

정자처리와 공배양이 체외성숙된 돼지 난포란의 분할에 미치는 영향¹

이장희 · 김창근* · 정영채* · 박충생**

국립종축원

Effect of Sperm Treatment and Co-culture on Cleavage of Porcine Oocytes Matured *In Vitro*¹

J. H. Lee, C. K. Kim, Y. C. Chung and C. S. Park

National Animal Breeding Institute

SUMMARY

The objective of this study was to develop an effective *in vitro* production system capable of obtaining more porcine embryos from immature oocytes. These experiments were conducted to examine the effect of sperm factor on the IVF and IVD, and the effect of coculture with somatic cells on the IVD of embryos. Although the concentration of epididymal sperm for IVF did not affect on cleavage rate, but 5×10^5 sperm/ml showed the highest cleavage rate(48.7%) and the developmental potential of IVF oocytes from this concentration was also greatly higher($P < 0.05$) than those from other sperm concentrations. The treatment with heparin for sperm capacitation significantly($P < 0.05$) increased the cleavage rate of oocytes, whereas the cleavage index between the oocytes fertilized with caffeine- or heparin-treated sperm did not differ but these chemical sperm treatments greatly increased the index compared with the control. The highest cleavage rate(47.7%) was obtained by IVF with 4°C-stored sperm for 12hrs and the cleavage rate from fresh sperm was significantly higher($P < 0.05$) than that from frozen sperm, but the developmental potential after IVF was slightly high from the frozen sperm. The cleavage rate of IVF oocytes cocultured with oviductal epithelial cells and cumulus cells was 76.3% and 72.9%, respectively. There was no difference between two coculture systems but this rate was significantly higher($P < 0.05$) than that of medium alone(42.0%).

Key words: sperm treatment, cleavage, porcine oocytes

서 론

돼지의 체외수정에서 정자의 농도는 다정자침입

과 밀접한 관련이 있기때문에 체외수정시 특히 고려되어야 할 주요 요인으로 강조되어 왔으며(Hunter, 1991; Shamsuddin 등, 1993), 최근의 연구에서는 체외수정시의 정자 농도가 낮아지는 경향에

¹ 이 논문은 1991년도 한국과학재단의 박사학위 연구지원비에 의하여 연구되었음.

* 중앙대학교 산업대학(College of Industrial Studies, Chung-Ang University)

** 경상대학교 농과대학(College of Agriculture, Gyeong-Sang University)

있다(Wang 등, 1992). 특히 Ding 등(1992)은 수정시 낮은 정자농도에서 정상적인 수정이 많았고 이를 위해서는 낮은 농도에서 수정시간을 다소 연장시키는 것이 효과적이라 한 바 있다.

체외수정시 정자의 수정능획득 방법으로는 caffeine, heparin, calcium ionophore, caffeine과 heparin 또는 calcium ionophore의 병용처리, PAF(platelet activating factor) 및 lysophosphatidylcholine 등 여러가지 화학제의 처리가 이용되어 왔고 그 결과는 연구자들에 따라 차이가 많다(Handrow 등, 1986; Parrish 등, 1988; Lecierc 등, 1990; Niwa와 Ohgoda, 1988).

돼지의 체외수정에 이용된 정자로는 사출된 신선(Hamano 등, 1989) 또는 동결정자(Soejima 등, 1983) 및 정소상체 미부의 신선(Iritani 등, 1978) 또는 동결정자(Nagai 등, 1988)가 이용되어 왔으며 보존상태에 따른 정자의 조건이 체외수정율에 크게 영향하기 때문에 체외수정시 정자의 확보는 커다란 문제점으로 대두되어 왔다(Nagai 등, 1984; Almlid와 Johnson, 1988; Hashizume 등, 1990; Waberski 등, 1994).

한편 높은 발달단계의 체외수정란을 확보하기 위하여 여러가지 방법들이 시도되고 있으나 최근 가장 보편적인 방법으로는 체세포와의 공배양이 시도되고 있다. 돼지수정란과의 공배양에 이용되는 체세포로는 돼지난소의 fibroblast(pOF), 난관상피세포, 난구세포, 태아의 fibroblast monolayer 등이 있다(White 등, 1989). 최근에 Yoshida 등(1989)과 Mattioli 등(1989)은 체외수정란을 미경산돈에 외과적으로 이식하여 높은 발달단계의 배반포기 수정란을 얻었으며, 이들중 Mattioli 등(1989)은 이들 수정란의 일부를 이식하여 1마리에서 9두의 산자를 생산하였으나 아직도 체외수정후 배발생능이 매우 저조한 실정에 있다.

이에 본 연구는 체외수정시 정자처리와 농도 및 체외수정후 체세포와의 공배양을 통해서 난포란으로부터 보다 효과적인 수정란 생산방법을 모색하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시난자

본 실험에 공시된 난포란은 도축장에서 도살직후 난포기의 난소로부터 적출하여 inverted microscope(Olympus SZ-PT, Japan)하에서 난구세포층이 충분한 난자-난구세포 complex만을 선별하여 공시하였다.

2. 난포란의 체외성숙배양액

Yoshida 등(1990, 1992)의 방법에 따라 제조된 TCM 199 Earl's salt에 hCG (10 IU/ml, Chorulon, Intervet Co., Holland)와 PMSG(10 IU/ml, Folligon, Intervet Co., Holland)을 첨가하여 micromilipore filter(0.2 μ m)로 여과시킨 후 39 $^{\circ}$ C, 100% 습도, 95% air, 5% CO₂ incubator (Model No. 2300, Sheldon, USA)에서 12시간 전 배양시킨 후 pH 7.4로 조정하여 사용하였다.

3. 난포란의 체외성숙

성숙배양액을 4-well dish (Cat. No. 176740, Nunclon, Denmark)에 0.5ml씩 분주한 후 난구세포가 충실히 부착된 난포란을 well당 10~30개씩 넣고 멸균 파라핀오일로 피복한 후 39 $^{\circ}$ C, 100%습도, 95% air, 5% CO₂, incubator에서 42시간 배양하였다.

4. 정자준비

1) 정소상체미부의 신선정자

도축장에서 체중 120kg 이상의 2~3개월로부터 도살 직후 한쪽 정소에서 적출한 정소상체 미부를 4 $^{\circ}$ C 정도의 보온병에 보관하여 2시간 이내 실험실로 운반하였다. 운반된 정소상체 미부는 생리식염수로 2~3회 세척후 Niwa 등(1988)의 방법에 따라 채취하였다. 채취된 정자는 정장내 수정능 억제물질을 제거하기 위해 수정기본배양액으로 5~10배 희석하고 300 \times g에서 10분간 2회 반복 원심분리하였다. 수정능 억제물질이 제거된 정자는 즉시 체외수정능을 유기시켜 체외수정에 공시하거나 수정 기본배양액에 희석하여 12시간 보존(4 $^{\circ}$ C)하여 공시하였다.

2) 정소상체 미부의 동결정자

정소상체 미부에서 채취된 정액 중에서 활력이

Table 1. Chemical composition of diluent for freezing of epididymal spermatozoa

	Component	Concentration
1st diluent	Tes-N-Tris(hydroxymethyl)methy 2 aminomethane sulfonic acid	1.20 g
	Tris(hydroxymethyl) aminomethane	0.40 g
	Glucose	3.00 g
	Sodium lauryl sulfate.....	0.16 g
	Penicillin G	250-1000 IU /ml
	Streptomycin sulfate.....	0.10 g
	Catalase	159 IU /ml
	Egg yolk	20%(v/v)
	Distilled water	up to 100ml
	2nd diluent	1st diluent plus 4%(v/v) glycerol

양호(80% 이상)하고 미성숙 또는 기형율이 낮은 정액(10% 이내)만을 동결하였다. 정자 동결보존액은 Soejima 등(1983)의 방법에 준하되 catalase를 첨가하여 제조하였으며, 보존액 조성은 Table 1과 같다.

동결과정은 Chung과 Im(1979)의 방법에 따라 실시하였으며 최종 희석된 정자는 $5 \sim 10 \times 10^7 / 0.5$ -ml straw의 농도로 포장하였다. 동결된 straw의 용해는 $38 \sim 42^\circ\text{C}$ 항온수조에서 20~60초간 실시하였으며 용해후 활력이 60% 이상의 양호한 개체의 정자만 체외수정에 공시하였다.

5. 체외수정

1) 체외수정 기본 배양액

Yoshida 등(1990)의 방법에 따라 제조된 TCM 199 Earl's salt 용액을 micromilipore filter(0.2 μ m)에 여과시키고 pH 7.8 로 조정한 다음 4-well dish에 각 well당 0.5 ml씩 분주한 후 12시간 전배양시켰다.

2) 정자의 전처리

정소상체 미부의 신선 또는 동결정자(2 straw)는 caffeine(2mM) 또는 heparin (100ug/ml)이 첨가된 수정 배양액으로 재부유하였다. 양호한 활력을 갖는 정자를 얻기 위하여 1,000 rpm에서 0.5~1분

간 원심분리하는 강제 swimp up법으로 죽은 정자 또는 이물질을 침전시켰다. 상층액을 1,500 rpm에서 5분간 다시 원심분리한후 상층액을 제거하여 운동 정자의 농도가 $10 \times 10^7 / \text{ml}$ 되게 재부유시켜 Kim 등(1990)의 방법에 따라 0.5~1시간 전배양하였다.

3) 체외수정

체외성숙이 끝난 난포란을 수정 배양액이 들어 있는 4-well dish의 well 당 10~30개씩 옮긴 후 수정능 획득 전처리가 끝난 정자는 처리별 0.05~50 $\times 10^6 / \text{ml}$ 의 농도로 주입하고 멸균 파라핀오일로 피복한 다음 39°C , CO_2 incubator에서 6~7시간동안 수정시켰다.

6. 수정란의 체외배양

수정란을 sodium pyruvate(40 $\mu\text{g} / \text{ml}$), glucose (1.0 mg /ml), sodium lactate(60% syrup ; 3.7 μ l/ml), dibekacin sulphate (100 $\mu\text{g} / \text{ml}$), glutamine(0.146 $\mu\text{g} / \text{ml}$) 및 10%(v/v) FCS가 포함된 TCM 199 Earl's salt(발생배양액)에 옮겨 수정후 120시간까지 배양하였으며 매 24시간마다 신선배양액으로 1/2씩 교환하였다. 한편 수정후 일부의 난포란은 난관상피세포 또는 난구세포와 공배양하였다.

1) 난관상피세포의 준비

도축장에서 수집한 황체기의 난관(누두부-자궁선단부)을 난관-자궁접속부를 절단하고 곧게 편 후 난관상피층이 잘 분리되도록 난관 전체를 가볍게 문지른 다음 누두부에서 난관-자궁접속부쪽으로 TCM-199 Earl's salt(pH 7.4) 용액을 관류시켜 시험관에 5분간 정지시킨 후 상층액을 제거하였다. 침전물을 재부유시켜 1,500 rpm으로 10분간 원심분리하여 반복 세척하고 발생배양액으로 재부유하여 난관상피세포의 최종농도가 5×10^6 cell/ml 되도록 조정하였다.

2) 난구세포의 준비

난구세포는 5mm이상의 대난포에서 채취하였다. 대난포에서 난포액을 약간 흡입해 내고 세포수를 많이 얻기 위하여 난포를 가볍게 문지른 다음 나머지 난포액을 흡입해 내었다. 흡입된 난포액은 난관상피세포의 처리방법과 같은 방법으로 원심분리하고 최종농도의 세포수를 조정하였다.

3) 수정란의 발생능 판정

처리별 수정란의 발생성적을 분할율 또는 분할지수로 표시하였다. 분할지수는 Wright(1977)의 방법에서와 같이 처음 공시 수정란의 2, 4, 8, 16 및 32 배로 발생할 때 점수를 각각 1(2-세포기), 2(4-세포기까지 발생한 수정란), 3(8-세포기까지 발생한 수정란), 4(8-세포기까지 발생한 수정란) 및 5점(상실배까지 발생한 수정란)으로 구분하고 이들 발생 정도의 점수와 각 점수에서 조사된 수정란 수를 곱한 총합을 처리별 난할된 수정란의 총수로 나누었을 때의 값으로 하였다.

7. 통계분석

실험결과의 통계분석은 Minitab statistical software(Minitab, New York, 1985)의 일반선형모델을 사용하여 student's t-test로 유의성 검정을 하였으며 수정란의 난할율은 χ^2 -test로 유의성 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 체외수정시 정자농도가 체외성숙된 난포란의 분할에 미치는 영향

성숙배양액에서 42시간 체외성숙된 난포란을 정자농도가 다른 조건에서 체외수정하였을 때 체외수정 후 난할율과 분할지수는 Table 2와 같다.

체외수정시 정자농도가 5×10^5 /ml일 때 난할율과 분할지수가 가장 높게 나타났다. 또한 체외수정시 높은 농도보다는 낮은 농도에서 발생성적이 다소 높은 경향을 보였다.

이 결과는 Naito 등(1989)이 5×10^5 /ml의 정자농도로 체외 수정후 96시간까지 난할율이 53%였던 결과와 Yoshida(1989)가 4×10^5 /ml의 농도로 수정후의 분할율이 46~65%였던 결과보다 다소 낮았으며 Park 등(1990)이 사출정자로 5×10^5 /ml의 농도에서 38%의 수정율을 보였던 결과보다는 높았다. 또한 Nagai 등(1984)은 정소상체미부 정자의 농도가 8×10^8 /ml일 때 정자 침입율이 75%로 다른 농도에서 보다 높게 나타났으며 농도가 증가될수록 다정자침입도 증가되는 경향을 보고하였다. Iritani 등(1978)은 체외수정시 사출정자보다는 정소상체미부 정자의 수정율이 높다고 하였다. 이들 보고에서와 같이 대체로 낮은 농도가 정상수정율에 다소 유리한 것으로 나타난 것을 본 실험에서도 확인할 수 있었으며 Seizo와 Toyoda(1986)도 정자농도가 높을수록 정자침입율과 다정자침입율이 높았다고 하였다.

이와 같이 체외수정시 정자의 높은 농도는 정자 침입율은 높일 수 있으나 다정자침입때문에 최근에는 높은 난할율과 정상적인 발생성적을 얻기 위해서 정자의 농도는 차츰 낮아지고 있다(Hunter, 1991; Wang 등, 1992). 특히 Ding 등(1992)은 2.5×10^4 /ml농도로 8 ~ 10시간동안 수정시켰을 때 융성전핵 및 자성전핵 둘 다 가진 난자의 비율이 높아짐으로써 낮은 농도로 수정시간을 다소 연장시키는 것이 유리함을 보고하였다. 또한 소에서도 Shamsuddin 등(1993)은 다정자침입, 단위발생 및 융성-자성전핵의 비동기화 등을 줄이기 위해서 수정시 정자농도가 매우 중요함을 시사한 바 있다.

2. 정자의 수정능 획득방법이 체외성숙된 난포란

Table 2. Effect of sperm concentrations on cleavage of oocytes matured *in vitro*

Sperm conc. (cell /ml)	No. of oocytes ¹⁾ examined	No. of oocytes cleaved to					Total (%) ²⁾	Cleavage index ³⁾ ($\bar{x} \pm SD$)
		2-cell	4-cell	8-cell	16-cell	M		
5×10^4	73	8	8	8	3	1	29(40.1±2.6)	2.26 ^a ±.31
5×10^5	130	15	10	22	11	5	63(48.7±7.5)	3.02 ^b ±.40
5×10^6	110	19	13	1	1	5	39(35.4±6.9)	1.85 ^a ±.36
5×10^7	66	9	9	1	3	1	23(35.0±4.1)	2.12 ^a ±.59

1) Oocytes were cultured for 48hrs in maturation medium containing LH(10 μ g/ml) and FSH (5 μ g/ml), then culured to 120h after *in vitro* fertilization with caffeine(2mM)-treated sperm.

2) Cleavage rate(%) was calculated from number of embryos cleaved until 120h, and expressed as mean±SD.

3) Cleavage index(CI) was assessed according to scores "1"(two-cell) to "5"(developed to morula stage;M) described by Wright's method(1977). CI based on number of normal blastomeres as measured by the formula for a geometric progression and was defined as :

$$CI = \frac{\sum Di Fi}{\sum Fi}$$

Where,

Di : ith score for developmental potential of embryos, i = 1, 2, 3, 4 and 5.

Fi : frequency corresponding to Di.

^{a, b} Values in same column with different superscripts are significantly different (P<0.05)

Table 3. Effect of sperm treatments on cleavage of oocytes matured *in vitro*

Sperm treatement	No. of oocytes ¹⁾ examined	No. of oocytes cleaved to					Total (%) ²⁾	Cleavage index ³⁾ ($\bar{x} \pm SD$)
		2-cell	4-cell	8-cell	16-cell	M		
Control	54	7	6	3	1		17(32.5±4.0) ^a	1.89±.53
Caffeine	95	10	12	7	4	2	35(36.2±4.5) ^a	2.26±.60
Heparin	52	7	8	7	2	3	27(50.1±8.5) ^b	2.40±.42

1) Oocytes were cultured for 42hrs in maturation medium containing LH(10 μ g/ml) and FSH(5 μ g/ml).

2), 3) CI : refer to Table 1.

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

의 분할에 미치는 영향

Caffeine 또는 heparin으로 전처리된 정자로 6~7시간 체외수정시킨 후 120시간까지의 난할율은 Table 3에서 보는 바와 같이 heparin처리에 의한 체외수정능획득이 유의적(P<0.05)으로 가장 높은 난할율을 나타내었다. 분할지수는 heparin 처리구가 2.39로 가장 높게 나타났으나 유의적인 차이는 없었다. 한편 caffeine처리에 의한 난할율은 대조구와 큰 차이가 없었으나 분할지수는 heparin처리구와 비슷한 수준이었다. 따라서 caffeine 과 heparin

처리에 의한 정자의 수정능획득이 대조구보다 정상적인 배발생성적이 다소 높은 경향을 나타내었다.

이와 같은 heparin처리의 결과는 Kim 등(1990)의 수정율보다 다소 높았다. 한편 소에서 Niwa와 Ohgoda(1988)가 caffeine 또는 heparin으로 처리된 정자의 수정후 정자침입율을 보고한 것과 Chik-amatsu 등(1989)이 heparin처리에서 웅성 및 자성 전핵형성율, 분할율 및 8-세포기 이상까지 발생한 수정란의 비율이 caffeine처리보다 높았다고 보고한 결과와 같은 경향을 나타냈다. Heparin처리

수정후 발생에 다소 효과적인 이유에 대해서 Handrow 등(1986)은 heparin이 세포내 Ca^{2+} 의 농도를 증가시킴으로써 정자의 수정능획득과정에 중요한 요인으로 작용한다고 하였으며, Parrish 등(1988)은 heparin이 정자세포막의 비안정화를 촉진하여 정자의 수정능획득에 효과적이라고 하였다. Caffeine의 효과에 대해서 Kusunoki 등(1989)은 산양 정자에서 caffeine첨가시 정자활력의 증진에는 효과적이었으나 부적절한 시간의 노출에서는 활력 및 생존성이 크게 저하됨으로서 caffeine이 heparin보다 독성이 강함을 보고하였다.

3. 정자의 보존방법이 체외성숙된 난포란의 분할

에 미치는 영향

정소상체 미부 정자의 보존상태에 따른 난할율은 Table 4에서 보는 바와 같이 신선정자, 동결정자 및 12시간 보존된 정자의 비교에서 신선정자의 경우가 동결정자보다 유의적($p < 0.05$)으로 높은 난할율을 나타내었다. 그러나 분할지수에 의한 발생성적은 동결정자의 경우가 분할지수 2.78로 동결되지 않은 정자보다 정상적인 발생이 다소 높은 것으로 나타났다.

동결정자의 결과는 Nagai 등(1988)의 정자침입율과 다정자침입율이 높았던 결과보다 크게 개선된 수준의 난할율과 발생성적을 보여주었으며, 또한 Wang 등(1992)이 정소상체 미부 정자로 체외수정

Table 4. Effect of epididymal sperm treatments on cleavage of oocytes matured *in vitro*

Sperm treatment	No. of oocytes ¹⁾ examined	No. of oocytes cleaved to						Cleavage index ³⁾ ($\bar{x} \pm SD$)
		2-cell	4-cell	8-cell	16-cell	M	Total (%) ²⁾	
Unfrozen sperm	145	24	15	16	8	4	68(46.3 \pm 4.8) ^a	2.32 \pm .32
Stored(4°C) sperm for 12hrs	55	15	2	2	2	4	25(47.7 \pm 10.3) ^a	2.12 \pm .37
Frozen sperm ³⁾	132	12	6	6	7	5	36(27.2 \pm 8.1) ^b	2.78 \pm .47

1) Oocytes were cultured for 42hrs in maturation medium containing hCG(10 IU/ml) and PMSG(10 IU/ml), then cultured to 1w20h after *in vitro* fertilization with heparin(100 μ g/ml)-treated sperm.

2) CI : refer to Table 1.

3) Percentage of motile spermatozoa at IVF was >60%.

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

Table 5. Effect of co-culture system on developmental potential of oocyte after *in vitro* fertilization

Co-culture system	No. of oocytes ¹⁾ examined	No. of oocytes cleaved to						Cleavage index ²⁾ ($\bar{x} \pm SD$)
		2-cell	4-cell	8-cell	16-cell	M	Total (%)	
Control	24	2	4	3	1	-	10(42.0 \pm 3.5) ^a	2.30 \pm .50 ^a
Cumulus cell	90	9	13	10	14	19	65(72.9 \pm 5.1) ^b	3.33 \pm .24 ^b
Oviductal epithelial cell	96	11	11	14	11	26	73(76.3 \pm 2.3) ^b	3.43 \pm .13 ^b

1) Oocytes were cultured for 42hrs in maturation medium containing hCG(10 IU/ml) and PMSG(10 IU/ml), then cultured to 120h after *in vitro* fertilization with heparin-treated sperm.

2) CI : refer to Table 1.

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

후 48시간 배양에서 보고한 난할율보다도 높은 수준이었다. 한편 Zheng 등(1992)이 사출신선정자와 동결정자로 체외수정할 때 자동선택형성율이 후자가 높으며, 동결정자에서 수정율이 높아 발생성적이 양호했다고 보고한 바 있으며, Waberski 등(1994)은 액상정액의 경우에도 정자의 노화때문에 48시간 이상 보존하였을 경우에는 직진정자의 비율이 현저히 낮아진다고 하였다. 또한 Almlid와 Johnson(1988)은 동결 직후 보다 2시간 보존에서 정상 침체를 가진 정자의 비율이 높았고 보존시간이 경과할 수록 그 비율이 현저히 감소한다고 하였다.

4. 수정후 공배양 배발생에 미치는 영향

체외성숙 체외수정후 배발생배양액에서 난구세포 또는 난관상피세포와 공배양하여 120시간까지의 난할율은 Table 5에 나타난 바와 같다. 난관상피세포와의 공배양에서 가장 높은 난할율을 나타내었으며 분할지수도 역시 가장 높았다. 또한 이들 난구세포 또는 난관상피세포와의 공배양이 대조구보다 유의적($P < 0.05$)으로 높은 난할율과 분할지수를 나타냈다.

이와 같은 공배양의 결과는 돼지에서 White 등(1989)이 *in vivo*에서 생산한 2~16세포기의 수정란을 난관상피세포와 공배양하였을 때의 배반포와 부화배반포의 형성율과, Prather 등(1991)이 1~2세포기와 3~4세포기의 돼지수정란을 면양난관내에서 배양하였을 때의 상실배와 배반포형성율을 보고한 것보다 본 실험의 발생율이 현저히 낮았다. 그 원인은 Hyttel과 Niemann(1990)가 밝힌 바와 같이 체외성숙 체외수정란은 발생중 세포질내 공포형성때문에 비정상수정란의 발생율이 높은 것으로 사료되었다. 난구세포와 난관상피세포와의 공배양에 따른 난할율은 소에서 Behboodi 등(1992)이 각각 36% 및 40%였음이 보고 되었고 Rexroad와 Powell(1988)은 면양에서, Takada 등(1991)은 소에서 체내생산된 수정란을 난관상피세포 또는 난구세포와의 공배양하였을 때 단순배양액(Ham's F-10)에서보다 유의적으로 발생성적이 높았다고 하였다. 특히 소에서 Berg와 Brem(1990)은 난관상피세포보다 과립막세포가 상실배 및 배반포형성율이 높았다고 하였다. 그러나 Aoyagi 등(1990)은 체외성숙

및 체외수정란의 공배양에서 난관상피세포가 난구세포보다 배반포형성율이 높다고 하였으며 이상의 결과를 종합하여 볼 때 돼지에서 소와 같이 난구세포보다는 난관상피세포와의 공배양이 수정란 발생에 다소 효과적임을 알 수 있었다

적 요

본 연구는 미성숙난포란으로부터 다수의 돼지 수정란을 얻기 위한 효과적인 체외생산체계를 개발하기 위해 정자요인이 체외수정 및 발생에 미치는 영향과 수정후 체세포와의 공배양이 배발생에 미치는 영향을 조사하고자 하였다.

체외수정시 정소상체미부정자의 농도는 난할율에 유의적인 영향을 미치지 않았으나 5×10^5 /ml에서 가장 높았다(48.7%). 이 농도에서의 발생능은 다른 농도에서보다 현저히 높았다($P < 0.05$). 정자의 수정능획득을 위하여 caffeine보다 heparin처리에서 난할율이 유의적으로 높았으며($P < 0.05$), 분할지수는 이들 화학적 정자처리간에 차이가 없었으나 대조구보다는 현저히 높았다. 정소상체미부정자의 보존형태별 난할율은 4°C에서 12시간 보존할 때가 가장 높았으며 비동결정자가 동결정자보다 유의적으로 높았다($P < 0.05$). 그러나 분할지수로 나타낸 발생능은 동결정자에서 다소 높았다. 난관상피세포 및 난구세포와 공배양된 체외수정란의 난할율은 76.3% 및 72.9%로 난구세포보다 난관상피세포에서 다소 높았으며 이들의 난할율은 대조구보다 유의적으로 높았다($P < 0.05$). 분할지수로 나타낸 발생능은 두 공배양간에 차이가 없었으나 대조구보다 유의적으로 높았다($P < 0.05$).

참고문헌

- Almlid T and Johnson LA. 1988. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol additoin on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. J. Anim. Sci., 66:2899-2905.
- Aoyagi A, Fujii K, Iwazumi Y, Urakawa M and Ono H. 1990. Effects of culture systems on

- development of *in vitro* fertilized bovine ova into blastocysts. *Theriogenology* 34:749-759.
- Behboodi E, Anderson GB and BonDurant RH. 1992. Development of *in vitro* fertilized oocytes from pregnant and nonpregnant cows in oviductal epithelial and cumulus cell co-culture systems. *Theriogenology* 38: 1077-1084.
- Berg U and Brem G. 1990. Developmental rates of *in vitro* produced IVM-IVF bovine oocytes in different cell co-culture systems. *Theriogenology* 33:195(Abstr.).
- Chikamatsu N, Urakawa M, Fukui Y, Aoyagi Y and Ono H. 1989. *In vitro* fertilization and early development of bovine follicular oocytes matured systems and inseminated with spermatozoa treated by different methods. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 35:154-158.
- Chung JY and Im KS. 1979. Studies on the frozen boar semen. II. Effects of freeze-thawing on sperm acrosomic system and fertility. *Korean J. Anim. Sci.* 21:333-338.
- Ding J, Clarke N, Nagai T and Moor RM. 1992. Protein and nuclear changes in pig eggs at fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 31:287-296.
- Hamano S, Naito K, Fukuda Y and Toyoda Y. 1989. *In vitro* capacitation of boar ejaculated spermatozoa : effect of conditioned media prepared from preincubated sperm suspension. *Gamete Res.* 24:483-489.
- Handrow RR, Parrish JJ and First NL. 1986. Heparin stimulates calcium uptake by bovine sperm *in vitro*. *J. Androl.* 7(Suppl.):23 (Abstr.).
- Hashizume T, Tanimura I and Kanematsu S. 1990. Ultrastructures of the acrosome in frozen-thawed boar spermatozoa by the pellet freezing method. *Jap. J. Anim. Reprod.* 36:195-202.
- Hunter RHF. 1991. Oviduct function in pigs, with particular reference to the pathological condition of polyspermy. *Mol. Reprod. Dev.* 29:385-391.
- Hyttel P and Niemann H. 1990. Ultrastructure of porcine embryos following development *in vitro* versus *in vivo*. *Mol. Reprod. Dev.* 27:136-144.
- Iritani A, Niwa K and Imai H. 1978. Sperm penetration of pig oocytes matured *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 54:379-383.
- Kim SK, Lee MH, Lee MH and Shin YH. 1990. Studies on *in vitro* maturation and fertilization of porcine follicular oocytes. *Korean J. Anim. Reprod.*, 14:23-30.
- Kusunoki H, Sakaue M, Sato S and Konda S. 1989. Induction of the acrosome reaction in ejaculated goat spermatozoa by preincubation in chemically defined medium. *J. Exp. Zool.* 249:322-328.
- Lecierc P, Sirard MA, Chafouleas JG and Lambert RD. 1990. Decreased binding of calmodulin to bull sperm proteins during heparin-induced capacitation. *Biol. Reprod.* 42:483-489.
- Mattioli M, Bacci ML, Geleati G and Seren E. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 31:1201-1207.
- Nagai T, Niwa K and Iritani A. 1984. Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization *in vitro* of pig follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.* 70:271-275.
- Nagai T, Takahashi T, Masuda H, Shioyo Y, Kuwayama M, Fukushima M, Iwasaki S and Hanada A. 1988. *In vitro* fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 84:585-591.
- Naito K, Fukuda Y and Ishibashi I. 1989. Developmental ability of porcine ova matured in porcine follicular fluid *in vitro* and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 31:1049-1057.

- Niwa K and Ohgoda O. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on *in vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology* 30:733-741.
- Park SB, Park HK and Iritani A. 1990. *In vitro* fertilization in the pig. *Korean J. Anim. Sci.* 32:20-26.
- Parrish JJ, Parrish JS, Winer MA and First NL. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* 38:1171-1180.
- Prather RS, Sims MM and First NL. 1991. Culture of porcine embryos from one- and two-cell stage to the blastocyst stage in sheep oviducts. *Theriogenology* 35:1147-1151.
- Rexroad CE and Powell AM. 1988. Co-culture of ovine eggs with oviductal cells and trophoblastic vesicles. *Theriogenology* 29:387-397.
- Seizo H and Toyoda Y. 1986. *In vitro* fertilization of pig eggs with ejaculated spermatozoa preincubated at high sperm concentration. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 32:177-183.
- Shamsuddin M, Larsson B and Rodriguez-Martinez H. 1993. Maturation-related changes in bovine oocytes under different culture conditions. *Anim. Reprod. Sci.* 31:49-60.
- Soejima A, Masuda H, Waide Y and Matsukawa Y. 1983. Effects of dilution rate, pellet volume, packed volume in aluminium-pack, straw volume and freezing methods on the survival of boar spermatozoa. *人工受精研誌* 5:6-8.
- Takada N, Tsukamoto A, Kurokawa Y and Shioya Y. 1991. Effect of cumulus cells on the development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Jap. J. Anim. Reprod.* 37:9-13.
- Waberski D, Weitze KF, Lietmann C, Lubbert W zur Lage, Bortolozzo FP, Willmen T and Petzoldt R. 1994. The initial fertilizing capacity of longterm-stored liquid boar semen following pre- and postovulatory insemination. *Theriogenology* 41:1367-1377.
- Wang ZK, Wei PH, Wang, JZ Lei C and Kou MQ. 1992. Maturation and fertilization of porcine oocytes *in vitro*. *Theriogenology* 37:733-739.
- White KL, Hehnke K, Rickords LF, Southern LL, Thompson DL and Wood TC. 1989. Early embryonic development *in vitro* by coculture with oviductal epithelial cells in pigs. *Biol. Reprod.* 41:425-430.
- Wright RW. 1977. Successful culture *in vitro* of swine embryos to blastocyst stage. *J. Anim. Sci.* 44:844-858.
- Yoshida M. 1989. Improved viability of two-cell stage pig embryos resulting from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vivo*. *Jap. J. Anim. Reprod.* 35:34-37.
- Yoshida M, Ishizaki Y and Pursel VG. 1992. Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 31:68-71.
- Yoshida M, Ishizaki Y and Kawagishi H. 1990. Blastocyst formation by pig embryos resulting from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 88:1-8.
- Zheng YS, Fiser P and Sirard MA. 1992. The use of ejaculated boar semen after freezing in 2 or 6% glycerol for *in vitro* fertilization of porcine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 38:1065-1075.