

β-Lactoglobulin과 BSA의 첨가가 돼지 체외수정란의 발달에 미치는 효과

박용수¹, 김명신², 박흠대^{2,*}

¹경상북도축산기술연구소, ²대구대학교 식품생명공학부

Effects of the Addition of β-lactoglobulin and BSA on the Development of Porcine Embryos

Yong-Soo Park¹, Myoung-Sin Kim² and Hum-Dae Park^{2,*}

¹Gyoengbuk Livestock Research Institute, Yeongju 750-871, Korea

²Division of Life Food and Biotech., Daegu University, Gyeongsan 712-714, Korea

ABSTRACT

This study was performed to elucidate the effects of addition of β-lactoglobulin and bovine serum albumin (BSA) *in vitro* maturation (IVM) and *in vitro* culture (IVC) medium on porcine embryo production. The development rate to the 2 cell (71.4~75.6%) and blastocyst stages (6.8~13.3%) with different BSA concentrations in IVM medium were similar among treatment groups. Blastocyst hatching rate was significantly higher in the control group (0.0 mg/ml) than in the group of 1.0 mg/ml supplement (20.0% vs. 0.0%; $p < 0.05$). The development rate to the 2 cell (62.0~70.6%) and blastocyst stages (15.4~38.5%) with different β-lactoglobulin concentrations in IVM medium was similar among treatment groups. The development rate to the blastocyst was significantly higher in the group of 1.0 mg/ml (15.3%) than in the group of 0.5 mg/ml supplement (7.6%, $p < 0.05$). The development rate to the 2 cell and blastocyst stages following the first addition of β-lactoglobulin in IVM medium was significantly higher in the control group (77.0% and 18.9%) and was 0~44 hr (77.2% and 16.9%) greater than that observed in other treatment groups ($p < 0.05$).

The development rate to the 2 cell stage (68.1~74.8%) and blastocyst stages (9.2~12.7%) with different BSA concentrations in IVC medium was similar among treatment groups. However, blastocyst hatching rate was significantly higher in the group of 3.0mg/ml supplement (30.0%) than in the control group (0.0%; $p < 0.05$). The development rate to the 2 cell stage (72.9~78.0%), blastocyst (7.1~14.2%) and hatching stages (33.3~38.1%) were not different. The development rate to the 2 cell stage (63.6~72.5%), blastocyst (8.4~16.1%) and hatching stages (18.2~37.5%) at the different culture periods were similar among treatment groups. This study suggested that if the addition level and periods of β-lactoglobulin addition are adjusted, it is possible to replace BSA in the *in vitro* porcine embryo production.

(Key words : porcine, BSA, β-lactoglobulin, *in vitro* culture)

서 론

돼지 미성숙 난포란의 체외성숙에 대한 연구는 Edwards (1965)가 43~46시간 동안 체외배양을 통하여 제2성숙 분열 중기(metaphase II; M-II)에 도달했다고 처음으로 보고한 이래, Motlik과 Fulka(1974)는 체외성숙란의 체내수정 능력을 확인했고, Iritani 등(1978)은 체외성숙란의 체외수정을 성공시켰으며, Mattioli 등(1989)은 체외성숙란 유래 수정란을 수란돈에 이식하여 처음으로 산자를 생산함으로써 체외성숙, 체외수정란의 발달 능력을 확인하였다. 한편, Day 등(1998), Yoshida 등(1993) 그리고 Marchal 등(2001)이 각각 체외성숙, 체외

수정 유래의 2~4세포기, 8세포기~상실기, 배반포기의 돼지 수정란을 이식하여 산자를 생산하는데 성공함으로써 체외성숙, 체외수정, 체외 발달 유래의 수정란도 출생까지의 발달 능력을 갖고 있다는 것이 확인되었다. 그러나 돼지의 경우는 다른 종에 비해 핵 성숙과 더불어 세포질 성숙이 수반되지 못하여 불안정한 체외성숙(Motlik 등, 1984) 및 체외수정 시 다정자 침입(Abeydeera와 Day, 1997) 등이 발생하고, 체외배양 시에는 4 세포기에서 발달 지연 및 정지(Camous 등, 1984; Heyman 등, 1987) 현상이 발생하여 양질의 수정란 확보에 어려움이 있다. 특히 인간에게 유용한 단백질을 생산하기 위한 형질 전환 돼지 생산 연구의 효율성 향상을 위해서는 안정적인 체

* Correspondence : E-mail : pys0112@chol.com

외수정란의 생산 체계가 확보되어야 할 것이다.

돼지 난포란의 체외생산에 있어서 발생하는 여러 가지 문제점들을 해결하기 위하여 많은 연구자들이 다양한 연구를 시도해 왔다. 특히, 돼지 난자의 체외성숙에서 상피세포 성장인자(epidermal growth factor, EGF)가 핵성숙을 자극한다는 Sommer 등(1992)의 보고는 Reed 등(1993)과 Singh 등(1993)에 의해서도 확인되었다. 그리고 각종 호르몬(Fukui 등 1992; Leibfried-Rutledge 등, 1986), 단백질원으로 혈청 및 BSA(Natio 등, 1988), 각종 성장인자의 첨가(Ding와 Foxcroft, 1994; Illera 등, 1998) 등이 체외성숙 및 음성 전핵 형성율을 증가시킨다는 연구가 보고되었다.

체외배양 단계에 대한 연구로는 체외배양 시 발생하는 활성산소는 단백질의 합성 저해 및 세포막의 파괴 등을 유발(Legge와 Sellens, 1991)하며, 고농도의 sodium lactate와 glucose는 수정란의 배 발생에 유해하기 때문에 낮은 농도의 sodium lactate와 glucose가 함유된 NCSU23 용액이 적당하다는 연구(Abeydeera 등, 2001) 등을 통해 어느 정도 이 기술들이 체계적으로 이루어지고 있다. 그리고 아미노산의 첨가는 세포내 물질 유입 조절 기능(Anbari와 Schultz, 1993; Biggers 등, 1997)과 세포내의 buffer 역할(Edwards 등, 1998), 또한 cysteine 및 glutamine의 첨가는 포유동물의 난포란 성숙 과정에 있어 핵 성숙과 더불어 세포질 성숙에 중요하다고 보고되었다(Ka 등, 1997). 포유동물 난자의 체외생산에 있어서 배지에 첨가하는 단백질 원으로서 BSA의 중요성은 연구자에 따라 효과적(Kricher 등, 1999; Rho와 Hwang, 2002) 또는 비효과적(Abeydeera 등, 2000; Gardner, 1994)이라고 보고하고 있기 때문에 현재는 거의 경험적으로 첨가하고 있는 실정이다.

본 연구는 돼지 난포란의 체외성숙 및 배양 조건 확립을 위해 일반적으로 사용되고 있는 에너지원인 BSA의 첨가 농도를 검토하였으며, BSA 대체 물질로서 유청단백질의 일종인 β -lactoglobulin의 첨가 농도 및 시기가 돼지 배의 발달에 미치는 영향을 검토하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 배지

난소로부터 미성숙 난포란의 회수 및 세척용 배지는 10 mM HEPES(Sigma, U.S.A.)와 3 mg/ml BSA(Sigma, U.S.A.)가 첨가된 HEPES buffered Tyrode's medium 용액이다. 체외성숙용 배지는 0.57 mM cysteine(Sigma, U.S.A.), 10% porcine follicular fluid(pFF), 2.5 mM β -mercaptoethanol(Sigma, U.S.A.), 10 ng/ml estradiol-17 β (Sigma, U.S.A.), 10 ng/ml epidermal growth factor(Sigma, U.S.A.), 10 IU/ml human chorionic gonadotropin(hCG; Sigma, U.S.A.), 10 IU/ml pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG; Sigma, U.S.A.)을 첨가 또는 미첨

가한 BSA-free North Carolina State University(NCSU) 23 용액이다(Petters와 Wells, 1993). 체외수정용 배지는 1 mg/ml BSA, 2.5 mM caffeine sodium benzoate(Sigma, U.S.A.)가 첨가된 modified Tris-buffered medium(mTBM) 용액, 신선 정자 처리용 배지는 1 mg/ml BSA, 75 mg/ml penicillin G, 25 mg/ml gentamycin이 첨가된 Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS, Gibco, U.S.A.)용액, 체외배양용 배지는 3 mg/ml BSA가 첨가된 porcine zygotes medium(PZM 3) 용액을 각각 사용하였다(Yoshika 등, 2002). 그리고 실험에 제공되는 모든 배지의 미세 소적은 mineral oil(Sigma, U.S.A.)을 피복하여 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 최소한 4시간 이상 평형시킨 후 사용하였다.

2. Porcine Follicular Fluid(pFF)의 제조

pFF는 직경 5 mm 이상의 난포로부터 회수하여 10분 동안 정치시켜 하강을 유도한 후, 4 $^{\circ}$ C에서 8,000 rpm, 30분간 원심분리한 상층액만을 0.45 μ m millipore filter(Millipore, France)로 여과, 사용 전까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

3. 난포란의 회수

도축된 암퇘지로부터 난소를 적출하여 75 μ g/ml penicillin G(Sigma, U.S.A.)가 첨가된 0.9% 생리식염수(30 $^{\circ}$ C)가 들어있는 보온병에 담아 도축 후 2시간 내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 penicillin G가 첨가된 0.9% 생리식염수로 3~4회 세척하여 난소의 혈액과 이물질을 제거한 후, 18G 주사침이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 직경 3~6 mm의 가시난포로부터 난포액을 흡입함으로써 난포란을 회수하였다. 회수한 난포란을 실체 현미경(\times 80, Olympus, Japan)하에서 난구세포의 부착이 조밀하며, 세포질이 균일한 것만을 선별하여 실험에 제공하였다.

4. 체외성숙

선별된 난포란을 세척용 배지로 2~3회 세척하였다. 체외배양 배지가 500 μ l씩 분주된 4-well dish(NUNC, Roskilde, Denmark)에 50~60개의 미성숙 난포란을 넣고, 22시간 동안 배양시킨 후 PMSG와 hCG가 첨가되지 않은 체외성숙 배지에서 부가적 22시간 동안 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 배양함으로써 체외성숙을 유도하였다.

5. 체외수정

1) 정자의 준비

본 실험에 사용된 정액은 다비 A.I CENTER(충주, 한국)에서 제작된 정액을 이용하였으며, 17 $^{\circ}$ C에 보관하여 최대 5일 동안 사용하였다. 보존된 정액은 D-PBS 용액을 동일 비율로 15 ml 원심분리관(Corning, U.S.A.)에 넣고 2,000 rpm에서 3분

간 원심분리하여 상층액을 제거하는 과정을 3회 실시하였다. 원심분리 후 하층부의 정자괴에 2 ml의 D-PBS 용액을 넣어 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 15분간 swim-up하였다. 운동성을 가진 부유된 정자를 회수하여 2,000 rpm에서 3분간 원심분리를 실시한 다음, 침전된 정자는 체외수정 배지로 희석하였다. 정자 농도는 3×10⁶ spermatozoa/ml가 되도록 조절하였다.

2) 체외수정

체외성숙을 유도한 후 형태적으로 난구세포가 확장된 난포란만을 선별하여 0.1% hyaluronidase(Sigma, U.S.A.)가 첨가된 세척용 용액에서 난구세포를 제거한 후 체외수정 배지로 2~3회 세척하였다. 그리고 mineral oil로 피복된 48 μl의 체외수정 배지에 15개씩의 난포란을 넣고, 상기에서 준비된 정자 2 μl(최종 정자 농도 1.2×10⁵ sperms/ml)를 첨가하여 39°C, 5% CO₂ 배양기에 6시간 배양함으로써 체외수정을 유도하였다.

6. 체외배양

체외수정된 수정란(배양 0일)을 체외배양 배지에서 pipetting하여 정자를 포함한 불순물을 제거한 후 다시 체외배양 배지로 2~3회 세척하였다. 세척된 수정란은 미리 준비한 50 μl의 체외배양용 배지에 40~50개씩 넣어 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 체외배양 2일째에 수정율을 관찰하였고, 배양 6일 및 7일째 배반포 발달율을 조사하였다.

7. 실험 설계

1) 체외성숙

(1) BSA 첨가 농도

체외성숙용 배지에 BSA를 각각 0, 0.5, 1.0, 2.0 및 3.0 mg/ml 첨가하였다.

(2) β -Lactoglobulin 첨가 농도

체외성숙용 배지에 β -lactoglobulin을 각각 0, 0.5 및 1.0 mg/ml 첨가하였다.

(3) β -Lactoglobulin 첨가 시기

체외성숙용 배지에 1.0 mg/ml의 β -lactoglobulin을 0~22, 22~44, 0~44시간째에 각각 첨가하였다.

2) 체외배양

(1) BSA 첨가 농도

체외배양용 배지에 BSA(Sigma, U.S.A.)를 각각 0, 0.5, 1.0, 2.0 및 3.0 mg/ml 첨가하였다.

(2) β -Lactoglobulin 첨가 농도

체외배양용 배지에 β -lactoglobulin(Sigma, U.S.A.)을 각각 0, 0.5 및 1.0 mg/ml 첨가하였다.

(3) β -Lactoglobulin 첨가 시기

체외배양용 배지에 1.0 mg/ml의 β -lactoglobulin을 day-1, day-2, day-3, day-4, day-5일에 각각 첨가하였다.

8. 통계 처리

실험결과에 대한 통계학적 분석은 χ^2 -test를 이용하였다.

결과 및 고찰

1. 체외성숙

1) BSA 첨가 농도

돼지 난포란의 체외성숙용 배지에 첨가하는 BSA의 농도가 배 발달에 미치는 효과를 검토한 결과는 Table 1과 같다. 체외수정율(\geq 2세포기)은 각각의 처리군에서 71.4~75.6%, 배반포로의 발달율은 6.8~13.3%로서 유사한 경향이였다. 그러나 부화 배반포로의 발달율은 대조군이 20.0%로서 1.0 mg/ml 처리군의 0.0%보다 유의하게 높았다($p<0.05$).

돼지 미성숙 난포란의 핵과 세포질 성숙 여부가 수정 후 체외수정란의 발달에 결정적인 역할을 한다(Fukui 등, 1992). 돼지 미성숙 난포란의 성숙을 위해 일반적으로 사용하고 있는 modified TCM199 용액(Mattioli 등, 1989)은 효율이 낮은 것으로 밝혀져 현재는 NCSU23 용액(Abeydeera 등, 2001)을 많이 이용하게 되었으며, 각종 호르몬(Fukui 등 1992; Leibfried-Rutledge 등, 1986), 단백질원으로 혈청 및 BSA(Natio 등, 1988), 각종 성장인자의 첨가(Ding와 Foxcroft, 1994; Illera, 1998) 등

Table 1. Effect of the concentration of BSA in *in vitro* maturation medium on the development of porcine oocytes

Concentration of BSA (mg/ml)	No. of examined oocytes	No. (%) of embryo developed to		
		\geq 2-cell	Blastocyst	Hatched/blastocyst
Control ¹⁾	150	110(73.3)	20(13.3)	4(20.0) ^b
0.5	126	90(71.4)	16(12.7)	1(6.3) ^{ab}
1.0	160	121(75.6)	19(11.9)	0(0) ^a
2.0	117	87(74.4)	10(6.8)	1(10.0) ^{ab}
3.0	128	93(72.7)	13(10.2)	1(7.7) ^{ab}

¹ Control: Without BSA in *in vitro* maturation medium.

^{ab} Values with different superscripts differ significantly($p<0.05$).

이 체외성숙 및 응성 전핵 형성을 증가시킨다는 연구가 보고되었다. 본 연구에서 체외성숙 배지에 BSA의 첨가는 배반포 발달에 효과가 없었다. 그런데 본 연구에서 사용하는 기초배지에는 pFF가 함유되어 있다. 이 pFF에는 여러 종류의 에너지원, 단백질 그리고 호르몬이 첨가되어 있기 때문에 일반적으로 연구자(Funahashi와 Day, 1993)들은 체외성숙 배지에는 단백질원으로서 BSA를 첨가하지 않는다. 본 연구에서도 이것을 확인하였으며, BSA는 아마도 pFF속에 함유되어 있는 어떤 미지의 성분과 같이 작용함으로써 오히려 체외성숙 인자로는 부적합하다고 사료된다.

2) β -Lactoglobulin 첨가 농도

돼지 난포란의 체외성숙 배지에 첨가하는 β -lactoglobulin의 농도가 배 발달에 미치는 효과를 검토한 결과는 Table 2와 같다. 체외수정율(2세포기)은 각각의 처리군에서 62.9~70.6%로 비슷한 경향이였다. 그러나 배반포로의 발달율은 1.0 mg/ml 처리군이 15.3%로서 0.5 mg/ml의 7.6%에 비하여 유의하게 높았다($p < 0.05$). 한편, 부화 배반포로의 발달율은 1.0 mg/ml 처리군이 38.5%로서 높았으나 다른 처리군 간의 유의차는 인정되지 않았다.

3) β -Lactoglobulin 첨가 시기

돼지 난포란의 체외배양용 배지에 β -lactoglobulin의 첨가 시기가 배반포 또는 부화 배반포로의 배 발달에 미치는 효과를 검토한 결과는 Table 3과 같다. 체외수정율(≥ 2 세포기)은 대조군과 0~44 hr 처리군이 0~22 hr 처리군보다 유의하게 높았다($p < 0.05$). 또한, 배반포로의 배 발달율은 대조군 및 0~44 hr 처리군이 0~22 hr 및 22~44 hr 처리군보다 유의하게 높았다($p < 0.05$). 한편, 부화 배반포로의 배 발달율은 21.7~28.6%로 유사한 경향이였다.

돼지 미성숙 난포란은 체외에서 43~46시간 동안 성숙 배양함으로써 제2감수분열 중기에 도달한다(Edwards 등, 1965).

Table 2. Effect of the concentration of β -lactoglobulin in IVM medium on the development of porcine oocytes

Concentration of β -LG ¹⁾ (mg/ml)	No. of examined oocytes	No. (%) of embryo developed to		
		≥ 2 -cell	Blasto-cyst	Hatched/blastocyst
Control ²⁾	170	115(67.6)	21(12.4) ^{ab}	7(33.3)
0.5	170	107(62.9)	13(7.6) ^a	2(15.4)
1.0	170	120(70.6)	26(15.3) ^b	10(38.5)

¹⁾ β -LG: β -lactoglobulin.

²⁾ Control: Without β -lactoglobulin in IVM medium.

^{ab} Columns with different superscripts significantly differ($p < 0.05$).

Table 3. Effect of the duration of β -lactoglobulin in IVM medium on the development of porcine oocytes

Duration of β -LG ¹⁾ (mg/ml)	No. of examined oocytes	No. (%) of embryo developed to		
		≥ 2 -cell	Blasto-cyst	Hatched/blastocyst
Control ²⁾	122	94(77.0) ^b	23(18.9) ^b	5(21.7)
0~22 hr	90	58(64.4) ^a	8(8.9) ^a	2(25.0)
22~44 hr	100	68(68.0) ^{ab}	7(7.0) ^a	2(28.6)
0~44 hr	136	105(77.2) ^b	23(16.9) ^b	6(26.1)

¹⁾ β -LG: β -lactoglobulin.

²⁾ Control: Without β -lactoglobulin for 44 hour maturation.

^{ab} Columns with different superscripts significantly differ($p < 0.05$).

한편 PMSG, hCG 및 estradiol-17 β 를 첨가한 성숙 배지에서 20시간 배양한 후 호르몬 무첨가 배지에서 20시간 추가 배양은 체외성숙 전 기간 동안 첨가한 것보다 정자 침투율 및 응성전핵 형성이 높았다(Funahashi와 Day, 1993). 본 실험의 결과, 체외성숙 시 β -lactoglobulin은 배양 초기부터 첨가하는 것이 효과적이었다. 따라서 돼지 난포란의 체외성숙 배지에 β -lactoglobulin의 첨가효과는 1.0 mg/ml 농도로 지속적으로 첨가하여야 하며, 그 작용기작에 대해서는 더욱 검토되어야 할 것으로 사료된다.

2. 체외배양

1) BSA 첨가 농도

돼지 난포란의 체외배양용 배지에 BSA의 첨가 농도가 배 발달에 미치는 효과를 검토한 결과는 Table 4와 같다. 체외수정율(≥ 2 세포기)은 68.1~74.8%, 배반포 도달율은 9.2~12.7%로서 각 처리군에서 유사한 경향이였다. 그러나 부화율은 3.0 mg/ml 처리군이 30.0%로서 대조군의 0.0%에 비하여 유의하게 높았다($p < 0.05$).

포유동물의 체외배양에 있어서 BSA는 가장 기본적으로 첨가하는 에너지원으로서 배지내에 독성 물질로부터 방어 효과가 있다(Kane, 1987). 또한, 돼지 배의 배반포 형성율(Rho와 Hwang, 2002), 소 배의 배반포 형성 및 배반포의 세포수(Kricher 등, 1999)에 효과가 있다. 그러나 화학적인 조성은 Lot 번호에 따라 종류는 매우 다양하다. 이와 같은 다양성에서 유래되는지는 확실히 밝혀져 있지 않지만, 오히려 체외에서 유래된 배의 발달에 비효과적이라는 보고도 많다(Abeydeera 등, 2000; Gardner, 1994). 본 연구의 Table 4에서와 같이 체외배양 시 배지로서 BSA 첨가는 부화 배반포로의 배 발달을 향상에 효과적이었다. 따라서 돼지 난포란의 체외배양에는 BSA가 필요하다고 사료된다.

Table 4. Effect of the concentration of BSA in *in vitro* culture medium on development of porcine embryos

Concentration of BSA (mg/ml)	No. of examined oocytes	No. (%) of embryo developed to		
		\geq 2-cell	Blastocyst	Hatched/blastocyst
Control ¹⁾	120	86(71.1)	11(9.2)	0(0) ^a
0.5	135	101(74.8)	17(12.6)	3(17.6) ^{ab}
1.0	143	100(69.9)	18(12.6)	2(11.1) ^{ab}
2.0	160	109(68.1)	20(12.5)	4(20.0) ^{ab}
3.0	158	113(71.5)	20(12.7)	6(30.0) ^b

¹ Control: Without BSA in *in vitro* culture medium.

^{ab} Columns with different superscripts significantly differ($p < 0.05$).

2) β -Lactoglobulin 첨가 농도

돼지 난포란의 체외배양용 배지에 β -lactoglobulin의 첨가 농도가 배 발달에 미치는 효과를 검토한 결과는 Table 5와 같다. 체외수정율은 72.9~78.0%, 배반포 도달율은 7.1~14.2% 및 부화율은 33.3~38.1%로서 각각의 처리군에서 차이가 없었다.

배양액 조성 물질의 하나하나에 대한 확실한 결과에 대한 재현성을 고려하여 최근 BSA 대체 물질로서 PVP(Cholewa와 Whitten, 1970), PVA(Bigger 등, 1997; Lee와 Fukui, 1996)를 이용하기도 한다. 따라서 이와 같은 것을 고려하여 본 연구는 BSA 대체 물질로서 유청단백질 중의 하나인 β -lactoglobulin을 이용하였다. 그 결과 BSA와 유사한 배발달율(Table 4)을 기록하여 BSA 대체 물질로서 충분한 사용 가능성이 있다고 사료되며, 나아가서 유청단백질의 다른 물질들도 배의 발생에 더욱 검토가 필요하다고 생각된다.

3) β -Lactoglobulin 첨가 시기

돼지 난포란의 체외배양용 배지에 β -lactoglobulin의 첨가

Table 5. Effect of the concentration of β -lactoglobulin in *in vitro* culture medium on development of porcine embryos

Concentration of β -LG ¹⁾ (mg/ml)	No. of examined oocytes	No. (%) of embryo developed to		
		\geq 2-cell	Blastocyst	Hatched/blastocyst
Control ²⁾	150	117(78.0)	21(14.0)	7(33.3)
0.5	155	113(72.9)	11(7.1)	4(36.4)
1.0	148	109(73.6)	21(14.2)	8(38.1)

¹ β -LG: β -lactoglobulin.

² Control: Without β -lactoglobulin in *in vitro* culture medium.

Table 6. Effect of the duration of β -lactoglobulin in *in vitro* culture medium on development of porcine embryos

Day of β -LG ¹⁾ (mg/ml)	No. of examined oocytes	No. (%) of embryo developed to		
		\geq 2-cell	Blastocyst	Hatched/blastocyst
Control ²⁾	120	80(66.7)	16(13.3)	6(37.5)
Day-1	186	124(66.7)	30(16.1)	10(33.3)
Day-2	120	87(72.5)	11(9.2)	3(27.3)
Day-3	180	126(70.0)	26(14.4)	8(30.8)
Day-4	131	91(69.5)	11(8.4)	2(18.2)
Day-5	176	112(63.6)	17(9.7)	7(35.3)

¹ β -LG: β -lactoglobulin.

² Control: Without β -lactoglobulin in *in vitro* culture medium.

시기가 배 발달에 미치는 효과를 검토한 결과는 Table 6과 같다. 체외수정율은 63.6~72.5%, 배반포 도달율은 8.4~16.1%, 및 부화율은 18.2~37.5%로서 각각의 처리군에서 유사한 경향이였다.

본 실험의 결과로부터, 체외배양 시 β -lactoglobulin의 첨가 시기는 배양하는 배의 발생 단계와 무관하였다. 따라서 Table 5와 같이 고찰한다면 돼지 난포란으로부터 배반포의 체외생산에 있어서 β -lactoglobulin의 첨가량과 첨가 시기를 조절한다면 배지에 첨가하는 단백질원으로서 BSA의 대체 물질로서 그 가능성은 있다고 사료된다.

결론

본 연구는 돼지 수정란의 체외생산 효율의 향상을 목적으로 체외배양용 배지에 BSA 및 β -lactoglobulin 첨가가 배 발달에 미치는 효과를 검토하였다. 체외성숙용 배지에 BSA의 첨가 농도에 따른 체외수정율(71.4~75.6%) 및 배반포로의 배 발달율(6.8~13.3%)은 비슷한 경향이였다. 그러나 부화 배반포로의 배 발달율은 대조군(20.0%)이 1.0 mg/ml 첨가군(0%)보다 유의하게 높았다($p < 0.05$). 체외성숙용 배지에 β -lactoglobulin의 첨가 농도에 따른 체외수정율(62.0~70.6%) 및 부화 배반포로의 배 발달율(15.4~38.5%)은 비슷한 경향이였다. 그러나 배반포로의 배 발달율은 1.0 mg/ml 첨가군(15.3%)이 0.5 mg/ml 첨가군(7.6%)보다 유의하게 높았다($p < 0.05$). 체외성숙용 배지에 β -lactoglobulin의 첨가 시기에 따른 체외수정율 및 배반포로의 배 발달율은 대조군(77.0 및 18.9%)과 0~44 hr 첨가군(77.2 및 16.9%)이 다른 군에 비하여 유의하게 높았다($p < 0.05$). 한편 부화 배반포로의 배 발달율은 21.7~28.6%로서 비슷한 경향이였다.

체외배양용 배지에 BSA의 첨가 농도에 따른 체외수정율(68.1~74.8%) 및 배반포로의 배 발달율(9.2~12.7%)은 비슷한 경향이였다. 그러나 부화 배반포로의 배 발달율은 3.0 mg/ml 첨가군(30.0%)이 무첨가군(0%)보다 유의하게 높았다($p < 0.05$). 체외수정율은 72.9~78.0%, 배반포 도달율은 7.1~14.2% 및 부화율은 33.3~38.1%로서 각각의 처리군에서 차이가 없었다. 체외수정율은 63.6~72.5%, 배반포 도달율은 8.4~16.1%, 및 부화율은 18.2~37.5%로서 각각의 처리군에서 유사한 경향이였다.

이상의 결과로부터 체외생산에 있어서 배지에 첨가하는 단백질원으로서 BSA 대신에 β -lactoglobulin도 이용할 수 있으며, 그 이용 방법은 다각적인 차원에서 추가적인 검토의 필요성이 있다고 사료된다.

참고문헌

- Abeydeera LR and Day BN. 1997. Fertilization and subsequent development *in vitro* of pig oocytes inseminated in a modified Tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Biol. Reprod.* 57:729-734.
- Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Murphy CN and Day BN. 2000. Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor. *Theriogenology* 54:787-797.
- Abeydeera LR, Wang WH, Prather RS and Day BN. 2001. Effect of incubation temperature on *in vitro* maturation of porcine oocytes: Nuclear maturation, fertilization and developmental competence. *Zygote* 9:331-337.
- Anbari K and Schultz RM. 1993. Effect of sodium and betaine in culture media on development and relative rates of protein synthesis in reimplantation mouse embryo *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 35:24-28.
- Biggers JD, Summers MC and McGinnis LK. 1997. Polyvinyl alcohol and amino acids as substitutes for bovine serum albumin in culture media for mouse preimplantation embryos. *Hum. Reprod. Update.* 3:125-135.
- Camous S, Heyman Y, Menezo W and Menezo Y. 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J. Reprod. Fertil.* 72:479-485.
- Cholewa JA and Whitten WK. 1970. Development of two-cell mouse embryos in the absence of a fixed-nitrogen source. *J. Reprod. Fert.* 22:553-555.
- Day BN, Abeydeera LR, Johnson LA, Welch GR, Wang WH, Boquest AC, 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 chromosome bearing spermatozoa stored by high speed flow cytometry. *Theriogenology* 50:981-988.
- Ding J and Foxcroft GR. 1994. Epidermal growth factor enhances oocyte maturation in pigs. *Mol. Reprod. Dev.* 39:30-40.
- Edwards LJ, Williams DA and Gardner DK. 1998. Intracellular pH of the mouse preimplantation embryo: amino acids act as buffer of intracellular pH. *Hum. Reprod.* 13:3441-3448.
- Edwards RG. 1965. Maturation of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 208:349-352.
- Fukui Y, Terawaki Y and Ono H. 1992. Effect of gonadotropins and steroids and culture on bovine oocytes maturation. *Theriogenology* 18:161-175.
- Funahashi H and Day BN. 1993. Effects of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 98:179-185.
- Gardner DK. 1994. Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell. Int.* 18:1163-1179.
- Heyman Y, Menezo Y, Chesne P, Camous S and Gardner V. 1987. *In vitro* cleavage of bovine and ovine early embryos: Improved development using co-culture with trophoblastic vesicles. *Theriogenology* 27:59-68.
- Illera MJ, Loren PL, Illera JC and Petters RM. 1998. Developmental competence of immature pig oocytes under the influence of IVM-IVF processes. *Journal of Developmental Biology* 42:1169-1172.
- Iritani A, Niwa K and Imai H. 1978. Sperm penetration *in vitro* of pig follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fertil.* 54:384-394.
- Ka HH, Sawai K, Wang WH, Im KS and Niwa K. 1997. Amino acids in maturation medium and presence of cumulus cells at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matured and penetrated *in vitro*. *Biol. Reprod.* 57:1478-1483.
- Kane MJ. 1987. Minimal nutrient requirements for culture of one-cell rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 37:775-778.
- Kricher RL, Lane M and Bavister BD. 1999. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined culture media. *Biol. Reprod.* 60:1345-1352.
- Lee ES and Fukui Y. 1996. Synergistic effect of alanin and glycine on bovine embryos cultured in a chemically defined medium and amino acid uptake by *in vitro* produced

- bovine morulae and blastocyst. *Biol. Reprod.* 55:1383-1389.
- Legge M and Sellens MH. 1991. Free radical scavengers ameliorate the 2-cell block in mouse embryo culture. *Hum. Reprod.* 6:867-871.
- Leibfried-Rutledge ML, Crister ES and First NL. 1986. Effect of fetal calf serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus oocyte complexes. *Biol. Reprod.* 35:850-857.
- 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.
- Mattioli M, Bacci ML, Galeati G and Seren E. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 31:95-105.
- Motlik J and Fulka J. 1974. Fertilization of pig follicular oocytes cultivated *in vitro*. *J. Reprod. Fertility.* 36:235-237.
- Motlik J, Grozet N and Fulka J. 1984. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J. Reprod. Fertil.* 72:323-328.
- Naito K, Fukuda Y and Toyoda Y. 1988. Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocyte matured *in vitro*. *Gamete, Res.* 21:289-295.
- Petters RM and Wells KD. 1993. Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 48:61-73.
- Reed ML, Estrada JL, Illera MJ and Petters RM. 1993. Effects of epidermal growth factor, insulinlike growth factor-I and dialyzed porcine follicular fluid on porcine oocyte maturation *in vitro*. *J. Exp. Zool.* 266:74-78.
- Rho SH and Hwang WS. 2002. *In vitro* development of porcine parthenogenetic and cloned embryos: comparison of oocytes-activating technique, various culture systems and nuclear transfer methods. *Reprod. Fertil. Deva.* 14:93-99.
- Singh B, Barbe GJ and Armstrong DT. 1993. Factors influencing resumption of meiotic maturation and cumulus expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 36:113-119.
- Sommer P, Rath D and Niemann H. 1992. *In vitro* maturation of porcine oocytes in the presence of follicular granulosa cells, FSH and/or EGF. *Proc. 12th Int. Cong. Anim. Reprod.* 1:378-380.
- 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.
- Yoshika K, Suzuki C, Tanaka A, Anas IM and Iwamura S. 2002. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol. Reprod.* 66: 112-119.