

## 受精能獲得 處理法이 소 卵胞卵의 體外受精 및 分割率에 미치는 影響에 관한 研究

金相根, 韓成郁\*, 韓邦根\*\*

忠南大學校 獸醫科大學

### Studies on the Effects of the Capacitation Methods of Spermatozoas on *in-vitro* Fertilization and Cleavage Rate of Bovine Follicular Oocytes

Kim, S.K., S.W. Han and B.K. Han

College of Vet. Med., Chungnam National Univ.

#### SUMMARY

The studies on the carried out to investigate the effects of capacitation method of spermatozoa on the *in vitro* fertilization and cleavage rate of bovine follicular oocytes. The ovaries were obtained from slaughtered Korean native cows. The follicular oocytes surrounded with cumulus cells were recovered by aspirating follicular fluids from the visible follicles of diameter 3~5mm. The follicular oocytes were cultured in TCM-199 medium containing hormones and FCS for 24~48hrs in an incubator with 5% CO<sub>2</sub> in air at 38.5°C and then matured oocytes were again cultured for 12~18hrs with motile capacitated sperm by preincubation of mKRB, treatment of HIS(high strength ion), Ca-IA(Inophore A), BFF(bovine follicular fluids) and heparin.

The results obtained in these experiments were summarized as follows :

1. The *in vitro* fertilization and cleavage rate of follicular oocytes fertilized with capacitated spermatozoas in BO solution by preincubation of mKRB, treatment of HIS, Ca-IA, BFF and heparin methods were 53.1%, 33.9%, 50.8%, 48.1%, 58.8% and 28.1%, 17.7%, 26.2%, 22.8%, 32.8%, respectively. And the fertilization and cleavage rate of heparin method was of highest of all.
2. The *in vitro* fertilization and cleavage rate of follicular oocytes fertilized with capacitated spermatozoas in BO solution by both caffeine, BSA and heparin methods were 65.8%, 70.3% and 40.8%, 47.3%, respectively, and those rates were higher treatment of heparin + BSA, heparin + caffeine than treatment of heparin.
3. The *in vitro* fertilization and cleavage rate of follicular oocytes fertilized with capacitated spermatozoas in BO solution with heparin concentrations of 2, 5, 10, 20, 40 $\mu$ g/ml were 50.0%, 54.7%, 58.1%, 51.7% and 27.9%, 32.8%, 37.1%, 30.0%, respectively. And the fertilization and cleavage rate of follicular oocytes fertilized with capacitated spermatozoas in BO solution with 10 $\mu$ g/ml of heparin was the highest of all.
4. The *in vitro* fertilization and cleavage rate of follicular oocytes fertilized with capacitated

\* 忠南大學校 農科大學(Coll. of Agri., Chungnam National Univ.)

\*\*全南大學校 獸醫科大學(Coll. of Vet. Med., Chonnam National Univ.)

spermatozoas in BO solution containing heparin with caffeine concentration of 10, 20, 30, 40  $\mu\text{g/ml}$  were 71.4%, 74.3% and 70.6%, 70.0% and 45.7%, 47.3%, 44.1%, 41.4%, respectively. The fertilization and cleavage rate of spermatozoa fertilized in BO solution with caffeine and heparin together (70.3~74.3%) was higher than that of spermatozoa fertilized in BO solution with heparin (58.8%).

5. The *in vitro* fertilization and cleavage rate of follicular oocytes fertilized with capacitated spermatozoas in BO solution containing heparin with BSA concentration of 5, 10, 20, 30  $\mu\text{g/ml}$  were 63.6%, 62.9%, 66.7%, 60.3% and 44.1%, 43.5%, 48.5%, 42.7%, respectively. The fertilization and cleavage rate of spermatozoa fertilized in BO solution with BSA and heparin together (60.3%~66.73%) was higher than that of spermatozoa fertilized in BO solution with heparin (58.8%).

## I. 緒論

소 卵胞卵의 體外受精을 위한 精子의 受精能獲得 誘起에 관한 연구는, Iritani와 Niwa(1977) 및 Iritani 등(1984)의 m-KRB液에서의 前培養處理, Brackett 등(1982)의 high ionic strength液에서의 前處理, Hanada(1985), 金과朴(1988) 및 Aoyagi 등(1988)의 Ca inophore 處理, Fukui(1983)등과 金과朴(1988)의 牛 卵胞液의 處理, Parrish 등(1986)의 heparin과 BSA 處理, Ohgoda 등(1988)의 caffeine 處理, Niwa와 Ohgoda(1988) 및 Park(1989)등의 heparin과 caffeine의 併用處理에 의한 수정능획득 유기 등의 여러 방법들이 보고되었다.

Handrow 등(1982)은 生體內 卵胞液과 子宮液에 존재하는 heparin과 hyaluronic acid를 함유하는 glycosaminoglycans는 尖體反應을 촉진시킨다고 하였으며, Parrish 등(1986)은 체외수정에 사용하는 凍結融解 精子는 射出 또는 精巢上體 精子와는 달리 생존 시간이 짧기 때문에 前處理를 할 수 없으므로 caffeine 또는 heparin 등의 첨가에 의해 단시간내에 수정능획득을 유기시켜야 한다고 하였으며, Ball 등(1981)과 Parrish 등(1986)은 haparin 또는 heparin과 BSA를 동시에 첨가했을 때 강력한 受精能獲得 작용을 가진다고 하였으며, 또한 Gravers 등(1971)은 caffeine의 첨가가 精子의 活力과 精子侵入率이 향상되었다고 보고하였으며, Ohgoda 등(1988)은 凍結精子에 caffeine을 처리했을 때 精子侵入率을 향상시킨다고 보고하였으며, Niwa와 Ohgoda(1988)는 heparin과 caffeine을 併用처리함으로써 heparin과 caffeine이

受精能獲得에 上昇作用을 한다고 하였다.

이들의 研究를 종합해 보면 哺乳動物 精子의 수정능 획득에 영향을 미치는 요인으로서 수정능획득 所要時間이 중요하며, 그의 雄畜의 生理상태, 精子培養液의 組成과 添加劑의 種類, 處理方法間 및 소의 個體차이 등의 요인으로 생각된다(Bedford, 1970; Rogers와 Yanagimachi, 1975; Brackett, 1982; Fukui 등, 1983; Lambert 등, 1984; Sirard와 Lambert, 1985; Parrish 등, 1986). 그러나 이들 研究 報告들은 보고자간에 受精能獲得 성적과 體外受精率에도 큰 차이가 있을 뿐만 아니라, 또한 소 精子에 적합한 受精能獲得 처리법도 확립되어 있지 않은 실정이다.

이에 본 研究는 소 卵胞卵의 體外受精에 있어서 精子의 수정능획득 처리법이 體外受精率에 미치는 영향을 究明하고자 몇 가지 受精能獲得 處理法을 비교 검토하고자 실시하였다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 卵胞卵의 回收

屠殺 直後의 雌畜 韓牛의 卵巢를 摘出하여, 100IU/ml의 penicillin G와, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 streptomycin sulfate를 첨가한 38°C의 生理的 食鹽水에 浸漬하여 2시간 이내에 實驗室로 옮겨, 卵巢표면을 洗滌하고 卵巢표면의 습기를 제거한 다음 注射器로 卵胞液을 흡입하여 時計皿에 채취한 후 實體顯微鏡(20~40 $\times$ )하에서 卵胞卵을 回收하여 배양액으로 3回 洗滌하였다.

### 2. 培養液

卵胞卵의 體外成熟 및 體外受精을 위한 基本培養液은 TCM-199(Whittaker, M. A., Bioproducts Co. USA)로 10(v/v)의 FCS와 1 $\mu$ g/ml의 FSH(Sigma, USA), 2IU/ml HCG, 1 $\mu$ g/ml의  $\beta$ -estradiol(Sigma, USA), 100IU/ml의 penicillin G 및 100 $\mu$ g/ml의 streptomycin sulfate가 첨가된 培養液을 이용하였으며, 사용전 0.2 $\mu$ M millipore filter로 濾過模菌후 사용하였다.

### 3. 卵胞卵의 體外成熟

卵胞卵의 體外培養은 체의상속용 培養液 50 $\mu$ l 小滴을 mineral oil(Squibb Co., USA)로 피복하여 培養 2~3시간전에 CO<sub>2</sub> 培養器내(5% CO<sub>2</sub>, 95% air, 38.5°C)에서 5~6시간 平衡시킨 후 小滴當 5개의 卵胞卵을 浸漬하여 24시간 培養하였다.

### 4. 精子的 受精能獲得

#### 1) m-KRB 處理法

凍結精液을 38°C의 恒溫水槽에 약 1시간 浸漬하여 融解한 후, 0.5ml의 精液을 3ml의 mKRB액에서 부유시킨 후 500rpm으로 3분간 원심분리하여 洗滌하고 다시 mKRB액으로 再浮遊시켜 1ml의 재부유액을 CO<sub>2</sub> 배양기에서 前培養하였다.

#### 2) HIS(High ionic strength)處理法

2ml의 HIS액(Brackett, 1982)에 0.1ml의 精液을 稀釋하여 5분간 배양한 다음 300rpm으로 5분간 遠心分離후 精子塊를 1ml의 BO(Brackett와 Oliphant, 1975)液에 희석하여 4시간 前培養하였다.

#### 3) Ca-IA(Inophore A)處理法

凍結精液을 10mM caffeine이 첨가된 BO液으로 희석하여 遠心分離에 의해 精子를 2회 遠心洗滌한 후 精子濃度를 25~30 $\times 10^6$ /ml로 조정한 精子浮遊液 1ml에 Ca-IA(Sigma, USA) 50 $\mu$ l로 1분간 처리하였다.

#### 4) BFF(Bovine follicular fluids)處理法

10~20mm의 卵胞로부터 채취한 卵胞液을 600rpm으로 10분간 遠心分離한 다음 上層液을 56°C에서 30분간 非動化 처리후 濾過 滅菌하여, 여기에 融解精液을 1:15의 비율로 稀釋한 다음 CO<sub>2</sub> 培養器에서 4시간 前培養하여 수정능획득을 誘起하였다.

#### 5) Heparin 處理法

受精能獲得 培養液 TCF(Tyrode calcium-free)1ml에 精液 0.2ml를 試驗管내에서 혼합하여 CO<sub>2</sub> 培

養器에서 swim-up 처리후, 上層液을 수정용 배양액으로 2,000rpm으로 10분간 2회 遠心分離하여 세척하고 精子塊를 同量의 100 $\mu$ g/ml의 heparin(Sigma, USA)과 각각 3ng/ml 및 2.5mM BSA와 caffeine이 첨가된 BO액으로 희석하여 15분간 CO<sub>2</sub> 培養器에서 受精能獲得을 誘起하였다. BSA 및 caffeine 併用 處理는 분리한 精子塊를 5, 10, 20, 30mg/ml의 BSA와 2, 5, 10, 20 $\mu$ g/ml의 caffeine이 각각 첨가된 BO액으로 희석한 후 CO<sub>2</sub> 배양기에서 3시간동안 前培養하여 수정능획득을 유지하였다.

### 5. 體外受精

體外受精은 成熟培養한 卵胞卵을 受精用 培養液으로 3회 洗滌 후, 주위의 卵丘細胞를 pipetting에 의하여 일부 제거한 다음 mineral oil로 피복한 45 $\mu$ l의 受精用 培養液 小滴에 5개의 卵胞卵을 주입한 후, 受精能獲得을 誘起시킨 精子 浮遊液 2 $\mu$ l(1.5 $\times 10^6$ /ml)로 媒精하였다.

### 6. 成熟 및 受精의 判定

卵胞卵의 成熟 및 受精의 判定은, 체외에서 배양한 卵胞卵과 媒精 후 24시간에 일부의 난자는 0.1% hyaluronidase(Sigma, USA)에 의해 卵丘細胞를 제거한 후 slide glass에 滴下하여 25% acetic acid에 24~48시간 固定한 다음 10% acetic-orcein으로 染色하여 成熟과 受精 與否를 判定하였으며, 나머지 난자는 胚 發生을 유도하여 媒精후 8, 16, 24시간에 수정 여부를 判定하였다(Shea 등, 1976; Ball 등, 1984).

## III. 結果 및 考察

### 1. 受精能獲得 處理法에 따른 體外受精率

소 卵胞卵의 體外受精에 있어서 受精能獲得 처리법에 따른 體外受精率과 分割率은 Table 1과 같다.

精子的 受精能獲得 처리에 있어서 mKRB液의 前處理, HIS液처리, Ca-IA液 처리, BFF처리 및 heparin 처리에 따른 體外受精率은 각각 53.1%, 33.9%, 50.8%, 48.1% 및 58.8%를 나타냈다. 또한 이때의 受精卵의 分割率은 28.1%, 17.7%, 26.2%, 22.8% 및 32.8%를 나타냈다. 精子的 受精能獲得 처리법에 있어서 mKRB液 처리, Ca-IA液 처리 및 heparin 처리법은 50.0%이상을 나타냈으며, 처리법

Table 1. Effects of capacitation methods of sperms on *in vitro* fertilization rate of bovine oocytes

Capacitation method of sperms	No. of oocytes cultured	No. of oocytes fertilized(%)	No. of oocytes cleaved(%)
m-KRB method	64	34 (53.1)	18 (28.1)
HIS method	62	21 (33.9)	11 (17.7)
Ca-IA dmthod	65	33 (50.8)	17 (26.2)
BFF method	79	38 (48.1)	18 (22.8)
Heparin method	67	40 (58.8)	22 (32.8)

\* HIS : High ionic strength  
 Ca-IA : Ca-inophore A  
 BFF : Bovine follicular fluids

중 heparin에 의한 精子的 처리법이 높은 수정율을 나타냈다.

이러한 결과는, Parrish 등(1986)이 heparin에 의한 精子的 受精能獲得 처리시의 受精率 79.0%, Iritani와 Niwa(1977) 및 Iritani 등(1984)의 m-KRB液에서의 前培養處理에 의한 정자의 수정능 획득 처리시의 受精率 21~67%와, Hanada(1985)의 Ca-IA 처리에 의한 受精能獲得 처리시의 均等分割率 25.6~55.0%에 비해 낮은 성적이었으나, Brackett 등(1982)의 HIS 처리에 의한 受精率 40.0%와 Fukui 등(1983)의 BFF 처리에 의한 46.2%에 비해서는 다소 높은 성적이었다. 특히, heparin 처리에 의한 精자의 受精能獲得 誘起는 높은 체외수정율을 나타냈는데, 이는 生體내 卵胞液과 子宮液에 존재하는 heparin과 hyaluronic acid를 함유하는 glycosaminoglycans (GAG)는 尖體反應을 촉진시키며 강력한 受精能獲得 작용을 가지고 있어 높은 體外受精率을 얻을 수 있는 것으로 생각된다(Ball 등, 1981; Handrow 등, 1982; Bondioli와 Wright, 1983; Parrish 등, 1986).

## 2. Heparin과 BSA 및 Caffeine의 併用處理에 따른 體外受精率

소 卵胞卵의 體外受精에 있어서 精자의 受精能獲得 처리법에 따른 heparin과 BSA 및 caffeine을 併用處理했을 때 體外受精率과 分割率은 Table 2와 같다.

精자의 受精能獲得 처리에 있어서 가장 높은 體外受精率을 나타낸 heparin을 이용하여 BSA 및 caffeine을 첨가한 BO액으로 처리했을 때의 體外受精率은 각각 65.8% 및 70.3%로써 heparin의 단독처리보다 수정율이 증가되었으며, 또한 分割率도 40.8% 및 47.3%로 증가하는 경향을 나타냈다.

이러한 결과는, Critser 등(1984)이 精液을 1mM caffeine을 첨가한 修正 Tyrode액에 1~2시간 前培養했을 때의 體外受精率 62%와 Niwa와 Ohgoda(1988)가 5mM caffeine과 10 $\mu$ g/ml heparin을 첨가한 BO액에서 처리했을 때의 受精率인 48%에 비해 높았으나, Park(1989) 등이 同量의 caffeine과 heparin을 첨가한 BO액에서 前培養 또는 바로 수정했을 때 體外受精率이 각각 100%와 94%였다고 한 결과와, Aoyagi 등(1988)의 BSA가 첨가된 배양액에

Table 2. Effects of heparin and BSA, caffeine added to BO solution on sperm capacitation

Capacitation method of sperms	No. of oocytes cultured	No. of oocytes fertilized(%)	No. of oocytes cleaved(%)
Control	67	40 (58.8)	22 (32.8)
Heparin + BSA	76	50 (65.8)	31 (40.8)
Heparin + caffeine	74	52 (70.3)	35 (47.3)

\* BSA : Bovine serum albumin

**Table 3.** The fertilization and cleavage rates of bovine follicular oocytes fertilized *in vitro* with sperm suspensions in BO solution containing at different concentrations of heparin

Heparin concentration in sperm suspension ( $\mu\text{g/ml}$ )	No. of oocytes cultured	No. of oocytes fertilized (%)	No. of oocytes cleaved (%)
5	68	34 (50.0)	19 (27.9)
10	64	35 (54.7)	21 (32.8)
20	62	36 (58.1)	23 (37.1)
40	60	31 (51.7)	18 (30.0)

서 caffeine 으로 前處理의 수정율이 80%였다고 한 결과에 비해서는 낮은 성적이었다.

### 3. Heparin 의 濃度에 따른 體外受精率

소 卵胞卵의 體外受精時 精子의 受精能獲得 처리에 있어서 heparin 의 濃度에 따른 體外受精率은 Table 3 과 같다.

精子의 受精能獲得 처리에 있어서 가장 높은 體外受精率을 나타낸 heparin 의 濃度에 따른 體外受精率은 heparin 5 $\mu\text{g/ml}$ , 10 $\mu\text{g/ml}$ , 20 $\mu\text{g/ml}$  및 40 $\mu\text{g/ml}$  을 처리했을 때 각각 50.0%, 54.7%, 58.1% 및 51.7%였으며, 또한 體外受精卵의 分割率은 각각 27.9%, 32.8%, 37.1% 및 30.0%로써 heparin 농도간에는 큰 차이가 인정되지 않았으며, 20 $\mu\text{g/ml}$  濃度の 처리가 비교적 다른 농도에 비해 높은 體外受精率과 分割率을 나타냈다.

이러한 결과는 10 $\mu\text{g/ml}$  의 heparin 을 첨가한 BO 액에서 受精能獲得을 誘起한 수정율이 56.1%라고 보고한 Parrish 등(1986)의 결과와, 20 $\mu\text{g/ml}$  을 첨가

했을 때 48.1%라고 한 Niwa 와 Ohgoda(1988)의 결과에 비해서는 다소 높은 성적이었다. 또한 精子의 수정능 획득 유기에 있어 적절한 heparin 농도는 20 $\mu\text{g/ml}$  라고 한 Parrish 등(1989) 및 金 등(1990)의 결과와는 거의 일치되는 경향이였다.

한편 Parrish 등(1989)은 heparin 처리에 의한 수정능 획득 유기시 精子細胞內 pH 의 알칼리화와 세포내  $\text{Ca}^{++}$ 의 증가는 受精能獲得 誘起중 尖體膜을 변화시키는 기능을 갖는 酵素系를 活性化함으로써 수정능 획득 유기에 중요한 역할을 한다고 하였다.

### 4. Caffeine 의 濃度에 따른 體外受精率

소 卵胞卵의 體外수정시 精子의 受精能獲得 처리에 따른 heparin 과 caffeine 의 처리에 있어서 caffeine 의 濃度에 따른 體外受精率은 Table 4 와 같다.

소 卵胞卵의 體外수정시 heparin 과 caffeine 에 의해 精子의 受精能獲得 처리에 있어서 caffeine 의 濃度에 따른 體外受精率은 caffeine 10 $\mu\text{g/ml}$ , 20 $\mu\text{g/ml}$ , 30 $\mu\text{g/ml}$  및 40 $\mu\text{g/ml}$  을 처리했을 때 각각 71.

**Table 4.** The fertilization and cleavage rates of bovine follicular oocytes fertilized *in vitro* with sperm suspensions in BO solution containing heparin at different concentration of caffeine

Caffeine concentration in sperm suspension (mg/ml)	No. of oocytes cultured	No. of oocytes fertilized (%)	No. of oocytes cleaved (%)
10	70	50 (71.4)	32 (45.7)
20	74	55 (74.3)	35 (47.3)
30	68	48 (70.6)	30 (44.1)
40	70	49 (70.0)	29 (41.4)

4%, 70.3, 70.6% 및 74.3%로서 20 $\mu$ g/ml의 caffeine의 濃度로 처리했을 때 가장 높은 體外受精率을 나타냈다. 精子的 수정능획득 유기에 있어서 heparin 單獨處理時의 수정율 58.8%에 비해 heparin과 caffeine을 併用處理했을 때 70.0~74.3%로써 수정율이 증가하는 경향을 나타냈다.

Critser 등(1984)은 1mM caffeine으로 1~2시간 前培養했을 때 수정율 62%와 대조구 73%와 차이가 없다고 하였으나, Ohgoda 등(1988)은 凍結融解 精자를 caffeine 처리에 의해 精子침입율이 증가되었다고 하였으며, Niwa와 Ohgoda(1988)는 10mM caffeine이 첨가된 BO액으로 회색후 20 $\mu$ g/ml의 heparin이 첨가된 BO액에서의 수정율은 35~96%였으나 heparin만 첨가했을 경우 17~64%의 수정율을 얻었으며, caffeine이 첨가된 BO액에서의 수정은 heparin 농도에 영향을 받는다고 하였으며, Parrish 등(1985, 1986)은 heparin 처리는 정자의 직접적인 작용에 의한 효과라고 하였다. 그러나, 本 研究에서 精자의 수정능획득 유기시 caffeine과 heparin을 併用處理하는 것이 heparin을 單獨處理시보다 수정율을 증가시키는 것으로 판단되었다.

#### 5. BSA의 濃度에 따른 體外受精率

소 卵胞卵의 체외수정시 精자의 受精能獲得 처리에 따른 heparin과 BSA의 처리에 있어서 BSA의 濃度에 따른 體外受精率은 Table 5와 같다.

소 卵胞卵의 체외수정시 heparin과 BSA에 의해 精자의 受精能獲得 처리에 있어서 BSA의 濃度에 따른 體外受精率과 分割率은 BSA 5 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml,

20 $\mu$ g/ml 및 30 $\mu$ g/ml를 처리했을 때 각각 63.6%와 62.9%, 66.7% 및 60.3%와 44.1%, 43.5%, 48.5% 및 42.7%로서 20 $\mu$ g/ml의 농도로 BSA를 처리했을 때 受精率과 分割率이 높았으나 BSA 농도에 다른 受精率과 分割率에는 유의한 차이가 인정되지 않았다.

본 연구에서 체외수정시 BSA 첨가효과는 큰 차이는 없었으나, 20%의 BSA를 첨가한 TCM-199 배양액 내에서 heparin으로 처리하였을 때 다른 구에 비해 높은 수정율을 나타냈다. Aoyagi 등(1988)은 BSA가 첨가된 배양액내에서 caffeine의 처리시간은 4시간, caffeine과 Ca-IA의 복합처리는 2~3시간 배양에 의해 수정능획득 유기후의 체외수정율은 복합처리시 80% 이상의 수정율을 나타냈다고 하였다.

#### IV. 摘要

本 研究은 소 卵胞卵의 體外受精에 있어서 精자의 受精能獲得 처리법이 體外受精率에 미치는 영향을 究明하고자 소 卵胞卵과 mKRB液의 前處理, HIS液처리, Ca-IA液 처리, BFF처리 및 heparin 처리법과 heparin과 caffeine 및 BSA의 併用處理에 의해 受精能獲得을 유기한 精자와 媒精후 體外受精率과 分割率을 조사하였는 바 그 결과는 다음과 같다.

1. 소 卵胞卵의 체외수정에 있어서 mKRB液의 前處理, HIS液처리, Ca-IA液 처리, BFF처리 및 heparin 처리법으로 精자와의 수정능획득을 유기하였을 때 體外受精率과 分割率은 각각 53.1%, 33.9%, 50.8%, 48.1% 및 58.8%와 28.1%, 17.7%, 26.2%, 22.8% 및 32.8%로서 heparin 처리법

Table 5. The fertilization and cleavage rates of bovine follicular oocytes fertilized in vitro with sperm suspensions in BO solution containing heparin at different concentrations of BSA

BSA concentration in sperm suspension ( $\mu$ g/ml)	No. of oocytes cultured	No. of oocytes fertilized (%)	No. of oocytes cleaved (%)
Heparin + BSA			
5	68	42 (63.6)	30 (44.1)
10	62	39 (62.9)	27 (43.5)
20	66	44 (66.7)	32 (48.5)
30	68	41 (60.3)	29 (42.7)

이 가장 우수하였다.

2. 소 卵胞卵의 體外受精에 있어서 heparin 과 BSA 및 caffeine 의 併用處理에 의해 精子의 受精能獲得을 유기했을 때의 體外受精率과 分割率은 각각 65.8% 및 70.3%와 40.8% 및 47.3%로서 heparin 의 單獨處理의 수정율보다 높았다.
3. 소 卵胞卵의 體外受精에 있어서 精子의 受精能獲得유기시 heparin 의 농도를 5 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 20 $\mu$ g/ml 및 40 $\mu$ g/ml 를 처리했을 때 體外受精率과 分割率은 각각 50.0%, 54.7%, 58.1% 및 51.7%와 27.9%, 32.8%, 37.1% 및 30.0%로서 10 $\mu$ g/ml 의 heparin 을 처리했을 때 가장 높았다.
4. 소 卵胞卵의 體外受精에 있어서 heparin 과 caffeine 처리에 의해 精子의 受精能獲得을 유기시 caffeine 의 濃度에 따른 體外受精率과 分割率은 caffeine 을 10 $\mu$ g/ml, 20 $\mu$ g/ml, 30 $\mu$ g/ml 및 40 $\mu$ g/ml 을 처리했을 때 각각 71.4%, 70.3%, 70.6% 및 74.3%와 45.7%, 47.3%, 44.1 및 41.4%로서 20 $\mu$ g/ml 의 濃度가 가장 높은 體外受精率을 나타냈으며, heparin 의 단독처리의 受精率 58.8%에 비해 heparin 과 caffeine 을 併用處理했을 때 70.3~74.3%로서 受精率이 증가하는 경향을 나타냈다.
5. 소 卵胞卵의 體外受精에 있어서 heparin 과 BSA 의 처리에 의해 精子의 受精能獲得을 유기시 BSA 의 濃度에 따른 體外受精率과 分解率은 BSA 5 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 20 $\mu$ g/ml 및 30 $\mu$ g/ml 를 처리했을 때 각각 63.6%, 62.9%, 66.7% 및 60.3%와 44.1%, 43.5%, 48.5% 및 42.7%로서 20 $\mu$ g/ml 의 BSA 를 처리했을 때 가장 높은 體外受精率과 分割率을 나타냈다.

## V. 引用文獻

1. Aoyagi, Y., K.Fujii, Y.Iwazumi, M. Furudate, Y.Fukui and H. Ono. 1988. Effects of two treatments on semen from different bulls on *in vitro* fertilization results of bovine oocytes. *Theriogenology*, 30 : 973-985.
2. Ball, G.D., M.E. Bellin, R.L. Ax and N.L. First. 1981. Glycosaminoglycans in individual preovulatory and cystic bovine ovarian follicles. *J. Anim. Sci.*, 53(Suppl. 1) : 285.
3. 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.
4. Bedford, J.M. 1970. Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol. Reprod.*, (Suppl. 2)128-158.
5. Brackett, B.G., D.Bousquet, M.L. Boice, W.J. Donawick, J.F. Evans and M.A. Derssel. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*, 27 : 147-158.
6. Brackett, B.G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 12 : 267-274.
7. Bondioli, K.R. and R.W. Wright, Jr. 1983. *In vitro* fertilization of bovine oocytes by spermatozoa capacitated *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 57(4) : 1001-1005.
8. Critser, E.S., M.L. Leibfried and N.L. First. 1984. The effects of semen extension, cAMP and caffeine on *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*. 21 : 625-631.
9. Fukui, Y., M. Fukushima and O. Ono. 1983. Fertilization *in vitro* of bovine oocytes after various sperm procedures. *Theriogenology*; 20 : 651-660.
10. Gravers, D.L., N.L. First, J.J. Sullivan and H.A. Lardy. 1971. Stimulation and maintenance of ejaculated bovine spermatozoa respiration and motility by caffeine. *Biol. Reprod.*, 5 : 336-339.
11. Hanada, A. 1985. *In vitro* fertilization in cattle with particular reference to sperm capacitation by Inophore A 23187. *Jpn. J. Reprod.*, 31(5)56-61.
12. Handrow, R.R., R.W. Lenz and R.L. Ax. 1982. Structural comparisons among

- glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 107 : 1236-1332.
13. 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.
  14. Iritani, A. and K. Niwa. 1977. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fert.*, 30 : 325-328.
  15. Lambert, R.D., M.A. Sirard and R. Beland. 1984. The fertilization performance *in vitro* of bovine and rabbit spermatozoa capacitated *in vitro*. *Proc. 10th Congr. Anim. Reprod.*, AI, II 1, 3 : 392-394.
  16. Niwa, K. and O. Ohgoda. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on *in vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology*, 33 : 733-741.
  17. Ohgoda, O., K. Niwa, M. Yuhara, S. Takahashi and K. Kanoya. 1988. Variations in penetration rates *in vitro* of bovine follicular oocytes do not reflect conception rates after artificial insemination using frozen semen from different bulls. *Theriogenology*, 29 : 1375-1381.
  18. 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.
  19. Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish, M.L. Leibfried-Rutledge, E.S. Cister, W.H. Eyestone and N.L. First. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25 : 591-600.
  20. Rogers, B.J. and R. Yanagimachi. 1975. Retardation of guinea pig sperm acrosome reaction by glucose. The possible importance of pyruvate and lactate metabolism in capacitation and acrosome reaction. *Biol. Reprod.*, 13 : 568-575.
  21. Shea, B.F., J.P.A. Latour, K.N. Berdin and R.D. Baker. 1976. Maturation *in vitro* and the subsequent fertilizability of extra follicular bovine oocytes. *J. Anim. Sci.*, 43 : 809-815.
  22. Sirard, M.A. and R.D. Lambert. 1985. *In vitro* fertilization of follicular oocytes obtained by laparoscopy. *Biol. Reprod.*, 33 : 487-494.
  23. 金相根, 朴恒均. 1988. 소 卵胞卵의 體外成熟과 受精에 관한 研究. 韓國家畜繁殖會誌, 14 : 50-56.
  24. 金相根, 李晚徽. 1990. 卵胞의 크기, 호르몬의 添加, 精液의 形態 및 受精能獲得 方法 등이 소 卵胞卵의 體外成熟 및 體外受精率에 미치는 影響에 관한 研究. 韓國家畜繁殖學會誌, 14(4) : 237-244.