

소 난포란의 체외수정에 있어서 정액의 처리방법이 수정 및 체외발달에 미치는 영향

정 장 용
진주산업대학교 축산학과

Effects of Sperm Treatments on Fertilization and *In Vitro* Development of Bovine Follicular Oocytes

J. Y. Chung

Dept. of Animal Science, Chinju National University

SUMMARY

The ovaries of Korean native cows or heifers were obtained from a slaughter house and kept on 28~30°C and transported to laboratory within 2 hrs. The follicular oocytes were collected follicles. The oocytes were matured *in vitro* for 24 hrs. In TCM-199 supplemented with 35 µg/ml FSH, 10 µg/ml LH, 1 µg/ml estradiol-17 and granulosa cells at 39°C under 5% CO₂ in air.

The caudal epididymis of Korean native bulls were obtained from a slaughter house and transported to laboratory within 30 minutes. Swim-up of collected spermatozoa and freezing sperm was layered under 2ml fertilization B. O. medium in two tissue culture tubes and held at a 45°C angle for 0~2 hrs. They were fertilized *in vitro* by freezing sperm treated with heparin for 24 hrs, and then the zygotes were co-cultured *in vitro* with bovine oviductal epithelial cells for 7 to 9 days.

The follicular oocytes recovered were classified into 41.7% as grade I, 51.5% as grade II and 6.8% as grade III. The number of oocytes recovered per ovary was averaged 8.3 and they were classified into 2.3 as grade I, 2.5 as grade II and 2.3 as grade III.

The cleavage rate of matured oocytes was significantly ($P < 0.05$) higher after *in vitro* fertilization in caudal epididymis (66.1%) than freezing sperm (51.3%). Similarly, the proportion of cleaved zygotes that developed to blastocysts was 19.6 and 14.3% respectively. The cleavage rate and *in vitro* developmental rate in swim-up period of freezing sperm was similar (59.3~63.4 and 13.6~19.3%).

(Key words : oocyte, caudal epididymis sperm, freezing sperm, cleavage, *in vitro* development, bovine, Korean native bull)

서 론

종축의 개량효과를 높이기 위하여 수정란이식 기법이 널리 이용되고 있으나 수정란이식 기술의 산업적 이용을 위해서는 무엇보다도 적은 비용으로

* 본 논문은 '95 첨단농림기술개발비로 수행하였음.

수정란을 보다 안정적 대량 생산과 체내이식의 효율성을 높일 수 있어야 할 것이다. 체외수정 기법은 도축장에서 버려지는 난소로부터 미성숙 난자의 대량 확보가 가능하므로 난자의 이용효율과 비용 측면에서는 기존의 과배란 처리방법에 비하여 보다 개선된 방법이라고 할 수 있다. 그러나 이러한 체외수정이 성공적으로 이루어지기 위해서는 난자의 성숙, 정자의 수정능력 획득 및 침체반응을 위한 정자의 처리와 배양조건 등의 기술이 확립되어야 한다. 현재로서는 체외수정을 및 포배기로의 발달율이 매우 낮은 실정이다.

체내 성숙난자를 이용하여 체외수정에 의한 최초의 산자 생산은 Brackett(1982)에 의해 보고되었으며, 최근에는 난포란을 이용한 체외배양기법으로 체외성숙, 수정 및 체외발달한 수정란을 이식하여 산자를 생산하고 있다(Reichenbach 등, 1992; Jiang 등 1990; Lu 등, 1990; Kajihara 등, 1990; Eystone과 First, 1989).

포유동물의 체외수정에 관한 연구는 Austin과 Chang(1951)이 정자의 수정능 획득 현상을 관찰한 이래 Thibault 등(1954)에 의해 최초로 가토에서 체외수정에 성공하였다. 소의 체외수정은 1965년 Edwards가 난포란의 체외성숙을 보고한 이래 Sreenan(1970)과 Hunter(1987)가 체외성숙시킨 난포란을 발정우의 난관에 체내수정시켜 전핵형성을 관찰함으로써 체외성숙의 가능성을 확인하였다.

본 연구에서는 도살장에서 도살되는 한우의 난소를 적출하여 난소로부터 미성숙 난포란을 회수하여 체외에서 성숙한 난자를 동결정액과 정소상체미부정액을 처리 방법에 따른 수정 및 체외발달에 미치는 영향을 조사하고자 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 채취

미성숙 난포란의 채취를 위하여 도축장(김해 도축장)에서 도살된 한우의 암소에서 난소를 적출하여 penicillin G(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 streptomycin(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 함유된 생리식염수(28~30 $^{\circ}\text{C}$)가 들어 있는 보온병에 담아 2시간 내에 실험실로 운반하여 난소 표면의 이물질과 조직을 제거한 후 penicillin

G(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)가 함유된 식염수로 2~3회 세척하여 정 등(1995)의 방법으로 채취하였다. 즉 18 gauge 주사침이 부착된 10 ml 주사기에 5% FCS가 첨가된 TCM-199 배양액 2 ml를 흡입한 후 2~6 mm 가시난포로부터 난포액과 난포란을 동시에 흡입하여 13 ml의 시험관에 담아 5~10분간 정치시켜 하부액을 petri dish(Falcon, U.S.A)로 옮겨 도립현미경 하에서 난포란을 수집하였다. 수집한 난포란을 기본배양액(TCM-199+10% FCS)으로 4~5회 세척하면서 난구세포의 부착 정도와 세포질의 충실도에 따라 3등급으로 분류하였다. Grade I은 4~5층의 난구세포층으로 되어 있고, 세포질이 충실한 것을 선발하였고, grade II는 2~3층의 난구세포층을 가진 것, grade III은 부분적으로 나화된 것으로 분류하여 난포란을 실험에 공시하였다.

2. 난포란의 체외성숙

체외성숙 배양액은 TCM-199(Sigma, U.S.A)배양액에 10% FCS, sodium pyruvate(56 $\mu\text{g}/\text{ml}$), streptomycin(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), penicillin G(100 units/ml)와 LH(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), FSH(35 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 estradiol-17(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가하여 사용하였다. 체외성숙은 정 등(1995)의 방법으로 실시하였다. 즉 체외성숙 배양액을 4-well dish에 1 ml씩 분주하여 39 $^{\circ}\text{C}$ CO₂ incubator(5% CO₂, 95% air, 98~99% 습도)에서 20시간 전배양을 실시하여 평형을 유도한 후 well당 10~15개의 난포란을 옮겨 incubator 내에서 24시간 동안 배양함으로써 체외성숙을 유도하였다. 체외성숙시 과립막세포를 2×10^6 cells/ml의 난포란과 같이 공배양을 실시하였다.

3. 체외수정

체외수정을 위한 정자의 준비는 한우 동결정액을 용해하여 500 \times g로 원심분리한 후 하층액만을 채취하여 B. O.배양액을 1 ml 첨가하여 다시 원심분리를 2~3회 반복함으로써 동해방지제를 제거한다. 동해방지제가 제거된 정액은 CO₂ incubator에서 swim-up을 유도하기 위하여 0~2시간 동안 배양 후 다시 500 \times g로 원심분리하여 상층액을 취하여 다시 CO₂ incubator에서 10~15분간 수정능 획득을 유도하였다. 체외수정은 성숙된 난포란을 B. O. 배

양액 80~100 μ l 당 10~15개의 난자를 옮긴 후 수정능이 획득된 정자의 최종농도가 2×10^6 sperms/ml이 되게 첨가하여 약 24시간 동안 CO₂ incubator에서 수정을 유도하였다.

정소상체 미부 정자는 도축장에서 도살 직후 정소를 적출하여 4℃ 전후 항생제가 첨가된 생리식염수에 담아 30분 이내에 실험실로 운반하였다. 운반된 정소상체 미부는 penicillin G(100 units/ml)와 streptomycin(100 μ g/ml)이 첨가된 생리식염수로 2~3회 세척한 후 표피를 절개하여 B. O. 배양액이 들어있는 dish에서 세절하여 농후정자를 채취하였다. Swim-up은 상기 동결정액의 처리방법과 동일한 방법으로 1시간 동안 실시한 후 수정을 유도하였다.

4. 난관 상피세포의 준비

난관 상피세포의 회수를 위하여 도축장(김해 도축장)으로부터 수집한 난관을 생리식염수에 담아 얼음위에서 운반하여 항생제가 함유된 생리식염수로 1~2회 세척하여 결합조직과 지방덩이를 제거한 다음 다시 생리식염수로 세척하였으며, 오염을 방지하기 위하여 난관의 양쪽 끝부분을 약 1 cm 정도 제거하였다. 난관 상피세포의 회수는 난관 협부에서 누두부 쪽으로 10% FCS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 1~2 ml을 관류시켜 회수하였다. 채취한 난관 상피세포는 500×g로 원심분리시켜 상층액을 제거하고 하층의 pellet 부분을 2회 이상 세척하여 2×10^6 cells/ml의 최종농도로 조정하여 배양시킴으로써 monolayer cell의 형성을 유도하였다.

5. 체외수정란의 체외배양

체외수정이 이루어진 수정란을 회수하여 10% FCS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 4~5회 세척

하여 monolayer를 형성하고 있는 난관 상피세포와 공배양을 시키면서 48시간 간격으로 신선한 배양액으로 교환하면서 수정란의 체외발달을 유도하였다.

6. 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과들의 통계처리는 Micro-stata statical program package를 사용하여 χ^2 -test를 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 난포란의 회수

도살장에서 채취한 난소를 실험실로 운반하여 항생제가 첨가된 생리식염수로 세척한 다음 18 gauge needle로 난포란의 크기에 따라 소난포(직경 < 2 mm), 중난포(직경 2~6 mm) 대난포(직경 > 6 mm)로 구분하여 난포란을 채취한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다.

48개의 난소에서 398개의 난포란을 채취한 결과, 소, 중 및 대난포에서 각각 166(41.7%), 205(51.5%) 및 27개(6.8%)의 난포란을 회수하였으며, 회수한 난포란의 등급별로 보면 grade I는 모두 110개를 회수하여 난소당 각각 평균 2.3개의 회수율을 보였다. Grade II 및 grade III 등급은 각각 2.5 및 2.3개를 회수하였다. 본 실험에서는 난소 1개당 난자회수율은 8.3개로서 Leibfred-Rutledge 등(1985)의 6.6개 보다는 다소 높은 회수율을 보였으며, Hamano와 Kuwagama(1993)은 흡입 및 slicing 방법으로 회수하여 난소 1개당 38개의 난포란을 회수하였다. 또한 Carloan 등(1994)은 직경 2~6 mm의 난포에서 13.9개를 회수하여 본 실험결과보다는 다소 높으며, 난포란의 회수는 흡입방법과 slicing 방법

Table 1. Recovery rates of oocytes by different follicle sizes

Follicular size	No. of used ovary	Total	No. of oocytes recovered			
			G I	G II	G III	G IV
Small (<2 mm)	48	166(41.7)	52(31.3)	59(35.5)	41(24.8)	14(8.4)
Medium(2~6 mm)	48	205(51.1)	57(27.8)	61(29.8)	55(26.8)	32(15.6)
Large (>6 mm)	48	27(6.8)	1(3.7)	2(7.4)	13(48.1)	11(40.8)
Mean no. of oocytes recovered per ovary	48	308(8.3)	110(2.3)	122(2.5)	109(2.3)	57(1.2)

을 병용하는 것이 회수율을 높일 수 있는 효과적인 방법이라고 생각된다.

2. 동결정액과 정소상체 미부 정자의 수정 및 체외발달율

5 mM의 caffeine과 10 μ g의 heparine이 첨가된 체외수정용 B. O. 배양액에 체외성숙이 완료된 난자를 동결정액과 정소상체 미부 정자를 24시간 동안 수정을 유도한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다.

체외수정을 유도하기 위하여 한우 동결정액을 사용하였을 때는 232개의 체외성숙 난자 중 119개가 수정이 이루어져 51.3%의 수정율을 보였으며, 이 중에서 17개의 수정란이 배반포기로 발달하여 14.3%의 발달율을 보였다. 또한 정소상체 미부 정자를 사용하였을 때는 224개의 체외성숙난자 중 148개가 수정이 이루어져 66.1%의 수정율을 보였고 이 중 29개가 배반포기로 발달하여 19.6%의 체외발달율을 보였다. 동결정액과 정소상체 미부 정자를 체외수정용 정자로 사용하였을 때 각각 51.3 및 66.1%로서 정소상체 미부 정자를 사용하였을 때가 유의적($P < 0.05$)으로 체외수정율이 높았으며, 체외수정란의 배반포로의 발달율은 각각 14.3 및 19.6%로서 유의적($P < 0.05$)인 차이가 없었다.

이러한 결과는 한우 동결정액 자체가 각종 미생물 오염으로 인하여 수정배지를 완전히 오염시켰으므로 체외수정의 실패 또는 체외수정율을 감소시켰으며, 특히 여름철에 제조한 동결정액이 오염의 정도가 더욱 심하였다. 이 등(1995)은 50 μ g/ml의 kanamycin을 수정용 배양액에 첨가하였을 때 상당부분 정액내의 미생물 오염을 줄일 수 있어서 수정율과 체외발달율을 향상시켰다고 보고하였다.

3. Swim-up 처리 시간에 따른 수정율 및 체외발달율

체외수정을 위한 한우 동결·융해정액은 B. O. 배양액에 500 \times g로 2~3회 원심분리를 실시하여 동해방지제를 제거하였으며, CO₂ incubator에서 적정 swimup 시간을 규명하기 위하여 0~2시간 동안 배양을 실시하여 수정을 유도한 후 배반포기로의 발달율을 조사한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다.

수정은 분할 여부에 따라 수정율을 판단하였다. Swim-up을 시키지 않았을 때 61.4%가 수정이 이루어졌으며, swim-up을 30분에서 2시간 동안 시켰을 경우는 59.3~63.4%의 수정이 이루어져 swim-up처리 시간에 따른 수정율은 유의적($P < 0.05$)차이가 없었다. 체외수정란의 배반포로의 발달율은 swim-

Table 2. Cleaved and development rates by different sperm source of *in vitro* matured bovine oocytes

Sperm sources	No. of oocytes inseminated	No. of oocytes cleaved	No. of embryos developed to	
			Morula	Blastocyst(%)
Freezing	232	119(51.3) ^b	36	17(14.3) ^a
Caudal epididymis	224	148(66.1) ^a	56	29(19.6) ^b

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

Table 3. Cleavage and development rate by different swim-up time of freezing sperm from IVM-IVF bovine oocytes

Swim-up periods(hrs.)	No. of oocytes inseminated	No. of oocytes cleaved	No. of embryos developed to	
			Morula	Blastocyst(%)
0.0	127	78(61.4) ^a	24	11(14.1) ^a
0.5	118	70(59.3) ^a	21	11(15.7) ^a
1.0	103	62(60.2) ^a	21	12(19.3) ^a
1.5	98	59(60.2) ^a	20	8(13.6) ^a
2.0	131	83(63.4) ^a	27	14(16.9) ^a

* Values with same superscripts in the column were not significantly different ($P < 0.05$).

up을 시키지 않았을 때가 14.1%가 배반포로 발달하였으며, swim-up을 시켰을 경우는 13.6~19.3%가 배반포로 발달하였으나 이들간에 유의적($P < 0.05$)인 차이는 없었다.

본 실험결과 swim-up처리는 체외수정율과 배반포로의 발달에 직접적인 영향은 미치지 않는 것으로 생각된다. 단지 swim-up을 시키는 것은 활력이 좋은 정자를 선별하여 수정시키는데 불과하며, swim-up 처리를 생략함으로써 체외수정의 복잡한 과정을 단축시키도 무방할 것으로 생각된다.

적 요

본 연구에서는 도살장에서 도살되는 한우의 난소를 적출하여 난소로부터 미성숙 난포란을 회수하여 체외에서 성숙한 난자를 동결정액과 정소상체 미부정액을 처리 방법에 따른 수정 및 체외발달에 미치는 영향을 조사하고자 본 실험을 수행하였다.

도살장에서 도살된 한우의 난소를 채취하여 체외 성숙을 시킨 다음 한우 동결정액을 용해하여 B. O. 배양액으로 원심분리를 2~3회 반복하여 동해방지제를 제거한 후 CO₂ incubator에서 0~2시간 동안 swim-up을 유도하였다. 정소상체 미부 정자는 도축장에서 도살 직후 정소를 채취하여 체외수정에 사용하였다. 체외수정은 수정용 B. O. 배양액 80~100 μ l 당 10~15개의 난자를 옮겨 정자의 최종농도가 2×10^6 sperms/ml이 되게 첨가하여 약 24시간 동안 CO₂ incubator에서 수정을 유도하였다. 체외수정이 이루어진 수정란을 회수하여 10% FCS가 첨가된 TCM-199 배양액으로 4~5회 세척하여 monolayer를 형성하고 있는 난관 상피세포와 공배양을 시키면서 48시간 간격으로 신선한 배양액으로 교환하면서 수정란의 체외발달을 유도한 결과는 다음과 같다.

난소에서 난포의 크기에 따른 Grade I의 회수율은 소, 중 및 대난포에서 각각 31.3, 27.8 및 3.7%였으며, 48개의 난소로부터 모두 398개의 미성숙 난자를 회수하여 난소당 8.3개의 미성숙 난자를 회수하였다. 등급별로는 2.3, 2.5 및 2.3%의 회수율을 보였다.

체외수정율은 정소상체 미부 정자를 사용하였을

때가 66.1%로서 동결정액을 사용하였을 때의 51.3% 보다는 유의적($P < 0.05$)으로 높았으며, 배반포로의 발달율은 각각 19.6 및 14.3%으로서 이들간의 유의적($P < 0.05$)인 차이가 없었다.

Swim-up처리 시간에 따른 수정율은 59.3~63.4%의 수정이 이루어져 swim-up처리 시간에 따른 유의적($P < 0.05$)인 차이가 없었으며, 체외수정란의 배반포로의 발달율도 13.6~19.3%가 배반포로 발달하였으나 이들간에 유의적($P < 0.05$)인 차이는 없었다.

참고문헌

- Austin CR. 1951. Observation on the penetration of the sperm into mammalian egg. Aust. J. Sci. Res. B., 4:581-586.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF and Dressel MA. 1982. Normal development ment following *in vitro* fertilization in the cow. Biol. Reprod., 27: 147-158.
- Carolan C. 1994. Effect of recovery method on yeild of bovine oocytes perovary and their developmental conceptanxe after maturation, fertilization and culture *in vitro*. Theriogenol., 41:1061-1068.
- Eyestone WH and First NL. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. J. Reprod. Fert., 85:715-720.
- Edwards RG. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. Nature, 208:349-351
- Hunter RHF. 1987. The timihg of capacitation in mammalian spermatozoa are interpretation. Res. Reprod., 19:3-4.
- Jiang HSW, Wang L, Lu KH, Gordon I and Polge C. 1991. Roies of different cells monolayers in the co-culture of IVF bovine embryos. Theriogenol., 335:216.
- Kajihara T, Kometani N, Kobayashi S, Shitana-

- ka Y, Klshiba Y, Hishiyama L, Shiraiwa K and Goto K. 1990. Pregnancy rate and births after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. Theriogenol., 33:264.
- Leibfried- Rutledge M, Crister LC and First NL. 1985. Fertilization potential of follicular oocytes classified by steps of cycle and size of follicle. Theriogenol., 23:753-759.
- Lu KH, Jiang HS, Wang WL and Gordon I. 1990. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. Vet. Rec., 121:259-260.
- Reichenbach HD, Leibrich J, Berg U and them G. 1992. Pregnancy rates and births after unilateral or bilateral transfer of bovine embryos produced *in vitro*. J. Reprod. Fert., 54:363-370.
- Selman JM. 1970. *In vitro* maturation and attempted fertilization of cattle follicular oocytes. J. Agricul. Sci., 75:293-396.
- Thibault C, Dauzier L and Winterberger S. 1954. Etude cytologique de la fecondation *in vitro* de loeuf de la lapine. C. R. Soc. Biol, Paris, 148:189-190.
- Xu KP, Greve T, Callesen H and Hyttel P. 1987. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized *in vitro*. J. Reprod. Fert., 81:501-504.
- 이명식, 고응규, 임기순, 장원경, 양보석, 오성종 박용운. 1995. 소 체외수정란 생산에 있어 미 생물 제어에 관한 연구. 한국가축번식학회지, 19:153-157.
- 정장용, 박희성, 박성진, 문승식, 정현승. 1995. 소 난포란의 체외성숙도가 수정 및 체외발달에 미치는 영향. 진주산업대학 농업기술연구소보, 8:9-15.

(접수일자 : 1997. 7. 21 / 채택일자 : 1997. 8. 16)