

## 체외성숙, 수정 및 배양에 있어서 각기 다른 배양조건들이 소 체외수정란의 생산에 미치는 효과

조성근<sup>†</sup> · 송상현 · 공일근\* · 이효종\*\* · 최상용\*\* · 박충생  
경상대학교 축산진흥연구소

### Effects of *In Vitro* Maturation, *In Vitro* Fertilization and *In Vitro* Culture Conditions on Bovine Embryo Production

S. K. Cho<sup>†</sup>, S. H. Song, I. K. Kong\*, H. J. Lee\*\*, S. Y. Choi\*\* and C. S. Park

Institute for Development of Livestock Production, Gyeongsang National University,  
660-701, Republic of Korea

#### SUMMARY

This study was conducted to establish the optimal conditions for *in vitro* embryo production using oocytes derived from follicles of slaughter-house ovaries. The ovaries of Hanwoo were obtained from a local slaughter-house. The oocytes were aspirated from visible follicles of 2~7 mm in diameter. The recovered oocytes which were completely surrounded by at least 2 layers of cumulus cells and a homogeneous cytoplasmic pigmentation were used. The selected oocytes were washed 3 or 4 times with D-PBS containing 10% bovine calf serum(BCS) and matured *in vitro*(IVM) in Ham's F-10 supplemented with 10% BCS or 0.01  $\mu$ g/ml epidermal growth factor(EGF) at 39°C under 5% CO<sub>2</sub> in air for 24 hours. They were fertilized *in vitro*(IVF) with fresh sperm separated by Percoll density gradient or swim-up in TALP media. The zygotes were cultured with or without bovine oviductal epithelial cells(BOEC) in media(HECM-6 supplemented with 11 amino acid and/or TCM-199 supplemented with 10% BCS) for 7 to 10 days. The results obtained were as follow:

The cleavage rate and developmental rate to blastocyst after maturation and IVF were not significantly different between Ham's F-10 with EGF(76.0% vs. 44.0%) and BCS(75.9% vs. 43.6%)( $P < 0.05$ ). The cleavage rate and developmental rate to blastocyst after fertilizing by swim-up or Percoll method were not significantly( $P < 0.05$ ) different between swim-up(80.2% vs. 29.2%) and Percoll(81.9% vs. 26.5%)( $P < 0.05$ ). The cleavage rate in TCM 199(80.5%) was significantly higher than that in HECM-6(72.0%)( $P < 0.05$ ). However, developmental rate to blastocyst using TCM 199 following HECM-6 for 3 or 4 days (42.2%) was significantly higher than that in TCM-199 alone (26.7%)( $P < 0.05$ ). The

본연구는 1995~1998년도 농림수산특정연구과제 현장애로 기술개발사업연구비에 의하여 연구되었음.

\* 순천대학교 동물자원학과(Department of Animal Science, Suncheon National University)

\*\* 경상대학교 수의학과(Department of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University)

<sup>†</sup> Correspondence

cleavage rate and developmental rate of embryos produced *in vitro* by exchange timing for HECM-6 media were not significantly different between in day 3(78.6% vs. 45.5%) and day 4(75.0% vs. 43.2%)( $P < 0.05$ ). The cleavage rate and developmental rate to blastocysts according to co-culture system were not significantly different between with(74.2% vs. 41.4%) and without BOEC(73.9% vs. 43.5%)( $P < 0.05$ ). The number of blastomere in blastocyst stage after co-culture with or without BOEC was not significantly different ( $106.7 \pm 5.1$  and  $96.6 \pm 4.0$ ). In conclusion, the most transferable IVP embryos could be produced from Ham's F-10 medium for IVM, Percoll density gradient method for IVF sperm separation and *in vitro* culture in HECM-6 until day 3 or day 4, and then transferred into TCM-199 until day 9 within adequate embryo density in culture droplets after insemination.

(Key words : *in vitro* culture, EGF, amino acid, HECM, bovine)

## 서 론

체외수정란의 생산체계의 확립은 난자 및 수정란의 발달에 관한 연구자들의 이해력을 향상시키는데 도움이 될 것이다. 난포란의 성숙과 초기 배발달의 과정에 관한 연구는 어느 정도 확립되어 있음에도 불구하고, 여러가지 배양체계에 의하여 성숙된 난포란으로부터 배반포기배로의 발달율은 30~40% 정도로 보고되어 왔다(Brackett와 Zuelke, 1993). 이러한 체외수정란 생산체계(IVP system)의 한계요인은 난포란 채란시 난포의 크기와 환경 및 난포란 자체의 질(quality)에 있다고 설명하였다(Pavlok 등, 1992; Lonergan 등, 1994; Blondin과 Sirard, 1995; Hazeleger 등, 1995). 이러한 가설들을 증명하기 위한 방법은 난포란이 상실배 또는 배반포 단계까지 발달해 나갈 수 있는 체외배양체계가 구축되어야 하며, 따라서 후기배로 발달할 수 있는 충분한 능력을 지닌 우수한 난포란을 확인·선발함과 동시에 그들이 유래된 난포의 환경적 특성을 인식해야 한다.

따라서 본 연구의 목적은 난포란 및 체외수정란의 배양에 적합한 배양체계의 구축을 위하여 체외성숙, 수정 및 배양방법에 따라 기존 그룹배양의 후기배 발달율에 상응하는 적정 배양체계를 정립하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 난포란의 채란

본 실험에 공시된 난소는 도축장에서 도살직후 난소를 적출하여 penicillin G(100 units/ml)와 streptomycin(100  $\mu$ g/ml)이 함유된 생리식염수(30~35 $^{\circ}$ C)의 보온병에 담아 3~4시간 내에 실험실로 운반하여 생리식염수로 3~4회 세척한 후, 18-G needle이 부착된 50 ml tube에 음압을 이용하여 가시난포로부터 난포란을 채란하였다. 난포란의 선발은 난구세포의 부착 정도와 세포질의 충실도에 따라 Wiemer 등(1991)의 방법에 준하여 실시하였으며, 최소한 2층 이상의 난구세포층으로 되어 있고, 세포질이 균일하고 충실한 것을 선발하여 실험에 공시하였다.

### 2. 난포란의 체외성숙

난포란의 체외성숙에 사용한 배양액은 25 mM HEPES가 첨가된 TCM-199(Sigma, USA) 또는 Ham's F-10(Sigma, USA)의 기본배양액에 56  $\mu$ g/ml sodium pyruvate, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 100 units/ml penicillin G와 10  $\mu$ g/ml LH, 35  $\mu$ g/ml FSH, 1  $\mu$ g/ml estradiol-17 $\beta$ 를 첨가하였고, 10% BCS 혈청(HyClone<sup>®</sup>, U.S.A.) 또는 0.01  $\mu$ g/ml EGF(Sigma, U.S.A.)를 각각 첨가하였다.

체외성숙은 Wiemer 등(1991)의 방법에 준하여 체외성숙 배양액을 100 mm dish(Nunc, Denmark)에 100  $\mu$ l씩 drop 분주하여 18 시간 이상 전 배양을 실시하여 평형을 유도한 다음, 체외성숙용 배양액에 15~20 개의 난포란을 넣고 5% CO<sub>2</sub>, 98~99%

습도, 39°C incubator(5% CO<sub>2</sub> incubator)에서 24 시간 동안 체외성숙을 유도하였다.

### 3. 체외수정용 정자의 준비

난포란의 체외수정을 위한 정자의 준비는 신선정자를 이용하여 Swim-up 또는 Percoll density gradient 방법으로 실시하였다. Swim-up 방법은 5 units/ml heparin이 첨가된 세척용 sperm-TALP로 활력이 높은 정자를 채취하기 위하여 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 실시하였다. Swim-up의 유도는 15 ml conical plastic tube에 농후정자와 세척용 sperm-TALP medium이 층을 이루도록 하기 위해서 tube의 아래층에 정자를 넣고 그 위의 층에 sperm-TALP medium을 섞이지 않도록 조심스럽게 분주한 후 45°의 각도로 눕혀서 1시간 동안 활력 정자의 부유를 유도하였다. Percoll density gradient 방법은 5 units/ml heparin이 첨가된 세척용 sperm-TALP로 활력이 높은 정자를 채취하기 위하여 15 ml conical plastic tube의 아래층에 90% Percoll 2 ml을 넣고 그 위의 층에 45% Percoll 2 ml을 두 층이 섞이지 않도록 조심스럽게 부어 놓은 다음, 신선정액 또는 동결정액 1 ml을 tube의 맨 윗층에 넣어 700×g로 30분 동안 원심분리 시켰다. Swim-up을 유도하여 부유된 상층액의 정자와 Percoll에서 침전된 하층액의 정자만을 각각 채취하여 500×g에서 2회 5분간 원심분리한 후, 수정능획득을 위하여 5 mg/ml BSA, 5 mM caffeine 및 10 µg/ml heparin이 첨가된 수정용 IVF-TALP를 5 ml 첨가하여 다시 500×g에서 5분간 원심분리한 후 약 1 ml의 수정용 IVF-TALP를 첨가하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 10~15분간 처리하여 수정능획득을 유도하였다.

### 4. 체외수정

체외수정은 체외성숙된 난포란을 수정용 IVF-TALP로 3~4회 세척한 후 수정용 IVF-TALP에 100 µl drop당 15~20 개의 난자를 옮긴 다음 수정능이 획득된 2×10<sup>6</sup> sperm/ml의 최종농도로 매정한 후, 24시간 동안 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 수정을 유도하였다.

### 5. 체외수정란의 체외배양을 위한 난관상피세포

의 준비

도축장에서 채취한 난관의 오염을 방지하기 위하여 500 units/ml penicillin G와 500 µg/ml streptomycin이 들어있는 4°C의 생리식염수에 담겨 3~4시간 이내에 실험실로 운반하였다. TCM-199 medium 1 ml가 들어있는 10 ml syringe로 난관협부에서 누두부쪽으로 관류하여 채취한 난관상피세포는 500×g에서 5분간 원심분리시켜 상층액은 제거하고 나머지 pellet 부분을 2회 이상 원심분리기로 세척하여 1~2×10<sup>6</sup> cells/ml의 최종농도로 조절하여 48시간 동안 배양시킴으로써 체외수정란과의 공배양에 이용하였다.

### 6. 체외수정란의 체외배양

체외수정된 수정란은 10% BCS가 첨가되어 있는 TCM-199 배양액 또는 기본 배양액 Hamster Embryo Culture Medium (HECM; Schini and Bavister, 1988)을 약간씩 변형시킨 HECM-3에 11종의 아미노산(Taurine, Asparagine, Cysteine, Histidine, Lysine, Proline, Serine, Aspartic Acid, Glycine, Glutamic Acid, Glutamine)이 첨가된 배양액 HECM-6으로 4~5회 세척하여 난구세포와 정자를 완전히 제거한 다음 난관상피세포와 공배양하거나 난관상피세포가 첨가되지 않은 배양액으로 배양하여 후기배로의 배 발달을 조사하였다. 체외 배양액으로 TCM-199을 사용할 경우에 있어서 난관상피세포와 공배양할 경우 48시간마다 신선한 배양액으로 교환하며, 5일이 경과한 후 신선한 난관상피세포로 교환하였으며, 체외배양액 HECM-6을 사용할 경우 난관상피세포와 공배양하거나 난관상피세포가 첨가되지 않은 배양액으로 배양하여 3~4일간 HECM-6에서 배양한 후, 10% BCS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 체외수정란을 옮겨 7~9일까지 배양하여 후기배로의 배 발달을 조사하였다.

### 7. 체외수정란의 활구수 조사

체외수정란을 배양하는데 있어서 난관상피세포와 공배양한 군과 공배양하지 않은 군 간의 활구수를 조사하기 위하여 수정 후 8일까지 배양한 배반포 기배를 Hoechst 33342(Sigma, U.S.A.)를 이용하

여 Pursel 등(1985)의 방법에 준하여 핵염색을 실시하여 형광현미경 200~400 배의 배율하에서 할구수를 조사하였다.

### 8. 통계학적 분석

실험결과와 통계학적 분석은 SAS package를 이용하여 실시하였으며, GLM(General Linear Model) procedure를 적용하여 각 요인의 least square mean을 구하여 요인간의 유의차를 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 체외성숙시 EGF와 BCS첨가에 따른 배 발달을

최적 배양체계 구축을 위하여 도축장에서 도축되는 한우의 난소에서 채란된 난포란을 이용하여, 다각적인 면에서 체외성숙, 체외수정 및 체외배양을 거친 체외수정란의 생산 결과는 다음과 같다. Table 1에서는 도축 난소의 난포란을 이용하여 체외성숙시 기존의 체외성숙용 배양액 Ham's F-10에 10% BCS 혈청과 10 ng/ml EGF의 첨가가 수정율과 후기배로의 발달율에 차이점이 나타나지는지를 조사하였다. 본 실험의 결과, EGF와 BCS의 수정율은 각각 76.0%와 75.9%로 나타났으며, 배반포기까지의 발달율에 있어서도 각각 44.0%와 43.6%로 나타나 두 첨가구 사이에 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

체외성숙시 EGF의 첨가가 미성숙난자의 체외성숙 후 핵과 세포질성숙 및 수정율과 후기배로의 발달율에 미치는 영향에 관한 연구에 있어서, Coskun 등(1991)은 미성숙난자의 체외성숙시 성숙용 배양액 DME/F-12에 10 ng/ml의 EGF를 첨가하였을 경우 수정율과 4~8 세포기까지의 발달율에 있어서 혈청이 첨가되지 않은 경우 보다 높은 성적을 나타내었다고 보고하였다.

Lonergan 등(1996)은 체외성숙시 체외성숙용 배양액 TCM-199에 1~100 ng/ml의 EGF를 첨가하면 수정율에 있어서는 TCM-199 단독배양 또는 10% FCS가 첨가된 TCM-199에 배양했을 때 보다 높은 성적을 나타내었고, 부화율에 있어서는 10 ng/ml 첨가구에서 가장 높은 성적을 나타내었다고 보고하였다. 그러나 이들은 체외성숙시 FCS(10%), EGF(10 ng/ml) 및 FCS+EGF 첨가구에 있어서 수정율은 각각 76, 73 및 75%를 나타내었고, 후기배로의 발달율에 있어서는 각각 48, 41 및 42%로 나타내었다고 보고하여 본 실험의 결과와 비슷한 경향을 나타내었다.

이러한 결과를 볼 때 미성숙 난포란의 체외성숙시 배양조건이 수정율과 후기배로의 발달에 영향을 미치는 것으로 사료되며, 따라서 체외성숙용 배양액에 고가의 혈청을 첨가하는 것보다는 저가의 EGF를 첨가하는 것이 체외수정란의 생산에 사용되는 비용의 일부를 절감할 수 있으리라 사료된다.

### 2. 체외수정용 정자준비 방법에 따른 배 발달을

체외수정란을 생산하기 위하여 체외성숙 후 체외수정에 필요한 정자를 준비하는데 있어서 정자의 초기 분리과정은 IVF에 사용되는 운동성을 가진 정상 정자의 회수율을 높이기 위하여 반드시 필요하다. 현재까지 소에 있어서 IVF를 위한 정자의 준비 기술 방법과 운동성 정자의 회수율을 높이기 위한 기술 방법은 swim-up(Parrish 등, 1986), Percoll density gradients(Saeki 등, 1991) 및 glass wool(Stubbings와 Woski, 1991)을 이용해 왔다. 이 중 현재 가장 보편적으로 사용되어지고 있는 기술은 swim-up 방법이다. 그러나 이 방법은 한 개의 동결정액 straw에서 IVF에 필요한 적정 정자의 농도를 회수하기는 쉽지 않다. Parrish 등(1995)은 소

Table 1. Development of bovine embryos produced *in vitro* by different culture system for IVM

| Treatments | Replicates | No. of oocytes used | No.(%) of oocytes cleaved | No.(%) of embryos developed to blastocyst |
|------------|------------|---------------------|---------------------------|---|
| EGF        | 6          | 392                 | 298(76.0) <sup>a</sup>    | 131(44.0) <sup>a</sup>                    |
| BCS        | 6          | 435                 | 330(75.9) <sup>a</sup>    | 144(43.6) <sup>a</sup>                    |

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

Table 2. Effect of swim-up and Percoll treatment on subsequent development of bovine IVP embryos

| Type of sperm treatments | Replicates | No. of oocytes used | No.(%) of oocytes cleaved | No.(%) of embryos developed to blastocyst |
|--------------------------|------------|---------------------|---------------------------|---|
| Swim-up                  | 3          | 162                 | 130(80.2) <sup>a</sup>    | 38(29.2) <sup>a</sup>                     |
| Percoll                  | 3          | 226                 | 185(81.9) <sup>a</sup>    | 49(26.5) <sup>a</sup>                     |

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

의 동결·융해 정자의 분리에 있어서 swim-up 방법 보다는 Percoll 방법이 적합하다고 보고한 바 있다. 따라서, 도축장에서 수집한 난소로부터 난포란을 채취하여 체외성숙시킨 후 체외수정에 사용되는 운동성을 가진 정상 정자의 회수율을 높이기 위하여 swim-up 방법과 Percoll 방법을 비교·조사한 결과는 Table 2와 같다. Percoll의 방법으로 채취된 정자를 이용하였을 경우에 81.9%의 수정율을 나타내어 swim-up 방법으로 채취된 정자를 이용하였을 경우에서의 80.2%의 수정율과는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 또한 후기배로의 발달율에 있어서 swim-up 방법으로 채취된 정자를 이용하였을 때는 29.2%로 나타났으며, Percoll 방법에서 나타난 후기배로의 발달율은 26.5%로서 두 처리군간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 그러나 약간 높은 후기배로의 발달율 결과만으로는 현재 가장 보편적으로 사용하고 있는 swim-up 방법이 정자의 분리에 적합하다고 단정하기는 어렵다. 특히 동결정액의 활력정자의 분리는 swim-up 방법보다는 Percoll 방법을 이용하는 것이 유리하다고 사료되며, 또한 활력정자를 분리하는데 있어서 육안적 활력평가방법에 의한 결과 swim-up 방법에서는 70% 정도의 활력정자가 관찰된 데 비해 Percoll 방법에 의해서는 90% 이상의 활력도가 높은 정자가 분리되었다. 따라서 체외수정에 있어서 Percoll 방법에 의해 분리된 활력도가 높은 정자를 이용하여 체외수정시 수정율을 충분히 향상시킬 수 있을 것으로 사료된다.

본 실험의 결과에서는 언급되지 않았으나, 활력도를 가진 운동성 정자의 회수율에 있어서 Parrish 등(1995)과 비슷한 결과를 얻을 수 있었다. 따라서 본 실험의 결과에서는 체외수정을 위한 정자를 분리하는 방법에 있어서 swim-up 방법보다는 Percoll density gradient 방법을 이용하는 것이 보다 많은 양의 활력을 가진 운동성 정자를 얻는데 유리하고,

정자를 준비하는데 소요되는 시간도 단축시킬 수 있을 것으로 사료된다.

### 3. 체외배양액의 종류에 따른 후기배로의 발달율

Pinyopummintr와 Bavister(1991)는 체외수정 후 단순배양액 HECM으로 배양했을 때 난관상피 세포나 혈청과의 공배양이 없어도 morula 까지는 충분히 발달할 수 있으나 blastocyst 단계에서는 혈청의 첨가가 필요하다고 보고하여 2단계 배양법의 이용 가능성을 시사하였다. McKiernan 등(1995)은 Golden hamster를 이용하여 HECM을 기본으로 20종의 아미노산을 8종의 HECM에 각각 첨가하여 후기배의 발달율을 조사한 결과, 본 연구와 같은 11종의 아미노산이 각각 다른 농도로 첨가된 HECM-6에서 다른 첨가군에 비하여 가장 높은 성적을 나타내었다고 보고하였다. Pinyopummintr와 Bavister(1996)는 체외성숙·수정 후 수정란을 배양하는데 있어서 1단계 방법으로 10% BCS가 첨가된 TCM-199으로 배양 1일째부터 8일째까지 배양하는 방법과 2단계 방법으로 HECM-3에 lactate, 11종의 amino acid, pyruvate 및 glucose를 각각 첨가하여 수정 후 72시간까지 배양한 후에 10% BCS가 첨가된 TCM-199에서 후기배까지의 발달율을 조사한 바, 배반포기배까지의 발달율에 있어서 1단계 방법에 비하여 2단계 방법에 있어서 높은 후기배로의 발달성적을 보고하였다.

Table 3에서는 체외수정 후 수정란을 배양하는데 있어서 Pinyopummintr와 Bavister(1995)의 2단계 배양방법을 약간 수정하여 체외성숙·수정된 난포란을 체외배양액 TCM-199(+10% BCS)과 HECM-6(+11 amino acids)에서 각각 3일동안 배양한 후 TCM-199 배양액으로 옮겨 후기 배반포기까지의 배 발달율을 조사하였다. 수정율에 있어서는 TCM-199 배양액에서는 80.5%로 나타나 72.0%를

Table 3. Effect of culture media on *in vitro* development of bovine IVF embryos\*

| Media** | Replicates | No. of oocytes used | No.(%) of oocytes cleaved | No.(%) of embryos developed to blastocyst |
|---------|------------|---------------------|---------------------------|---|
|         |            |                     |                           |   |
| TCM-199 | 6          | 400                 | 322(80.5) <sup>a</sup>    | 86(26.7) <sup>b</sup>                     |
| HECM-6  | 5          | 625                 | 450(72.0) <sup>b</sup>    | 191(42.4) <sup>a</sup>                    |

†Different superscripts in the same column indicated a significant difference (P<0.05).

\*Maturation medium: Ham's F-10; Fertilization medium: TALP; Sperm concentration: 2×10<sup>6</sup> cells/ml.

\*\*TCM-199: cultured in TCM-199 from day 1 to day 9; HECM-6: cultured in HECM-6 until day 3~4, and then transferred into TCM-199.

나타낸 HECM-6 배양액보다는 높은 유의적(P<0.05) 차이를 나타내었다. 그러나 배반포기까지의 발달율에 있어서는 HECM-6 배양액에서 42.4%의 높은 성적을 나타내어 TCM-199 배양액의 26.7% 보다는 훨씬 높은 유의적(P<0.05) 차이를 나타내었다.

이는 TCM-199과 같은 복합배양액에는 초기 수정란의 발달에 좋지 않는 영향을 미치는 glucose가 함유되어 있기 때문에 이를 배제하기 위하여 직접 연구실에서 제조할 수 있는 단순배양액을 만들어 이용함으로써 이러한 일부 발달을 저하의 문제점을 극복해 나갈 수 있을 뿐만 아니라 수정란의 대사 및 필요성분 조사 등에 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

#### 4. 체외배양액의 교체시기에 따른 배 발달율

Table 4에서는 체외수정 후 체외배양액 HECM-6를 이용하여 초기 체외수정란을 체외배양하는데 있어서 HECM-6에서 3일 또는 4일간 배양한 후 10% BCS가 첨가된 TCM-199으로 수정란을 이동하여 9~10일까지 후기배로의 발달율에 차이가 나타나는지를 조사하였다. 수정율에 있어서 3일과

4일간에 각각 78.6%와 75.0%로 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 후기배로의 발달율에 있어서도 각각 45.5%와 43.2%로 나타나 HECM-6에서의 배양시간이 3일과 4일간에 있어서는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 그러나 배반포기배로의 발달속도에 있어서 HECM-6에서 3일간 배양후 TCM-199으로 이동한 군에서는 수정 후 8일째에 76.0%의 배반포기 발달율을 나타낸 반면, HECM-6에서 4일간 배양후 TCM-199으로 이동한 군에서는 수정 후 7일째에 71.0%의 배반포기 발달율을 나타내어, 초기 수정란의 체외배양에 있어서 HECM-6에서 4일간 배양 후에 TCM-199으로 수정란을 이동하는 것이 후기 배반포기배로의 발달속도를 빠르게 할 수 있음을 나타내고 있다. 그러나 다만, 후기배로의 발달속도를 나타내는데 있어서 배반포기배의 평가기준에 대한 세심한 주의력이 필요한 것으로 사료된다.

#### 5. 체외배양시 난관상피세포와의 공배양에 따른 배 발달 및 할구수 조사

Table 5에서는 미성숙 난포란을 체외성숙 및 체외수정 후 HECM-6를 이용하여 초기 체외수정란의 체외배양을 3일 또는 4일간 배양하는데 있어서 소

Table 4. Blastocyst development of embryos produced *in vitro* following media exchange with HECM-6 at day-3 or day-4 of culture\*

| Exchange of media | No. of oocytes used | No.(%) of oocytes cleaved | No.(%) of blastocyst   |           |          |          |          |
|-------------------|---------------------|---------------------------|------------------------|-----------|----------|----------|----------|
|                   |                     |                           | Total                  | Day 7     | Day 8    | Day 9    | Total    |
| Day 3             | 210                 | 165(78.6) <sup>a</sup>    | 75(45.5) <sup>b</sup>  | 4( 5.3)   | 57(76.0) | 14(18.7) | 75(100)  |
| Day 4             | 617                 | 463(75.0) <sup>a</sup>    | 200(43.2) <sup>b</sup> | 142(71.0) | 39(19.5) | 19(19.5) | 200(100) |

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

\*Maturation medium: Ham's F-10; Fertilization medium: TALP; Sperm concentration: 2×10<sup>6</sup> cells/ml.

Table 5. Effect of co-culture with BOEC in HECM-6 media on *in vitro* development of bovine IVF embryos\*

| Culture condition | Replicates | No. of oocytes used | No. (%) of oocytes cleaved | No. (%) of embryos developed to blastocyst |
|-------------------|------------|---------------------|----------------------------|--|
|                   |            |                     |                            |  |
| HECM-6 only       | 10         | 1920                | 1419(73.9) <sup>a</sup>    | 617(43.5) <sup>b</sup>                     |
| Co-culture        | 14         | 2031                | 1507(74.2) <sup>a</sup>    | 624(41.4) <sup>b</sup>                     |

<sup>†</sup>Different superscripts in the same column indicated a significant difference ( $P < 0.05$ ).

\*Maturation medium: Ham's F-10; Fertilization medium: TALP; Sperm concentration:  $2 \times 10^6$  cells/ml.

의 난관상피세포(bovine oviductal epithelial cell; BOEC)의 첨가군과 무첨가군 사이에 수정율 및 후기 배반포기배로의 발달율에 차이가 나타나는지를 실험하였다. 수정율에 있어서 첨가군과 무첨가군에서 각각 73.9%와 74.2%로 나타나 두 군간에 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 배반포기배로의 발달율에 있어서도 첨가군과 무첨가군에서 각각 43.5%와 41.4%로 나타나 두 군간에 발달율에 있어서 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

체외배양시 난관상피세포와의 공배양은 소에서 8~16 세포기의 "cell block 현상"을 극복한다고 하였으나(Goto 등, 1988; Eyestone과 First, 1989), 몇몇의 연구보고서에서는 소의 미성숙난포란을 체외성숙·수정 후 체외배양하는데 있어서 난관상피세포와 같은 체세포(somatic cell)와 공배양을 하지 않아도 8~16 세포기의 발달중지 현상을 극복하여 20~30% 또는 그 이상의 배반포기배로의 발달율을 나타낸다고 보고하였다(Pinyopunmintr와 Bavister, 1991; Fukui 등, 1991; Takahashi와 First, 1992; Kim 등, 1993).

따라서 본 연구에서는 단순배양액 HECM-6에 11종의 아미노산을 첨가함으로써 난관상피세포와의 공배양을 하지 않아도 난관상피세포와 공배양한 군과 거의 같은 성적을 나타내었다. 이는 체외배양

에 있어서 난관상피세포와의 공배양에서 가끔 발견될 수 있는 오염의 일부 원인을 방지할 수 있을 뿐만 아니라, 초기 수정란의 배양에 있어서 serum이 첨가되지 않는 단순배양액 HECM-6에 난관상피세포와 같은 체세포와 공배양을 하지 않고 단지 11종의 아미노산만을 첨가하여도 후기배로의 발달율에 있어서 영향을 미치지 않을 것으로 사료된다.

Table 6에서는 체외수정 후 체외배양시 난관상피세포와 공배양하지 않은 군과 공배양한 군과의 배양 8일째 배반포기배의 할구수를 각각 조사한 결과는 다음과 같다. 즉 체외배양액 HECM-6에서 4일 동안 배양한 다음 TCM-199 배양액으로 체외수정란을 옮겨 배양하면서 체외배양 8일째의 배반포기배의 할구수는 난관상피세포와 공배양하지 않은 군과 공배양 군에서 각각  $96.6 \pm 4.0$ 개와  $106.7 \pm 5.1$ 개로 나타나 두 처리군 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

## 적 요

미성숙 난포란을 이용하여 체외수정란을 생산하기 위해서는 난포란 배양에 적합한 배양체계의 구축이 필수적이므로 체외성숙, 수정 및 배양에 따라 적합한 최적 배양체계를 정립하고자, 도축장에서

Table 6. Effect of co-culture with BOEC on blastomere counts of *in vitro* developed bovine IVF embryos\*

| Culture conditions   | No. of blastocysts used** | No. of blastomeres |        |
|----------------------|---------------------------|--------------------|--------|
|                      |                           | Mean $\pm$ S.E.    | Ranges |
| Culture media only   | 28                        | $96.6 \pm 4.0^a$   | 61~140 |
| Co-culture with BOEC | 23                        | $106.7 \pm 5.1^a$  | 59~150 |

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

\*Maturation medium: Ham's F-10; Fertilization medium: TALP; Sperm concentration:  $2 \times 10^6$  cells/ml.

\*\*Examined 192 h post-insemination.

도출된 한우의 난소에서 최소한 2층 이상의 난구세포를 가지고 세포질이 충실한 난포란을 채란하여 실험에 공시하여, 체외성숙, 수정 및 배양에 따른 후기배로의 발달율을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

체외성숙시에는 Ham's F-10 배양액에 EGF를 첨가하여도 수정율과 배반포기배로의 발달율에는 BCS를 첨가한 경우와는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 그리고 체외수정시 정자를 준비하는데 있어서도 Swim-up 방법과 Percoll density gradient 방법에 있어서 수정율은 각각 80.2%와 81.9%로 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 체외수정 후 체외배양용 배양액으로 TCM-199과 HECM-6를 이용한 결과, 수정율에 있어서는 각각 80.5%와 72.0%로 TCM-199에서 약간 높은 경향을 나타내었으나, 배반포기배로의 발달율에 있어서는 26.7%와 42.4%로 TCM-199에 비해 HECM-6에서 훨씬 높게 나타났다. 그리고 HECM-6 배양액에서 수정란의 초기 배양시 난관상피세포와의 공배양군과 공배양을 하지 않는 군에 있어서는 수정율과 발달율에 있어서 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 그리고 체외수정 후 체외배양시 난관상피세포와 공배양 하지 않은 군과 공배양군과의 할구수를 체외배양 8일째 조사한 결과 각각  $96.6 \pm 4.0$ 개 및  $106.7 \pm 5.1$ 개로 나타나 두 처리군 간에 유의적 차이를 나타내지 않았다.

이상의 실험 결과들을 종합해 보면, EGF가 첨가된 체외성숙용 배양액 Ham's F-10으로 24시간 동안 체외성숙을 유도하여 Percoll density gradient 방법으로 채취된 운동성을 가진 활력정자와 매정하여 체외수정을 시킨 다음 HECM-6 체외배양액으로 3~4일 동안 초기 배양을 한 후, 10% BCS가 첨가된 신선 TCM-199 배양액으로 옮겨 후기배로의 발달율을 유도하는 것이 체외수정란의 생산율을 높이는 데 효율적인 것으로 사료된다.

## 참고문헌

- Blondin P and Sirard MA. 1995. Oocytes and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 41:54-62.
- Brackett BG and Zuelke KA. 1993. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, 39:43-64.
- Coskun S, Sanbuissho A, Lin YC and Rikihisa Y. 1991. Fertilizablity and subsequent developmental of bovine oocytes matured in medium containing epidermal growth factor (EGF). *Theriogenology*, 36:485-494.
- Eyestone WH and First NL. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fertil.*, 85:715-720.
- Fukui Y, McGowan LT, James RW, Pugh PA and Tervit HR. 1991. Factors affecting the in-vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 92:125-131.
- Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanishi Y and Ogawa K. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* maturation and fertilization. *J. Reprod. Fertil.*, 83:753-758.
- Hazeleger NL, Hill DJ, Stubbings RB and Walton JS. 1995. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential *in vitro*. *Theriogenology*, 43:509-522.
- Kim JH, Niwa K, Lim JM and Okuda K. 1993. Effects of phosphate, energy substrates and amino acids on development of *in vitro*-matured, *in vitro*-fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. *Biol. Reprod.*, 48:1320-1325.
- Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP and Gordon I. 1994. Effect of follicle size on bovine oocytes quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 37:48-53.
- Lonergan P, Carolan C, Van Langendonck A,



- Donnay I, Khatir H and Mermillod P. 1996. Role of epidermal growth factor in bovine oocytes maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. Biol. Reprod., 54:1420-1429.
- McKiernan SH, Clayton MK and Bavister BD. 1995. Analysis of stimulatory and inhibitory amino acids for development of hamster one-cell embryos. Mol. Reprod. Dev., 42: 188-199.
- Parrish JJ, Krogenaes A and Susko-Parrish JL. 1995. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. Theriogenology, 44:859-869.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH and First NL. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. Theriogenology, 25: 591-600.
- Pavlok A, Lucas-Hahn A and Niemann H. 1992. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. Mol. Reprod. Dev., 31:64-67.
- Pinyopummintr T and Bavister BD. 1991. *In vitro*-matured /*in vitro*-fertilized bovine oocytes can develop into morulae /blastocysts in a chemically defined, protein-free culture media. Biol. Reprod., 45:736-742.
- Pinyopummintr T and Bavister BD. 1995. Minimum energy substrate requirements for early cleavage stages of bovine embryo development *in vitro*. Theriogenology, 43:299. Abstr.
- Pinyopummintr T and Bavister BD. 1996. Energy substrate requirements for *in vitro* development of early cleavage-stage bovine embryos. Mol. Reprod. Dev., 44:193-199.
- Pursel VG, Wall RJ, Rexroad JrCE, Hammer RE and Brinster RL. 1985. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. Theriogenology, 24:687-691.
- Saeki K, Hoshi M, Leibfried-Rutledge ML and First NL. 1991. *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. Theriogenology, 44:256-260.
- Schini SA and Bavister BD. 1988. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. Biol. Reprod., 39:1183-1192.
- Stubbing RB and Wosik CP. 1991. Glass wool versus swim-up separation of bovine spermatozoa for *in vitro* fertilization. Theriogenology, 35:276. Abstr.
- Takahashi Y and First NL. 1992. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. Theriogenology, 37: 963-978.
- Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, McKenna AI, Fick GH and Schultz GA. 1991. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. Mol. Reprod. Dev., 30:330-338.

---

(접수일 : 2000. 4. 4 / 채택일자 : 2000. 4. 28)