

소의 난포액과 호르몬이 난포란의 체외수정 및 체외발달에 미치는 영향

최양석 · 송상현 · 최창용* · 하란조 · 강다원 · 최상용* · 윤창현 · 박충생
경상대학교 축산학과

Effect of Bovine Follicular Fluid and Hormones on *In Vitro* Oocyte Fertilization and Development of Bovine Embryos

Y. S. Choi, S. H. Song, C. Y. Choi*, R. J. Ha, D. W. Kang, S. Y. Choi*, C. H. Yun and C. S. Park

Dept. of Animal Science, Gyeongsang National University

SUMMARY

This study was carried out to determine the effect of bovine follicular fluid(bFF), hormones, and fetal bovine serum(FBS) supplemented in the medium on the *in vitro* fertilization and development of bovine embryos.

The ovaries were obtained from a local abattoir and placed in physiological saline kept at 30~32°C and brought to the laboratory within 3~4 hours. The oocytes and follicular fluid were collected by aspiration from visible follicles, and the oocytes of grades I on the basis of the morphology of cumulus cells attached and the homogeneity of cytoplasmic granules were selected and used for maturation. The basal media used for oocyte maturation, fertilization and embryo development *in vitro* were Ham' F-10, TALP and TCM-199, respectively. The hormones supplemented in maturation medium were consisted of 35 µg/ml FSH, 10 µg/ml LH and 1 µg/ml estradiol-17β. The bFF collected from 5~9 mm follicles was centrifuged, filtered and inactivated by heat-treatment at 56°C for 30 min. FBS also was inactivated with the same method and kept at -20°C until use. The embryos were co-cultured with the monolayer of bovine oviductal epithelial cells at 39°C under 5% CO₂ in air for 9 days. The results obtained were summarized as follows:

The fertilization rate of oocytes was found 87.4% from 10% FBS and hormones treatment for IVM, and 37.1% of these IVF embryos were developed to blastocyst stage in 10% FBS groups. Compared with this control system, the fertilization rate was decreased significantly(P<0.05) in the maturation without either FBS or hormones. These IVF embryos were developed to morula stage at the similar rate, but to blastocyst at significantly(P<0.05) lower rate in the embryo culture with or without FBS supplementation. The fertilization rate(82.9%) in hormones and 10% inactivated bFF was similar with 10% FBS and hormone groups(87.4%), but decreased significantly(P<0.05) in 20 or 30% bFF (61.0 or 66.0%), respectively.

* 경상대학교 수의과대학(College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University)

In vitro developmental competence to blastocyst stage in 10% FBS and 20% inactivated bFF(37.1 and 31.4%) was higher than in 10 or 30% inactivated bFF(20.0 or 19.2%) or 10, 20 and 30% fresh bFF(19.1, 21.0 and 17.5%).

The results indicated that the *in vitro* fertilization and development rate of the embryos should be improved in 10% FBS or 20% inactivated culture system and 20% inactivated bFF might be available economically for bovine oocyte maturation and embryo culture instead of fetal bovine serum.

(Key words : follicular fluid, hormones, *in vitro* fertilization, bovine embryo)

서 론

포유동물의 미성숙난자가 체외의 적당한 환경에서 감수분열을 재개한다는 사실이 밝혀진 이후 많은 연구자들이 배양 조건을 개선하여 체내와 비슷한 수준으로 수정란을 생산하고자 노력하였음에도 1등급의 소 미성숙난자들이 배반포기까지 발달되는 비율은 아직 1/3 정도에 불과하다고 Brackett와 Zuelke(1993)은 보고하였다.

LH, FSH 및 estradio-17 β (E₂)는 체외성숙용 배양액에 첨가되는 대표적인 호르몬이며, 공동으로 또는 단독으로 첨가되어 미성숙난자의 성숙을 유도하고 있다. 즉 LH는 체외성숙 배양액에서 난자-난구 복합체의 해당과정을 개선하며 난자의 성숙에 필요한 영양적 환경을 개선하고(Brackett과 Zuelke, 1993; Zuelke와 Brackett, 1993), FSH는 난자-난구 복합체에서 hyaluronic acid를 합성하여 난구 세포를 팽창시키고 oocyte maturation inhibitor의 농도를 낮추어 난자의 성숙을 돕는다고 하였으며(Eppig 등, 1996; Buccione 등, 1990; Hensleing와 Hunter, 1983), 또한 E₂는 체외배양 중인 granulosa cell에서 합성될 수 있으며 LH와 FSH의 작용을 활성화시키고 cell-cell communication을 유지하여 단백질의 합성을 향상시켰다고 한다(Roberts와 Echterkamp, 1994; Pontbriand 등, 1989).

체외수정란의 배양액에는 주로 소의 혈청을 많이 사용하는데 이는 수정란의 저해하는 물질이 있으며(Gardner, 1994), 혈청의 대체물질로 polyvinylpyrrolidone(PVP), polyvinylalchol(PVA), transferin, collagen, insulin 등을 사용하였으나 수정란의 발달에는 효과적이지 못하였다(Shamsuddin 등, 1994; Takagi 등, 1991). 한편 배란 전 난자의 환경

인 난포액은 미성숙난자의 성숙을 억제했다는 보고도 있지만(Ayoub와 Hunter, 1993), 그 억제기능은 난포벽의 과립막세포에 의한 것이었다는 사실도 보고되어 있다(Sirard와 Bilodeau, 1990; Akufo 등, 1988). 과립막 세포가 제거된 난포액은 수 시간내에 성숙억제능력을 상실하거나 성숙촉진작용으로 전이되고 미성숙 난자는 곧 성숙을 재개했다는 보고도 있기 때문에 체외수정란 배양액의 단백질 공급 원으로서 이용할 수 있을 가능성을 보였다(Sirard, 1990; Romero와 Seidel, 1994). 난포액 자체의 성장(Hazeleger 등, 1995; Artini 등, 1994) 뿐만 아니라, 첨가한 난포액의 농도(Kato와 Iritani, 1993; Lonergan, 1990), 처리방법(Collins와 Wright, 1995), 배양액의 종류 및 첨가한 호르몬과 혈청(Carolan 등, 1996; Lonergan 등, 1994) 등에 따라서 난자의 성숙(Naito 등, 1990; Fukui 등, 1987), 정자의 수정능력획득(Gye와 Kim, 1996; Yoshioda 등, 1992) 및 수정란 발달(Kim 등, 1996; Funahashi와 Day, 1993; Larocca 등, 1993)의 향상에 차이가 있었다는 보고도 있다.

그 동안 효율적인 체외수정란 생산 방법을 개발하기 위하여 많은 연구를 해 왔으며 특히 최적한 배양액 개발을 위하여 중점적으로 연구를 해 왔다. 배양액의 첨가 물질로 난포액을 이용하는 방안에 관한 연구도 많이 이루어 졌으나 주로 성숙배양액에 첨가한 연구들이다. 그러나 수정란 배양액에 첨가할 단백질원 첨가제로서의 난포액은 체외수정란의 생산비 경비 절감의 면에서도 중요한 과제임에 이에 관한 연구가 극히 미진한 실정이므로 본 연구에서는 난포액의 수정란 배양액 첨가 효과를 규명하고자 함에 주 목적을 두었으며, 아울러 성숙배양액의 조건이 수정란 발달에 미치는 영향을 규명하고자 단백질원과 호르몬의 첨가에 따른 수정란 발달

를도 조사하였다.

재료 및 방법

1. 난소 및 난포란의 채취

도축 후 30분 이내에 회수한 한우의 난소를 100 unit/ml penicillin G와 100 µg/ml streptomycin을 첨가한 생리식염수가 30~32℃로 유지된 보온병에 담아 3~4시간 이내에 실험실로 운반하여 생리적 식염수로 3~4회 세척하여 혈액 등 이물질을 제거하였다. 난포란의 회수용 배양액인 Ham's F-10은 39℃, 5% CO₂ incubator에서 12시간 이상 전배양을 실시하였다. 18 G 주사침이 부착된 10 ml syringe를 이용하여 직경 2~9 mm의 난포에서 난포액과 난포란을 회수하여 10~15분 동안 15 ml tube에서 정치한 후 독립현미경하에서 난포란을 선별하였다. 난포란은 난구세포의 충실도와 세포질의 균일도에 따라서 선별한 후 우수한 난포란을 본 실험에 공시하였다.

2. 난포액 및 소 태아혈청의 준비

10분 동안 정치시킨 난포액의 상층액을 체세포나 혈액을 제거하고 난포액만을 분리하여 500×g에서 5분 동안 2회 원심분리하여 56℃에서 30분 동안 가열처리하여 불활성화시켜 직경 0.8 µm syringe filter로 여과한 후 3 ml씩 분주하여 사용할 때까지 -20℃에서 보관하였다. 또한 신선 난포액도 불활성화를 시키지 않고 단지 0.8 µm syringe filter로 여과하여 5 ml tube에 3 ml씩 분주하여 -20℃에서 보관하였다. FBS는 56℃의 항온수조에서 30분 동안 정치시켜서 불활성화한 다음, 0.2 µm membrane filter로 여과하여 -20℃에서 보관하였다.

3. 난관상피세포 공배양의 준비

난관은 발정주기에 관계없이 채취하여 얼음이 들어 있는 ice box에 담아 4℃를 유지하면서 실험실로 운반하여 100 unit/ml penicillin G와 100 µg/ml streptomycin이 첨가된 생리식염수로 3~4회 세척하여 혈액 등 이물질을 제거하였다. 멸균 가위와 핀셋으로 난관을 제외한 혈관, 지방조직 등과 같은 결합 조직을 제거한 후 70% alcohol, 생리적 식염수의

순으로 2~3회 세척하여 멸균된 paper towel로 물기를 제거하고 오염 가능성이 있는 양끝을 1 cm 정도 제거하였다. TCM-199 medium이 들어 있고 23 G needle이 부착되어 있는 2 ml syringe로 험부 끝에 주사침을 삽입하여 평대부 방향으로 관류 후 핀셋으로 난관을 조심스럽게 훑어 내려 난관상피세포를 수집했다. 난관상피세포의 단층을 유도하기 위하여 TCM-199 medium으로 500×g에서 5분 동안 3회 원심분리한 뒤 1~2×10⁶ cells/ml로 조정하여 48시간 동안 39℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

4. 정자의 준비

개체차이에 의한 수정율의 편차를 줄이기 위하여 2~3마리의 도축 한우에서 채취한 정소상체미부를 사용하였는데, 도축 즉시 정소상체미부를 적출하여 20~30분 이내에 실험실로 운반하여 100 unit/ml penicillin G와 100 µg/ml streptomycin을 첨가한 생리적 식염수로 2~3회 세척하여 혈액 등의 이물질을 제거하였다. 멸균 처리한 paper towel을 이용하여 정소상체표면의 수분을 제거하고, 멸균된 가위와 핀셋으로 표피층을 절개한 후 정소상체 미부 조직을 잘라내었다.

10 mM의 caffeine이 첨가된 2 ml Sp-TALP medium에 수집한 정소상체미부 정액을 층이 지도록 조심스럽게 다루어 15 ml tube에 옮겨 39℃, 5% incubator에서 45°로 비스듬히 정치하여 swimming-up을 유도함으로써 활력이 우수한 정자를 선별하였다. 선별된 상층액을 10 µg/ml heparin이 첨가된 Fert-TALP medium으로 500×g에서 5분 동안 3회로 원심분리하여 15분 배양 후 최종 농도가 1~2×10⁶ sperms/ml 되도록 조정하였다.

5. 난포란의 체외성숙

회수한 난포란 체외성숙용 배양액[Ham's F-10+호르몬(35 µg/ml FSH, 10 µg/ml LH, 1 µg/ml estradiol 17-β)]으로 옮겨 39℃, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 체외성숙을 유도하였는데 이들 체외 성숙은 10% FBS 또는 10, 20 및 30%의 bFF를 이용하였다. 체외성숙된 난포란은 10 µg/ml heparin이 포함된 Fert-TALP medium으로 3~4회

세척한 다음 paraffin oil이 피복된 100 μ l drop에 20~30개의 난포란을 옮겨 수정능획득이 유지된 $1\sim 2\times 10^6$ sperms/ml 농도로 24시간 동안 체외수정을 유도하였다.

6. 수정란의 체외배양

체외수정 후 24시간 제 난자와 정자를 분리하기 위하여 TCM-199으로 3~4회 세척하여 이미 체외 성숙 배양액과 같은 농도의 FBS, 신선 bFF 또는 불활성 bFF로 난관상피세포의 단층이 형성된 TCM-199에서 24시간 동안 배양 후 pipette으로 난구 세포를 제거하였으며, 이때 2포기 이상으로 분할된 수정란으로 수정율을 계산하였다. 48시간 마다 신선한 배양액으로 교체하면서 9일째까지 배양하여 배반포기까지 발달유도하였다.

7. 통계학적 분석

본 실험의 결과분석은 χ^2 -test를 이용하여 처리군 간의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 호르몬과 소 태아혈청이 체외수정 및 수정란의 발달에 미치는 효과

체외성숙 배양액에 첨가한 호르몬(LH, FSH, E₂)과 FBS가 성숙과정을 통하여 미성숙난자의 체외 수정율 및 수정란의 체외발달율에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 즉 호르몬과 10% FBS 첨가구에서 나타난 수정율은 87.4%로서, 호르몬이 결여된 경우의 65.4%나 FBS

가 결여된 경우의 71.1%에 비하여 유의적($P<0.05$)으로 높았다. 그러나 호르몬 결여구와 FBS 결여구 간에는 유의적($P<0.05$)인 차이가 없었다.

체외수정란의 morula 발달율은 각 처리구에서 비슷하여 유의적($P<0.05$)인 차이가 인정되지 않았으나, 배반포배로의 발달율은 성숙과정에서 호르몬과 FBS를 첨가하고 수정란 배양과정에도 10% FBS를 첨가한 구에서 37.1%로써 성숙배양에서 단지 10% FBS를 첨가한 처리구(16.6%) 및 체외성숙과정에서 호르몬은 첨가하였으나 체외배양에서 10% FBS를 첨가하지 않은 처리구(16.9%)에 비하여 유의적($P<0.05$)으로 향상되었다.

성숙과정에서 호르몬 혹은 FBS를 첨가하지 않을 경우에 수정율은 유의적으로 낮았으나 체외수정란의 상실배로의 발달율에는 유의적인 영향을 미치지 않았다. 그러나 배반포배로의 발달율이 낮아졌기 때문에 체외배양액에 첨가한 호르몬과 FBS는 수정란의 형성뿐만 아니라 후기배의 발달에도 중요한 기능을 하는 것으로 사료된다. Sanbuissho와 Threlfall(1988)는 BSA를 포함한 성숙배양액에 FSH와 hCG를 첨가하면 난자의 성숙율이 개선되었다고 하였으며, Galli와 Moor(1991)는 체내 회수란을 TCM-199+10% FCS로 구성된 체외성숙 배양액으로 성숙시켰을 때에 human menopausal gonadotropin(hMG)을 첨가하면 난자의 성숙율이 향상되었고, 이들 수정란을 난관배양하였을 때 배반포배 발달율도 향상되었다고 하였다. Saeki 등(1990)은 성숙배양액에 소 태아혈청만을 첨가했을 때보다 본 실험과 같은 호르몬을 병용 첨가했을 때 수정율과 배반포배로의 발달율을 현저히 향상시켰다고 하

Table 1. Effect of hormones and fetal bovine serum in maturation or culture medium on the development of *in vitro* fertilized bovine embryos

Supplement for oocyte maturation	Supplement for embryo culture	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes fertilized	No. (%) of embryos developed to	
				Morula	Blastocyst
Hormones & 10% FBS	10% FBS	151	132(87.4) ^a	60(45.4) ^a	49(37.1) ^a
Hormones only	None	149	106(71.1) ^b	50(47.1) ^a	18(16.9) ^b
10% FBS only	10% FBS	110	72(65.4) ^b	35(48.6) ^a	12(16.6) ^b

* Values with different superscripts in the same column were significantly ($P<0.05$) different.

였다. 이러한 결과로 보아 난포란의 체외성숙 배양 조건이 수정란의 후기배로의 발달에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

2. 체외수정율에 대한 난포액의 효과

체외성숙 배양액에 첨가한 난포액이 성숙과정을 통하여 수정란의 체외발달에 미치는 영향은 Table 2에서 보는 바와 같이 10% FBS 첨가구의 수정율은 87.4%이며 10% bFF 첨가구의 수정율은 82.9%로서 유의적($P < 0.05$)인 차이가 없었으나, 20 및 30% 난포액의 첨가구에서 수정율은 각각 61.0 및 66.0%로서 난포액의 농도가 수정율에 큰 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다.

Loneran 등(1994)은 TCM-199에 호르몬을 첨가한 성숙배양액에서 10%의 불활성화 거세우혈청을 첨가한 경우에 10~20%의 신선 난포액을 첨가하여도 비슷한 수준의 수정율을 얻었다고 하였으며, Kim 등(1996)은 TCM-199을 기본배양액으로

Table 2. Effect of fetal bovine serum and bovine follicular fluid in maturation medium on *in vitro* fertilization of bovine oocytes

Protein supplement	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes fertilized
1% FBS	151	132(87.4) ^a
10% bFF	94	78(82.9) ^a
20% bFF	118	72(61.0) ^b
30% bFF	103	68(66.0) ^b

* Values with different superscripts in the same column were significantly ($P < 0.05$) different.

hCG와 E₂를 첨가하여 성숙배양한 결과, 신선난포액을 10~60% 수준으로 첨가하여 80% 이상의 수정율을 얻었다고 하였다. 이상의 결과에서 10% 불활성화 난포액을 성숙배양액에 단백질원으로서 첨가하면 우수한 수정율을 얻을 수 있음을 알 수 있었다.

3. 신선 및 불활성화 난포액이 체외발달에 미치는 효과

체외성숙 배양액에 첨가한 신선 난포액과 불활성화 난포액이 수정란의 발달에 미치는 효과는 Table 3에서 보는 바와 같다. 상실배로의 발달율은 10% FBS 첨가구, 신선 난포액 첨가구 및 불활성화 난포액 첨가구 간에 유의적인 차이가 없었다. 배반포배로의 발달율에서는 10% FBS 첨가구(37.1%)와 20% 불활성화 난포액 첨가구(31.4%)와 유의적인 차이가 없었으나, 다른 난포액 첨가구보다 유의적으로($P < 0.05$) 높았다.

신선 난포액 첨가구들과 불활성화 난포액 첨가구들의 배반포배로의 발달율에서 20% 불활성화 난포액 첨가구의 31.4%는 10, 20 및 30% 신선 난포액 첨가구의 19.1, 21.0 및 17.5%와 유의적인 차이가 없었으나, 10 및 30% 불활성 난포액 첨가구의 20.0 및 19.2%보다 유의적($P < 0.05$)으로 높았다. 그러나 10, 20 및 30% 신선 난포액 첨가구와 10 및 30% 불활성 난포액 첨가구와는 유의적($P < 0.05$)으로 차이가 없었다.

난포액 첨가 수준이 체외수정란의 체외발달율에 미치는 영향을 조사하고자 체외성숙시와 동일 수준의 혈청 혹은 난포액이 첨가된 배양액에서 수정란을 발달시킨 결과, 수정란 중 상실배로의 발달율에

Table 3. Effect of FBS and bFF in maturation and culture media on the development of bovine embryos

Protein supplement	No. of embryos examined	No. (%) of embryos developed to	
		Morula	Blastocyst
10% inactivated FBS	132	60(45.4) ^a	49(37.1) ^a
10% fresh bFF	73	40(54.7) ^a	14(19.1) ^{bc}
20% fresh bFF	57	32(56.1) ^a	12(21.0) ^{bc}
30% fresh bFF	40	22(55.0) ^a	7(17.5) ^{bc}
10% inactivated bFF	128	61(47.6) ^a	26(20.0) ^c
20% inactivated bFF	127	68(53.5) ^a	40(31.4) ^{ab}
30% inactivated bFF	114	58(50.8) ^a	22(19.2) ^c

* Values with different superscripts in the same column were significantly ($P < 0.05$) different.

서는 어느 처리구에서나 비슷하였으나, 배반포배로의 발달율에서는 20% 불활성화 난포액 첨가구가 10% FBS 첨가구와 비슷하게 가장 높은 발달율을 보였고 기타의 처리구들에서는 이들보다 유의적 ($P < 0.05$)으로 낮은 발달율을 나타내었다. 본 실험의 처리구 중 가장 높은 배반포배로의 발달율을 보인 10% FBS 첨가구의 37.1%는 Carolan 등(1996)의 35%와 비슷한 수준이었다. 각 처리구 간의 배반포배로의 발달율에는 유의적인 ($P < 0.05$) 차이를 보였으나 상실배로의 발달율에 있어서는 유의차가 나타나지 않은 것은 Collins와 Wright(1995)에서와 같이 초기의 수정란은 배양액에 첨가된 단백질질의 종류나 수준에 큰 영향을 받지 않고 상실배까지는 발달할 수 있기 때문인 것으로 사료된다.

성숙배양액에 난포액을 첨가한 경우의 수정란 발달효과에 관하여 Lonergan 등(1994)은 10~20%의 불활성화 거세우 혈청을 첨가했을 때 20%의 신선 난포액을 첨가한 경우와 비슷한 수준의 배반포배로의 발달율을 얻었다고 하였으며, 그러나 Kato와 Iritani(1993)는 신선 난포액이 우수하였다고 하면서 그 이유로서는 함유된 성장물질의 효과일 것으로 추정했다.

Hazeleger 등(1995) 및 Carolan 등(1996)은 난포의 크기에 따라 steroid hormones이나 단백질의 조성이 다를 수 있다고 보고하였으며, Lonergan 등(1994)은 대난포(>6 mm)를, 그러나 Sirard(1995) 등은 소난포를 이용하는 편이 수정란 발달에 유리하다고 하였고, Carolan 등(1996)은 대(>8 mm), 중(6~8 mm) 및 소(<6 mm) 난포의 액에서 유의적인 차이를 발견할 수는 없었다고 하는 등 서로 다른 결과를 보고하였다. 본 실험에서 직경 5~9 mm 난포액을 사용하였으므로 난포의 크기에 따른 조성상의 차이에 따라 첨가하는 호르몬이나 단백질의 종류와 수준을 달리 설정한다면 보다 높은 수정율과 발달율을 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

이러한 연구결과들은 본 실험에서와는 달리 난포액을 성숙배양액에만 첨가하고 수정란 배양액에는 혈청을 첨가한 경우이기 때문에, 본 연구에서의 수정란 발달율과 직접 비교할 수는 없다. 본 실험에서 수정란 배양액에 10% FBS를 첨가한 경우에 비하여 20% 신선 난포액 첨가구에서 수정란 발달율이

유의적으로 낮았으나 불활성화 난포액 20% 첨가구에서는 비슷하게 높은 발달율이 얻어진 것이다.

수정란 배양액의 첨가제로 난포액을 사용한 연구 결과는 찾아보기 어렵다. 다만 Larocca 등(1993)은 대난포(≥ 15 mm)에서 채취한 난포액을 불활성화 시켜서 체외성숙 및 수정란 배양액에 공히 첨가하였을 때 10% ECS 첨가구보다 유의적으로 높은 수준의 배반포배를 생산함으로써 난포액이 배양액 첨가제로서 우수하다고 밝힌 바 있으나 그 발달율의 수준은 본 실험의 성적에 비하여 상당히 낮았다. 본 연구에서 발달율이 높은 이유는 성숙배양액에 호르몬을 첨가했기 때문이라고 생각된다.

적 요

소 난포액을 미성숙난자의 체외성숙 배양액에 첨가하였을 때 체외수정을 및 체외발달율에 미치는 영향을 규명하고, 또한 체외성숙 배양시 혈청과 호르몬들의 첨가 효과 및 수정란의 체외배양시 혈청의 첨가 효과를 규명하고자 하였으며 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 난포란의 체외성숙시 10% FBS와 호르몬을 첨가한 경우에는 87.4%의 수정율을 보였으며, 이들 수정란을 10% FBS 배양조건에서 체외배양한 결과 45.4 및 37.1% 상실배 및 배반포배로 발달하였다. 이에 비하여 성숙배양액에 10% FBS나 호르몬 중 어느 한 가지만을 첨가한 경우에는 수정율이 유의적 ($P < 0.05$)으로 낮았으며, 이들 수정란을 배양한 결과 10% FBS의 첨가에 관계없이 비슷한 수준으로 상실배로 발달하였으나 배반포배로의 발달율은 유의적 ($P < 0.05$)으로 낮았다.
2. 성숙배양액에 공히 호르몬을 첨가하면서 첨가 혈청 및 난포액 수준간의 체외수정율을 비교한 결과 10% FBS를 첨가한 구(87.4%)에 비하여 불활성화 난포액 10% 첨가구(82.9%)는 비슷하였으나, 불활성화 난포액 20 및 30% 첨가구(61.0 및 66.0%)에서 유의적 ($P < 0.05$)으로 낮았다.
3. 성숙배양액에 공히 호르몬을 첨가하면서 성숙배양액 및 수정란배양액에 동일 수준으로 첨가

한 혈청과 난포액들의 수준 간의 배반포배 발달을 비교한 결과 10% FBS(37.1%)를 첨가한 구에 비하여 20% 불활성화 난포액 첨가구(31.4%)는 비슷하였으나, 10 및 30% 불활성화 난포액 첨가구(20.0 및 19.2%)와 10, 20 및 30% 신선 난포액 첨가구(19.1, 21.0 및 17.5%)는 유의적($P < 0.05$)으로 낮았다.

이상의 결과에서 체외성숙 배양 조건이 우수하던 체외수정율을 높일 수 있을 뿐만 아니라 배반포배로의 발달율도 향상되며, 성숙배양액과 수정란 배양액에 소 태아혈청 대신에 난포액을 첨가하여도 비슷한 수준의 수정율과 배반포배 발달율을 얻을 수 있음을 알 수 있었다.

참고문헌

- Akufo E, Phelps DA, Tibbits FD and Foote WD. 1988. Influence of follicular components on oocyte meiosis *in vitro*. *Theriogenology*, 33:643-649.
- Artini PG, Battaglia C, Ambrogio GD, Brreca A, Droghini F, Volpe A and Genazzani AR. 1994. Relationship between human oocyte maturity, fertilization and follicular fluid growth factors. *Human Reprod.*, 9:902-906.
- Ayoub MA and Hunter AG. 1993. Inhibitory effect of bovine follicular fluid on *in vitro* maturation of bovine oocytes. *J. Dairy Sic.*, 76:95-100.
- Brackett B and Zuelke K. 1993. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, 39:43-64.
- Buccione R, Schroeder AC and Eppig JJ. 1990. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol. Reprod.*, 43:543-547.
- Carolan C, Lonergan P, Monget P, Monniaux D and Mermillod P. 1996. Effect of follicle size and quality on the ability of follicular fluid to support cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 43:477-483.
- Collins AR and Wright RW Jr. 1995. Effects on embryo development of heat treatment and filtration of bovine follicular fluid used to supplement IVM medium. *Theriogenology*, 43:189 (Abstract)
- Eppig JJ, O'Brien M and Wigglesworth K. 1996. Mammalian oocyte growth and development *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 44:260-273 (Abstract).
- Fukui Y, Glew AM and Moor RM. 1987. Method of sperm preparation for *in vitro* fertilization of sheep. *Jap. J. Anim. Reprod.*, 33:44-47.
- Funahashi H and Day BN. 1993. Effects of follicular fluid at fertilization *in vitro* on sperm penetration in pig oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 99:97-103.
- Galli C and Moor RM. 1991. Gonadotrophin requirements for the *in vitro* maturation of sheep oocytes and their subsequent embryonic development. *Theriogenology*, 35:1083-1093.
- Gardner DK. 1994. Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell Int.*, 18:1163-1179.
- Gye MC and Kim MK. 1996. Acrosome reaction of mouse sperm by human follicular fluid. *Korean J. Fertil. Steril.*, 23:215-221.
- Hazeleger NL, Hill DJ, Stubbings RB and Walton, JS. 1995. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential *in vitro*. *Theriogenology*, 43:509-522.
- Hensleigh HC and Hunter AG. 1983. Influence of FSH and hCG upon the *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*, 19:133 (Abstract).
- Kato H and Iritani A. 1993. *In vitro* fertilization in cattle. *Mol. Reprod. Dev.*, 36:229-231.
- Kim KS, Mitsumizo N, Fujita K and Utsurni K. 1996. The effect of follicular fluid on *in vitro*

- maturation, oocyte fertilization and the development of bovine embryos. *Theriogenology*, 45:787-799.
- Larocca C, Kmaid S and Calvo J. 1993. Effect of follicular fluid and estrus cow serum on maturation, fertilization and development of the bovine oocyte *in vitro*. *Theriogenology*, 39:253 (Abstract).
- Lonergan P. 1990. Factors affecting *in vitro* maturation and fertilization of the bovine oocyte. M. Agr. Ac. Thesis, University College, Dublin.
- Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP and Gordon I. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 37:48-53.
- Naito K, Kosaka M, Fukuda Y, Ishibashi I and Toyoda Y. 1990. Analysis of the factor(s) present in follicular fluids promoting male pronucleus formation ability of porcine follicular oocytes. *Jap. J. Anim. Reprod.*, 36: 213-218.
- Pontbriand D, Goff AK, Xu KP and King WA. 1989. Effect of steroids on protein synthesis in mature and immature bovine oocytes. *Theriogenology*, 31:240 (Abstract).
- Roberts AJ and Echterkamp SE. 1994. *In vitro* production of estradiol by bovine granulosa cells: Evaluation of culture condition, stage of follicular development, and location of cells within follicles. *Biol. Reprod.*, 51: 237-282.
- Romero A and Seidel GE Jr. 1994. Effects of bovine follicular fluid on maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*, 41:383-394.
- Saeki K, Lueibfred-Rutledge ML and First NL. 1990. Are fetal serum and hormones necessary during *in vitro* maturation of cattle oocytes for subsequent development. *Theriogenology*, 33:316 (Abstract).
- Sanbussho A and Threlfall WR. 1988. The influence of serum and gonadotrophins on bovine oocyte maturation *in vitro*. *Theriogenology*, 29:301 (Abstract).
- Shamsuddin M, Larsson B, Gustafsson H and Rodriguez-Martinez H. 1994. A serum-free, cell-free culture system for development of bovine one-cell embryos up to blastocyst stage with improved viability. *Theriogenology*, 41:1033-1043.
- Sirard MA, Roy F, Mermillod P and Guibault LA. 1995. Origin of the follicular fluid added to the media during bovine IVM influences embryonic development. *Theriogenology*, 44:85-94.
- Sirard MA. 1990. Temporary inhibition of meiosis resumption *in vitro* by adenylate cyclase stimulation in immature bovine oocytes. *Theriogenology*, 33:757-767.
- Sirard MA and Bilodeau S. 1990. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 43:777-783.
- Takagi Y, Mori K, Tomizawa M, Takahashi T, Sugawara S and Masaki J. 1991. Development of bovine oocytes matured, fertilized and cultured in a serum-free, chemically defined medium. *Theriogenology*, 35:1197-1207.
- Yoshida M, Ishizaki Y, Kawagishi H, Bamba K and Kojima Y. 1992. Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes *in vitro* and on their subsequent fertilizing and developmental capacity *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 95:481-488.
- Zuelke KA and Brackett BG. 1993. Increased glutamine metabolism in bovine cumulus cell-enclosed and denuded oocytes after *in vitro* maturation with luteinizing hormone. *Biol. Reprod.*, 48:815-820.

(접수일자 : 1997. 8. 2 / 채택일자 : 1997. 8. 21)