

소 난자의 체외수정 및 이후 발육에 영향을 미치는 요인들

윤종택 · 노상호 · 정연길 · 이호준 · 한기영

한경대학교 동물생명자원학과

Factors Affecting *In vitro* Fertilization and Subsequent Development of Bovine Oocytes

J. T. Yoon, S. Roh, Y. G. Jung, H. J. Lee and K. Y. Han

Department of Animal Life and Resources, HanKyong National University

SUMMARY

The objectives of the study were to establish sperm separation method and duration of insemination for bovine IVF. Oocytes from slaughterhouse ovaries were matured and fertilized using general protocol. After 18 or 42 h of insemination, six to ten embryos were placed into a 30 μ l drop of each medium, and the embryos were examined 7~10 d post insemination without medium renewal.

First, we compared Percoll gradient with swim-up technique for sperm separation. There was no difference in cleavage rates between them, but the developmental rates over morula stage of oocytes fertilized with sperm separated by Percoll gradient was significantly higher than that with sperm selected by swim-up technique ($p < 0.05$). Second, we evaluated development of bovine embryos derived from the IVF procedure with different durations (18 vs 42 h) of fertilization. There was also no difference in cleavage rates, but the development to blastocyst stage of oocytes exposed to sperm for 42 h was significantly higher than that exposed for 18 h ($p < 0.05$).

In conclusion, Percoll gradient can be used for sperm selection, improving of embryonic development. Also, 42 h of IVF may improve the development of bovine embryos.

(Key words : bovine oocyte, *in vitro* fertilization, development, IVF)

서 론

포유동물에서 정자가 암컷 생식도관에 들어간 후에는 난관 좁은 부분에 일시적으로 머물다가 난관팽대부로 이동하게 되는데 이 때 수정능력을 보유한 정자가 선별되게 된다(Hunter와 Wilmut, 1984).

소에서 체외수정기법이 도입되면서 활력이 뛰어난 정자를 선별하기 위하여 다양한 방법이 이용되

어 왔는데 Parrish 등(1984)은 swim-up 기법에 의한 소의 체외수정을 향상을 최초로 보고하였으며 Stubbings와 Wosik (1991)는 유리섬유 여과법을, White 등(1984)은 BSA 농도구배에 의한 정자분리 방법을 제시하였다. 그러나 유리섬유 여과법에 의한 경우 작업시간이 3분 정도 밖에 여유가 없기 때문에 실험실에서 정액을 최단시간에 신속하게 취급해야 하는 단점이 있다. Estienne 등(1988)은 유사한 방법으로 BSA를 이용, 90% 이상의 활력있는 정

† 본 연구는 안성시 한우산업의 경쟁력 제고방안에 관한 연구용역사업(1998~1999년)의 지원으로 수행되었음.

자를 선별하는데 성공하였다. 이러한 방법 외에도 치밀하고 우수한 핵을 지닌 정자를 분리하는 방법으로 Percoll gradient의 고밀도분획에 분리된 정자를 선별하는 방법이 제시되고 있다(Utsumi 등, 1988). Percoll은 polyvinylpyrrolidone으로 코팅된 SiO₂의 현탁액으로 사람의 체외수정실험에 널리 이용되고 있다. 사람에서는 Percoll을 이용한 방법과 swim-up에 의한 정자분리방법을 비교하여 우량정자의 선별율을 비교한 보고가 있으며(Lannou와 Blanchard, 1988), 소에서는 Rho (1998)가 Percoll, swim-up 및 유리섬유 여과법의 세가지 정자분리 방법에 대한 정자의 회수율 등을 조사하였다.

소의 체외수정란의 첫 분할시기는 수정 후 24시간에서 48시간까지 다양하게 나타나는데 최근 체외수정 및 수정 후 첫 분할까지의 소 초기배의 체외발육능을 검토한 결과에서 수정개시 후 30~31시간에 첫 분할을 완료한 2~4세포기 수정란만을 선발해 배양할 경우 배반포로의 발생율이 45% 이상으로 높게 나타났다는 보고가 있다(Lee 등, 1996). 그러나 일반적으로 30시간 수정을 실시할 경우 작업시간이 심야로 연장되어 실험실 운영이 효율적으로 이뤄지지 못하는 경우가 생기게 된다. 따라서 체외수정시간을 그 이상으로 연장하여도 발생율에 차이가 없다면 실험목적에 따라 효율적인 체외수정 시스템을 갖출 수 있을 것이다.

본 연구에서는 Percoll 및 swim-up에 의한 정자 선별방법을 비교하여 효율적인 방법을 선택하고 체외수정 시간을 연장하여 수정란의 발육능을 검토, 효율적인 수정란의 생산체계를 갖추고자 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 체외성숙

1) 미성숙난자의 채취

완충액으로 25 mM의 HEPES가 첨가된 tissue culture medium (TCM)-199 (이하 세정용 TCM 199)을 18 gauge 주사침을 장착한 10 ml 주사기로 흡인, 주사침과 주사기의 내강을 세정한 후 도축장에서 채취한 난소의 소난포(직경 2~6 mm)로부터

난포액과 함께 미성숙난자를 흡인, 채취하였다. 난자를 포함한 난포액을 플라스틱 petridish(100×20 mm, Becton Dickinson Labware, U.S.A.)에 5분간 정치시킨 후 상층액을 제거하였다. 미성숙난자는 난구세포가 치밀하며 2층 이상 부착되어 있고 균일한 난자세포질을 갖는 난자를 선별하였다.

2) 성숙배양

성숙배양에는 4-well plate (Nunc Co., Denmark)를 사용하였으며 배양개시 전 각 well에 500 µl의 성숙배양용 TCM199을 넣어 전배양하였다. 선별한 미성숙난자는 세정용 TCM199 배양액으로 3회 세정한 후 10%의 FBS, 15 mM sodium bicarbonate, 2.5 µg/ml FSH (Antrin, Denka Pharm., Japan) 및 1 µg/ml estradiol (Sigma Co., U.S.A.)가 첨가된 성숙배양용 TCM199으로 1회 세정하여 well 당 20~50개를 넣어 39°C, 5% CO₂ incubator 내에서 24시간 성숙배양하였다.

2. 체외수정

1) 정자의 swim-up 및 수정능획득

정액은 2두의 한우의 종모우로부터 채취한 동결정액(0.5 ml /straw; 축협한우개량사업소)으로 각 종모우의 정액 straw를 1개씩 37°C의 온수에 약 30초간 용해한 후 5 ml의 플라스틱 시험관(Becton Dickinson Labware, U.S.A.)에 모아 혼합하였다. 실제현미경하에서 용해한 정자의 일부로 운동성을 확인한 후 Pasteur pipette을 이용, 미리 작성한 0.8 ml의 정자배양용 TALP가 들어있는 8~10개의 플라스틱 시험관 저부에 0.2 ml의 정액을 분주하여 5% CO₂ incubator 내에 1시간 정치시켜 swim-up 처리하였다. 시험관으로부터 상부 0.6~0.7 ml의 상층액을 흡입하여 15 ml의 원심관(Becton Dickinson Labware, U.S.A.)에 모은 후 2회 원심, 세정하였으며(600 g, 5분), 혈구계산판으로 정자의 수를 산정하여 정자농도가 50×10⁶개/ml가 되도록 정자부유액을 작성하고 동량의 200 µg/ml heparin 용액(Sigma Co., U.S.A.)을 첨가하여 최종 heparin 농도를 100 µg/ml로 맞추고 5% CO₂ incubator 내에 15분간 정치함으로써 수정능획득을 유도하였다.

정자의 Percoll (Sigma Co., U.S.A.) 처리는 Rosenkrans 등 (1993)의 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 마개가 달린 15 ml의 원심관에 90% Percoll gradient 3 ml, 45% Percoll 2 ml를 분주한 후 정액 straw를 하나 용해하여 상층부에 분주한다. 이 후 400 g에서 20분간 원심분리하여 원심관 기저부의 정자 pellet을 회수, 수정능획득에 공여하였다.

2) 체외수정

정자처리 개시 전 플라스틱 petridish (60×15 mm, Corning Costar Co., U.S.A.)에 수정용 TALP (이하 IVF-TALP; pH 7.8, Table 1)으로 40 μl의 미소적을 만든 후 mineral oil (Sigma Co., U.S.A.)을 도포하여 5% CO₂ incubator 내에 정치시켰다. 정자의 swim-up종료와 동시에(체외성숙 23 시간째) 4-well plate로부터 체외성숙 난자를 회수하여 W-TALP (pH 7.4)로 3회 세정한 후 5~8개의 난자를 5 μl의 배양액과 함께 흡입하여 미리 작성해 둔 수정용 미소적에 주입하여 수정 시까지 5% CO₂ incubator내에 정치시켰다. 수정능획득을 위한 heparin 처리를 완료한 정자부유액 5 μl를 미소적에 각각 주입하여 최종정자농도를 2.5×10⁶개가 되도록 하였으며, 5% CO₂ incubator 내에서 실험설계에 따라 18 혹은 42시간동안 체외수정하였다.

3. 체외배양

체외배양용 TALP (mTALP; Table 1)를 30μl씩 미소적으로 작성하였으며 최소한 실험 2시간 전에 전배양하였다. 수정한 난자는 수정 미소적으로부터 세정용 배양액으로 옮겨 가볍게 pipetting 하여 난자에 부착되어 있는 정자 및 난구세포를 제거하였으며 작성한 체외배양액의 미소적에 각각 6~10개씩 첨가하여 5% CO₂ incubator내에서 배양하였다. 수정 당일을 0일로 하여 7일째에 수정란을 관찰하여 분할율, 상실배 및 배반포로의 발육률을 산정하였다.

4. 수정란 염색

수정 18시간 후 난자는 다음과 같이 고정 및 염색을 실시하여 수정 여부를 판정하였다. 난자를 0.5%

Table 1. Composition of media for fertilization and culture *in vitro*

Component	Units	IVF-TALP ^a	mTALP ^b
NaCl	mM	114.0	90.0
KCl	mM	3.2	3.2
NaHCO ₃	mM	25.0	25.0
NaH ₂ PO ₄	mM	0.4	0.4
Na-lactate (60% syrup)	mM	10.0	10.0
Na-pyruvate	mM	0.5	0.5
CaCl ₂	mM	2.0	2.0
MgCl ₂	mM	0.5	0.5
Glucose	mM	-	1.5
BSA ^c	mg/ml	8.0	8.0
EAA ^d	%	-	2.0
NEAA ^e	%	-	1.0

^a *In vitro* fertilization-Tyrode's with lactate, albumin and pyruvate.

^b Modified Tyrode's with lactate, albumin and pyruvate for culture.

^c Bovine serum albumin (99% albumin, fatty acid free, fraction V).

^d Essential amino acids.

^e Non-essential amino acids.

hyaluronidase (Sigma Co., U.S.A.)로 5분간 처리하고 fine glass pipette을 이용, mouth pipetting으로 난구세포층을 완전히 제거한 다음, 고정액(glacial acetic acid 1 : ethanol 3)에 72시간 고정하였다. 이후 수정란은 염색액(1% aceto-orcein)으로 염색, 400×의 실체현미경 하에서 전핵 및 다정자침입 여부를 조사하였다.

5. 통계학적 분석

실험결과와 통계학적 유의성 검정에는 Chi-square test를 이용하였다.

결과 및 고찰

1. 정자 선별방법에 따른 수정 후 소 수정란의 체외발육률

소 정자의 선별 시 Percoll 및 swim-up 기법을 이용한 후 체외수정에 공여, 이후 분할 및 상실배로의

발육률을 검토한 결과, 각각 68.2 및 71.8의 분할율과 29.4 및 20.7%의 상실배로의 발육률을 나타내어 분할율의 경우 두 군간의 유의성은 인정되지 않았으며 상실배로의 발육률은 Percoll에 의해 선별된 정자로 수정된 난자군에서 유의적으로 높게 나타났다(Table 2). Percoll로 처리된 정자가 swim-up 처리된 정자에 비하여 분할율에서는 차이가 없었으나 후기배로의 발육률이 높았던 것은 정상적으로 수정 및 발육이 이뤄지는 수정란의 절대수가 많음을 의미한다. 일반적으로 Percoll 처리와는 달리 swim-up 처리된 정자의 경우 운동성이 뛰어난 정자만이 선별되므로 동일한 농도의 정자를 수정에 공여하였을 경우 다정자침입의 가능성도 배제할 수 없으나 예비실험 결과 다정자침입에 있어서 두 그룹간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 그러나 사람에서의 연구에 의하면(Sapienza 등, 1993) Percoll 처리에 의한 정자의 선별이 swim-up에 비하여 고품질의 정자가 획득되는 것으로 알려져 있어 전통적인 swim-up에 의한 정자 선별이 반드시 우수한 정자의 확보를 보장한다고 볼 수 없다. 이에 대해 Rho (1998)는 Percoll로 정자를 처리한 난자의 발육률이 높은 것은 수정 후 전핵 형성이 조기진행됨에 따

라 발육률이 향상되기 때문이라고 보고하였다. 따라서 Percoll 처리법은 swim-up 처리법에 비하여 적은 양의 정액으로도 많은 수의 정자 회수가 가능하고 후기배로의 발육이 우수한, swim-up을 대체할 수 있는 정자선별법으로 판단된다. 다만 공여될 정자의 양은 많으나 품질이 매우 불량할 경우 Percoll에 의한 활력정자의 선별이 쉽지 않기 때문에 이러한 경우 조건에 따라 swim-up에 의한 정자의 선별이 상대적으로 유리할 것으로 생각된다.

2. 수정시간에 따른 소 수정란의 체외발육률

체외수정 시간을 18 및 42시간으로 나누어 실시한 후 분할 및 발육률을 검토한 결과, 각각 67.4 및 72.4의 분할율과 6.5 및 16.7%의 배반포로의 발육률을 나타내어 분할율의 경우 두 군간의 유의성은 인정되지 않았으며 배반포로의 발육률은 42시간 수정한 군에서 유의적으로 높게 나타났다(Table 3). 소 난자의 체외수정시간은 수정방법 및 배양액에 따라 8시간에서 30시간까지 다양하게 보고되어 있다(Kim 등, 1993; Lee 등, 1996). 본 실험에서 42시간 수정군이 18시간 수정군에 비해 높은 발육률을 나타내기는 했으나 분할율에 있어서는 유의적인 차

Table 2. Comparison of two sperm separation methods affecting subsequent development after fertilization *in vitro*

Group*	No. of oocytes	No. (%) of 2-cell	No. (%) of ≥morula	Percent of ≥morula / 2-cell
Percoll	453	309 (68.2)	133 (29.4) ^a	43.0 ^b
Swim-up	440	316 (71.8)	91 (20.7) ^b	28.8 ^b

- Embryos were examined 7 day post-insemination.

*Percoll: sperm separation using percoll gradient by centrifugation.

Swim-up: sperm selection by swim-up method.

^{ab}Different superscripts within the same column differ significantly ($P < 0.05$).

Table 3. Development of bovine embryos derived from the IVF procedure with different durations of fertilization

Duration of IVF (hour)	No. of oocytes inseminated	No. (%) of 2-cell	No. (%) of blastocysts	Percent of blastocysts / 2-cell
18	384	259 (67.4)	25 (6.5) ^a	9.7 ^a
42	503	364 (72.4)	84 (16.7) ^b	23.1 ^b

- After IVF, the oocytes were cultured in mTALP for 8~10 days.

^{ab} Different superscripts within the same column differ significantly ($P < 0.05$).

Table 4. Sperm penetration rates after 18 h of insemination

No. of oocytes	No. (%) of fertilized ova	No. (%) of monospermy	No. (%) of polyspermy
51	46 (90.2)	33 (71.7)	13 (28.3)

이가 없었으며 수정 18시간 후 1세포기 수정란을 일부 염색하여 수정율을 검토한 결과 90.2%의 높은 정자 침입율을 나타내어 (Table 4) 18시간 수정군의 발육률 저하가 수정을 및 분할율의 저하에 기인하지는 않는 것으로 판단된다. 이는 연장된 수정시간에 의해 수정율이 향상되고 그에 따라 및 이후 분할 및 발육률이 증가한다는 Lee 등(1996)의 견해와 다소 상반된 결과였다. 오히려 본 실험에서는 18시간 수정 후에도 전반적으로 30% 정도의 다정자침입이 나타나 이에 따른 정상발육의 저하를 개선할 필요가 있을 것으로 생각된다. 노 등(1997)은 수정시간이 54시간으로 연장될 경우 정자가 배양액 내에서 사멸하는 과정에서 자가분해 등으로 인해 난자의 발육에 좋지 못한 영향을 끼친다고 하였으나 본 실험결과 42시간의 수정시간으로는 이러한 역작용은 나타나지 않는 것으로 판단된다. Pinyopummintr와 Bavister (1991)는 배양액내의 혈청이 수정 후 소 난자의 첫 분할을 억제한다고 하였는데 본 실험에서는 배양액 내에 혈청을 첨가하지 않았기 때문에 체외수정 및 체외배양액의 성분 차이에 따른 난자로의 영향을 생각할 수 있다. 체외수정 시 이용하는 수정용 배양액은 IVF-TALP로 체외배양 시 이용하는 mTALP와 일부 첨가성분에 차이가 있다 (Table 1). 우선적으로 생각할 수 있는 것은 glucose로 초기배에서의 glucose의 유해성은 이미 많은 연구보고가 있다(Matsuyama 등, 1993; 노 등, 1997). 본 실험에서 이용된 체외수정용 배양액에는 glucose가 포함되어 있지 않기 때문에 체외수정시간의 연장이 수정란의 glucose로의 노출을 지연시켜 발육에 도움을 주었을 가능성을 생각할 수 있다. 또 다른 인자로서 아미노산을 들 수 있다. 최근에는 소 수정란의 아미노산 대사에 관한 연구가 활발하여 몇몇 특정 아미노산의 대사능을 측정된 연구도 보고되고 있다(Lee와 Fukui, 1996). 그러나 본 실험에서 배양액에 첨가된 아미노산은 필수, 비필수 아미노산의 혼합물로서 개개의 아미노산의 유해 혹

은 유익성을 판단할 수 없었다. 체외배양용 mTALP와 체외수정용 IVF-TALP의 또 하나의 차이는 삼투압으로 NaCl의 농도에 큰 차이를 보인다. 단순 배양액을 이용할 경우 2세포기 이후의 배양에 있어서는 삼투압을 낮춰주는 것이 상실배 및 배반포로의 발육률을 향상시키는 데 유익하기 때문에(Lim 등, 1994; 노 등, 1998) mTALP의 경우 삼투압을 낮추어 배양에 공여하고 있으나 수정 직후 초기배에서는 낮은 삼투압으로의 급격한 변화가 수정란의 발육에 해로운 영향을 미칠 가능성도 배제할 수 없다. 따라서 본 실험에서는 수정시간의 연장에 따른 후기배로의 발육향상 및 이를 통한 안정적인 소 수정란의 생산체계를 확립하였으나 수정 후 초기배의 배양 시 아미노산 및 배양액의 삼투압(NaCl의 농도)이 후기배로의 발육에 미치는 영향에 관한 추가적인 연구가 이뤄져야 할 것으로 생각된다.

적 요

정자선별 시 Percoll 및 swim-up 기법을 비교, 적용하고 수정시간을 18 및 42시간으로 나누어 체외수정을 실시, 분할 및 발육률을 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 소 정자의 선별 시 Percoll 및 swim-up 기법을 이용한 후 체외수정에 공여, 이후 분할 및 상실배로의 발육률을 검토한 결과, 분할율의 경우 두 군간의 유의적인 차이는 인정되지 않았으며 상실배로의 발육률은 Percoll에 의해 선별된 정자로 수정된 난자 군에서 유의적으로 높게 나타났다.
2. 체외수정 시간을 18 및 42시간으로 나누어 실시한 후 분할 및 발육률을 검토한 결과, 분할율의 경우 두 군간의 유의적인 차이는 인정되지 않았으며 배반포로의 발육률은 42 시간 수정한 군에서 유의적으로 높게 나타났다.

이상의 결과로 보아 정자 선별에는 Percoll을 이

용한 방법이, 체외수정시간은 42시간 실시하는 것이 소 수정란의 체외생산체계에서 적절한 것으로 판단된다.

참고문헌

- Estienne MJ, Knight JW and Beal WE. 1988. Isolation of a population of intact highly motile porcine spermatozoa using a discontinuous bovine serum albumin gradient. *Theriogenology*, 29:771-778.
- Hunter RHF and Wilmut I. 1984. Sperm transport in the cow: peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. *Reprod. Nutr. Dev.*, 24:597-608.
- Kim JH, Niwa K, Lim JM and Okuda K. 1993. Effects of phosphate, energy substrates, and amino acids on development of *in vitro*-matured, *in vitro* fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. *Biol. Reprod.*, 48:1320-1325.
- Lannou DL and Blanchard Y. 1988. Nuclear maturity and morphology of human spermatozoa selected by Percoll density gradient centrifugation or swim-up procedure. *J. Reprod. Fert.*, 84:551-556.
- Lee ES and Fukui Y. 1996. Synergistic effect of alanine and glycine on bovine embryos cultured in a chemically defined medium and amino acid uptake by *in vitro*-produced bovine morulae and blastocysts. *Biol. Reprod.*, 55:1383-1389.
- Lee ES, Fujii Y and Fukui Y. 1996. A comparative study on developmental capacity to blastocysts derived from 1-and 2(3)-cell bovine embryos after *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology*, 45:1151-1162.
- Lim JM, Okitsu O, Okuda K and Niwa K. 1994. Effects of calf serum in culture medium on development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 41:1091-1098.
- Matsuyama K, Miyakoshi H and Fukui Y. 1993. Effect of glucose levels during the *in vitro* culture in synthetic oviduct fluid medium on *in vitro* development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 40:595-605.
- Parrish JJ, Parrish JL and First NL. 1984. Effect of swim-up separation and heparin pretreatment of frozen-thawed spermatozoa on *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, 30(Suppl. 1):112(Abs.).
- Pinyopummintr T and Bavister BD. 1991. *In vitro*-matured/*in vitro*-fertilized bovine oocytes can develop into morula/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. *Biol. Reprod.*, 45:736-742.
- Rho GJ. 1998. Effect of sperm preparation techniques on subsequent *in vitro* development of bovine embryos. *Korean J. Emb. Trans.*, 13:117-125.
- Rosenkrans CF, 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.
- Sapienza F, Verheyen G, Tournaye H, Janssens R, Pletinex I, Derde M and Van Steirteghem A. 1993. An auto-controlled study in *in vitro* fertilization reveals the benefit of Percoll centrifugation to swim-up in the preparation of poor-quality semen. *Human Reprod.*, 8:1856-1862.
- Stubbings RB and Wosik DP. 1991. Glass wool versus swim-up separation of bovine spermatozoa for *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, 35:276.
- Utsumi K, Katoh H and Iritani A. 1988. Developmental ability of bovine follicular oocytes matured in culture and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 29:320.

White LM, Beal WE, Barne JH, Saacke TG and Varshall CE. 1984. Characteristics of bovine spermatozoa after migration through bovine serum albumin gradient. J. Animal Sci., 59:454-459.

노상호, 윤종택, 한기영, 이병천, 황우석. 1998. 단 순한정배양액의 성분조정에 의한 소 수정란의

체외생산. 한국수정란이식학회지, 13:235-243.
노상호, 이병천, 황우석. 1997. Glucose가 소 초기 배의 분할 및 발육에 미치는 영향. 한국수정란 이식학회지, 12:161-169.

(접수일 : 1999. 1. 23 / 채택일자 : 1999. 3. 5)