

Polyvinylpyrrolidone 첨가가 돼지 체외 수정란의 발달과 세포수에 미치는 영향

박용수 · 김재영¹ · 박흠대^{2,*}
경상북도축산기술연구소

Effect of the Addition of Polyvinylpyrrolidone on *In Vitro* Development and Cell Number of Porcine Embryo after *In Vitro* Fertilization

Y. S. Park, J. Y. Kim¹ and H. D. Park^{2,*}

Kyongbuk Livestock Research Institute

SUMMARY

In this study, we examined the effects of molecular weight, concentrations and treated the duration of polyvinylpyrrolidone (PVP) *in vitro* maturation (IVM) medium (Experiment 1), and the effect of PVP in IVM, *in vitro* fertilization (IVF) and *in vitro* culture (IVC) medium on the development and cell number of porcine embryos (Experiment 2). The base mediums were NCSU 23 solution for IVM, mTBM solution for IVF and PZM3 solution for IVC. In experiment 1, the development rates to 2 cell and blastocyst stage were not differ from the different molecular weight (MW), concentration and duration of PVP in IVM medium. However, the hatching rate of blastocyst was significantly higher in the group of MW 40,000, 0.5% and 0~44 hr than in the other groups ($p<0.05$). In experiment 2, the results of IVM, IVF and IVC medium with (W) or without (W/O) 0.5% MW 40,000 PVP are follows. The development rate to 2 cell stage was highest in the group of W-W/O-W ($p<0.05$). The development rate to blastocyst and hatching rate was higher in the group of W-W/O-W and W-W/O-W/O than that of other treatments ($p<0.05$).

(Key words : pig, polyvinylpyrrolidone, *in vitro* development, cell number)

서 론

유전자 재조합 기술의 개발 및 응용의 폭이 넓어짐에 따라 동물과 인간의 유전자를 수정란에 도입하여 형질 전환 동물을 생산하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 돼지는 생리 기능이 인간과 유사하기 때문에 각종 실험에 많이 이용되고 있으

나 그 효율성은 실험 동물에 비하여 낮은 수준이다. 이러한 원인은 돼지 미성숙 난자의 핵과 세포질 성숙의 불안정, 불안정한 응성 전핵 형성 및 다정자 침입 등이다(Abeydeera와 Day, 1997; Motlik 등, 1984). 이러한 문제를 해결하기 위하여 체외 수정과 배양 방법의 개선을 시도하였으나(Matias 등, 2003; Abeydeera, 2001) 체외에서 생산할 수 있는

¹ 차병원 여성의학연구소 불임의학연구소(Infertility Medical Center of CHA General Hospital)

² 대구대학교 공과대학 생명공학과(Department of Biotechnology, Daegu University)

* Correspondence : E-mail : humdai@daegu.ac.kr

배반포는 수정된 난자의 25% 이하로 저조하다(Stokes 등, 2005). 따라서 배반포의 체외 수정란 생산 기술의 향상은 체외 수정 및 체외 배양 방법의 조건 확립과 더불어 미성숙 난자의 체외 성숙과 관련된 요인들에 대한 정립도 필요할 것이다.

돼지 미성숙 난자의 체외 성숙은 Edwards (1965)에 의해 처음으로 성공한 이후 배지(Wang 등, 1997), 난포액(Yoshida 등, 1992), 각종 호르몬(Funahashi와 Day, 1993), 혈청과 단백질원(Abeydeera 등, 1998), 항산화제(Funahashi 등, 1997), 성장 인자(Illera 등, 1998) 등의 효과를 보고하였다. 특히 Kikuchi 등 (1999)은 유전자 활성화와 초기 분화가 일어나는 수정란의 착상 전 단계에는 미성숙 난자의 세포질 성숙이 중요하기 때문에 체외 성숙법의 개선을 통하여 배 발달율을 향상시킬 수 있었다.

수정란의 체외 배양에 있어서 혈청 단백질은 독소의 감소, 영양 제공, 성장 인자의 방출 및 난자의 유착과 경화를 방지하지만 기형 유발 인자와 발생 억제 인자의 방출과 같은 유해 작용이 있어서 체외 배양 연구의 초기부터 혈청 대체 물질에 대한 연구가 시도되었다(Trounson과 Gardner, 2000). Bavister(1981)가 PVP의 효과를 보고한 이후 여러 고분자 물질의 이용에 관한 연구가 보고되었으나 그 효과에 대해서는 의문이다(Ali와 Sirard, 2002; Biggers 등, 2000; Eckert 등, 1998).

따라서 본 연구는 돼지 미성숙 난자의 체외 성숙 배지에 첨가하는 PVP의 분자량, 농도 및 시간이 배 발달에 미치는 효과와 이를 기준으로 체외 성숙, 수정 및 배양용 배지에 PVP의 첨가가 배 발달과 배반포의 세포수에 미치는 효과를 검토하였다.

재료 및 방법

1. 배 지

난소로부터 미성숙 난자의 회수 및 세척용 배지는 10 mM HEPES(Sigma, H-6147)와 3 mg/ml bovine serum albumin(BSA, Sigma, A-9647)이 첨가된 HEPES buffered Tyrode's medium(TL-HEPES) 용액이다. 체외성숙 배지는 0.57 mM cysteine(Sigma, C-7352), 10% porcine follicular fluid(pFF), 2.5 mM β -mercaptoethanol, 10 ng/ml estradiol-17 β (Sigma,

E-2758), 10 ng/ml epidermal growth factor (Sigma, E-4127), 10 IU/ml human chorionic gonadotropin(hCG; Sigma, CG-10), 10 IU/ml pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG; Sigma, G-4877)을 첨가 또는 미첨가한 BSA-free North Carolina State University (NCSU) 23 용액이다. 체외 수정 배지는 1 mg/ml BSA(Sigma, A-6003), 2.5 mM caffeine sodium benzoate(Sigma, C-4144)가 첨가된 modified Tris-buffered medium(mTBM) 용액, 신선 정자 처리용 배지는 1 mg/ml BSA(Sigma, A-9647), 75 mg/ml penicillin G, 25 mg/ml gentamycin이 첨가된 Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS, Gibco BRL, Grand Island, NY) 용액, 체외 배양 배지는 3 mg/ml BSA (Sigma, A-6003)가 첨가된 Porcine Zygotes Medium (PZM 3) 용액을 각각 사용하였다. 그리고 실험에 제공되는 모든 배지의 미세 소적은 mineral oil(Sigma, M-8410)을 피복하여 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 최소한 4시간 이상 평형시킨 후 사용하였다.

2. Porcine Follicular Fluid(pFF)의 제조

pFF는 직경 5 mm이상의 난포로부터 회수하여 10분 동안 정치시켜 침전을 유도한 후, 4 $^{\circ}$ C에서 8,000 rpm, 30분간 원심분리한 상층액만을 0.45 μ m millipore filter(Millex-GV, Millipore, France)로 여과, 사용 전까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

3. 미성숙 난자의 회수

도축장에서 난소를 적출하여 75 μ g/ml penicillin G(Sigma, P-3032)가 첨가된 0.9% 생리 식염수(30 $^{\circ}$ C)가 들어있는 보온병에 담아 도축 후 2시간 내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 penicillin G가 첨가된 0.9% 생리 식염수로 3~4회 세척하여 난소의 혈액과 이물질을 제거한 후, 18G 주사침이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 직경 3~6 mm의 난포로부터 난포액을 흡입함으로써 미성숙 난자를 회수하였다. 회수한 미성숙 난자를 실체현미경(\times 80, Olympus, Japan)하에서 난구 세포의 부착이 조밀하며, 세포질이 균일한 것만을 선별하여 실험에 제공하였다.

4. 체외 성숙 및 PVP 첨가

선별된 미성숙 난자를 TL-HEPES 용액으로 2~3회 세척하였다. 체외 배양 배지가 500 μ l씩 분주된 4-well dish(NUNC, Roskilde, Denmark)에 50~60개의 미성숙 난포란을 넣고, 22시간 동안 배양시킨 후 PMSG와 hCG가 첨가되지 않은 체외 성숙 배지에서 다시 22시간 동안 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 배양함으로써 체외성숙을 유도하였다.

1) 분자량

체외 성숙 배지에 PVP 분자량에 따른 효과를 검토하기 위하여 MW 360,000(PVP-360; Sigma, H-0533)과 MW 40,000(PVP-40; Sigma, P-0930)을 각각 0.5% 첨가하였다.

2) 첨가 농도

체외 성숙 배지에 첨가하는 PVP의 농도의 효과를 검토하기 위하여 체외성숙용 배지에 PVP-40을 0, 0.3, 0.5, 1 및 3%를 각각 첨가하였다.

3) 첨가 시간

체외 성숙 배지에 0.5% PVP-40를 체외 성숙 0~22, 22~44, 0~44시간까지 각각 첨가하였다.

4) 첨가 방법

체외 성숙, 수정 및 체외 배양 배지에 0.5% PVP-40를 실험 목적에 따라 각각 또는 동시에 첨가하였다.

5. 체외 수정

1) 정자의 준비

본 실험에 사용된 정액은 돼지 인공수정 센터에서 제작된 희석 정액을 이용하였다. 정액은 D-PBS 용액을 동일 비율로 15 ml 원심분리관(Corning, 430052)에 넣고 2,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 상층액을 제거하는 과정을 3회 실시하여 세정하였다. 원심분리 후 하층부의 정자괴에 2 ml의 D-PBS 용액을 넣어 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 15분간 swim-up하였다. 운동성을 가진 부유된 정자를 회수하여 2,000 rpm에서 3분간 원심분리를 실시한 다음, 침전된 정자는 체외 수정 배지로 희석하였다. 정자 농도는 3×10^6 sperms/ml가 되도록 조절하였다.

2) 체외 수정

체외 성숙을 유도한 후 형태적으로 난구 세포가 확장된 미성숙 난자만을 선별하여 0.1% hyaluronidase(Sigma, H-3506)가 첨가된 TL-HEPES 용액에서 pipetting 함으로써 난구 세포를 제거한 후 체외수정 배지로 2~3회 세척하였다. 그리고 mineral oil로 피복된 48 μ l의 체외수정 배지에 15개씩의 미성숙 난자를 넣고, 상기에서 준비된 정자 2 μ l (최종 정자 농도 1.2×10^5 sperms/ml)를 첨가하여 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에 6시간 배양함으로써 체외 수정을 유도하였다.

6. 체외 배양

체외 수정된 수정란(배양 0일)을 체외배양 배지에서 pipetting 하여 정자를 포함한 불순물을 제거한 후 다시 체외배양 배지로 2~3회 세척하였다. 세척된 수정란은 미리 준비한 50 μ l의 체외 배양용 배지에 40~50개씩 넣어 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 체외 배양 2일째에 수정율을 관찰하였고, 배양 6일 및 7일째 배반포 발달율을 조사하였다.

7. 배반포의 이중 형광 염색

체외에서 각종 방법으로 생산된 배반포의 품질을 평가하기 위하여 세포수를 측정하였다. propidium iodid (Sigma, P-4170; PI)와 bisBenzimide(Sigma, B-2261)를 사용하여 이중 형광 염색을 실시하였다. 배반포의 투명대를 0.5% protease(Sigma, P-6911)용액으로 처리하여 용해시킨 후, 0.1% PVA가 첨가된 TL-HEPES 용액(TL-PVA)으로 3~5회 세척하였다. 그리고 anti-pig whole serum(Sigma, P-3164) 용액에 1시간 배양한 후, 10 μ l/ml propidium iodide와 10 μ l/ml bisBenzimide 가 1:1 첨가된 guinea pig complement(Sigma, S-1639)용액에 1시간 처리하여 염색하였다. 염색된 배반포를 3~5회 세척한 후, slide glass에 whole mount하여 형광현미경($\times 100 \sim 200$, IX71, Olympus)하에서 배반포의 내부세포괴(inner cell mass, ICM)와 영양 배엽 세포(trophoblast, TB)의 세포수를 각각 조사하였다.

8. 통계 처리

배 발달을 결과에 대한 통계학적 분석은 χ^2 -test를 이용하였고, 세포수는 SAS program을 이용하여 Mean±S.E.로 나타냈으며, Duncan's multiple range test를 이용하여 유의차($p<0.05$)를 검정하였다.

결 과

1. 분자량

돼지 미성숙 난자의 체외 성숙 배지에 첨가하는 PVP의 분자량이 배 발달에 미치는 효과를 검토한 결과는 Table 1과 같다. 수정을 및 배반포 발달율은 PVP-40군이 PVP-360군과 유사한 경향이었으나 배반포의 부화율은 PVP-40군이 PVP-360군에 비하여 유의하게 높았다($p<0.05$).

2. 첨가 농도

돼지 미성숙 난자의 체외 성숙 시 PVP-40 첨

가 농도가 배 발달에 미치는 효과를 검토한 결과는 Table 2와 같다. 수정율은 0, 0.3, 0.5, 1 및 3% 군이 63.3~71.6%, 배 발달율은 9.3~14.4%로서 차이가 없었다. 그러나 배반포의 부화율은 0.5% 군이 28.6%로서 가장 높았고 1%군과는 유의차가 인정되었다($p<0.05$).

3. 첨가 시간

돼지 미성숙 난자의 체외성숙 배지에 PVP-40 첨가시간이 배 발달에 미치는 효과를 검토한 결과는 Table 3과 같다. 수정율은 미첨가, 0~22, 22~44 및 0~44군에서 60.3~66.5%, 배반포 발달율은 7.5~13.5%로서 비슷하였다. 그러나 배반포의 부화율은 0~44군이 37.5%로서 다른 실험군의 10.5~14.3%보다 유의하게 높았다($p<0.05$).

4. 첨가 방법

Table 1. Effect of the addition of different molecular weight of polyvinylpyrrolidone on *in vitro* development of porcine oocytes

PVP	No. of oocytes	No. (%) of embryo developed to		
		≥ 2-cell	Blastocysts	Hatched blastocysts
10% FBS	809	513 (63.4)	90 (11.1)	23 (25.6) ^{ab}
PVP-40	809	494 (61.6)	73 (10.1)	22 (30.1) ^b
PVP-360	809	482 (59.6)	69 (9.8)	11 (15.9) ^a

^{a,b} Values with different superscripts in the same column are significantly different ($p<0.05$).

Table 2. Effect of the concentrations of polyvinylpyrrolidone in *in vitro* maturation medium on the development of porcine oocytes

Concentration (%)	No. of oocytes	No. (%) of embryo developed to		
		≥ 2-cell	Blastocysts	Hatched blastocysts
Control ¹⁾	215	136 (63.3)	21 (10.9)	4 (19.1) ^{ab}
0.3%	215	140 (65.1)	21 (10.6)	3 (14.3) ^{ab}
0.5%	215	145 (67.4)	28 (14.4)	8 (28.6) ^b
1%	215	154 (71.6)	19 (9.5)	1 (5.3) ^a
3%	215	145 (67.4)	18 (9.3)	3 (16.7) ^{ab}

¹⁾ Control : Without addition of polyvinylpyrrolidone.

^{a,b} Values with different superscripts in the same column are significantly different ($p<0.05$).

돼지 미성숙 난자의 체외 성숙, 수정 및 배양 배지에 PVP-40 첨가가 배 발달 및 배반포의 세포수에 미치는 효과를 검토한 결과는 Table 4 및 5와 같다. 수정율은 W-W/O-W군이 69.3%로서 가장 높았고, W-W-W, W-W-W/O, W/O-W-W/O 및 W/O-W/O-W 군과는 유의차가 인정되었다($p<0.05$). 배반포 발달율은 W-W/O-W 및 -W/O 군이 W-W-W와 -W/O, W/O-W-W와 -W/O 및 W/O-W/O-W 군의 것보다 유의하게 높았다($p<0.05$). 배반포의 부

화율도 W-W/O-W 및 -W/O 군의 것이 다른 군에 비하여 유의하게 높았다($p<0.05$).

배반포의 TB 및 총 세포수는 전 군에서 유사한 경향이였다. 그러나 ICM 수는 W/O-W/O-W 군이 평균 7.4개로서 가장 많았고 W-W-W와 -W/O, W/O-W-W와 -W/O 및 W/O-W/O-W/O 군의 것과는 유의차가 인정되었다($p<0.05$).

고 찰

Table 3. Effect of duration of polyvinylpyrrolidone addition in *in vitro* maturation medium on the development of porcine oocytes

Duration (hr)	No. of oocytes	No. (%) of embryo developed to		
		≥ 2-cell	Blastocyst	Hatched blastocysts
Control ¹⁾	194	117 (60.3)	19 (10.5)	2 (10.5) ^a
0~22	199	125 (62.8)	15 (7.5)	2 (13.3) ^a
22~44	194	117 (60.3)	14 (7.8)	2 (14.3) ^a
0~44	194	129 (66.5)	24 (13.5)	9 (37.5) ^b

¹⁾ Control : Without addition of 0.5% polyvinylpyrrolidone.

^{a,b} Values with different superscripts in the same column are significantly different ($p<0.05$).

Table 4. Effect of addition of polyvinylpyrrolidone in *in vitro* maturation, fertilization and culture media on the development of porcine oocytes

<i>In vitro</i>			No of oocytes	No. (%) of embryo developed to		
Maturation	Fertilization	Culture		≥ 2-cell	Blastocysts	Hatched blastocysts
W ¹⁾	W	W	424	261 (61.6) ^a	31(8.0) ^a	3(9.7) ^{ab}
		W/O	425	265 (62.4) ^a	33(8.1) ^a	0(0.0) ^a
	W/O	W	424	294 (69.3) ^b	50(12.6) ^b	15(30.3) ^c
		W/O	424	268 (63.2) ^{ab}	56(14.0) ^b	21(37.5) ^c
W/O ²⁾	W	W	425	270 (63.5) ^{ab}	26(6.8) ^a	2(7.7) ^{ab}
		W/O	425	255 (60.0) ^a	30(7.5) ^a	1(3.3) ^{ab}
	W/O	W	425	260 (61.2) ^a	31(7.7) ^a	3(9.7) ^{ab}
		W/O	425	279 (65.6) ^{ab}	41(10.4) ^{ab}	5(12.2) ^b

¹⁾ W: With 0.5% PVP.

²⁾ W/O: Without 0.5% PVP.

^{a,b,c} Values with different superscripts in the same column are significantly different ($p<0.05$).

Table 5. Effect of addition of polyvinylpyrrolidone in *in vitro* maturation, fertilization and culture media on the number of inner cell mass, trophoblast and total cells of porcine blastocysts

Maturation	<i>In vitro</i>		No. of blastocysts	No. of cells		
	Fertilization	Culture		Total	Inner cell mass	Trophoblast
W ¹⁾	W	W	5	21.0±2.7	2.1±0.3 ^a	19.0±2.5
		W/O	5	22.9±1.6	2.1±0.3 ^a	20.7±1.4
	W/O	W	5	30.9±6.5	5.9±2.9 ^{ab}	25.0±4.2
		W/O	5	31.9±5.2	4.6±1.2 ^{ab}	27.3±4.1
W/O ²⁾	W	W	5	20.1±3.6	1.9±0.3 ^a	18.3±3.4
		W/O	5	22.6±2.0	2.0±0.3 ^a	20.6±1.8
	W/O	W	5	25.0±3.1	7.4±1.6 ^b	17.6±2.4
		W/O	5	29.0±3.3	2.7±0.5 ^a	26.3±3.2

¹⁾ W: With 0.5% PVP.

²⁾ W/o: Without 0.5% PVP.

^{a,b} Values with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

배의 체외 배양용 배지에는 혈청이나 알부민과 같은 고분자 물질들이 첨가되어 다양한 생리적 또는 물리적 작용을 한다. 생리적 기능에는 성장 인자 또는 중금속 물질과 결합하는 작용이 있고, 물리적 작용에는 유리 또는 조직 배양물에 부착 예방작용이 있다(Gardner 등, 2004). 지금까지 혈청이 배 배양에 이용되었으나 에너지 대사, 미토콘드리아의 구조적 손상 및 지질의 비정상 침착으로 수정란에 유해하게 작용한다(Trounson과 Gardner, 2000). 또한 체내에서 포유류의 수정란은 발생 동안 혈청에 노출되지 않는다. Bavister(1981)가 혈청 및 알부민을 대체하기 위한 합성 고분자 물질(PVA)의 가능성을 보고하였으나 수정란의 생리와 대사의 유지에 부적합하였고, 특히 동결 수정란의 생존율이 낮았고(Eckert 등, 1998) 마우스 태아에서는 선천적 이상이 보고되었다(Gardner 등, 1999). 호르몬이 첨가된 체외 성숙 배지에 PVP 첨가는 수정 후 배 발달율이 혈청과 유사하였고(Sacki 등, 1991), 과립막 세포의 존재하에서도 PVP는 배 발달을 유지하였다(Lonergan 등, 1999). 한편 PVP-40 또는 미첨가 SOF 배지에서 소 미성숙 난자의 핵성숙이 정상적으로 유도되었고, 배반포 발달율이 BSA 또는 FCS 첨가된 배지에서 성숙된 미성숙 난자에

비하여 높았고, 특히 PVP-40이 PVP-360에 비하여 핵성숙율과 배 발달율이 유의하게 높았다(Ali와 Sirard, 2002). 본 연구에서는(Table 1) 돼지 미성숙 난자의 체외 성숙 배지에 혈청, PVP-40 및 PVP-360의 첨가가 수정율과 배반포 발달율에는 차이가 없었으나, 배반포의 부화율은 PVP-40이 PVP-360보다 유의하게 높았다($p < 0.05$). 따라서 돼지 미성숙 난자의 체외 성숙에서도 PVP가 혈청을 대체할 수 있었으며, 특히 PVP-40이 효과적이었다.

소의 미성숙 난자의 체외 성숙 배지에 0.3% PVP 첨가는 30% 난포액 첨가와는 배 발달율이 비슷하였으나, 60% 난포액 첨가보다는 높았다(Kim 등, 1996). 또한 고농도인 4% PVP 첨가가 저농도의 PVP 첨가보다 미성숙 난자와 과립막 세포 복합체의 성장과 발달에 효과적이었다, 고농도의 PVP 첨가는 이후 배 발달을 저해하였다(Hirao 등, 2004). 본 연구에서도 0.5%군의 배반포 발달율이 높은 경향이었고, 특히 배반포의 부화율은 유의하게 높았다($p < 0.05$). 따라서 이후 실험에는 Table 1 및 2의 결과를 토대로 PVP-40을 0.5% 첨가하였다.

돼지 미성숙 난자는 체외에서 43~46시간 동안 성숙 배양함으로써 제 2 감수 분열 중기에 도달한다(Edwards, 1965). PMSG, hCG 및 estradiol-17 β

를 첨가한 체외 성숙 배지에서 20시간 배양한 후 상기 호르몬이 미첨가된 배지에서 20시간의 추가 배양이 체외 성숙 전 기간 동안 호르몬을 첨가한 것 보다 정자 침투율 및 응성 전핵 형성율이 높았다(Funahashi와 Day, 1993). 본 연구에서는 체외 성숙 과정에서 PVP의 첨가 시간에 따른 배 발달율은 비슷한 경향이었으나, 배반포의 부화율은 PVP가 0~44시간째 첨가된 체외 성숙 배지에서 유래한 것이 유의하게 높았다($p<0.05$).

체외 성숙 배지에 PVP의 분자량 및 첨가 농도와 시간을 검토한 결과 PVP-40을 0.5% 농도로 44시간 동안 첨가하는 것이 효과적이었다. 상기 결과를 바탕으로 돼지 수정란의 체외 생산 과정에 PVP 첨가 효과를 검토하였다. 이전의 보고에서는 체외 성숙 및 배양 단계 각각에 대한 PVP의 효과는 보고가 있으나, 종합적으로 검토한 보고는 없었다. 본 연구에서 W-W/O-W 또는 -W/O 체계가 다른 체계에 비하여 배반포 발달율과 배반포의 부화율에 효과적이었다. 그러나 PVP 첨가에 따른 배반포의 세포수를 검토한 결과에서는 체외 성숙·수정·배양 배지에 PVP 첨가에 따른 총세포 및 TB 수는 유사한 경향이었으나, ICM 세포수는 W/O-W/O-W 군이 유의하게 높았다($p<0.05$). 한편 종류는 다르지만 고분자물질인 PVA를 체외 배양에 이용하였을 때 동결성 및 이식후 태아의 이상이 유발되었다는 보고도 있다(Gardner 등, 1999; Eckert 등, 1998).

따라서 본 연구의 결과에서 돼지 난포란의 체외 생산에서 배 발생 측면에서의 PVP 첨가의 효과가 인정되었으나, PVP가 혈청의 역할을 대체하기 위해서는 동결성 및 산자의 이상과 같은 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

적 요

본 연구는 고품질의 돼지 체외 수정란을 생산하기 위하여 체외 성숙 배지에 첨가하는 polyvinylpyrrolidone(PVP)의 분자량, 첨가 농도 및 시간(실험 1)과 체외 성숙·수정·배양 단계에서 PVP의 첨가(실험 2)가 배 발생과 세포수에 미치는 효과를 검토하였다. 돼지 미성숙 난자의 체외 성숙은 NCSU 23 용액, 체외 수정은 mTBM 용액, 체외 배양은

PZM 3 용액을 이용하였다. 체외 성숙용 배지에서 PVP의 분자량, 농도 및 첨가 시간에 따른 수정율과 배반포 발달율은 차이가 없었다. 그러나 배반포의 부화율은 분자량 40,000(30.1%), 0.5%(28.6%) 및 0~44시간(37.5%) 첨가군이 다른 시험군에 비하여 유의하게 높았다($p<0.05$). 분자량 40,000 0.5% PVP를 체외성숙, 수정 및 배양 배지에 각각 첨가(W) 또는 미첨가(W/O)한 결과, 수정율은 체외성숙·수정·배양에서 W-W/O-W 군이 69.3%, 배반포 발달율과 부화율은 W-W/O-W 및 W-W/O-W/O 군이 각각 12.6과 30.0% 및 14.0과 37.5%로서 다른 군에 비하여 유의하게 높았다($p<0.05$). 총 세포수와 Trophoblast 수는 처리군 간에 유사한 경향이었으나, Inner cell mass 수는 W/O-W/O-W 군이 평균 7.4개로서 가장 높았다($p<0.05$).

참고문헌

- Abeysdeera LR. 2001. *In vitro* fertilization and embryo development in the pig. J. Reprod. Fertil., 58:159-173.
- Abeysdeera LR and Day BN. 1997. Fertilization and sub-sequent development *in vitro* of pig oocytes inseminated in a modified Tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. Biol. Reprod., 57:729-734.
- Abeysdeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Murphy CN, Prather RS and Day BN. 1998. Maturation of *in vitro* of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. Biol. Reprod., 58: 1316-1320.
- Ali A and Sirard MA. 2002. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during *in vitro* maturation. Biol. Reprod., 66:901-905.
- Bavister BD. 1981. Substitution of a synthetic polymer for protein in a mammalian gamete culture system. J. Exp. Zool., 217:45-51.
- Biggers JD, McGinnis LK and Raffin M. 2000. Amino acids and preimplantation development of the

- mouse in protein-free potassium simplex optimized medium. *Biol. Reprod.*, 63:281-293.
- Eckert J, Pugh PA, Thompson JG, Nieman H and Tervit HR. 1998. Exogenous protein affects developmental competence and metabolic activity of bovine pre-implantation embryos *in vitro*. *Reprod. Fertil. Dev.*, 10:327-332.
- Edwards RG. 1965. Maturation of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 208:349-352.
- Funahashi H, Cantley C and Day BN. 1997. Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyryl cyclic AMP improves developmental competence following *in vitro* fertilization. *Biol. Reprod.*, 47:679-686.
- Funahashi H and Day BN. 1993. Effects of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 98:179-185.
- Gardner DK, Lane M and Watson AJ. 2004. A laboratory guide to the mammalian embryo. Oxford University press, New York, pp 41-61.
- Gardner DK, Rodriguez-Martinez H and Lane M. 1999. Fetal development after transfer is increased by replacing protein with the glycosaminoglycan hyaluronan for mouse embryo culture and transfer. *Hum. Reprod.*, 14:2575-2580.
- Hirao Y, Itoh T, Shimizu M, Iga K, Aoyagi K, Kobayashi M, Kacchi M, Hoshi H and Takenouchi N. 2004. *In vitro* growth and development of bovine oocyte-granulosa cell complexes on the flat substratum: Effects of high polyvinylpyrrolidone concentration in culture medium. *Biol. Reprod.*, 70:83-91.
- Illera MJ, Loren PL, Illera JC and Petters RM. 1998. Developmental competence of immature pig oocytes under the influence of IVM-IVF processes. *Int. J. Dev. Biol.*, 42:1169-1172.
- Kikuchi K, Nagai T, Ding J, Yamauchi N, Noguchi J and Izaike Y. 1999. Cytoplasmic maturation for activation of pig follicular oocytes cultured and arrested at metaphase I. *J. Reprod. Fertil.*, 116:143-156.
- Kim KS, Mitsumizo N, Fujita K and Utsumi K. 1996. The effects of follicular fluid on *in vitro* maturation, oocyte fertilization and development of bovine embryos. *Theriogenology*, 45:787-799.
- Matas C, Coy P, Romar R, Marco M, Gadea J and Ruiz S. 2003. Effect of sperm preparation method on *in vitro* fertilization in pigs. *Reproduction*, 125:133-141.
- Motlik J, Grozet N and Fulka J. 1984. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J. Reprod. Fertil.*, 72:323-328.
- Lonergan P, O'Kearney-Flynn M and Boland MP. 1999. Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. *Theriogenology*, 51:1565-1576.
- Sacki K, Hoshi M, Leibfried-Rutledge ML and First NL. 1991. *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes matured in serum free medium. *Biol. Reprod.*, 44:256-260.
- Stokes PJ, Abeydeera LR and Leese HJ. 2005. Development of porcine embryos *in vivo* and *in vitro*; evidence for embryo 'cross talk' *in vitro*. *Dev. Biol.*, 284:62-71.
- Trounson AO and Gardner DK. 2000. Handbook of *in vitro* fertilization. 2nd ed., CRC Press New York, pp 206-264.
- Yoshida M, Ishizaki Y, Kawagish H, Bamba K and Kojima Y. 1992. Effect of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes *in vitro* and on their subsequent fertilizing and developmental capacity *in vitro*. *Reprod. Fertil.*, 95:481-488.
- Wang WH, Abeydeera LR, Cantley TC and Day BN. 1997. Effect of oocyte maturation media on development of pig embryos or produced by *in vitro* fertilization. *J. Reprod. Fertil.*, 111:101-108.

(접수일: 2006. 6. 7 / 채택일: 2006. 6. 20)