

체외성숙 돼지난포란의 체외수정과 배발달에 관한 연구

I. 배양액, 수정능획득 방법이 체외성숙 난포란의 체외수정에 미치는 영향

정형민 · 엄상준 · 송경록* · 이훈택 · 정길생

건국대학교 동물자원연구센터

*건국대학교 의과대학 산부인과학교실

Studies on *In Vitro* Fertilization and Development of *In Vitro* Matured Porcine Follicular Oocytes

I. Effect of Media and Capacitation Procedures on *In Vitro* Fertilization

Chung, H. M., S. J. Uhm, K. R. Seung*, H. T. Lee, and K. S. Chung

Animal Resources Research Center, * College of Medicine, Kon-Kuk University

SUMMARY

These experiments were undertaken to establish the optimal culture systems for *in vitro* maturation, fertilization and subsequently embryonic development of porcine immature follicular oocytes isolated from the ovary of slaughtered pigs. Porcine ovaries were brought to the laboratory from local slaughter house within 1 hour after slaughtering and cumulus oocytes complexes were recovered from antral follicles (3~5mm) with 23 gauge needle. To mature follicular oocytes, cumulus oocytes complexes were washed three times with TCM-199 containing 25mM HEPES and incubated (39°C, 5% CO₂ in air) for 42hrs. Ejaculated and liquid stored boar spermatozoa capacitated with different sperm capacitation methods and media were prepared for fertilizing of matured follicular oocytes *in vitro*. Fertilization was performed by adding 5~10 μ l of capacitated spermatozoa containing 1~5 \times 10⁵ sperm/ml to droplets. Eighteen to twenty-eight hours after sperm insemination, fertilized eggs were washed three times with culture media and transferred to the culture media. The fertilization rates of *in vitro* matured follicular oocytes cultured in B, O., TCM-HEPES, m-KRB, and TALP-II media were 61.3%, 83.0%, 88.9% and 89.2%, respectively. In addition, the polyspermy rates were 60.7%, 66.5%, 53.8%, and 43.9%, respectively. These data indicated that the highest of fertilization and the lowest of polyspermy rate was shown in TALP-II medium. Spermatozoa capacitated by caffeine, heparin, and percoll density gradient treatment in the 4 different media, the fertilization rates were 33.0~57.2%, 39.9~90.2%, and 52.6~92.8%, respectively, showing the lowest rate in caffeine treatment. The development rate of follicular oocytes, fertilized with the spermatozoa capacitated by caffeine, heparin, and percoll gradient in the TALP-II medium, upto 2- to 4-cell stages were 32.6%, 74.5% and 70.9%, respectively. Finally, fertilization rates of follicular oocytes cultured with follicular fluid containing medium from 10 to 100% were 61.2~94.1% and the rates (90~94%) with 10~20% follicular fluids were significantly higher than those (85.3%) of cultured in the media

without follicular fluid. In addition, the rates of pronucleus formation were also higher in follicular fluid treated group (73.1~83.0%) than those (64.7%) of oocytes cultured without follicular fluid. The highest fertilization and pronucleus formation rates was found in oocytes cultured with 10% follicular fluid.

These results suggest that the addition of heparin or percoll density gradient method is better capacitation method. Furthermore, the addition of porcine follicular fluid to the fertilization medium may improve the fertilization rates and formation of pronucleus.

I. 서 론

최근 가축번식학 연구에서 가축 난자의 체외수정, 수정란의 동결보존, 수정란 이식, 수정란의 성관별 및 핵이식을 포함한 미세조작 기술의 발전에 따라 가축의 생산성 향상이 급속도로 향상되어 왔다(First, 1991). 따라서 이러한 연구 성과를 가축의 생산성 향상에 접목시키기 위해서는 가장 기본적인 연구재료인 다수의 수정란을 확보해야 한다는 문제가 도출되었고 이에 따라 도살되는 가축의 난소내에 존재하는 미성숙 난포란을 이용하여 체외에서 다수의 수정란을 확보하려는 연구가 집중적으로 수행되어져 왔다. 특히 우 난포란을 이용한 연구에서는 현재까지 다수의 산자생산 보고가 되고 있어 어느 정도 그 연구가 확립되어 있다고 할 수 있다(Xu 등, 1987; Goto 등, 1988; Kane 등, 1992). 그러나 돼지의 경우 난포란의 체외성숙 시간이 타가축에 비해 상대적으로 길으며(Tsafiriri와 Channing, 1975), 수정능 획득방법이 확립되어 있지 않아 체외수정시 다정자 침입율이 매우 높고 또한 수정된 정자두부의 팽화현상이 낮아 응성전핵 형성이 매우 저조한 실정(Iritani 등, 1978; Nagai 등, 1984; Mattioli 등, 1988; Yoshida 등, 1990)이어서 난포란을 이용한 산자의 생산보고가 극히 제한되어 있다(Yoshida 등, 1990). 현재까지 보고된 돼지 난포란의 연구에서 난포란 성숙을 위해서는 성선자극호르몬과 스테로이드 호르몬 혹은 난포액의 첨가(Mattioli 등, 1989; Yoshida 등, 1990, 1992b; Naito 등, 1988) 및 배양액의 조성변화(Yoshida 등, 1992a, 1993) 등이 보고되었으며, 정자의 수정능 획득을 위해서는 heparine처리법(Mattioli 등, 1989), caffeine처리법(Ding 등, 1992) 등과 같은 화학물질을 이용하거나 난포액의 첨가(Hansen 등, 1991), 고농도 정자가 전배양된 배양

액을 이용하는 방법(Hansen 등, 1991), 난관상피세포등과 같은 체세포와 전배양 처리하는 방법(Nagai와 Moor; 1990) 및 배양액의 조성변화(Yoshida, 1993) 등이 보고되고 있다. 그러나 이들 연구자들간의 결과가 각기 상이하고 또한 그 결과도 일치되지 않은 실정 이어서 이에 대한 종합적인 검토가 요구되고 있는 실정이다.

이에 본 연구에서는 체외성숙된 돼지 난포란을 이용하여 상이한 배양액, 상이한 수정능 획득 방법 및 난포액의 첨가효과를 검토하므로써 최적의 수정조건을 확립하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난포란의 회수

도축장에서 도살되는 돼지로부터 난소를 회수하여 39℃로 조정된 멸균 생리식염수가 충만된 보온병에 담아 1시간이내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 채자 멸균 생리식염수로 난소의 이물질과 혈액을 세척한 다음 70% 알콜스폰지를 이용하여 난소의 표면을 소독하였다. 이어 23 gauge의 주사침이 부착된 10ml 주사기를 이용하여 2~6mm 크기의 가시난포를 흡인한 다음 이를 10ml 원심분리관에 분주한 후 10분간 정치시켰다. 이후 원심분리관 하단의 침전물을 채취하여 TCM-HEPES(25mM) 배양액하에서 난포란만을 회수하였다. 회수된 난포란중 난구세포가 치밀하게 부착되고 난자의 세포질이 균일한 것만을 선별하여 실험에 공시하였다.

2. 미성숙 난포란의 체외성숙

난포란의 체외성숙은 TCM-HEPES배양액에 10% FCS(Fetal calf serum, Gibco BRL, USA)와 1μg/ml FSH, 2IU/ml hCG 및 1μg/ml의 Oes-

tradiol-17 β 가 첨가된 배양액을 제조하고 0.2 μ m의 membrane filter(Gelman Co., USA)로 여과한 후 4-well culture dish에 1 ml적하한 뒤 2시간 이상 39°C, 5% CO₂ 및 95% 공기조건의 배양기내에서 평형시킨 후 각 well당 20개의 미성숙 난포란을 침지하여 42시간 동안 배양함으로써 성숙을 유도하였다 (Chung 등, 1992).

3. 정자의 수정능 획득과 체외수정

1) 정액의 준비

본 연구에 사용된 정액은 KAIC(Korea Artificial Insemination Center)사에서 제작된 액상정액과 축산시험장의 종돈에서 수음법으로 채취한 정액을 사용하였는데 이들의 품종은 Landrace, Duroc, Hampshire종이었다. 실험에 사용된 정액은 운동성이 80% 이상이고 기형율이 20% 이하의 것만을 사용하였으며 액상정액의 보존기간은 3일 이상 경과된 것은 이용하지 않았다.

2) 배양액

정자의 세척과 체외수정을 위해서는 BO배양액 (Brackett와 Oliphant, 1975), TCM-HEPES, m-KRB(Petter등, 1989) 및 수정TALP-II 배양액 (Yanagimachi, 1982)을 사용하였다. 이들 모든 배양액에 4 mg/ml의 Bovine serum albumin(BSA: Sigma, A7030, Fraction V, USA)이 첨가된 것은 정자세척 및 수정능 획득용 배양액으로 15 mg/ml의 BSA가 함유된 배양액은 체외수정용 배양액으로 사용하였는데 이들 배양액의 pH는 7.4로 osmolarity는 290 mOsmol/kg으로 조정하여 사용하였으며 0.22 μ m의 membrane filter(Gelman Co., USA)로 제균하여 4°C에서 보관하여 사용하였다.

3) 정자의 수정능 획득

본 연구에서 사용된 정자의 수정능 획득방법은 다음과 같았다.

(1) Caffeine 처리법

2~3 ml의 액상정액을 10 ml의 BO용액이 함유된 원심분리관에 넣고 800 rpm에서 5분간 원심분리를 실시한 다음 상층액은 제거한 후 2 mM의 caffeine (Sigma, Cell culture grade, USA)이 함유된 BO용

액에 재차 동일조건하에서 원심분리를 실시한 다음 배양기에서 10분간 정치하므로써 정자의 부유를 유도하였다. 부유된 정액은 5×10⁵/ml의 농도가 되도록 조정된 다음 4-well tissue culture plate(Nunc, Denmark)에 1 ml씩 분주하여 3시간 동안 배양기에서 추가로 배양하므로써 수정능 획득을 유도하였다.

(2) Heparin 처리법

원심분리관에 정액 2~3 ml와 정액세척용 m-TALP배양액을 5 ml혼합하여 800 rpm에서 5분간 원심분리를 실시한 다음 상층액을 제거한 다음 100 μ g/ml의 heparin(Cell culture grade, Sigma, USA)이 함유된 배양액 2ml를 분주한 다음 재차 원심분리를 실시하였다. 원심분리가 완료된 정액은 배양기에서 10분간 swim-up을 유도한 후 상층의 운동성이 활발한 정액만을 회수하여 체외수정용 배양액에 정액의 농도가 5×10⁵/ml가 되도록 조정하여 이를 체외수정에 이용하였다.

(3) Discontinuous Percoll Gradient 법

90%와 45%의 Percoll(Pharmacia, Sweden)이 함유된 정자세척용 m-TALP배양액을 제작한 다음 원심분리관에 90% percol용액 2 ml를 하단에 45% percol용액 2ml를 상단에 혼합되지 않게 층층의 gradient를 제작하였다. 이후 이들 원심분리관 상층에 정액 2 ml를 분주한 다음 2,000 rpm에서 15분간 원심분리를 실시하여 수정능획득을 유도하였다.

4) 체외수정

체외성숙이 완료된 난포란은 TCM-HEPES배양액으로 5회 세척한 다음 상기 3가지 방법에 의해서 수정능이 획득된 정자를 이용하여 수정을 유도하였다. 이때 정자의 농도는 모두 5×10⁵/ml로 조정하였으며 이들 정자의 운동성은 80% 이상의 것만을 사용하였다. 수정후 18~20시간째에 난포란을 회수하여 신선배양액으로 세척한 다음 m-KRB배양액으로 옮겨 배발생을 유도하거나 수정후 12시간째에 aceto-orcin염색을 실시하여 수정율과 다정자 침입율을 조사하였다.

4. 배양조건

본 연구에서 사용된 난포란의 체외성숙, 수정 및 체

외성숙, 수정 및 체외배양을 위해서는 39°C의 5% CO₂ 및 95% 조건의 배양기(Forma, USA)에서 실험을 실시하였다.

5. 통계처리

본 연구에서 얻어진 모든 실험자료의 통계처리는 χ^2 검정을 실시하여 $P < 0.05$ 이하의 유의성만을 대조구와 처리구간의 통계학적 차이로 인정하였다.

II. 결과 및 고찰

1. 난포란의 체외수정에 미치는 배양액의 영향

체외성숙이 완료된 난포란의 체외수정시 가장 효과적인 배양액을 선정하기 위하여 BO액(Brackett와 Oliphant, 1975), TCM-HEPES 배양액, m-KRB (Petters등, 1990) 및 m-TALP II (Yanagimachi, 1982) 배양액을 사용하여 원심분리법과 swim-up법으로 얻은 정자를 이용하여 체외수정을 실시한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 이 Table 1에서 보는 바와 같이 BO용액에서의 체외수정율은 61.3%로서 실험에 사용된 4가지 배양액중 가장 저조한 수정율을 나타내었다. 한편, TCM-HEPES, m-KRB 및 TALP-II 배양액의 수정율은 각각 83.0%, 88.9% 및 89.2%로 나타났다. 그러나 전처리구에서 다정자의 침입율은 43.9~66.5%로서 상당히 높은 수치를 나타내었다. 이러한 결과는 Park(1989)이 체외성숙 돼지 난포란을 체외에서 수정시켰을 때 정자의 침입이 이루어진 난자의 70%이상에서 다정자 침입이 나타났다는 결과와 일치되는 것이었다.

2. 수정능획득 방법에 따른 난포란의 체외수정

상이한 4가지의 배양액과 상이한 3가지의 정자 수정능 획득 방법을 이용하여 체외성숙이 완료된 난포란의 체외수정을 실시한 결과는 Table 2과 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 이 표에서 보는 바와 같이 BO액에서의 수정율은 caffeine처리구의 경우 33.0%였으며, heparin처리구와 percoll처리구의 경우 수정율은 각각 40.9%와 52.6%였다. 또한 이들 방법에 의해 얻어진 수정란중 다정자 침입이 일어난 수정란의 비율은 각각 58.9%, 20.9% 및 16.1%였다. TCM-HEPES배양액의 경우 caffeine, heparin 및 percoll처리에 의한 수정율은 각각 36.8%, 39.9% 및 61.8%였고 다정자 침입율은 각각 17.4%, 12.4% 및 12.7%를 보였다. m-KRB배양액의 경우 55.1%, 79.0% 및 77.9%의 수정율 및 30.5%, 14.9% 및 21.1%의 다정자 침입율을 나타내었으며, TALP-II 배양액의 경우 수정율은 57.2%, 90.2% 및 92.8%였으며 다정자 침입율은 각각 22.8%, 11.3% 및 10.3%로 나타났다. Table 9에서 보는 바와 같이 처리한 배양액중 m-KRB배양액과 TALP-II 배양액이 다른 두 배양액에 비해 유의하게 높은 수정율을 나타냈으며, 수정능 획득 방법에 따른 수정율에서는 배양액에 상관없이 heparin이나 percoll gradient처리를 사용한 구에서 다같이 caffeine 처리법에 비해 높은 수정율을 나타내었으며 다정자 침입율에서도 caffeine처리법이 다른 정자 처리법에 비해 높은 다정자 침입율을 나타내어 돼지 난포란의 수정에 있어서는 caffeine처리법이 바람직한 처리방법이 되지 못한다는 사실을 확인하였다. 모든 처리구중에서 TALP-II 배양액에서 가장 높은 수정율과 가장 낮은 다정자 침입율을 나타내었는데 이는 다른 3가지 배양액에 비해 TALP-II 배양액의 경우 taurine과 epinephrine이 함유되어 있는데 이들 물질이

Table 1. *In vitro* fertilization rates of *in vitro* matured porcine follicular oocytes in four different fertilization media

Media	No. of oocytes inseminated	No. (%) of oocytes fertilized	No. (%) of oocytes polyspermy
B.O	320	196 (61.3) ^a	119 (60.7)
TCM-HEPES	270	224 (83.0) ^b	149 (66.5)
m-KRB	270	240 (88.9) ^b	129 (53.8)
TALP-II	360	321 (89.2) ^b	141 (43.9)

Means in the same column with the same superscript are not different ($P < 0.01$)

Table 2. *In vitro* fertilization rates of *in vitro* matured follicular oocytes in different media with different treatment

Fertilization media	Treatment*	No. of oocytes examined	No. of oocytes fertilized(%)	No. of oocytes polyspermy(%)
B O Sol.	Caffeine	788	260(33.0) ^a	153(58.9) ^a
	Heparin	1,028	421(40.9) ^a	88(20.9) ^b
	Percoll	365	192(52.6) ^b	61(16.1) ^b
TCM-HEPES	Caffeine	889	327(36.8) ^a	57(17.4) ^b
	Heparin	670	267(39.9) ^a	33(12.4) ^b
	Percoll	128	79(61.8) ^b	10(12.7) ^b
m-K R B	Caffeine	321	177(55.1) ^a	54(30.5) ^b
	Heparin	1,872	1,479(79.0) ^b	221(14.9) ^b
	Percoll	335	261(77.9) ^b	55(21.1) ^b
TALP- II	Caffeine	360	206(57.2) ^a	47(22.8) ^b
	Heparin	875	789(90.2) ^c	89(11.3) ^b
	Percoll	2,492	2,312(92.8) ^c	239(10.3) ^b

* Caffeine(2 mM), Heparin(100 g/ml), Percoll(2-step, 40%, 60%). Means in the same column with the same superscript are not different (P<0.05). Statistical differences were analyzed from stastic comparison among means of treatment group by fertilization media.

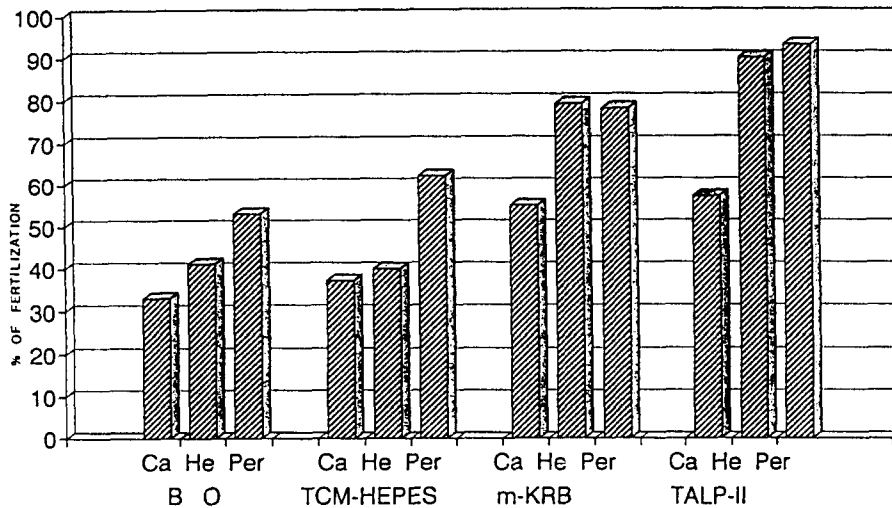


Fig. 1. Effects of three different sperm capacitation procedures and four different media on *in vitro* fertilization of porcine follicular oocytes

Ca : Caffeine(2mM)

He : Heparin (100 μg/ml)

Per : Discontinuous percoll gradient(45%, 90%)

정자의 활력과 수정능 획득을 촉진시켜 주는 물질로 생각된다.

또한 정자의 수정능 획득 방법에 있어서도 caffeine처리법에 비해 heparin과 percoll gradient법

이 유의적으로($P < 0.05$) 높은 수정율을 나타내었는데, 이는 돼지 정자의 경우 단기간의 정자 처리법이 장기간 처리법에 비해 수정율이 높다는 것을 시사한다. 이와 같은 결과는 Fukui 등(1990)이 우난포란의 체외 수정시 heparin을 처리하는 것이 바람직하며 정자의 처리시간도 5~60분 이내의 단시간 처리법이 수정율을 높일수 있는 방법이라고 보고한 결과와 Utsumi 등(1991)이 우난포란의 체외수정시 percoll법을 이용하므로서 다정자 침입율을 저하시킬 수 있다고한 결과와 대체로 일치하는 것이라 하겠다.

한편, TALP-II 배양액하에서 상이한 3가지 수정능 획득 방법에 의해서 수정이 이루어진 난포란이 2-세포기로 발달하는 비율을 조사한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다.

Table 3에서 나타난 바와 같이 caffeine 처리법에 의해 수정이 이루어진 난포란의 경우 2-세포기로의 난할율은 32.6%인데 비하여 heparin이나 percoll gradient법에 의해 수정능 획득이 이루어진 정자를 이용하여 수정된 난포란의 경우 2-세포기로의 난할율은 각각 74.5%와 70.9%로서 caffeine 처리구의 난할율에 비해 유의적으로 높은 성적을 나타내었다($P < 0.05$).

01). 이러한 결과는 정자의 수정능 획득 방법이 난포란의 수정율뿐만 아니라 이후의 배발달에도 관여한다는 사실을 뒷받침해주는 것이라 하겠다.

3. 체외수정에 미치는 난포액의 영향

한편 난포란의 체외성숙시 체외성숙을 촉진시키는 인자중의 하나였던 난포액이 체외수정에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하기 위하여 m-KRB 배양액을 기초 배양액으로하고 10~100%의 난포액을 첨가한 다음 heparin 처리법에 의해 수정능이 획득된 정자를 이용하여 체외수정을 실시한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같다.

Table 4에서 보는 바와 같이 난포액이 함유되지 않은 배양액의 경우 수정율은 85.3%였다. 반면 난포액 첨가구의 경우, 100% 난포액 처리구를 제외한 모든 구에서 대조구에 비해 대차가 없는 수정율을 나타내었다. 한편, 이들 수정란의 응성전핵 형성율을 조사한 결과 난포액이 첨가되지 않은 대조구의 경우 응성전핵 형성율은 64.7%인 데 반해 난포액 첨가 전처리구의 경우 응성전핵 형성율은 73.1~83.0%로서 다같이 유의하게 높은 전핵 형성율을 나타내었다($P < 0.05$). 이

Table 3. Effects of three different treatments for the porcine sperm capacitation on *in vitro* fertilization and development of *in vitro* matured oocytes

Treatment	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes fertilized	No. (%) of embryos cleaved
Caffeine	273	148(54.2) ^a	89(32.6) ^a
Heparin	1,017	844(83.0) ^{a,b}	629(74.5) ^{a,b}
Percoll	298	247(82.9) ^{a,b}	175(70.9) ^{a,b}

Means in the same column with the same superscript are not different ($P < 0.01$)

Table 4. Effects of various concentrations of porcine follicular fluids on the *in vitro* fertilization rates of *in vitro* matured porcine oocytes

Concentration of follicular fluid	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes fertilized	No. (%) of oocytes with male pronucleus
None	136	116(85.3) ^a	75(64.7) ^a
10%	536	483(90.1) ^a	401(83.0) ^b
20%	376	354(94.1) ^a	278(78.5) ^b
50%	346	287(82.9) ^a	219(76.3) ^b
100%	152	93(61.2) ^b	68(73.1) ^b

Means in the same column with the same superscript are not different ($P < 0.05$)

러한 결과는 난포액의 첨가가 난포란의 체외성숙을 촉진할 뿐만 아니라 수정과정에서도 수정율과 정자의 팽화 및 응성전핵으로의 발달을 촉진한다는 사실을 뒷받침해주는 결과라 하겠다. 이러한 결과는 Ishibashi 등 (1992)이 흰쥐 난포란의 체외성숙과 수정시 돼지 난포액을 첨가할 경우 난포란의 체외성숙 뿐만 아니라 난포란의 체외수정을 및 난할율이 증가된다고 보고한 결과와 일치되는 것이라 하겠다. 난포액의 첨가가 난포란의 성숙과 수정에 미치는 역할에 대해서는 현재까지 알려진 바가 없지만 일반적으로 난포액내에는 다량의 glycosaminoglycans가 존재하며 이들 GAGs 물질들은 난포란의 생존성을 증대시키고 퇴행을 연장 혹은 억제시키며(Sato 등, 1987, 1990), 투명대의 경화현상을 억제하여 정자의 침입을 용이하게 하고(Vanderhyden과 Armstrong, 1989), 정자의 수정능 획득을 용이하게 하며(Hansen 등, 1991), 수정시 정자의 팽화 및 응성전핵으로의 형성을 촉진하는 것(Yoshida 등, 1992)으로 알려져 있다. 또 난포액의 첨가가 난포란의 체외성숙을 억제시키는 작용(Tsafirri와 Channing, 1975; Tsafirri 등, 1977)도 보고되고 있어 추후에 좀더 구체적인 검토가 있어야 할 것으로 사료된다.

IV. 적 요

본 연구는 체외성숙 유도된 돼지 난포란을 이용하여 다수의 수정란을 확보하기 위해 상이한 배양액과 수정능 획득 방법 그리고 난포액을 첨가하므로써 최적의 수정조건을 확립하기 위해서 실시하였다.

돼지 난포란은 도살장에서 얻은 난소를 1시간 이내에 실험실로 운반한 다음 23 게이지 주사침이 부착된 10ml 주사기를 이용하여, 3~5mm의 난포로부터 난구세포-난자의 복합체를 회수하였다. 회수된 난포란은 25mM의 HEPES가 함유된 TCM-199배양액으로 3회 세척한 다음 성선자극호르몬과 스테로이드호르몬이 첨가된 TCM-HEPES배양액으로 42시간 동안 39°C, 5% CO₂ 및 95% 공기조건인 배양기내에서 체외성숙을 유도하였다. 체외성숙이 유도된 난포란은, 액상보존된 정액을 사용하여 상이한 배양액과 상이한 수정능 획득 방법에 따라 처리한 다음 1~5 × 10⁵ /ml의 농도로 조정된 정액을 공시하여 체외수정

을 실시하였다. 체외수정 18~22시간후의 난포란은 신선배양액으로 세척한 후 염색을 실시하여 수정율과 다정자 침입율을 조사하였으며 일부의 난포란은 m-KRB배양액으로 옮겨 난할율을 조사하였다. 체외에서 성숙된 난포란을 체외에서 수정함에 있어서 최적의 배양액을 선정하고자 B.O액, TCM-HEPES, m-KRB 및 TALP-II 배양액을 공시하여 체외수정을 실시한 결과 수정율은 각각 61.3%, 83.0%, 88.9% 및 89.2%였으며 다정자 침입율은 각각 60.7%, 66.5%, 53.8% 및 43.9%로서 TALP-II 배양액이 가장 높은 수정율과 가장 낮은 다정자 침입율을 나타내었다. 상기 4가지 배양액을 공시하여 각기 Caffeine 처리법, Heparin처리법 및 Percoll Density Gradient법으로 수정능획득을 유도하였던 결과 배양액의 종류에 관계없이 Heparin처리법(39.9~90.2%)이나 Percoll처리법에 의한 수정율(52.6~92.8%)이 Caffeine 처리법에 의한 수정율(33.0~57.2%)보다 유의하게 높았다. TALP-II 배양액을 공시하여 상기 3가지 상이한 방법으로 수정능획득이 이루어진 정자에 의해 수정된 수정란을 체외배양한 결과 2~4-세포기로의 난할율은 각각 32.6%, 74.5% 및 70.9%였다. 또한 체외수정에 미치는 난포액의 영향을 조사하기 위하여 0~100% 난포액이 첨가된 배양액을 사용하여 체외수정을 실시한 결과 난포액이 함유되지 않은 대조구의 수정율 3%에 비하여 10%와 20% 첨가구의 수정율은 각각 90.1% 및 94.1%로서 높게 나타난 반면, 50%와 100%의 난포액이 첨가된 구의 경우는 각각 82.9%와 61.2%로써 대조구에 비해 저조하였다. 한편 응성전핵형성율은 대조구의 64.7%에 비하여 난포액 첨가구는 73.1~83.0%로써 10%난포액이 첨가된 구에서 가장 높은 수정율과 전핵형성율을 나타내었다.

이상의 결과로 보아 체외성숙 난포란의 체외수정을 위해서는 TALP-II 배양액이, 수정능 획득 방법으로는 Heparin이나 Percoll처리법이 바람직하며 수정용 배양액에 의한 난포액의 첨가는 수정율 뿐만아니라 응성전핵형성율을 촉진하는 것으로 생각된다.

V. 인용문헌

1. Brackett, B.G., and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*.

- Biol. Reprod., 12:260-274.
2. Chung, H.M., S.P. Park, J.H. Oh, H.T. Lee and K.S. Chung. 1992. The effect of rabbit peritoneal fluid on *in vitro* maturation of mammalian follicular oocytes. The proceeding of the 12th international congress on animal reproduction, in Hague, Netherlands, 1:318-320.
 3. Ding, J., N. Clarke, T. Nagai, and R.M. Moor. 1992. Protein and nuclear changes in pig eggs at fertilization. Mol. Reprod. Dev., 31:287-296.
 4. First, N. L. 1991. New advances in reproductive biology of gametes and embryos. In: Animal applications of research in mammalian development. Current communications, CSHL Press, pp. 1-22.
 5. Fukui, Y., T. Sonoyama, H. Mochizuki, and H. Ono. 1990. Effects of heparin dosage and sperm capacitation time on *in vitro* fertilization and cleavage of bovine oocytes matured *in vitro*. Theriogenology, 34:579-591.
 6. Goto, K., Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba, Y. Nakanishi, 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.
 7. Hansen, C., A. Srikandakumar, and B.R. Downey. 1991. Presence of follicular fluid in the porcine oviduct and its contribution to the acrosome reaction. Mol. Reprod. Dev., 30:148-153.
 8. Iritani, A., K. Niwa, and H. Imai. 1978. Sperm penetration *in vitro* of pig follicular oocytes matured in culture. J. Reprod. Fert., 54:394-383.
 9. Kane, M.T. 1987. Culture media and culture of early embryos. Theriogenology, 27:49-57.
 10. Mattioli, M., B. Barboni, M.L. Bacci, and E. Seren. 1988. Maturation of pig oocytes: Observation on membrane potential. Biol. Reprod., 43:318-322.
 11. Mattioli, M., M.L. Bacci, G. Galeati, and E. Seren. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. Theriogenology, 31:1201-1207.
 12. Nagai, T., K. Niwa, and A. Iritani. 1984. Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization *in vitro* of pig follicular oocytes. J. Repr. Fert., 70:271-275.
 13. Naito, K., Y. Fukuda, and Y. Toyoda. 1988. Effect of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured *in vitro*. Gamete Res., 21:289-295.
 14. Park, S. B. 1989. Studies on fertilization *in vitro* in the pig. PH. D. Thesis, Kyoto University, Japan.
 15. Petters, R.M, and M.L. Reed. 1991. Addition of taurine or hypotaurine to culture medium improves development of one- and two-cell pig embryos *in vitro*. Theriogenology, 35:253.
 16. Tsafirri, A., N. Dekel, and S. Bar-Ami. 1982. The role of oocytes maturation inhibitor in follicular regulation. J. Reprod. Fert., 64:541-551.
 17. Utsumi, K., H. Kato, and A. Iritani. 1991. Full-term development of bovine follicular oocytes matured in culture and fertilized *in vitro*. Theriogenology, 35: 695-703.
 18. Xu, K.P., T. Greve, H. Callesen, and P. Hyttel. 1987. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized *in vitro*. J. Reprod. Fert., 81:501-504.
 19. Yanagimachi, Y. 1982. *In vitro* sperm capacitation and fertilization of golden hamster eggs in a chemically defined medium. In: *In vitro* fertilization and embryo transfer. E.S.E. Hafez and K. Semm, eds. MTP

- Press, pp. 65-76.
20. Yoshida, M., K. Ramba, and Y. Kojima. 1989. Effect of gonadotropins and estradiol-17 on the timing of nuclear maturation and cumulus mass expansion in pig oocytes cultured *in vitro*. Jpn. J. Anim. Reprod., 35:86-91.
 21. Yoshida, M., Y. Ishizaki, and H. Kawagishi. 1990. Blastocyst formation by pig embryos resulting from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. J. Reprod. Fert., 86:1-8.
 22. Yoshida, M., Y. Ishizaki, H. Kawagishi, K. Ramba, and Y. Kojima. 1992a. Effect of porcine follicular fluid on *in vitro* maturation of pig oocytes and on their subsequent fertilizing and developmental capacity *in vitro*. J. Reprod. Fert., 95:481-488.
 23. Yoshida, M., K. Ishigaki, and V. G. Pursel. 1992b. Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured *in vitro*. Mol. Reprod. Dev., 31:68-71.
 24. Yoshida, M. 1993. Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes *in vitro*. Mol. Reprod. Dev., 35:76-81.