

배지에 첨가한 혈청, HEPES 및 과립막세포가 난포의 소 난자의 체외성숙에 미치는 영향

허준희 · 황우석 · 조충호

서울대학교 수의과대학

서 론

소 난포란에 대한 체외배양이 1965년 Edwards⁷⁾에 의해 처음으로 보고된 이후 소 난자의 체외성숙 및 체외수정에 관한 연구가 여러학자에 의해 수행되어 왔다. 1987년 Lu 등¹⁷⁾은 체외에서 성숙된 소난자를 체외수정후 양 난관에서 6~7일 배양후 이식하여 수란우중 67%가 임신되었다고 하였다.

체외에서 성숙배양된 난자는 다정자 침입, 분할이상 및 분할중지 등의 발육이상이 나타남으로 체외배양시 난자의 핵과 세포질의 완전한 성숙을 유도하는 것은 중요하며 이를 위해 선인들은 배지에 호르몬(Moor와 Trounson, 1987), 혈청(Leibfried-Lutledge 등, 1986), 난관상피(Gandolfi와 Moor, 1987), 및 과립막세포(Fukui와 Ono, 1989) 등을 첨가하였다^{10,11,15)}.

Sreenan²¹⁾은 소 난자의 체외배양시 배지에 혈청을 첨가했을 때 성숙률이 높았다고 하였고, Eppig 등⁸⁾은 혈청은 투명대의 자발적인 경화작용을 억제하고 난자성숙기간 동안 수정능 발달에 필수적인 요소를 함유하고 있다고 주장하였다.

한편 Sanbuissho와 Threlfall¹⁹⁾은 혈청중 발정기의 암소로부터 얻은 혈청을 첨가하였을 때 소 난자의 체외수정률이 높았다고 하였다. Leibfried-Lutledge 등¹⁵⁾은 혈청은 소 난자의 체외성숙과 수정에서 뛰어난 단백질 공급원이라고 하였으며, Canfield 등³⁾은 소 혈청알부민의 첨가만

으로도 소의 초기 수정난 발달을 유지할 수 있었다고 하였다.

한편 Crister 등⁶⁾은 과립막세포와 난구세포에 둘러싸인 난자 사이의 상호작용이 성숙중인 소 난자의 발달완료에 관여하는 것으로 보고하였고, Xu 등²³⁾은 성숙배지에 과립막세포의 첨가로 소 난자의 체외수정후의 발육률을 증진시켰다고 하였으며 최근 Fukui와 Ono¹⁰⁾는 과립막세포의 배지첨가로 소 난자의 체외성숙에는 별 영향을 미치지 않았지만 체외수정률과 발육능을 높여 주었다고 하였다.

이상에서 살펴본 바와 같이 배지에 첨가한 혈청의 종류에 따른 난자성숙 및 발달에 대한 효과는 연구자에 따라 다양하게 보고되었고 최근 과립막세포의 첨가가 난자의 체외수정률과 발육능을 높여주었다고 보고되었다. 따라서 저자는 pH buffer인 HEPES를 첨가한 배지와 첨가하지 않은 배지에서 혈청의 종류 및 농도변화 그리고 성숙 난포로부터 채취한 과립막세포의 첨가가 난포의 소 난자의 체외성숙에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

난포란의 채취 : 도살된 암소로부터 양측 난소를 채취하여 난소표면의 혈액과 여분의 결체 조직을 제거한후 100IU/ml의 penicillin(이하 Pc로 약함)과 100µg/ml의 streptomycin(이하 SM으로 약함)이 첨가된 30~35°C의 생기식염수가 든 보

은병에 넣어 실험실로 운반하였다. 실험실에 도착한후 37°C의 생리식염수로 두 세번 세정한후 멸균여과지로 혈액과 수분을 제거하고 18 gauge 침이 달린 10ml 주사기로 37°C의 Dulbecco's phosphate buffered saline(Gibco, U.S.A., 이하 PBS로 약함) 1ml정도 흡인한후 직경 2~5mm의 소난포로 부터 난자를 흡인하였다. 이를 시계접시 위에 올려놓고 실체현미경(15~30X)하에 검경하여 난구세포가 팽윤되지 않고 세포질이 균질한 정상난자를 선별하여 배양에 제공하였다.

난포란의 배양액 : 소 난포란의 성숙배양액은 Tissue culture medium 199(Gibco, U.S.A, 이하 TCM199로 약함)에 25mM HEPER, 10% 혹은 20%의 fetal calf serum(Gibco, U.S.A., 이하 FCS로 약함) 또는 calf serum(Gibco, U.S.A, 이하 CS로 약함), 5mg/ml의 bovine serum albumin(Sigma, U.S.A., 이하 BSA로 약함) 그리고 성숙 난포로 부터 채취한 과립막세포를 5×10^6 개/ml의 비율로 첨가하였고 항생제는 100IU/ml의 Pc과 50 μ g/ml의 SM을 첨가하여 배양액을 작성하였다. 작성한 배양액을 0.22 μ m millipore filter(Gelman, German)로 여과하여 세척용과 성숙용으로 분주하여 39°C, 5% CO₂, 95% 공기 및 습도가 포화상태인 CO₂배양기내에서 2~3시간 동안 전 배양을 실시하였다.

난포란의 체외배양 : 선별된 전상 난자를 HEPES가 첨가된 세척용 배지로 세번 세척한후 성숙배지가 들어 있는 4 well dish(Nunc, U.S.A)의 well당 8~10개의 난자를 넣은 다음 그 위에 paraffin oil(mineral oil, Squibb, U.S.A)를 덮어서 CO₂배양기내에서 24시간 성숙배양을 실시하였다.

체외성숙도의 판정 : 난포란의 체외 성숙배양 후 성숙정도는 제1극체 방출여부와 핵성숙정도로 판정하였다. 성숙배양난자를 5분간 0.1% hyaluronidase처리와 구경이 작은 피펫으로 흡인배출조작법에 의해 난구세포를 완전히 제거한 다음 제1극체의 방출여부를 관찰하고 나머지 난자는 slide glass위에 올려 놓고 고정액(ethyl alcohol : acetic acid=1 : 3)으로 고정한후 1% acetoorcein으로 염색하여 위상차현미경하에서 관찰하였다. 이때 성숙도의 판정은 Ball 등²⁾의 방법

에 따라 제1감수분열(중기I, 후기I, 종기I)과 제2감수분열 중기(중기II)로 구분하여 조사하였다.

통계처리 : 실험결과치는 분산분석으로 각 실험군간의 유의성을 검정한후 LSD를 이용한 다중평균비교를 통하여 비교분석하였다.

결 과

소 난포란의 체외배양시 배지에 첨가한 혈청의 종류 및 농도변화, HEPES와 과립막세포의 첨가여부가 체외성숙률에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험한 결과는 다음과 같았다.

HEPES를 첨가한 배지에서 혈청의 종류 및 농도변화가 난포의 소 난자의 체외성숙에 미치는 영향 : HEPES buffer를 첨가한 성숙배지에서 소 난자의 성숙률에 대한 FCS, CS 및 BSA의 효과를 비교한 결과 FCS 10% 및 20% 첨가시 각각 63.5% 및 59.0%의 성숙률을, CS 10% 및 20% 첨가시 각각 57.8% 및 58.5%의 성숙률을 그리고 5mg/ml의 BSA첨가시 23.5%의 성숙률을 보였다. BSA 첨가시의 성숙률은 FCS과 CS 첨가시의 성숙률보다 유의성 있게 낮았고($p < 0.05$) 배양후 변성된 난자의 비율도 20.6%로서 가장 높았다. FCS과 CS의 종류 및 농도변화간의 유의차는 인정되지 않았다(Table 1).

HEPES를 첨가하지 않은 배지에서 혈청의 종류 및 농도변화가 난포의 소 난자의 체외성숙에 미치는 영향 : HEPES buffer를 첨가하지 않은 성숙배지에서 소 난자의 성숙률에 대한 FCS, CS 및 BSA의 첨가효과를 비교한 결과 FCS 10% 및 20% 첨가시 각각 65.1% 및 61.1%의 성숙률을, CS 10% 및 20% 첨가시 각각 56.8% 및 61.3%의 성숙률을 그리고 5mg/ml BSA 첨가시 23.5%의 성숙률을 보였다. BSA 첨가시의 성숙률은 FCS과 CS 첨가시의 성숙률 보다 유의성 있게 낮았고($p < 0.05$) 배양후 변성된 난자의 비율도 27.6%로서 가장 높았다. FCS과 CS의 종류 및 농도변화간의 유의차는 인정되지 않았다(Table 2). 그리고 Table 1과 Table 2의 결과를 비교할때 HEPES를 첨가했을 때와 첨가하지 않았을 때의 평균성숙률은 각각 52.5% 및 53.7%로서 HEPES 첨가유무에 따른 유의차는 인정할

Table 1. Effects of Sera (FCS, CS, or BSA) on the Maturation of Bovine Extrafollicular Oocytes Cultured in TCM 199 with HEPES

Type of serum	Conc. of serum(%)	No. oocytes examined	Stage of maturation*			Maturation rate(%)
			Deg	GV-TI	MII	
FCS	10	52	4	15	33	63.5 ^a
	20	39	3	13	23	59.0 ^a
CS	10	45	5	19	26	57.8 ^a
	20	41	3	14	24	58.5 ^a
BSA	5(mg/ml)	34	7	19	8	23.5 ^b

*Deg : Degeneration, GV-TI : Germinal Vesicle-Telophase I,
 MII : Metaphase II

a,b : Different superscripts denote significant differences ($p < 0.05$).

Table 2. Effects of Sera (FCS, CS, or BSA) on the Maturation of Bovine Extrafollicular Oocytes Cultured in TCM 199 without HEPES

Type of serum	Conc. of serum(%)	No. oocytes examined	Stage of maturation*			Maturation rate(%)
			Deg	GV-TI	MII	
FCS	10	43	3	12	28	65.1 ^a
	20	36	4	10	22	61.1 ^a
CS	10	37	5	11	21	56.8 ^a
	20	31	4	7	20	61.3 ^a
BSA	5(mg/ml)	29	8	14	7	24.1 ^b

*Deg : Degeneration, GV-TI : Germinal Vesicle-Telophase I,
 MII : Metaphase II

a,b : Different superscripts denote significant differences ($p < 0.05$).

Table 3. Effects of Co-Culture with Granulosa Cells on the Maturation of Bovine Extrafollicular Oocytes

Granulosa cells	No. oocytes examined	Stage of maturation*			Maturation rate(%)
		Deg	GV-TI	MII	
-	52	4	15	33	63.5
+	38	3	10	25	65.8/

The maturation medium was TCM 199 supplemented with 10% of FCS and HEPES.

*Deg : Degeneration, GV-TI : Germinal Vesicle-Telophase I,
 MII : Metaphase II

수 없었다.

과립막세포의 첨가가 난포의 소 난자의 체외 성숙에 미치는 영향 : 과립막세포를 성숙난포로부터 채취하여 배지에 첨가하여 소 난자의 체외 성숙에 미치는 영향을 알아본 결과 과립막세포

를 첨가하였을 때와 첨가하지 않았을 때의 성숙률은 각각 65.8% 및 63.5%로서 과립막세포의 첨가가 소 난자의 체외성숙까지는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Table 3).

고 찰

소 난자의 체외배양시 배지는 난자와 직접 접촉하고 있기 때문에 배양성공여부에 매우 중요한 요인이 되며 난자에 대한 접합한 환경을 제공하기 위해 여러가지 첨가제가 첨가되어 왔으며 그 중 혈청은 단백질 공급원으로서 일반적으로 배지에 첨가되어 왔다^{1,9)}.

Sreenan²¹⁾은 소 난자의 체외배양시 감수분열 제1중기나 제2중기에 도달하는 난자는 난포액에서 배양했을 때보다 배지에 혈청을 첨가해서 배양했을 때 더 높았다고 하였고 Thibault 등²²⁾은 배지에 혈청의 첨가가 난구세포와 생존성을 높이고 난자의 감수분열개시에 좋은 효과를 미치는 것은 간접적으로 방선관을 통해서 일어날 것이라고 주장하였다. Choi 등⁵⁾은 마우스 난자의 성숙배지에 FCS를 첨가했을 때 난자의 자발적인 투명대 경화작용을 억제하여 정자침입률을 증가시켰고 효소에 의한 투명대 용해시간도 단축시켰다고 보고하였다.

Sanbuissho와 Threfall¹⁹⁾은 혈청중에서도 standing estrus 중인 암소로부터 얻은 혈청의 첨가에 의해 체외에서 성숙된 소 난자의 체외수정률은 증가시켰지만 체외성숙률에는 영향을 미치지 않은 것으로 보고하였고 Lu 등¹⁷⁾과 Xu 등²³⁾은 발정암소혈청의 첨가로 초기 소 수정란의 발달을 높여 주었다고 보고하였다.

한편 Leibfried-Lutledge 등¹⁵⁾은 BSA와 낮은 용량의 FCS(0.1 혹은 1.0%) 첨가는 높은 용량의 FCS(5, 10 혹은 20%) 첨가보다 소와 햄스터에서 난자의 생존성과 성숙률이 낮았고 FCS는 FSH작용에 의한 난구세포팽윤에 필요하며 난구세포의 생존성과 제1차 감수분열 완료를 촉진시켰고 BSA첨가시 난구세포팽윤이 관찰되지 않았다고 보고하였다.

본 실험에서 난포외 소 난자의 체외성숙에 대한 혈청의 종류(FCS과 CS)와 농도(10%와 20%)에 따른 효과는 유의차가 인정되지 않았지만 5mg/ml BSA첨가시 다른 혈청 첨가군에 비해 유의성 있게 성숙률이 낮고, 배양과정중 변성된 난자는 가장 많이 발생하였다. 또한 난구세포의

팽윤정도도 다른 혈청첨가군에 비해 불량하였다. Canfield 등³⁾은 normal steer serum과 BSA 첨가시 소 수정란 발달에 효과에 있어서 별 차이가 없었고 BSA첨가만으로도 소 수정란 발달을 유지하는 것으로 보아 혈청중 albumin이 수정란 발달에 중요한 역할을 한다고 보고하였지만 본 시험의 결과 BSA는 난포외 소 난자의 체외배양에는 부적합한 것으로 사료된다.

배양과정중 배지의 일정한 pH유지는 매우 중요한 것으로 알려져 있으며^{4,10,14,20)} 본 실험에서 5% CO₂ 공급하에 2,200mg/L NaHCO₃가 들어 있는 TCM 199에 25mM의 HEPES buffer 첨가가 난포외 소 난자의 체외성숙률에 미치는 영향을 조사해본 결과 HEPES 첨가시 52.5%였고, HEPES를 첨가하지 않았을 때는 53.7%로서 HEPES buffer의 첨가여부는 난포외 소 난자의 체외성숙에 대한 영향은 거의 없었으며 이와 관련된 보문은 접할 수 없었다.

Motlik과 Fulka¹⁸⁾는 토끼에서 그리고 Xu 등²³⁾은 소에서 과립막세포의 첨가는 수정후 난자의 발육능을 높여 주는 것으로 보고하였고, Crister 등⁶⁾은 과배란 처리를 한 소의 난포로부터 채취한 과립막세포를 첨가한 배양에서 핵성숙률, 수정률 및 모성전핵 형성률에는 차이가 없었으나 과립막세포를 첨가하지 않은 배양에서는 더 이상의 난자발육이 이루어지지 않았고, 과립막세포를 첨가한 배양에서는 난자중 36%가 상실배기와 배반포기로 발육한 것으로 보아 과립막세포와 난구세포에 둘러싸인 난자와의 상호작용이 체외성숙 과정중 난자의 발달완료에 관여하는 것으로 보고하였다.

Thibault 등²²⁾은 과립막세포는 소, 양, 돼지 및 토끼에서 최종 난자성숙의 개시에 절대적으로 필요하며 세포질 성숙과 관여되는 단백질합성을 시킨다고 보고하였고, Fukui와 Ono¹⁰⁾는 과립막세포의 배지첨가는 소 난자의 체외성숙률에 별 영향을 미치지 않았으나 체외수정률과 배반포기까지의 분할률을 높여 주었고, 배반포기 수정란의 세포수는 과립막세포를 첨가하지 않았을 때보다 높았으나 유의차는 없었다고 보고하였다.

본 실험에서 성숙 난포로부터 채취한 과립막세포를 ml당 5x10⁶개의 세포를 배지에 첨가한

결과 소 난자의 체외성숙률은 65.8%로서 첨가하지 않았을 때의 63.5%보다 약간 높았으나 유의차는 없었으며 이 결과는 과립막세포의 첨가가 소 난자의 체외성숙률에는 영향을 미치지 않았다는 Crister 등⁶⁾과 Fukui와 Ono¹⁰⁾의 결과와 일치하는 것으로서 과립막세포의 첨가가 소 난자 성숙에 대한 영향은 실험을 더 진행시켜 수정률 및 그 후의 발육능 등을 검토하는 것이 필요하다고 사료된다. 본 실험의 결과를 종합하여 볼때 FCS와 CS가 BSA에 비해 뛰어난 단백질 공급원임이 밝혀졌고 혈청의 종류 및 농도변화, HEPES와 과립막세포의 첨가유무는 난포의 소 난자의 체외성숙에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

결 론

난포의 소 난자의 체외배양시 배지에 첨가한 혈청, HEPES 및 과립막세포가 체외성숙률에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. HEPES를 첨가한 배지에서 FCS 10% 및 20% 첨가시 각각 63.5% 및 59.0%의 성숙률을, CS 10% 및 20% 첨가시 각각 57.8% 및 58.5%

의 성숙률을 그리고 5mg/ml의 BSA 첨가시 23.5%의 성숙률을 보였으며 BSA첨가시의 성숙률은 혈청을 첨가한 다른 4군에 비해 유의성 있게 낮았다($p < 0.05$).

2. HEPES를 첨가하지 않은 배지에서 FCS 10% 및 20% 첨가시 각각 65.1% 및 61.1%의 성숙률을, CS 10% 및 20% 첨가시 각각 56.8% 및 61.3%의 성숙률을 그리고 5mg/ml BSA첨가시 23.5%의 성숙률을 보였으며 BSA 첨가시의 성숙률은 혈청을 첨가한 다른 4군에 비해 유의성 있게 낮았다($p < 0.05$).

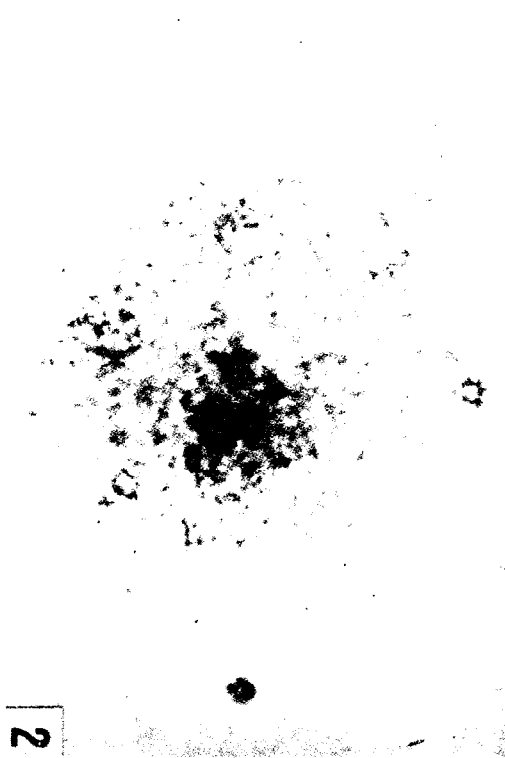
3. 배지에 과립막세포를 첨가했을 경우와 안했을 경우 각각 65.8% 및 63.5%의 성숙률을 보였으며 유의차는 없었다.

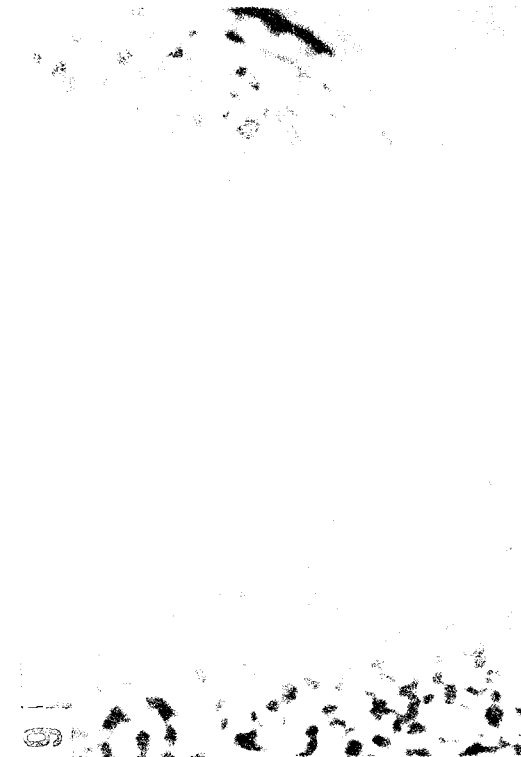
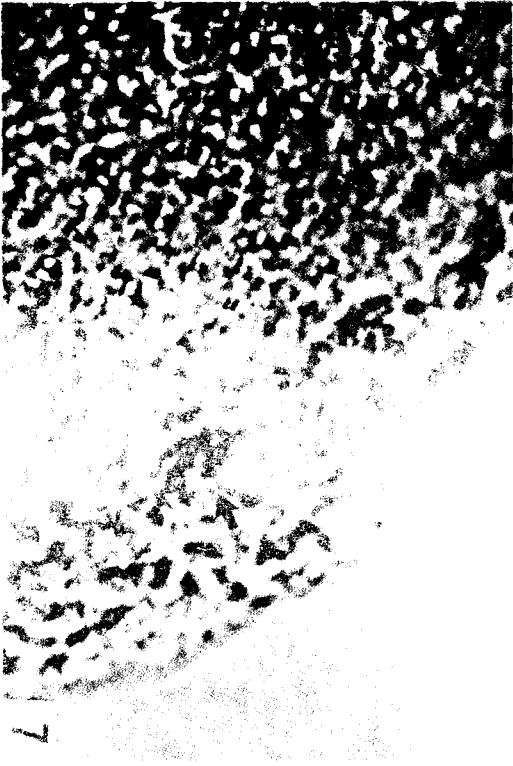
이상의 결과를 종합하면 FCS와 CS가 BSA에 비해 뛰어난 단백질 공급원임이 밝혀졌고 혈청의 종류 및 농도변화, HEPES와 과립막세포의 첨가유무는 난포의 소 난자의 체외성숙에 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

사사: 본 실험과 논문이 완성되기까지 많은 도움과 조언을 주신 서울대학교 수의과대학 권오경 선생님께 깊은 감사를 드립니다.

Legend's for figures

- Fig. 1. An extrafollicular bovine oocyte with compact cumulus cells. $\times 100$
- Fig. 2. An extrafollicular bovine oocyte with expanded cumulus cells. $\times 100$
- Fig. 3. An oocyte at the metaphase of the second meiotic division fixed at 24 hrs after culture, showing first polar body. $\times 100$
- Fig. 4. A bovine oocyte at the early metaphase I (arrow). $\times 1000$
- Fig. 5. A bovine oocyte at the early anaphase I (arrow). $\times 1000$
- Fig. 6. A bovine oocyte at the anaphase I (arrows). $\times 1000$
- Fig. 7. A bovine oocyte at the telophase I (arrows). $\times 1000$
- Fig. 8. A bovine oocyte at the metaphase II (arrows). $\times 400$





참 고 문 헌

1. Allen, R. L., Bondioli, K.R. and Wright, R.W. : The ability of fetal calf serum, new-born calf serum and normal steer serum to promote the in vitro development of bovine morulae. *Theriogenology* (1982) 18(2) : 185~189.
2. Ball, G.D., Leibfried, M.L., Ax, R.L. and First, N.L. : Maturation and fertilization of bovine oocytes in vitro. *J. Dairy Sci.* (1984) 67 : 2775~2785.
3. Canfield, R.W., Toole, R.J., Gwazdauskas, F.C., Vinson, W.E. and Whittier, W.D. : In vitro development of bovine morulae in bovine serum albumin, normal steer serum and uterine flushings. *Theriogenology* (1986) 26(5) : 561~568.
4. Carney, E.W. and Bavister, B.D. : Regulation of hamster embryo development in vitro by carbon dioxide. *Biol. Reprod.* (1987) 36 : 1155~1163.
5. Choi, T.S., Mori, M., Kohmoto, K. and Shoda, Y. : Beneficial effect of serum on the fertilizability of mouse oocytes matured in vitro. *J. Reprod. Fert.* (1987) 79 : 565~568.
6. Crister, E.S., Leibfried-Rutledge, M.L., Eyestone, W.H., Northey, D.L. and First, N.L. : Acquisition of developmental competence during maturation in vitro. *Theriogenology* (1986) 25(1) : 150 (Abs.).
7. Edwards, R.G. : Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* (1965) 208 : 349~351.
8. Eppig, J. J. and Schroeder, A.C. : Culture system for mamalian oocyte development : progress and prospects. *Theriogenology* (1986) 25(1) : 97~106.
9. Fukui, Y., Ishida, S., Terawaki, Y. and Ono, H. : Effects of synthetic media and nutrition sources on in vitro maturation of bovine follicular oocytes. *Res. Bull. Obihiro Univ.* (1981) 12 : 185~193.
10. Fukui, Y. and Ono, H. : Effects of sera, hormones and granulosa cells added to cultute medium for in-vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J. Reprod. Fert.* (1989) 86 : 501~596.
11. Gandolfi, F. and Moor, R.M. : Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fert.* (1987) 81 : 23~28.
12. Kane, M.T. : The effects of pH on culture of one-cell rabbit ova to blastocysts in bicarbonate-buffered medium. *J. Reprod. Fert.* (1974) 38 : 477~480.
13. Kane, K.T. : Bicarbonate requirements for culture of one-cell rabbit ova to blastocysts. *Biol. Reprod.* (1975) 12 : 552~555.
14. Kane, M.T. : Culture media and culture of early embryos. *Theriogenology* (1987) 27(1) : 49~57.
15. Leibfried-Lutledge, M.L., Crister, E.S. and First, N.L. : Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on in vitro maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. *Biol. Reprod.* (1986) 35 : 850~857.
16. Lindner, G.M., Dickey, J.F. and Hill, J.R. : Effects of bovine serum albumin concentration on the development of bovine embryos in vitro. *J. Anim. Sci.* (1983) 57(2) : 466~472.
17. Lu, K.H., Gordon, I., Gallagher, M. and McGovern, H. : Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. *Vet. Rec.* (1987) 121 : 259~260.
18. Motlik, J. and Fulka, J. : Fertilization of rabbit oocytes co-cultured with granulosa cells. *J. Reprod. Fert.* (1981) 63 : 425~429.
19. Sanbuissho, A. and Threlfall, W.R. : The effects of estrous cow serum on the maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte in vitro. *Theriogenology* (1985) 23(1) : 266(Abs.).
20. Smith, B.J., Spire, M.F., Davis, D.L. and Schall

- les, R.R. : Bovine embryo development in Dulbecco's phosphate buffered saline and Hams F-10 medium with HEPES buffer. *Theriogenology* (1986) 25(1) : 119(Abs.).
21. Sreenan, J. : In vitro maturation and attempted fertilization of cattle follicular oocytes. *J. Agric. Sci., Camb.* (1970) 75 : 393~396.
22. Thibault, C., Szollosi, D. and Gerard, M. : Mammalian oocyte maturation. *Reprod. Nutr. Develop.* (1987) 27(5) : 865~896.
23. Xu, K.P., Greve, T., Callesen, H. and Hyttle, M. : Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro. *J. Reprod. Fert.* (1987) 81 : 501~504.

Effects of Sera, HEPES and Granulosa Cells Added to Culture Medium on *In Vitro* Maturation of Extrafollicular Bovine Oocytes

Jun-Hoi, Hur, D.V.M., M.S., Woo-Suk, Hwang, D.V.M., Ph.D.
and Coong-Ho, Jo, D.V.M., Ph.D.

College of Veterinary Medicine, Seoul National University

Abstract

Immature bovine oocytes were cultured to investigate whether the addition of FCS(10% or 20%), CS (10% or 20%) or BSA(5mg/ml) to culture medium with or without HEPES and co-culture with granulosa cells affect the frequency of *in vitro* maturation of extrafollicular bovine oocytes. After culture, the maturation rates were examined by the presence of 1st polar body and nuclear configuration.

The maturation rate when FCS and CS as protein supplement were added to culture medium with or without HEPES was significantly higher than when BSA was added, and the maturation rate of extrafollicular bovine oocytes co-cultured with granulosa cells was higher than that cultured without granulosa cells, but there was no significant difference.

FCS and CS were shown to be superior protein supplement when compared to BSA, and serum concentration, HEPES and co-culture with granulosa cells did not affect the *in vitro* maturation of extrafollicular bovine oocytes.

Keywords : Bovine, extrafollicular, oocyte, *in vitro*, maturation.