

정자의 전처리시간, 농도 및 공동배양시간이 돼지난포란의 체외수정에 미치는 영향

朴炳權 · 林政勳 · 方南洙* · 李揆丞

충남대학교 축산학과

Effect of Preincubation Time, Concentration and Exposure Time of Sperm on *In Vitro* Fertilization of Porcine Follicular Oocytes Matured in *In Vitro*

B. K. Park, J. H. Lim, N. Z. Bang* and K. S. Lee

Department of Animal Science, Chungnam National University

SUMMARY

This study was conducted to investigate the effects of preincubation time, concentration and exposure time of sperm on *in vitro* fertilization of porcine follicular oocytes matured in *in vitro*. The results obtained are as follows :

1. Effect of preincubation time for porcine sperm capacitation on *in vitro* fertilization in medium with heparin was investigated. Normal fertilization rate was highest in 15 min(26.4%). However, there were no significant differences among preincubation times of 5~90 min.
2. Normal fertilization rates of sperm concentrations were 17.0~26.5%, and normal fertilization rate from 1×10^5 cell / ml concentration was also higher than those of other sperm concentration.
3. Normal fertilization rates of sperm exposure time of 4, 8, 12, 16 and 20 hours were 6.1, 20.8, 27.8, 25.0 and 26.7%, respectively. Normal fertilization rate from sperm exposure time of 12 hours was also higher than that of other sperm exposure times.

(Key word: *in vitro* fertilization, porcine oocyte, preincubation time, sperm concentration, sperm exposure time)

서 론

가축의 체외수정에 관한 연구는 생식세포의 수정 및 초기배발생을 지배하는 생리화학적 기전을 해명하는데 있어서 기초적인 지식을 제공할 뿐만 아니라, 수정란의 이식·수정란의 성감별·핵이식·목적유전자이식에 의한 형질전환동물의 작출 등과 같

은 발생공학적 첨단연구의 기본재료가 되는 다량의 수정란을 확보하는 수단을 확립하는데 매우 중요하다. 최근에는 도축되는 가축의 난소에서 회수한 다량의 미성숙난포란을 체외에서 성숙시킨 후 체외수정을 유도하려는 연구가 활발히 수행되고 있다 (Parrish 등, 1988, 1989 ; Niwa와 Ohgoda, 1988 ; Sirard 등, 1988 ; Fukui 등, 1990 ; Betancourt 등, 1993 ; Yoshida 등, 1993 ; Kano 등, 1994 ; Suzuki

* 中國 延邊大學 農學院

등, 1994).

정상적인 체외수정란을 얻기 위해서는 체외수정에 이용되는 정자의 조건이 매우 중요하다(Rodger, 1981). 즉, 가축난자의 체외수정은 실험동물에 비하여 매우 어려운데, 그 이유중의 하나가 정자의 성공적인 수정능획득 여부에 기인되기 때문이다(Iritani 등, 1977). 또한, 정자의 농도는 다정자침입 및 자·웅성전핵의 형성 등과 밀접한 관계가 있기 때문에 체외수정시 특히 고려되어야 할 주요인으로 강조되고 있다(Hunter, 1991 ; Shamsuddin 등, 1993). 체외수정에 이용하기 위한 정자의 수정능획득방법은 정자를 자성생식기도내에 일정기간 노출시켜 유기하는 방법(Iritani와 Niwa, 1977)과 체외에서 caffeine이나 heparin과 같은 수정능획득 유기물질이 함유되어 있는 수정배지에서 유기시키는 방법(Parrish 등, 1988 ; Yoshida 등, 1993) 등이 있는데, 최근에는 비교적 실험수행이 간편한 후자의 방법을 이용하여 축종별 수정능획득 유기물질의 종류 및 처리방법 등을 개선하므로써 체외수정률을 높이고 노력하고 있다.

이에 본 실험은 정자의 전처리시간, 농도 및 공동배양시간이 돼지 난포란의 체외수정에 미치는 영향을 구명하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시 난포란의 준비

실험에 공시한 난포란은 품종의 구분없이 도축 직후의 암태지로 부터 직출한 난소에서 채취하였다. 도살직후 직출한 난소를 100IU/ml의 penicillin G와 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate를 첨가한 30~36 $^{\circ}$ C의 멸균 생리식염수로 1~2회 세척한 다음, 동일 생리식염수에 침지하여 30분 이내에 실험실로 운반하였다. 실온(25~30 $^{\circ}$ C)에서 난소의 표면을 생리식염수로 2~3회 세척한 다음, 39 $^{\circ}$ C의 온수조에 놓고 실험에 공시하였다.

난포란의 채취는 18-gauge의 주사침이 장착된 20ml 주사기로 2~5mm 직경의 포상난포로부터 연속적으로 난포액과 함께 난포란을 흡입하여 채취하였다. 이것은 15ml 원심분리관으로 옮겨 온수조(39 $^{\circ}$ C)에서 5~10분간 정치시켜 난포란의 침전을

유도한 다음, 침전물만을 취하여 1.5cm 간격으로 방안을 표시한 87 \times 15mm 페트리접시(petri dish)에 넣고, 4mg/ml(w/v)의 BSA(bovine serum albumin, Fraction V, Sigma, USA)가 첨가된 PBS (phosphate buffered solution)로 희석하여 실제현미경(20~40 \times)하에서 난세포질이 균일한 난포란을 난구세포의 부착상태에 따라 선별하여 체외성숙에 공시하였다.

2. 난포란의 체외성숙

회수된 난포란은 Ham's F-10을 체외성숙 기본배양액으로 하여 10%(v/v) FBS, 10%(v/v) 돼지 난포액(pFF), 호르몬(1 μ g/ml FSH, 2IU/ml hCG, 1 μ g/ml estradiol-17) 및 100IU/ml의 penicillin G와 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate를 첨가하여 4-well plastic dish에 0.5ml씩 분주하고 mineral oil로 피복한 후 2~3시간 동안 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 95% 공기 및 100%습도로 조절된 CO₂배양기 내에서 평형시킨 다음, well당 30~35개의 미성숙 난포란을 적하하여 36~42시간 동안 배양하여 성숙을 유도하였다. 체외성숙 배양액은 pH 7.4, 삼투압을 290~300mOsmol로 조정하여 사용하였으며, 체외성숙배양액에 첨가하였던 난포액(pFF)은 직경 3~6mm의 포상난포에서 난포액을 흡인하여 15ml 원심분리관에 넣고, 3,000rpm에서 30분간 원심분리한 후, 0.80 μ m millipore filter로 1차 여과하였다. 그리고 제차 0.22 μ m millipore filter로 여과·멸균한 후 분주하여 -20 $^{\circ}$ C에 보존하면서 사용하였다.

3. 정자의 준비

성숙 수배지의 정소상체를 적출한 후, 정소상체 미부의 장막을 절개하여 18-gauge 주사침이 장착된 주사기로 정자부유액을 흡인하여 체외수정의 기본배양액인 BO액(Brackett과 Oliphant, 1975)에 4mg/ml의 BSA를 첨가한 5ml의 배양액에 침지하였다. 정소망액 및 정소상체액을 제거하기 위하여 1,500rpm에서 1차원심분리를 한 후 pellet만을 취하여 동일배양액에 재부유시킨 다음, CO₂배양기에서 15분 동안 swim-up시켜 운동성이 양호한 상층액 정자만을 취하여 15mg/ml의 BSA와 15 μ g/ml의 heparin이 함유되어 있는 체외수정배양액으로

1,000rpm에서 10분간 원심분리한 후, 운동성이 있는 정자수가 $1\sim 5\times 10^5$ 개/ml가 되도록 4-well plastic dish에 분주하고 mineral oil로 피복한 다음, CO₂배양기내에서 처리별로 5~90분 동안 전배양하여 수정능획득을 유지하였다.

4. 체외수정 및 수정의 판정

36시간 동안 체외성숙이 유도된 난자-난구세포복합체를 형태적으로 난구세포가 팽화된 것만을 선별하여, 수정능획득을 위한 전처리배양에 들어갔던 4-well plastic dish에 well당 20~30개의 난자-난구세포 복합체를 적하하여 20시간 동안 39°C, 5% CO₂, 95% 공기 및 100% 습도의 CO₂배양기에서 수정을 유도하였다. 한편, 성숙난포란과 정자의 공동배양시간에 따른 수정율을 알아보기 위하여 4~20시간 동안 공배양하면서, 매 4시간 간격으로 난구세포 및 투명대부착정자를 제거한 후 발달배지로 옮겨 배발생을 유도하였으며, 수정후 20시간째에 수정여부를 확인하기 위한 염색에 들어갔다. 수정 여부를 확인하기 위한 염색은, 먼저 0.1% hyaluronidase 용액에 수정란을 2~3분간 침지한 후 pipetting 및 세척하여 난구세포와 투명대부착정자를 완전히 제거한 다음 Byun 등(1991)의 방법에 따라 급속염색법으로 염색하여 수정 여부를 확인하였다.

결과 및 고찰

1. 정자의 수정능획득 전처리시간에 따른 체외수정

체외수정에 이용될 정자의 수정능획득을 위하여 heparin을 처리하였을 때 정자의 수정능획득 전처리시간에 따른 수정율을 알아보고자, 100 μ g/ml의 heparin을 첨가한 Sp-TALP 배양액에 1, 2의 원심분리 및 swim-up으로 처리한 정자를 $1\sim 5\times 10^5$ cell/ml 농도로 주입한 후, CO₂배양기에서 5, 10, 15, 30, 60 및 90분간 배양하여 정자의 수정능획득처리를 한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같이 정상수정율은 15분 처리구에서 26.4%로 가장 높게 나타났다. 그러나, 5~90분 처리시간의 전 처리구에서 유의성이 인정되는 큰 차이를 나타내지는 않았으며, 10~60분 처리시간의 경우가 정상수정율이 20.9~26.4%로서, 5분 처리구(15.4%) 및 90분 처리구(18.3%)보다 근소하게 높은 성적을 나타냈다. 한편, 정자침입률에 있어서도 전 처리구간에 유의차가 인정되지 않았다.

이와 같은 결과는 정자의 수정능획득처리시 25~100 μ g/ml 농도의 heparin으로 15~45분간 처리하였을 때 가장 좋은 수정율을 얻었다고 한 Fukui 등(1990)의 보고와 비슷한 결과였으나, Betancourt 등(1993)이 보고한 정상수정율 50~75%의 결과보다는 약간 떨어지는 성적이었다.

2. 정자농도에 따른 체외수정

체외성숙시킨 돼지난포란과 각기 농도를 달리하는 정자를 체외수정시켰을 때 정상수정율 및 다정자침입률에 어떻게 작용하는 알아보기 위하여 전처리를 끝낸 정자를 각각 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5

Table 1. Effect of pre-incubation time for porcine sperm capacitation on *in vitro* fertilization in medium with heparin¹

Pre-incubation time(min)	No. of oocytes inseminated	No.(%) of oocytes fertilized		
		Normal ²	Polyspermic	Total
5	65	10(15.4) ^a	23(35.4)	33(50.8) ^a
10	86	18(20.9) ^a	27(31.4)	45(52.3) ^a
15	110	29(26.4) ^a	25(22.7)	54(49.1) ^a
30	91	21(23.1) ^a	27(29.7)	48(52.8) ^a
60	65	15(23.1) ^a	21(32.3)	36(55.4) ^a
90	60	11(18.3) ^a	17(28.4)	28(46.7) ^a

¹ 100 μ g/ml heparin in Fert-TALP medium

² Monospermy, second polar body with sperm, female & male pronucleus

^{a, b} Means in the same column with the superscript are not different (P<0.05)

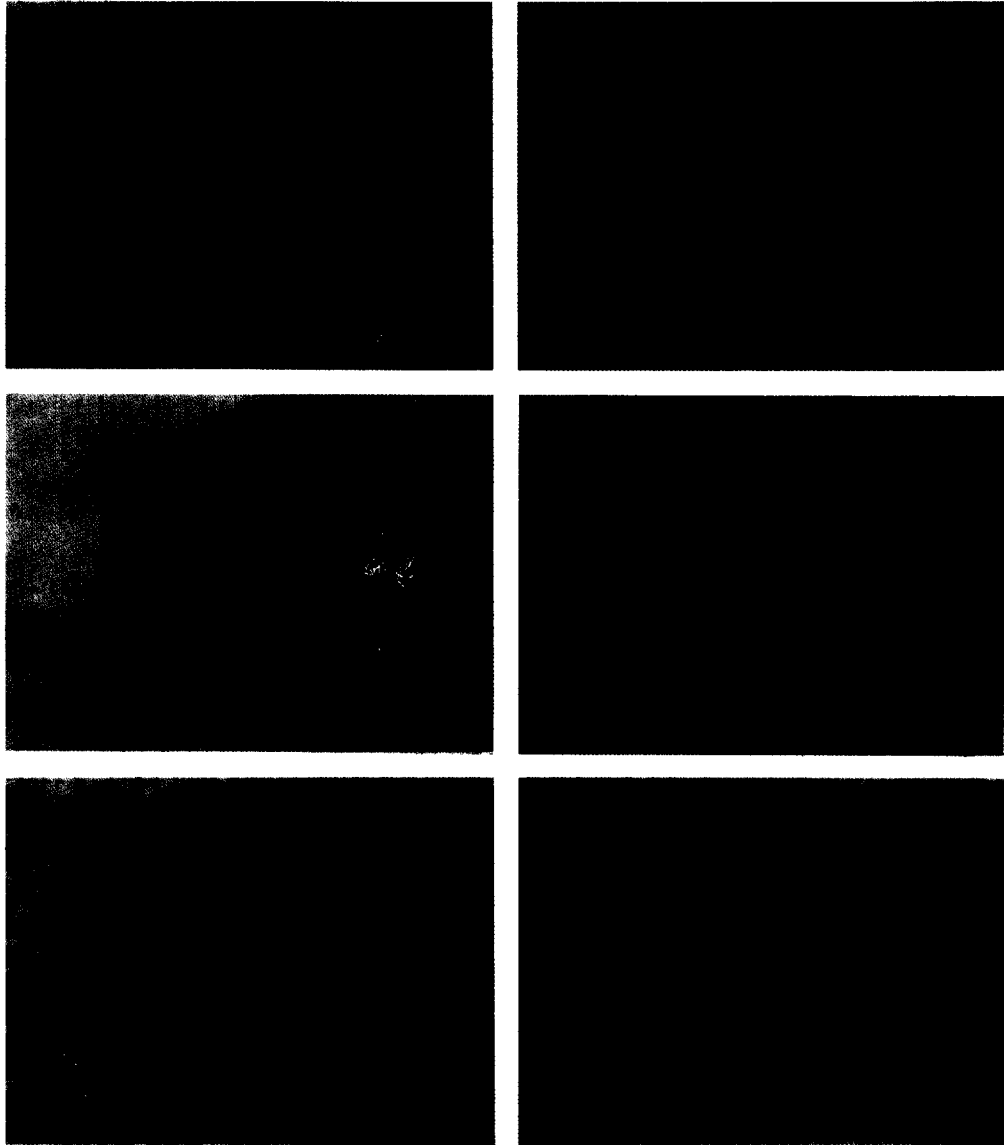


Fig. 1. Denuded oocytes stained with the Rapid Staining Method after insemination.(350~600×)

1. monospermic oocyte(pb: polar body, H: haploid) 2. polyspermic oocyte(2 sperm) 3, 4. oocyte with first and second polar body(H: haploid) 5. male(MP) and female(FP) pronuclei 6. 1 cell embryo with diploid(D)

$\times 10^5$, 1×10^6 및 5×10^6 cell/ml의 농도로 주입한 후, CO₂배양기에서 15분 동안 배양하여 수정능을 획득시킨 다음, 성숙난포란과 공배양하였는 바 그 결과는 Table 2와 같다.

정자농도가 1×10^5 cell/ml이었을 때 정상수정률

이 26.5%로 가장 높은 성적이었는데, 각 정자농도 별 정상수정률은 17.0~26.5%의 분포를 나타내서 농도처리간에 차이가 그리 크지 않았다. 그러나, 높은 정자농도는 정자침입률을 높이는 결과를 나타낸 반면에 다정자침입률도 높이는 결과를 초래하였다.

Table 2. Effect of sperm concentration on *in vitro* fertilization of *in vitro* matured oocytes for 36 hours

Sperm concentration (cell / ml)	No. of oocytes inseminated	No. (%) of oocytes fertilized		
		Normal ¹	Polyspermic	Total
1×10 ⁴	47	11(23.4)	5(10.6)	16(34.0)
5×10 ⁴	71	14(19.7)	12(16.7)	26(36.6)
1×10 ⁵	102	27(26.5)	23(22.5)	50(49.0)
5×10 ⁵	97	20(20.6)	33(34.0)	53(54.6)
1×10 ⁶	112	22(19.6)	38(33.9)	60(53.6)
5×10 ⁶	53	9(17.0)	28(52.8)	37(69.8)

¹ Monospermy, second polar body with sperm, female & male pronucleus

이와 같은 결과로 돼지체의 수정란의 체외수정시 정상적인 배발달을 위한 체외수정란을 얻기 위해서는 1~5×10⁵cell / ml의 정자농도가 적합하다고 판단된다.

이와 같은 결과는 Kano 등(1994)이 36시간 체외성숙 배양한 난포란과 1×10⁵cell / ml 농도의 정자를 수정시켰을 때 정상수정률이 36%라고 한 보고에 수정률이 다소 떨어졌으나, Nagai 등(1984)의 4×10⁸cell / ml의 정자농도에서 높은 정자침입률을 보였으나 다정자침입이 대부분이었다는 보고 및 Seizo와 Toyoda (1986)의 정자농도가 높을수록 정자침입률이 높아짐과 동시에 다정자침입률도 증가하였다고 한 보고와는 일치하는 결과였다. 또한, 최근에는 체외수정시 정자농도를 낮게 하는 경향 (Yoshida 등, 1990 ; Wang, 1992 ; Kano 등, 1994)이며, 정자농도를 낮게 하고 난자-정자공동배양 시간을 줄이는 방법으로 정상적인 수정률을 높이려는 연구를 하고 있다(Ding 등, 1992).

3. 정자와의 공동배양시간에 따른 체외수정

수정배지에서 성숙난포란과 정자를 공배양할 때 공배양을 끝낸 수정란을 발생배지로 옮기는 적정시간, 즉 적정수정시간을 알아보고자 난자-정자 공배양시간을 각각 4~20시간으로 하여 매 4시간 간격으로 난자에 부착되어 있는 난구세포와 정자를 발생배양액으로 충분히 세척하여 발생배지로 옮긴 후, 난자-정자 공배양시간과 발생배지에서 배양한 시간을 총 20시간으로 하여 염색에 공시, 수정 여부를 확인하였는 바, 그 결과는 Table 3과 같다.

난자-정자 공배양 4시간의 수정률(정상수정률+비정상수정률)은 7.6%로서 난자는 공배양 후 수시간 이내에 정자침입을 받는 것으로 나타났다. 정상수정률은 공배양 12시간에서 27.8%로 가장 높게 나타났다는데, 12시간 이후부터 20시간까지의 전체수정률은 55.0~59.1로 약간의 증가를 나타냈으나 다정자침입률도 30.0~33.3%로 같이 증가하였고 반면에 정상수정률은 25.0~26.7%로 낮아지거나 또는 증가하지 않는 결과를 나타냈다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 난자-정자 공배양시간은 12시간이 가장 적합하다고 사료된다.

Table 3. Effect of sperm exposure time on *in vitro* fertilization of *in vitro* matured oocytes for 36 hours

Sperm exposure time(h)	No. of oocytes inseminated	No. (%) of oocytes fertilized		
		Normal ¹	Polyspermic	Total
4	66	4(6.1)	1(1.5)	5(7.6)
8	48	10(20.8)	6(12.5)	16(33.3)
12	97	27(27.8)	25(25.8)	52(53.6)
16	60	15(25.0)	18(30.0)	33(55.0)
20	105	28(26.7)	34(33.3)	62(59.1)

¹ Mono spermy, second polar body with sperm, female & male pronucleus

이와 같은 결과는 Yoshida 등(1993)이 2mM caffeine 처리로 수정능 획득된 정자와 체외성숙난포란의 난구세포를 제거한 난자를 7~8시간 공배양하였을 때 정상수정률이 43%였다는 보고와, Park 등(1989)이 caffeine과 heparin이 첨가된 수정배지에서 정자의 전처리방법과 관계없이 난자-정자 공배양 8시간 이전에 이미 90%의 정자침입이 일어났다고 보고한 결과와 비교하였을 때 전체적인 수정률이 떨어지는 성적이었다.

적 요

본 실험에서는 체외성숙 돼지난포란의 체외수정에 미치는 정자요인 즉, 전처리시간, 정자농도 및 성숙난포란과 수정능이 획득된 정자와의 공동배양 시간에 따른 영향을 구명하고자 연구를 실시하였는바, 그 결과는 다음과 같다.

1. 정자의 수정능 획득을 위하여 heparin 처리하였을 때 수정능 획득 전처리시간에 따른 수정률은 15분 처리구에서 정상수정률이 26.4%로 가장 높게 나타났다. 그렇지만 5~90분 처리시간의 전처리구에서 유의성($P < 0.05$)이 인정되는 차이를 나타내지는 않았다.
2. 성숙난포란과 공배양시, 정자농도가 1×10^5 cell/ml이었을 때 정상수정률이 26.5%로 가장 높은 성적이었는데, 각 정자농도별 정상수정률은 17.0~26.5%의 분포를 나타내서 농도처리간에 차이가 그리 크지 않았다.
3. 체외성숙난포란의 체외수정시 난자-정자 공배양시간별 정상수정률은 4, 8, 12, 16 및 20시간에서 6.1, 20.8, 27.8, 25.0 및 26.7%로 각각 조사되었으며, 공배양 12시간에서 27.8%로 가장 높게 나타났다.

참고문헌

Betancourt M, Fierro R and Ambriz D. 1993. *In vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*, 40:1155-1160.

Byun TH, Lee SH and Song HB. 1991. Development of a rapid staining method for the ooc-

ytes from domestic animals. *Kor. J. Anim. Sci.*, 33:25-31.

Brackett BG and Oliphant G. 1975. Capacitation of rabbits spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 12:260-274.

Ding J and Foxcroft GR. 1994. Conditioned media produced by follicular shells of different maturity affect maturation of pig oocytes. *Biol. Reprod.*, 50:1377-1384.

Fukui Y, Sonoyama T, Mochizuki H and Ono H. 1990. Effects of heparin dosage and sperm capacitation time on *in vitro* fertilization and cleavage of bovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*, 34:579-591.

Hunter RH. 1991. Oviduct function in pig, with particular reference to the pathological condition of polyspermy. *Mol. Reprod. Dev.*, 29:385-391.

Iritani A, Niwa K and Imai H. 1978. Sperm penetration *in vitro* of pig follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fert.*, 54:394-384.

Jianchi Ding and George R, Foxcroft. 1994. Conditioned media produced by follicular shells of different maturity affect maturation of pig oocytes. *Biol. Reprod.*, 50:1377-1384.

Kano K, Miyano T and Kato S. 1994. Effect of oviductal epithelial cells on fertilization of pig oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 42:1061-1068.

Leifried-Rutledge ML, Harvey MF and First NL. 1989. The molecular biology of mammalian oocyte maturation. In the molecular biology of fertilization. Schatter. H and G. Schatten Academic Press. INC., pp.259-301.

Meyen BA, Rosenkrans CF Jr. and Davis DL. 1989. Development of pig blastocysts *in vitro* is altered by serum, bovine serum albumin and amino acids and vitamins. *Theriogenology*, 31:463-471.

- Nagai T, Niwa K and Iritani A. 1984. Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization *in vitro* of pig follicular oocytes. J. Reprod. Fert., 70:271-275.
- Niwa K and Ohgoda O. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on *in vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. Theriogenology, 30:733-741.
- Park CK, Ohgoda O and Niwa K. 1989. Penetration of bovine follicular oocytes by frozen-thawed spermatozoa in the presence of caffeine and heparin. J. Reprod. Fert., 86:577-582.
- Parrish JJ, Susko-parrish JL, Handrow RR, Sims MM and First NL. 1989. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. Biol. Reprod., 40:1020-1025.
- Parrish JJ, Parrish JS, Winer MA and First NL. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparine. Biol. Reprod., 38:1171-1180.
- Pincus G and Enzmann EU. 1935. The comparative behavior of mammalian eggs *in vitro*. Theriogenology, 35:253.
- Shamsuddin M, Larsson B, Gustafsson H and Rodriguez-Martinez H. 1993. *In vitro* development up to hatching of bovine *in vitro*-matured and fertilized oocytes with or without support from somatic cells. Theriogenology, 39:1067-1079.
- Seizo H and Toyoda Y. 1986. *In vitro* fertilization of pig eggs with ejaculated spermatozoa preincubated at high sperm concentration. Jpn. J. Anim. Reprod., 32:177-183.
- Shamsuddin M, Larsson B, Gustafsson H and Rodriguez-Martinez H. 1993. *In vitro* development up to hatching of bovine *in vitro*-matured and fertilized oocytes with or without support from somatic cells. Theriogenology, 39:1067-1079.
- Sirard MA, Parrish JJ, Ware CB, Leibfried-Rutledge ML and First NL. 1988. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. Biol. Reprod., 39:546-552.
- Suzuki K, Mori T and Shimizu H. 1994. *In vitro* fertilization of porcine oocytes in chemically defined medium. Therio., 42:1357-1368.
- Thibodeaux JK, Del Vecchio RP and Hansel W. 1993. Role of platelet-derived growth factor *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos. J. Reprod. Fert. 998:61-66.
- Wang ZK, Wei PH, Wang JZ, Lei C and Kou MQ. 1992. Maturation and fertilization of porcine oocytes *in vitro*. Theriogenology, 37:733-739.
- Wright RW Jr. and Bondioli KR. 1981. Aspects of *in vitro* fertilization and embryo culture in domestic animals. J. Anim. Sci., 53:702-729.
- Yoshida Mitsutoshi. 1987. *In vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vivo*. Jpn. J. Ver. Sci., 49(4):711-718.
- Yoshida M, Ishizaki Y and Kawagishi H. 1990. Blastocyst formation by pig embryos resulting from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. J. Reprod. Fert., 88:1-8.
- Yoshida M, Mizoguchi Y, Ishigaki K, Kojima T and Naga T. 1993. Birth of piglets derived from *in vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro*. Theriogenology, 39:1303-1311.