

## 돼지 난포란의 체외수정 및 체외발달에 관한 연구

박성원 · 홍승표 · 진종인 · 이지삼 · 정장용 · 박희성  
진주산업대학교 축산학과

### Studies on the *In Vitro* Fertilization and *In Vitro* Development of Porcine Embryos

S. W. Park, S. P. Hong, J. I. Chin, J. S. Lee, J. Y. Chung and H. S. Park

Dept. of Animal Science, Chinju National University, Chinju 660-758, Korea

#### SUMMARY

To improve the efficiency of *in vitro* production of embryos with follicular oocytes in pig, the recovery rates, *in vitro* fertilization and development. The results obtained were as follows:

The number of oocytes recovered 37 ovary was 1,365 by aspiration, 1,884 by slicing and 3,830 aspiration post slicing, per ovary was averaged 103.5 aspiration post slicing than 30.7 by aspiration and 50.8 by slicing ( $P < 0.05$ ). The percentage of grade I and II oocytes recovered was 0.05~0.2% and 1.7~2.3% respectively ( $P < 0.05$ ).

The fertilization rates of ejaculate and epididymis sperm was 83.0 and 83.1%. And cleavage rate was 60.8 and 69.0% respectively ( $P < 0.05$ ). However, there were no significant differences between sperm sources. The cleavage rates of fertilized oocyte was significantly ( $P < 0.05$ ) higher as B.O(92.8%) than TALP(90.1%) or mTBM(80.1%). And *in vitro* developed to blastocyst rates of mTBM media used for fertilization was significantly ( $P < 0.05$ ) higher as 12.4%, compared with the results using the media of TALP(1.6%) or B.O(0.0%).

The embryos developed 2-cell stage after *in vitro* fertilization were co-cultured with or without POEC and BOEC in NCSU-23 and TCM-199 media. *In vitro* developed to blastocyst rates was NCSU-23 with POEC(2.3%) or BOEC(1.2%), but *in vitro* cultured in TCM-199 medium with POEC or BOEC was not developed to blastocyst. The percentage of embryos that developed to morula stage in 0, 50, 100, 200 and 250 $\mu$ M was 16.6, 22.0, 13.5, 19.0 and 22.0%, respectively.

(Key words : oocytes, aspiration, slicing, fertilization,  $\beta$ -mercaptoethanol, culture, porcine)

#### 서론

근래에 와서 수정란 이식기술이 널리 이용되고 있으나 수정란이식 기술의 산업화를 위해서는 수정

란의 다량생산이 가능해야 한다. 이를 위해서는 최근 도축되는 가축의 난소에서 회수한 미성숙 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후 체외발달을 유도하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

도축된 개체로부터 채집한 난포란의 체외성숙,

체외수정 및 체외발달에 관한 연구는 난자의 성숙 및 수정 등의 생리학적 기전의 규명과 새로운 번식 기술의 개발에 매우 유용한 연구분야이지만 아직까지도 만족할 만한 수준에는 미치지 못하고 있으나 돼지에서도 체외수정란의 이식에 의한 산자생산이 성공함으로써 이 기술의 활용가치가 매우 높게 평가되고 있다(Mattioli 등, 1989).

돼지의 체외수정은 Iritani 등(1978)이 처음으로 성공을 거둔 이래 Mattioli 등(1989)은 체외수정란의 이식에 의한 산자를 생산하였다. 이 외에도 돼지의 체외수정에 관한 연구는 Edwards(1962)가 난포란의 체외성숙에 관하여 처음으로 보고한 이래 Leman과 Dziuk(1971), Prochazka 등(1992) 및 이 등(1994)에 의하여 많은 연구가 수행되어 왔다.

난포란의 채란은 소에서 흡입법보다 세절에 의한 방법이 회수율이 높을 뿐만 아니라 보다 많은 배반포기 수정란을 얻을 수 있다고 보고된 바 있다(Sus와 Madison, 1983). 난포란의 체외수정에 있어서 성숙배양시간이 길어지면 난자의 노화로 인하여 다정자 침입율이 높고(Hunter, 1991), 42~46시간 성숙배양이 핵성숙율이 가장 양호한 것으로 알려져 있다(Prochazka 등, 1992). 체외수정시 사용하는 정액에 있어서도 Nagai 등(1988)은 사출된 정자보다 정소상체미부정액이 체외수정율이 높다고 하였으나, Zheng 등(1992)은 동결정액이 신선정액보다 수정율이 높고 다정자 침입율은 낮으면서 진행형성율이 높다고 하여 연구자들간에 많은 견해가 있다.

체외수정란의 체외발달은 여러 요인에 의해서 영향을 받는 것으로 알려져 있으며, 대부분의 포유동물 수정란은 일정한 발달단계까지 발달 후 발육지연이나 정지가 되는 Cell block현상은 돼지의 경우는 4-세포기에 일어나는데 아직까지 정확히 규명되어 있지 않으며 이를 극복하기 위해  $\beta$ -Mercaptoethanol 및 Cysteine의 첨가에 대한 연구가 수행되어 왔으며 소의 경우 체외수정란의 체외배양시  $\beta$ -Mercaptoethanol을 첨가하여 높은 융성전핵 형성으로 배반포기까지 도달하였다고 보고(Takahashi 등, 1996; Lim 등, 1996)하였으나 돼지 수정란에 대한  $\beta$ -Mercaptoethanol 첨가에 대한 연구는 아직까지 없는 실정이다. 체외수정란의 체외발달에 있어서 돼지 난관상피세포, 태아의 fibroblast monolay-

er 또는 이들 두가지의 혼합하여 공배양을 실시하였을 때 높은 체외발달성적을 얻었다고 하였다(Whit-e 등, 1989).

그러나 돼지의 체외수정란의 생산은 적정 체외성숙 조건확립, 체외수정용 배양액의 제조와 높은 polyspermy 문제 및 낮은 배반포기로의 발달을 개선을 위한 체외배양체계 확립 등 아직도 많은 문제점이 해결되지 못하고 있는 실정이다.

따라서 본 연구는 돼지 체외수정란의 생산에 있어서 체외수정기법과 체외배양체계를 확립하고자 난포란의 회수방법과 정액의 차이에 따른 체외수정율 및 체외발달율을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 난소의 채취

본 실험에 사용된 난포란은 도축장에서 도축되는 성숙 모돈의 난소의 난포로부터 채취하였으며, 도살직후 적출된 난소는 100units/ml의 penicillin G(Sigma, USA)와 100 $\mu$ g/ml의 streptomycin(Sigma, USA) 항생제가 첨가된 37 $^{\circ}$ C의 멸균된 생리식염수에 담아 1~2시간내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 지방조직등을 제거한 후 항생제가 첨가된 37~39 $^{\circ}$ C의 신선한 생리식염수로 3~4회 세척하여 실험에 사용하였다.

### 2. 난포란의 회수

채취한 난소로부터 미성숙 난포란의 회수는 난소의 난포에서 흡입하는 방법, 난소를 세절하여 채취하는 방법과 흡입 후 다시 세절하는 방법 등으로 구분하여 각각 회수율을 조사하였다. 즉 흡입법은 18 gauge 주사바늘이 부착된 10ml 주사기로 기본배양액(TCM-199 + 5% FBS) 1ml를 흡입후 난포액과 함께 난포란을 흡입하는 방법으로 미성숙 난포란을 채취하였으며, 세절법은 기본배양액(TCM-199 + 5% FBS)이 담겨 있는 85mm dish에 난소를 반으로 절제하여 펼친 다음 세절용 칼로 난소 표면에 존재하는 2~6mm에 있는 난포액과 난소실질내의 난포란을 미세하게 세절하여 난포란을 회수하였다. 흡입후 세절에 의한 채취는 흡입법으로 채취한 난소를 다시 세절하여 난포란을 회수하였다. 채취한

난포액은 5% CO<sub>2</sub>, 98~99% 습도, 39℃ CO<sub>2</sub> 배양기내에서 5~10분간 정치시킨 후 상층액은 버리고 하층액만 취하여 도립현미경(Nikon, Japan) 하에서 난포란을 수집하였다. 채집한 난포란은 Wiemer 등(1991)의 방법에 따라 난구세포의 부착 정도와 세포질의 충실도에 따라 4등급으로 분류하여 회수율을 조사하였다. 즉 난구세포가 4층이고 세포질이 균일한 것을 Grade I, 난구세포가 3층인 것은 Grade II, 난구세포가 2층으로 형성된 것은 Grade III, 그리고 난구세포가 나화되었거나 퇴화된 것은 Grade IV 등급으로 분류하였다.

### 3. 난포란의 체외성숙

회수된 난포란은 TCM-199(Sigma, USA)와 NCSU-23(Wang 등, 1997)을 체외성숙용 기본배양액으로 하여 10% FBS(Gibco, USA), 10% 돼지난포액(pFF), 1μg/ml FSH(Sigma, USA), 2IU/ml hCG(Sigma, USA), 1μg/ml estradiol-17β(Sigma, USA) 호르몬을 첨가하여 5% CO<sub>2</sub>, 98~99% 습도, 39℃ CO<sub>2</sub> 배양기내에서 3시간 이상 전배양을 시킨 다음, 4 Well-dish(NUNC, Denmark)에 Well당 30~35개의 미성숙 난포란을 적하하여 46시간동안 배양함으로써 체외성숙을 유도하였다. 이때 체외성숙용 배양액은 pH 7.4, 삼투압을 270mOsmol/kg으로 조정하여 사용하였으며, 체외성숙 배양액에 첨가한 난포액(pFF)은 직경 2~6mm의 포상난포로부터 난포액을 흡입하여 10ml 튜브에 넣고 1500×g에서 30분간 원심분리한 후 0.80μm millipore filter(Corning, USA)로 1차 여과하였다. 그리고 2차로 0.22μm millipore filter로 여과, 멸균한 후 -20℃에서 냉동보관하면서 사용하였다.

### 4. 체외성숙란의 염색

난포란의 성숙염색은 46시간 동안 성숙배양시킨 난포란을 0.3%의 hyaluronidase(Sigma, USA)로 성숙된 난자의 난구세포를 완전히 제거한 후 slide glass 위에 난포란을 20~25개를 적하하여 cover glass으로 덮고, 난포란의 부피로 생긴 cover glass과 slide glass의 틈으로 고정액(ethanol:acetic acid=3:1)을 흘리는 방법으로 5분간 고정을 실시

하였다. 고정이 끝난 난포란의 염색은 염색액을 고정액과 같은 방법으로 주입하여 2~3분간 염색을 실시한 후, 탈염제(acetic acid : distilled water : glycerol=1:3:1)를 흘려 난세포질 이외의 염색을 제거시킨 다음 현미경하에서 난포란의 성숙 여부를 판단하였다.

## 5. 정자의 준비 및 체외수정

### 1) 수정용 배양액의 제조

체외수정용 기본 배양액은 TALP, B.O 및 mTBM(Wang 등, 1997)용액을 사용하였다. B.O 용액은 15mg/ml의 BSA와 Hypotaurin(Sigma, U.S.A) 0.9mg/ml를 첨가하였으며, TALP용액은 기본배양액에 0.018g Glucose(Sigma, USA), 0.042g NaHCO<sub>3</sub>, 0.44mg Na-Pyruvate 및 0.12g BSA를 첨가하여 사용하였고 mTBM용액은 기본배양액에 2mmol의 caffeine을 첨가하여 사용하였다. 이때 모든 수정용 배양액은 milipore filter(0.2μm)로 여과시켜 멸균하여 35mm dish에 소적을 만들어 파라핀 오일로 피복한 다음 5% CO<sub>2</sub>, 98~99% 습도, 39℃ CO<sub>2</sub> 배양기내에서 전배양을 유도하였다.

### 2) 정액의 준비

먼저 정소상체미부 정액은 도축장에서 도살되는 성숙한 숫돼지를 도살 직후 2~3개의 다른 개체의 정소상체미부를 2시간내에 실험실로 운반하여 항생제가 첨가된 생리식염수로 3~4회 세척한 다음 Niwa와 Ohgoda(1988)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 정소상체미부의 표피를 절개하여 개체별로 채취된 정자는 정장내의 수정능 억제물질을 제거하기 위하여 기본배양액으로 2~4배 희석하여 800×g에서 5분간 2회 원심분리하여 15분간 정치시켜 활력이 양호한 부유된 상층액 정자만 채집하였다. 다시 수정 배양액에 2회 원심분리 후 15분간 5% CO<sub>2</sub>, 98~99% 습도, 39℃ CO<sub>2</sub> 배양기내에 정치하여 정자농도가 1~2×10<sup>6</sup>/ml이 되게 조정하였으며, 수정용 소적에 수정능획득을 위하여 90~120분 동안 배양을 실시하였다.

신선정액의 준비는 본 대학교 동물사육장에서 사

육되고 있는 성숙한 숫돼지(듀록종)에서 수압법으로 채취하였다. 채취하기전 멸균된 병을 빛과 온도로 부터 정액을 보호하기 위하여 타올과 은박지로 병을 덮어 씌워 사용하였으며, 채취시 정액의 오염방지를 위하여 중모돈의 음경 표피와 주위를 멸균된 생리식염수로 3~4회 세척한 후 성적흥분을 유발시켜 승가를 유도하였다. 이때 음경이 돌출되면 손으로 압력을 가하였으며, 5~10초 후에 사출된 정액은 오염방지를 위하여 30~50ml은 버린 다음 채취하였다. 200ml 정도의 정액을 채취한 후 곧바로 실험실로 운반하여 정소상체미부의 정액처리방법과 동일한 방법으로 정액을 처리하였다.

### 3) 체외수정

체외성숙이 완료된 난포란은 3~4회 세척하여 준비하였으며, 전처리가 끝난 정자는  $1\sim 2 \times 10^6$  /ml 들어 있는 수정용 소직에 10개 전후의 성숙란을 넣어 약 12시간 동안 체외배양을 실시하여 수정을 유도하였다. 이때 체외수정용 배양액에 따른 체외 발달율을 조사하기 위하여 B.O, Fert-TALP 및 mTBM배양액을 각각 구분하여 체외수정율을 조사하였다.

### 6. 수정란의 체외배양

체외수정이 이루어진 수정란은 기본배양액(TCM-199 + 5% FBS)으로 4~5회 세척하여 난구세포를 제거한 다음 24-Well dish (Falcon, USA)에 15~20개의 수정란을 넣어 난관상피세포와 공배양을 실시하였으며, 48시간 간격으로 신선한 NCSU-23배양액으로 교환하면서 수정후 7~9일 까지 체외배양을 실시하여 후기배로의 발달을 유도하였다. 또한 체외배양용 NCSU-23배양액에  $\beta$ -Mercaptoethanol (Sigma, USA)을 농도별로 첨가하여 후기배로의 발달율을 조사하였다. 공배양을 위한 난관상피세포의 준비는 도축장으로부터 수집한 난관을 항생제 함유된 생리식염수로 2~3회 세척하여 난관의 결합 조직과 지방덩어리를 제거한 다음 난관의 양쪽 끝부분을 약 1cm 정도 제거하였으며, 난관협부에서 누두부쪽으로 10% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 1~2ml 관류시켜 난관상피세포를 회수하였다. 채취한 난관상피세포를 1000×g로 원심분리시

켜 상층액을 제거하고 하층의 pellet 부분을 2회 이상 세척하여  $2 \times 10^6$  cell /ml의 농도로 조정하여 배양시킴으로써 monolayer cell의 형성을 유도하였다.

### 7. 통계학 분석

본 실험에서 얻어진 결과들의 통계학적 분석은 SAS package를 이용하여 각 요인의 유의성 검정을 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 난포란의 회수율

채취한 난소의 난포(2~6mm)에서 난포란을 흡입법, 세절법 및 흡입후 세절법 등 3가지 방법으로 채란하여, 난구세포의 분포 정도에 따라서 등급별(grade I, II, III, IV)로 분류하여 회수한 난포란의 회수율은 Table 1에서 보는 바와 같다.

회수방법별로 각각 37개의 난소에서 회수한 난포란은 흡입법이 1,365개, 세절법이 1,884개 및 흡입후 세절법이 3,830개였으며, 난소당 회수한 난포란은 흡입 후 세절법이 103.5개로써 흡입법과 세절법의 30.7 및 50.8개보다 유의적( $P < 0.05$ )으로 회수율이 높았다. 회수한 난포란 중 1등급(grade I) 및 2등급 난포란은 0.05~0.2% 및 1.7~2.3%수준으로서 매우 낮았으며, 3등급 난포란은 흡입 후 세절법이 16.2개로써 흡입법과 세절법의 27.0 및 26.0%보다 유의적( $P < 0.05$ )으로 낮게 나타났다. 뿐만 아니라 채란한 전체 난포란의 71.0~81.9%가 4등급으로써 난포란의 quality는 매우 낮은 편이었다.

Hunter 등 (1972)은 소에서 미성숙란의 채취는 흡입법이 가장 널리 사용되는 방법이나 흡입법은 낮은 난자 회수율(30~60%)이 단점이라고 하였다. Iwasaki 등(1987)도 소에서 흡입법과 세절법을 병행하여 채란하는 방법을 개발하여 높은 회수율을 얻었다고 보고하였다. 이러한 연구결과와 난포란의 대량확보 측면에서는 흡입후 세절법이 효과적인 방법이라고 생각된다. 그러나 흡입후 세절법은 높은 회수율에도 불구하고 번거로운 단점때문에 오늘날은 흡입법을 가장 널리 사용하고 있다.

Table 1. Effect of collection method on yield and grade of porcine follicular oocytes

Collection methods	No. of ovary	No. of oocytes recovered	No. of oocytes recovered per ovary	No of oocytes classified by grade(%)			
				Grade I	Grade II	Grade III	Grade IV
Aspiration	37	1,365	30.7 <sup>c</sup>	3(0.2) <sup>a</sup>	24(1.8) <sup>a</sup>	368(27.0) <sup>a</sup>	970(71.0) <sup>a</sup>
Slicing	37	1,884	50.8 <sup>b</sup>	1(0.05) <sup>a</sup>	44(2.3) <sup>a</sup>	490(26.0) <sup>b</sup>	1,349(71.6) <sup>a</sup>
Aspiration post slicing	37	3,830	103.5 <sup>a</sup>	5(0.1) <sup>a</sup>	66(1.7) <sup>a</sup>	623(16.2) <sup>bc</sup>	3,136(81.9) <sup>a</sup>

Values with same superscripts in the same column were not significantly ( $P < 0.05$ ) different.

2. 정액과 배양액에 따른 체외수정율

체외성숙란을 신선정액과 정소상체미부 정액을 사용하여 정액에 따른 수정율의 차이와 수정용 배양액의 차이에 따른 체외수정율 및 체외발달율은 Table 2 및 3에서 보는 바와 같다.

신선정액과 정소상체미부정액을 사용하였을 때 수정율은 각각 83.0 및 83.1% 로써 정액간에 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이가 없었다. 체외수정이 이루어진 난자들의 분할율도 신선정액이 60.8%로써 정소상체미부정액의 분할율 69.0%와 유의적 ( $P < 0.05$ ) 차이는 없었다.

성숙이 완료된 난포란을 B.O, TALP 및 mTBM 수정용 배양액에 체외수정율 유도하여 체외발달을

실시하였을 때 분할율은 각각 92.8, 90.1 및 80.1% 로서 수정용 배양액간에 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이가 있었다.

체외수정란의 2-세포기에서 상실배기까지의 발달율은 전체적으로 B.O 배양액을 사용하였을 때가 가장 낮았으며, mTBM 배양액을 사용하였을 때가 가장 높았다 ( $P < 0.05$ ). 배반포기로의 발달율은 B.O 배양액에서는 배반포기로의 발달은 없었지만 TALP배양액에서는 1.6%의 발달율과 mTBM에서는 12.4%의 배반포로 발달하여 유의적 ( $P < 0.05$ )인 차이를 보였다.

Nagai 등(1988)은 동결정액을 이용하여 체내 및 체외에서 성숙 및 수정을 실시하였을 때 동결정액은 체내(79%)가 체외(42%)보다 높은 수정율을 얻

Table 2. *In vitro* fertilization and cleavage rate porcine oocytes by different sperm source

Sperm	No. of oocytes used	No. of oocytes fertilized(%)	No. of oocytes cleaved(%)
Ejaculated sperm	792	658 (83.0)	482 (60.8)
Epididymis sperm	705	586 (83.1)	487 (69.0)

There are no significant ( $P < 0.05$ ) differences in fertilization and embryo cleavage between the sperm source.

Table 3. *In vitro* development of IVF-derived porcine embryos culture in different fertilization media

Medium	No. of oocytes fertilized	No. of cleaved(%) <sup>*</sup>	No. of embryos <i>in vitro</i> developed to(%)				
			2-cell	4-cell	8-cell	Morula	Blastocyst <sup>*</sup>
B.O	347	322(92.8) <sup>a</sup>	61(18.9)	61(18.9)	56(17.3)	44(13.6)	0( 0.0) <sup>a</sup>
TALP	344	310(90.1) <sup>ab</sup>	157(50.6)	115(37.1)	80(25.8)	61(19.6)	5( 1.6) <sup>a</sup>
mTBM	181	145(80.1) <sup>b</sup>	98(67.5)	86(59.3)	72(49.6)	39(26.8)	18(12.4) <sup>b</sup>

<sup>\*</sup> Values with same superscripts in the same column were not significantly ( $P < 0.05$ ) different.

었으나, 다정자침입율은 체내(61%)보다 체외(90%)에서 매우 높았다고 보고하였다. Zheng 등(1992)은 동결정액을 이용하여 체외수정을 실시하였을 때 68%의 수정율을 얻었으나, 이중 20~50%

가 다정자 침입에 의한 수정이라고 보고하였다. Yoshida 등(1992)은 신선정액을 이용하여 87~94%의 수정율을 얻었다고 보고하였으며, 이와 같은 성적은 본 연구결과와 유사한 성적이다. 한편

Table 4. Developmental ability of fertilized pig oocytes in different media and co-culture

Culture media	POEC**	BOEC***	No. of embryos	No. of embryos <i>in vitro</i> developed to(%)			
				2~4 cell	8~16 cell	Morula	Blastocyst*
TCM-199	+	-	284	70 (24.6)	60 (21.1)	42(14.7)	0(0.0)
	-	+	210	95 (45.2)	65 (30.9)	21(10.0)	0(0.0)
NCSU-23	+	-	384	264(68.8)	173(45.1)	70(18.2)	9(2.3)
	-	+	309	225(72.8)	143(46.3)	58(18.8)	4(1.2)

\* There are not significantly different on the same column(P<0.05).

\*\* POEC : Porcine oviductal epithelial cells.

\*\*\* BOEC : Bovine oviductal epithelial cells.

Table 5. Effect of the addition  $\beta$ -ME in NCSU-23 media on the *in vitro* development to the porcine embryos

Concentration of $\beta$ -ME**	No. of embryos culture	No. of embryos <i>in vitro</i> developed to(%)			
		2-cell	4-cell	8-cell	Morula*
Control	306	234(76.4)	198(64.7)	156(50.9)	51(16.6)
50 $\mu$ M	266	210(78.9)	181(68.0)	159(59.7)	60(22.5)
100 $\mu$ M	302	200(66.2)	156(51.6)	111(36.7)	41(13.5)
200 $\mu$ M	300	194(64.6)	162(54.0)	129(43.0)	57(19.0)
250 $\mu$ M	263	171(65.0)	151(57.4)	128(48.7)	58(22.0)

\*There are not significantly different on the same column(P<0.05).

\*\* $\beta$ -ME :  $\beta$ -Mercaptoethanol.

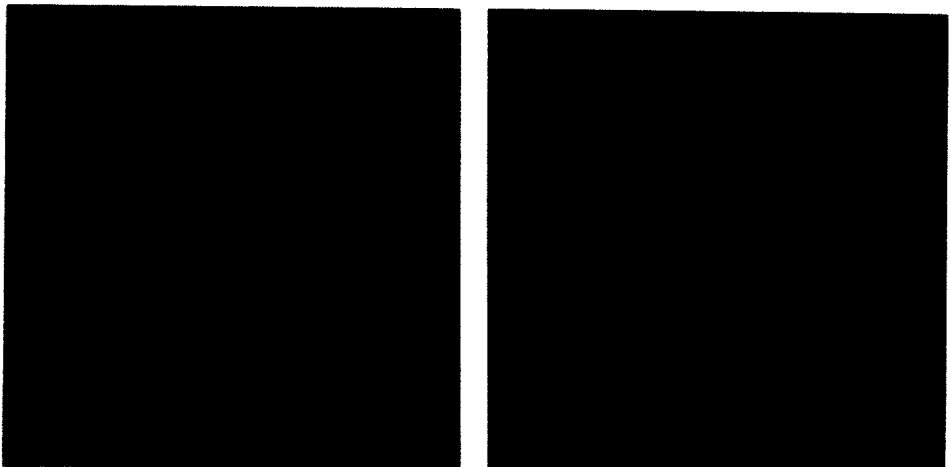


Fig. 1. *In vitro* development of porcine IVF embryos.

A) Expanded blastocyst for 6 day cultured, B) Hatched blastocyst for 7 day cultured

Kikuchi 등(1993)은 B.O 용액으로 수정을 실시하였을 때 전핵형성율이 59%였으며, 다정자침입율도 68%로써 높게 나타났다고 보고하였다.

Wang 등(1997)은 체외수정시 mTBM배양액을 사용하여 체외수정을 유도한 수정란을 NCSU-23, TCM-199 및 mWM으로 각각 배양액을 달리하여 체외발달을 유도하였을 때 30, 19 및 6%가 배반포로 발달하였으며, 체외수정란의 체외발달은 배양액에 영향을 많이 받는다고 보고하였다. NCSU-23 및 TCM-199배양액에서의 체외발달율은 본 연구결과와 다소 차이를 보였다.

이상의 결과를 볼 때 체외수정에 있어서 사용하는 정액이 수정율과 분할율에 영향을 미치지 않는 것으로 보이며, 체외수정용 배양액의 차이에 따른 체외발달율은 발달단계 구분없이 전체적으로 수정용 배양액이 배반포기로의 체외발달에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

## 적 요

본 연구는 돼지 체외수정란의 생산에 있어서 체외수정기법과 체외배양체계를 확립하고자 난포란의 회수방법과 정액의 차이에 따른 체외성숙 난자의 체외수정 및 체외발달율을 조사하여 번식효율 향상에 기여하고자 한다.

도축장으로부터 채집한 난소의 난포에서 흡입법, 세절법 및 흡입 후 세절법 등으로 난포란을 채취하여 등급별로 분류하여 회수율을 조사하였으며, 채취한 난포란은 신선정액과 정소상체미부 정액을 사용하여 체외수정을 조사와 수정용배양액인 B.O, TALP 및 mTBM배양액으로 체외수정을 실시하여 배반포로의 발달율을 조사하였다. TCM-199와 NCSU-23기본배양액에 OECM을 첨가하여 공배양으로 배반포기로의 체외발달을 실시하였으며, NCSU-23 기본배양액에  $\beta$ -Mercaptoethanol을 첨가하여 공배양을 실시하였다. 본 연구에서 얻은 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 회수방법별로 각각 37개의 난소로부터 난소당 회수한 난포란은 흡입 후 세절법이 103.5개로써 흡입법과 세절법의 30.7 및 50.8개보다 유의적( $P < 0.05$ )으로 회수율이 높았다. 회수한 난

포란 중 1등급(grade I) 및 2등급 난포란은 0.05~0.2% 및 1.7~2.3%수준으로서 매우 낮았으며, 3등급 난포란은 흡입 후 세절법이 16.2개로써 흡입법과 세절법의 27.0 및 26.0%보다 유의적( $P < 0.05$ )으로 낮게 나타났다.

2. 신선정액과 정소상체미부정액을 사용하였을 때 수정율은 각각 83.0 및 83.1% 로써 정액간에 유의적( $P < 0.05$ )인 차이가 없었다. 체외수정이 이루어진 난자들의 분할율도 신선정액이 60.8%로써 정소상체미부정액의 분할율 69.0%와 유의적( $P < 0.05$ )차이는 없었다. 성숙이 완료된 난포란을 B.O, TALP 및 mTBM 수정용 배양액에 체외수정을 유도하여 체외발달을 실시하였을 때 분할율은 각각 92.8, 90.1 및 80.1%로서 B.O 배양액을 사용할 때가 유의적( $P < 0.05$ )으로 높게 나타났다. 체외수정란의 2-세포기로부터 상실배기까지의 발달율은 mTBM 배양액을 사용하였을 때가 가장 높았다( $P < 0.05$ ). 배반포기로의 발달율은 B.O 배양액에서는 배반포기로의 발달은 없었지만 TALP배양액에서는 1.6%의 발달율과 mTBM에서는 12.4%의 배반포로 발달하여 유의적( $P < 0.05$ )인 차이를 보였다.
3. TCM-199기본배양액에 POEC 및 BOEC를 공배양과 단순배양체제로 체외발달을 실시하였을 때 배반포로의 발달은 없었으나, NCSU-23 기본배양액으로 하여 POEC와 공배양을 실시하였을 때는 384개의 수정란중 9(2.3%)개 배반포기로 발달하였으며, BOEC와 공배양을 실시하였을 때는 309의 수정란에서 4(1.2%)배반포기로 발달하였다( $P < 0.05$ ). 체외수정란을 NCSU-23 배양액에  $\beta$ -ME를 50, 100, 200, 250 $\mu$ M를 첨가하여 체외발달을 실시하였을 때 상실배로의 발달율은 22.5, 13.5, 19.0 및 22.0%로써 농도에 따른 유의적( $P < 0.05$ )차이는 없었으며, 배반포로의 발달은 농도에 관계없이 전혀 없었다.

## 참고문헌

Caamano JN, Pugh ML, Rowson AD and Youn-

- gs CR. 1998. Effects of oxygen tension and  $\beta$ -mercaptoethanol on development of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology*, 49:196(abstract).
- Edwards RG. 1962. Meiosis in ovarian oocytes of adult mammals. *Nature*, 196:446-450.
- Funahashi H, Cantley T and Day BN. 1994. Different hormonal requirements of pig oocyte cumulus complexes during maturation *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 101:159-165.
- Hunter RHF. 1991. Oviductal function in pigs with particular reference to the pathological condition of polyspermy. *Mol. Reprod. Dev.*, 29:385-391.
- Hunter RHF, Lawson RAS and Rowson LEA. 1972. Maturation, transplantation and fertilization of ovarian oocytes in cattle. *J. Reprod. Fertil.*, 30:325-328.
- Illera MJ, Lorenzo P, Illera J C, Silvan G, Portela A and Petters M. 1992. A simple medium supports *in vitro* development of one cell embryos from miniature pigs to the blastocyst stage. *Theriogenology*, 37:225.
- Iritani A, Niwa K and Imai H. 1978. Sperm penetration of pig follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fertil.*, 54:379-383.
- Iwasaki S, Nakahara TK, Shioya Y, Fukushima M and Hanada A. 1987. New methods for the recovery of oocytes from bovine ovarian tissue in relation to *in vitro* maturation and fertilization. *Japanese J. Anim. Reprod.*, 33:188-192.
- Kikuchi K, Nagai T, Motlik J, Shioya Y and Izaike Y. 1993. Effect of follicle cell on *in vitro* fertilization of pig follicular oocytes. *Theriogenology*, 39:593-599.
- Leman AD and Dziuk PJ. 1971. Fertilization and development of pig follicular oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 26:387-389.
- Lim JM, Liou SS and Hansel W. 1996. Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of  $\beta$ -mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. *Theriogenology*, 46:429-439.
- Mattioli M, Bacci ML, Geleati G and Seren E. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 31:1201-1207.
- Nagai T, Takahashi T, Masuda H, Shioya Y, Kuwayama M, Fukushima M, Iwasaki S and Hanada A. 1988. *In vitro* fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 84:585-591.
- Niwa K and Ohgoda O. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on *in vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology*, 30:733-741.
- Prochazka R, Kanka J, Sutovsky P, Fullka J, and Motlik J. 1992. Development of pronuclei in pig oocytes activated by a single electric pulse. *J. Reprod. Fertil.*, 96:725-734.
- Renz L, Torres C and Rath D. 1992. *In vitro* culture of porcine embryos to the blastocyst stage after *in vivo* or *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, 37:283.
- Suss U and Madison V. 1983. Morphology and meiotic development of bovine oocytes cultured *in vitro*. *Arch. Androl.*, 11:217-218.
- Takahashi H, Kuwayama M, Hamano S, Takahashi M, Okano A, Kadokawa H, Kariya T and Nagai T. 1996. Effect of  $\beta$ -mercaptoethanol on the viability of IVM/IVF/IVC bovine embryos during long-distance transportation in plastic straws. *Theriogenology*, 46:1009-1015.
- Wang WH, Abeydeera LR, Cantley TC and Day BN. 1997. Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by *in vitro* fertilization. *J. Reprod. Fertil.*, 111:101-108.
- White KL, Hehnke K, Rickords LF, Southern LL, Thompson DLJR and Wood TC. 1989.



- Early embryo development *in vitro* by co-culture with oviductal epithelial cells in pigs. Biol. Reprod., 41:425-430.
21. Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, Mckenna AI, Fick GH and Schultz GA. 1991 .Effects of maturation and co-culture treatments in the developmental capacity of early bovine embryos. Mol. Reprod. Dev., 30:330-338.
- Yoshida M, Isigaki Y, Kawagishi H, Bamba K and Kojima Y. 1992. Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes *in vitro* and on subsequent fertilizing and developmental capacity *in vitro*. J. Reprod. Fertil., 95:481-488.
- Zheng YS, Fiser SP and Sirard MA. 1992. The use of ejaculated boar semen after freezing in 2 or 6% glycerol for *in vitro* fertilization of porcine oocytes matured *in vitro*. Theriogenology, 38:1065-1075.
- 이장희, 김창근, 정영채, 1994. 돼지 난포란의 체외 성숙시 성성자극호르몬의 첨가가 체외성숙, 체외수정 및 배발생에 미치는 영향. 한국수정란 이식학회지, 9(1):85-93.
- 이홍준, 서승운, 이광희, 김기동, 이상호, 송해범, 1997.  $\beta$ -Mercaptoethanol 첨가에 의한 소 초기배의 체외발생 효과. 한국가축번식학회지, 21(4):389-396.
- 한만희, 박병권, 박창식, 이구승. 1996. 자궁내막세포와의 공배양이 돼지 체외수정란의 초기발달에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지, 11(3):217-223.

---

(접수일 : 1999. 10. 11 / 채택일자 : 1999. 11. 30)