韓國家畜繁殖學會誌 14(1) : 73~83(1990)
Korean J. Anim. Reprod.

家畜의 改良 및 繁殖效率 增進에 관한 硏究
VI. 소에 있어서 體外受精 卵胞卵의 發生能 向上에 관한 硏究

鄭英彩 · 金昌根 · 柳範龍 · 尹鍾澤 · 金亨泰 · 李揆丞*
中央大學校 畜産學科

Studies on the Improvement of Performance and Reproductive Efficiency in Farm Animal
VI. Studies on Improvement of Development Potential of *In vitro*-fertilized Bovine Follicular

Chung, Y.C., C.K.Kim, B.Y.Ryu, J.T.Yoon, H.T. Kim, K.S. Lee
Dept. of Anim. Sci., Chung-Ang University

SUMMARY

These studies were carried out to find the proper conditions for *in vitro* maturation and fertilization of bovine follicular oocytes and culture methods capable of further developing early embryos.

For these objectives, the cleavage rate of oocytes matured and fertilized *in vitro* was investigated under medium supplemented weth hormones and estrous cow serum and season of oocytes collection as well as different cumulus cell stage before insemination. Finally, 2~8 cell embryos were cultured in *in vitro* and *in vitro* culture system to investigate developmental capacity into morula.

1. Cleavage rate of oocytes matured *in vitro* was 27%(20/73) for A(LH+FSH+estradiol-17β+10% FBS), 38%(27/71) for B(LH+10% ECS) and 27%(15/56) for C(10% ECS), respectively. Supplement B showed more higher rate and 4~8 cell embryos were also obtained much more in this group(67%, 18/27).

   In vitro maturation rate of follicular oocytes cultured in TCM 199 supplemented with LH and 10% ECS was 88%(75/85).
2. Cleavage rate(15%, 10/65) of oocytes collected in summer was significantly lower than in fall (47%, 42/89).
3. Cleavage(65%, 44/68) of oocytes with partially removed cumulus cell before insemination was more higher than that(44%, 27/62) of oocytes with intact cumulus cell.
4. The frequency of development from early cleaved embryos into morula was 6%(4/65), 12%(4/33) for co-culture of cumulus cell monolayer and bovine oviduct epithelial cell monolayer, respectively and 24%(6/25) in ligated rabbit oviduct.

本 硏究는 1988年度 文敎部 遺傳工學 學術硏究會에 의하여 遂行되었음.
*忠南大學校 畜産學科(Dept. of Anim. Sci., Chung-Nam National University)

When bovine embryos were transferred to ligated rabbit oviduct, embryo development was enhanced to morula.

5. About 70~76% of sperm underwent acrosome reaction following 1~2hr incubation by caffeine plus heparin treatment.

Ⅰ. 緖 論

소에서 受精卵 移植技術의 産業的 利用이 現實化됨에 따라 體外受精에 관한 硏究가 매우 활발하게 진행되고 있으며, 최근에는 體外受精卵의 移植으로 송아지 分娩이 가능하게 되었다(Brackett 등, 1982; Xu 등, 1987; Goto 등, 1988). 體外受精技術의 應用은 繁殖障碍로 번식이 불가능한 개체의 이용을 가능케 할 뿐만 아니라 受精卵 移植技術의 이용효율을 더욱 증대시키면, 또한 大家畜에서 能力改良 신품종 육성 및 遺傳樣式의 규명에 필수적인 受精卵의 미세조작과 發生工學的 尖端技術을 效率的이고 용이하게 開發할 수 있는 기본적인 기술이다. 이러한 體外受精技術 개발에 있어서 필수적 요건은 다량의 卵子를 저렴하게 공급할 수 있는 체계의 확립이며 未成熟卵胞卵의 이용은 이런 점에서 가장 유용한 卵子供給方法이라고 할 수 있다. 그러나 現在 體外成熟 卵胞卵을 이용한 體外受精技術 開發에 있어서 아직 만족할 정도에 이르지 못하고 있어서 이를 개선하기 위해서 다각도로 많은 硏究가 집중되고 있다.

卵胞卵의 體外成熟과 受精能力의 向上을 위하여 Moor 등(1977)은 LH添加가 卵胞卵의 受精과 정상發生에 도움을 준다고 보고하였고, Fukushima와 Fukui(1985)은 FSH, LH, estradiol添加가 體外成熟率을 증진시킨다고 하였다.

Lu 등(1987, 1988)은 소의 發情血淸 添加가, Sanbuissho와 Threfall(1985)은 發情血淸의 단독 添加로 卵胞卵의 體外受精率이 向上되었다고 보고하였다. Sirad 등(1988)은 TCM 199에 10% FCS와 0.5 μg/ml FSH, 5 μg/ml LH, 1 μg/ml estradiol-17β를 첨가하여 99%의 體外成熟率과 73%의 體外受精率을 보고하였다.

소 精子의 受精能獲得 條件이 體外受精率에 미치는 영향에 관하여 Parrish등(1986)은 TALP medium에 10 μg/ml heparin 첨가로 71%의 受精率을 보고하였으며, Aoyagi 등(1988)은 BO medium에 10 mM caffeine을 첨가하여 53%의 受精率을 얻었으며, Niwa와 Ohgoda(1988)는 BO medium에 10 μg/ml heparin과 5mM caffeine을 添加하여 68%의 受精率을 보고하였다.

Crister 등(1986), Hanada 등(1986) 및 Sirad 등(1985)은 소의 體外成熟 卵胞卵을 體外受精시킨 후 토끼, 면양 또는 소의 卵管에서 胚發生을 惹起하여 암소에 移植 子牛를 생산하였으며, Crister 등(1986)과 Goto 등(1988)은 體外受精 卵胞卵을 體外에서 胚發生시켜 子牛를 生産하였다. 그러나 Wright와 Bondioli(1981)는 일반 medium에서 初期胚가 胚盤胞까지의 發生率이 극히 저조함을 보고하였고, Eyestone 등(1985)은 同種 또는 異種의 卵管內로 初期胚를 移植하면 cell block 狀態를 극복한다고 하였다.

Ellighton 등(1989)은 初期胚를 somatic cell과 co-culture하면 8~16細胞期를 통과하여 후기 桑實胚와 胚盤胞期로 發生이 向上되고 細胞數도 증가한다고 보고하였다. 이런 점을 고려하여 體外受精卵胞卵의 體外發生能을 개선하기 위하여 初期胚를 偽妊娠한 토끼 卵管에 이식하여 Hanada 등(1985)은 15%, Fukushima 등(1987)은 47%의 胚盤胞까지의 發生率을 얻었고, 양 卵管에 移植하여 Parrish 등(1986)은 25%, Lu 등(1987)은 74%의 胚盤胞 發生率을 보고하였다.

Heyman 등(1987)은 卵管上皮가 胚發生을 向上시킬 수 있음을 보고하였고 Bavister(1988)는 卵管上皮細胞등의 somatic cell로부터 受精卵의 發生促進因子가 生産, 分泌됨을 보고하였다. Crister 등(1986)은 medium에 hormone과 granulosa의 添加로 36%, Eyestone 등(1987)은 FCS를 첨가한 medium에 卵管上皮와 co-culture하여 93%의 초기배를 16細胞期 이상으로 體外發生시키는데 成功하였다.

따라서 本 硏究는 體外受精卵胞卵의 胚發生能力을 向上시키기 위하여 成熟培養液에 血淸 및 호르몬 添加效果를 調査하고 季節 및 培養方法에 따른 胚發生能을 調査하기 위하여 實施하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試動物

供試精液은 축협 한우개량사업소에서 제조된 韓牛 凍結精液을 供試하였으며, 卵胞卵은 축협 가락동 도축장에서 도축되는 韓牛와 Holstein 암소의 정상적인 卵巢에서 採卵하여 供試하였다.

2. 卵胞卵의 體外成熟 및 成熟率 판정

(1) 卵胞卵의 採取

도살 직후 정상 생식기를 가진 암소로 부터 난소를 採取한 후 항생제를 添加한 멸균 생리식염수가 들어있는 보온병(33~35℃)에 담아 3時間 이내에 實驗室로 운반하였다. 採卵은 37℃ 항온실에서 난소 표면을 멸균 생리식염수로 3회 세척하고 卵胞직경이 2~5mm인 정상 卵胞로 부터 10ml주사기와 20게이지 주사침을 사용하여 Ball 등(1982)의 방법에 따라 난소 실질을 찌른 후 연속적으로 卵胞液과 함께 흡입하면서 난포액을 採取하였다.

採取된 卵胞液은 10ml의 시험관에 담아 일정시간 정치한 다음 하단액을 스포이드로 흡입하여 소량의 培養液이 들어있는 petri dish(3001, Falcon plastic)에 담아 실체 현미경하에서 卵子의 細胞質과 주위 卵丘細胞層이 충실하게 부착된 卵子만을 선별, 이용하였다.

(2) 培養液의 製造

1) 卵胞卵의 體外成熟 培養液

TCM 199 liquid(380-23475, Gibco)에 50μg/ml gentamycin(국제약품공업주식회사)을 添加한 것을 기본 배양액으로 하여, 세가지 배양액 즉,

A : TCM 199+10μg/ml LH+5μg/ml FSH+1μg/ml estradiol-17β+10% Fetal bovine serum(FBS)

B : TCM 199+10μg/ml LH+10% Estrous cow serum(ECS)

C : TCM 199+10% ECS 이었다.

위의 세가지 배양액을 petri dish에 2ml씩을 넣은 후 멸균 파라핀 오일로 피복하여 5% CO_2, 95% 공기, 39℃ CO_2배양기내에서 12시간 동안 평형시켰다.

2) Hormone stock solution 製造

LH와 FSH(덴까제약주식회사)는 적정 희석배율이 되게 기본 培養液으로 용해시켰다. Estradiol-17β(E-8875, Sigma)는 처음 0.01g을 1ml의 ethanol에 용해시킨 후 培養液 9ml를 添加하여 총 10ml가 되게 하였다. 培養液의 ethanol濃度는 1%를 초과하지 않게 하였다. 각각의 Hormone stock solution은 제조직후 사용전까지 小滴으로 분주하여 -20℃에서 냉동 보관하였다.

3) 血淸準備

發情當日의 韓牛 血液으로 부터 分離해낸 estrous cow serum과 fetal bovine serum(240-1555, Gibco)은 56℃에서 30分間 비동화 시킨 후 사용하기 전까지 -20℃에서 냉동보관 하였다.

(3) 卵胞卵의 體外成熟 및 判定

12시간 동안 평형시간을 가진 2ml의 培養液이 들어있는 dish 각각에 10~15개의 卵胞卵을 넣고, 5% CO_2, 95% 공기, 39℃ CO_2배양기내에서 25시간 체외성숙시켰으며 體外成熟 판정은 培養이 끝난 卵胞卵을 0.3% hyaluronidase에 5分間 처리하여 卵丘細胞層을 제거한 뒤 제1극체의 돌출로서 成熟與否를 판정하였다.

3. 精子處理와 受精能獲得

(1) 精子處理

각기 다른 두 개체의 0.5ml straw 동결, 융해 精液을 혼합한 후 Table 1에 나타난 바와 같은 BO medium(Brackett와 Oliphant, 1975)에 BSA를 첨가하지 않고 caffeine 10mM(Niwa와 Ohogoda, 1988)을 첨가한 4ml의 BO액으로 희석하여 5分間 200g에서 원심분리하여 상층액을 제거하였다.

2회 반복후 5mM caffeine과 10μg/ml heparin이 들어있는 4ml BO medium(5mg/ml BSA 포함)으로 200g에서 5分間 원심분리한 후 상층액을 버리고 같은 培養液으로 精子濃度가 2×10^7cell/ml되게 조정하였다.

(2) 精子 受精能獲得

위 處理 精子의 受精能獲得을 위하여 39℃, 5% CO_2, 95%공기인 CO_2배양기에서 0.5, 1, 2, 3, 4時間 前培養한 다음 Didion 등(1989)의 方法에 따라 2개의 도말표본을 만들어 600배 위상차 현미경하에서 精子頭部 染色狀態를 기준으로 尖體反應이 일어난 生存 및 死滅精子數 尖體反應이 일어나지 않은 生存 및 死滅精子數로 구분한 백분율로 受精能獲得 결과를 산출하였

Table 1. Composition of defined medium for *in vitro* sperm capacitation and *in vitro* fertilization

Component	Concentration
Stock solution	
NaCl	112.00 mM
KCl	4.02 mM
$CaCl_2$	2.25 mM
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.52 mM
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	0.83 mM
Lincomycin-Spectinomycin (1 : 2 mixture, W/W)	90 μg/ml
Tylosin	10 μg/ml
Gentamycin	50 μg/ml
Dissolved in 5×distilled water and then this solution stored in a refrigerator.	
Defined medium	
Prepared defined medium with stock solution just before use by dissolveing the following components.	
D-Glucose	250.0 mg/100 ml
BSA (Bovine serum albumin)	5000.0 mg/100 ml
$NaHCO_3$	310.4 mg/100 ml
Na-pyruvate	13.8 mg/100 ml

다.

4. 體外受精 및 卵分割

체외수정은 前處理後 1.5時間 前培養된 정자를 濃度 $1\sim2\times10^6$/ml 되게 조정한 후 petri dish에 0.2ml drop을 만든 다음 멸균 파라핀 오일로 피복하여 각각에 10~15개씩의 卵子를 주입 20時間동안 受精을 실시하였다.

수정 20시간후 Ham's F10 liquid(380-2390, Gibco)에 3.7 μl/ml Na-lactic acid(L-1375 ; 60% syrup, Sigma), 2.2 mg/ml $NaHCO_3$, 50 μg/ml Gentamycin, 10% FBS가 添加된 발생배지로 옮겨 卵子를 28時間 추가 培養하여 卵分割率을 조사하였다.

5. 分割卵의 體外 및 體內培養

(1) 單層卵丘細胞와의 co-culture

Goto 등(1988)의 方法에 따라 受精 48시간후 分割卵을 덮고 있는 주위 卵丘細胞를 피펫팅으로 제거시킨 후 발생단계별로 2~3, 4~8細胞期로 구분하여 petri dish 底面에 확산된 cumulus cell monolayer 위에 올려놓고 co-culture를 하였으며, 매 48시간마다 신선한 培養液으로 배지를 절반(0.1 ml)씩 교환하였으며 4일 후의 發達狀態를 調査하였다.

(2) 卵管上皮細胞와의 co-culture

卵管上皮細胞의 準備는 Eyestone과 First(1989)의 方法에 따라 도축장에서 黃體期의 卵管을 採取 phosphate buffer saline(Mg^{2+}, Ca^{2+}제거)에 담아 실험실로 옮겨온 후 채취된 4개의 卵管을 각각 TCM 199 medium 2 ml로 관류하여 상피세포를 채취하고 같은 배양액 2 ml로 3회 세척한 뒤 상층액을 버리고 0.25% trypsin(610-5050 AG, Gibco) 2 ml를 주입 8분간 방치한 다음 500 g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 Ham's F10에 10% FBS가 添加된 培養液으로 3회 세척한 후 23게이지 주사침과 5 ml 주사기로 수차례 반복 흡입하여 上皮細胞들을 분산시킨 다음 같은 培養液으로 細胞數가 $10^4\sim10^5$ cell/ml 되게 조정하였다.

4 well dish(176740, Nunclon)에 각각 上皮細胞液을 0.2 ml씩 분주하여 3일간 배양후 monolayer의 形成與否를 檢査하였다. 形成區는 신선 培養液으로 절반(0.1 ml)을 교환하여 준 다음 受精후 48時間된 分割卵을 발생단계별로 2~3, 4~8細胞期로 구분하여 co-culture를 실시했으며, 매 48시간마다 0.1 ml씩의 배지를 신선배지로 교환하였고 4일 후의 發達狀態를 調査하였다.

(3) 分割卵의 體內培養

2~3 kg의 New Zealand White種 토끼를 卵移植 52시간전에 HCG(Chorulon, Holland) 100 IU를 耳靜脈에 주사, 僞妊娠狀態를 유도한 후 受精 48시간된 分割卵을 胚發達狀態에 따라 2~3과 4~8세포기로 구분하여 子宮·卵管連接部를 결찰한 양측 난관에 移植하였다. 移植 4일후 卵을 回收하여 胚發達狀態를 調査하였다.

III. 結果 및 考察

1. 成熟培養液에 호르몬과 血淸添加에 따른 卵分割率

Table 2. Cleavage of bovine oocytes matured in different maturation media

Oocyte maturation		No. of oocytes[3]	No. of oocytes developed[4]			
Oocyte[1]	Supplement[2]	inseminated	Uncleaved	2~3 cell	4~8 cell	Total cleavage(%)
KNC	A	40	29	9	2	11(28)
	B	41	25	6	10	16(39)
	C	26	20	6	-	6(23)
	Total	107	74	21	12	33(31)
HC	A	33	24	6	3	9(27)
	B	30	19	3	8	11(37)
	C	30	21	5	2	9(30)
	Total	93	64	14	13	29(31)

1) KNC : Korean native cow, HC : Holstein cow.
2) A(10 μg/ml LH+5 μg/ml FSH+1 μg/ml estradiol-17β+10% FBS)
B(10 μg/ml LH+10% ECS) and C(10% ECS) in TCM 199.
3) Only oocytes with expended cumulus cells were inseminated.
4) No. of oocytes cleaved at 48 hrs postinsemination.

TCM 199 基本成熟 培養液에 호르몬 또는 發情血淸 添加에 따른 卵分割率을 보면 Table 2와 같다.

韓牛에 있어서 培養液 組成에 따른 卵分割率이 A에서 28%, B에서 39%, C에서 23%, 總 31%(33/107)의 卵分割率을 보였고, Holstein種에서는 A에서 27%, B에서 37%, C에서 30%, 總 31%(29/93)의 卵分割率을 나타냈다.

韓牛와 Holstein種에서 모두 LH와 ECS 添加가 보다 높은 卵分割率을 보였으며, 總 分割率에 있어서는 韓牛와 Holstein種間에 차이는 없었다. 그리고 韓牛와 Holstein種 間에 있어 總 分割卵 中에서 4~8細胞期로 發生에 진전된 卵의 比率은 A에서 25%, B에서 67%, C에서 13%로써 LH와 ECS 添加에서 역시 높게 나타났다. 成熟培養條件 中에서 卵分割率이 가장 좋았던 10 μg/ml LH와 10% ECS 添加에서 體外成熟시킨 卵胞卵의 成熟率은 Table 3과 같이 韓牛에서는 88%, Holstein種에서는 89%, 總 88%를 나타냈고, 韓牛와 Holstein種間에는 차이는 없었다.

이러한 결과는 卵胞卵 成熟培養液에 hormone을 添加하여 卵分割率을 보고한 Crister 등(1986), Sirad 등(1988)의 成績보다는 낮은 結果였으나, Ball 등(1983)의 成績과는 유사하였고, 發情血淸을 添加하여 얻은 成績은 Sanbuissho와 Threfall(1985)의 結果와 일치하고 있다.

Table 3. *In vitro* maturation of bovine follicular oocytes

Oocytes[1]	No. of oocytes examined	No.(%) of oocytes extruding first polar body
KNC	41	36(88)
HC	44	39(89)
Total	85	75(88)

1) The same convention as shown in Table 2. Oocytes were matured 25 hrs in TCM 199 supplemented with 10 μg/ml LH and 10% ECS

卵胞卵 體外成熟 培養液에 LH와 發情血淸의 添加에서 卵分割率이 높았던 결과는 Jagiello 등(1977)이 LH 添加로 소 卵胞卵의 成熟分裂을 향상시켰다는 結果와 Sanbuissho와 Threfall(1985)의 卵胞卵의 體外成熟시 發情血淸 添加가 受精率을 증진시킨다는 보고와 관련이 있다고 볼 수 있겠다.

LH와 發情血淸 添加에서의 體外成熟 결과는 Fukui와 Ono(1989)이 TCM 199 培養液에 2.5 μg/ml FSH, 5 μg/ml LH와 發情血淸을 첨가하여 59%의 卵胞卵 體外成熟率을 얻은 결과보다는 높았으며, Younis 등(1989)이 發情當日 血淸을 添加하여 89%

成熟率을 보고한 結果와는 유사한 것이었다.

2. 卵胞卵 採卵季節과 卵分割率

Table 4는 여름(7~8月)과 가을(9~10月)에 각각 採卵한 卵胞卵을 LH와 ECS에서 體外成熟시켜 體外受精한 結果이다.

여름에 採卵된 卵胞卵의 卵分割率은 韓牛에서 13%, Holstein種에서 18%, 總 15%(10/65)였으며, 가을의 결과는 韓牛에서 46%, Holstein種에서 50%, 總 47%(42/89)로서 韓牛와 Holstein種에서 모두 여름에 採卵된 卵보다 가을에 採卵된 卵의 分割率 및 發生率이 현저히 높음을 알 수 있었다. 韓牛와 Holstein種間에 차이는 없었다.

이상의 結果는 Smith 등(1978)이 rhusus monkey에서 卵胞卵의 體外成熟率이 비번식계절보다 번식계절에서 높았다는 보고와 유사했으며, Monty와 Racowsky(1987)가 더운 여름에 소에 있어서 受精卵 採卵時 未受精卵의 採卵率이 높으며 소 受精卵의 體外培養에서도 黃體의 早期消滅과 發情遲延등으로 胚發生率이 低調하다는 보고와도 유사하였다.

3. 體外成熟 卵胞卵의 授精時 卵丘細胞狀態와 卵分割率

Table 5는 授精前 卵丘細胞의 부착상태에 따른 體外成熟 卵胞卵의 分割率 및 發生率을 나타내주고 있다. 授精前 卵丘細胞가 완전하게 부착된 卵의 分割率은 韓

Table 4. Cleavage of bovine oocytes collected in summer and fall

Season	Oocyte[1]	No. of oocytes[2] inseminated	No. of oocytes developed[3]			
			Uncleaved	2~3 cell	4~8 cell	Total cleavage (%)
Summer	KNC	32	28	0	4	4(13)
	HC	33	27	2	4	6(18)
	Total	65	55	2	8	10(15)
Fall	KNC	59	32	16	11	27(46)
	HC	30	15	7	8	15(50)
	Total	89	47	23	19	42(47)

1), 2), 3) The same convention as shown in Table 2.
Oocytes were matured in TCM 199 supplemented with 10 μg/ml LH and 10% ECS.

Table 5. *In vitro* development of bovine oocytes with intact and partially removed cumulus cells before insemination

Cumulus cell	Oocyte[1]	No. of oocytes inseminated	No. of oocyte developed[3]			
			uncleaved	2~3 cell	4~8 cell	Total cleaved (%)
Intact	KNC	34	20	7	7	14(41)
	HC	28	15	9	4	13(46)
	Total	62	35	16	11	27(44)
Partially removed (by pipetting)	KNC	42	16	8	18	26(62)
	HC	26	8	2	16	18(69)
	Total	68	24	10	34	44(65)

1), 2), 3) The same convention as shown in Table 2.
Oocytes were matured in TCM 199 supplemented with 10 μg/ml LH and 10% ECS.

牛에서 41.2%, Holstein種에서 46.4%, 總 44% (27/62)였으며, 卵丘細胞를 일부 제거 또는 더욱 확산시킨 卵의 分割率은 韓牛에서 62%, Holstein에서 69%, 總 65%(44/68)였다. 授精前 卵丘細胞가 다소 제거되거나 확산되었을 때의 卵分割率이 완전하게 卵丘細胞를 지닌 卵의 分割率보다 높게 나타났고, 韓牛와 Holstein種間에는 차이가 없었다.

이러한 結果는 Brackett 등(1988)이 授精前 온전한 卵丘細胞를 지닌 卵과 hyaluronidase 처리로 완전히 卵丘細胞를 제거한 卵과의 卵分割率 비교에서 온전한 卵丘細胞를 지닌 體外成熟 卵胞卵의 分割率 및 發生率이 높게 나타났다는 보고와는 상반되었으나 Sirad 등(1988)이 卵丘細胞가 제거된 體外成熟卵子를 이용 43%의 分割率을 얻은 것보다는 높은 성적이었으며, Ohgoda 등(1988)이 卵子의 卵丘細胞와 放射冠細胞가 卵子內 精子侵入을 지연시키거나 侵入을 어렵게 하여 受精이 지연된다고 보고한 것과 연관이 있는 것으로 사료된다.

4. 初期胚의 體內·體外培養에 따른 胚發生率

Table 6은 分割卵을 2~3, 4~8細胞期로 나누어 각각 單層卵丘細胞나 소 卵管上皮細胞와 체외 co-culture 하거나 또는 僞妊娠된 토끼 卵管에 移植한 후 16細胞期내지는 桑實胚까지의 胚發生率을 나타낸 것이다.

표에서 보는 바와 같이 單層卵丘細胞와의 co-culture時 桑實胚까지의 發生率은 2~3細胞期의 卵은 0%, 4~8細胞期의 卵은 10%, 總 6%(4/65)를 나타냈으며, 소 卵管 上皮細胞와의 co-culture에서는 2~3細胞期의 卵은 0%, 4~8細胞期 卵은 22%, 總 12% (4/33)가 桑實胚로 發生했다. 僞妊娠된 토끼卵管에 移植한 후 회수된 卵의 桑實胚까지의 發生率은 2~3 細胞期 卵에서 0%, 4~8細胞期 卵에서 33%, 總24% (6/25)의 發生率을 보였다.

이상과 같은 結果는 Goto 등(1989)이 單層卵丘細胞와 co-culture하여 23%의 桑實胚 및 胚盤胞까지의 發生率을 나타낸 것보다 저조한 성적이었으며, 소 卵管上皮細胞와의 co-culture에 있어서는 Fukui와 Ono (1989)가 보고한 12.2%의 桑實胚 및 胚盤胞까지 發生率과는 유사했으나, Kim 등(1989)이 보고한 28%의 發生率과 Ellington 등(1989)이 보고한 58%의 發生率보다는 저조한 성적이었다.

토끼 卵管에서의 결과는 Xu 등(1987)이 소 卵管에 移植하여 얻은 38%의 發生率과 Sirad 등(1988)이 양 卵管에 移植하여 얻은 28%, Fukui 등(1989)이 토끼 卵管에 移植하여 22.5%의 發生率을 나타낸 결과와는 유사하였으나, Aoyagi 등(1987)이 보고한 7%보다는 높은 성적이었고, Eyestone 등(1987)이 발표한 37~53%의 發生率보다는 낮은 성적이었다.

Table 6. Developmental capacity of *in vitro*-matured and-fertilized bovine oocytes in *in vitro*- and *in vivo* -culture system

Culture system	Initial[1] cell stage	No. of oocytes cultured or transfered	No. of oocytes examined or recovered(%)	No. of oocytes developed		
				< 16 cell	Morula(%)	Total(%)
Cumulus cell monolayer	2~3 cell	24	24	24	0	
	4~8 cell	41	41	37	4(10)	4/65(6)
Bovine oviduct						
epithelial cell monolayer	2~3 cell	15	15	15	0	
	4~8 cell	18	18	14	4(22)	4/33(12)
Rabbit oviduct	2~3 cell	11	7(64)	7	0	
	4~8 cell	23	18(78)	2	6(33)	6/25(24)

1) Oocytes(KNC+HC) were matured in TCM 199 supplemented with 10 μg/ml LH and 10% ECS.
Cleavage was examined 48 hrs after *in vitro* fertilization.

2) Eggs were examined 4 days after *in vitro*-culture or transfer.

5. Caffeine과 heparin에 의한 精子尖體反應率

本 實驗에서 體外受精에 이용한 精子의 體外受精能 獲得方法의 적정 여부를 알기 위하여 조사된 精子尖體反應은 Table 7과 같다.

5mM caffeine과 10μg/ml heparin의 공동처리 후 前 培養時間에 따른 精子의 尖體變化率에서 精子尖體가 온전한 生存 精子數는 前培養 1~2時間후에 급격히 줄어들고 尖體가 소실된 산 精子와 죽은 精子(B+D)의 數는 급격히 증가 됨을 알 수 있다.

이 결과는 caffeine과 heparin으로 처리된 본 실험에서의 精子受精能獲得은 적절하게 야기되었음을 알 수 있으며, 이를 근거로 前培養 1.5時間된 精子를 體外受精에 이용하였다.

Aoyagi 등(1988)은 精子尖體反應 유기물질이 소에 있어서 體外受精후 卵子의 發生에 매우 중요하다고 보고한바 있으며 Parrish 등(1986)은 受精能獲得을 위한 精子처리시 heparin처리가 좋은 효과를 나타낸다고 보고하였다. Niwa와 Ohgoda(1988)는 화학제제의 단독처리보다 caffeine과 heparin을 공동처리한 것이 더욱 좋은 結果를 얻었다고 발표하였다.

IV. 摘 要

本 研究는 體外成熟 卵胞卵의 體外受精後 胚發生能을 向上시킬 수 있는 적절한 體外成熟 培養 및 初期胚 培養方法을 찾고저 實施하였다.

卵胞卵의 體外成熟 培養液에 호르몬과 發情血淸 添加, 採卵時 季節 및 授精前 卵丘細胞 상태에 따른 卵分割率을 調査하였고, 分割卵의 體內·體外培養에 의한 桑實胚로의 胚發生率을 調査하였다.

1. 卵胞卵의 體外成熟 培養液의 組成에 따른 卵分割率이 A처리구(FSH+LH+estradiol-17β+10% FBS)에서 27%(20/73), B처리구(LH+10% ECS)에서 38%(27/71), C처리구(10% ECS)에서 27%(15/56)로서 B처리구에서 높게 나타났고, 分割卵中 4~8細胞期 發生卵도 B처리구에서 67%(18/27)로 높게 나타났다. B처리구의 體外成熟率은 88%(75/85)였다.

2. 여름에 採卵된 卵子의 卵分割率이 15%(10/65)로서 가을의 47%(42/89)보다 현저히 낮았다.

3. 授精前 卵주위 卵丘細胞層을 일부 제거한 卵의 分割率은 65%(44/68)로서 제거하지 않은 卵의 44%(27/62)보다 높았다.

4. 分割卵을 單層卵丘細胞와 co-culture했을때 桑實胚까지의 發生은 6%(4/65), 소 卵管上皮細胞와의 co culture에서는 12%(4/33), 토끼 卵管에 移植한 體內培養에서는 24%(6/25)로 토끼 卵管에서 胚發達率이 높았다.

5. 精子 體外受精能獲得에서 caffeine과 heparin의 共同處理에서 1~2時間에 많은 정자가 尖體反應을 일으켰다.

Table 7. Percentage of sperm with detached acrosome at various intervals after treatment with caffeine and heparin

Incubation time(h)	Dead sperm		Live sperm		A+C	B+D
	Intact(A)	Detached(B)*	Intact(C)	Detached(D)*		
0.5	19	33	30	18	49	51
1	21	54	10	15	31	69
2	12	63	12	13	24	76
3	12	56	11	21	23	77
4	14	60	12	14	26	74

Sperm treatment with caffeine(5mM) and heparin(10μg/ml).

Values represent means(%) of 150~200 sperm counted per slide.

*B : false acrosome-reacted(AR) sperm, D : true AR sperm.

謝 辭

本 硏究는 文敎部 1988년도 遺傳工學 學術硏究費 支援에 의하여 실시되었으며, 本 著者들은 硏究費를 제공한 文敎部와 卵巢와 精液을 공급해 주신 畜協中央會 韓牛乳牛改良事業所와 가락동 畜産物共販場에 謝意를 표하며 아울러 硏究를 도와 준 中央大學校 畜産學科 繁殖育種學 專攻 大學院生들에게도 감사드립니다.

V. 引用文獻

1. Aoyagi, Y., K.Fuzii, Y.Iwazumi, H. Wachi, Y.Fukui and H.Ono. 1987. Cleavage resulting from intra-rabbit oviduct transfer of bovine gametes. Jpn. J. Anim. Reprod. 33(4) : 209-212.
2. Aoyagi, Y,. K.Fuzii, Y.Irsazumi, M. Furudote, Y.Fukui and H.Ono. 1988. Effects of the treatments on semen from different bulls on *in vitro* fertilization results of bovine oocytes. Theriogenology 30 : 973-985.
3. Ball, G.D., M.L. Leibfried, R.W. Lenz, R.L. Ax, B.D. Bavister and N.L. First. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. Biol. Reprod. 28 : 717-725.
4. Bavister, B.D. 1988. Role of oviductal secretions in embryonic growth *in vivo* and *in vitro*. Theriogenology 29 : 143-154.
5. Brackett, B.G. and G.Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit supermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod. 12 : 260-274.
6. Brackett, B.G., D.Bousuguet, M.L. Boice, W.J. Donawick, J.F. Evans and M.A. Dressel. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. Biol. Reprod. 27 : 147-158.
7. Brackett, B.G., A.I. Younis and R.A. Fayrer-Hosken. 1988. Rescue of bovine oocytes with enhenced viability after *in vitro* fertilization. Proc. 44th. Anim. Fert. Sci. P-074(Abster.)
8. Crister, E.S., M.L. Leibfried-Rutledge, W. H. Eyestone, D.L. Northey and N.L. First. 1986. Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro*. Theriogenoloy 25 : 150(Abstr.)
9. Didion, B.A., J.R. Dobrinsky, J.R. Giles and C.N. Graves. 1988. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. Gamete Research 22 : 51-57.
10. Ellington, J.E., E.W. Carney and R.H. Foote. 1989. Composition of media in an early bovine embryo and oviduct epithelial cell co-culture system. Theriogenology 31 : 189.
11. Eyestone, W.H., D.L. Northey and M.L. Leibfried-Rutledge. 1985. Culture of one -cell bovine empryos in the sheep oviduct. Biol. Reprod. 32(suppl. 1) : 100(Abster.).
12. Eyestone, W.H., J.Vignieri and N.L First. 1987. Co-culture of early bovine embryos with oviductal epithelium. Theriogenology 27 : 228(Abstr.).
13. Eyestone, W.H. and N.L. First. 1989. Co -culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. J. Reprod. Fert. 85 : 715-720.
14. 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. 85 : 501-506.
15. Fukushima, M. and Y. Fukui. 1985. Effects of gonadotropins and steroids on the subsequent fertilizability of extrafollicular bovine oocytes cultured *in vitro*. Anim.

Reprod. Sci. 9 : 323-332.

16. Fukushima, M., Y. Shioya, M. Kuwayma, S. Iwasaki and A. Hunada, 1987. Effects of hormones added to culture medium for oocyte maturation and the subsequent development of *in vitro* fertilized bovine oocytes. Proc. 79th Jpn. Sic. Zootech. Sci., I-29. p. 15(Abstr.).
17. Goto, K., Y. Kajihara, S. Kosaha, 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* maturation follicular oocytes. J. Reprod. Fert. 83 : 753-758.
18. Hanada, A., Y. Shioya, K. Sakamoto and H. Kobayashi. 1985. Development to blastocyst stage of bovine follicular oocytes fertilized *in vitro* after maturation *in vitro*. Proc. 77th Jpn. Soc. Zootech. Sci. III-42, p. 79(Abstr.).
19. Hanada, A., Y. Enya and T. Suzuki. 1986. Birth of calves by nonsurgical transfer of *in vitro* fertilized embryos obtained from oocytes matured *in vitro*. Proc. 78th Jpn. Soc. Zootech. Sci. pp. 79(Abstr.).
20. Jagillo, M.D., J. Graffeo. M. Ducayen and R. Prosser. 1977. Futher studies of inhibitors of *in vitro* mammalian oocytes maturation. Fertility and Sterility. 28(4) : 476-481.
21. Kim, C.I., J.E. Ellington and R.H. Foote. 1989. Maturation, fertilization and development of bovine oocytes *in vitro* using TCM 199 and a simple defined medium with co-culture. Theriogenology (submitted).
22. Lu, K.H., I. Gordon, M.Gallagher and H. McGovern. 1987. Pregnancy estabilished in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. Vet. Rec. 121 : 259-260.
23. Lu, K.H., I. Gordon, J.B. Chen, M. Gallagher and H. McGorven. 1988. Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by *in vitro* techniques. Vet. Rec. 122 : 539-540.
24. Monty, D.E. and C. Racowsky. 1987. *In vitro* evaluation of early embryo viability and development in summer heat-stressed, superovulated dairy cows. Theriogenology 28(4) : 451-465.
25. Moor, R.M. and A.O. Tounson. 1977. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in vitro* and their subsequent development capacity. J. Reprod. Fert. 49 : 101.
26. Niwa, K. and Ohgoda, 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on *in vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. Theriogenology 30 : 733-741.
27. 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.
28. Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish, M.L. Leibfried-Rotledge, E.S. Critser, W.H. Eyestone and N.L. First. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thowed semen. Theriogenology 25 : 591-600.
29. Sanbuissho, A. and Threlfall, W.R. 1985. The effect of estrous cow serum on the *in vitro* maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte. Theriogenology 31 : 693-699.
30. Sirad, M.A., R.D. Lambert, D.P. Menard and M. Bedoya. 1985. Pregnancies after *in vitro* fertilization of cow follicular oocytes, their incubation in rabbit oviducts and their transfer to the cow uterus. J. Reprod. Fert. 75 : 551.
31. Sirad, M.A., J.J. Perrish, C.B. Ware,

M.L. Leibfried-Rutledge and N.L. First. 1988. The culture of bovine oocytes to obstain developmentally competent embroys. Biol. Reprod. 39 : 546-552.

32. Smith D.M., C.H. Conaway and W.T. Keriber. 1978. Influences of season and age on maturation *in vitro* of rhesus monkey oocytes. J. Reprod. Fert. 54 : 91-95.
33. Wright, R.W., Jr and K.R. Bondioli. 1981. Aspects of *in vitro* fertilization and embryo culture in domestic animals. J. Anim. Sci. 53 : 702-729.
34. Xu, K.P., T. Greve, H.Callssen and P. Hyttel. 1987. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized *in vitro*. J.Reprod. Fert. 81 : 501-504.
35. Younis, A.I., B.G. Brackett and R.A. Fayer-Hosken. 1989. Influence of serum and hormones on bovine oocytes maturation and fertilizatin *in vitro*. Gamete Research 23 : 189-201.
36. 김상근, 박항균. 1988. 소난포란의 체외성숙과 수정에 관한 연구. 한번식지, 12 : 112.
37. 김창근, 정영채, 박재원, 송해범. 1988. 소난포란의 체외성숙과 수정능력에 관한 연구. 한축지 30 : 224-232.
38. 정구민, 임경순. 1988. 소의 품종, 배양액의 첨가제 및 발정주기가 난포란의 체외성숙, 수정 및 발생에 미치는 영향. 한축지, 30 : 79-89.