韓國家畜繁殖學會誌 14(1) : 17~22(1990)
Korean J. Anim. Reprod.

體外成熟 및 受精된 牛 卵胞卵의 發生能

徐泰光・朴修奉・朴恒均

慶北大學校 農科大學

Developmental Capacity of Bovine Oocytes Matured and Fertilized *In Vitro*

Suh, T.K., S.B. Park and H.K. Park

College of Agriculture, Kyungpook National University

SUMMARY

The present study was carried to investigate the development potential of bovine follicular oocytes matured and fertilized *in vitro*. Bovine oocytes matured *in vitro* were fertilized, cultured, and transfered to the rabbit oviduct for *in vitro* culture to evaluate the development potential.

The rates of *in vitro* maturation, fertilization and polyspermy were 96%(355/369), 90%(320/355) and 15%(47/320), respectively. The percentage of oocytes cleaved after culture for 48 hours, to 2 cell, 3~4 cell, 6~8 cell stage were 17%(60/356), 21%(75/356) and 19%(67/356), respectively and overall cleavage rate was 57%(202/356).

The rate of recovered embryos after 5 days in rabbit oviduct was 56%(80/142), and 21%(17/80) of recovered embryos developed over morula stage.

Ⅰ. 緖 論

遺傳的으로 우수한 개체를 대량으로 생산하고자 하는 受精卵 移植技術의 산업화에 있어서 점차 제약조건으로 대두되고 있는 우수한 卵子의 확보방안으로서 소의 體外 受精技術이 각광을 받게 되었고 현재 활발한 연구가 진행되고 있다.

소의 體外受精技術을 이용한 受精卵의 활보는 소 卵胞卵의 體外 培養技術이 발달함에 따라 일반적으로 體外成熟된 卵胞卵을 凍結精液으로 受精시켜 受精卵을 확보하게 되었다(Fukui, 1989 ; Goto 等, 1989 ; Park 等, 1989).

그러나 受精卵 移植에 일반적으로 이용되는 桑實胚 또는 胚盤胞期胚의 확보는 현재까지의 체외 배양체계로서는 體外受精후 8~16 세포기에서 發生이 정지되는 block 현상을 극복하지 못하고 있으며 이러한 block 현상을 극복하기 위하여 體外受精卵을 토끼, 면양의 卵管내에서 일시배양하거나(Eyestone 等, 1985, 1987a ; Sirard 等, 1985, 1986), bovine fibroblast (Kuzan과 Wright, 1982), cumulus cell(Goto 等, 1989), trophoblastic vesicle(Camus 等, 1984), oviduct epitherial cell(Eyestone 等, 1987a)等과의 co-culture 방법을 이용하고 있다.

이에 體 연구는 體外成熟 및 受精된 소 卵胞卵의 發生에 대한 基礎知識을 얻기 위하여 體外成熟시킨 소 卵胞卵의 體外受精과 토끼난관내에서의 일시적 體內培養

에 의한 發生誘起에 관한 실험을 실시하여 다소의 成績을 얻었기에 그 結果를 報告한다.

II. 材料 및 方法

1. 供試材料

1) 公試動物

本 硏究에 供試된 卵胞卵은 부산 도축장(태강산업)에서 도살된 Holstein 암소중 년령, 체중 및 번식기록 등은 미상이나 정상생식기를 가진 개체의 卵巢에서 回收된 것으로서 卵巢는 도살 직후 적출하여 0.9% 생리식염수에 침지하고 보온병(36~37℃)에 담아 2 時間以內에 실험실로 운반하였다.

精液은 人工授精所에서 구입한 同種의 凍結精液을 이용하였으며 體外受精卵의 體內培養에는 New Zealand White種 암토끼를 供試하였다.

2) 培養液

卵胞卵의 體外成熟 및 體外受精卵의 發生을 위한 基體培養液으로는 TCM 199(Sigma, U.S.A)에 10% FCS, 0.02Au/ml FSH, 10 μg/ml LH, 1 μg/ml E_2, 11 mg/ml Na-pyruvate, 100 IU/ml penicillin G 및 50 μg/ml streptomycin sulfate가 添加된 培養液을 이용하였으며 사용전 0.2 μm millipore filter로 濾過除菌후 사용하였다. 卵胞卵 및 體內培養된 卵子의 回收와 精子處理用 基本 體內培養液은 BO液(Brackett와 Oliphant, 1975)에 1—mg/ml BSA를 添加하여 이용하였으며 精子의 受精能獲得 誘起에는 3 mg/ml BSA 및 2 mM caffeine을 添加후 이용하였다.

2. 試驗方法

1) 卵胞卵의 回收 및 成熟培養

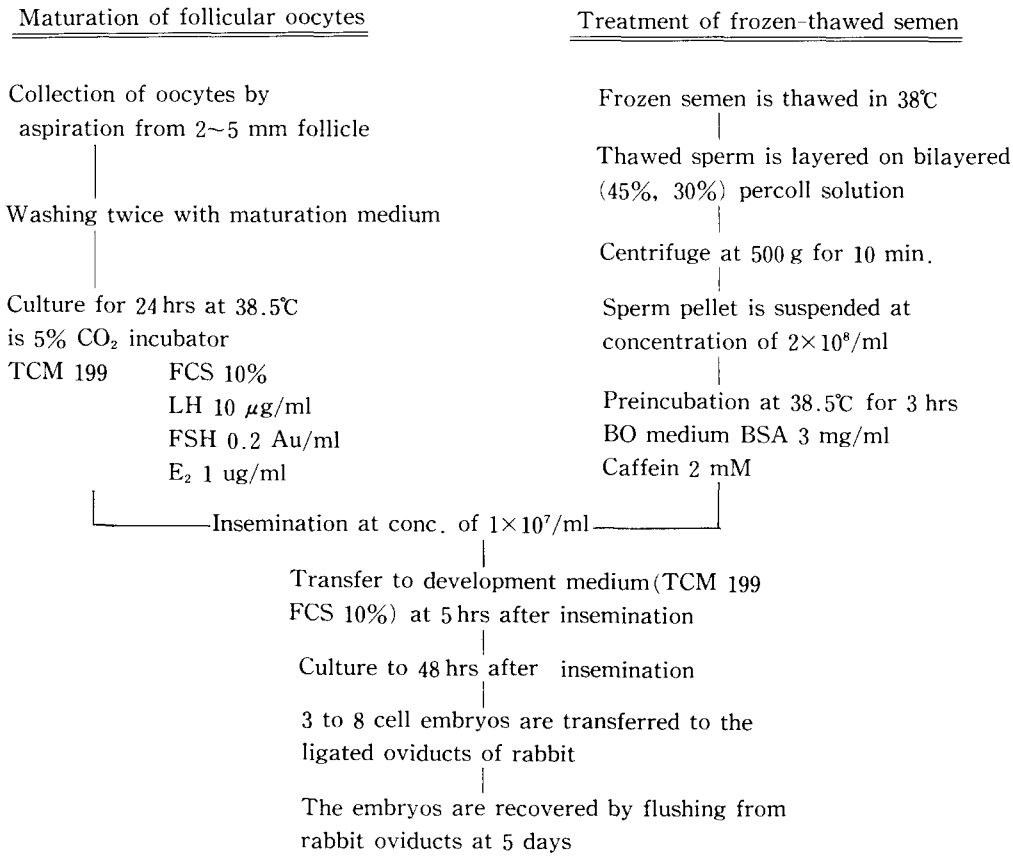

Fig. 1. Experimental procedure

本 試驗의 전체적인 과정은 그림 1과 같으며 卵胞卵의 回收는 0.9% 멸균 생리식염수로 卵巢 표면을 2회 세정후 2~5 mm 크기의 卵胞로부터 18 G 주사침이 부착된 주사기를 이용하여 흡입방법에 의해 回收하였다. 回收된 卵胞卵은 卵丘細胞가 치밀하게 부착된 卵胞卵만을 선별하였으며 體外成熟用 培養液으로 2회 세정하였다.

卵胞卵 培養은 前述한 體外成熟用 培養液 200 μl 小滴을 流動 paraffin oil로 피복한 다음 5% CO_2, 95% 공기, 38.5℃ CO_2 培養器內에서 5~6時間 平衡시킨 후 이 培養液 小滴에 卵胞卵을 沈漬하여 24時間 培養하였다.

2) 精子의 受精能獲得 및 體外受精

凍結精液은 38℃ 항온수조에 약 20초간 침지하여 융해한 후 각 2ml로 만든 45%, 30%의 Percoll (Sigma, U.S.A) 이중층에 융해한 精液을 넣고 遠心分解하였다(500 g×10 min). 遠心分解後 精子塊는 3 mg/ml BSA 와 2 mM caffeine이 添加된 BO液으로 浮遊시켜 2×10^8/ml 농도로 조정한 후 38.5℃, 5% CO_2 培養器에서 3 時間 前培養하여 受精能獲得을 誘起시켰다.

體外受精은 前述한 방법에 의하여 成熟이 이루어진 卵胞卵을 BO液으로 2회 세정후 준비된 50 μl BO液의 小滴에 20개씩 넣고 受精能獲得이 유기된 精子浮游液을 주입하였으며 最終受精濃度는 1×10^7/ml로 조정하였다.

受精後 5時間째에 卵胞卵은 200 μl 小滴의 發生用 培養液으로 옮겨 前述한 방법으로 44時間 體外培養하였다. 卵胞卵의 成熟 및 受精與否의 判定은 體外受精後 18~20 時間에 卵子 수위의 卵丘細胞를 pipetting 조작에 의해 제거한 後 25% acetic acid에 2~3일간 고정하고, 1% aceto-orcein으로 염색하여 Ball 等 (1984) 및 Iritani 等(1984)의 判定基準에 준하여 成熟度와 受精與否를 判定하였으며 受精卵의 분할단계는 도립현미경하에서의 형태적 관찰에 의해 판별하였다.

3) 體內培養

體外培養後 48時間에 3細胞期 이상으로 발달한 受精卵은 Park 등(1987)이 이용한 방법에 준하여 결찰된 토끼의 한쪽 卵管에 50개씩 移植한 후 5일간 體內培養하고 다시 回收하여 도립현미경하에서 胚 發達을 조사하였다.

III. 結果 및 考察

1. 소 卵胞卵의 體外受精

Percoll 처리後 3 mg/ml BSA 및 2 mM caffeine이 첨가된 BO液으로 3 時間 前培養하여 受精能獲得을 誘起시킨 精子와 24 時間 成熟培養시킨 卵胞卵을 體外受精했을때의 結果는 표 1에 나타난 바와 같다.

총 369개의 未成熟 卵胞卵을 體外培養한 結果 96%인 355개가 제 2 성숙분열 중기까지 정상적인 成熟이 誘起되었으며 體外受精 結果 90%인 320개가 受精이 확인되었고 多精子侵入을 보인 것은 15%인 47개였다. 이러한 結果는 82.9%의 體外成熟率 및 63.0%의 受精率을 보고한 Goto 等 (1988)의 結果보다는 우수하나 Younis 等(1989)이 보고한 97.7%의 體外成熟率 및 Niwa와 Ohgoda(1988)가 보고한 96%의 受精率에는 미치지 못하는 성적이었다.

그러나 本실험의 반복수가 적고 또한 Sirard 等 (1984)이 보고한 바와 같이 精液이 채취된 개체간의 차이에 의한 受精能獲得 誘起의 변이에 의해 受精率의 차이가 있음을 고려할 때보다 安定된 受精率을 얻기 위해서는 더 많은 硏究가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

Table 1. *In vitro fertilization with frozen-thawed semen in the cattle.*

Trial	No. of oocytes examined	No.(%) of oocytes matured	No.(%) of oocytes ferilized	NO.(%) of polyspermic oocytes
1	108	100 (93)	94(94)	9(10)
2	124	119 (96)	110(92)	18(16)
3	136	136(100)	116(85)	20(17)
Total	369	355(96)	320(90)	47(15)

Table 2. Development after *in vitro*fertilization of bovine oocytes matured *in vitro*

No. of eggs examined	No.(%) of eggs developed to			No.(%) of eggs cleavaged
	2 cell	3 to 4 cell	6 to 8 cell	
356	60(17)	75(21)	67(19)	202(57)

Development was evaluated 48hrs after insemination

Table 3. Development of bovine embryos cultured for 5 days in the ligated oviduct of rabbit.

No. of eggs		No. of eggs developed to		No.(%) of eggs developed ≥ morule
Transfer	Recovered(%)	Morula	Blastocyst	
142	80(56)	5	12	17(21)

3 to 8 cell embryos were transferred

2. 體外受精卵의 發生

體外受精後 48時間 體外培養된 卵子의 發生率은 표 2에 나타난 바와 같으며 48 時間 培養後 3 細胞期 이상으로 發達한 受精卵을 토끼卵管內에서 5日間 培養後 回收한 경우 回收率과 胚 發生率은 표 3과 같다.

총 356개의 卵胞卵을 成熟培養後 受精시켜 48 時間 培養한 結果 卵分割이 일어난 것은 57%인 202개로서 2細胞期, 3~4細胞期 및 6~8細胞期로 發達한 것이 각각 17%(60個), 21%(75個), 19%(67個)였다. 이 中 3 細胞期 이상으로 發達한 142個의 受精卵을 토끼卵管內에 移植하여 5日間 體內培養後 回收한 結果 回收率은 56%로서 80個의 受精卵이 回收되었으며 이 中 桑實胚 및 胚盤胞로 發達한 것은 각각 5個 및 12個로서 桑實胚期 이상으로의 胚發生率은 21%였다.

한편 體外受精卵의 發生에 있어서 8細胞期로의 發達에 74.4時間이 소요된다고 보고한 Park 等(1989)의 結果와 비교할 때 本 실험에서의 胚發達은 다소 빠른 편이며 이는 體外受精卵의 卵割이 體外受精에 이용된 精液이 얻어진 개체에 따라서도 차이가 있다는 結果를 보고한 Goto 等(1989)의 結果와도 관련이 있으리라 사료된다.

또한 體內培養에 있어서 本 실험에서의 培養後 回收率과 胚 發生率은 56% 및 21% 였으나 體外受精後 2~8細胞期로 發達한 受精卵을 토끼卵管內에서 4日 이상 體內培養했을 때 각각 50%, 41%의 回收率 및 桑實胚期로의 胚發達을 보고한 Sirard 等(1985)의 結果와 비교할때 回收率은 비슷하나 發生率은 저조하였다. 그러나 本 실험에서 이용한 體內培養方法은 정상적인 着床으로 유도될 수 있는 정상적으로 발달한 소 體外受精卵을 확보하는데 좋은 방법이 되리라 사료되며 더 좋은 回收率과 胚 發生率을 얻을 수 있는 方法的인 개선이 도모되어야 한다고 사료된다.

IV. 摘 要

本 實驗은 體外受精된 소 卵胞卵의 發生에 대한 기초지식을 얻고자 도축장에서 얻어진 卵巢에서 回收된 卵胞卵을 體外成熟後 受精시키고 48 時間 體外培養하였으며, 3細胞期 이상으로 胚 發生이 誘起된 受精卵을 토끼卵管內에서 體內培養하여 胚 發生을 조사하였던바 다음과 같은 結果를 얻었다.

총 369個의 卵胞卵을 供試하여 體外成熟과 受精을 誘導한 結果 96%의 成熟率과 90%의 受精率을 얻었으며 多精子侵入率은 15%였다. 또한 총 356個의 體外成熟된 卵胞卵을 受精後 48時間 體外培養한 結果 2細胞期, 3~4細胞期, 6~8細胞期까지 發達한 受精卵은 각각 17%(60個), 21%(75個) 및 19%(67個)로서 卵分割率은 57%였다.

한편 體外培養後 48時間에 3細胞期 이상으로 發達한 142個의 受精卵을 토끼卵管內에서 5日間 體內培養後 回收한 結果 回收率은 56%로서 80個가 回收되었으며 이 中 桑實胚 및 胚盤胞로 發達한 것이 각각 5個, 12個로서 桑實胚 이상으로 發達한 受精卵은 21%인 17個였다.

V. 引用文献

1. Ball, G.D., M.L.Leibfried, R.L. Ax and N.L.First. 1984. Maturation and fertilization of bovine oocytes *in vitro*.J.Dairy Sci., 67 : 2775-2785.
2. Brackett, B.G.and G.Oliphant.1975.Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod., 12 : 260-274.
3. Camus, S., Y.Heyman, W.Meziou and Y. Menezo. 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. J.Reprod. Fert., 72 : 479-485.
4. Eyestone, W.H., D.L.Northey and M.L. Leibfried-Rutledge. 1985. Culture of 1-cell bovine embryos in the sheep oviduct. Biol. Reprod., 32(suppl.1) : 100
5. Eyestone, W.H., J.Vignieri and N.L.First. 1987a. Co-culture of early bovine embryos with oviductal epethelium. Theriogenology, 27 : 228 (Abstr.).
6. Eyestone, W.H., M.L. Leibfried-Rutledge, D.L.Northey, B.G. Gilligan and N.L.First. 1987b. Culture of one-and two-cell bovine embryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct. Theriogenology, 28 : 1-7.
7. Fukui, Y. 1989. Effects of sera and steroid hormones on development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro* and co-cultured with bovine oviduct epitherial cells. J.Anim.Sci., 67 : 1318-1323.
8. Goto, K., Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba, Y. Nadanishi and K.Ogawa. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. J.Reprod.Fert., 83 : 753-758.
9. Goto, K., Y. Koba, S. Kosaka, Y. Nakanishi and K.Ogawa. 1989. *In vitro* fertilization and development of *in vitro* matured bovine follicular oocytes.J.Anim. Sci., 67 : 2181-2185.
10. Iritani, A., M.Kasai, K.Niwa and H.B. Song. 1984. Fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes with ejaculated spermatozoa capacitated in a chemically defined medium.J.Reprod.Fert., 70 : 487-492.
11. Kuzan, F.B. and R.W.Wright, Jr. 1982. Observations on the development of bovine morulae on various cellular and noncellular substrata. J. Anim. Sci., 54 : 811-816.
12. Niwa, K. and O. Ohgoda. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on *in-vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. Theriogenology, 30 : 733-741.
13. Park, C.K., O. Ohgoda and K. Niwa. 1989. Penetration of bovine follicular oocytes by frozen-thawed spermatozoa in the presence of caffeine and heparin. J. Reprod. Fert., 86 : 577-582.
14. Park, H.K., K.S.Choi and T.K.Suh. 1987. Studies on *in-vivo* culture of blastomeres separates from goat embryo. Bulletin of Inst. of Genetic Eng., 2 : 69-74. Inst. of Genetic Eng. Kyungpook National Univ.
15. Park, S.P., T.G.Park, S.H.Yoon, D.H. Ko and K.S.Chung. 1989. Studies on *in vitro* maturation of bovine follicular oocytes III. *In vitro* fertilization and development of *in vitro* matured bovine follicular oocytes. Kerean. J. Anim. Reprod., 13 : 105-112.
16. Sirard, M.A., R.Lambert and R. Beland. 1984. Evaluation of bovine capacitation by *in vitro* fertilzation. Theriogenology, 21 : 231(Abstr.).
17. Sirard, M.A., R.D.Lambert, D.P.Menard and M.Bedoya. 1985. Pregnancies after *in vitro* fertilization of cow follicular oocytes, their incubation in rabbit oviduct and their transfer to the cow uterus.J.Reprod.Fert., 75 : 551-556.

18. Sirard, M.A. and R.D. Lambert. 1986. Birth of calves after *in vitro* fertilization using laparoscopy and rabbit oviduct incubation of zygotes. Vet.Rec., 119: 167-169.
19. Younis, A.I., B.G.Brackett and R.A. Fayrer-Hosken. 1989. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. Gamete Res., 23: 189-201.