

Conclusions: Immediately after thawing, the testicular sperm did not showed motility. Although motility was gained after incubation, many cases the sperm remained non-motile until optimal insemination time. However, *in vitro* incubation of frozen-thawed testicular sperm showed positive reaction. And presence of motile- and viable sperm remarked HOS test could be an alternative method for the selection of viable sperm for ICSI.

B-17 DNA Synthesis and Sperm Mitochondria in Porcine Oocytes Following Porcine and Mouse Sperm Injection

Lee YJ, Kim BK and Kim NH

Department of Animal Science, Chungbuk National University, Cheong Ju, Chungbuk, Korea

Objective: To get insight into the nature of foreign mitochondria and syngamy during mammalian fertilization we compared fate of sperm mitochondria, DNA synthesis, and syngamy in porcine oocytes following microinjection of porcine or mouse spermatozoon.

Methods: At 8~10 and 18~20 hour following sperm injection, pronuclear movement, sperm mitochondria, and DNA synthesis were imaged with propidium iodide, mitotracker, and BrdU under confocal laser scanning microscope.

Results: Intracytoplasmic injection of either porcine or mouse spermatozoon activated porcine oocytes without additional parthenogenetic stimulation. Foreign mitochondria in either mouse or porcine sperm midpiece were introduced into porcine oocytes following sperm injection, but rapidly disappeared from the actively developing porcine oocytes. BrdU experiment showed new DNA synthesis in porcine oocytes following injection of mouse spermatozoon or sperm head. At 24 h after injection of mouse isolated sperm head or a spermatozoon, mitotic metaphase was seen in oocyte, but they did not go to normal cell division.

Conclusion: Pronuclear formation, foreign mitochondria disruption, DNA synthesis and syngamy during fertilization are not species specific processes.

B-18 생쥐 배반포기배의 초자화동결 · 초급속융해에 관한 연구

서울대학교 의과대학 산부인과학교실¹, 의학연구원 인구의학연구소²

성기형² · 김희선² · 오선경^{1,2} · 서창석^{1,2} · 김석현^{1,2} · 최영민^{1,2}

김정구¹ · 문신용^{1,2} · 이진용¹

목 적: 생쥐 배반포기배를 사용하여 초자화동결에 적절한 동결보존제와 방법을 확립하고자 하였다.

대상 및 방법: 6주령 F1 hybrid (C57BL/6×CBA/♂)를 과배란 유도하여 체외수정시킨 후 수정이 확인

된 2세포기 배아를 72시간 동안 체외배양하여 팽윤된 배반포기배만을 골라 EM grid에 얹어 초자화동결·초급속융해를 시행하였다. 일부는 대조군으로 처리없이 72시간 배양하여 부화율을 관찰하였다. 동결보존제로는 VS14 (1단계: 1.5 M Ethylene Glycol, 2단계: 5.5 M EG +1.0 M sucrose) 용액과 EFS40 (40% EG +18% Ficoll +0.5 M sucrose) 용액을 사용하였고 융해액으로는 1.0 M, 0.5 M, 0.25 M, 0.125 M sucrose 용액을 사용하였다. 초자화동결·초급속융해 후 6시간 후에 팽윤된 상태로 회복되는 배아를 관찰하였고 72시간 배양하여 각각의 부화율을 대조군과 비교하였다. 배양이 끝난 부화된 배아는 Hoechst 33258 (Sigma B2883)을 이용하여 염색한 후 형광현미경하에서 세포수를 관찰하였다.

결 과: 생쥐 배반포기배의 초자화동결·초급속융해 시 VS14와 EFS40의 회수율 (각각 97.5%, 97.3%) 과 생존율 (각각 100%)에는 유의한 차이가 없었다. 초급속융해 후 6시간 후에 다시 팽윤된 배아율은 VS14가 49.7%로 EFS40의 26.1%에 비해 유의하게 높았다. 융해 후 72시간 배양한 부화율 (Day 7)은 VS14와 EFS40이 각각 41.9%와 13.1%로 대조군의 87.8%에 비해 유의하게 낮았으나, VS14가 EFS40에 비해 유의하게 부화율이 높았다. Hoechst 33258를 이용하여 형광현미경하에서 세포수를 측정한 결과 배반포기시기에 대조군의 세포수 (86)에 비해 VS14와 EFS40 (각각 81, 88)이 유의한 차이가 없었으며, 부화된 배아의 세포수도 대조군의 세포수 (147)에 비해 VS14와 EFS40 (각각 122, 127)이 유의하게 낮았다. 그러나, VS14와 EFS40 사이에는 유의한 차이가 없었다.

결 론: 생쥐 배반포기배의 초자화동결에 있어 VS14 동결보존액을 사용하는 것이 EFS40 동결보존액을 사용하는 것 보다 적합하게 나타났지만 융해 후 72시간 배양 후 (Day 7) 부화율은 대조군에 비해서 유의하게 낮았다. 배반포기시기의 세포수는 대조군과 유의한 차이가 없지만 부화된 배아의 세포수는 대조군에 비해 유의하게 낮은 것으로 보아 고농도의 동결보존액이 배발달에 영향을 미치는 것으로 사료되며 이 점을 극복하기 위한 연구가 계속되어야 할 것이다.