

돼지 난포란 유래 체외수정란 생산에 대한 제요인의 영향  
IV. 체외발달 배양액의 종류와 배양액 교체가  
체외발달에 미치는 영향

연성흙<sup>†</sup> · 최선호 · 조창연 · 한만희 · 손동수 · 이규승<sup>1</sup>  
농촌진흥청 축산연구소 가축유전자원시험장

**Effects of Some Factors on *In Vitro* Production of Embryos  
from Antral Follicle-Derived Porcine Oocytes  
IV. Effects of Development Media and  
Those Change on *In Vitro* Development**

S. H. Yeon<sup>†</sup>, S. H. Choi, C. Y. Cho, M. H. Han, D. S. Son and K. S. Lee<sup>1</sup>  
*Animal Genetic Resources Station, National Livestock Research Institute, R.D.A.*

**SUMMARY**

This study was carried out to examine the effects of development media and those change on *in vitro* development (IVD) of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. Putative embryos, which were matured *in vitro* in modified NCSU-23 (mNCSU-23) supplemented with 10% porcine follicular fluid (pFF) and were fertilized in mTBM, were developed *in vitro* as the experimental scheme. The results are as follows.

When porcine putative embryos were cultured *in vitro* in NCSU-23 or CZB/Pig-MEM, the percentage of oocytes cleaved was not different between two systems, but the percentage of blastocysts in NCSU-23 was significantly higher than in CZB/Pig-MEM ( $P<0.05$ ). And when porcine putative embryos were cultured *in vitro* in NCSU-23 during 7 days with or without changing media at day 5, which was supplement with or without 10% fetal bovine serum(FBS), the percentage of oocytes cleaved, blastocysts at day 6, and the cell number of ICM, TE and total of blastocysts at day 7 were not different among three treatments.

As a result of this study, it is supposed that NCSU-23 be more favorable, to develop porcine embryos derived from IVM/IVF, than CZB/Pig-MEM, but that demonstration on the effects of changing medium with fresh one stand in need of the more experiments.

(Key words : porcine oocyte, IVM, IVF, IVD, development media, blastocysts)

서 론

돼지 체외성숙란의 체외수정능력이 Motlic과

Fulka(1974)에 의해 확인된 후, Iritani 등(1978)은 체외성숙란의 체외수정을 성공시켰고, Mattioli 등(1989)은 체외성숙란의 체외수정후 추정수정란을

\* 본 연구는 농촌진흥청 대형공동연구과제(2000-2002) 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

<sup>1</sup> 충남대학교 동물자원학부(Division of Animal Science and Resources, Chungnam National University)

<sup>†</sup> Correspondence : E-mail : yeonsu@rda.go.kr

수란돈에 이식하여 처음으로 산자를 생산함으로써 체외성숙/체외수정란의 발달능력이 확인되었다. 더 나아가, Yoshida 등(1993), Day 등(1998), 그리고 Marchal 등(2001)이 각각 체외성숙/체외수정 유래의 2~4세포기, 8세포기~상실기, 배반포기의 돼지 수정란을 이식하여 산자를 생산하는데 성공함으로써 체외성숙/체외수정/체외발달 유래의 수정란도 출생까지의 발달능력을 갖고 있다는 것이 확인되었다.

돼지수정란의 체외발달 배양을 위해 구성물질이 서로 다른 여러 가지 배양액이 개발되어 왔으나 어떤 배양액에서 배반포 발달율이 더 높고 그 세포수가 더 많은지, 또 장기간 배양에 따른 배양액내 구성물질의 농도 변화를 교정하거나 체내에서의 환경을 모사하는 배양액 교체가 수정란의 발달에 어떤 영향을 미치는 지에 대하여 아직 확실하지 않다.

체내 수정란의 체외발달에 대한 초기 연구에서 1세포 수정란은 4세포기에서 정지되는 것으로 보고되었으나(Davis, 1985) NCSU-23(Petters와 Wells, 1993), ISU액(Youngs 등, 1993), BECM-3(Dobrinsky 등, 1996) 등 여러 가지 배양액이 개발되면서 초기 체내 수정란을 배반포까지 발달시킬 수 있게 되었다. 그러나 Day(2000)는 이들 배양액에서 체내수정란이 70% 이상 배반포로 발달되었지만, 체외성숙/체외수정 유래 수정란은 배양액마다 발달율이 달랐다고 보고했다.

체내 수정란을 이용한 체외발달 연구에서, Rath 등(1995)과 Machaty 등(1998)은 NCSU-23이 함께 검토한 다른 배양액보다 더 우수한 것으로 보고했다. Dobrinsky 등(1996)은 돼지 체내 수정란의 체외발달에 NSSU-23보다 BECM-3가 더 좋았다고 했으나 Long 등(1999)은 체외성숙/체외수정란의 체외발달에 BECM-6 등보다 NCSU-23이 더 우수했다고 하였다.

한편, Stewart-Savage와 Bavister(1988)는 장기간 배양되는 배양액이 빠르게 나빠져 배발달을 지속시키지 못하게 될 수 있다고 하였다. Pollard 등(1995)은 체내 수정란의 체외발달에 CZB(Chatot 등, 1989)와, Hepes-CZB(H-CZB) 및 Pig-MEM(Malayer 등, 1988)를 비교하여 발달 단계별로 다른 결과를 얻었다고 하였고, 사람의 수정란 배양을

위해 개발된 Gardner의 순차배양시스템 G1.2/G2.2(Gardner와 Lane, 1993; Gardner 등, 1998)는 소(Krisher 등, 1993), 산양(Bormann 등, 2000) 및 돼지(Ghandhi 등, 2001)의 수정란 발달도 잘 지속시키는 것으로 나타났다. 이러한 순차배양시스템에 대하여 Swain 등(2001)은 이 시스템이 에너지 기질 및 그 농도를 바꾸어주는 이점이 있으며, 이렇게 하여 체내에서 발달하는 수정란이 난관을 통해 자궁으로 이동하는 것처럼 체내수정란이 놓이는 환경의 변화를 모사할 수 있다고 하였다.

본 연구는 돼지 수정란의 체외발달에 사용되고 있는 몇 가지 배양액 중에서 체외수정란 생산체계에 적합한 배양액을 선발하고, 선발된 배양액을 이용하여 체내의 환경변화를 모사하는 배양시스템을 개발하기 위하여 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. COCs 채취와 pFF 준비

도축장 유래의 미경산돈 난소로부터 시험에 사용한 COCs를 회수하거나 pFF를 준비하는 과정은 본 연구의 I보(연 등, 2004b)에 기술한 바와 같다.

### 2. 미성숙 난포란의 성숙배양

미성숙 난포란의 성숙배양액으로 NCSU-23(Petters와 Wells, 1993)만을 이용했다는 것 외에 성숙배양시의 첨가물질 및 호르몬, 그리고 성숙배양의 전 과정도 본 연구의 I보(연 등, 2004b)에 기술한 바와 같다.

### 3. 수정배양액, 정자, 난자의 준비 및 체외수정

체외수정용 배양액과 전처리, 정자 및 난자의 준비, 체외수정 방법 등 체외수정을 위한 준비 및 체외수정의 전 과정도 본 연구의 I보(연 등, 2004b)에 기술한 바와 같다.

### 4. 체외수정란의 발달배양

체외성숙/체외수정란의 발달배양에는 실험 목적에 따라 0.4% BSA(Sigma, Fraction V)가 함유된 NCSU-23(Petters and Wells, 1993) 또는 CZB/Pig-MEM (Pollard 등, 1995)을 사용했다. 체외수정이

완료된 추정수정란은 체외발달 배양액으로 3회 세척한 다음 4-well dish(Nunc, Denmark)의 500  $\mu$ l 체외발달 배양액에 well당 40개 내외씩 옮겨 넣은 다음, 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 포화습도의 배양기 내에서 7일 동안 배양하여 체외발달시켰는데, 그 중 일부는 체외배양 개시 96시간(4일) 전후에 실험 목적에 따른 배양액으로 교체한 다음 배양을 계속하였다. 난할율은 체외배양 개시 후 44시간에, 배반포 발달율은 체외배양 개시 후 144시간에 조사했다.

### 5. 확장배반포의 염색과 세포 구분

확장배반포의 ICM 세포수와 TE 세포수를 조사하기 위한 처리 과정 및 세포 구분은 본 연구의 II 보(연 등, 2004a)에 기술한 바와 같다.

### 6. 실험 구성

첫 번째 실험은 NCSU-23과 CZB/Pig-MEM이 체외수정란 생산에 미치는 영향을 구명하기 위해 체외성숙/체외수정시킨 난자를 NCSU-23에서 배양액 교체없이 7일 동안 배양하는 처리와 CZB에서 4일 동안 배양한 다음 Pig-MEM으로 옮겨서 나머지 3일간 배양하는 처리를 두고 수행했다. 두 번

제 실험은 체외배양 후반기에 FBS 첨가효과를 구명하기 위해 체외성숙/체외수정시킨 난자를 NCSU-23에서 배양액 교체없이 7일 동안 배양하는 처리와 체외배양 5일째에 같은 배양액으로 교체하여 배양하는 처리 및 NCSU-23의 0.4% BSA를 10% FBS로 대체한 배양액(mNCSU-23F)으로 교체하여 배양하는 처리를 두고 수행했다.

### 7. 통계처리

본 연구에서는 각 실험별로 처리당 4회 이상 반복 시험을 수행했으며, 조사된 성적은 실험계획에 따라 *t*-검정 또는 분산분석(ANOVA)을 실시한 다음, 유의성이 인정된 것에 대해서는 LSD에 의하여 처리간 차이를 구분했다.

## 결과 및 고찰

### 1. 발달배양액의 영향

체외성숙/체외수정란을 NCSU-23에서 배양액 교체없이 7일 동안 배양하거나 CZB에서 4일 배양한 다음 Pig-MEM에 옮겨서 나머지 3일간 배양한 결과는 Table 1 및 Table 2와 같다. 난 분할율은 각

Table 1. Effects of development media on *in vitro* development of *in vitro* fertilized embryos derived from porcine antral follicles

Medium	No. of oocytes inseminated	% of oocytes cleaved (Mean±SE)	% of blastocysts at day 6 (mean±SE)	
			/ cleaved	/ inseminated
NCSU-23	178	51.1±3.9	19.3±1.4 <sup>A</sup>	10.0±1.4 <sup>a</sup>
CZB/Pig-MEM	185	47.9±4.5	9.8±1.5 <sup>B</sup>	4.9±1.1 <sup>b</sup>

<sup>A,B</sup> Values within columns for individual treatments with different superscripts differ ( $P<0.01$ ).

<sup>a,b</sup> Values within columns for individual treatments with different superscripts differ ( $P<0.05$ ).

Table 2. Effects of development media on cell number of blastocysts developed from *in vitro* fertilized embryos derived from porcine antral follicles

Medium	No. of blastocysts	No. of cells <sup>1</sup> (mean±SE)			% of ICM cells (mean±SE)
		ICM	TE	Total	
NCSU-23	11	4.3±0.5	27.2±2.2	31.5±2.7	13.3±0.5
CZB/Pig-MEM	3	3.3±0.9	25.0±6.7	28.3±7.5	11.7±0.4

<sup>1</sup> ICM : inner cell mass, TE : Trophoctoderm.

각 51.1%와 47.9%로 배양액간에 차이를 보이지 않은 반면, 분할판대 배반포 발달율은 19.3%와 9.8%로( $P<0.01$ ), 그리고 추정수정란대 배반포 발달율은 10.0%와 4.9%로( $P<0.05$ ) 유의적인 차이를 나타냈다. 그러나 배반포의 ICM 세포수는 각각 4.3개와 3.3개였으나 처리간에 유의적인 차이는 없었고, TE 세포수(27.2개와 25개)와 총세포수(31.5개와 28.3개)도 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

Swain 등(2001)은 체외수정란을 NCSU-23 또는 G1.2/G2.2에서 배양했을 때, 난 분할율은 각각 74%와 68%로 비슷했지만 배반포 발달율은 15%와 8%로 NCSU-23이 더 우수했다고 하였고 Abeydeera (2001)은 mWM, NCSU-23, ISU액, BECM-3 등을 사용하여 체외성숙/체외수정란의 체외발달을 비교한 결과, 배반포 발달율이 NCSU-23에서 가장 좋았고(30%) mWM에서 가장 낮았다(5%)고 보고했다. 본 실험은 NCSU-23과 CZB/Pig-MEM을 비교한 것이지만, NCSU-23이 배반포 발달율에서 더 우수했다는 점에서 위의 두 보고와 같은 경향이였다.

체외발달 배양액의 개발이나 비교를 위해서 지금까지 많은 연구자들은 체내 수정란을 이용해 왔다. Rath 등(1995)은 2~4세포기의 체내 수정란으로 NCSU-23, mWM, mKRB를 비교한 결과, 배반포까지의 발달을 촉진하는데 NCSU-23이 다른 두 배양액보다 더 효과적이라고 보고했고, Pollard 등(1995)은 1세포기와 상실기의 체내 수정란을 이용하여 CZB, CZB에 HEPES를 첨가하고  $\text{NaHCO}_3$ 를 줄인 H-CZB (HEPES-CZB), 그리고 Pig-MEM를 비교한 결과, 1세포 수정란은 Pig-MEM보다 CZB나 H-CZB에서 배반포까지 더 잘 발달했고, 상실배는 세 가지 배양액에서 대부분 배반포로 발달했으나 CZB와 H-CZB에서는 일부 배반포만이 탈출된 반면, Pig-MEM에서는 대부분이 탈출되었고, 배반포의 세포수 역시 Pig-MEM에서 발달된 것이 더 많았다고 보고했다. 또 Machaty 등(1998)은 1~2세포기의 체내 수정란을 이용하여 NCSU-23과, KSOM에 필수 및 비필수 아미노산을 첨가한 KSOM/AA를 비교한 결과, 배반포까지의 발달은 NCSU-23과 KSOM/AA에서 각각 47.7%와 45.2%로 서로 비슷했지만 배반포의 ICM 세포수, TE 세포수 및 총세포수는 NCSU-23이 각각 5.7, 25.0 및 30.5개로

KSOM/AA의 3.8, 17.5 및 21.4개보다 많았기 때문에 NCSU-23이 제공하는 환경이 초기배 발달에 더 적합했다고 보고했다. 본 실험의 결과는 체외수정란에 대한 것이고 위의 세 보고는 체내 수정란에 대한 것이라는 점에 차이가 있지만 NCSU-23이 돼지 수정란의 배발달에 좋은 영향을 줄 수 있다는 것을 시사한다는 측면에서 일치하고 있다.

한편, Dobrinsky 등(1996)은 BECM-3와 NCSU-23을 이용하여 체내유래 수정란을 배양한 결과, BECM-3에서 발달율이 더 높았다고 보고했으나, Long 등(1999)은 체외 수정란을 BECM-3와 BECM-6에서 각각 배양했을 때, 발달율에 차이가 없었고, 체외수정란의 체외발달 배양액으로 BECM-6와 여기에 taurine과 hypotaurine을 추가시킨 BECM-7, 그리고 NCSU-23과 여기에 MEM amino acids와 BME amino acids를 추가시킨 NCSU-23aa 등 4종을 비교한 결과, 난분할율은 39.8(NCSU-23)~45.6%(BECM-7)로 배양액 사이에 차이가 없었으나 배반포 발달율은 NCSU-23과 NCSU-23aa가 각각 19.8%, 13.6%로 BECM-6와 BECM-7의 4.0%, 4.9%보다 좋았다고 보고했다. 또 taurine과 hypotaurine이 들어있는 배양액의 배반포는 그것들이 들어있지 않은 배양액의 배반포보다 세포수가 많았던 반면, 아미노산이 추가된 NCSU-23aa는 NCSU-23보다 분할판대 배반포 발달이 오히려 떨어졌다고 보고했다.

이렇게 체외발달 배양액마다 다른 배 발달율을 보이는 이유에 대해 Day (2000)와 Abeydeera(2002)는 포도당의 존재 여부와 lactate의 농도의 차이때문일 것으로 추정했고, Petters와 Well(1993)은 lactate와 pyruvate는 포도당이 들어있는 배양액에서 돼지 수정란의 발달에 해로운 것 같다고 보고했다. 또 Iwasaki 등(1999)은 BSA-free WM에서 포도당, lactate, pyruvate가 모두 포함된 것보다 lactate와 pyruvate만 포함된 것이 배양초기 발달에 더 좋은 결과를 가져왔으며 lactate의 효과가 함께 첨가되는 포도당에 의한 억제효과보다 중요하다고 하였다. Taurine과 hypotaurine의 효과는 돼지에서(Petters와 Reed, 1991) 뿐만 아니라 hamster(Barnett와 Bavister, 1992)와 소(Liu와 Foote, 1995, 1997)에서 이미 확인된 것이였다. 한편, Bavister와 Arlotto (1990)는 어떤 아미노산은 hamster 수정란에 유독

할지도 모른다고 보고한 반면, Dobrinsky 등(1996)은 전체 아미노산이 돼지 체내 수정란의 배발달에는 나쁜 영향을 주지 않았다고 보고했다. Long 등(1999)은 이전 보고들의 서로 다른 결과나 자신들의 결과에 비추어 체외수정란의 아미노산 요구가 체내 수정란의 요구와 다르거나, 체내 수정란은 불리한 배양조건에서 체외 수정란보다 더 잘 견딜는지도 모른다고 추정했다.

## 2. 배양액 교체의 영향

체외성숙/체외수정란을 NCSU-23에서 배양액 교체없이 7일 동안 배양하거나(배양액 비교체) 체외배양 5일째에 같은 배양액(동일배양액 교체)이나 0.4% BSA를 10% FBS로 대체한 배양액(FBS 첨가액 교체)으로 완전히 교체하여 배양한 결과는 Table 3 및 Table 4와 같다. 분할란대 배반포발달율은 17.5%(동일배양액 교체)~23.4%(FBS 첨가액 교체), 추정수정란대 배반포 발달율은 각각 8.6%(동일배양액 교체)~11.2%(FBS 첨가액 교체)로 처리간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 또 배반포의 ICM 세포수는 각각 4.2, 3.7, 4.8개로 동일 배양액 교체가 FBS 첨가액 교체보다 적은 경향을 보였으나 유의

적인 차이는 아니었고, TE 세포수는 28.2%(배양액 비교체)~33.1개 (FBS 첨가액 교체), 총세포수는 32.3개(동일배양액 교체)~37.9개(FBS 첨가액 교체)로 모두 처리간 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

이러한 결과는 CZB나 H-CZB에서 1세포기의 체내수정란을 120시간 배양한 다음, 20% FCS를 첨가한 같은 배양액에 옮겨 계속 배양한 결과, 배반포 발달율에서 처리간에 차이가 없었다는 Pollard 등(1995)의 보고와 일치하는 것이었다. 또한 아미노산과 insulin을 첨가한 NCSU-23(mNCSU-23)에서 1~2세포기의 체내 수정란과 체외 수정란을 4일간 배양하고, 같은 배양액이나 여기에 다시 FCS를 첨가한 NCSU-23 (mNCSU-23F)으로 교체하여 4일간 추가 배양한 결과, 체내 수정란과 체외 수정란 모두 처리간 배반포 발달율에서 유의적인 차이가 없었다는 Koo 등(1997)의 보고와도 같은 결과였다. 여기서 비교한 두 보고는 배양후기 FBS의 첨가가 탈출 배반포의 증가를 가져왔다고 하였으나 본 실험에서는 수정종료 7일후에 확장배반포기의 수정란을 분별염색하여 세포수 조사에 활용했기 때문에 배반포의 투명대 탈출을 조사하지 않았지만, 염색을 생략한 일부 반복에서 탈출 배반포를 관찰할

Table 3. Effects of development media exchange on *in vitro* development of *in vitro* fertilized embryos derived from porcine antral follicles

Medium exchange	No. of oocytes inseminated	% of oocytes cleaved (Mean ± SE)	% of blastocysts at day 6 (mean ± SE)	
			/ cleaved	/ inseminated
Unchanged	264	49.6 ± 2.7	22.2 ± 2.5	11.0 ± 1.2
The same medium	272	49.7 ± 2.1	17.5 ± 3.7	8.6 ± 1.8
FBS suppl. medium	269	48.1 ± 2.3	23.4 ± 2.4	11.2 ± 1.2

Table 4. Effects of development media exchange on cell number of blastocysts developed from *in vitro* fertilized embryos derived from porcine antral follicles

Medium exchange	No. of blastocysts	No. of cells <sup>1</sup> (mean ± SE)			% of ICM cells (mean ± SE)
		ICM	TE	Total	
Unchanged	13	4.2 ± 0.4	28.2 ± 2.1	32.4 ± 2.5	12.9 ± 0.5
The same medium	13	3.7 ± 0.3	28.6 ± 1.8	32.3 ± 2.2	11.3 ± 0.5
FBS suppl. medium	14	4.8 ± 0.4	33.1 ± 1.6	37.9 ± 2.0	12.4 ± 0.5

<sup>1</sup> ICM : inner cell mass, TE : Trophectoderm.

수 있었는데 그것들은 모두 FBS를 첨가한 처리의 것이었다(자료는 제시하지 않음).

Stewart-Savage와 Bavister(1988)는 장기간 배양되는 배양액은 빠르게 나빠진 결과 수정란의 발달을 지속시키지 못하게 될 수도 있다고 하였다. Swain 등(2001)은 순차배양시스템은 이 문제를 극복하고 또 에너지 기질 및 그 농도를 바꾸어주는 이점이 있으며, 이렇게 함으로써 체내에서 발달하는 수정란이 난관을 통해 자궁으로 이동하는 것처럼, 체내 수정란이 놓이는 환경의 변화를 모사한다고 하였다. 그러나 Swain 등(2001)은 순차배양시스템 G1.2/G2.2가 돼지 체외 유래 수정란의 체외발달에서 단일시스템인 NCSU-23보다 떨어지는 결과를 가져왔다고 보고했다. 반면에 NCSU-23을 일부 변경하여 단계별 구분 배양한 Koo 등(1997)은 배반포발달율은 개선하지 못했지만 탈출 배반포를 증가시켰으므로 부분적으로 배반포의 질을 개선한 것으로 사료된다.

NCSU-23은 지금까지 개발된 발달배양액 중에서 가장 우수한 것으로 보고되었으므로(Abeydeera, 2001) NCSU-23을 기반으로 하는 순차배양시스템이 개발된다면 체외수정란 생산을 위해 보다 개선된 방법이 될 수 있을 것 같다. 포도당을 제외시키고 낮은 농도의 lactate(4.5mM)와 pyruvate(0.33mM)를 추가시킨 mNCSU-23에서 배양초기 72시간 동안 배양한 다음 본래의 NCSU-23에서 72시간 배양했을 때, 전기간 NCSU-23에서 배양한 것보다 배반포 발달율이 개선되었고 한 Abeydeera (2002)의 보고는 NCSU-23을 기반으로 하는 순차배양시스템을 예고하는 것일지도 모른다.

한편 지금까지 돼지 수정란의 발달배양을 위한 배양액 성분의 구성과 농도는 수정란이 요구하는 발달단계별 기질의 요구량이나 대사를 근거한 경우보다 오히려 특정 성분이 수정란의 발달에 미치는 영향을 토대로 변경된 것이 더 많은 것 같다. 또 수정란 발달에 대한 특정 기질의 영향에 대하여 서로 상반된 결과를 보고한 예가 많았던 것은 발달단계별로 달라지는 그 기질의 영향을 간과하고 발달배양 전 기간 동안 나타난 것으로 그 영향을 평가했기 때문인 것으로 사료된다. 게다가 체내 수정란과 체외수정란의 특정 기질에 대한 요구량

이 서로 다르거나 체내 수정란이 적절치 않은 배양환경에 더 잘 견딜지도 모른다는 Long 등(1999)의 주장이 사실이라면 지금까지 체내 수정란을 이용한 여러 가지 기질의 영향은 다시 검토되어야 할 것이다.

## 적 요

본 연구는 체외성숙/체외수정 유래의 돼지 난자를 이용하여 체외발달시 배양액의 종류나 교체에 따른 영향을 구명하고자 수행하였다. mNCSU-23에서 체외성숙시킨 다음 mTBM에서 체외수정시킨 난자를 목적에 따라 두 가지로 나누어 실험한 결과는 다음과 같다.

1. 체외성숙/체외수정란을 NCSU-23에서 배양액 교체없이 7일 동안 배양하거나 CZB에서 4일 배양한 다음 Pig-MEM으로 옮겨서 나머지 3일간 배양한 결과, 난분할율은 배양액간 차이를 보이지 않은 반면, 추정수정란대 배반포 발달율( $P<0.05$ )과 분할란대 배반포 발달율은 NCSU-23에서 배양된 것이 유의적으로 높았다( $P<0.01$ ). 그러나 배반포의 ICM 세포수, TE 세포수 및 총세포수에서는 모두 차이가 없었다.
2. 체외성숙/체외수정란을 NCSU-23에서 배양액 교체없이 7일 동안 배양하거나 체외배양 5일째에 신선한 동일 배양액이나 0.4% BSA를 10% FBS로 대체한 배양액(mNCSU-23F)으로 완전히 교체하여 배양한 결과, 난분할율, 배반포발달율, 배반포의 ICM 세포수, TE 세포수 및 총세포수 모두 처리간 유의적인 차이를 보이지 않았다.

결과적으로, NCSU-23이 CZB/Pig-MEM보다 체외성숙/체외수정 유래의 난자를 체외발달시키는데 적합한 것으로 사료되며, 체외발달배양 과정에 신선한 배양액이나 일부 변경된 배양액으로의 교체에 대해서는 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

Abeydeera LR. 2001. *In vitro* fertilization and emb-

- ryo development in the pig. *J. Reprod. Fertil.*, 58(Suppl.):159-173.
- Abeydeera LR. 2002. *In vitro* production of embryos in swine. *Theriogenology*, 57:256-273.
- Barnett DK and Bavister BD. 1992. Hypotaourine requirement for *in vitro* development of golden hamster one-cell embryos into morulae and blastocysts, and production of term offspring from *in vitro*-fertilized ova. *Biol. Reprod.*, 47:297-304.
- Bavister BD and Arlotto T. 1990. Influence of single amino acids on the development of hamster one-cell embryos *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 25:45-52.
- Bormann CL, Ongerer EM and Krisher RL. 2000. Effects of vitamins on maturation of caprine oocytes and their subsequent developmental capacity *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 62(Suppl.):166 (abstr.).
- Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL and Torres I. 1989. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 86:679-688.
- Davis DL. 1985. Culture and storage of pig embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 33(Suppl.):115-124.
- Day BN. 2000. Reproductive biotechnologies: current status in porcine reproduction. *Anim. Reprod. Sci.*, 60: 161-172.
- Day BN, Abeydeera LR, Johnson LA, Welch GR, Wang WH, Cantley TC and Rieke A. 1998. Birth of piglets preselected for gender following *in vitro* fertilization of *in vitro* matured pig oocytes by X and Y bearing spermatozoa stored by high speed flow cytometry. *Theriogenology*, 49:360(abstr.).
- Dobrinsky JR, Johnson LA and Rath D. 1996. Development of a culture medium (BECM-3) for porcine embryos: effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on embryo development. *Biol. Reprod.*, 55:1069-1074.
- Gandhi AP, Lane M, Gardner DK and Krisher RL. 2001. Substrate utilization in porcine embryos cultured in NCSU23 and G1.2/G2.2 sequential culture media. *Mol. Reprod. Dev.*, 58:269-275.
- Gardner DK and Lane M. 1993. Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biol. Reprod.*, 48:377-385.
- Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J and Hesla J. 1998. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in *in-vitro* fertilization. *Human Reprod.*, 13:3434-3440.
- Iwasaki T, Kimura E and Totsukawa K. 1999. Studies on a chemically defined medium for *in vitro* culture of *in vitro* matured and fertilized porcine oocytes. *Theriogenology*, 51:709-720.
- Koo DB, Kim NH, Lee HT and Chung KS. 1997. Effects of fetal calf serum, amino acids, vitamins and insulin on blastocoel formation and hatching of *in vivo* and IVM/IVF-derived porcine embryos developing *in vitro*. *Theriogenology*, 48:791-802.
- Krisher RL, Lane M and Bavister BD. 1993. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi defined and defined culture media. *Biol. Reprod.*, 60:1345-1352.
- Liu Z. and Foote RH. 1995. Effects of amino acids on the development of *in-vitro* matured/*in-vitro* fertilization bovine embryos in a simple protein-free medium. *Human Reprod.*, 10:2985-2991.
- Liu Z. and Foote RH. 1997. Effects of amino acids and amanitin on bovine embryo development in a simple protein-free medium. *Mol. Reprod. Dev.*, 46:278-285.
- Long CR, Dobrinsky JR and Johnson LA. 1999. *In vitro* production of pig embryos: Comparisons of culture media and boars. *Theriogenology*, 51:1375- 1390.
- Machaty Z, Day BN and Prather RS. 1998. De-

- velopment of early porcine embryos *in vitro* and *in vivo*. Biol. Reprod., 59:451-455.
- Malayer JR, Hansen PJ and Buhi WC. 1988. Secretion of proteins by cultured bovine oviducts collected from estrus through early diestrus. J. Exp. Zool., 248:345-353.
- Marchal R, Feugang JM, Perreau C, Venturi E, Terqui M and Mermillod P. 2001. Meiotic and developmental competence of prepubertal and adult swine oocytes. Theriogenology, 56:17-29.
- Mattioli M, Bacci ML, Galeati G and Seren E. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. Theriogenology, 46:1201-1207.
- Motlik J and Fulka J. 1974. Fertilization of pig follicular oocytes cultivated *in vitro*. J. Reprod. Fertil., 36:235-237.
- Petters RM and Reed ML. 1991. Addition of taurine or hypotaurine to culture medium improves development of one- and two-cell pig embryos *in vitro*. Theriogenology, 35:253(abstr.).
- Petters RM and Wells KD. 1993. Culture of pig embryos. J. Reprod. Fertil., 48:61-73.
- Pollard JW, Plante C and Leibo SP. 1995. Comparison of development of pig zygotes and embryos in simple and complex culture media. J. Reprod. Fertil., 103:331-337.
- Rath D, Niemann H, Tao T and Boerjan M. 1995. Ratio and number of inner cell mass and trophoblast cells of *in vitro* and *in vivo* produced porcine embryos. Theriogenology, 43:304(abstr.).
- Stewart-Savage J and Bavister BD. 1988. Detrioration of stored culture media as monitored by a sperm motility bioassay. J. *In Vitro* Fertil. Embryo Transf., 5:76-80.
- Swain JE, Bormann CL and Krisher RL. 2001. Development and viability of *in vitro* derived porcine blastocysts cultured in NCSU23 and G1.2/G2.2 sequential medium. Theriogenology, 56: 459-469.
- Yoshida M, Mizoguchi Y, Ishigaki K, Kojima T and Nagai T. 1993. Birth of piglets derived from *in vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro*. Theriogenology, 39:1303-1311.
- Youngs CR, Ford SP, McGinnis LK and Anderson LH. 1993. Investigations into the control of litter size in swine: I. Comparative studies on *in vitro* development of Meishan and Yorkshire preimplantation embryos. J. Anim. Sci., 71: 1561-1565.
- 연성흠, 손동수, 한만희, 위미순, 최선희, 이규승. 2004a. 돼지 난포란 유래 체외수정란 생산에 대한 제요인의 영향. II. 체외성숙배양시 EGF와 COC의 수가 체외성숙, 체외수정 및 체외발달에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지, 19: 173-183.
- 연성흠, 최선희, 김종대, 손동수, 한만희, 이규승. 2004b. 돼지 난포란 유래 체외수정란 생산에 대한 제요인의 영향. I. 체외성숙, 체외수정, 체외발달에 대한 체외성숙 배양액의 영향. 한국수정란이식학회지, 19:165-172.

---

(접수일: 2004. 9. 5 / 채택일: 2004. 11. 10)