

韓牛에 있어서 卵胞卵의 體外受精에 影響을 미치는 要因에 關한 研究

徐泰光·朴恒均
慶北大學校 農科大學

Study on Factors Affecting *in vitro* Fertilization of Follicular Oocytes in Korean Native Cattle

Suh, T.K. and H.K. Park
College of Agriculture, Kyungpook National University

SUMMARY

This study was carried out to investigate the factors affecting fertilization *in vitro* of follicular oocytes with frozen-thawed spermatozoa in Korean Native Cattle.

The bovine ovaries were obtained at a slaughter house and the follicular oocytes were recovered by aspirating the follicular fluid from the visible follicles of 3~6mm. The bovine oocytes were matured *in vitro* for 20~24 hours in TCM-199 containing FCS and hormones. The matured oocytes were fertilized *in vitro* using Percoll-separated frozen-thawed spermatozoa in BO solution. The effects of dilution and fertilization media, capacitating method, concentration of inseminated sperm and time after insemination of fertilization, were observed.

The results obtained are summarized as follows :

1. The fertilization rate of frozen-thawed sperm inseminated in BO solution with caffeine and heparin together(56.4%) was higher than that of sperm inseminated in BO solution with either caffeine(10.5%) or heparin(8.9%) and without both caffeine and heparin(0%) ($P<0.05$).
2. The fertilization rate(56.3%) of frozen-thawed sperm inseminated in BO solution with both caffeine and heparin without preincubation was higher than that of sperm preincubated(2.9%) ($P<0.05$).
3. The fertilization with high concentration of frozen-thawed sperm($1.4\sim 1.8\times 10^7$ cells/ml) in BO solution containing caffeine and heparin resulted in higher fertilization rate, 76.7%, than the low concentration of sperm($0.8\sim 1.0\times 10^7$ cells/ml), 32.7% ($P<0.01$).
4. When the oocytes were inseminated with frozen-thawed sperm in BO solution containing caffeine and heparin without preincubation, fertilization rate increased by time and the rates were 5.9, 46.0 and 59.4% at 8, 16 and 24 hours, respectively.

I. 緒 論

哺乳動物의 體外受精은 1951년 Austin 과 Chang 이 각각 精子의 受精能獲得 現象을 관찰한 이래 Thibault 등(1954)에 의해 最初로 家兎에서 體外受精에 成功하

였으며, 소에 있어서의 體外受精에 관한 研究는 1965년 Edwards에 의해 소 卵胞卵의 體外成熟이 報告된 이후 이 分野에 관한 많은 研究가 수행되었다.

體外受精을 위한 牛 精子의 受精能獲得 誘起는, Iritani와 Niwa(1977) 및 Iritani 등(1984)이 이용하

m-KRB 液에서 前培養, Brackett 등(1982)의 high ionic strength 液에서의 前培養, Byrd(1981), Aoyagi 등(1988) 및 金과 朴(1988)의 calcium ionophore 의 添加, Ohgoda 등(1988)의 caffeine 添加, Parrish 등(1985^{a,b})의 heparin 의 添加, Niwa 와 Ohgoda (1988) 및 Park 등(1989)의 caffeine 과 heparin 의 併用添加에 의한 受精能獲得 誘起 등 많은 방법이 報告되었다.

體外受精에 이용하는 凍結融解精子는 射出精子 또는 精巢上體 精子의 경우와는 달리 生存期間이 짧기 때문에 오랜 시간 前培養치리를 할 수 없으므로 caffeine 또는 heparin 등의 添加에 의해 짧은 시간내에 受精能獲得을 誘起시켜야 한다(Parrish 등, 1986). Heparin 은 尖體反應을 誘起시키는 가장 유력한 glycosaminoglycan(GAG)으로 알려져 있으며(Handrow 등, 1982), Parrish 등(1986)은 凍結融解精자를 heparin 으로 前培養하여 受精했을 때 對照區에 비해 受精率을 향상을 報告하였다.

Caffeine 은 소 精子의 活力을 향상시킨다고 알려져 있으며(Garvers 등, 1971), Ohgoda 등(1988)은 凍結融解精자를 caffeine 처리함으로써 精子侵入率이 향상되었다고 報告하였다. Niwa 와 Ohgoda(1988)는 heparin 과 caffeine 으로 併用處理하여 受精했을 때 heparin 의 單獨處理에 비해 精子侵入率이 향상되었으며, 5mM caffeine 과 併用處理시 heparin 의 농도는 10 μ g/ml 가 최적이라고 하였다. Park 등(1989)은 精자를 heparin 과 caffeine 으로 併用處理하여 受精했을 때 媒精後 3시간째부터 精子侵入이 일어났으며, 精子侵入率은 媒精後 시간이 경과함에 따라 증가하였고 受精能獲得의 誘起에 heparin 과 caffeine 이 상승작용을 한다고 報告하였다. 그러나 凍結融解精자를 이용한 韓牛 卵胞卵의 體外受精에 영향을 미치는 要因에 대한 보고는 적은 實情이다.

따라서 본 연구는 韓牛 卵胞卵의 體外受精技術의 確立을 위한 基礎研究로서 凍結融解精자를 이용한 體外受精에 影響을 미치는 要因에 관한 基礎資料를 얻고자 實施하였다.

II. 材料 및 方法

1. 卵胞卵의 回收

本 試驗에 공시된 卵胞卵은 屠畜場에서 도살되는 정

상生殖器를 가진 韓牛 암소의 卵巢卵胞(3~6mm)로부터 回收하였다. 18G 주사침이 부착된 주사기를 이용하여 卵胞液의 흡입에 의해 회수된 卵胞卵은 사-레에 분주하여 5~10분간 정치한 다음 實體顯微鏡(Olympus X-Tr, Olympus, Japan)下에서 上層液을 일부 除去한 후 卵胞卵을 回收하였다.

2. 培養液

卵胞卵의 體外成熟을 위한 기본培養液은 10% FCS (GIBCO, USA), 0.02 AU/ml FSH(Toshiba Pharm. Co., Japan), 10 μ g/ml LH(Sigma, USA), 1 μ g/ml estradiol-17 β (Sigma, USA), 11 μ g/ml sodium pyruvate(Sigma, USA), 100 IU/ml penicillin G(Sigma, USA) 및 50 μ g/ml streptomycin sulfate(Sigma, USA)가 添加된 TCM-199(Earle's salt, Sigma, USA)를 이용하였다.

精子處理를 위한 基本培養液은 glucose를 첨가하지 않은 BO液(Brackett 와 Oliphant, 1975)를 이용하였으며, 사용전 0.2 μ m millipore filter(Gelman Sci., USA)로 濾過, 滅菌하였다. 제조된 배양액은 38.5 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培養器에서 8~12시간 CO₂평형을 시킨 후 사용하였다.

3. 卵자의 準備

回收된 卵胞卵은 200 μ l 培養液 小滴에 넣고 50~80배의 實體顯微鏡下에서 卵丘細胞가 치밀하고 두텁게 부착된 것을 선별하여 培養液으로 2~3회 洗滌후 시험에 이용하였다.

卵胞卵은 paraffin oil로 피복한 200 μ l의 培養液 小滴 내에 넣고 CO₂ 培養器내에서 20~24시간 成熟 培養하였다.

4. 精子의 準備

韓牛 凍結精液은 36~37 $^{\circ}$ C의 恒溫水槽에 약 20초간 浸漬하여 融解한 후, 각 2ml의 30% 및 40% Percoll(Sigma, USA) 이중층에 넣고 500g, 10분간 원심분리후 上層液은 제거하고 시험관 하층에 남은 活力이 좋은 精자를 이용하였다.

前培養에 의한 受精能獲得은 Percoll에 의해 분리된 下層의 精子塊를 각각 3mg/ml 및 2.5mM BSA와 caffeine이 첨가된 BO液으로 희석후, 38.5 $^{\circ}$ C, 5% CO₂培養器에서 3시간 동안 前培養하여 受精能獲得을 誘起하였다(Goto 등, 1988).

Caffeine, heparin의 併用處理에 의한 受精能獲得은 精子를 10mM caffeine이 첨가된 BO液에 부여시킨 후, 20mg/ml BSA 및 20 μ g/ml heparin이 첨가된 BO液에 同量으로 희석하여 受精能獲得을 誘起하였다(Niwa와 Ohgoda, 1988).

5. 體外受精

體外에서 20~24시간 배양으로 成熟이 이루어진 卵胞卵은 BO液으로 2회 洗滌後 20mg/ml BSA 및 20 μ g/ml heparin이 첨가된 100 μ l 受精用 BO液 小滴에 넣고 10mM caffeine으로 희석된 精子를 1:1 同量으로 주입하여 媒精하였으며 前培養에 의해 受精能獲得이 유지된 精子는 受精用 무첨가 BO液에 成熟된 卵胞卵을 넣은 후 동일한 방법으로 媒精하였다.

精子는 1.4~1.8 $\times 10^7$ cells/ml 농도로 媒精하여 38.5 $^{\circ}$ C, 5% CO₂培養器에서 배양하였으며, 媒精濃도에 따른 受精率의 비교시험에서는 0.8~1.0 $\times 10^7$ cells/ml 농도로 媒精하였다.

6. 體外受精의 判定

體外成熟과 受精의 判定은 媒精後 24시간에 일부의 卵子를 acetic alcohol(1:3)로 3일간 固定한 후 1% aceto-orcein(Merck, Germany)으로 染色하여 核成熟度 및 受精與否를 조사하거나, 媒精後 8, 16 및 24시간 卵子를 固定, 染色하여 媒精후의 경과시간에 따른 受精率을 조사하였으며, 卵子내에 침입한 精子頭部의 膨化, 前核形成 및 多精子侵入을 受精으로 判定하였다(金과 박, 1988; 宋, 1989).

III. 結果 및 考察

1. 精子의 稀釋液 및 受精培養液

PercoII에 의해 遠心分離한 下層의 精子를 BO액 또는 5mM caffeine이 첨가된 BO액으로 稀釋後 BO액 또는 10 μ g/ml heparin이 첨가된 BO액에서 1.4 $\times 10^7$ cells/ml 농도로, 체외에서 20시간 배양한 다음 成熟이 誘起된 卵胞卵과 22시간 배양했을 때의 體外受精率은 Table I과 같다.

Heparin이 첨가된 受精用 BO액에서 caffeine이 첨가된 BO액 및 caffeine이 첨가되지 않은 BO액으로 희석한 精子를 成熟된 卵胞卵과 體外受精했을 때의 受精率은 각각 56.4% 및 8.9%였으며, 無添加 受精用 BO액에서 caffeine이 첨가 또는 첨가되지 않은 BO액으로 희석된 精子와 體外受精했을 때 受精率은 각각 10.5% 및 0%로서, caffeine이 첨가된 BO액으로 희석後 heparin이 첨가된 BO액에서 수정했을 때의 受精率이 유의적으로 높았다($P < 0.05$).

생체내 卵胞液과 子宮液에 존재하는 heparin과 hyaluronic acid를 함유하는 glycosaminoglycan (GAG)는 尖體反應을 촉진시키며 강력한 受精能獲得작용을 가지고 있는 바(Handrow 등, 1982), Parrish 등(1985^b)은 수정 Tyrode 배양액으로 射出精子를 세척하여 10 μ g/ml의 heparin액으로 처리했을 때 수정율은 67%, heparin添加 또는 無添加로 精子를 6시간 前培養했을 때 각각 20% 및 76%의 수정율을 얻었다고 보고하였다.

또한, Parrish 등(1986)은 凍結精子를 融解後 10 μ g/ml heparin액으로 15분간 처리하거나 또는 heparin 처리를 하지 않았을 때 수정율은 각각 79%와 40%이며 多精子 侵入率은 각각 20%와 10%였다고 하

Table 1. Effect of media of dilution for spermatozoa and fertilization on *in vitro* fertilization*

Dilution media of spermatozoa	Fertilization media	No. of oocytes	No. of oocytes at				Fertilization rate (%)**
			MII	Penetrated	Pronucleus	Polyspermy	
Control		60	48	—	—	—	0 ^a
Caffeine	heparin	110	48	22	38	2	56.4 ^c
—	heparin	45	41	4	—	—	8.9 ^b
Caffeine	—	76	68	4	4	—	10.5 ^b

*Follicular oocytes were cultured for 20 hours and examined at 22 hours after insemination at concentration of 1.4 $\times 10^7$ cells/ml in BO solution. Caffeine and heparin were added at final concentration of 5mM and 10 μ g/ml, respectively.

**Fertilized means ova with penetrated sperm, pronucleus and polyspermy.

a,b,c. Percentage followed by different letters within the same column differ significantly ($P < 0.05$).

었다.

한편 Parrish 등(1989)은 heparin 처리에 의한 受精能獲得 誘起時 精子細胞內의 pH의 알칼리화가 일어나는데 이는 정자의 Ca^{2+} 흡수와 관련되며, 精子細胞內 pH 변화와 細胞內 Ca^{2+} 의 증가는 受精能獲得 誘起동안 정자의 plasma 또는 尖體膜을 변화시키는 기능을 갖는 酵素系를 活性化함으로서 受精能獲得 誘起에 중요한 역할을 한다고 하였다.

本 研究 結果에서는 heparin 첨가에 의한 수정율은 8.9%로 Fukui(1989), Sirard 등(1988)의 67.1% 및 73%에 비해 낮은 성적이었는데, 이는 heparin 濃度, 受精能獲得 處理方法 등의 差異에 기인된 것으로 생각된다. Caffeine은 소 精子의 活力을 향상시킨다고 알려져 있으며(Garvers 등, 1971), Critser 등(1984)은 射出精子를 1mM caffeine으로 1~2시간 前培養했을 때 수정율은 62%로서 대조구의 73%와 차이가 없다고 하였으며, Ohgoda 등(1988)은 凍結融解精子를 caffeine으로 처리함으로써 精子侵入率이 향상되었으나 寸소개체간에 큰 변이가 있다고 보고하였다.

Niwa와 Ohgoda(1988)는 凍結融解精子를 10mM caffeine 첨가된 BO액으로 희석한 후 이와 同量인 20 μ g/ml heparin이 첨가된 BO액에 수정함으로써 35~96%이 수정율을 얻었으나 heparin만 첨가했을 때는 17~64%의 수정율을 얻었다고 하였으며, 體外受精率은 정자를 제공하는 寸소 個體에 따라 변이가 있다고 보고하였다.

본 연구에서 凍結融解精子를 caffeine과 heparin 또는 heparin 처리하여 얻은 수정율은 56.4% 및 8.9%로서 Niwa와 Ohgoda(1988)의 결과에 비해 수정율이 낮은 것은 寸소 개체의 차이에 의한 것으로 생각된다.

Parrish 등(1985^b, 1986)은 heparin 處理效果는 정

자에 대한 직접적인 작용에 의한다고 하였으나, Niwa와 Ohgoda(1988)는 caffeine이 첨가된 수정배지에서 수정은 heparin 농도에 영향을 받으며 10 μ g/ml heparin 처리가 最適濃度라고 하였고, caffeine과 heparin의 수정에 대한 상승효과는 受精能獲得과 尖體反應 또는 수정에 있어서 이들의 相互의 作用에 기인하는 것 같으나 개체에 따른 受精率 增加의 일정한 傾向이 없기 때문에 이 上昇效果의 기전을 명확히 밝히기는 어렵다고 보고하였다.

그러나, 본 연구결과에서 보는 바와 같이 凍結融解精子의 體外受精率은 caffeine과 heparin을 併用添加하는 것이 56.4%, caffeine 또는 heparin을 單獨添加했을 때는 각각 10.5%와 8.9%로서 單獨添加보다 併用하여 添加하는 것이 수정율을 증가시킬 수 있음이 판단되었다.

2. 精子의 受精能獲得 方法

凍結精子를 融解후 caffeine을 첨가한 BO액에서 前培養하거나 또는 caffeine과 heparin을 첨가한 BO액에서 前培養없이 體外受精시켰을 때 受精率은 Table 2와 같다.

Percoll에 의해 遠心分離하여 얻은 下層精子를 2.5 mM caffeine이 첨가된 BO액으로 3시간 前培養 또는 10mM caffeine이 첨가된 BO액으로 희석후 同量의 20 μ g/ml heparin이 첨가된 BO액에서 前培養없이 體外受精시켰을 때 受精率은 각각 2.9% 및 56.3%로서 caffeine으로 희석후 heparin이 첨가된 BO액에서 수정했을 때의 受精率이 유의적으로 높았다($P < 0.05$).

Critser 등(1984)은 凍結精子를 融解후 1 mM caffeine을 첨가한 수정 Tyrode액에 1~2시간 前培養하여 62%의 수정율을 얻었고, Aoyagi 등(1988)은

Table 2. Effect of caffeine and heparin added to BO solution on spermatozoa capacitation*

Capacitation method	No. of oocytes	No. of oocytes at			Fertilization rate (%)
		MII	Pronucleus	Polyspermy	
Control	60	48	0	0	0 ^a
Caffeine	68	34	2	0	2.9 ^a
Caffeine+heparin	64	10	30	6	56.3 ^b

*Oocytes were cultured for 20 hours and examined at 24 hours after insemination at concentration of 1.4×10^7 cells/ml.

^{a,b} Percentage followed by different letters within the same column differ significantly ($P < 0.05$).

10mM caffeine을 첨가한 BO액에서 5시간 前培養하여 53.3%의 수정율과 14.3%의 多精子侵入率을 보고하였다. 본 연구 결과는 Critser 등(1984), Aoyagi 등(1988)의 결과에 비해 낮은 편이었는데 이는 caffeine의 添加濃度, 前培養시의 精子濃도와 前培養時間 또는 숙소의 個體差에 기인한 것으로 생각된다.

Niwa와 Ohgoda(1988)는 5mM caffeine과 10 μ g/ml heparin을 첨가한 BO액에서 受精能獲得을 誘起한 정자와 수정했을 때 受精率과 前核形成率이 각각 48% 및 64%라고 하였고, Park 등(1989)은 同量の caffeine과 heparin이 함유된 BO액에서 凍結精자를 5~5.5시간 前培養하거나 또는 바로 수정하였을 때 受精率은 각각 100% 및 94%였다고 보고하였다.

그러나, 본 研究에서는 前培養에 의한 수정이 caffeine과 heparin을 첨가하여 바로 體外受精한 것에 비해 수정후 정자의 活力과 生存性이 급격히 저하되었을 뿐만 아니라 受精率도 낮았는데 이는 凍結融解精자의 前培養시 정자의 生存期間이 짧기 때문에 受精率이 저하된다고 보고한 Parrish 등(1985^b)의 보고와 일치하나, 前培養한 정자가 受精率을 증가시켰다는 Park 등(1989)의 보고와는 일치하지 않는 결과였다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 體外受精을 위한 韓牛의 精자는 caffeine을 첨가한 BO액으로 회석후 heparin을 첨가한 BO액에서 前培養없이 바로 體外受精하는 것이 受精率을 向上시키는데 도움이 되는 것으로 생각된다.

3. 受精能獲得 精자의 濃度

Percoll에 의해 分離한 精자를 5mM caffeine과 10 μ g/ml의 heparin이 添加된 BO액에서 前培養없이 精子濃도를 달리하여 體外受精시켰을 때의 受精率은 Table 3과 같다.

精자를 0.8~1 \times 10⁷cells/ml 또는 1.4~1.8 \times 10⁷ cells/ml 농도로 媒精후 24시간때의 受精率은 각각 32.

7% 및 76.7%로서 精子濃도를 1.4~1.8 \times 10⁷cells/ml로 수정시켰을 때 受精率은 유의적으로 높았다 (P<.01). 이러한 結果는 정자를 caffeine과 heparin이 첨가된 BO액에서 2.5~5 \times 10⁶cells/ml 농도로 體外受精시켰을 때 媒精후 7시간 및 22시간 째의 受精率은 각각 86% 및 94%였다고 한 Park 등(1989)의 결과에 비해 다소 낮았는데 이는 受精한 精子濃도가 다른 연구자에 비해 다소 높았지만 精子濃도를 달리한 처리구간에 受精率의 차이가 난 결과에 비추어 볼 때 精자를 제공한 숙소의 個體差 또는 品種에 의한 差異에 기인된 것으로 생각된다.

Parrish 등(1986)은 swim up에 의해 分離된 정자를 15분간 1 μ g/ml heparin액으로 처리한 후 0.75 \times 10⁶cells/ml, Sirard 등(1988)은 1 \times 10⁶cells/ml, Fukui(1986)는 1.5 \times 10⁶cells/ml, Fukui와 Ono(1986)는 1 \times 10⁶cells/ml의 농도로 각각 體外受精했을 때 受精率은 각각 79, 73, 67.1 및 56.6%로서 類似한 條件과 濃度에서도 報告者에 따라 相異한 受精率을 보고하였는데 이는 受精培地, heparin의 含量 및 受精 判定時間의 差異와 숙소의 個體差에 기인된 것으로 생각된다.

한편, Ling과 Lu(1990)는 0.64 \times 10⁶, 1.6 \times 10⁶, 3.2 \times 10⁶ 및 4.8 \times 10⁶cells/ml로 精子濃도를 달리하여 體外受精시켰을 때 수정후의 分割率은 각각 85.0, 82.8, 81.6 및 82.3%로 차이가 없었으나 胚盤胞期로의 발달은 각각 35.4, 28.4, 24.3 및 29.3%로서 0.64 \times 10⁶cells/ml의 精子濃도로 수정했을 때 胚 發生率이가장 높았으나 精子濃도가 1.6 \times 10⁶cells/ml 이상이면 胚盤胞로의 發生率이 감소한다고 보고하였다.

본 연구에서의 精子濃도는 他 報告者에 비해 높은 편인데 이는 韓牛 凍結融解 精자의 生存期間이 caffeine과 heparin 添加로 인해 단축되었기 때문이며, caffeine과 heparin 첨가에 의해 體外受精에 이용되는

Table 3. Effect of spermatozoa concentration inseminated on in vitro fertilization*

Spermatozoa concentration (cells/ml)	No. of oocytes	No. of oocytes at			Fertilization rate (%)
		MII	Pronucleus	Polyspermy	
0.8~1.0 \times 10 ⁷	55	37	17	1	32.7 ^a
1.4~1.8 \times 10 ⁷	60	14	36	10	76.7 ^b

*Oocytes were cultured for 20~24 hours, and spermatozoa were inseminated without preincubation in BO solution containing 5mM caffeine and 10 μ g/ml heparin.

^{a,b} Percentage followed by different letters within the same column differ significantly (P<0.01).

凍結融解精자의 受精濃도는 $0.8\sim 1.0\times 10^7$ cells/ml 로 하는 것보다는 $1.4\sim 1.8\times 10^7$ cells/ml 의 精子濃도로 수정하는 것이 높은 受精率을 얻을 수 있다고 생각된다. 그러나, 숫소의 個體差에 의한 受精率은 조사하지 않았으므로 韓牛 個體에 따른 體外受精率에 대해 더 研究되어야 할 것으로 생각된다.

4. 媒精後 經過時間

5mM caffeine 과 $10\mu\text{g/ml}$ heparin 농도의 BO 액에서 凍結融解精자를 $1.4\sim 1.8\times 10^7$ cells/ml 濃도로 20~24시간 배양후 成熟이 유기된 卵胞卵과 媒精시킨 후의 經過時間에 따른 受精率은 Table 4와 같다.

媒精후 8, 16, 24시간에 卵子를 固定, 染色후 鏡檢하여 受精率을 조사하였는 바 受精率은 각각 5.9, 46.0 및 59.4%로서 媒精후 시간이 경과함에 따라 受精率이 증가되었으며 前核形成과 多精子侵入도 증가되었다. 이러한 결과는 caffeine 과 heparin 이 첨가된 BO 액 내에서 $2.5\sim 5\times 10^6$ cells/ml 의 精子濃도로 수정했을 때 媒精후 5, 6, 7, 22시간의 受精率은 각각 35, 69, 86 및 94%로서 시간이 경과함에 따라 受精率도 증가한다고 보고한 Park 등(1989)의 결과와, 凍結融解精자를 heparin 으로 처리했을 때 媒精후 9시간과 14시간 때의 受精率은 각각 35%와 60%로서 媒精후 시간이 경과함에 따라 受精率이 증가하며 이러한 受精率의 차이는 受精 觀察時間의 차이 때문이라고 보고한 Susko-Parrish 등(1990)의 결과와 一致되는 傾向이었다.

Parrish 등(1988)은 숫소의 個體에 따라 정자의 受精能獲得 時間에 차이가 있으며, Leibfried-Rutledge 등(1989)은 heparin 처리된 精子의 侵入는 媒精후 8시간부터 시작되며, 숫소에 따라 精子侵入率이 다르나 24시간에는 거의 동일한 受精率을 얻었다고 보고하였으며, Younis 와 Brackett(1990)는 媒精후 6, 12, 24,

48시간때의 受精率은 각각 35.1, 49.3, 87.7 및 77.8%로서 媒精후 24시간과 48시간때의 受精率이 더 높았으나, 胚 發生에 있어서 桑實胚이상으로의 발달은 각각 3.8, 17.6, 28.0 및 17.9%로서 媒精후 24시간 胚 發生을 유기하는 것이 가장 좋다고 報告하였다. 본 연구에서는 韓牛 精子에 의한 體外受精率은 媒精時間이 경과함에 따라 增加하는 傾向이었다.

IV. 摘 要

본 研究는 凍結融解精자를 이용한 韓牛 卵胞卵의 體外受精에 影響을 미치는 要因을 조사하고자 實施하였다. 屠殺韓牛의 卵巢卵胞(3~6mm)로부터 회수한 卵胞卵을 호르몬과 FCS 가 첨가된 TCM-199培養液에서 배양한 후 caffeine 및 heparin 처리한 凍結融解精자로 體外受精시켜 精子稀釋 및 受精培養液, 受精能獲得의 유기방법, 精子의 濃度 및 媒精후 經過時間에 따른 體外受精率을 조사하였던 바 그 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 凍結融解精자를 caffeine(5mM)과 heparin($10\mu\text{g/ml}$)을 併用添加하여 體外受精했을 때 受精率은 56.4%로서 caffeine, heparin 이 單獨添加 및 無添加의 受精率인 10.5, 8.9 및 0%에 비하여 높았다($P<0.05$).
2. 凍結融解精자를 caffeine 과 heparin 을 併用添加하여 前培養하지 않고 수정했을 때 體外受精率은 56.3%로서 2.5mM caffeine 이 첨가된 BO 액에서 3시간 前培養하여 수정했을 때의 2.9%에 비해 높았다($P<0.05$).
3. 凍結融解精자를 caffeine 과 heparin 이 添加된 BO 액에서 前培養없이 $1.4\sim 1.8\times 10^7$ cells/ml 濃도로

Table 4. Effect of time after insemination on *in vitro* fertilization*

Time after insemination (hr)	No. of oocytes	No. of oocytes at				Fertilization rate (%)
		MII	Penetrated	Pronucleus	Polyspermy	
8	51	43	1	2	0	5.9 ^a
16	50	24	19	3	1	46.0 ^b
24	69	28	4	32	5	59.4 ^b

*Oocytes were cultured for 20~24 hours, and spermatozoa were inseminated without preincubation at concentration of $1.4\sim 1.8\times 10^7$ cells/ml in BO solution containing 5mM caffeine and $10\mu\text{g/ml}$ heparin.

^{a,b} Percentage followed by different letters within the same column differ significantly ($P<0.01$).

수정했을 때 受精率은 76.7%로서 $0.8\sim 1.8\times 10^7$ cells/ml 濃度로 수정했을 때의 32.7%에 비해 높았다($P<0.01$).

4. 凍結融解精子를 前培養없이 caffeine 과 heparin 이 添加된 배양액에서 수정했을 때 媒精後 8, 16, 24 시간때의 受精率은 각각 5.9, 46.0 및 59.4%로서 媒精後 시간이 경과함에 따라 향상되었다.

V. 引用文獻

1. Aoyagi, Y., K. Fujii, Y. Iwazumi, M. Furudate, Y. Fukui and H. Ono. 1988. Effects of two treatments on semen from different bulls on *in vitro* fertilization results of bovine oocytes. *Theriogenology*, 30: 973-985.
2. Austin, C.R. 1951. Observations on the penetration of the sperm into mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res. Ser. B.*, 4: 581-586.
3. Brackett, B.G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 12: 260-274.
4. Brackett, B.G., D. Bousquet, M.L. Boice, W.J. Donawick, J.F. Evans and M.A. Derssel. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*, 27: 147-158.
5. Byrd, W. 1981. *In vitro* capacitation and chemically induced acrosome reaction in bovine spermatozoa. *J. Exp. Zool.*, 215: 35-46.
6. Chang, M.C. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in fallopian tubes. *Nature(London)*, 168: 697-698.
7. Critser, E.S., M.L. Leibfried and N.L. First. 1984. The effects of semen extension, cAMP and caffeine on *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 21: 625-631.
8. Edwards, R.G. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature(London)*, 208: 349-351.
9. Fukui, Y. 1989. Effects of sera and steroid hormones on development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro* and co-cultured with bovine oviduct epithelial cells. *J. Anim. Sci.*, 67: 1318-1323.
10. Fukui, Y. and H. Ono. 1989. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 86: 501-506.
11. Garvers, D.L., N.L. First, J.J. Sullivan and H.A. Lardy. 1971. Stimulation and maintenance of ejaculated bovine spermatozoa respiration and motility by caffeine. *Biol. Reprod.*, 5: 336-339.
12. 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.
13. Handrow, R.R., R.W. Lenz and R.L. Ax. 1982. Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 107: 1326-1332.
14. Iritani, A. and K. Niwa. 1977. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fert.*, 50: 119-121.
15. Iritani, A., M. Kasai, K. Niwa and H.B. Song. 1984. Fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes with ejaculated spermatozoa capacitated in a chemically defined medium. *J. Reprod. Fert.*, 70: 487-492.
16. Leibfried-Rutledge, M.L., E.S. Critser, J. J. Parrish and N.L. First. 1989. *In vitro* maturation and fertilization of bovine

- oocytes. *Theriogenology*, 31 : 61-74.
17. Ling, Z. J. and K. H. Lu. 1990. Frequency of cleavage and development *in vitro* of bovine oocytes fertilized in different numbers in drops with different sperm concentrations. *Theriogenology*, 33 : 275 (Abstract).
 18. Niwa, K. and O. Ohgoda. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on *in vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology*, 30 : 733-741.
 19. Ohgoda, O., K. Niwa, M. Yuhara, S. Takahashi and K. Kanoya. 1988. Variations in penetration rates *in vitro* of bovine follicular oocytes do not reflect conception rates after artificial insemination using frozen semen from different bulls. *Theriogenology*, 29 : 1375-1381.
 20. Park, C.K., O. Ohgoda and K. Niwa. 1989. Penetration of bovine follicular oocytes by frozen-thawed spermatozoa in the presence of caffeine and heparin. *J. Reprod. Fert.*, 86 : 577-582.
 21. Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish and N. L. First. 1985^a. *In vitro* fertilization of bovine oocytes using heparin treated and swim up separated frozen thawed bovine semen is repeatable and results in high frequencies of fertilization. *Theriogenology*, 23 : 216(Abstract).
 22. Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish and N. L. First. 1985^b. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm *in vitro*. *Theriogenology*, 24 : 537-549.
 23. Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish, M.L. Leibfried-Rutledge, E.S. Critser, W.H. Eyestone and N.L. First. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25 : 591-600.
 24. Parrish, J.J., J. Susko-Parrish, M.A. Winer and N.L. First. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.*, 38 : 1171-1180.
 25. Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish and N. L. First. 1989. Capacitation of bovine sperm by heparin: Inhibitory effect of glucose and role of intracellular ph. *Biol. Reprod.*, 41 : 683-699.
 26. Sirard, M.A., J.J. Parrish, C.B. Ware, M.L. Leibfried-Rutledge and N.L. First. 1988. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol. Reprod.*, 39 : 546-552.
 27. Susko-Parrish, J.L., M.B. Wheeler, R.L. Ax, N.L. First and J.J. Parrish. 1990. The effect of penicillamine, hypotaurine, epinephrine and sodium metabisulfite, on bovine *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, 33 : 333(Abstract).
 28. Thibault, C., L. Dauzier and S. Winterberger. 1954. Etude cytologique de la fécondation *in vitro* de l'oeuf de la Lapine. *C.R. Soc. Biol., Paris*, 148 : 789-790.
 29. Younis, A.I. and B.G. Brackett. 1990. *In vitro* development of bovine oocytes into morulae and blastocysts. *Theriogenology*, 33 : 362(Abstract).
 30. 金相根, 朴恒均. 1988. 소 卵胞卵의 體外成熟과 受精에 관한 研究. 韓國家畜繁殖學會誌, 12 : 112-119.
 31. 宋海範. 1989. 體外培養한 소 卵胞卵과 헬스터 摘出子宮에서 前培養한 소 精子的 體外受精에 관한 研究. 韓國家畜繁殖學會誌, 13 : 32-39.