ml과 streptomycin 50 μ g/ml, FBS(Gibco, Korea) 5%, FSH 0.1U/ml 및 cysteamine 100 μ M을 첨가하여 5% CO₂로 조정된 배양기에서 22~23시간 성숙시켰다.

3. 체외 수정과 발생

성숙배양이 끝난 난자는 황우는 한우 후보씨 수컷(KPN 999)를 이용하여 수정을 실시하였으며 유전자원으로 선발된 백우와 흑우의 정액을 triladyl-egg yolk 희석액으로 동결한 스트로를 이용하여 수정하였다 기본 배양액으로 BO배지를 활용하였으며(Brackett과 Oliphant, 1975), 37도에서 45초간 용해된 동결정액을 calcium과 magnesium이 없는 PBS 6ml로 800g에서 7분간 원심 분리하여 세정하였다 정자의 활성도를 높이기 위하여 thiophillin 0.45 μ g/ml이 첨가된 BO배양액으로 4~6 \times 10⁶/ml 농도로 희석하였다. 체외 성숙된 난자 당 5~10 \times 10³개가 함유되도록 정자 부유액을 최종 부피가 25~50 μ l 소적이 되도록 첨가하였다. 체외 수정시간은 8시간으로 조정하였으며 수정된 난자를 체외 배양하기 위하여 COCs를 난자와 동일한 크기의 미세 유리관으로 흡입 및 배출을 반복하여 난구세포를 제거하였다.

난구세포가 제거된 난자는 mSOFai 발생용 배양액으로 옮겼으며 1% BME amino acid, 2% MEM non-essential amino acid, 3mg/ml FAF-BSA, 10 μ g/ml insulin 및 2mM taurine이 첨

가된 소적에서 2일 동안 5% CO₂, 5% O₂ 와 90% N₂로 조정된 배양기에서 초기 발생을 유도하였으며(Holm 등, 1999; Takahashi와 First 1992), 배양 3일째에 FBS 10%를 첨가하였다. 배양 3일과 8일에 수정란의 발생단계를 2세포기, 상실기 및 배반포 형성율을 관찰하여 조사 하였다.

4. 자료 분석

난자의 난할율 및 발생율은 student's t-test로 분석을 실시하였다. P-값이 0.05보다 낮은 실험군은 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주 되었다.

결 과

1. cysteamine이 도축장 유래 난소의 체외 발생에 미치는 영향
도축장 유래 난소에서 6시간 이내 실험실로 이송한 난소에서 난자를 채취하고 cysteamine 0, 0.1, 0.3, 0.9mM이 함유된 성숙배양액에서 체외 성숙을 실시하였다 각 처리군 당 A, B 급 난자를 무작위로 배치하고 22시간 동안 성숙된 난자를 체외수정에 이용되었으며 mSOFaa 배양액에서 8일 동안 체외 발생을 실시하였다. Table 1에서는 0.1mM 농도의 cysteamine을 처리한 실험군이 0.9mM 처리군에 비하여 2세포기 출현율이 유의적으로 높게 나타났으나 59.2% 대 35.6%, $P < 0.05$ 대조군과 0.3mM 처리군과는 유의적 차이가 나타나지 않았다 ($P > 0.05$). 그러나, 상실기로 발생하는 수정란은 0.9mM 처리

Table 1. Effect of cysteamine during IVM of slaughterhouse derived oocytes on *in vitro* embryonic development

Treatment (mM)	No. of COCs	No. of matured oocyte (% \pm SD)		
		2 cell	Morula	Blastocyst
Control	56	27 (48.2 \pm 8.5) ^a	15 (26.8 \pm 6.2) ^a	11 (19.6 \pm 2.5) ^a
0.1	59	35 (59.3 \pm 4.1) ^b	25 (42.4 \pm 2.5) ^b	18 (30.5 \pm 4.4) ^b
0.3	57	29 (50.9 \pm 10.1) ^b	20 (35.1 \pm 10.7) ^a	17 (29.8 \pm 7.3) ^a
0.9	59	21 (35.6 \pm 4.2) ^b	8 (13.6 \pm 2.6) ^c	7 (11.9 \pm 7.6) ^a

^{a, b} Values with different superscripts in column differ significantly ($P < 0.05$).

Table 2. Developmental competence of OPU oocytes from rare Korean lines and slaughterhouse derived oocytes

Origin of oocytes (line)	No. of COCs	No. of matured oocyte (% \pm SD)		
		2 cell	Morula	Blastocyst
SH ¹ (Hanwoo)	124	77 (62.1 \pm 9.1) ^a	49 (39.5 \pm 5.5) ^a	34 (27.4 \pm 7.8) ^a
OPU (White)	62	49 (79.0 \pm 6.3) ^b	32 (51.6 \pm 12.4) ^b	26 (41.9 \pm 15.1) ^b
OPU (Red)	42	31(73.8 \pm 17.4) ^b	17 (40.5 \pm 18.1) ^a	11 (26.2 \pm 19.1) ^a
OPU (Black)	22	21 (81.8 \pm 34.4) ^b	10 (45.5 \pm 28.2) ^a	8 (36.4 \pm 27.6) ^a

^{a, b} Values with different superscripts in the same column differ significantly ($P < 0.05$).

¹ means slaughterhouse derived oocytes that were matured with 0.1mM cysteamine.

군에서 유의적으로 낮게 나타났고(13.6%), 0.1mM 처리군의 상실기 발생율이 대조군에 비하여 유의적으로 높게 관찰되었다 (26.8% 대 42.4%). 0.1mM 처리군의 배반포 발생율은 실험군과 0.9mM 처리군에 비하여 유의적으로 높은 수치가 관찰되었으나 (19.6%, 30.5% 및 11.9%), 0.3mM 처리군의 발생율 (30.5% 대 29.8%)과 차이가 존재하지 않았다($P > 0.05$).

2. OPU유래 난자 발생에 cysteamine이 미치는 영향

Table 2에서는 도축장 유래 난소에서 채취한 난자와 백우, 황우, 흑우에서 OPU를 실시하여 채취한 난자를 0.1mM cysteamine을 첨가한 배양액에서 22시간 성숙시키고 체외수정을 실시하였다. mSOFaa 배양액에서 8일 동안 체외 발생을 유도하였을 때, 2세포기, 상실기 및 배반포기의 발생율을 조사하면, 2세포기의 발생율은 백우, 흑우, 황우가 각각 79.0%, 73.8%, 81.8%로 관찰되었으며 백우의 2세포기 발생율은 도축난소 유래 난자의 난할율보다 유의적으로 높게 관찰되었다. 상실기와 배반포의 출현율은 백우의 OPU유래 수정란은 51.6%와 41.9%로 관찰되었으며 황우는 40.5%와 26.2%, 흑우

에서는 45.5% 및 36.4%로 관찰되었다. 그림 2에서 보는 바와 같이 백우와 흑우의 OPU유래 난자는 부화 배반포로 발생하였으며 도축장 유래 난자보다 백우 OPU유래 난자 발생율이 유의적으로 높은 것으로 관찰되었다($P < 0.05$).

고 찰

본 연구는 우리나라의 가축유전자원을 수집하고 보존하는 방법을 개발하기 위하여 종축의 증식 효율이 가장 높일 수 있는 방법으로 판단되는 난자생검법(OPU)을 실시하였다. 회수된 난자는 체외에서 성숙수정한 후, 체외 발생시키는 방법으로 백우와 흑우의 암컷에서 배반포를 생산하였다.

초음파 장비를 활용하여 난자를 흡입하는 방법은 체외 수정기법과 함께 배반포 생산 효율을 최적화하기 위하여 가장 우수한 난자를 얻을 수 있다. 또한, 소 난자의 체외 성숙과정에서 중요한 기능을 담당하고 있다고 알려진 cysteamine 첨가하여 수정란 생산방법을 검토하였다. cysteamine의 이용성은

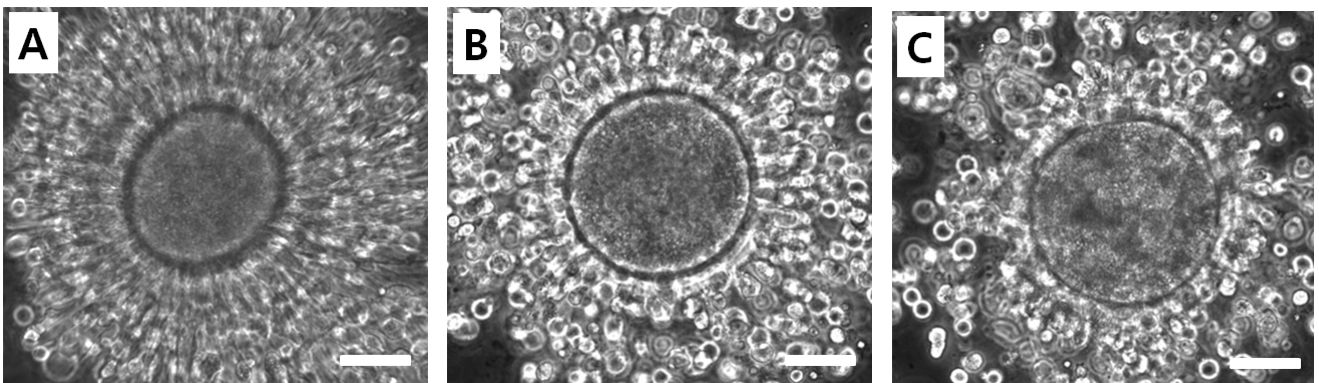


Figure 1. Images of slaughterhouse derived matured oocytes for 22h. Morphologically good COCs (grade A and B) and partially detached COCs (grade C) were used for in vitro fertilization. The scale bar represents 50 μ m.

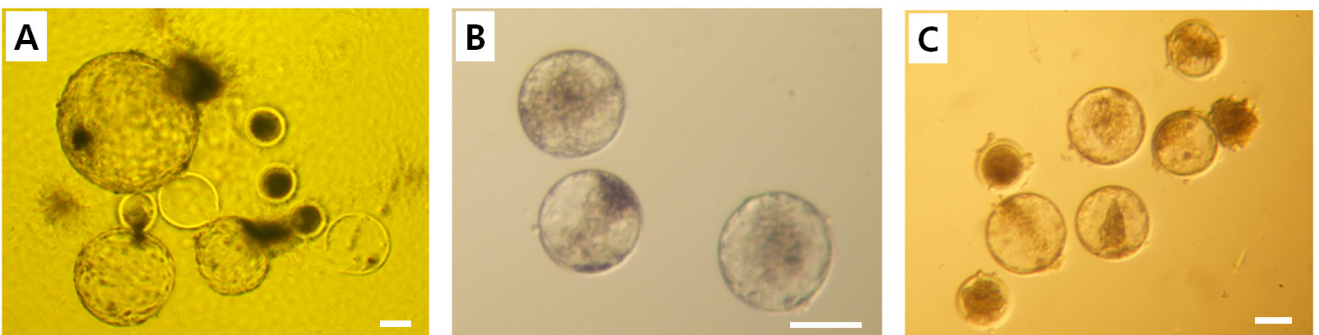


Figure 2. Images of OPU derived Korean rare blastocysts. Morphologically healthy blastocysts were shown at (A) Day 9 culture of Hanwoo line of embryos (IVP rate was 57.1%), (B) Day 7 culture of Black hanwoo line (42.8%) and (C) Day 7 culture of White Hanwoo (75.0%). The scale bar represents 100 μ m.

소의 난자에서 처음 기능이 알려지기 시작하여 돼지의 난자 성숙에도 중요한 인자라고 알려져 있으며(Merton 등, 2013), 염소 난자의 체외수정 연구에도 우수한 결과가 보고되었다(Urdaneta 등 2004). Cysteamine 분자는 구조적으로 한쪽은 thiol기(-SH)를 가지면서 다른 한쪽은 아미노(-NH₂)기를 가진 물질(NH₂CH₂CH₂SH)로서 아직까지 정확한 분자적 기작을 알지 못하나, 세포질 내 glutathione(GSH)농도를 증가시키는 것으로 보고되었다. 산화형 glutathione(GS-SG)을 활성형인 환원형 glutathione(GSH)으로 바꾸거나 glutathione을 재합성할 때 필요한 cystein 유리 아미노산의 공급을 담당하는 것으로 추정되고 있다(Zmuda와 Friedenson 1983). 사람의 혈장에서는 cysteamine의 농도가 0.1 μ M 이하로 매우 낮은 농도로 존재하고 있으나, 수정란이 배양될 때 배양액에 존재하는 cystein은 산화형 glutathione과 같이 산화형(cystine)으로 전변되기 쉽다. 이러한 현상은 사람에게 있어서 유전질환에서도 나타나는데 세포질 안에서 아미노산이2개 결합된 cystine의 배출되지 못하는 유전적 질병(Fanconi syndrome, cystinosis)이 존재한다. 이 경우, 유전질환 치료제로서 cysteamine은 고아신약으로 처방되는데 lysosome에 농축된 cystine의 환원에 사용되어 배출을 용이하도록 돕는 기능이 있다(Theone 등, 1976). 그러나 포유류 난자와 수정란에서 가장 중요한 기능은 glutathione의 산화환원의 평형 상태를 유지하는 기능이라고 알려져 있어 소의 수정란 생산에 도움을 주는 것으로 판단되었다(Wilmet 등, 2011).

회소한우의 체외 수정란을 체외에서 대량생산하여 유전자원을 확보하는 방법은 OPU기법이 가장 우수하다고 판단되는데 이는 단기간에 지속적으로 배반포를 생산하는 방법이기 때문이다. 본 연구에서는 백우(한우 알비노 변이종)의 경우 1달 동안 총 8회의 OPU시술로 체외수정에 사용가능한 우수한 난자를 62개 회수하였으며 총 26개의 이식 가능한 수정란을 생산하였다. 41.9%의 배반포 생산율은 도축유래 난자의 배반포 생산율(30.5%)보다 높은 수치로 관찰되었으며 이는 OPU 유래 난자의 질적 균일성이 도축장 난소유래 난자보다 더 우수하기 때문인 것으로 추정된다. 그러나 본 연구에 사용된 회소 한우의 수가 백우 1두, 흑우 3두로 충분하지 않기 때문에 추후 연구를 통하여 자료 확보가 더 필요한 것으로 판단된다. 또한 시험에 공시된 3마리의 흑우 중 2마리는 난포 낭종을 가진 개체로 난소에서 회수가 가능하다고 판단되는 난포의 개수가 평균 3.3개로 백우나 황우보다 매우 낮았다(미발표 자료). 흑우의 경우, 평균 36.4%의 배반포 형성율에서 관찰되는 매우 높은 수치의 표준편차는 이 개체에서 OPU유래 난포를 회수하지 못한 성적에 기인하였다. 즉, 흑우 3마리에서 1달에 걸쳐 총 18회 OPU시술 중에서 9회는 난자를 회수하지 못한 경우가 발견되었으며 이러한 수치는 OPU성적도 개체의 건강상태에 따라 변이가

매우 크게 나타난다는 것을 의미하고 있다. 흥미로운 점은 난포낭종을 가진 개체에서는 회수한 난자도 cysteamine이 함유된 배양액에서 성숙이 되어 배반포를 생산할 수 있음을 알 수 있었으며 이는 난포 낭종을 가진 도태 대상 유전자원에서도 OPU기법을 적용할 때 후대를 생산하거나 수정란의 동결을 통하여 유전자원을 생산할 수 있다는 것을 증명하였다. 생체의 난소를 다루는 방법은 많은 어려움이 존재하기 때문에 혈액이 오염될 가능성이 많으며(Ginther 등, 1997), 시술자의 숙련도에 따라 난포 내 난자의 회수율이 차이가 심하다고 알려져 있으나 회수된 난자의 질은 도축장 유래 난소보다 더 우수한 것으로 관찰되었고 이는 다른 연구자의 결과와도 동일하다고 판단된다. OPU과정 중에서 난자의 회수율과 배반포 발생 효율은 독립적이라는 것을 관찰할 수 있었는데 이는 Tamassia 등(2003)에 의하여 발표된 결과와도 동일하며 아마도 어미 소의 영향력이 더 큰 것으로 사료되었다. 그러므로 이러한 효과를 관찰하기 위하여 더 많은 유전자원축이 OPU 유래 난자의 성숙, 체외 수정 후 배반포 연구에 필요하며 이는 동결유전자원 확보에 중요한 기술로 판단된다.

결론

본 연구에서는 회소한우 중 가장 개체수가 적게 보유하고 있는 백우와 흑우를 중심으로 후대의 생산과 동시에 동결 유전자원을 확보하는 방법을 강구하기 위하여 cysteamine을 OPU유래 난자의 성숙과정에 이용하는 방법을 검토하였다. cysteamine의 첨가효과는 0.1mM이 최적으로 보고되었으며 이 농도를 회소한우의 OPU유래 난자의 성숙에 사용되어도 높은 성적의 배반포 발생율이 관찰되었다. 그러므로 0.1mM cysteamine을 이용하여 난자를 성숙하는 방법은 난자의 성숙에 도움이 되며 체외 성숙에서 발생능력을 잃어버릴 수 있는 난자를 회복시키는데 도움이 됨을 배반포 형성율을 관찰함으로써 증명하였다.

사사

본 연구는 2016년도 농촌진흥청 연구사업(세부과제명: 최소의 번식학적 특성 분석연구, 세부과제번호: PJ010293042016)과 2016년도 농촌진흥청 국립축산과학원 박사후연수과정 지원 사업에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

- Boni R. 2012. Ovum pick-up in cattle: a 25 yr retrospective analysis. *Anim. Reprod.* 9:362-369.
- Boni R, Roelofsens MWM, Pieterse MC, Wurth YA and Kruip TAM. 1992. Ovum Pick-Up and embryoproduction *in vitro*: an established procedure in cattle. In: Proceedings of the VIII Congress. Europ. Emb. Transf. Assoc. Lyon, France. Lyon: AETE. pp. 128 (Abstract).
- Bousquet D, Twagiramungu H, Morin N, Brisson C, Carboneau G and Duroche J. 1999. *In vitro* embryo production in the cow: An effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology* 51:59-70.
- Brackett BG and Oliphant G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.* 12:260-274.
- Callesen H, Greve T and Christensen F. 1987. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocyte, *Theriogenology* 27:217 (Abstract).
- de Matos DG and Furnus CC. 2000. The importance of having high glutathione level after bovine *in vitro* maturation on embryo development: Effect of b-Mercaptoethanol, Cysteine and Cystine. *Theriogenology* 53:761 - 771.
- de Matos DG, Furnus CC, Moses DF and Baldassarre H. 1995. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 42:432 - 436.
- de Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Martinez AG 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.
- Edwards RG. 1965. Maturation *in vitro* of human ovarian oocytes. *Lancet* 286:926 - 929.
- Ginther OJ, Kot K, Kulick LJ and Wiltbank MC. 1997. Sampling follicular fluid without altering follicular status in cattle: oestradiol concentrations early in a follicular wave. *J. Reprod. Fert.* 109:181-186.
- Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T and Callesen H. 1999. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* 52:683 - 700.
- Takahashi Y and First NL. 1992. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 37:963 - 978.
- Tamassia M, Heyman Y, Lavergne Y, Richard C, Gelin V, Renard JP and Chastant-Maillard S. 2003. Evidence of oocyte donor cow effect over oocyte production and embryo development *in vitro*. *Reproduction* 126:629-637.
- Thoene JG, Oshima RG, Crawhall JC, Olson DL and Schneider JA. 1976. Cystinosis. Intracellular cystine depletion by aminothiols *in vitro* and *in vivo*. *J. Clin. Invest.* 58:180-189.
- Kruip TA, Pieterse MC, van Beneden TH, Vos PL, Wurth YA and Taverne MA. 1991. A new method for bovine embryo production: a potential alternative to superovulation. *Vet. Rec.* 128:208-210.
- Kruip TA, Boni R, Wurth YA, Roelofsens M, Pieterse MC. 1994. Potential use of Ovum Pick-Up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology* 42:675-683.
- Lenz S and Lauritsen JG. 1982. Ultrasonically guided percutaneous aspiration of human follicles under local anesthesia: a new method of collecting oocytes for *in vitro* fertilization. *Fertil. Steril.* 38:673-677.
- Litynski GS. 1997. Raoul Palmer, World War II, and transabdominal coelioscopy. *Laparoscopy extends into gynecology. J. Soc. Lap. Surg.* 1:289-292.
- Merton JS, Knijn HM, Flapper H, Dotinga F, Roelen BA, Vos PL and Mullaart E. 2013. Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation of slaughterhouse and opu-derived bovine oocytes improves embryonic development without affecting cryotolerance, pregnancy rate, and calf characteristics. *Theriogenology*. 80:365-371.
- Nagai T. 2001. The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology* 55:1291 - 1301.
- Pieterse MC, Kappen KA, Kruip TA and Taverne MA. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30:751-762.
- Pieterse MC, Vos PL, Kruip TA, Willemse AH and Taverne MA. 1991. Characteristics of bovine estrous cycles during repeated transvaginal, ultrasound-guided puncturing of follicles for ovum pick-up. *Theriogenology*. 35:401-413.
- Simon L, Burgartz L, Rath D and Niemann H. 1993. Repeated bovine oocyte collection by means of a permanently rinsed ultrasound guided aspiration unit. *Theriogenology* 39:312 (Abstract).

- Stephoe PC and Edwards RG. 1970. Laparoscopic recovery of preovulatory human oocytes after priming of ovaries with gonadotropins. *Lancet* 295: 683-689.
- Takahashi M, Nagai T, Hamano S, Kuwayama M, Okamura N and Okano A. 1993. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biol. Reprod.* 49:228-32.
- Urdaneta A, Jiménez AR, Paramio MT and Izquierdo D. 2004. Cysteamine, glutathione and ionomycin treatments improve *in vitro* fertilization of prepubertal goat oocytes. *Zygote*. 12:277-284.
- Van der Schans A, Van der Westerlaken LAJ, De Wit AAC, Eyestone WH and De Boer HA. 1991. Ultrasound-guided transvaginal collection of oocytes in the cow. *Theriogenology* 35:288 (Abstract).
- Wilmer MJ, Kluijtmans LAJ, van der Veldena TJ, Willems PH, Schefferd PG, Masereeuw R, Monnensf LA, van den Heuvela LP and Levtchenko EN. 2011. Cysteamine restores glutathione redox status in cultured cystinotic proximal tubular epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1812:643-651.

Received July 18, 2016, Revised September 07, 2016,
Accepted September 30, 2016