

## 햄스터 적출자궁에서 전배양한 소 정자의 난포란에의 침입시기 및 체외수정 초기상에 관한 연구

송해범 · 김광식  
대구대학교 농과대학

### Timing of Fertilization *In Vitro* of Follicular Oocytes by Bull Spermatozoa Preincubated in the Uteri Isolated from Estrous Hamsters

Song, H. B. and K. S. Kim  
College of Agriculture, Taegu University

#### SUMMARY

The cattle follicular oocytes matured for 26~28h in culture condition were examined at 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16 and 18h after insemination with bull spermatozoa preincubated for 4.5h in the uteri isolated from estrous hamsters.

After further culture with spermatozoa for 4~18 h, 73~89% of the total oocytes had matured to the second metaphase. None of the follicular oocytes matured in culture, were fertilized 5h after insemination. But when the oocytes were examined at 6, 8, 10, 14 and 18h after insemination, 60, 73, 82, 80 and 87% of oocytes were fertilized, respectively. The majority of the fertilized oocytes had enlarged sperm head at 6h after insemination and a part of the fertilized oocytes begun to develop from enlarged sperm head to male pronuclear stage at 8h after insemination, and most of them developed to male and female pronuclear stage at 10h after insemination.

The results suggest that the penetration of spermatozoa into the oocytes may occur earlier than 6h after insemination and development of their pronuclear stage may occur at 8h after insemination.

#### I. 서 론

Iritani 와 Niwa 가 1977년에 소의 체외수정을 발표한 이후 많은 연구가 수행되어 소의 체외수정계는 성공적으로 확립되어 왔다(Wright and Bondioli, 1981; Brackett, 1983; Niwa, 1983). 한편 Brackett 등(1982)이 체외수정란의 이식에의해 세계 최초로 송아지 생산에 성공한 이후 난포란을 체외성숙시켜 체외수정한 후 이식하여 송아지를 분만한 보고도 많이 발표되었다(Crister 등, 1986; Lu 등, 1987,

1990; Goto 등, 1988; Fukui 와 Ono, 1989; Fukuda 등, 1990).

소의 체외수정계는 송아지 생산이 일반화될 정도로 확립되었으나 체외수정 후 정자가 난자에 침입하는 정확한 시기와 침입 후 융성전행으로 변화되어가는 수정 초기상의 경과에 mouse(Iwamatsu와 Chang, 1972; Gaddum Rosse 등, 1982), hamster (Usui와 Yanagimachi, 1976) 등의 일부 실험동물과 돼지(Nagai, 1984) 및 산양(Song 등, 1988)에서는 보고되었으나 소에 있어서는 아직까지 보고된 바 없다.

따라서 본 실험은 체외에서 성숙시킨 난포란과

이 논문은 1991년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 지방대학육성과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

hamster 적출자궁에서 수정능획득을 유기시킨 정자를 체외수정 했을 때 정자의 정확한 침입시기를 찾고 수정초기상의 변화과정을 경시적으로 관찰하기 위해 실시했다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 난자 채취

난소는 양산도축장에서 한우 암소에서 임의로 채취 하였으므로 연령, 체중 및 번식기록 등은 미상이나 정상생식기를 갖고 있었다. 발정휴지기에 있는 난소만을 도살후 30분 이내에 적출하여 0.9% 생리적식염수에 침지하고 보온병(35~37°C)에 담아 2시간 이내에 실험실로 운반하고, 난소표면에 부착된 혈액 등을 제거 하였으며 0.1% 소혈청알부민(BSA)을 첨가한 수정 Krebs-Ringer bicarbonate solution(m-KRB 액)으로 세척한 후 실험현미경 하에서 직경 2~5mm의 난포를 파쇄하여 파립막세포가 치밀하게 부착된 난자만을 pipette으로 채란했다.

### 2. 배양액

Toyoda와 Chang(1974)이 흰쥐의 체외수정에 사용한 Ringer's액을 약간 수정한 수정 Krebs-Ringer bicarbonate solution(m-KRB 액)을 제조하여 난자 채취용 및 정자의 수정능획득용은 소혈청알부민(BSA; Falcon V. Sigma, 미국) 0.1%를 첨가하여 0.2µm millipore filter 로 여과한 다음 사용하였고, 난자배양 및 수정용은 소혈청알부민 0.4%를 첨가하여 사용하였다(Table 1).

### 3. 난포란의 체외배양

파립막세포에 둘러싸인 난포란을 m-KRB액(0.1% BSA)으로 2회 세척한 후 11×35mm 배양접시(Nuclon, 덴마크)에 0.4ml 배양액 소적을 3개 형성하고 파라핀오일을 얇게 덮고 각각의 소적에 약 10개의 난포란을 주입하고 37°C, 99% 습도가 유지되는 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 26~28시간 배양하여 제2 성숙분열중기까지 성숙시켰다.

### 4. 정액채취 및 정자의 수정능획득

대구대학교 실습목장에서 실험일에 인공질법으로

**Table 1. Composition of modified Krebs-Ringer bicarbonate solution.**

Composition	mM
NaCl	94.60
KCl	4.78
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1.71
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.19
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.19
NaHCO <sub>3</sub>	25.07
Glucose	5.56
Na-pyruvate	0.50
Na-lactate	21.58
Streptomycin	50 µg /ml
Prnicillin	75 µg /ml
BSA	*
Phenol red	2 µg /ml

\* Crystalline bovine serum albumin(BSA) was supplemented 1mg/ml for sperm washing and preincubation, and 4mg/ml for oocyte culture and fertilization *in vitro*.

채취한 한우원정액을 정자의 활력과 생존율이 75<sup>+++</sup> 이상인 것만을 실험에 사용하였다.

채취한 정액은 정자의 수정능획득 억제인자를 제거하기 위해 정액과 배양액을 1 : 2~4배의 비율로 혼합한 후 실온에서 2회 원심분리(500×g, 10분) 하여 정장을 제거하고 남은 정자괴에 2~3ml 배양액(1% BSA 첨가)을 첨가하여 정자농도를 10~15×10<sup>6</sup>마리/ml로 조절하였다.

정자의 수정능획득을 위해 발정휴지기의 햄스터에 25IU PMSG (Serotropin; Teikoku-Zoki CO., 일본)를 주사하여 48~52시간 후 발정을 유기시켰으며, 25IU hCG (Serotropin; Teikoku-Zoki CO., 일본)를 주사하고 10~12시간 후 자궁을 적출하여 난관자궁 접합부와 자궁경을 절찰하였으며 정자부유액 0.03ml를 주입한 후 10ml 시험관에 넣고 0.9% 생리적식염수에 침지한 후 CO<sub>2</sub>배양기(37°C)에서 4시간 30분 동안 전배양하였다.

### 5. 체외수정 및 수정 초기상의 관찰

체외수정용으로 준비한 0.4% BSA를 첨가한 m-KRB액 0.4ml 소적에 26~28시간 체외배양한 난

포란 약 10개씩을 분주하고, 햄스터 적출자궁에서 수정능획득을 유기시킨 정자는 정자농도가 약  $1 \sim 3 \times 10^6$ 마리/ml가 되도록 수정하고 CO<sub>2</sub>배양기(5% CO<sub>2</sub>, 37℃)에서 4~18시간 동안 배양시켰다. 정자의 침입 시기 및 자동전핵의 형성시기등을 경시적으로 관찰하기 위해 1~2시간 간격으로 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16 및 18시간에 각각 실험현미경하에서 난자 주위의 과립막세포는 pipetting 을 반복하여 제거하고 25% glacial acetic acid에 2~3일간 고정하여, 1% aceto-orcein으로 염색하고 aceto glycerol로 세척한 후 위상차현미경으로 검경하였다.

수정초기상의 관찰은 Iritani 등(1984)의 기준에 따라 난자내의 정자침입시기, 정자두부의 팽화정도, 정자미부의 유무, 제2 극체의 방출 유무 및 자성전핵과 웅성전핵의 형성까지의 경과시간을 조사하였다(Fig. 1.).

### III. 결과 및 고찰

햄스터 적출자궁에서 4시간 30분 전배양하여 수정능획득을 유기시킨 정자와 26~28시간 체외배양하여 제2 성숙분열중기까지 성숙시킨 난포란을 체외수정했을 때 Table 2에서 보는 바와 같이 공시란의 73~89%가 수정 후 4~18시간의 추가 배양 후 제2 성숙분열중기까지 성숙되었으며, 수정 후 5시간 까지는 정자의 침입을 확인할 수 없었으나, 수정 후 6시간에는 정자가 난자에 침입하여 팽화된 두부와 제2 성숙분열말기의 난자핵 또는 제2 극체가 관찰되어 60%가 수정되었음을 확인할 수 있었다. 수정 후 8시간 이후부터 시간이 경과함에 따라 팽화된 정자두부가 웅성전핵을 형성하기 시작하고 난자의 핵도 자성전핵을 형성하기 시작하여, 수정 후 10시간에는 29개의 수정란 중 14개가 초기단계의 웅성전핵을 형성하고 23개가 초기단계의 자성전핵을 형성하였다. 12시간에는 28개의 수정란 중 11개의 초기단계와 5개의 후기단계 웅성전핵을 형성하고 17개의 초기단계와 5개의 후기단계 자성전핵을 형성하였으며, 16시간에는 27개의 수정란 중 8개의 초기단계와 16개의 후기단계 웅성전핵을 형성하고 10개의

**Table 2. Fertilization in vitro of cattle follicular oocytes examined at 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16 and 18h after insemination with bull spermatozoa preincubated for 4.5h in the uteri isolated from estrous hamsters\***

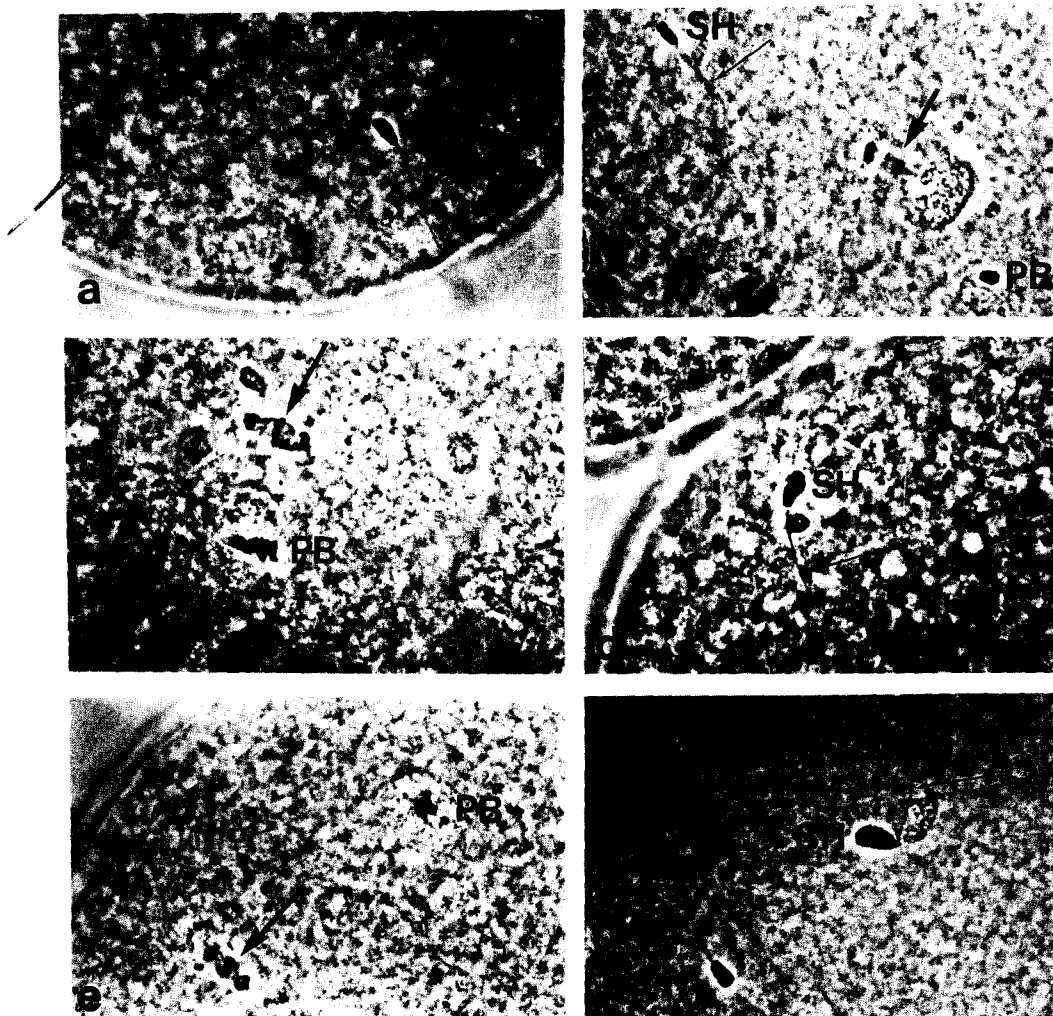
Time of examination (h after insemination)	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured to M-II (%)**	No. of oocytes fertilized(polyspermic)						
			Total with evidence of fertilization (%)***	With penetrated sperm head &		With enlarged sperm head &		With both pronuclei	
				M-II or A-II	T-II	T-II	F.P.N.	early	late
4	32	23(74)	0						
5	41	33(80)	0						
6	53	43(81)	26(60)	9(1)	13(1)	4(1)			
7	47	38(81)	20(53)	1	3	16(1)			
8	52	40(77)	29(73)	3	5	17(1)	3	1	
10	41	35(85)	29(82)			6(2)	9(7)	14(2)	
12	45	40(89)	28(70)		1	5(2)	6(3)	11(2)	5
14	45	33(73)	24(80)		4	4	4(1)	5(1)	5
16	51	42(82)	27(64)			1	2	8(2)	16(2)
18	54	47(87)	41(87)			4	1(1)	6(2)	30(7)

\* The isolated uterus immersed physiological saline was kept in a CO<sub>2</sub> incubator(5% CO<sub>2</sub> in air at 37℃) and sperm concentration at the time of insemination was  $1 \sim 3 \times 10^6$  spermatozoa /ml.

\*\* Oocytes were fixed after culture for 28 h and additional culture with spermatozoa for 4~18 h.

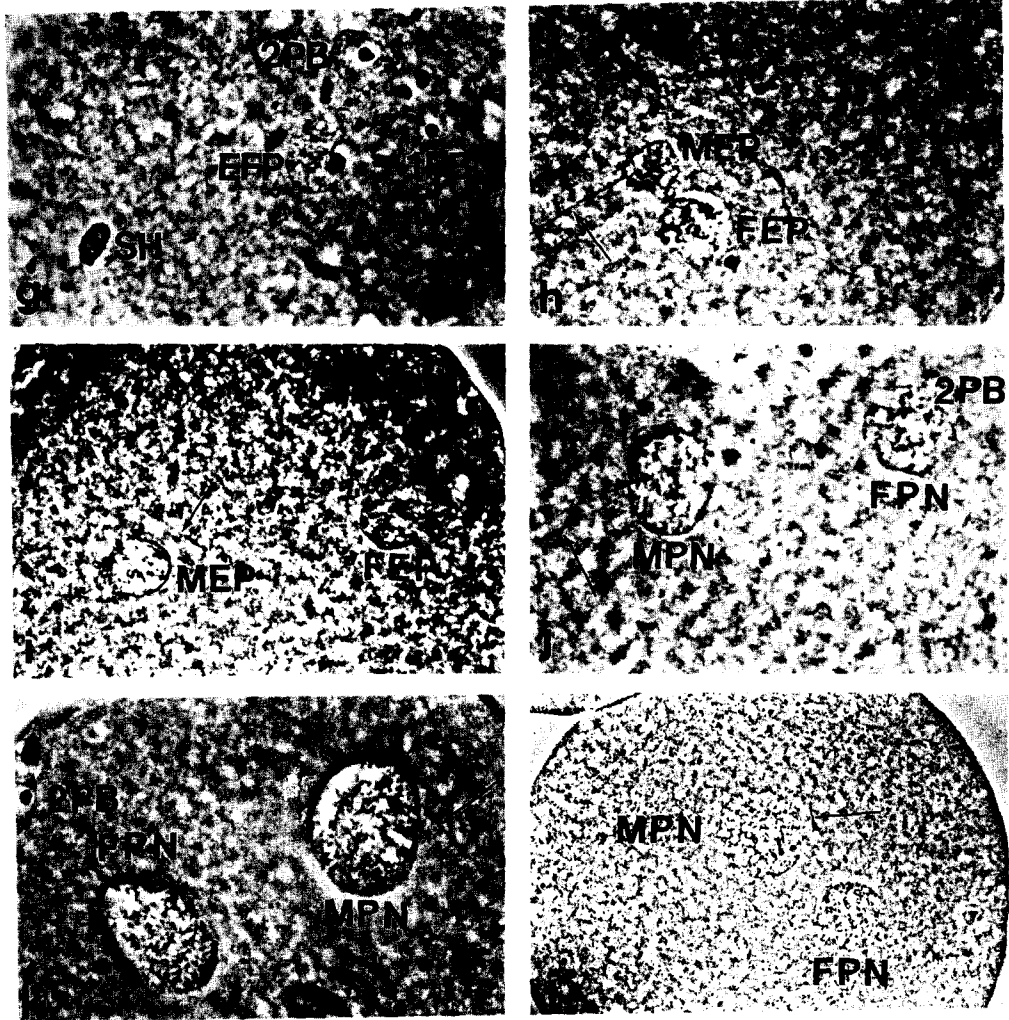
\*\*\* Percentages of the number of oocytes matured to the second metaphase.

M-II : second metaphase, A-II : second anaphase, T-II : second telophase, F.P.N. : female pronuclei



**Fig. 1.** Cattle follicular oocytes matured in culture were fixed 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16 and at 18 h after insemination with bull spermatozoa preincubated for 4.5 h in the uteri isolated from estrous hamsters, stained and photographed under a phase-contrast microscope.

- a) An oocyte fixed at 5 h after insemination. One unenlarged sperm head(SH) with the straightened tail(arrow) in the vitellus can be seen. The female nuclear mass and 1st polar body are out of focus.  $\times 480$ .
- b) An oocyte fixed at 6 h after insemination. The second meiotic division(large arrow), 1st polar body(PB) and a penetrated sperm head(SH) with the straightened tail(small arrow) in the cytoplasm can be seen.  $\times 480$ .
- c~d) An oocyte fixed at 7 h after insemination. The second meiotic division (large arrow) and 1st polar body(PB) can be seen at figure c. An enlarged sperm head(SH) and sperm tail(small arrow) can be seen at figure d.  $\times 480$ .



- e~f) An oocyte fixed at 8 h after insemination. The second meiotic division (large arrow) and 1st polar body(PB) can be seen at figure e. An enlarged sperm head(SH) and sperm tail(small arrow) can be seen at figure f.  $\times 480$ .
- g) An oocyte fixed at 10 h after insemination. The early female pronucleus(EFP), two polar bodies(1PB, 2PB) and an enlarged sperm head(SH) can be seen. Sperm tail is out of focus.  $\times 480$ .
- h) An oocyte fixed at 12 h after insemination. The early both pronuclei(FEP, MEP) with corresponding sperm tail(arrow) and 2nd polar body(2PB) can be seen. The 1st polar body is out of focus.  $\times 480$ .
- i) An oocyte fixed at 14 h after insemination. The early both pronuclei(FEP, MEP) with corresponding sperm tail(arrow) can be seen. Two polar bodies are out of focus.  $\times 480$ .
- j) An oocyte fixed at 14 h after insemination. The both pronuclei(FPN, MPN) with corre-

sponding sperm tail(arrow) and 2nd polar body(2PB) can be seen. The 1st polar body is out of focus. ×480.

k) An oocyte fixed at 16 h after insemination. The both pronuclei(FPN, MPN) with corresponding sperm tail(arrow) and 2nd polar body(2PB) can be seen. The 1st polar body is out of focus. ×480.

l) An oocyte fixed at 18 h after insemination. The both pronuclei (FPN, MPN) with corresponding sperm tail(arrow) can be seen. Two polar bodies are out of focus. ×240.

초기단계와 16개의 후기단계 자성전핵을 형성하였다.

난포란을 26~28시간 체외배양하고 수정 후 4~18 시간 추가 배양했을 때 73~89%가 제2 성숙분열중기 까지 성숙된 것은 Song과 Iritani(1989)가 비슷한 조건에서 60~84%가 제2 성숙분열중기까지 성숙되었다고 보고한 것과 비슷한 결과였다.

햄스터 적출자궁에서 4시간 30분 전배양하여 수정능획득을 유기한 정자를 26~28시간 체외배양하여 제2 성숙분열중기까지 성숙된 난포란과 체외수정했을 때 6시간 이후에 60%의 정자가 난포란에 침입하여 수정된 것은 Niwa 등(1991)이 동결융해한 정액에 caffeine과 heparin 을 첨가하여 수정능획득을 유기한 정자로 미성숙 GV 단계의 난포란에 체외수정했을 때 수정 후 즉시 정자침입을 확인할 수 있었다는 보고와는 차이가 있었으나 이는 미성숙 난포란을 사용한 것과 본 실험에 비해 다정자 침입이 많았던 것으로 보아 정자의 수정능획득을 유기하는 방법의 차이에서 기인된 것 같으며, Song 등(1989)이 산양에서 비슷한 조건일 때 6시간에는 정자의 침입이 확인되지 않고 12시간에 정자의 침입이 확인된 것과는 상이하나, 이와 같은 현상은 종의 차이에 기인된 것일 가능성이 크다.

수정 후 8시간부터 시간이 경과함에 따라 팽화된 정자두부가 응성전핵을 형성하기 시작하고 난자의 핵도 제2 극체를 방출하고 자성전핵을 형성하기 시작한 것은 Niwa 등(1991)의 보고에서는 수정 후 8시간에 응성전핵과 자성전핵 형성이 시작되었으나 미성숙된 GV 단계의 난포란에 동결융해한 정자를 BO액에 caffeine과 heparin을 첨가하여 수정능획득을 유기한 것이 m-KRB 액만으로 수정능획득을 유기한 것과는 상당한 차이가 있는 것 같으며, 특히 본 실험에서는 다

정자 침입이 거의 없었던 것은 Fulka 등(1982)이 투명대제거 난포란의 거의 50%가 다정자 침입이었다고 보고한 것과 Niwa 등(1991)이 미성숙 GV 단계의 난포란에서 거의 대부분이 다정자 침입이었다고 보고한 것을 비교할 때 난포란을 26~28시간 체외배양함으로써 투명대와 세포질이 성숙되어 표층립이 충분히 방출될 수 있었던 것에 기인된 것으로 추측할 수 있으며 hamster(Moore 와 Bedford, 1978)와 rabbit (Berrios와 Bedford, 1979)에서도 GV 단계의 난포란에서는 표층립의 방출이 충분하지 않았다고 보고한 것과도 일치하는 경향이었다.

#### IV. 요 약

소의 체외수정에서 정자의 난자내 침입시기와 침입한 정자의 변화과정을 관찰하기 위해 26~28시간 체외배양하여 제2 성숙분열중기 까지 성숙된 난포란과 햄스터 적출자궁에서 4시간 30분 전배양하여 수정능획득을 유기시킨 정자를 체외수정하여 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16 및 18시간 후 검경한 결과를 요약하면 다음과 같다.

수정후 4~18시간 정자와 추가배양된 난포란은 73~89%가 제2 성숙분열중기까지 성숙되었다. 수정 후 5시간까지 난포란은 전혀 수정되지 않았으나 6시간 후에는 60%, 8시간 후에는 73%, 10시간 후에는 82%, 14시간 후에는 80%, 18시간 후에는 87%가 각각 수정되었다. 또한 수정된 난포란은 6시간 후에는 대부분 팽화된 정자두부를 갖고 있으나 8시간 이후 부터는 점차 응성전핵과 자성전핵으로 발달되었으며, 10시간

이후에는 대부분 융성전핵과 자성전핵을 갖고 있었다.

이상의 결과로 보아 소의 체외수정에서는 난포란에 정자의 침입이 수정후 적어도 6시간 이전에 일어나고 침입한 정자는 수시간 내에 융성전핵으로 발달되는 것으로 추측된다.

## V. 인용문헌

1. Berrios, M. and J. M. Bedford. 1979. Oocyte maturation : Aberrant post-fusion responses of the rabbit primary oocyte to penetrating spermatozoa. J. Cell Sci., 39 : 1-2.
2. Brackett, B. G. 1983. A review of bovine fertilization *in vitro*. Theriogenology, 19 : 1-5.
3. Brackett, B. G., D. Bousquet, M. I. Boice, W. J. Donawick, J. E. Evans and M. A. Dressel. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. Biol. Reprod., 27 : 147-158.
4. Crister, E. S., M. L. Leibfried-Rutledge, W. H. Eyestone, D. L. Northey and N. L. First. 1986. Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro*. Theriogenology, 25 : 150.
5. Fukuda, Y., M. Ichikawa, K. Naito and Y. Toyoda. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized and cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. Biol. Reprod., 42 : 114-119
6. Fukui, Y. and H. Ono. 1989. Effect of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. J. Reprod. Fert., 86 : 501-506.
7. Fulka, J. Jr., A. Pavlok and J. Fulka. 1982. *In-vitro* fertilization of zona-free bovine oocytes matured in culture. J. Reprod. Fert. 64 : 495-499.
8. Gaddum-Rosse, P., R. J. Blandau, L. B. Langley and K. Sato. 1982. Sperm tail entry into the mouse egg *in vitro*. Gamete Res., 6 : 215-223.
9. Goto, K., Y. Kajihara, S. Kosaka, Y. Nakanishi and K. Ogawa. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* maturation follicular oocytes. J. Reprod. Fert., 83 : 753-758.
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. Iwamatsu, T. and M. C. Chang. 1972. Sperm penetration *in vitro* of mouse oocytes at various times after maturation. J. Reprod. Fert., 31 : 237-247.
12. Lu, K. H., I. Gordon, M. Gallagher and H. McGovern. 1987. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. Vet. Rec., 121 : 259-260.
13. Lu, K. H., I. Gordon, M. Gallagher and H. McGovern. 1990. Pregnancy established in cattle by transfer of fresh and frozen embryos derived from *in vitro* maturation, fertilization of oocytes and their subsequent culture *in vitro*. Theriogenology, 33 : 278.
14. Moore, H. D. M. and J. M. Bedford. 1978. Ultrastructure of the equatorial segment of hamster spermatozoa during penetration of oocytes. J. Ultrastruct. Res., 62 : 110-117.
15. Nagai, T. 1984. *In vitro* fertilization of pig oocytes with boar spermatozoa. Ph. D. Thesis, Kyoto Univ., Kyoto.
16. Niwa, K. 1983. Mammalian fertilization *in vitro*. JPN. J. Zootech. Sci., 54 : 1-17.
17. Niwa, K., C. K. Park and K. Okuda. 1991. Penetration *in vitro* of bovine oocytes during maturation by frozen-thawed spermatozoa. J.

- Reprod. Fert., 91 : 329-336.
18. Song, H. B. and A. Iritani. 1989. *In vitro* fertilization of bovine follicular oocytes matured in culture with bull spermatozoa preincubated in the uteri isolated from hamsters. Korean J. Animal Reprod., 13 : 32-39.
  19. Song, H. B., T. H. Koh, T. H. Byun and K. S. Shim. 1988. Timing of fertilization *in vitro* of follicular oocytes by epididymal spermatozoa in the goat. J. Agr. Sci., Taegu Univ., 2 : 5-10.
  20. Toyoda, Y. and M. C. Chang. 1974. Fertilization of rat eggs *in vitro* by epididymal spermatozoa and the development of such eggs following transfer. J. Reprod. Fert. 36 : 9-22.
  21. Usui, N. and R. Yanagimachi. 1976. Behavior of hamster sperm nuclei incorporated into eggs at various stages of maturation, fertilization and early development: the appearance and decondensation in egg cytoplasm. J. Ultrastruct. Res., 57 : 276-288.
  22. Wright, R. W. and K. R. Bondioli. 1981. Aspect of *in vitro* fertilization and embryo culture in domestic animals. J. Anim. Sci., 53 : 702-729.