

돼지 난포란 유래 체외수정란 생산에 대한 제요인의 영향

Ⅲ. 체외수정배양액과 정자농도가 체외수정 및 체외발달에 미치는 영향

연성흙[†] · 손동수 · 진현주 · 최선호 · 김인철 · 박창식¹ · 이규승¹
농촌진흥청 축산연구소 가축유전자원시험장

Effects of Some Factors on *In Vitro* Production of Embryos from Antral Follicle-Derived Porcine Oocytes Ⅲ. Effects of Fertilization Media and the Sperm Concentration during Fertilization on *In Vitro* Fertilization and Development

S. H. Yeon[†], D. S. Son, H. J. Jean, S. H. Choi, I. C. Kim, C. S. Park¹ and K. S. Lee¹
Animal Genetic Resources Station, National Livestock Research Institute, R.D.A.

SUMMARY

This study was carried out to examine the effects of fertilization media and sperm concentration on *in vitro* fertilization (IVF) and development (IVD) of porcine oocytes matured *in vitro*. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were collected from antral follicles of porcine ovaries collected from abattoir, and were matured *in vitro* in modified NCSU-23 (mNCSU-23) supplemented with 10% porcine follicular fluid (pFF). After the fertilization by experimental scheme, putative embryos were developed *in vitro* in NCSU-23. The results are as follows.

When the oocytes were fertilized *in vitro* in modified TBM or modified TLP-PVA by 1×10^5 sperm/ml, all of the fertilization parameters were not significantly different between two media. Subsequently, as these putative embryos were developed *in vitro* in NCSU-23, the percentage of oocytes cleaved and of blastocysts were not different between two media, either.

When the oocytes were fertilized *in vitro* in mTBM by 5×10^4 , 1×10^5 or 5×10^5 sperm/ml, all of the fertilization parameters were significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) increased as sperm concentration was elevated. Subsequently, as these putative embryos were developed *in vitro* in NCSU-23, the percentage of oocytes cleaved and of blastocysts were significantly boosted ($P < 0.01$) as sperm concentration at fertilization was elevated from 5×10^4 to 1×10^5 sperm/ml, but were not different between 1×10^5 and 5×10^5 sperm/ml.

(Key words : porcine oocyte, IVF, IVD, fertilization media, sperm concentration)

* 본 연구는 농촌진흥청 대형공동연구과제(2000-2002) 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

¹ 충남대학교 동물자원학부(Division of Animal Science and Resources, Chungnam National University)

[†] Correspondence : E-mail : yeonsu@rda.go.kr

서 론

돼지 체외성숙란의 체외수정능력이 Motlic과 Fulka(1974)에 의해 확인된 후, Iritani 등(1978)은 체외성숙란의 체외수정을 성공시켰고, Mattioli 등(1989)은 체외성숙란의 체외수정후 추정수정란을 수란돈에 이식하여 처음으로 산자를 생산함으로써 체외성숙/체외수정란의 발달능력이 확인되었다. 더 나아가, Yoshida 등(1993), Day 등(1998), 그리고 Marchal 등(2001)이 각각 체외성숙/체외수정 유래의 2~4세포기, 8세포기~상실기, 배반포기의 돼지 수정란을 이식하여 산자를 생산하는데 성공함으로써 체외성숙/체외수정/체외발달 유래의 수정란도 출생까지의 발달능력을 갖고 있다는 것이 확인되었다.

돼지 난자의 체외수정에 사용되고 있는 배양액에는 그 구성물질이 서로 다른 여러 가지가 있지만, 이들 배양액간 중요한 차이점은 Ca^{2+} 의 농도와 bicarbonate 존재 여부이다. Ca^{2+} 는 정자의 수정능 획득과 침체반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 수정능획득이 일어나는 동안 정자세포막의 여러 경로를 통해 세포 밖의 Ca^{2+} 가 세포내로 유입되는데(Tulsiani 등, 1998; Parrish 등, 1999) 정자내에 Ca^{2+} 가 증가하면 수정능획득에 필수적인 세포내의 반응 즉, cATP 증가, pH 상승 및 tyrosine 인산화 등이 수반된다고 보고되었다(Visconti와 Kopf, 1988; Parrish 등, 1994; Uguz 등, 1994; Walensky와 Snyder, 1995). 포유류에서 정자의 수정능획득과 침체반응에 Ca^{2+} 이 필요한 것은 분명하지만(Fraser, 1995), bicarbonate 역시 정자의 수정능획득과 침체반응을 일으킬 수 있는 물질로 알려져 있다(Florman 등, 1989; Lee와 Storey, 1989; Abeydeera 등, 1997). 그러나 bicarbonate는 Ca^{2+} 를 정자 내로 일찍 그리고 많이 유입시키므로(Harrison 등, 1993), bicarbonate 존재하에 Ca^{2+} 농도가 높으면, 자연적인 침체반응을 자극시켜 정자 침투율과 다정자 수정이 떨어질 수 있는 것으로 보고되었다(Abeydeera와 Day, 1997).

현재 돼지 체외수정에 많이 사용되고 있는 배양액 중에서 mTBM은 Ca^{2+} 농도가 높은 반면, bicarbonate는 들어있지 않고, bicarbonate가 들어가

있는 BO액, mKRB, mTALP는 모두 Ca^{2+} 농도가 낮은 것이다. 이들 배양액 중에서 정자침투율이나 다정자수정율, 그리고 계속되는 체외발달을 고려할 때, 어떤 배양액이 더 적합할지는 분명치 않다.

한편, 돼지 난자의 체외수정에 적절한 정자농도 역시 보고마다 극단적인 차이를 나타내고 있다. 체외수정시 배양소적에 들어가는 난자당 정자수와 다정자 수정 발생 사이에는 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되었다(Rath, 1992). 이와 관련하여 Abeydeera(2002)와 Nagai와 Moor(1990)는 체내수정과 비교할 때 체외수정은 체외성숙란을 지나치게 많은 정자에 너무 오랫동안 노출시키기 때문에 다정자 수정을 발생시키는지도 모르며, 이론적으로는 배양소적에 들어가는 난자당 정자수를 줄여줌으로써 다정자수정의 문제를 해결할 수 있을 것이라고 하였다.

본 연구는 돼지 체외수정에 사용되고 있는 몇 가지 배양액 중에서 체외수정란 생산체계에 적합한 배양액을 선발하고, 선발된 배양액에서 체외수정율과 다정자수정율을 고려한 최적의 체외수정 정자농도를 구명하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. COCs 채취와 pFF 준비

도축장에서 체중 110kg 전후의 미경산돈 난소를 도축 직후 회수하여 35~38°C의 멸균생리식염수(0.9% NaCl)로 2회 세척한 다음, 같은 액으로 채운 보온병에 침지하여 60분 이내에 실험실로 운반하였고 실험실에서 신선한 생리식염수로 다시 2~3회 난소를 세척한 다음 COCs를 채취했다. COCs는 직경이 3~6mm의 포상난포로부터 19개이지 주사침이 장착된 10ml 주사기로 난포액과 함께 흡인한 다음, 37°C의 가온 블록에 미리 준비해둔 15ml 원심분리관(Corning, USA)으로 옮겼다. 이 원심분리관을 10분간 정치시켜 침전된 pellet을 회수하고 35×10mm petri-dish(FALCON, USA)에서 mTL-Hepes-PVA(Long 등, 1999)로 희석하였다. 실험현미경(Olympus SZH-10, Japan)하에서 난구세포가 2~3층 이상 치밀하게 붙고 난자의 세포질이 균일한 COCs만을 선별하여 실험에 공시했다.

돼지난포액(pFF)은 COCs 채취시와 같은 방법

으로 회수하여 실험실로 운반한 돼지 난소의 3~6 mm 포상난포에서 채취하여 4°C의 냉수에 미리 준비해둔 15ml 원심분리관에 옮겼다. 이어서 4°C 3,000 rpm에서 30분간 원심분리한 다음 상정액만을 분리하여 2.9 μm 과 0.45 μm 의 이중필터(Sigma, USA)로 여과하여 -20°C 냉동고에 보관해 두고 성숙배양액 제조시 용해하여 사용했다.

2. 미성숙 난포란의 성숙배양

체외성숙용 배양액은 NCSU-23(Petters와 Wells, 1993)에서 0.4% BSA 대신 10% pFF를 넣고, 0.6 mM cysteine, 50 μM β -mercaptoethanol, 그리고 1 mM dbcAMP를 첨가하여 사용했고, 호르몬은 10 IU/ml PMSG와 10 IU/ml hCG를 첨가했다.

체외성숙배양을 위해서는 4-well dish (Nunc, Denmark)를 사용하여 각 well당 500 μl 의 성숙용 배양액을 넣고 mineral oil로 덮은 다음 2시간 이상 전배양을 실시했다. 공시된 COCs는 TL- Hepes-PVA와 성숙용 배양액으로 각각 3회 세정하여 미리 준비된 성숙배양액으로 옮겼다. CO₂ 배양기에서의 배양조건은 배양 전기간 39°C, 5% CO₂ 및 포화습도였다. 세정된 COCs는 4-well dish의 각 well당 50개 내외씩 넣어 호르몬과 dbcAMP가 첨가된 배양액에서 20~22시간 배양한 다음, 호르몬과 dbcAMP가 첨가되지 않은 배양액에서 22~24시간 배양하여 총 44~46시간 동안 배양함으로써 체외성숙을 유도했다.

3. 수정배양액 및 난자의 준비

체외수정용 배양액은 2.0 mM caffeine sodium benzoate와 0.1% BSA(Sigma, Fraction V)를 첨가한 mTBM(Abeydeera와 Day, 1997) 또는 mTLP-PVA(Long 등, 1999)를 사용했으며, mTBM은 체외수정에 사용하기 전 48시간 이상 전배양을 실시하여 안정화시킨 다음 이용했다.

체외성숙이 완료된 COCs를 0.1% hyaluronidase가 포함되고 pFF가 들어가지 않은 성숙배양액에서 난구세포를 제거한 다음, 난자를 체외수정용 배양액으로 3회 세정하여 35×10 mm petri-dish에 mineral oil로 덮은 90 μl 의 수정용 배양소적에 넣고 매 정할 때까지 배양기 내에서 배양했다.

4. 정자의 준비와 체외수정

정액은 수압법으로 채취하여 Modena 희석액(SGI, USA)으로 생존정자수로 3×10^7 sperm/ml의 농도가 되도록 액상정액을 만들어 3일 이내에 사용했고, 정자 세정액은 0.1% BSA와 75 $\mu\text{g/ml}$ penicillin G 및 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin sulfate를 첨가한 D-PBS를 사용했다.

체외수정용 정액을 준비하기 위하여 액상정액 1 ml를 취한 다음 세정액 2 ml과 혼합하여 15 ml 원심분리관에 넣고 700×g에서 5분간 원심분리를 실시하여 상층액을 제거했다. 그 다음 침전된 정자에 세정액 3 ml을 더하여 같은 방법으로 원심분리하고 상층액을 제거하는 세정과정을 2회 더 실시했다. 최종적으로 원심분리관 하단에 남은 정자 침전물에 체외수정용 배양액을 3 ml를 넣어 39°C, 5% CO₂ 및 포화습도의 CO₂ 배양기 내에서 15분간 정지했다. 부유된 정자들을 회수하여 Makler counting chamber(Sefi-Medical Instruments, Israel)로 운동정자수를 계산한 다음, 운동정자의 최종농도가 체외수정 소적내 정자농도의 10배가 되도록 체외수정용 배양액으로 다시 희석했다. 이 정액을 난자가 들어있는 90 μl 소적에 10 μl 씩 주입한 다음, 39°C, 5% CO₂ 및 포화습도의 CO₂ 배양기 내에서 5~6시간 동안 난자와 함께 배양하는 방법으로 체외수정을 실시했다.

5. 염색 및 판정

체외수정이 종료된 추정수정란(putative embryos)을 반복당 9개씩 취하여 잔류 난구세포와 투명대에 부착된 정자를 제거하고 체외발달 배양액에 옮겨 10시간 동안 추가로 배양한 다음, Byun 등(1991)의 방법에 따라 난자급속염색법(Rapid Staining Method)으로 염색하고 위상차현미경(Olympus AX70, 400×)하에서 정자의 침입, 다정자수정, 융성전핵 형성 등 수정 여부를 확인했다.

6. 체외수정란의 발달배양

체외성숙/체외수정란의 발달배양에는 0.4% BSA(Sigma, Fraction V)가 함유된 NCSU-23(Petters and Wells, 1993)을 사용했다. 체외수정이 완료된 추정수정란은 체외발달배양액으로 3회 세척한 다

음 4-well dish(Nunc, Denmark)의 500 μ l 체외발달 배양액에 well당 40개 내외씩 옮겨 넣은 다음, 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 및 포화습도의 배양기 내에서 배양하여 체외발달시켰다. 체외배양 개시후 약 44시간에 난할율을, 약 144시간에 배반포발달율을 조사했다.

7. 실험 구성

첫 번째 실험은 체외수정배양액이 체외수정 및 체외발달에 미치는 영향을 구명하기 위해 mNCSU-23에서 체외성숙시킨 난자를 mTBM 또는 mTLP-PVA에서 운동정자수 1×10^5 /ml로 체외수정시킨 후 체외수정율과 체외발달율을 조사했다. 두 번째 실험은 체외수정란 생산에 미치는 최종정자농도의 영향을 구명하기 위해 체외수정배양액은 mTBM으로, 체외수정 소적 내의 최종정자농도는 운동정자수를 각각 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 sperm/ml로 조정하여 체외수정시킨 다음 체외수정율과 체외발달율을 조사했다.

8. 통계처리

본 연구에서는 각 실험별로 처리당 4회 이상 반복 시험을 수행했으며, 조사된 성적은 실험계획에 따라 *t*-검정 또는 분산분석(ANOVA)을 실시한 다

음, 유의성이 인정된 것에 대해서는 LSD에 의하여 처리간 차이를 구분했다.

결과 및 고찰

1. 수정배양액의 영향

체외성숙란을 mTBM 또는 mTLP-PVA에서 액상정액을 이용하여 운동정자수 1×10^5 sperm/ml로 체외수정시킨 결과는 Table 1과 같다. mTBM에서 수정시킨 난자의 정자침투율, 응성전핵형성을, 다정자수정발생을 및 난자당정자수는 각각 83.3%, 86.9%, 35.5% 및 1.8개, mTLP-PVA에서 수정시킨 난자의 그것들은 각각 76.4%, 81.7%, 37.3% 및 1.9개로 두 배양액간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

이어서 이들 체외수정란을 NCSU-23에서 체외발달시킨 결과는 Table 2와 같다. mTBM에서 수정시킨 난자의 난분할율, 분할란대 배반포 발달율 및 추정수정란대 배반포 발달율은 각각 51.1%, 20.6% 및 10.7%로 mTLP-PVA에서 수정시킨 난자의 그것들(각각 48.6%, 17.5% 및 8.6%)과 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

이러한 결과는, Martinez-Madrid 등(2001)이 수

Table 1. Effects of fertilization media on *in vitro* fertilization of *in vitro* matured oocytes derived from porcine antral follicles

Medium	Total no. of oocytes examined	% (mean \pm SE) of oocytes ¹			Rate of polyspermy (Mean \pm SE)	Mean no. of spermatozoa in penetrated oocytes (Mean \pm SE)
		penetrated	with MPN	with PPN		
mTBM	53	83.3 \pm 4.8	86.9 \pm 3.2	28.2 \pm 5.3	35.5 \pm 4.7	1.8 \pm 0.2
mTLP-PVA	50	76.4 \pm 3.8	81.7 \pm 2.1	25.0 \pm 7.2	37.3 \pm 4.1	1.9 \pm 0.1

¹ MPN: Male pronucleus, PPN: Polypronucleus.

Table 2. Effects of fertilization media on *in vitro* development of *in vitro* fertilized embryos derived from porcine antral follicles

Medium	No. of oocytes inseminated	% of oocytes cleaved (Mean \pm SE)	% of blastocysts at day 6 (mean \pm SE)	
			/ cleaved	/ inseminated
mTBM	243	51.1 \pm 4.4	20.6 \pm 1.8	10.7 \pm 1.5
mTLP-PVA	243	48.6 \pm 3.7	17.5 \pm 1.2	8.6 \pm 1.1

정배양액으로 mTBM 또는 mTALP 사용하여 비교했을 때, $0.5\sim 1.0 \times 10^6$ sperm/ml 농도에서 정자침투율은 각각 61~77%, 92~94%, 다정자수정 발생율은 44~50%, 86~89%로 모두 mTALP에서 높았다고 보고한 것이나, Kidson 등(2001)이 위의 두 배양액을 4×10^5 sperm/ml 농도에서 비교했을 때, 정자침투율은 각각 32%와 54%, 다정자수정 발생율은 10 %와 40%로 모두 mTALP에서 높았지만, 10 배 높은 정자농도에서 정자침투율은 각각 79%와 82%로 비슷한 반면, 다정자수정 발생율은 mTBM에서 유의적으로 낮았다(26%와 76%)고 보고한 것과 일치하지 않는 것이었다. 그러나 본 실험에 사용된 mTLP-PVA는 mTALP의 BSA 일부를 PVA로 대체한 것으로 Long 등(1999)은 본 실험보다 낮은 농도(2×10^4 sperm/ml)로 체외수정시켰음에도 불구하고 정자침투율은 71.4%, 음성전핵형성율은 62.6 %, 다정자수정 발생율은 30.8%였다고 보고한 바 있다. 한편 mTBM에서의 체외수정 결과는 동결정액을 이용하여 본 실험에서보다 높은(1.5×10^5 또는 5×10^5 sperm/ml) 농도로 수정시킨 Abeydeera 등(1998) 및 Boquest 등(1999)의 보고와 일치하는 것이었다.

mTBM에서 수정시킨 난자의 체외발달의 결과는 Abeydeera 등(1998)의 보고와 비교할 때, 난분할율은 비슷한 반면 배반포 발달율은 떨어지는 것이었고 mTLP-PVA에서 수정시킨 난자의 결과는 Long 등(1999)의 보고와 비교할 때, 난분할율은 높았지만 배반포 발달율은 떨어지는 것이었다. 이것은 Long 등(1999)과 체외성숙배양 및 체외발달배

양에서의 차이, 그리고 성숙배양시 EGF 첨가에 대한 앞서의 보고(연 등, 2004) 등으로 미루어 볼 때, 체외수정배양의 영향이 아니라 체외성숙배양과 체외발달배양의 영향에 기인된 것으로 사료된다.

본 실험의 결과를 포함해서 연구자들마다 체외수정 결과가 서로 다른 것은 체외성숙과정이나 체외수정과정의 차이 외에도 난자와 직접 만나는 정자의 수정능력 차이가 원인이 될지도 모른다. Sirard 등(1993)과 Xu 등(1996a,b)은 난자에 대한 정자침투율과 다정자수정 발생율이 정자를 제공하는 수퇘지 사이에 뿐만 아니라, 같은 수퇘지에서도 사출정액간에, 그리고 같은 사출에서도 분획간에 서로 달랐다고 보고했으며, Coy 등(1999)은 수퇘지 사이의 이러한 차이를 고려하여 사전에 조사한 정자침투율과 다정자수정 발생율을 반영한 정자농도로 체외수정시켰다고 보고했다. 본 실험에서도 이러한 차이를 최소화하기 위해 두 마리의 서로 다른 품종에서 채취하여 제조한 액상정액을 혼합하여 체외수정에 사용했지만 변이는 비교적 크게 나타났다.

2. 수정시 정자농도의 영향

체외성숙란을 mTBM에서 액상정액을 이용하여 3가지 정자농도 즉, 운동정자수로 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 sperm/ml로 체외수정시킨 결과는 Table 3과 같다. 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 sperm/ml에서 정자침투율은 각각 56.7, 82.9, 92.1%로 조사되었으며 이것은 서로 유의적인 차이($P < 0.01$)를 갖는 것이었다. 또 음성전핵형성율(각각 66.1, 85.7, 91.6%), 다정자수정 발생율(각각 12.8, 34.5, 50.0%) 및 난자

Table 3. Effects of sperm concentration on *in vitro* fertilization of *in vitro* matured oocytes derived from porcine antral follicles

Sperm concentration	Total no. of oocytes examined	% (mean±SE) of oocytes ¹			Rate of polyspermy (Mean±SE)	Mean no. of spermatozoa in penetrated oocytes (Mean±SE)
		penetrated	with MPN	with PPN		
5×10^4	53	56.7±3.1 ^A	66.1±4.9 ^a	9.7±6.2 ^a	12.8±4.1 ^a	1.2±0.1 ^a
1×10^5	52	82.9±2.3 ^B	85.7±3.7 ^b	29.0±3.5 ^b	34.5±5.4 ^b	1.8±0.2 ^b
5×10^5	52	92.1±2.5 ^C	91.6±2.7 ^c	41.0±3.0 ^c	50.0±5.7 ^c	2.8±0.3 ^c

¹ MPN: Male pronucleus, PPN: Polypronucleus.

^{A,B,C} Values within columns for individual treatments with different superscripts differ ($P < 0.01$).

^{a,b,c} Values within columns for individual treatments with different superscripts differ ($P < 0.05$).

Table 4. Effects of sperm concentration on *in vitro* development of *in vitro* fertilized embryos derived from porcine antral follicles

Sperm concentration	No. of oocytes inseminated	% of oocytes cleaved (Mean±SE)	% of blastocysts at day 6 (mean±SE)	
			/ cleaved	/ inseminated
5×10^4	232	28.1±4.1 ^A	12.3±2.8 ^A	3.9±1.1 ^A
1×10^5	245	51.8±2.8 ^B	22.3±2.5 ^B	11.4±1.0 ^B
5×10^5	241	58.5±4.1 ^B	21.6±2.2 ^B	12.6±1.3 ^B

^{A,B} Values within columns for individual treatments with different superscripts differ ($P < 0.01$).

당 정자수(각각 1.2, 1.8, 2.8개)도 각각의 처리마다 유의적인 차이($P < 0.05$)를 나타냈다.

계속해서 이들 추정수정란을 NCSU-23에서 체외발달시킨 결과는 Table 4와 같다. 난분할율, 분할란대 배반포 발달율 및 추정수정란대 배반포 발달율은 5×10^4 sperm/ml에서 각각 28.1%, 12.3% 및 3.9%로 1×10^5 sperm/ml의 51.8%, 22.3% 및 11.4%나 5×10^5 sperm/ml의 58.5%, 21.6%, 12.6%보다 유의적으로 낮았으나($P < 0.01$), 1×10^5 와 5×10^5 sperm/ml 간에는 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 결과적으로 5×10^4 부터 5×10^5 sperm/ml까지의 정자농도에서 체외수정과 관련된 조사항목은 직선적으로 체외수정란 발달과 관련된 조사항목은 대수적으로 비례했다.

이러한 결과는 정자농도를 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 sperm/ml로 조정하여 체외성숙난자를 mTBM에서 체외수정시킨 결과, 정자침투율은 1×10^5 (39.9%)에서 보다 5×10^5 (83.5%)와 1×10^6 (86.9%)에서 높았고 다정자침입도 같은 경향이었으며 난자당정자수는 정자농도와 비례했으나 웅성전핵형성율은 차이가 없었다는 Abeydeera와 Day(1997)의 보고와 일치하지 않았으나, TCM-199에서 정자농도를 1×10^4 , 5×10^4 , 2.5×10^5 , 5×10^5 sperm/ml로 조정하여 수정시켰을 때, 정자침투율(21~42%, 58~71%, 91~94%, 98~99%), 다정자침입율(43~44%, 53~58%, 70~81%, 91~92%), 난자당 정자수(1.4~1.6, 2.2~2.9, 2.9~3.8, 6.3~7.4개) 등은 정자농도간에 상당한 차이가 있었으나 웅성전핵형성율(Waymouth 49~64% 또는 TCM-199 57~72%)은 차이가 없었다는 Coy 등(1999)의 보고와는 부분적으로 일치했다.

본 실험과 위의 두 보고 사이에는 여러 가지 차이가 있다. 앞에서 이미 언급한 수태지의 차이 외에도 정액종류, 수정전 정액의 처리 방법, 배양시스템 및 배양액 등이 서로 달랐다. Coy 등(1999)은 3두에서 채취한 정액을 이용하여 2두는 같은 농도(1×10^6 sperm/ml)로, 1두는 다른 농도(5×10^5 sperm/ml)로 체외수정시킨 결과, 정자침투율과 다정자수정 발생율이 같은 농도의 수태기간에 유의적인 차이를 나타낸 반면, 다른 농도의 수태기간에 유의적인 차이를 나타내지 않았고, 난자당 정자수는 3두 사이의 차이가 모두 유의적이었다고 보고했다. 또 같은 실험에서 두 가지 배양시스템으로 성숙시킨 난자를 똑같은 농도의 같은 돼지 정액으로 수정시켰을 때에도, 정자침투율, 다정자수정 발생율, 웅성전핵형성율, 난자당정자수에서 유의적인 차이를 나타냈다고 보고했다. 이 보고가 본 실험과 다른 연구자들의 결과 사이에서 나타나는 차이를 설명하는 것이라면, 체외수정에 적절한 정자농도는 특정한 농도가 아니라 비교적 넓은 범위의 농도에서 수태지에 따라 결정되는 것일지도 모른다.

그렇다 하더라도 본 실험을 포함한 많은 보고에서 높은 정자침투율을 가져온 정자농도는 높은 다정자수정발생율을 동반했다. 체외성숙란의 체외수정에서 만족할만한 정자침투율을 얻을 수 있는 농도에서조차 높은 다정자수정 발생을 막을 수 없었다. 결과적으로 체외성숙란의 다정자수정 발생은 정자농도에 의해 조절되지 않는 것 같다. 따라서 체외성숙 또는 체외수정 단계에서 체내 환경을 모사하여 정자침투에 대한 투명대반응을 유도할 수 있는 기술개발이 여전히 필요해진다.

적 요

본 연구는 mNCSU-23에서 체외성숙시킨 난자를 이용하여 돼지 체외수정시 적절한 배양액과 정자농도를 구명하고자 수행하였다. 정액은 액상정액을 이용하였고 체외수정배양액으로 mTBM과 mTLP-PVA, 정자농도는 운동정자수 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 sperm/ml로 체외수정한 다음 NCSU-23에서 체외발달을 유도한 결과는 다음과 같다.

1. 돼지 체외성숙란을 mTBM 또는 mTLP-PVA에서 운동정자수 1×10^5 sperm/ml로 체외수정시킨 다음 체외발달시킨 결과, 정자침투율, 응성전핵형성을, 다정자수정발생율, 난분할율, 배반포 발달을 등 어느 것도 두 배양액간 차이를 나타내지 않았다.
2. 체외성숙란을 mTBM에서 운동정자수 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 sperm/ml로 체외수정시킨 다음 체외발달시킨 결과, 정자침투율, 응성전핵형성을, 다정자수정발생율 등은 모두 정자농도간 유의적인 차이를 보였고($P < 0.05$), 난분할율과 배반포발달율은 5×10^4 이 1×10^5 , 5×10^5 sperm/ml보다 유의적으로 낮았으나($P < 0.01$), 1×10^5 와 5×10^5 sperm/ml 간에는 차이가 없었다.

따라서, 액상정액을 이용한 돼지 체외성숙란의 체외수정배양액으로 mTBM과 mTLP-PVA간 차이는 없으며, mTBM에서 체외수정시킬 때 정자농도는 운동정자수로 1×10^5 sperm/ml가 적절할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Abeydeera LR. 2002. *In vitro* production of embryos in swine. *Theriogenology*, 57:256-273.
- Abeydeera LR and Day BN. 1997. *In vitro* penetration of pig oocytes in a modified Tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology*, 48:537-544.
- Abeydeera LR, Funahashi H, Kim NH and Day BN. 1997. Clortetracycline fluorescence patterns and *in vitro* fertilization of frozen-thawed boar spermatozoa incubated under various bicarbonate concentrations. *Zygote*, 5: 117-125.
- Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Prather RS and Day BN. 1998. Presence of β -mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured *in vitro* and the rate of blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, 50:747-756.
- Boquest AC, Abeydeera LR, Wang WH and Day BN. 1999. Effect of adding reduced glutathione during insemination on the development of porcine embryos *in vitro*. *Theriogenology*, 51: 1311- 1319.
- Byun TH, Lee SH and Song HB. 1991. Development of a rapid staining method of the oocytes from domestic animal. *Kor. J. Anim. Sci.*, 33: 25-31.
- Coy P, Ruiz S, Romar R, Campos I and Gadea J. 1999. Maturation, fertilization and complete development of porcine oocytes matured under different systems. *Theriogenology*, 51:799-812.
- Day BN, Abeydeera LR, Johnson LA, Welch GR, Wang WH, Cantley TC and Rieke A. 1998. Birth of piglets preselected for gender following *in vitro* fertilization of *in vitro* matured pig oocytes by X and Y bearing spermatozoa stored by high speed flow cytometry. *Theriogenology*, 49:360(abstr.).
- Florman HM, Tombes RM, First NL and Babcock DF. 1989. An adhesion-associated agonist from the zona pellucida activates G protein-promoted elevations of internal Ca^{2+} and pH that mediate mammalian sperm acrosomal exocytosis. *ev. Biol.*, 135:133-146.
- Fraser LR. 1995. Ionic control of sperm function. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7:905-925.
- Harrison RA, Mairret B and Miller NG. 1993. Flow cytometric studies of bicarbonate-mediated Ca^{2+} influx in boar sperm populations. *Mol. Reprod. Dev.*, 35:197-208.
- Iritani A, Niwa K and Imai H. 1978. Sperm penet-

- ration *in vitro* of pig follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fertil.*, 54: 379-383.
- Kidson A, Colenbrander B, Verheijden JHM and Bevers MM. 2001. Polyspermia in the pig is dependent on both IVF medium and sperm dose during fertilization *in vitro*. *Proc. 6th Int. Conf. Pig Reprod.*, 75(abstr.).
- Lee MA and Storey BT. 1989. End point of first stage of zona pellucida-induced acrosome reaction in mouse spermatozoa characterized by acrosomal H⁺ and Ca²⁺ permeability: Population and single cell kinetics. *Gamete Res.*, 24: 303-326.
- Long CR, Dobrinsky JR and Johnson LA. 1999. *In vitro* production of pig embryos: Comparisons of culture media and boars. *Theriogenology*, 51:1375-1390.
- Marchal R, Feugang JM, Perreau C, Venturi E, Terqui M and Mermillod P. 2001. Meiotic and developmental competence of prepubertal and adult swine oocytes. *Theriogenology*, 56:17-29.
- Martinez-Madrid B, Dominguez E, Alonso C, Diaz C, Garcia P and Sanchez R. 2001. Effect of IVF medium and sperm concentration on fertilization parameters. *Proc. 6th. Int. Conf. Pig Reprod.*, 74(abstr.).
- Mattioli M, Bacci ML, Galeati G and Seren E. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 46:1201-1207.
- Motlik J and Fulka J. 1974. Fertilization of pig follicular oocytes cultivated *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 36:235-237.
- 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 and Graham JK. 1999. *In vitro* capacitation of bovine spermatozoa: role of intracellular calcium. *Theriogenology*, 51:461-472.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Uguz C and First NL. 1994. Differences in the role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. *Biol. Reprod.*, 51:1099-1108.
- Petters RM and Wells KD. 1993. Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 48: 61-73.
- Rath D. 1992. Experiments to improve *in vitro* fertilization techniques for *in vivo*-matured porcine oocytes. *Theriogenology*, 37:885-896.
- Sirard MA, Dubuc A, Bolamba D, Zheng Y and Coenen K. 1993. Follicle- oocyte-sperm interactions *in vivo* and *in vitro* in pigs. *J. Reprod. Fertil.*, 48(suppl):3-16.
- Tulsiani DRP, Abou-Haila A, Loeser CR and Pereira BMJ. 1998. The Biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Exp. Cell Res.*, 240:151-164.
- Uguz C, Vredenburg WL and Parrish JJ. 1994. Heparin-induced capacitation but not intracellular alkalinization of bovine sperm is inhibited by Rp-adenosine-3',5'-cyclic monophosphothioate. *Biol. Reprod.*, 51:1031-1039.
- Visconti PE and Kopf GS. 1988. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol. Reprod.*, 59:1-6.
- Walensky LD and Snyder SH. 1995. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J. Cell Biol.*, 130:857-869.
- Xu X, Ding J, Seth PC, Harbison DS and Foxcroft GR. 1996a. *In vitro* fertilization of *in vitro* matured pig oocytes: Effects of boar and ejaculate fraction. *Theriogenology*, 45:745-755.
- Xu X, Seth PC, Harbison DS, Cheung AP and Foxcroft GR. 1996b. Semen dilution for assessment of boar ejaculate quality in pig IVM and IVF systems. *Theriogenology*, 46:1325-1337.
- Yoshida M, Mizoguchi Y, Ishigaki K, Kojima T and Nagai T. 1993. Birth of piglets derived

from *in vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro*. Theriogenology, 39:1303-1311.
연성흠, 손동수, 한만희, 위미순, 최선호, 이규승.
2004. 돼지 난포란 유래 체외수정란 생산에 대한
제요인의 영향. II. 체외성숙배양시 EGF와

COC의 수가 체외성숙, 체외수정 및 체외발달
에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지, 19:
173-183.

(접수일: 2004. 8. 20 / 채택일: 2004. 10. 23)