

FDA를 이용한 소 난포란의 생사 판정

김중계 · 박세필*

제주대학교 농과대학 동물자원과학과

The Use of Fluorescein Diacetate(FDA) to Assess Oocyte Viability in the Bovine

J. K. Kim and S. P. Park*

Department of Animal Biotechnology,
College of Agriculture, Cheju National University

SUMMARY

This experiment was carried out to determine the possibility of using FDA on the selection of viable bovine immature oocytes. The results obtained in these experiments were summarized as follows:

1. The rates of nuclear maturation(metaphase II) of bovine oocytes according to FDA concentration were 92.5%(37/40) in the control and those rates in the dilution of FDA to 1:400,000, 1:800,000 and 1:1,600,000 were 74.4%(67/90), 80.3%(38/46) and 71.1%(32/45), respectively.
2. The fertilization rate(≥ 2 -cell) in the control was 72.2%(39/54) and those rates in the dilution of FDA to 1:400,000, 1:800,000 and 1:1,600,000 were 28.8%(23/80), 66.7%(32/48) and 62.2%(28/45), respectively. In these results, appropriate concentration of FDA to bovine immature oocytes was 1:800,000.
3. Effect of FDA treatment to the blastocyst development of bovine oocytes was indicated that control was 22.2%(18/81) and FDA treatment groups which were classified to strong, partial and weak were 21.4%(36/168), 14.5%(9,62) and 0%(0/15), respectively.

This result suggested that in vitro development to the blastocyst was severely reduced except strong group according to the FDA fluorescent level($P < 0.05$) and that using FDA is possible to select of bovine oocytes.

(Key words : FDA, Bovine, Immature oocytes, Nuclear maturation)

본 연구는 1994년도 한국과학기술재단 연구비 지원에 의해서 수행되었음.

*마리아 산부인과 기초의학연구소(Maria Infertility Medical Institute)

I. 서론

일반적으로 체내, 체외생산된 수정란의 경우 동결 및 용해 후 수정란을 광학현미경으로 관찰했을 때 외관상으로는 할구의 파괴나 변형이 없었을지라도 이미 발육능력을 소실하거나 대사작용이 정지된 수정란 등이 존재하게 된다. 이러한 수정란의 생존성을 판정하는 방법으로서 (1)현미경에 의한 형태학적 판정방법, (2)CO₂ 배양기에 의한 난자 배양방법, (3)DAPI test(4', 6'-diamino-2-phenyl-indole), (4)FDA test(3', 6'-diacetyl-fluorescein) 그리고 최종적으로 (5)직접 이식방법 등이다(Kim 등, 1992). 이들 방법 중 FDA test는 그 처리가 간단하고, 단시간(2분~5분)에 생사 판정이 가능하며 일부의 분할구의 죽은 부분까지도 생사가 판정되어 등급별로도 구분할 수 있을 뿐만 아니라 생사 판정이 불가능한 난포란(follicular oocyte), 배란된 성숙난자, 배반포기 혹은 부화 배반포기배도 명확하게 판정 가능하다. 더우기 난자 발육에 해가 없으며 현미경 하의 형태학적 관찰보다 정확성을 10% 증가시킬 수 있으므로(Schilling 등, 1982) 처리별 비교시험에서는 정확성을 기대할 수 있고 같은 시일에 많은 시험을 수행할 수 있는 장점이 있다(Kim 등, 1994). FDA test는 최초로 Rotman과 papermaster(1966)에 의해 체외배양 수정란의 생존성을 측정하는데 사용된 이래, bovine(Schilling과 Dopke, 1978; Schilling 등, 1979, 1982; Frank 등, 1986), mouse(Leibo와 Mazur, 1978; Linda와 Trounson, 1980), rabbit(Schilling과 Dopke, 1978; Schilling 등, 1979), pig oocyte(Didion 등, 1990) 등에서 수정란의 생사 판정에 사용되었으며, 국내에서도 최근 mouse 수정란에서 Kim 등(1988, 1994), Kang 등(1989), 돼지수정란에서는 Lee 등(1992), Kim 등(1992)이, 그리고 rat 난포란과 수정란에서

Ko 등(1996)이 동결 용해 후 FDA test에 의한 생존성 판정을 보고한 바 있다.

따라서 본 실험은 소 난포란의 ovum bank의 일환으로서 동결에 앞서 양질의 미성숙 난포란을 확보할 목적으로 적정농도의 FDA로 판정하고 그와 동시에 체외수정과 배 발달에 미치는 영향을 검토하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 소 미성숙 난포란의 회수 및 체외성숙

공시난자는 Park 등(1995)의 방법에 준하여 회수하였다. 도축장에서 도살된 holstein 성숙우의 난소를 생리식염수(0.9% NaCl + penicillin G 0.075g/l + streptomycin sulfate 0.05g/l)가 들어있는 보온병(32±2°C)에 넣어 1시간 이내에 운반하고, 2~6mm의 가시난포로부터 18 gauge needle-10ml 주사기를 이용하여 난포란을 회수하였다. 회수된 난포란은 0.1% BSA가 함유된 TALP-HEPES 배양액으로 3회 세척한 후, 0.2mM Na-pyruvate, 10% fetal bovine serum, 1μg/ml gentamycin이 첨가된 TCM-199(Gibco) 50μl 소적에 침지하여 체외성숙을 유도하였고, 또한 일부의 난자는 FDA test 후 발광정도에 따라 strong, partial과 weak로 나누어 체외성숙을 유도하였다(Fig. 1. A, B).

2. 체외수정

체외수정을 위한 정자는 동결정액을 용해하여 discontinuous percoll column(각각 2ml의 45%와 90% percoll)의 상층에 부유시키고 700×g에서 15분간 원심하여 침전된 부위에서 회수한 후 Sp-TALP 배양액으로 2.5×10⁷cells/ml의 농도로 조정하여 준비하였다. 체

외수정은 22~24시간 동안 체외성숙된 난자를 Sp-TALP 배양액으로 3회 세척하고 2ul의 heparin(2 μ g/ml)과 2ul의 PHE(penicillamine 18.2 μ M, hypotaurine 9.1 μ M, epinephrine 1.8 μ M)가 첨가된 수정용 소적(Fert-TALP : 44ul/drop)에 옮겨 2ul의 농축정액(5×10^5 cells/ml)을 첨가하여 체외수정을 실시하였다 (Rosenkrans 등, 1993).

3. 체외수정란의 배양

체외수정 44 \pm 2시간 후 난할배(≥ 2 -cell)는 cumulus cell을 제거한 뒤 3mg/ml의 fatty acid-free BSA가 첨가된 CR1(Rosenkrans 등, 1993) 배양액에서 2일간 배양하고, 10% fetal bovine serum이 첨가된 CR1배양액을 4 일간 추가배양하여 배반포기배까지의 발달을 조사하였다.

4. FDA test

FDA-stock solution은 fluorescein diacetate(Sigma, cat. no. F-7378) 5mg을 1ml acetone으로 용해하여 제조하였으며, 이를 1:400,000, 1:800,000 및 1:1,600,000의 비율로 PBS에 희석하여 FDA 처리군에 이용하였다. 처리군의 미성숙 난포란은 이와같이 제조된 FDA 용액에 3분동안 평형시키고 m-PBS로 3회 세척한 후 성숙용 배양액에서 배양하여 수정 및 배발달을 유도하거나 또는 형광현미경으로 FDA의 발광정도에 따라 strong, partial 과 weak로 생사를 판정한 후 성숙용 배양액에서 배양하여 수정 및 배발달을 유도함으로써 FDA 적정농도와 FDA가 배발달에 미치는 영향을 검토하였다(Schilling 등, 1979; Kim 등, 1992).

5. Hoechst처리에 의한 핵성숙도 검토

24시간 동안 체외성숙된 난자는 2% forma-

lin 용액에 2~3분간 처리하고 TL-HEPES 배양액으로 3회 세척한 후 slide glass위에 놓고 coverslip으로 덮어 현미경상에서 잘 나오도록 누르며 2.5 μ g/ml의 bisbenzimidazole(Hoechst no. 33342) 용액으로 채워 UV filter가 장착된 형광현미경에서 관찰하였다. 또한, 난포란의 성숙은 metaphase II (MII)를 기준으로 검토하였다(Fig. 1. C, D).

6. 실험내용

실험 1 : FDA 희석배율이 미성숙 난포란의 핵성숙에 미치는 영향

미성숙 난포란을 1:400,000, 1:800,000 및 1:1,600,000의 FDA에 3분간 노출하여 충분히 세척하고 형광 현미경 하에서 그 광도를 비교한 다음 체외성숙용 소적 내에서 22~24시간 동안 체외성숙을 유도하고 다시 Hoechst로 염색한 후 형광현미경 하에서 관찰하여 MII 상태를 기준으로 체외성숙을 판정하였다.

실험 2 : FDA 희석배율이 수정율에 미치는 영향

미성숙 난포란을 1:400,000, 1:800,000 및 1:1,600,000의 FDA에 3분간 노출하여 충분히 세척하고 형광 현미경 하에서 그 광도를 비교한 다음 체외성숙용 소적 내에서 22~24시간 동안 체외성숙을 유도하고 체외수정 후 44 \pm 2 시간 동안 배양하여 난할(≥ 2 -cell)을 기준으로 체외수정을 판정하였다.

실험 3 : FDA 1:800,000 처리가 난포란의 배발달에 미치는 영향

미성숙 난포란을 1:800,000 FDA에 3분간 노출하여 충분히 세척하고 형광 현미경 하에서 그 광도를 확인한 다음 체외성숙용 소적 내에서 22~24시간 동안 체외성숙을 유도하고 체외

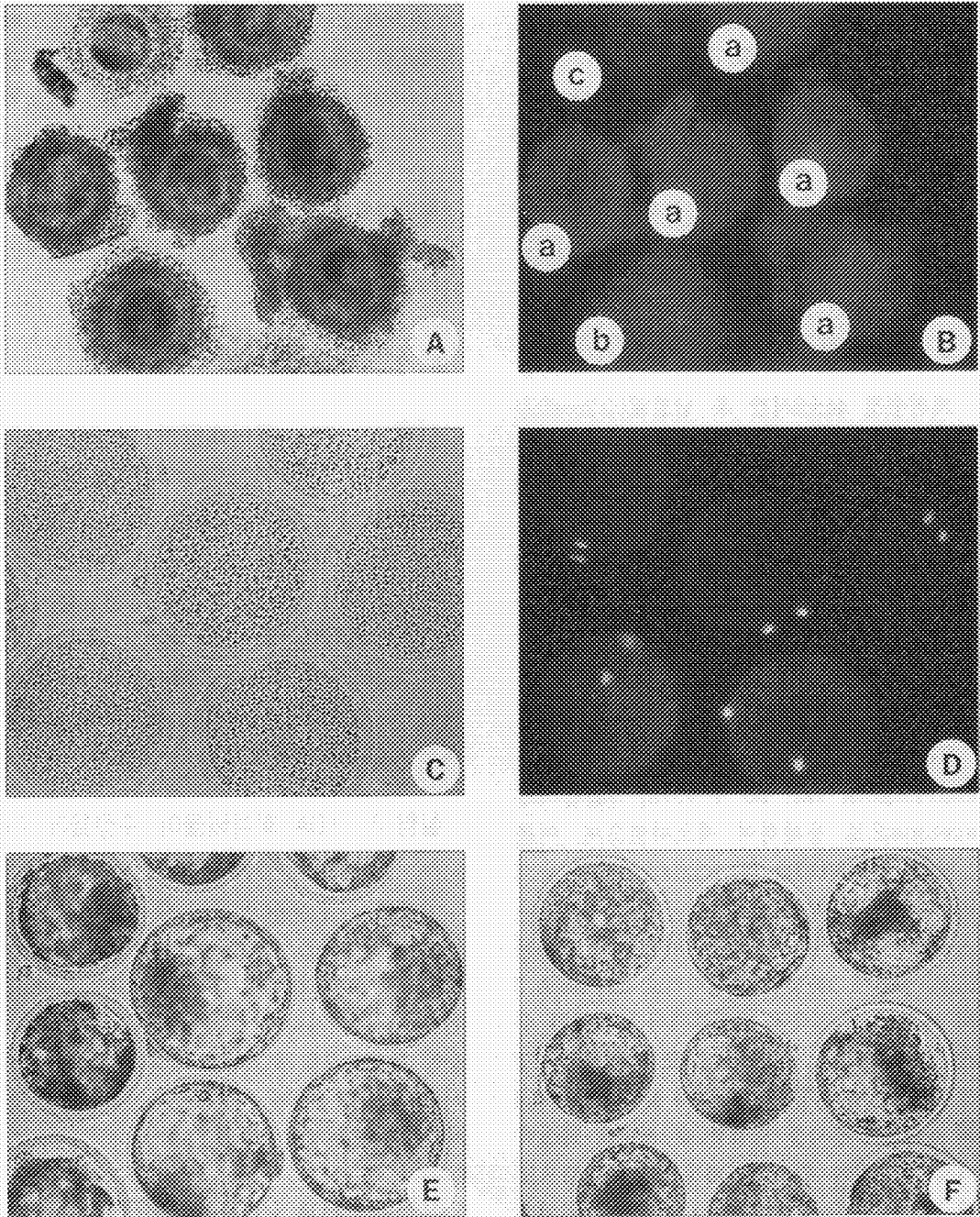


Fig 1. In vitro maturation and development of bovine oocytes tested by FDA.

A, B) Fluorescent level after FDA treatment of immature bovine oocytes(a:Strong, b:partial, c: weak).

C, D) Evaluation of maturity of FDA-tested oocytes by Hoechst 33342.

E, F) Development of bovine oocytes after FDA treatment(E:strong, F:partial)

수정하여 난할배(≥2-cell)를 제외배양용 배양액 내에서 6일간 배양한 후 대조군과 비교하여 FDA(1:800,000)가 배반포기배까지의 발달에 미치는 영향을 검토하였다.

실험 4 : FDA 1:800,000 처리후 발광정도에 따른 배발달을 비교

미성숙 난포란을 1:800,000 FDA에 3분간 노출하여 충분히 세척하고 형광 현미경 하에서 그 광도를 비교한 다음, 그 발광정도를 Schilling 등(1979)의 방법에 준하여 strong, partial 및 weak로 나누어 제외성숙용 소적 내에서 22~24시간 동안 제외성숙을 유도하고 제외수정하여 난할배(≥2-cell)를 제외배양용 배양액 내에서 6일간 배양한 후 배반포기배까지의 발달에 미치는 영향을 검토하였다(Fig. 1, E, F).

III. 결과 및 고찰

1. FDA 희석배율이 미성숙 난포란의 핵성숙에 미치는 영향

Hoechst 염색법을 통한 대조군의 경우 최종 성숙단계인 M II까지의 성숙율은 92.5% (37/40)였고, FDA처리군의 경우 희석비율 1:400,000, 1:800,000 및 1:1,600,000에서 각각 74.4% (67/90), 80.3% (38/46), 71.1% (32/45)의 성숙율을 나타내어 FDA처리군의 경우 대조군보다 대체적으로 낮은 성숙율을 보이거나(p<0.05) 처리군간에서는 농도와 관계 없이 유사한 성숙율을 나타내었다. 그러나 희석비율 1:800,000의 경우 대조군과 유사한 성적을 얻을 수 있었다. 이러한 결과는 FDA를 미성숙난포란에 처리하였을 때 적어도 핵성숙에는 유해한 영향을 미치지 않는것으로 사료되며 양질의 미성숙 난포란을 선별하는 데에

FDA 사용 가능성을 시사해 준다고 하겠다.

2. FDA 희석배율이 수정율에 미치는 영향

FDA를 미성숙난포란단계에서 처리한 후 수정율(≥2-cell)에 미치는 영향을 검토한 결과, 대조군의 경우 72.2% (39/54)를 나타냈고, 1:400,000, 1:800,000 및 1:1,600,000에서 각각 28.8% (23/80), 66.7% (32/48), 62.2% (28/45)의 수정율을 나타냈다. Table 1과 Table 2의 성적을 종합하여 볼 때, FDA 희석배율 1:800,000에서 대조군과 난포란의 처리시 FDA의 적정농도를 1:800,000으로 결정하였다.

Table 1. Effects of FDA to the bovine oocyte maturation in vitro

Treatment	No. of oocytes	No. of oocytes matured (%)
Control	40	37(92.5) ^a
1:400,000	45	34(75.6) ^b
1:800,000	46	38(80.3) ^{a,b}
1:1,600,000	45	32(71.1) ^b

* Maturation rate was defined as Meta-phase II stage.

^{a,b} Means in the column without common superscripts are significantly different (p<0.05).

Table 2. Effects of FDA to the bovine oocyte fertilization in vitro

Treatment	No. of oocytes	No. of oocytes fertilized (%)
Control	40	39(72.2) ^a
1:400,000	80	23(28.8) ^b
1:800,000	48	32(66.7) ^a
1:1,600,000	45	28(62.2) ^b

* Fertilization rate was defined as ≥2-cell embryos.

^{a,b} Means in the column without common superscripts are significantly different (p<0.001).

3. FDA 1:800,000 처리가 난포란의 배 발달에 미치는 영향

FDA 1:800,000 처리가 난포란의 배 발달에 미치는 영향을 검토한 결과, 난할율(≥ 2 -cell)은 대조군의 경우 74.3%(81/109), FDA처리군은 74.7%(62/83)이었으며 배반포기배까지의 발달율은 대조군의 경우 22.2%(18/81), 처리군은 14.5%(9/62)을 나타내었으며 유의차는 인정되지 않았다.

4. FDA 1:800,000 처리 후 발광정도에 따른 배 발달율 비교

FDA의 발광 정도에 따라 strong, partial, weak로 나누어 배 발달에 미치는 영향을 검토한 결과, 난할율은 strong과 partial의 경우 각

각 74.3%(168/226)와 70.5%(62/88)로서 유사하였으나 weak의 경우 55.5%(15/27)를 나타냈다($p < 0.005$). 또한 배반포기배 발달에 있어서도 각각 21.4%(36/168), 14.5%(9/62), 0%(0/15)을 나타내어 FDA의 발광정도의 감소에 따라 배 발달도 현저하게 감소되는 것을 알 수 있었다($p < 0.05$).

특히, FDA처리시 strong의 경우 배반포까지의 발달율은 21.4%로서 Table 3에 제시되었듯이 대조군의 배반포기배까지의 배 발달율(22.2%)과 비교했을 때 거의 유사한 배 발달율을 나타내 FDA를 통한 양질의 미성숙 난포란을 선별하는데 효과적으로 사용될 수 있다는 것을 알 수 있었다.

Table 3. Development rates of bovine oocytes after FDA treatment of 1:800,000 concentration

Treatment	No. of oocytes	Rate(%) of development			
		≥ 2 -cell	8-cell	Morula	Blastocyst
Control	109	81(74.3)	31(38.3)	24(29.6)	18(22.2)
1:800,000	83	62(74.7)	24(38.7)	15(24.2)	9(14.5)

Table 4. Development rates of bovine oocytes according to the fluorescent level after FDA treatment of 1:800,000 concentration

Fluorescent level	No. of oocytes	Rate(%) of development			
		≥ 2 -cell	8-cell	Morula	Blastocyst
Strong	226	168(74.3) ^a	81(48.2)	47(28.0)	36(21.4) ^a
Partial	88	62(70.5) ^{a,b}	28(45.2)	14(22.6)	9(14.5) ^{a,b}
Weak	27	15(55.5) ^b	3(20.0)	0(0.0)	0(0.0) ^b
Total	341	245*(71.8)	112(45.7)	61(24.9)	45(18.4)

^{a,b} Means in the same column without common superscripts are significantly different($p < 0.05$).

IV. 적요

본 연구는 미성숙 난포란을 선별함에 있어서 FDA 이용 가능성을 조사하고자 실시하였으며 요약된 결과는 다음과 같다.

1. FDA 농도변화에 따른 hoechst 염색법을 이용한 핵성숙율(Metaphase II)과 수정율을 조사한 결과, 핵성숙율의 경우 대조군은 92.5%(37/40)을 나타냈고 FDA 희석농도 1:400,000, 1:800,000 및

- 1:1,600,000 처리군은 각각 75.6(34/45), 80.3% (38/46), 71.1%(32/45)의 성숙율을 나타냈다.
2. FDA를 미성숙난포란 단계에서 처리한 후 수정율(≥ 2 -cell)에 미치는 영향을 검토한 결과, 대조군의 경우 72.2%(39/54)를 나타냈고 FDA 1:400,000, 1:800,000 및 1:1,600,000 처리군은 각각 28.8%(23/80), 66.7%(32/48), 62.2%(28/45)의 수정율을 나타내어 소 미성숙 난포란의 처리시 FDA의 적정농도는 1:800,000으로 결정하였다.
 3. FDA처리가 소 난포란의 배반포기배까지의 발달에 미치는 영향을 검토한 결과 대조군의 경우 2%(18/81)을 나타냈고 FDA 처리군의 경우 strong, partial, weak 각각 21.4%(36/168), 14.5%(9/62), 0%(0/15)의 배반포기배 발달율을 보여 strong군을 제외하고는 FDA의 발광정도의 감소에 따라 배발달도 현저하게 감소되어($p < 0.05$) FDA의 이용가능성을 시사하였다.

V. 인용문헌

1. Didion, B.A., D. Pomp, M.J. Martin, G.E. Homanics and C.L. Markert. 1990. Observation on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. *J. Anim. Sci.*, 68:2803~2810.
2. Frank, G.C., S.L. Coley, B. Betterbed and R.D. Page. 1986. The effect of freezer type, cryoprotectant and processing methods on viability of frozen embryos. *Theriogenology*, 26:134~144.
3. Kang, M.J., Y.H. Kim, S.H. Moon and J.K. Kim. 1989. Studies on the rapid freezing of mouse embryos : I. Effects of cryoprotectants concentration of the mouse embryo survival of the rapid freezing. *Korean J. Anim. Reprod.*, 13(3):134~1404.
4. Kim, J.K., C.K. Kim, M.J. Kang., D.J. Chang and S.H. Kim. 1988. Studies on simplified procedures for freezing and thawing of bovine embryos : IV. Effect of simplified procedures of freezing and seeding using a cryoprotectant containing sucrose on the rabbit embryo survival rate determined with the FDA test. *Korean J. Anim. Sci.*, 30(10):583~589.
5. Kim, J.K., M.S. Kang, K.G. Chang, G.R. Ko and B.C. Yang. 1992. Effects of the improvement of vitrification solution and FDA-test on the embryo survival and conception rate by ultrarapid freezing : II. Effects of the addition level of non-permeable cryoprotectants(ficol, sucrose) in vitrification solution and equilibration time on the survival of vitrified mouse embryos. *Korean J. Animal Reprod.*, 16(4):317~323.
6. Kim, J.K., B.C. Yang, S.H. Moon, G.R. Ko, M.S. Kang and D.J. Jang. 1994. Effects of FDA-test on the survival and conception rate in vitrified mouse embryos : I. Effects of addition levels of FDA(fluorescein

- diacetate) on survival and conception rate in vitrified mouse morulae. Korean J. Anim. Reprod., 18(1): 55~62.
7. Ko, H. J and J.K. Kim. 1996. Effects of the oocyte and developmental stages of the rat embryos after the vitrified freezing on the survival rate(FDA-test). Korean J. Emb. Trans., 11(1):41~50.
 8. Lee, B.K., S.K. Kim and K.S. Lee. 1992. Studies on the survival rates after slow and ultrarapid frozen-thawing of porcine embryos. Korean J. Anim. Reprod., 16(2):117~123.
 9. Leibo, S.P. and P. Mazur. 1978. Preservation of mammalian embryos by freezing. Academic Press, New york:179~197.
 10. Linda, R.M. and A.O. Trounson. 1980. The use of fluorescein diacetate to assess embryo viability in the mouse. J. Reprod. Fert., 58: 189~196.
 11. Park, S.P., S.E. Kim, S.J. Uhm, E.Y. Kim, T.O. Kim, S.H. Yoon, K.S. Chung and J.H. Lim. 1995. Effect of a simple serum-free medium, CR1, on the development of IVM/IVF bovine embryos. Korean J. Fertil. Steril., 22:105~108.
 12. Rosenkrans, C.F. Jr., G.Q. Zeng, G.T. McNamara, P.K. Schoff and N.L. First. 1993. Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. Biol. Reprod., 49:459~462.
 13. Rotman, B. and B.W. Papermaster. 1966. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 55:134~141.
 14. Schilling, E. and H.H. Dopke. 1978. A rapid diagnostic test for the viability of early cattle and rabbit embryos using diacetyl-fluorescein. Naturwissenschaften, 65:658~659.
 15. Schilling, E., D. Smidt, B. Sacher, D. Petac and S. El. Kaschab. 1979. Diagnosis of the viability of early embryos by fluorescence microscopy. Anim. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 19(5):1625~1529.
 16. Schilling, E., H. Niemann, and D. Schidt. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. In Vitro Fertilization and Embryo Transfer, 349~355.
- (접수일자 : 1997. 7. 21. / 채택일자 : 1997. 8. 20.)