韓國家畜繁殖學會誌 25(2) : 163~169 (2001)
Korean J. Animal Reprod.

체외수정용 배양조건의 신속한 Q/C를 위한 정자-난자 결합분석법(OSBA) 개발

정 구 민 · 신 영 수[1]
한국생명과학연구소

Oocyte-sperm Binding Assay (OSBA) Technique for Rapid Q/C of IVF Culture Condition

Chung, K. M. and Y. S. Shin[1]
Han Kook Life Science Institute

ABSTRACT

OSBA(oocytes-sperm binding assay) is a tool developed for rapid test of optimal condition of IVF medium and protein source by binding ability of mouse sperm and egg. Mouse oocyte-cumulus complexes were prepared by removing of the cumulus cells with 0.1% hyaluronidase. 10±2 oocytes per 30 μl medium drop were inseminated with 3 μl sperm suspension and were cultured for 3 hours and 24 hours, respectively. And the oocytes were recovered gently and the No. of sperm bound on oocytes were counted.

In the Exp. 1, the ratio of oocytes bound with one sperm at least were 60.2%(50/83), 2%(2/77) and 100%(79/79) in the medium with no protein, FBS(15%, v/v) and BSA(0.4%. w/v), respectively. Fetal bovine serum(FBS) seriously inhibited sperm binding on oocyte, although bovine serum albumin(BSA) promoted the binding ability. The inhibiting effect of FBS was dependent on the concentration of FBS.

The sperm binding ability according to oocyte maturity was tested in the Exp. 2. There was no significant difference between Met. II (mature) and Met. I (intermediate mature) oocytes in the number of oocytes bound with sperm and the number of sperm bound on oocytes.

Finally, in Exp. 3, two batches of Ham's F10 medium with good and poor quality by OSBA were tested (The ratios of embryos developed from PN 1-cell stage to hatched blastocyst; 25% vs. 70%). In the medium with good quality, sperm binding ability was significantly increased ($P < 0.05$). The ratio of oocytes bound with one sperm at least was 66% and 90% in the medium with poor and good quality, respectively.

Conclusively, It was possible to test IVF medium condition rapidly and easily by OSBA.

† Corresponding author : Han Kook Life Science Institute
[1] 신구대학 자원동물산업과

Ⅰ. 서 론

인간을 비롯한 각종 포유동물의 체외수정과 관계되는 배양조건은 정도관리(quality control)를 통하여 안전하고 일정하게 유지할 수 있다. 생쥐 수정란은 발생 생리의 기본 기전이 인간과 가축의 발생 생리와도 유사한 점이 있어 정도관리에 널리 사용되고 있다. 수정란을 이용한 정도관리 방법으로 생쥐 1세포기배를 이용한 배양 방법이 시행되고 있지만, 명확한 결과를 얻기 위해서는 5일간의 배양기간이 소요되는 단점이 있다.

난자 이용의 단점을 극복하기 위하여 인간 정자나 햄스터 정자로 정도관리를 시행하고 있으나, 정자는 생쥐 배아에 비해 유해환경에 잘 견디며 정자가 요구하는 조건과 체외수정에서 요구되는 조건 역시 서로 다르다. 정자의 이용은 정도관리의 측면보다는 실제 정자의 수정능을 확인하기 위하여 주로 사용되어 왔는데, 투명대를 제거한 햄스터 난자와 정자의 융합현상을 보는 HEPT(hamster zona-free oocytes), 인간 난자의 투명대를 이용하는 SPA(sperm penetration assay) 등이 가장 대표적인 방법이다. 그러나 이러한 방법들은 경제적인 측면이나 도덕적인 측면 및 효율적인 측면에서 사용하기가 어려운 것이 사실이다.

본 연구자들은 인간을 비롯한 동물의 체외수정시 난발생에 결정적인 영향을 미치는 최적의 배양조건을 빠른 시간 내에 찾기 위하여 마우스 정자-난자 결합분석법(oocytes-sperm binding assay; OSBA)을 개발하였다.

본 연구는 자체 개발한 OSBA의 유용성을 평가하기 위해서 단백질원, 배양액의 질, 난자의 성숙도에 따라서 정자와 난자의 결합능력을 알아보았다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 마우스 난자 준비

4~5주령의 hybrid(C57BL/6 × CBA/N) F_1 암컷에 PMSG(Sigma) 5IU를 복강내 주사하였으며, 48시간 후에 5IU hCG(Sigma)를 주사하여 과배란을 유도하였다. hCG주사 후 14시간째에 난관을 절개하는 방법으로 난구세포가 부착된 난자를 회수하였다. 회수된 난자를 0.1% hyaluronidase가 첨가된 DPBS에 30초~1분간 침지하여 난구세포를 제거하였으며, 신선한 DPBS 배양액으로 옮겨 3회 세척하였다. 난자의 성숙도는 제1극체의 존재 유무에 따라 Met. Ⅱ(mature)와 Met. Ⅰ(intermediate mature)으로 구분하였다.

수정란을 이용한 정도관리를 위하여, 암컷은 hCG 주사 직후 동일계통의 수컷과 1:1로 합사시킨 후 다음 날 오전 10시 이전에 질전을 확인하였으며, 질전이 형성된 암컷으로부터 hCG 주사 16~18시간째에 정핵기의 1세포 수정란을 회수하였다. 채란은 난관팽대부를 찢어 OCCs(oocyte-cumulus complexes)를 회수하여 0.1% hyaluronidase 용액으로 난구세포를 제거하였다. 회수된 1세포기배는 3~4회 반복세척 과정을 통해 정상적인 난자를 선별하여 실험에 사용하였다.

2. 마우스 정자 준비와 OSBA

8주령 이상의 hybrid(C57BL/6 × CBA/N) F_1 수컷에서 정소상체 미부를 절개하는 방법으로 정자를 준비하였다. 단백질원이 없는 배양액에서 정소상체 미부의 정자를 유리하여 10분간 37℃ 배양기에서 배양한 제1차 정자 부유액을 역시 단백질원이 없는 배양액과 1:5로 희석하여 다시 10분간 배양하였다(제2차 정자부유액). 제2차 정자 부유액 3 μl를 10±2개의 난자를 들어있는 배양액 소적(30 μl)에 넣어서 OBSA를 실시하였다. 정자 주입 후 3시간~24시간째에 조심스럽게 난자를 뽑아내어 배양액으로 세척한 후 도립현미경(100×)에서 난자에 부착된 정자의 수를 세었다.

3. 배양액과 단백질원의 준비

본 연구에 사용된 기본 배양액으로 0.4% BSA (Fraction V; Sigma)가 첨가된 DPBS 배양액을 준비하여, 난자의 회수, 세척 등에 이용하였으며, OSBA를 위하여 Ham's F-10 배양액에 단백질원을 첨가하지 않거나 혹은 0.4% BSA, 1, 5, 10, 15,

20% FBS(Sigma) 및 10% 양수(amniotic fluid; AF)를 각각 첨가하여 준비하였다.

4. 통계분석

본 실험에서 얻어진 자료는 χ^2 test방법으로 처리간 유의차 검정을 실시하였으며, p value가 0.05 이하인 경우 유의하게 차이가 나타나는 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 수정 배양액내의 단백질원의 종류 및 농도에 따른 효과

OSBA를 이용하여 수정 배양액내에 첨가된 단백질원의 종류에 대한 효과를 확인하기 위하여, 단백원 무첨가, 15% FBS 및 0.4% BSA를 각각 첨가한 Ham's F-10배양액에 성숙 난자와 정자를 넣어 3시간 혹은 24시간 동안 수정을 유도하여 난자에 부착된 정자수를 측정한 결과는 Table 1과 같다. 수정 3시간째에 난자당 하나 이상의 정자가 부착된 난자의 비율은 BSA 첨가군, 무첨가군, FBS첨가군의 순으로 유의한 차이를 나타내었으며(100% vs. 60.2% vs. 2.1%), 24시간동안 수정된 경우보다 3시간 동안 수정된 경우가 높은 정자 부착율을 보였다.

따라서 투명대에 정자가 부착되는데 있어서 단백원이 매우 중요한 역할을 한다는 사실을 확인할 수 있었다. 특히 정자와 난자의 결합에 있어서 혈청이 매우 유해한 효과가 있음을 알 수 있었다. 이러한 효과는 결합에 요하는 배양시간을 연장하여도 마찬가지였다. 난자에 부착된 정자의 수는 단백원 무첨가시 소수(1～3개)에 국한되었지만, 알부민을 첨가한 배양액에서는 70% 이상의 난자가 다수(11개 이상)의 정자가 부착된다는 사실을 알 수 있었다. 결론적으로 정자와 난자의 결합은 배양액의 조건(단백원의 종류)에 따라서 매우 민감한 반응을 보인다는 사실을 알 수 있었다.

한편, FBS의 첨가농도에 따른 정자의 결합능력을 알아보기 위하여, Ham's F-10에 0, 1, 5, 10 and 20% FBS를 첨가한 후 정자와 난자를 배양하여 투명대에 부착된 정자수를 측정한 결과는 Table 2와 같다. 대조군(0.4% BSA)에서 정자의 결합능력이 우수하게 나타난 것과는 달리, FBS는 난자에 대한 정자의 부착을 강하게 저해하는 것으로 나타났다. 난자에 하나 이상의 정자가 부착된 경우는 0%, 1%, 5% FBS 첨가군 각각에서 유의한 차이를 나타내었으며(51.0% vs. 89.9% vs. 4.6%), 5% FBS 농도 이상에서는 처리군간 유의차는 나타나지 않았다(4.6～3.6%). 특히, 1% FBS 첨가군의 경우 2～5개의 정자가 부착된 것이 54.4%로 무첨가군의 14.3%

Table 1. Effect of protein source added in insemination medium on sperm binding ability on zona pellucida of mature mouse oocytes

Time after IVF (hr)	Proteins added in medium	No. of oocytes insem.	No. of sperm bound on zona & No.(%) of eggs with 0	1	2～5	6～10	>11	No. (%) of eggs bound with one sperm at least
3	Nothing	83	33(39.8)[a]	28(33.7)[a]	18(21.7)[a]	4(4.8)[a]	0(0.0)[a]	50(60.2)[a]
	FBS(15%)	77	75(97.4)[b]	2(2.1)[b]	0(0.0)[b]	0(0.0)[a]	0(0.0)[a]	2(2.1)[b]
	BSA(0.4%)	79	0(0.0)[c]	0(0.0)[b]	5(6.3)[c]	18(22.8)[b]	56(70.9)[b]	79(100)[c]
24	Nothing	34	29(85.3)[a]	2(5.9)[a]	3(7.7)[a,b]	0(0.0)[a]	0(0.0)[a]	5(14.7)[a]
	FBS(15%)	34	32(94.1)[a]	1(2.9)[a]	1(2.9)[a]	0(0.0)[a]	0(0.0)[a]	2(5.9)[a]
	BSA(0.4%)	34	5(14.7)[b]	11(32.4)[b]	9(26.5)b	3(8.8)[a]	6(17.6)[b]	29(85.3)[b]

[a,b,c] ; Different superscripts in the same row were significantly different ($p < 0.05$)

Table 2. Effect of concentration of fetal bovine serum added in insemination medium on sperm binding on the zona pellucida of mature mouse oocytes

Concen. of FBS (%)	No. of oocytes insem.	No. (%) of eggs bound with sperm					No. (%) of eggs bound with one sperm at least
		0	1	2~5	6~10	>11	
0	49	24(50.0)[a]	15(30.6)[a]	7(14.3)[a,d]	3(6.1)[a,d]	0(0.0)[a]	25(51.0)[a]
1	79	8(10.1)[b]	12(15.2)[b]	43(54.4)[b]	15(19.0)[b]	1(1.3)[a]	71(89.9)[b]
5	87	83(95.4)[c]	3(3.4)[c]	1(1.1)[c]	0(0.0)[c]	0(0.0)[a]	4(4.6)[c]
10	81	78(96.3)[c]	3(3.7)[c]	0(0.0)[c]	0(0.0)[c]	0(0.0)[a]	3(3.7)[c]
20	84	81(96.4)[c]	3(3.6)[c]	0(0.0)[c,d]	0(0.0)[c]	0(0.0)[a]	3(3.6)[c]
Control	86	0(0.0)[d]	0(0.0)[c]	1(1.2)[c]	1(1.2)[c,d]	84(97.7)[b]	86(100)[d]

* Control = 0.4% BSA in Ham's F-10

[a.b.c.d] ; Different superscripts in the same row were significantly different ($p<0.05$)

에 비해 유의하게 높았다. 따라서 Table 2의 실험 결과는 정자와 난자의 결합에 결정적인 영향을 미칠 수 있는 배양조건을 명확히 판별할 수 있음을 시사하고 있다.

2. 단백질원과 난자의 성숙도와의 관계

제1극체의 유무에 따라서 난자의 성숙도를 Met. Ⅱ(mature)와 Met. Ⅰ(intermediate mature)으로 구분하였으며, 각각의 난자는 단백원 무첨가, 15% FBS, 0.4% BSA 및 10% AF(양수)가 각각 첨가된 Ham's F-10 배양액에서 OSBA를 실시하였다. 배양 3시간 후에 측정한 OSBA 결과는 Table 3에 나타난 바와 같다.

Met. Ⅱ 난자와 Met. Ⅰ 난자에 대한 정자의 결합능력은 비슷한 양상을 보였다. 단백원 무첨가 배양액에서는 Met. Ⅰ 난자가 Met. Ⅱ 난자보다 정자-난자 결합율이 다소 높게 나타났다. 반면에 알부민 혹은 양수 첨가 배양액에서는 Met. Ⅱ 난자가 Met. Ⅰ 난자보다 다소 많은 수의 정자가 부착되었다. 그러나 혈청첨가 배양액에서는 난자의 성숙도와는 무관하

Table 3. Interaction between protein source added in insemination medium and oocyte maturity on sperm binding ability on zona pellucida of mouse oocytes

Maturity of oocytes	Proteins added in medium	No. of oocytes insem.	No. (%) of eggs bound with sperm					No. (%) of eggs bound with one sperm at least
			0	1	2~5	6~10	>11	
Mature	Nothing	17	16(94.1)[a,c]	1(5.9)[a,b]	0(0.0)[a]	0(0.0)[a]	0(0.0)[a]	1(5.9)[a]
	FBS(15%)	17	17(100)[a]	0(0.0)[a]	0(0.0)[a]	0(0.0)[a]	0(0.0)[a]	0(0.0)[a]
	BSA(0.4%)	17	0(0.0)[b]	0(0.0)[a]	0(0.0)[a]	0(0.0)[a]	17(100)[b]	17(100)[b]
	AF(10%)	15	10(66.7)[c]	4(26.7)[b]	0(0.0)[a]	1(6.7)[a]	0(0.0)[a]	5(33.3)[c]
Intermediate mature	Nothing	39	25(64.1)[a]	2(17.9)[a]	6(15.4)[a]	1(2.6)[a]	0(0.0)[a]	14(35.9)[a]
	FBS(15%)	40	40(100)[b]	0(0.0)[a]	0(0.0)[b,d]	0(0.0)[a]	0(0.0)[a]	0(0.0)[b]
	BSA(0.4%)	45	1(2.2)[c]	4(8.9)[a,b]	16(35.6)[c]	13(28.9)[b]	11(24.4)[b]	44(97.8)[c]
	AF(10%)	44	35(79.5)[a,b]	6(13.6)[b]	3(6.8)[a,d]	0(0.0)[a]	0(0.0)[a]	9(20.5)[d]

[a.b.c.d] ; Different superscripts in the same row were significantly different ($p < 0.05$)

Table 4. Effect of quality of Ham's F-10 medium on sperm binding ability on the zona pellucida of mature mouse oocytes

Serial No. of Ham's F-10	No. (%) of blastocysts* Hatched	Total	No. of oocytes treated	No. (%) of eggs bound with sperm 0	1	2~5	6~10	>11	No. (%) of eggs bound with one sperm at least
151	5/20(25.0)[a]	14/20(70.0)[a]	42	15(35.7)[a]	15(35.7)[a]	10(23.8)[a]	2(4.8)[a]	0(0.0)[a]	27(64.3)[a]
152	14/20(70.0)[b]	17/20(85.0)[a]	42	4(9.5)[b]	10(23.8)[b]	22(52.4)[b]	3(7.1)[a]	3(7.1)[a]	38(90.5)[b]

* Means blastocysts developed *in vitro* from pronuclear embryos of F1 hybrid mice in protein-free Ham's F-10 medium.

[a,b] ; Different superscripts in the same row were significantly different ($p < 0.05$)

게 정자의 부착율은 모두 0%였다. 이러한 결과는 OSBA에서 Met.Ⅱ난자 대신에 Met.Ⅰ난자를 이용해도 비슷한 결과를 얻을 수 있음을 시사한다.

3. Ham's F-10 배양액의 질에 따른 OSBA의 효과

생쥐 1세포기배를 일련번호 151과 152 Ham's F-10 배양액에서 각각 4일간 배양한 결과(배반포기까지의 발달율)와 OSBA의 결과를 비교한 결과는 Table 4와 같다.

가장 널리 사용되는 정도관리 방법인 생쥐 1세포기배에서 배반포까지의 배발달율을 기준으로 하여 Ham's F-10 배양액을 평가하여 일련번호 151은 불량(poor), 152는 양호(good)로 판정하였다(25% vs. 70%). 반면에, OSBA 결과로써 하나 이상의 정자가 부착된 비율은 일련번호 152 배양액이 151 배양액보다 유의하게 높게 나타났으며(90.5% vs. 64.3%), 정자의 부착수도 152에서 많게 나타났다. 이 결과는 생쥐 1세포기배에서의 결과와도 일치하며 이것으로 볼 때 OSBA는 배양액의 질적평가에 유용한 정도관리 방법이라는 것을 알 수 있었다.

Ⅳ. 고 찰

OSBA(Oocyte-Sperm Binding Assay)는 배양액에 첨가되는 단백질원의 종류, serum의 농도, 배양액의 batch에 따라 정자의 결합능력이 다르다는 것을 보여주었으며, 정도관리 방법으로서의 유용성을 확인시켜 주었다. 본 실험에서는 FBS가 난자내 정자의 부착을 심각하게 저해한다는 것을 보여주었는데, 특히 농도가 증가함에 따라 부착되는 정자수는 유의하게 감소하였다. 그러나 BSA의 첨가는 FBS, AF등과 같은 다른 단백질원이나 무첨가군에 비해 난자내 정자의 부착율을 유의하게 증가시켜 체외수정에 효과적이라는 것을 보여주었다.

본 실험에는 정장이 포함되지 않은 정소상체 미부정자를 사용하였으며, 따라서 정장유래 단백질원이 포함되지 않았다. Harrison 등(1982)은 BSA의 첨가로 가역적으로 정자의 운동성을 자극할 수 있다고 보고하였으며, Waberski 등(1989)도 BSA는 돼지정자에서 시험보존 6일 동안 정자의 운동성을 자극한다는 것을 발견했다. 따라서 BSA에 의해 운동성이 자극된 정자는 체외수정시 난자의 투명대에 강하게 부착될 수 있는 것으로 보인다.

IVF-ET 프로그램의 정도관리를 위하여 가장 널리 사용되고 있는 방법이 생쥐 2세포기배의 발달율을 평가하는 것이다. 1세포기배를 사용하는 것이 2세포기배를 사용하는 것보다 suboptimal condition에 민감한 것으로 알려져 있으나(Davidson 등, 1988), 대부분의 생쥐배아에서 *in vitro* 2- cell block을 가지므로 그 이용이 제한되어 있다. 2세포기배 역시 hCG 주사 후 40~44시간째에 회수할 때 종에 따라서는 일부의 난자들이 *in vitro* 2-cell block에 걸리기도 하며, 배반포기배까지 발달율을 확인하는데 적어도 4일이 소용된다. 체외수정 및 배양에 사용하는 대부분의 배양액은 2주 이내로

사용하는 것이 효과적인데, 수정란을 이용할 경우 과배란 유도일수를 포함해 1주 내외의 시간을 요하므로 배양액의 준비, 보관, 사용에 효율성이 떨어진다는 단점이 있다.

인간 정자나 햄스터 정자의 체외 생존결과를 통한 정도관리 방법은 수정란을 이용하는 경우보다 빠르고 간편하지만, 정자는 난자에 비해 민감도가 낮으며 정자가 요구하는 조건과 체외 수정시 요구하는 조건이 일치하지 않아 널리 사용되지 않고 있다.

본 연구에 사용된 OSBA는 배양액의 질적 평가에 있어서 생쥐1세포기배의 배발달을 이용한 검사결과와 일치하므로, 기존의 정도관리 방법과 동일한 효과를 기대할 수 있을 것으로 보인다. 또한 쉽게 준비할 수 있는 생쥐의 난자와 정자를 이용하였으며, 배양시간이 3시간으로 짧고, 평가방법이 간편해 시간적, 경제적으로도 효율성이 높다는 장점이 있다. OSBA의 정확도를 점검하기 위해서는 다른 정도관리 체계와 추가적인 비교실험을 하여야 할 것이나, 지금까지의 결과로 비추어 볼 때 체외수정용 배양액 및 단백질원의 정도관리, 수정능획득이나 첨체반응시 정자의 능력, 난자와 투명대내 sperm receptor의 기능성을 평가하는 유용한 평가방법으로 활용될 수 있을 것이라 사료된다.

V. 요 약

본 연구는 마우스 정자-난자 결합분석법(oocytes-sperm binding assay; OSBA)을 이용하여 단백질원, 배양액의 질, 난자의 성숙도에 따라서 정자와 난자의 결합능력을 알아보고 그 유용성을 알아보기 위하여 실시하였다.

4~5주령의 hybrid(C57BL/6 × CBA/N) F_1 암컷에서 회수된 미수정란에 0.1% hyaluronidase를 이용하여 난구세포를 제거하였으며, 제1극체의 존재유무에 따라 Met.Ⅱ(mature)와 Met.Ⅰ(intermediate mature)로 구분하였다. 암컷과 동일 계통의 8주령 이상된 수컷에서 회수된 정소상체 미부정자를 37℃에서 10분간 배양하였다. 배양된 정자부유액은 단백원 무첨가배양액과 1:5로 희석하여 10분간 배양한 다음 3 μl를 10±2개의 난자를 들어있는 배양액 소적(30 μl)에 넣어서 정자와 난자의 결합을 유도하였다. 정자 주입 후 3시간 혹은 24시간째에 난자를 뽑아내어 세척하였으며, 도립현미경(100×)에서 난자에 부착된 정자의 수를 세었다. 수정란을 이용한 정도관리를 위하여 과배란이 유도된 암컷은 수컷과 합사시켰으며, hCG 주사 16~18시간째에 전핵기의 1세포 수정란을 회수하였다.

단백질원의 종류에 대한 효과를 확인하기 위하여 OSBA를 실시한 결과, 수정 3시간째에 난자당 하나 이상의 정자가 부착된 난자의 비율은 BSA첨가군, 무첨가군, FBS 첨가군의 순으로 유의한 차이를 나타내었다(100% vs. 60.2% vs. 2.1%). 한편, BSA 첨가군에서 정자의 결합능력이 우수하였으나 FBS는 매우 유해하였으며 FBS의 농도가 5%까지는 증가함에 따라 유의한 차이를 나타내었다. 따라서 투명대에 정자가 부착에 있어서 단백원이 매우 중요한 역할을 하며, OSBA는 정자와 난자의 결합에 결정적인 영향을 미칠 수 있는 배양조건을 명확히 판별할 수 있음을 시사하였다.

Met.Ⅱ(mature)와 Met.Ⅰ(intermediate mature) 난자를 단백원 무첨가, 15% FBS, 0.4% BSA 및 10% AF(양수)가 첨가된 Ham's F-10 배양액에서 OSBA를 실시한 결과, 난자의 성숙도에 상관없이 정자의 결합능력은 비슷한 양상을 보였으며, BSA 첨가군, 양수첨가군, 무첨가군, FBS첨가군 순으로 높게 나타났다. 이러한 결과는 OSBA에서 Met.Ⅱ 난자 대신에 Met.Ⅰ난자를 이용해도 비슷한 결과를 얻을 수 있음을 시사한다.

생쥐 1세포기배에서 배반포까지의 배발달율을 기준으로 Ham's F-10 배양액을 평가하여 일련번호 151은 불량(poor), 152는 양호(good)로 판정한 다음, 동일한 배양액에 OSBA를 실시한 결과 생쥐 1세포기배의 결과와 마찬가지로 일련번호 152 배양액이 151 배양액보다 유의하게 높게 나타났다. 따라서 OSBA는 기존의 정도관리 방법과 동일한 효과를 기대할 수 있을 것이다.

결론적으로, OSBA는 배양액 조건에 따라 정자의 결합능력이 다르다는 것을 보여주었으며, 정도관리 방법으로서의 유용성을 확인시켜 주었다. 또

한 쉽게 준비할 수 있는 생쥐의 난자와 정자를 이용하였으며, 배양시간이 3시간으로 짧고, 평가방법이 간편해 시간적, 경제적으로도 효율성이 높다고 사료된다.

Ⅵ. 인용문헌

1. Ackerman, S. B., Swanson, R. J., Adams, P. J. and Wortham, J. W. E. Jr. 1983. Comparison of strains and culture media used for mouse *in vitro* fertilization. Gamete Res., 7:103.
2. Davidson A., Vermesh, M., Lobo, R. A. and Paulson, R. J. 1988. Mouse embryo culture as quality control for human *in vitro* fertilization; the one-cell versus the two-cell model. Fertil. Steril., 49:516-521.
3. Harrison, R. A. P., Dott, H. M. and Foster, G. C. 1982. Bovine serum albumin, sperm motility, and the dilution effect. J. Exp. Zool., 222:81-88.
4. Waberski, D., Weitze, K. F., Rath, D. and Sallmqann, H. P. 1989. Effect of bovine serum albumin and zwitterionic buffers on stored liquid bore semen. Zuchthygiene, 24:128-133
5. 정구민, 문신용, 오선경, 임경순, 장윤석. 1990. 배양액과 첨가제의 효율적인 품질검사에 관한 연구. 한국수정란이식학회지, 5:28-41.

(접수일자 : 2001. 4. 13. / 채택일자 : 2001. 5. 10.)