

위한 것이다. 본 실험에 사용한 YS 배양액은 110 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂ · 2H₂O, 0.8 mM MgSO₄ · 7H₂O, 20 mM NaHCO₃ 및 5 mM KHCO₃로 완충액을 만든 다음 0.2 mM Taurine, 1 mM Glutamine 및 0.1 mM Insulin을 첨가하고 30 mM Sodium lactate, 0.4 mM Sodium pyruvate 및 10 ml Antibiotics antimycotic solution을 넣었으며 MEM 수준의 non-essential amino acid, RPMI 1640 수준의 amino acid 및 MEM수준의 vitamin 을 첨가하고 잘 혼합하여 제조하였다. 난구세포(Cumulus cell)의 채취는 난자를 난포액으로부터 회수할 때 성숙된 난자의 방사관 주위의 난구세포피를 30 gauge 바늘로 분리하고 잘 세척하였다. 0.0003%의 Hyaluronidase가 첨가되고 10% 난포액을 함유한 100-200 μL YS 배양액에서 난구세포피를 모아 pipette으로 흡인, 배출하면 Granular cell(단일세포)이 되는데 약 10,000개의 Granular cell들을 10 μl의 미세소적에서 배양하다가 3-4시간 후에 2PN 수정란을 배양할 수 있는 10% 난포액이 들어 있는 YS 배양액으로 교환하였다. 다음날 정상적으로 수정이 확인되면 미리 준비된 자신의 난구세포 미세소적에 2PN 수정란을 옮기고 24시간 간격으로 배양액을 교환하면서 난자채취 후 5일째까지 배양하고 Blastocyst 발생을 관찰하였다.

Blastocyst는 형태학적으로 Early Blastocyst(EB), Early Expanding Blastocyst(EEB), Middle Expanding Blastocyst(MEB) 및 Expanded Blastocyst(EdB)로 구분하였다. 한 환자에게 Blastocyst 수정란을 3개가 넘지 않도록 자궁에 이식하고 주기 6주(난자채취 약4주)후 G-sac수와 심장박동태아수를 관찰함으로써 착상율과 임신율을 조사하였다. 이상의 결과는 다음과 같다.

1. 난자채취 2일째에 4개 이상의 수정란이 양호한 세포분열을 하고 있는 환자 360명 중 5일째에 최소한 1개의 Blastocyst도 발생하지 않은 환자가 9명(2.5%)이 관찰되었다.

2. 360명의 환자로부터 2929개의 2PN 수정란을 4일간 배양하였을 때 1728개의 Blastocyst (59%)를 관찰할 수 있었으며 EB, EEB, MEB 및 EdB는 각각 513개 (17.5%), 360개 (12.3%), 366개 (12.5%) 및 489개 (16.7%)로 조사되었다.

3. 351명의 환자에게 1015개의 Blastocyst를 이식함으로써 한 환자에게 평균 2.89개의 Blastocyst가 이식되었다.

4. G-sac수와 심장박동 태아수는 각각 297개와 225개로써 이식된 Blastocyst의 착상율과 착상 진행율은 각각 29.3%와 22.2%로 관찰되었다.

5. Blastocyst를 이식한 351명의 환자 중 176명의 환자에서 임신 (50.1%)이 되었고 131명의 환자가 임신이 유지 (37.3%)되고 있다.

6. 임신이 유지되고 있는 131명의 환자 중에서 단태아 임신, 쌍태아 임신 및 삼쌍태아 임신은 각각 58명 (44.3%), 52명 (39.7%) 및 21명 (16.0%)으로 조사되었다.

자신의 난구세포(autologous cumulus cells)를 공동배양에 이용할 수 있게 됨으로써 다른 체세포를 이용할 때에 sub-culture 과정이나 viral screening 을 생략할 수 있어 보다 쉽고 간편하게 되었다. 또한 10% 난포액을 첨가한 YS 배양액에서 2PN 수정란을 난구세포와 공동배양하고 이를 자궁에 이식하였을 때 높은 Blastocyst 발생률, 착상율 및 임신율을 얻을 수 있다는 것은 IVF-ET program에 효율적 가치가 있다는 것을 시사하고 있다.

- 13 -

Effects of extracellular potassium concentrations on acrosome reaction, polyspermy, and pronuclear formation during in vitro fertilization in the pig

*Animal Resources Research Center,
Kon-Kuk University*

Joon-Gyo Lim · Nam-Hyung Kim
Hoon-Taek Lee · Kil-Saeng Chung

Potassium concentrations in the mammalian oviduct and uterus are particularly interesting due to its unusual high concentration (12-25

mM) compared with that in blood stream (3-6 mM). In this study we examined effects of various potassium concentrations in fertilization medium on acrosome reaction, polyspermy, and pronuclear formation. Porcine oocyte-cumulus cell complexes from ovaries were cultured in NCSU23 medium supplemented with 0.6 mM cysteine, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FSH, and 10% porcine follicular fluid for 42 h. After culturing for maturation, oocytes were co-cultured with spermatozoa in Tris-buffered medium containing 0, 3, 6 and 12 mM potassium supplemented with 5 mM caffeine and 0.4% BSA for 6 h. Potassium concentrations were varied by adjusting KCl. Osmolarity and Cl⁻ concentrations were maintained by adjusting NaCl concentration. Subsequent to IVF oocytes were cultured in NCSU23 supplemented with 0.4% BSA for 6 h. At 12 h after insemination, oocytes were fixed in ethanol and acetic acid (3:1, v/v) for 48 h, stained with 1% aceto-orcein, and examined sperm penetration and male pronuclear formation under phase contrast microscope. In absence of potassium in the fertilization medium, sperm penetration was not observed. Supplement with 3, 6, and 12 mM potassium in the fertilization medium resulted in high incidence of polyspermy. The incidence of polyspermy was significantly ($p < 0.05$) higher in the fertilization medium contained 6 or 12 mM K⁺ than in that contained 3 mM K⁺. The mean number of sperm penetrated in oocytes in medium with 6 and 12 mM potassium was higher ($p < 0.05$) than that in medium with 3 mM potassium. There was no difference in proportions (45~57%) of pronuclear formation among different potassium concentrations. Chlorotetracycline (CTC) analysis was used to determine the capacitation and acrosome reaction of spermatozoa incubated for 1.5 and 3 h after preincubation in the various concentrations of potassium. CTC analysis revealed three main fluorescence patterns,

uncapacitated F, capacitated B and acrosome reacted AR. For each potassium concentration, there was a significant shift from F to B and B to AR pattern with increasing potassium concentration. These results suggest that extracellular potassium is required for the sperm penetration and addition of extracellular potassium in the fertilization medium affects sperm capacitation and acrosome reaction which result in the high incidence of polyspermy.

- 14 -

Sexing of Bovine Preimplantation Embryos derived from IVF using Fluorescence *in situ* hybridization(FISH)

Department of Animal Science and Technology
Graduate School, Seoul National University

Jong Ho Lee · Seung Hak Lee ·
Kyung Soon Im

I. Construction of Bovine Y chromosome-specific Probe

Sex identification of preimplantation embryos is important to livestock for the control sex ratios. Several methods have been reported for bovine sex determination. Previous work in this area has utilized the polymerase chain reaction(PCR) to amplify Y-chromosome-specific sequences from a single cell in order to determine embryonic sex.

The purpose of the current studies was to develop an rapid, sensitive method for sex determination which use bovine Y chromosome-specific probe for FISH in order to detect this marker in bovine chromosome, sperm and embryos.