

돼지 卵母細胞의 體外成熟 및 體外受精時 培養液과 液狀精液의 效果

朴昌植 · 李揆丞 · 朴炳權 · 張學奎* · 李義海* · 徐直*

忠南大學校 農科大學

Effect of Maturation Media and Liquid Boar Semen on Maturation and Fertilization of Pig Oocytes *In Vitro*

Park, C. S., K. S. Lee, B. K. Park, X. K. Zhang*, Y. H. Lee* and Z. Xu*

College of Agriculture, Chungnam National University

SUMMARY

This present study was carried out to examine the effect of maturation media and liquid boar semen on *in vitro* maturation and fertilization of pig oocytes. The results obtained were as follows :

When the oocytes were cultured for 36~42 hours in mTCM-199, Waymouth MB 725 /1 and mTLP-PVA medium, the maturation rates were 90%, 92% and 88%, respectively. The sperm penetration rates of pig oocyte matured *in vitro* were 87%(mTCM-199), 90%(Waymouth MB 725 /1) and 86%(mTLP-PVA), respectively. The rates of nuclear maturation and fertilization of pig oocytes among three different media did not differ. However, the rate of male pronucleus formation of pig oocytes was significantly higher in pig oocytes matured in Waymouth MB 725 /1(91%) than in oocytes matured in mTCM-199(66%) and mTLP-PVA(62%) medium ($P < 0.05$).

When the collected sperm-rich fraction without diluent was used for *in vitro* fertilization in mTCM-199 fertilization medium, the fertilization rate was 87.9%. However, when the liquid boar semen diluted with Bütschwilier diluent was used at day 3 and 5 after dilution, the fertilization rate was 40.8% and 0.0%, respectively.

(Key words : Maturation media, Liquid boar semen, Pig oocytes, *In vitro* fertilization)

I. 緒 論

未成熟 卵母細胞를 體外에서 成熟 및 受精시키기 위한 研究는 受精現象과 胎兒發達 過程을 究明할 뿐만 아니라 優秀한 遺傳形質을 가진 受精卵을 培養, 複製

增殖, 性鑑別 等の 手段을 提供하여 家畜改良에 크게 寄與할 수 있다는 側面에서 重要時 되고 있다.

돼지 卵母細胞의 體外受精에 關한 研究는 Iritani 等 (1978), Pavlok(1981), 그리고 Nagai 等(1984)이 體外에서 卵子內에 精子浸透와 雄性前核의 形成이 可能하다는 報告가 있으면서 始作되었다. 最近 *in vivo*에

이 論文은 韓國科學財團의 "1994年度 韓國科學者 中國派遣 研究"의 結果임.

* Tian Jin Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Tian Jin 300112, China.

서 成熟된 卵子를 體外受精시켜 正常仔豚을 生産한 結果가 Cheng 等(1986), Nagai 等(1988), 그리고 Yoshida(1987, 1989)에 의해서, *in vitro*에서 成熟시킨 卵母細胞를 體外受精시켜 正常仔豚을 生産한 結果가 Mattioli 等(1989)에 의해서 報告되므로써 돼지에서 體外受精技術의 開發 可能性을 나타냈다. 그러나, 體外受精技術이 養豚業에서 實用化되기 위해서는 많은 問題點들이 나타나고 있다. 그중의 하나가 體外成熟된 卵母細胞들에 浸透한 精子들의 雄性前核 形成率이 낮다는 것이며, 또 하나는 體外受精을 시키기 위한 精子受精能獲得의 效果的인 調節이다.

未成熟 卵母細胞의 體外成熟과 雄性前核形成率을 높이기 위해 돼지 卵胞液의 添加(Mattioli 等, 1988 ; Naito 等, 1988 ; Yoshida 等, 1992)가 效果的이란 報告가 있었고, Yoshida 等(1992)은 Waymouth MB 752 /1 培養液이 다른 培養液보다 雄性前核形成率이 높으며, cysteine의 添加가 雄性前核形成率을 높인다고 報告하였다. 體外成熟 卵母細胞를 體外受精시키기 위해서 種牡豚에서 採取한 原精液의 精子(Yoshida, 1987), 精巢上體 尾部的 精子(Iritani 等, 1978), 그리고 凍結精液의 精子(Nagai 等, 1988 ; Zheng 等, 1992)가 利用되었으나 液狀精液을 利用한 結果는 없었다.

따라서 本 試驗은 成熟培養液이 未成熟卵母細胞의 成熟과 雄性前核形成에 미치는 效果와 液狀精液을 利用한 體外受精 可能性을 究明하고자 實施하였다.

II. 材料 및 方法

1. 精子의 體外受精能獲得

種牡豚의 精液採取 間隔은 7일로 하여 200ml 保溫 瓶에 人工臈法으로 採取하면서 濃厚精子 部分과 稀薄精子 部分으로 分離하였다. 濃厚精子 部分은 室溫에서 1~2時間 동안 冷却시켜 原精液과 液狀精液으로 나누어 本 試驗에 使用하였다. 液狀精液은 Bütschwilier 稀釋液으로 濃厚精液 1 : 稀釋液 2의 比率로 稀釋하여 保存하였다. 保存된 液狀精液은 精液 製造 當日을 1일로 하여 3日과 5日 保存한 것을 使用하였다. 精子濃度는 血球計算器를 利用하였다. 供試精液은 15ml 遠心分離 튜브에 取한 다음 1mg/ml BSA를 添加한 0.9% NaCl 溶液(洗滌液)을 同量 稀釋하여 50g로 3分

間 遠心分離하였으며, 遠心分離後 튜브 밑에 少量 가라앉은 不純物만을 남기고 위 部分의 모든 精液은 다른 遠心分離 튜브에 옮겨 붓고 550g에서 5分間 遠心分離하여 洗滌液으로 2回 精子를 洗滌하였다. 마지막 遠心分離後 洗滌液을 除去한 精子는 10ml TCM-199 精子 前處理 培養液(受精培養液에서 2mM caffeine을 除去한 培養液)에 精子濃도가 2×10^8 cells/ml 되도록 하여 再浮遊시켰으며, 37℃에서 4~5時間 培養하여 體外受精에 使用하였다.

2. 卵母細胞의 回收

屠殺場에서 種牡豚으로 부터 採取한 卵巢는 100 μ g/ml kanamycin sulfate를 添加한 0.9% NaCl에 保存되어 實驗室內로 運搬되었고, 卵母細胞는 直徑이 2~6mm 되는 卵胞로부터 18gauge의 注射針이 裝着된 5ml 注射器로 吸入하여 回收하였다. 卵母細胞의 回收는 PB1(Whittingham, 1971) 培養液을 利用했으며, 回收된 卵母細胞는 PB1 培養液으로 2回, 그리고 成熟培養液으로 各各 2回 洗滌後, 卵丘細胞가 全體의 으로 緻密하고 넓게 分布되고 卵細胞質 狀態가 均一한 것을 試驗에 使用하였다. 卵母細胞를 除去後, 卵胞液을 吸入하여 室溫에서 1,500g로 30分間 遠心分離시켜 顆粒細胞를 除去하였다. 顆粒細胞를 除去한 卵胞液은 0.8 μ m, 0.45 μ m 그리고 0.22 μ m filter로 各各 濾過하여 -20℃에 保存하면서 使用하였다.

3. 培養液과 培養條件

本 試驗에 使用된 卵母細胞의 體外成熟 培養液은 Earle's salt가 含有된 mTCM-199에 0.91mM sodium pyruvate · 3.05mM glucose · 2.92mM calcium lactate를 添加한 培養液, Waymouth MB 752 /1 培養液, 그리고 mTLP-PVA에 1.0mM glutamine · 0.2mM isoleucine · 0.05mM methionine · 0.1mM phenylalanine을 添加한 培養液의 3가지 培養液을 使用하였으며, 成熟이 完了된 卵母細胞의 體外受精 基本培養液은 mTCM-199 培養液을 使用하였다. 한편, 모든 培養液은 各各 pH 7.4, 滲透壓 290~300mOsmol로 調整하여 使用하였으며 使用前에 0.22 μ m filter로 濾過한 다음, 39℃, 5% CO₂, 95% 空氣, 100% 濕度의 CO₂ 培養機에서 10~12時間 동안 平衡시킨 後 使用하였다.

4. 體外成熟과 受精

卵母細胞의 體外成熟 培養은 各各의 基本 培養液에 10%(v/v) FCS, 10%(v/v) pFF, 호르몬(10IU/ml PMSG, 10IU/ml hCG, 1 μ g/ml estradiol-17 β) 및 100 μ g/ml의 kanamycin sulfate를 添加한 培養液을 35mm polystyrene dish에 0.5ml 씩 分注하고 mineral oil로 덮어 2~3時間 동안 CO₂ 培養基內에서 平衡시킨 후 25~35個의 未成熟 卵母細胞를 옮겨 36~42時間 동안 培養하여 成熟을 誘導하였다. 成熟培養後 膨화된 卵丘細胞를 가진 25~35個의 卵母細胞는 mineral oil로 덮은 mTCM-199에 10% (v/v) FCS · 2mM caffeine · 100 μ g/ml의 kanamycin sulfate가 添加된 2.0ml의 受精培養液에 옮겼으며, 最後 精子濃度가 2.5~5 \times 10⁴cells/ml 되도록 1회에 精子를 添加하였다. 7~8時間 受精後, 卵母細胞는 受精卵 培養液으로 2回 洗滌하였으며, 5~10個의 受精卵을 mineral oil로 덮은 mTCM-199에 0.27mM sodium pyruvate, 21.6mM sodium lactate(60% syrup), 10%(v/v) FCS 및 100 μ g/ml의 kanamycin sulfate를 添加한 0.1ml의 受精卵培養液에 옮겨 精子 注入後 18時間까지 培養하였다.

5. 成熟 및 受精與否의 判定

36~42時間 培養하여 體外成熟을 誘起한 卵母細胞의 成熟與否를 檢査하기 위하여 0.3% hyaluronidase 溶液에서 pipetting 方法으로 卵丘細胞層을 除去하고 slide glass 위로 옮겨 cover glass를 덮어 定置시킨 後 固定液(ethanol and acetic acid, 3 : 1, v/v)에 沈漬하여 48時間 동안 固定한 다음 1% aceto-orcein

으로 染色하여 核成熟段階를 判定하였다. 體外受精의 判定은 體外受精後 18時間間에 受精 與否를 檢査하기 위하여 固定 · 染色하여 精子의 侵入, 精子頭部의 膨化 및 前核形成 與否를 確認하는 方法으로 判定하였다.

III. 結果 및 考察

1. 培養液에 따른 體外成熟 및 體外受精

돼지 卵母細胞의 體外成熟 및 體外受精에 미치는 培養液의 要因에 대하여 알아보고자 mTCM-199, Waymouth MB 725 / 1 및 mTLP-PVA 培養液에서 卵母細胞를 36~42時間 成熟培養한 後, 成熟이 完了된 卵母細胞를 mTCM-199 培養液을 受精培養液으로 體外受精시킨 結果를 Table 1과 같다.

Table 1에서 보는 바와 같이 體外成熟率은 mTCM-199 培養液이 90%, Waymouth MB 725 / 1 培養液이 92% 및 mTLP-PVA 培養液이 88%를 나타냈고, 成熟卵母細胞의 精子浸透率은 각각 87% (mTCM-199), 90%(Waymouth MB 725 / 1) 및 86% (mTLP-PVA)로 나타나서 각 培養液間에 成熟率 및 受精率의 큰 差異가 없는 것으로 調査되었다. 그러나, 體外受精後 雄性前核 形成率은 Waymouth MB 725 / 1 培養液이 91%로서 mTCM-199 培養液(66%) 및 mTLP-PVA 培養液(62%)보다 有意的(P<0.05)으로 높은 成績을 나타냈다.

이와 같은 結果는 돼지에서 培養液別로 雄性前核 形成率을 比較하였을 때 Waymouth MB 725 / 1 培養液이 다른 培養液들보다 높은 成績을 나타냈다고 한 Yoshida 等(1992)의 報告와 一致하는 것이었다. 또한, Eppig 等(1990)과 Van de Sandt 等(1990)의

Table 1. Comparison of maturation media with pig follicular fluid on nuclear maturation, penetration and pronucleus formation in pig oocytes

Media	No. (%) of oocytes		
	Nuclear maturation	Sperm penetration ¹	Male pronucleus formation ²
mTCM-199	99 / 110(90)	86 / 99(87)	57 / 86(66) ^b
Waymouth MB 725 / 1	105 / 114(92)	95 / 105(90)	86 / 95(91) ^a
mTLP-PVA	99 / 112(88)	85 / 99(86)	53 / 85(62) ^b

¹ In matured oocytes.

² In matured and penetrated oocytes.

^{ab} Means in the same column with different superscripts differ significantly(P<0.05).

Table 2. *In vitro* fertilization of *in vitro* matured pig oocytes with undiluted and diluted boar semen in mTCM-199 fertilization media

Item	No. of oocytes inseminated	No. (%) of oocytes fertilized	No. (%) oocytes polyspermy
Undiluted	140	123 / 140(87.9) ^a	85 / 123(69.1) ^a
Diluted semen ¹			
3 day	98	40 / 98(40.8) ^b	19 / 40(47.5) ^b
5 day	100	0	0

¹ Bütschwiler diluent was used for dilution of sperm-rich fraction. *In vitro* fertilization was done with the liquid boar semen preserved 3 and 5 days after dilution.

^{ab} Means in the same column with the different superscripts differ significantly ($p < 0.05$).

各各 다른 7種類의 培養液別로 比較하였을 때 Waymouth MB 725 / 1 培養液이 가장 높은 核成熟率 및 受精率을 나타냈다고 한 報告와 대체로 一致하는 結果였으나, 本 試驗의 結果에서는 培養液間에 核成熟率의 差異가 거의 없는 것으로 나타나서 核成熟率의 部分에서는 위 報告者들과 多少 相異한 結果를 나타냈다.

2. Bütschwiler 稀釋液과 液狀精液의 保存期間에 따른 體外受精

돼지 射出精液의 濃厚精子 部分을 Bütschwiler 稀釋液으로 稀釋하여 3日 및 5日間 保存하였을 때 保存期間에 따른 體外受精 結果는 Table 2와 같다.

Table 2에서 보는 바와 같이 Bütschwiler 稀釋液으로 稀釋하여 3日 및 5日間 保存하였을 때의 受精率은 各各 40.8% 및 0.0%로 나타났다. 이와 같은 結果는 稀釋 保存하지 않고 採取後 即時 利用한 對照區의 受精率 (87.9%)에 比較하여 低調한 成績이었지만, Bütschwiler 稀釋液을 利用하였을 때 3日間 保存한 液狀精液으로 體外受精이 可能함을 나타내는 것으로서 向後 長期保存된 液狀精液의 利用性を 示唆하는 結果였다. 한편, 受精卵의 多精子侵入率은 對照區 및 3日 保存된 液狀精液區에서 各各 69.1% 및 47.5%로 調査되었다.

돼지의 體外成熟 卵母細胞를 體外受精時 射出精液의 稀釋液狀精液을 保存期間別로 比較한 報告는 거의 찾아볼 수 없어서 本 試驗의 結果와 直接 比較할 수가 없었는데, Nagai 等 (1984)은 精巢上體 精子를 利用하여 11~71%의 受精率을 얻었으나 射出精液으로는 0%의 受精率이었다고 報告하였으며, Zheng 等 (1992)의 報告는 돼지 凍結精液을 利用하였을 때 19

~68%의 受精率을 얻었으며 그중 20~55%가 多精子侵入이었다고 報告하였고, Yoshida 等(1992)은 原精液을 利用하여 87~94%의 受精率을 얻었다고 報告하는 등, 研究者 또는 精子의 採取場所·保存方法·體外受精能獲得方法 等に 따라 體外受精率의 差異가 커서 앞으로 많은 研究를 하여야 할 必要性이 있다고 思料된다.

IV. 摘要

本 試驗은 돼지 卵母細胞의 體外成熟 및 體外受精時 培養液과 液狀精液이 미치는 影響을 調査하기 위하여 實施되었다. 本 試驗에서 얻은 結果를 要約하면 다음과 같다.

36~42時間 동안 體外成熟 培養하였을 때 各 培養液間의 體外成熟率은 mTCM-199 培養液이 90%, Waymouth MB 725 / 1 培養液이 92% 및 mTLP-PVA 培養液이 88%로 나타났다. 體外成熟 卵母細胞의 精子浸透率은 各各 87%(mTCM-199), 90% (Waymouth MB 725 / 1) 및 86%(mTLP-PVA)로 나타나서 各 培養液間에 成熟 및 受精率의 差異가 없는 것으로 調査되었다. 그러나, 體外受精後 雄性前核 形成率은 Waymouth MB 725 / 1 培養液에 91%로서 mTCM-199 培養液(66%) 및 mTLP-PVA 培養液(62%)보다 有意的($P < 0.05$)으로 높은 成績을 나타냈다.

採取直後 稀釋하지 않은 精子濃厚部分을 利用하여 mTCM-199 受精培養液에서 體外受精을 시켰을 때의 受精率은 87.9%였다. 그러나 Bütschwiler 稀釋液으로 稀釋하여 3日과 5日 保存한 液狀精液을 利用하였을

경우의 受精率은 各各 40.8%와 0.0%였다.

V. 引用文獻

1. Cheng, W. T. K., R. M. Moor and C. Polge. 1986. *In vitro* fertilization of pig and sheep oocytes matured *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology*, 25:146.
2. Eppig, J. J., A. C. Schroder, J. J. M. Van de Sandt, C. A. Ziomek and B. D. Bavister. 1990. Developmental capacity of mouse oocytes that grow and mature in culture : The effect of modification of the protocol. *Theriogenology*, 33:89-100.
3. Iritani, A., K. Niwa and H. Imai. 1978. Sperm penetration of pig follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fertil.*, 54:379-383.
4. Mattioli, M., G. Galeuti and E. Seren. 1988. Effects of follicle somatic cells during pig oocyte maturation on egg penetrability and male pronucleus formation. *Gamete Res.*, 20: 177-183.
5. Mattioli, M., M. L. Bacci, G. Geleati and E. Seren. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 31:1201-1207.
6. Nagai, T., K. Niwa and A. Iritani. 1984. Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization *in vitro* of pig follicular oocytes. *J. Reprod. fertil.*, 70:271-275.
7. Nagai, T., T. Takahasi, H. Masuda, Y. Shioya, M. Kuwayama, M. Fukushima, S. Iwasaki and A. Hanada. 1988. *In vitro* fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 84:585-591.
8. Naito, K., Y. Fukuda and Y. Toyoda. 1988. Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured *in vitro*. *Gamete Res.*, 21:289-295.
9. Pavlok, A. 1981. Penetration of hamster and pig zona-free eggs by boar ejaculated spermatozoa preincubated *in vitro*. *Int. J. Fertil.*, 26:101-106.
10. Van de Sandt, J. J. M., A. C. Schroeder and J. J. Eppig. 1990. Culture media for mouse oocyte maturation after subsequent embryonic development. *Mol. Reprod. Dev.*, 25: 164-171.
11. Whittingham, D. G. 1971. Survival mouse embryos after freezing and thawing. *Nature*, 233:125-126.
12. Yoshida, M. 1987. *In vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vivo*. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 49:711-718.
13. Yoshida, M. 1989. Improved viability of two-cell stage pig embryos resultion from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vivo*. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 35:34-37.
14. Yoshida, M., K. Ishigaki and V. G. Pursel. 1992. Effect of maturaton media on male pronucleus formation in pig oocytes matured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 31:68-71.
15. Zheng, Y. S., P. Fiser and M. A. Sirard. 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.

(접수일자 : 1997. 1. 17 / 채택일자 : 1997. 3. 15)