

培養體系가 體外成熟 소 卵胞卵의 體外受精 및 胚 發達에 미치는 效果

조성근 · 송상현 · 정기화* · 강대진 · 박충생
경상대학교 농과대학 축산학과

Effects of Culture Systems on *In Vitro* Fertilization and Development of *In Vitro* Matured Bovine Follicular Oocytes

S. K. Cho, S. H. Song, K. H. Chung*, D. J. Kang and C. S. Park

Department of Animal Science, College of Agriculture, Gyeongsang National University

SUMMARY

This study was conducted to improve the *in vitro* maturation(IVM), *in vitro* fertilization (IVF) and *in vitro* developmental capacity of oocytes derived from slaughtered Korean native cattle. The recovered oocytes, obtained from a local slaughter house, were used completely surrounded by at least 3 layers of cumulus cells in combination with a homogeneous cytoplasmic pigmentation. *In vitro* maturation was induced in TCM-199 or Ham's F-10 supplemented with LH(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), FSH(35 $\mu\text{g}/\text{ml}$), estradiol-17 β (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) at 39°C under 5% CO₂ in air for 24 hours. Sperm from caudal epididymis and previously matured cumulus-oocytes complexes were cultured for 24 hours in 100 μl droplets of fertilization media under paraffin oil. The zygotes were cultured with media(TCM-199 with bovine oviductal epithelial cells or CR1aa) for 7 to 10 days.

The cleavage rate of IVM-IVF oocytes was significantly ($P < 0.05$) higher following maturation using Ham's F-10 (59.9%) than TCM-199 (51.6%). Development to the blastocysts among cleaved embryos was not significantly different between maturation media: Ham's F-10 (16.0%) and TCM-199(11.9%). However, the hatching rate was affected significantly ($P < 0.05$) on maturation media as 62.9% in Ham's F-10, compared with 41.2% in TCM-199. The cleavage rate of IVM-IVF oocytes was significantly ($P < 0.05$) higher following IVF using m-TALP medium (80.1%) than BO medium (51.6%). The percentage of *in vitro* developed blastocysts among cleaved embryos was not significantly different between fertilization media: BO (11.7%) and m-TALP (17.6%). The cleavage and the developmental rate to the blastocysts after IVF in m-TALP or condition medium(CM) with or without oviduct epithelial cell monolayer(OECM) was similar(80.1% and 17.6% in m-TALP, 83.8% and 19.4% in M-TALP with OECM, 82.9% and 18.9% in CM, 87.6% and 16.0% in CM with OECM, respectively). The percentage of *in vitro* developed blastocysts among cleaved embryos was significantly ($P < 0.05$) higher in TCM-199 medium co-cul-

* 축산기술연구소(National Livestock Research Institute)

tured with bovine oviductal epithelial cell monolayers(35.2%) than CR1aa medium(1.9%).

These results suggest that the most transferable IVF embryos could be produced from Ham's F-10, m-TALP and TCM-199 medium with bovine oviductal epithelial cell monolayers for IVM, IVF and IVC, respectively.

서론

소에 있어서 체외성숙과 체외배양에 이용되고 있는 배양액은 TCM-199(Eckert 등, 1995; Brackett 등, 1993; Mochizuki 등, 1991; Saeki 등, 1991; Lu 등, 1987)이 가장 보편적으로 사용되어져 왔고, 일부에서 체외성숙용 배양액으로는 Ham's F-10(Hawk 등, 1994 a, b; Xu 등, 1992, 1987)을 사용하였다. 그리고 Ham's F-10, Menezo's 2(B2) 그리고 몇가지 다른 배양액들은 체외배양액으로써 사용하였다(Hernandez-Ledezma 등, 1993; Kim, J-H 등, 1993; Rosenkrans 등, 1993; Bavister 등, 1992; Fukui 등, 1991).

체세포와의 공배양은 핵성숙뿐 아니라 세포질의 성숙에도 좋은 영향을 미치며 배발달율을 향상시킨다고 보고되고 있다(Lu 등, 1987; Xu 등, 1987; Crister 등, 1986). Granulosa cell은 체외성숙, 체외수정 후 배반포까지 발달율을 향상시킨다고 알려져 있다(Fukui와 Ono, 1989). Xu 등(1992)은 Ham's F-10 으로 성숙시켜 modified Tyrode's solution으로 수정시킨 후 각종 배양액으로 난관상피세포와 공배양한 결과, 상실배/배반포기까지의 발달율이 가장 높은 것은 Menezo's 2(B2) medium 이었다고 하였으며, Hawk와 Wall(1994)은 체외성숙용 배양액으로 TCM-199, Ham's F-10 및 Menezo's 2(B2)를 비교한 결과 배반포기까지의 발달율은 각각 28%, 40% 및 9%로써, 체외성숙용 배양액으로는 Ham's F-10이 후기배로의 발달에 좋은 영향을 미친다고 보고하였다.

체외수정용 배양액으로써 modified TALP(Parrish 등, 1986)와 BO medium(Brackett와 Oliphant, 1975)이 많이 이용되고 있으며, BO medium에는 13 mM glucose가 포함되어 있는 반면에 TALP medium에는 0~5 mM의 glucose 함유되어 있는데, glucose는 heparin의 수정능 획득 작용을

억제하거나 지연시키는 것으로 알려져 있다(Parrish 등, 1989). 체외수정용 배양액으로 TALP를 사용하였을 때는 수정시간이 18~24시간이었으나(Monson 등, 1992; Solti 등, 1992; Brackett 등, 1989; Eyeston 등, 1989; Fukui 등, 1989, 1988), BO를 사용했을 때는 6시간 정도로(Kajihara 등, 1990; Goto 등, 1988) 비교적 짧은 시간에서 수정되었다.

난관상피세포, 난관액, 난포액 및 난구세포들에 대한 작용 기전은 알려지지 않았으나 bovine(Ellington 등, 1991; Guyader와 Chupin, 1991; Ehrenwald 등, 1990; Parrish 등, 1989), equine(Ellington 등, 1993), porcine(Nagai와 Moor, 1990) 그리고 ovine(Gutierrez 등, 1993) 등에서 정자의 수정능획득에 도움을 준다고 알려져 있다.

Xu 등(1990)은 수정용 배양액에 BOEC를 첨가하여 높은 수정율을 보고하였고, Guyader와 Chupin(1991)은 난관상피세포와 6시간 동안 전배양한 신선정자는 높은 수정능획득율을 나타내었다고 보고하였다.

소 체외수정란의 8~16 세포기 발달중지 현상을 극복하고 발생능을 향상시키기 위하여 많은 연구자들은 초기 수정란을 난관에 이식하여 배양하는 방법(Leibfried-Rutledge 등, 1987), 여러 종류의 체세포와 공배양하는 방법(Rexroad 등, 1991, 1989; Ellington 등, 1990; White 등, 1989; Gandolfi 등, 1987) 그리고 배양액에 EDTA를 첨가하거나 삼투압을 조절하는(Lawitts와 Bigger, 1991) 등의 최적의 배양액 조성과 자궁액을 첨가하는 방법(Fischer 등, 1990) 및 난관상피세포를 전배양시켜서 일정한 배양조건을 유지하는 condition medium(CM)을 이용한 배양법(Eyeston 등, 1991, 1989) 등이 보고되고 있으나, 난관상피세포와 과립막세포와의 공배양이 채취와 배양에 용이하고, 발달중지현상의 극복뿐만 아니라 수정란의 발생능력 향상효과도 높이고 이용도가 높은 실정이다(Ellington 등, 1990; Eyeston과 First, 1989; Gandolfi 등, 1987). 난관

상피세포가 수정란의 발육증진에 대한 기전은 명확하지 않으나, 난관상피세포에서 분비되는 단백질, 혈청 albumin과 면역 globulin 등이 배란된 난자의 투명대에 결합하여 위란강내로 전이되어 수정란의 정상적인 발달과 trophic factor로 작용하는 것으로 알려져 있다(Boice 등, 1990; Buih 등, 1990; Gandolfi 등, 1989; Bavister, 1988). Rosenkrans과 First(1991)는 단순배양액 중의 하나인 CR1aa 배양액에 필수 및 비필수 아미노산을 첨가하여, 영양세포가 없는 조건하에서도, 소 수정란의 체외발달에 유익하다는 결과를 보고하였으며, Moreno와 Westhusin(1993)은 CR1 배양액에 아미노산 첨가 또는 buffalo rat liver(BRL) cell monolayer와의 공배양을 비교한 결과, 각각 비슷한 후기배로의 발달을 나타내었다.

본 연구에서는 도축된 한우에서 미성숙 난포란을 회수하여, 각각의 다른 배양액들을 이용하여 체외에서의 성숙, 수정 및 후기배로의 발달을 유도하여 배발달에 영향을 미치는 배양액들의 효과를 비교함으로써, 소의 체외수정란 생산성 향상을 위한 가장 적합한 배양체계를 구축하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 난소의 운반 및 난포란의 채취

본 실험에 공시된 난소는 도축장에서 도살된 한우의 암소에서 즉시 적출하여 penicillin G(100 units/ml)와 streptomycin(100 μ g/ml)이 함유된 생리식염수(25~30 $^{\circ}$ C)가 들어있는 보온병에 담아 3~4 시간 내에 실험실로 운반하였다. 미성숙 난포란을 채취하기 전에 난소 주위의 불필요한 조직을 제거하고 penicillin G(100 units/ml)와 streptomycin(100 μ g/ml)이 함유된 생리식염수(25~30 $^{\circ}$ C)로 3회 세척한 후 18 gauge의 바늘이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 2~7mm 난포란을 채취하였다. 난포란의 채취시 사용한 배양액은 5% FBS가 첨가된 TCM-199이나 Ham's F-10을 사용하였다. 흡입된 난포액은 13 ml의 시험관에 담아 5~10 분간 정치시킨 후 침전된 하부액을 5 ml의 피펫으로 흡입하여 60 mm 배양접시에 옮기고, 40 배 배율의 도립현미경(Olympus, Japan)에서 난포란을 수집한 후 기본배양액(TCM-199 또는 Ham's F-10 + 10% FBS)으로 4~5 회 세척하면서 선발하였다. 난포란의 선발은 Fig. 1과 같이 난구세포의 부착 정도와 세포질의 충실도에 따라 Wiemer 등(1991)의 방법에 준하여 최소한 3층 이상의 난구세포층과 세포질이 충실한 것을 선발하여 실험에 공시하였다.

2. 난포란의 체외성숙

난포란의 체외성숙은 25 mM HEPES가 첨가된

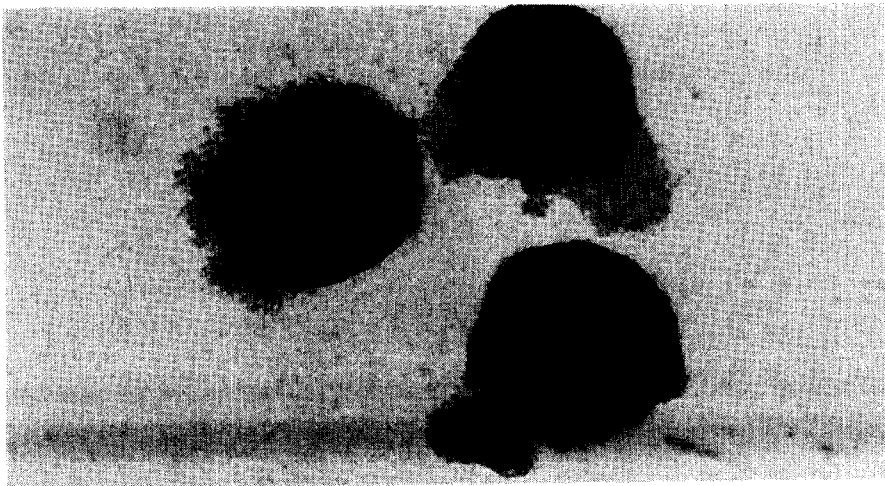


Fig. 1. Cumulus-oocytes complexes(COC) completely surrounded by at least 3 layers of cumulus cells in combination with a homogenous cytoplasmic pigmentation($\times 40$).

TCM-199(Earle's salt, Sigma Chem. Co., USA)과 Ham's F-10(Nutrient Mixture F-10[HAM], Sigma Chem. Co., USA)의 기본배양액을 사용하였으며, FBS(Gibco. Co., USA)는 56℃에서 30 분간 비등화시켜 0.2 μ m membrane filter(Gelman Sci., USA)로 여과한 후 10ml씩 tube(Falcon, USA)에 분주하여 -20℃에서 냉동보관하면서 사용하였다.

체외성숙용 배양액은 TCM-199에 sodium pyruvate(56 μ g/ml)를 첨가하거나 Ham's F-10을 사용하였다. 각각의 배양액에는 streptomycin(100 μ g/ml), penicillin G(100 units/ml)과 hormones 으로는 LH(10 μ g/ml), FSH(35 μ g/ml), estradiol 17 β (1 μ g/ml) 그리고 10 % FBS를 첨가하였다.

체외성숙은 Wierner 등(1991)의 방법에 준하여 각각의 체외성숙 배양액을 4-well dish(Nunc, Cat. No. 176740, Denmark)에 18 시간 이상 전 배양을 실시하여 평형을 유도한 다음, 체외성숙용 배양액에 각각 15~20 개의 난포란을 넣고 5% CO₂, 98~99% 습도, 39℃ CO₂ incubator에서 24 시간 동안 체외성숙을 유도하여, Fig. 2와 같이 난포세포의 팽창 정도와 세포질의 충실도 등으로 체외성숙도를 판정하여 체외수정에 공시할 난포란을 선발하였다.

3. 정자의 준비

정자는 개체차에 의한 수정율을 줄이기 위하여 2~3 마리의 한우로부터 각각 1 개의 정소를 적출하여 실험실에 운반 후 정소상체 미부 정자를 채취하였다. 채취된 정자는 caffeine(10 mM)이 첨가된 세척용 BO medium이나 heparin(5 units/ml)이 첨가된 m-TALP medium으로 활력이 높은 정자를 채취하기 위하여 5% CO₂, 98~99% 습도, 39℃ CO₂ incubator에서 swimming-up을 실시하였다. swimming-up을 유도하여 부유된 상층의 정자만을 채취하여 500 g 에서 5 분간씩 2회 원심분리한 후, BSA(5 mg/ml), caffeine(5 mM) 및 heparin(10 μ g/ml)이 첨가된 수정용 BO medium 또는 BSA(6 μ g/ml), caffeine(5 mM) 및 glucose(5 mM)가 첨가된 m-TALP medium을 각각 5 ml 첨가하여 다시 500 g 에서 5 분간 원심분리하였다. 수정능 획득을 위하여 약 1 ml의 수정용 BO medium과 m-TALP medium을 각각 첨가하여 CO₂ incubator에서 10~15분간 정지하였다.

4. 난관상피세포와 수정용 conditioned medium의 준비

1) 체외배양을 위한 난관 상피세포의 준비

도축장에서 채취한 난관을 소독한 후 항생제가 첨가된 생리식염수로 2~3 회 세척한 다음 오염가

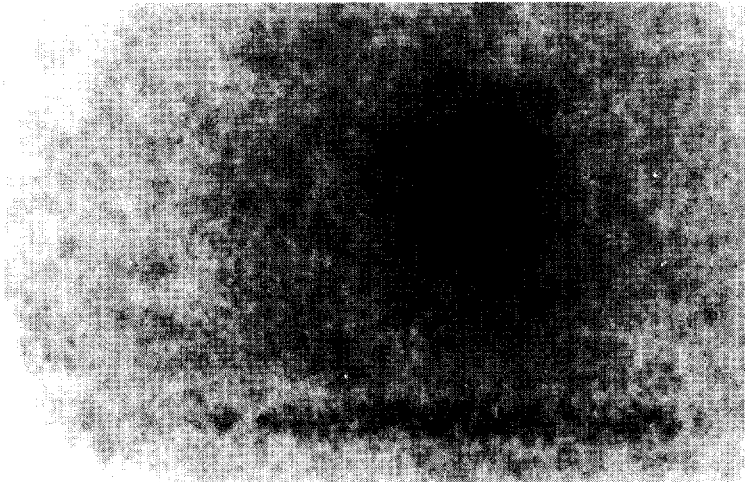


Fig. 2. Following *in vitro* maturation for 24 hours, the cumulus cells were observed to undergo a dramatic expansion($\times 40$).

능성이 있는 난관의 양끝 부분을 약 1 cm 정도를 잘라낸다. TCM-199 medium 1 ml가 들어있는 10 ml 주사기로 난관협부에서 누두부쪽으로 관류시킨 다음 핀셋으로 난관을 압박하면서 난관 상피세포를 채취하였다. 채취한 난관 상피세포는 500 g 에서 5 분간 원심분리시켜 상층액은 제거하고 나머지 pellet 부분을 2 회 이상 원심분리기로 세척하여 $1\sim 2 \times 10^6$ cells/ml의 최종농도로 조절한 후 10% FBS가 첨가된 TCM-199 medium으로 배양시킴으로써 Fig. 3과 같이 monolayer cells의 형성을 유도하였다.

2) 체외수정을 위한 난관 상피세포와 conditioned medium의 준비

위의 방법으로 난관 상피세포를 채취, 원심분리하여 10% FBS가 첨가된 TCM-199 medium이 들어 있는 24 well-dish에 $1\sim 2 \times 10^6$ cells/ml의 최종농도로 분주하여 배양하였다. 배양 후 5일째 TCM-199 신선배양액으로 교환하고, 7일째 수정용 배양액 m-TALP medium으로 교환한 후 3일째 신선 m-TALP medium으로 교환하여 수정에 이용하였으며, 3일간 배양된 m-TALP medium은 $0.2\mu\text{m}$ 로 필터를 한 후, 4°C 의 냉장고에 보관하면서 수정용 배양액으로 사용하였다.

5. 체외수정

체외수정용 배양액은 1) BO medium, 2) m-TALP medium, 3) conditioned medium, 4)

m-TALP medium + OEMC, 그리고 5) conditioned medium + OEMC 의 5 처리로 분류하였다.

체외성숙된 난포란을 수정용 BO medium, m-TALP medium 또는 conditioned medium으로 각각 3~4 회 세척한 후, 5가지로 분류된 각각의 수정용 media에 $100\mu\text{l}$ drop당 10~15 개의 난자를 옮긴 후 정자의 최종농도가 $1\sim 2 \times 10^6$ sperms/ml이 되도록 하여 24 시간 동안 39°C , 5% CO_2 incubator에서 체외수정을 유도하였다.

6. 체외수정란의 체외배양

체외성숙·수정된 난포란의 체외배양은 TCM-199에 10% FBS를 첨가하여 난관상피세포와 공배양을 하거나, $20\mu\text{l}/\text{ml}$ BME(Basal Medium Eagle) amino acid solution(50 X, Sigma Chem. Co., USA), $10\mu\text{l}/\text{ml}$ MEM(Minimal Essential Medium) non-essential amino acid solution(100 X, Sigma Chem. Co., USA) 및 $3\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA-V (Sigma Chem. Co., USA)가 첨가된 CR1aa medium에서 배양하였다.

체외수정 24시간 후에 수정란은 CR1aa medium 또는 10% FBS가 첨가되어 있는 TCM-199 medium으로 4~5 회 세척하여 난구세포와 정자를 제거시킨 다음 각각의 배양액으로 배양하였다. CR1aa medium은 48 시간마다 신선한 배양액으로 교환하였고, TCM-199 medium은 monolayer cells을 형성한 난관 상피세포에서 공배양을 시키면서 48

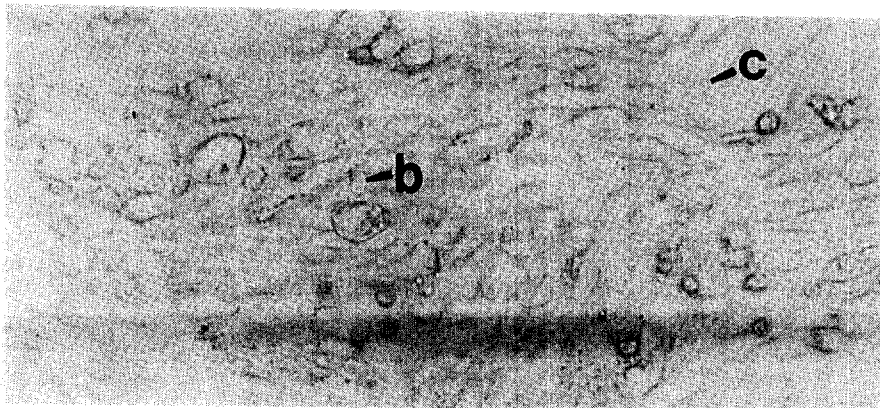


Fig. 3. Monolayer of oviductal epithelial cells, b and c indicated an epithelial cell and a fibroblast like cell, respectively ($\times 100$).

시간마다 신선한 배양액으로 교환했으며, 5 일이 경과한 monolayer cells은 신선한 monolayer cells로 교환하였다. 각각의 배양액으로 배양하면서 수정 후 48시간에는 2-세포기 이상으로 발달한 수정란의 수정율을 조사하였으며, 7~10 일 동안에는 배반포 기배로의 발달율을 조사하였다.

7. 통계학적 분석

실험결과의 통계적 분석은 Microsta computer statistical program package를 사용하여 χ^2 -test를 실시하여 처리군간의 유의차를 검정하였다.

결과 및 고찰

1. TCM-199 또는 Ham' F-10에서 체외성숙 후의 배 발달율

체외 성숙용 배양액의 차이가 배 발달에 미치는 영향을 구명코자, TCM-199과 Ham's F-10 에서 체외 성숙시킨 후의 배발달율을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 수정율에 있어서 TCM-199과 Ham's F-10에는 각각 51.6%와 59.9%로 유의적($P < 0.05$)인 차이를 나타내었으나, 배반포의 발달율은 각각

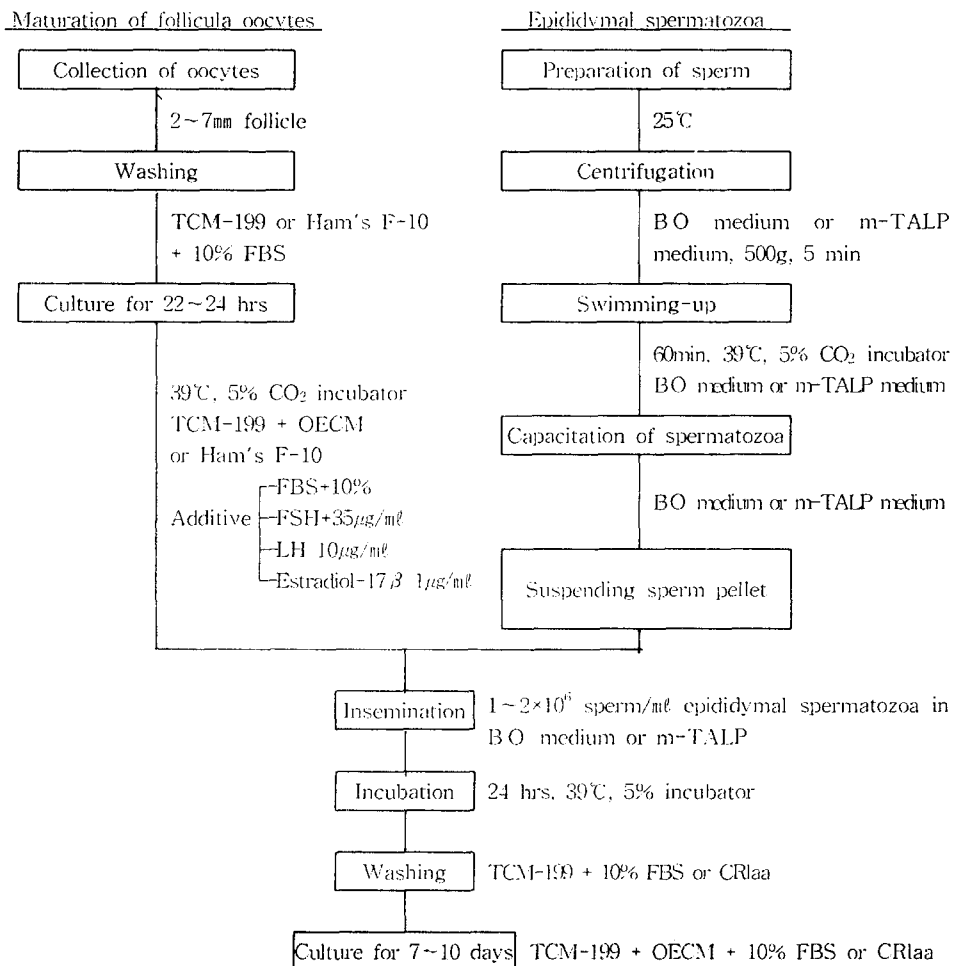


Fig. 4. Diagram of experimental procedure for IVM and IVF of bovine follicular oocytes and IVC of bovine embryos.

Table 1. Effect of maturation media on *in vitro* fertilization and *in vitro* development of bovine embryos produced by *in vitro* fertilization of follicular oocytes^a

Maturation media	No. of oocytes used	No. of oocytes cleaved(%)	No. of blastocysts	
			Total(%)	Hatched(%)
TCM-199	701	362(51.6) ^a	43(11.9) ^a	19(41.2) ^a
Ham's F-10	729	437(59.9) ^b	70(16.0) ^a	44(62.9) ^b

^a Fertilization medium : BO ; Co-culture medium : TCM-199 and OECM(oviductal epithelial cell monolayers) ; 11 replicates.

* Values with same superscripts were not significantly different(P<0.05)

11.9%와 16.0%로 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 그러나 배반포기의 부화율은 41.2%와 62.9%로써, TCM-199에 비해 Ham's F-10의 부화율이 유의적(P<0.05)으로 높았다.

Hawk와 Wall(1994)은 3가지의 성숙용 배양액(TCM-199, Ham's F-10 및 Menezes's 2(B2))으로 난포란을 체외성숙시켜 TALP medium으로 수정시킨 후 Menezes's 2(B2)와 Buffalo Rat Liver (BRL) cell을 이용하여 수정란을 공배양한 결과, 배반포기까지의 발달율은 각각 28%, 40% 및 9%로써, 체외성숙용 배양액으로는 Ham's F-10이 후기 배로의 발달율을 향상시킨다고 보고하였다. 그러나 본 실험에서 체외성숙용 배양액으로 이용한 TCM-199과 Ham's F-10에 있어서 배반포기배로의 발달율은 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, 부화율에 있어서는 Ham's F-10이 높은 성적을 나타내었다. 이러한 결과로 볼 때 Ham's F-10의 높은 부화율은 체외수정란이식에 있어서 수태율의 향상에 좋은 영향을 미칠 것으로 사료된다.

수정용 배양액으로서 BO medium과 m-TALP medium을 각각 사용하여, 성숙된 난포란을 정소상

체의 미부정자와 약 24 시간 동안 체외수정을 유도한 결과는 Table 2에서와 같다. 수정율은 각각 51.6%와 80.1%로 BO에 비하여 m-TALP가 상당히 높은 수정율을 나타내었다. 그러나 수정후 배반포의 발달율은 11.9%와 17.6%로 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, 사용된 난포란에 있어서 배반포의 발달율은 6.1%와 14.1%로 유의적(P<0.05)인 차이를 나타내었다.

체외수정시 난관상피세포와의 공배양에 따른 수정율과 배발달율을 조사하기 위하여 m-TALP medium과 CM(conditioned medium)을 각각 단독으로 또는 난관 상피세포와 공배양한 결과는 다음과 같다. Table 3에 나타난 것처럼 수정율은 각각 80.1%(m-TALP), 83.8%(m-TALP + OECM), 82.0%(CM) 및 87.6%(CM + OECM)로 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 8회 실험 반복에 의한 수정율의 범위는 73.3%에서 90.3%로 나타났다. m-TALP와 CM을 단독으로 또는 난관 상피세포와 공배양하여 수정시킨 후, 수정란의 배반포 발달율은 Table 4에서 나타난 것처럼 각각 17.6%, 19.4%, 18.9% 및 16.0%로써 유의적인 차이가 나타나지 않

Table 2. Blastocyst development of *in vitro* matured bovine follicular oocytes by different fertilization media^a

Fertilization media	No. of oocytes used	No. of oocytes cleaved(%)	No. of blastocysts	% Blastocyst	
				Used	Cleaved
BO	701	362(51.6) ^a	43	6.1 ^a	11.9 ^a
m-TALP	206	165(80.1) ^b	29	14.1 ^b	17.6 ^b

^a Maturation medium : TCM-199 ; Co-culture medium : TCM-199 and OECM(oviductal epithelial cell monolayers)

* Values with same superscripts were not significantly different(P<0.05)

Table 3. Cleavage rates of bovine oocytes inseminated with fresh spermatozoa on fertilization media co-cultured with or without OECM

Fertilization media	Co-culture with	No. of oocytes used	No. of oocytes cleaved	
			Total(%)	% Range
m-TALP	None	206	165(80.1) ^a	73.3 ~ 87.0
	OECM	179	150(83.8) ^a	79.0 ~ 89.7
CM	None	133	109(82.0) ^a	80.0 ~ 87.9
	OECM	153	134(87.6) ^a	83.7 ~ 90.8

^a Maturation medium : TCM-199 ; Co-culture : TCM-199 and OECM ; 8 replicates.

* Values with same superscripts in the column were not significantly different (P<0.05)

* OECM : oviductal epithelial cell monolayers

Table 4. Blastocyst development of *in vitro* matured bovine follicular oocytes on different fertilization media co-cultured with or without OECM^a

Fertilization media	Co-culture with	No. of oocytes cleaved	No. of embryos developed to blastocyst(%)
m-TALP	None	165	29(17.6) ^a
	OECM	150	26(17.3) ^a
CM	None	109	20(18.3) ^a
	OECM	134	24(17.9) ^a

^a Maturation medium : TCM-199 ; Co culture : TCM-199 and OECM ; 8 replicates.

* Values with same superscripts in the column were not significantly different (P<0.05)

* OECM : oviductal epithelial cell monolayers

았다.

Pollard 등(1991)은 정자가 난관 상피세포와 공배양한지 수분 이내에 난관 상피세포와 결합하며, 이러한 물리적 상호작용은 정자의 운동성 유지와 수정능획득에 영향을 미친다고 보고하였으며, Guyader와 Chupin(1991)은 난관 상피세포와 6 시간 동안 전배양한 신선정자는 높은 수정능획득율을 나타내었다고 보고하였다. Miller 등(1994)은 체외성숙된 난포란을 4가지의 조건 [1) TALP medium(control), 2) TALP + BOEC, 3) TALP + PHE(penicillamine, hypotaurine 그리고 epinephrine) 또는 4) TALP + BOEC와 PHE] 으로 수정시킨 결과, 수정율은 각각 32%, 52%, 55% 및 66%로 나타났으며, 상실배와 배반포기까지의 발달율은 각각 21%, 28%, 25% 및 35%로 나타났다고 보고하여 본 실험보다 높은 결과를 나타내었다.

체외성숙용 배양액으로 Ham's F-10에 LH(10 μ

g/ml), FSH(35 μ g/ml), estradiol-17 β (1 μ g/ml) 그리고 10% FBS를 첨가하여 5% CO₂ incubator에서 24 시간 동안 체외성숙을 유도하였으며, 성숙된 난포란은 수정용 m-TALP medium에 100 μ l drop당 10~15 개의 난자를 옮겨 수정능이 획득된 정자와 24 시간 동안 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 수정을 유도하였다. 수정란은 20 μ l/ml BME (Basal Medium Eagle) amino acid solution, 10 μ l/ml MEM(Minimal Essential Medium) non-essential amino acid solution 및 3 μ g/ml BSA-V가 첨가된 CR1aa medium 또는 10% FBS가 첨가되어 있는 TCM-199 medium으로 배양하였다. 각각의 배양액으로 배양하면서 수정율과 배반포기배로의 발달율을 조사한 결과는 Table 5와 같이, 배반포까지의 발달율은 TCM-199 에서 35.6%로 CR1aa에서의 발달율 1.88%보다 유의적(P<0.05)으로 높았다.

Table 5. Blastocyst development of IVF/ IVC embryos in TCM-199 or CR1aa culture medium^a

Culture media	No. of oocytes used	No. of oocytes cleaved(%)	No. of embryos develop to blastocyst(%)
TCM-199 (with OEMC)	237	202(85.2) ^a	72(35.6) ^a
CR1aa	391	320(81.8) ^a	6(1.9) ^b

^a Maturation medium : Ham's F-10 ; Fertilization medium : m-TALP ;4 replicates.

* Values with same superscripts in the column were not significantly different (P<0.05)

* OEMC : oviductal epithelial cell monolayers

Eyestone과 First(1989)는 체외성숙, 수정된 수정란을 난관 상피세포와 공배양, 난관 상피세포에 의한 conditioned medium 및 10% FCS가 첨가된 TCM-199으로 배양한 후 상실배/배반포기까지의 발달율은 각각 35%, 22% 및 3%로 나타났다고 보고하여, 본 실험 결과와 난관상피세포와 공배양한 결과가 비슷하였다. 그러나 Hawk와 Wall (1994)이 TCM-199으로 granulosa cells 또는 buffalo rat liver(BRL) cells과 함께 공배양하여, 배반포기까지의 발달율은 각각 20%와 22%로 나타났다는 보고보다는 높은 결과였다.

Rosenkrans와 First(1991)는 체외성숙·수정된 소의 체외수정란을 단순배양액의 일종인 CR1에 10 µg/ml phenol red와 3 mg/ml fatty acid-free bovine serum albumin을 첨가하거나 EAA(1 mM L-glutamine이 첨가된 Basal Medium Eagle essential amino acids)와 NEA(Minimal Essential Medium(MEM) nonessential amino acids)를 첨가하여 7일 동안 배양한 후 배반포기까지의 발달율은 각각 10.2%와 21.4%로 나타났으며, 영양세포가 없는 조건하에서도 필수 및 비필수 아미노산을 첨가하여 배양하는 것이 소 수정란의 체외발달에 유익하다고 하였다. 본 실험에서는 체외수정란의 후기배로의 배 발달을 위한 배양액으로는 10% FBS가 첨가된 TCM-199을 이용하여 난관 상피세포와 공배양하는 것이 더 효과적인 것으로 나타났으나, 단순배양액인 CR1aa에 필수 및 비필수 아미노산의 첨가만으로는 후기배로의 배 발달에 좋은 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

적 요

소에 있어서 체외성숙, 체외수정 및 체외배양을 통한 체외 수정란 생산의 효율적인 배양체계를 구축코자, 도축장에서 도축된 한우의 난소에서 세포질이 충실하고 최소한 3층 이상의 난구세포를 가진 난포란을 채란하여 실험에 공시하였다. 난포란의 체외성숙용 배양액으로는 TCM-199 또는 Ham's F-10에 LH(10 µg/ml), FSH(35 µg/ml), estradiol-17β(1 µg/ml) 그리고 10% FBS를 각각 첨가하여 24 시간 동안 체외성숙을 유도하였으며, 성숙된 난포란은 BO m-TALP 및 conditioned medium에서 각각 정소상체 미부의 정자와 수정시킨 후 TCM-199이나 CR1aa medium으로 후기배로의 배 발달을 유도하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 체외성숙용 배양액으로 TCM-199 또는 Ham's F-10을 사용한 결과, 수정율은 51.6%와 59.9%로 유의적(P<0.05)인 차이를 나타내었으나, 배반포의 발달율은 각각 11.9%와 16.0%로 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 그러나 배반포기의 부화율은 41.2%와 62.9%로써, TCM-199에 비해 Ham's F-10의 높았다.
2. 성숙된 난포란을 BO medium 또는 m-TALP medium에서 체외수정을 유도한 결과, 수정율은 각각 51.6%와 80.1%로 BO에 비하여 m-TALP가 상당히 높은 수정율을 나타내었다. 그러나 수정후 배반포의 발달율은 11.9%와 17.6%로 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, 사용된 난포란에 있어서 배반포의 발달율은 6.1%와 14.1%로 유의적(P<0.05)인 차이를 나타내었다.
3. 체외수정시 난관 상피세포와의 공배양에 따른 수정율과 배발달율을 조사하기 위하여 m-TA-

LP medium과 CM(conditioned medium)을 각각 단독으로 또는 난관 상피세포와의 공배양한 결과, 수정율은 각각 80.1%(m-TALP), 83.8%(m-TALP + OEMC), 82.0%(CM) 및 87.6%(CM + OEMC)로 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 수정란의 배반포 발달율에 있어서도 각각 17.6%(m-TALP), 19.4%(m-TALP + OEMC), 18.9%(CM) 및 16.0%(CM + OEMC)로써 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

4. 체외수정 24 시간 후에 수정란은 각각 10% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액에서 난관상피세포와 공배양시키거나 아미노산이 첨가된 CR1aa 배양액에서 7~10 일 동안 배반포기배로의 발달율을 조사한 결과, TCM-199이 35.6%로 CR1aa의 1.88% 보다 유의적($P < 0.05$)으로 높은 발달율을 보였다.

이상의 실험결과를 종합할 때, 세포질이 충실하고 최소한 3층 이상의 난구세포를 가진 난포란을 선별하여 성숙용 배양액으로는 Ham's F-10, 수정용 배양액으로 m-TALP를 사용하여 10% FBS가 첨가된 TCM-199 배양액에서 난관 상피세포와 공배양시키는 것이 체외수정란의 생산성을 높이는데 효율적인 것으로 사료된다.

참고문헌

- Bavister BD, Rose-Hellekant TA and Pinyopummintr T. 1992. Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology*, 37:127~146.
- Boice ML, Geisert RD, Blair RM and Verhage HG. 1990. Identification and characterization of bovine oviductal glycoproteins synthesized at estrus. *Biol. Reprod.*, 43: 457~465.
- Brackett BG, Younis AI and Fayrer-Hosken RA. 1989. Enhanced viability after *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro* with high concentrations of luteinizing hormone. *Fertil. Steril.*, 52:319~324.
- Brackett BG and Oliphant G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 12:260~274.
- Brackett BG and Zuelke KA. 1993. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, 39:43~63.
- Eckert J and Niemann H. 1995. *In vitro* maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media. *Theriogenology*, 43:1211~1225.
- Ellington JE *et al.* 1990. Bovine 1~2 cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell co-culture systems. *Biol. Reprod.*, 43:97~104.
- Ellington JF *et al.* 1991. Behavior of bull spermatozoa in bovine uterine tube epithelial cell coculture: an *in vitro* model for studying the cell interactions of reproduction *Theriogenology*, 35:977~989.
- Eyestone WH, Jones JM and First NL. 1991. Some factors affecting to efficacy of oviduct tissue conditioned medium for the culture of early bovine embryos. *J. Reprod. Fert.*, 92:59~64.
- Fischer B, Jung T, Hegele-Hartung C and Beier HM. 1990. Development of preimplantation rabbit embryos in uterine flushing-supplemented culture media. *Mol. Reprod. Dev.*, 27:216~223.
- Fukui Y and Ono H. 1989. Effect of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for *in vitro* fertilization, maturation, cleavage and development of bovine oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 86:501~506.
- Gandolfi F, Brevini TAL and Moor RM. 1989. Effect of oviduct environment on embryonic development. *J. Reprod. Fert.*, (Suppl.) 38:107~115.
- Gandolfi F and Moor RM. 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep

- by co-culture with oviduct epithelial cell. *J. Reprod. Fertil.*, 81:23~28.
- Goto K *et al.* 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.
- Gutierrez A, Garde J, Garcia-Artiga C and Vazquez I. 1993. Ram spermatozoa cocultured with epithelial cell monolayers: an *in vitro* model for the study of capacitation and the acrosome reaction. *Mol. Reprod. Dev.*, 36:338~345.
- Guyader C and Chupin D. 1991. Capacitation of fresh bovine spermatozoa on bovine epithelial oviduct cell monolayers. *Theriogenology*, 36:505~512.
- Hawk HW and Wall RJ. 1994a. Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro* produced oocytes. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology*, 41:1571~1583.
- Hawk HW and Wall RJ. 1994b. Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro* produced oocytes. II. Media and co-culture cells. *Theriogenology*, 41:1585~1594.
- Hernandez-Ledezma JJ, Villaneueva C, Sikes JD and Roberts RM. 1993. Effects of CZB versus medium 199 and of conditioning culture media with either bovine oviductal epithelial cells or buffalo rat liver cells on the development of bovine zygotes derived by *in vitro* maturation-*in vitro* fertilization procedures. *Theriogenology*, 39:1267~1277.
- Kajihara Y, Kometani N, Kobayashi S, Shitanaka Y, Koshiha Y, Hishiyama K, Shiraiwa K and Goto K. 1990. Pregnancy rate and births after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in-vitro* matured follicular oocytes. *Theriogenology*, 33:264.
- Lawitts J and Biggers JD. 1991. Overcoming the 2-cell block by modifying standard components in a mouse embryo culture medium. *Biol. Reprod.*, 45:245~251.
- Leibfreid-Rutledge ML *et al.* 1987. Developmental potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. *Biol. Reprod.*, 36:376~383.
- Lu KH, Gorden I, Gallagher M and McGovern H. 1987. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. *Vet. Rec.*, 121:259~260.
- Miller GG, Gliedt DW, Rakes JM and Rorie RW. 1994. Addition of penicillamine, hypotaurine and epineprine(PHE) or bovine oviductal epithelial cell(BOEC) alone or in combination to bovine *in vitro* fertilization medium increases the subsequent embryos cleavage rate. *Theriogenology*, 41:689~696.
- Moreno JF and Westhusin M. 1993. A comparison of two systems for culture of bovine zygotes *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 48(Suppl. 1):169.
- Nagai T and Moor RM. 1990. Effect of oviduct cells on the incidence of polyspermy in pig eggs fertilized *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 26:377~382.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Handrow RR, Smith MM and First NL. 1989. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol. Reprod.*, 40:1020~1025.
- Parrish JJ *et al.* 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen *Theriogenology*, 25:591~600.
- Pollard JW, Plante C, King WA, Hansen PJ, Betteridge KJ and Suarez SS. 1991. Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding to oviductal epithelial cells. *Biol. Reprod.*, 44:102~107.
- Rexroad CE Jr and Powell AM. 1991. Effect of serum-free co-culture and synchrony of recipients on development of cultured sheep

- embryos to fetuses. *J. Anim. Sci.*, 69:2066~2072.
- Rosenkrans CF Jr and First NL. 1991. Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage: effects of amino acids and vitamins. *Theriogenology*, 35:266.
- Rosenkrans CF Jr, Zeng GQ, McNamara GT, Schoff PK and First NL. 1993. Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. *Biol. Reprod.*, 49:459~462.
- Saeki 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.
- Solti L, Machaty Z, Barandi Zs, Torok M and Vajta G. 1992. IVF embryos of known parental origin from the endangered Hungarian Grey Cattle breed. *Theriogenology*, 37:301.
- Wiemer KE *et al.* 1991. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 30:330~338.
- Xu KP, Greve T, Callesen H and Hyttel P. 1987. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 81:501~504.
- Xu KP *et al.* 1990. Pregnancy rates following transfer of bovine embryos produced by *in vitro* maturation, fertilization and co-culture. *Theriogenology*, 33:351.