

단순한정배양액의 성분조정에 의한 소 수정란의 체외생산

노상호 · 윤중택 · 한기영 · 이병권* · 황우석*
안성산업대학교 동물생명자원학과

In Vitro Production of Bovine Embryos by Modification of Simple Defined Culture Medium

S. Roh, J. T. Yoon, K. Y. Han, B. C. Lee and W. S. Hwang
Department of Animal Life Resources, Ansung National University

SUMMARY

In this study, we investigated the effects of three kinds of culture medium (Charles and Rosenkrans; CR1aa, Tyrode's; TALP, synthetic oviduct fluid; SOF), insulin+transferrin+selenium complex (ITS), macromolecules(polyvinyl alcohol: PVA, fetalbovine serum: FBS) and NaCl on the development of early bovine embryos. In experiment 1, there were no differences in embryo development among three kinds of embryo culture medium (CR1aa, TALP, SOF). In experiment 2, BSA, FBS and PVA were added each in TALP as macromolecule sources. The developmental rates of embryos in BSA or FBS added TALP were significantly higher than in PVA added one ($p<0.01$), but there was no difference between BSA and FBS added groups. In experiment 3, bovine embryos were cultured in TALP with the following supplements: BSA alone (1, 3 or 8 mg/ml, each) or BSA (1, 3 or 8 mg/ml, each)+ITS (10 μ g/ml insulin, 5 μ g/ml transferrin, 5 ng/ml selenium). In higher concentration of BSA and ITS supplemented groups, the developmental rates over compacted morula were higher than others, but there was a significant effect of ITS only in 1 mg/ml of BSA added group ($p<0.05$). In experiment 4, the effect of reduced concentration of NaCl was evaluated. The developmental rate over compacted morula in the medium containing 90 mM of NaCl was higher than in 114 mM group ($p<0.05$).

In conclusion, BSA could be used as a macromolecule source in bovine embryo culture, and ITS, as a serum substitute, could be used for improving of embryonic development. Also, reduction of NaCl concentration from 114 mM to 90 mM may improve the development of bovine embryos.

(Key words : bovine, embryo, *in vitro* culture, defined medium)

* 서울대학교 수의과대학 (College of Veterinary Medicine, Seoul National University)

서 론

포유동물에서 수정란의 체외배양은 수정란이식, 핵이식, 형질전환동물의 생산 등의 산업적인 목적 혹은 불임의 치료 및 수정란의 생리 연구 등에 필수적인 과제이다. 그러나 수정란을 체외에서 배양할 경우 체내와 다른 환경으로 말미암아 일부 제한된 포유동물에서 수정란의 발육이 정지되는 cell-block 현상을 보인다 (Bavister, 1987). 이러한 현상은 토끼난관 내에서 일시적인 배양 (Boland, 1988), 난관상피세포 (Eyestone과 First, 1989), 난구세포 (Goto 등, 1988), 자궁섬유아세포 (Voekle, 1985), 영양막세포 (Camous 등, 1984) 등과의 공배양을 통하여 극복되어 왔다. 그러나 체세포를 이용한 수정란발육의 향상은 공배양하는 세포들이 과연 수정란에 이로운 물질을 분비하는지 혹은 수정란에 독성이 있는 물질을 대사시키거나 제거하는지에 대한 많은 의문이 제기되어 체세포와의 공배양 없이 발육률을 높이기 위한 방법으로 phosphate 농도의 조절 (Kim 등, 1993), glucose 노출시기 조절 (Matsuyama 등, 1993), 삼투압 (Lim 등, 1994) 및 산소분압의 조절 (Voelkel과 Hu, 1992) 등이 시도되어 왔으며 연구자들간에 선호하는 배양액의 종류도 매우 다양하다 (CR1_{aa}: Rosenkrans와 First, 1991; mTLP: Kim 등, 1993; mSOF: Takahashi와 First, 1992).

내독소를 제거한 고순도의 물과 시약의 사용으로 체세포와의 공배양없이 혈청첨가만으로 체외 성숙 및 체외수정유래 소 수정란의 배양이 가능함이 증명되었고 (Shamsuddin 등, 1993), 혈청의 첨가가 포배강 형성을 향상시킨다는 사실이 보고되어 있다 (Pinyopummintr와 Bavister, 1991). 일반적으로 체세포 배양시 ITS를 첨가하면 혈청의 농도를 10%에서 3~5%로 낮추어도 동일한 효과를 볼 수 있는 것으로 알려져 있다. 마우스 수정란은 배양액내의 NaCl의 농도가 75 mM 이상인 경우 유해한 영향을 받는 것으로 보고되어 있다 (Lawitts와 Biggers, 1992). 또한 Lim 등(1994)은 NaCl의 농도를 89 mM로 낮추어 제조한 배양액을 사용, PVA 첨가, 무혈청 배양체계에서 우수한 배발육률을 보고하였다.

본 실험에서는 단순합성배양액으로서의 최적 배양액의 선정, ITS의 첨가와 BSA의 농도조절 및 NaCl 농도의 조절을 통한 무혈청, 체세포배제 배양체계를 확립하여 소 수정란을 안정적으로 생산하고자 수행되었다.

재료 및 방법

1. 체외성숙

1) 미성숙난자의 채취

완충액으로 25mM의 HEPES가 첨가된 tissue culture medium (TCM) -199 (이하 세정용 TCM 199)을 18 gauge 주사침을 장착한 10 ml 주사기로 흡인, 주사침과 주사기의 내강을 세정한 후 도축장에서 채취한 난소의 소난포(직경 2~5 mm)로부터 난포액과 함께 미성숙난자를 흡인, 채취하였다. 난자를 포함한 난포액을 플라스틱 petridish (100×20 mm, Becton Dickinson Labware, U.S.A.)에 5분간 정치시킨 후 상층액을 제거하였다. 미성숙난자는 난구세포가 치밀하며 2층 이상 부착되어 있고 균일한 난자세포질을 갖는 난자를 선발하였다.

2) 성숙배양

성숙배양에는 4-well plate를 사용하였으며 배양기시 전 각 well에 500 μ l의 성숙배양용 TCM 199을 넣어 전배양하였다. 선발한 미성숙난자는 세정용 TCM 199 배양액으로 3회 세정한 후 10%의 FBS, 15 mM sodium bicarbonate, 2.5 μ g/ml FSH(Antrin[®], Denka Pharm., Japan) 및 1 μ g/ml estradiol (Sigma Co., U.S.A.)가 첨가된 성숙배양용 TCM 199으로 1회 세정하여 well 당 20~50개를 넣어 39°C, 5% CO₂ incubator 내에서 24시간 성숙배양하였다.

2. 체외수정

1) 정자의 swim-up 및 수정능획득

정액은 2두의 한우의 종모우로부터 채취한 동결정액(0.5 ml/straw; 축협 한우개량부)으로 각

종모우의 정액 straw를 1개씩 37℃의 온수에 약 30초간 용해한 후 5 ml의 플라스틱 시험관 (Becton Dickinson Labware, U.S.A.)에 모아 혼합하였다. 실제현미경하에서 용해한 정자의 일부로 운동성을 확인한 후 Pasteur pipette을 이용, 미리 작성한 0.8 ml의 정자배양용 TALP가 들어 있는 8~10개의 플라스틱 시험관 저부에 0.2 ml의 정액을 분주하여 5% CO₂ incubator 내에 1시간 정치시켜 swim-up 처리하였다. 시험관으로부터 상부 0.6~0.7 ml의 상층액을 흡입하여 15 ml의 원심관(Becton Dickinson Labware, USA)에 모은 후 2회 원심, 세정하였으며(600 g, 5분), 혈구계산판으로 정자의 수를 산정하여 정자농도가 50×10⁶ 개/ml가 되도록 정자부유액을 작성하고 동량의 200 µg/ml heparin 용액(Sigma Co., U.S.A.)을 첨가하여 최종 heparin 농도를 100 µg/ml로 맞추고 5% CO₂ incubator내에 15분간 정치함으로써 수정능획득을 유도하였다.

2) 체외수정

정자처리 개시 전 플라스틱 petridish (60×15 mm, Corning Costar Co., U.S.A.)에 수정용 TALP (이하 IVF-TALP; pH 7.8)으로 43 µl의 미소적을 만든 후 mineral oil (Sigma Co., USA)을 도포하여 5% CO₂ incubator내에 정치시켰다. 정자의 swim-up종료와 동시에 (체외성숙 23시간째) 4-well plate로부터 체외성숙난자를 회수하여 세정용 TALP (pH 7.4)로 3회 세정한 후 5~8개의 난자를 3 µl의 배양액과 함께 흡입하여 미리 작성해 둔 수정용 미소적에 주입하여 수정 시까지 5% CO₂ incubator내에 정치시켰다. 수정능획득을 위한 heparin처리를 완료한 정자부유액 4 µl를 미소적에 각각 주입하여 최종정자농도를 2.0×10⁶개가 되도록 하였으며, 5% CO₂ incubator내에서 18시간동안 체외수정하였다.

3. 체외배양

실험설계에 따라 각종 체외배양액을 30 µl씩 미소적으로 작성하였으며 최소한 실험 2시간 전에 전배양하였다. 수정한 난자는 수정 미소적으로부터 세정용 배양액으로 옮겨 가볍게 pipetting하여

난자에 부착되어 있는 정자 및 난구세포를 제거하였으며 작성한 체외배양액의 미소적에 각각 6~10개씩 첨가하여 5% CO₂ incubator내에서 배양하였다. 수정 당일을 0일로 하여 7일째에 수정란을 관찰하여 분할율, 상실배 및 배반포로의 발육률을 산정하였다.

4. 실험 1: 배양액의 종류에 따른 소 수정란의 체외발육률

체외성숙난자를 18시간 동안 체외수정한 후 CR1_{aa}, TALP 및 SOF(Table 1)로 작성한 30 µl의 미소적 내에서 배양, 수정 42시간째에 분할율을 검사하고 배양액의 교환없이 7일간 배양, 치밀상실배 및 배반포로 발육한 수정란의 개수를 산정하였다.

5. 실험 2: 배양액 내 고분자물질원에 따른 소 수정란의 체외발육률

TALP에서 BSA를 제거한 후 배양액 내에 고분자물질을 1) BSA: 8 mg/ml 2) FBS: 10% (v/v) 3) PVA: 0.5 mg/ml의 세 군으로 나누어 첨가, 배양 및 검란을 실시하였다.

6. 실험 3: BSA 및 ITS가 소 수정란의 체외발육에 미치는 영향

배양액으로 사용한 TLP에 ITS solution (Sigma Co, USA)을 1% 농도로 첨가 혹은 첨가하지 않고(최종농도: insulin; 10 µg/ml, transferrin; 5.5 µg/ml, selenium; 5 ng/ml) 고분자물질원으로 각각 BSA (1, 3, 8 mg/ml) 및 PVA (0.5 mg/ml)를 사용한 4가지 배양액을 작성하여 실험 3과 동일한 방법으로 배양 및 검란을 실시하였다.

7. 실험 4: NaCl이 소 수정란의 체외발육에 미치는 영향

기존의 TALP (BSA; 3 mg/ml)의 NaCl 농도를 114 mM에서 90 mM로 낮추고 1% ITS solution을 첨가한 배양액(mTALP; Table 1)으로 소 수정란을 배양하였다. 대조군으로는 ITS첨가 TALP (BSA; 3 mg/ml)를 사용하였다. 배양 및 검란은 실험 3과 동일한 방법에 의하여 실시하였다.

Table 1. Composition of various media for bovine embryo culture *in vitro*

| Component | Units | CR1 _{aa} ^A | SOF ^B | TALP ^C | mTALP ^D |
|----------------------------------|-------|--------------------------------|------------------|-------------------|--------------------|
| NaCl | mM | 114.7 | 107.7 | 114.0 | 90.0 |
| KCl | mM | 3.2 | 7.2 | 3.2 | 3.2 |
| NaHCO ₃ | mM | 26.2 | 25.1 | 25.0 | 25.0 |
| NaH ₂ PO ₄ | mM | - | - | 0.4 | 0.4 |
| KH ₂ PO ₄ | mM | - | 1.2 | - | - |
| Na-lactate (60% syrup) | mM | - | 3.3 | 10.0 | 10.0 |
| HemiCa-lactate | mM | 5.0 | - | - | - |
| Na-pyruvate | mM | 0.4 | 0.3 | 0.5 | 0.5 |
| CaCl ₂ | mM | - | 1.7 | 2.0 | 2.0 |
| MgCl ₂ | mM | - | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| Glucose | mM | - | 1.5 | 1.5 | 1.5 |
| Phenol red | μg/ml | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| BSA ^V | mg/ml | 3.0 | 8.0 | 8.0 | 3.0 |
| EAA ^W | % | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 |
| NEAA ^X | % | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| FBS ^Y | % | 5.0 | - | - | - |
| ITS ^Z | % | - | - | - | 1.0 |

^A Charles Rosenkrans 1 with essential and non-essential amino acids.

^B Synthetic oviduct fluid.

^C Tyrode's with lactate, albumin and pyruvate.

^D Modified Tyrode's with lactate, albumin and pyruvate.

^V Bovine serum albumin (fatty acid free, fraction V).

^W Essential amino acids.

^X Non-essential amino acids.

^Y Fetal bovine serum.

^Z Insulin (10 μg/ml), transferrin (5.5 μg/ml) and selenium (5 ng/ml).

8. 통계학적 분석

실험결과와 통계학적 유의성 검정에는 Chi-square test를 이용하였다.

결 과

1. 배양액의 종류에 따른 소 수정란의 체외발육률

소 수정란의 배양시 CR1_{aa}, TALP 및 SOF를 사용하여 발육률을 검토한 결과, 각각 62.3, 62.0 및 63.3%의 분할율과 17.3, 17.8 및 18.0%의 후기 배로의 발육률을 나타내어 배양액간의 발육률의 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Table 2).

2. 배양액 내 고분자물질원에 따른 소 수정란의 체외발육률

배양액 내의 고분자물질원으로 BSA, FBS 및 PVA를 첨가하여 사용한 결과 BSA 및 FBS 첨가군이 각각 18.4 및 20.3%의 후기배로의 발육률을 보여 PVA 첨가군의 1.6% 보다 유의적으로 높은 발육률을 나타내었다(Table 3, p<0.01).

3. BSA 및 ITS가 소 수정란의 체외발육에 미치는 영향

배양액내의 BSA 농도를 달리하면서(1, 3, 8 mg/ml) 1% ITS를 첨가하여 실험한 결과 BSA의 농도가 증가할수록 후기배로의 발육률이 높았으며 BSA의 농도에 관계없이 ITS를 첨가한 군의 후기배로의 발육률이 높았으나 BSA 1 mg/ml 함유 배양액에서만 ITS첨가에 따른 유의적인 차이가 인정되었다(Table 4; 17.5% : 7.5%, p<0.05).

Table 2. Development of bovine embryos in various culture media

| Media | No. of oocytes | No. of replicates | No.(%) of cleaved oocytes | No.(%) of cMo, BI*/cleaved |
|-------------------|----------------|-------------------|---------------------------|----------------------------|
| CR1 ^{aa} | 130 | 4 | 81(62.3) | 14(17.3) |
| TALP ^b | 163 | 4 | 101(62.0) | 18(17.8) |
| SOF ^c | 158 | 4 | 100(63.3) | 18(18.0) |

* cMo=compacted morulae, BI=blastocysts.

^a Charles Rosenkrans 1 with essential and non-essential amino acids.

^b Tyrode's with lactate, albumin and pyruvate.

^c Synthetic oviduct fluid.

Table 3. Effect of macromolecules on culture of bovine embryos fertilized *in vitro*

| Macromolecules | No. of 2-cell | No. of replicates | No.(%) of cMo, BI* |
|------------------|---------------|-------------------|-----------------------|
| BSA ^A | 201 | 6 | 37(18.4) ^a |
| FBS ^B | 207 | 6 | 42(20.3) ^a |
| PVA ^C | 190 | 6 | 3(1.6) ^b |

* cMo=compacted morulae, BI=blastocysts.

^A Bovine serum albumin(fatty acid free, fraction V).

^B Fetal bovine serum.

^C Poly vinyl alcohol.

^{a,b} Different superscripts in the same column differ significantly (p<0.01).

Table 4. Effects of BSA and ITS on development of early bovine embryos

| Macromolecules | ITS** | No. of 2-cell | No. of replicates | No.(%) of cMo, BI* |
|----------------|-------|---------------|-------------------|-----------------------|
| BSA (1 mg/ml) | + | 120 | 4 | 21(17.5) ^a |
| BSA (1 mg/ml) | - | 120 | 4 | 9(7.5) ^b |
| BSA (3 mg/ml) | + | 120 | 4 | 26(21.6) ^a |
| BSA (3 mg/ml) | - | 120 | 4 | 20(16.7) ^a |
| BSA (8 mg/ml) | + | 151 | 4 | 34(22.1) ^a |
| BSA (8 mg/ml) | - | 151 | 4 | 30(19.9) ^a |
| PVA | + | 172 | 4 | 3(1.7) ^c |
| PVA | - | 149 | 4 | 1(0.6) ^c |

* cMo=compacted morulae, BI=blastocysts.

** Insulin: 10 µg/ml, transferrin: 5.5 µg/ml, selenium: 5 ng/ml

^{a-c} Different superscripts in the same column differ significantly (p<0.05).

4. NaCl이 소 수정란의 체외발육에 미치는 영향

배양액 내의 NaCl 농도를 114 mM과 90 mM로 나누어 소 수정란을 배양한 결과 NaCl의 농도가

90 mM인 군(22.6%)이 114 mM 군(35.8%)에 비하여 유의적으로 높은 후기배로의 발육률을 보였다(Table 5; p<0.05).

Table 5. Effect of NaCl concentration on development of early bovine embryos

| NaCl (mM) | No. of 2-cell | No. of replicates | No.(%) of cMo, BI* |
|-----------|---------------|-------------------|-----------------------|
| 114 | 105 | 4 | 24(22.9) ^a |
| 90 | 123 | 4 | 44(35.8) ^b |

* cMo=compacted morulae, BI=blastocysts.

^{ab} Different superscripts in the same column differ significantly (p<0.05)

고 찰

본 실험에서는 실험자들이 선호하는 세 종류의 배양액으로 각각 소 수정란을 배양해 보았으나 발육률에는 큰 차이를 보이지 않았다. 수정란은 체내와는 달리 액체 내 환경 하에서 자라기 때문에 체내와 완전한 동일한 환경을 유지할 수 없다. 이에 따라 체외에서의 배양환경은 다양하게 변화시킬 수 있으며 특히 이온균형을 맞추기 위한 salt의 경우 다양한 조합을 통하여 적절한 배양체계를 확립할 수 있을 것으로 생각된다.

배양액 내에 첨가하는 혈청은 포배강형성 (Takagi 등, 1991)을 촉진하는 것으로 알려져 있으며 그것은 혈청내의 각종 성장인자 때문인 것으로 추측되고 있다. 그러나 혈청을 첨가할 경우 batch에 따른 차이를 극복할 수 없다는 단점이 있으며 최근의 연구들은 배양액의 고분자물질로 BSA 및 PVA 등을 사용하여 일정수준 이상의 상실배 및 배반포 발생을 가능하게 하고 있다. 일반적으로 BSA가 한정배양액의 규정에 부합되지 않다는 의견이 있으나 순도높은 fatty acid free BSA를 사용할 경우 albumin과 성장인자의 결합력이 상실되기 때문에 미확인인자에 의한 영향이 최소한으로 제한된다는 의견이 있으며(Thompson, 1996), 돼지 수정란 배양시 Fraction V에 비하여 우수한 배발육률을 보인 보고도 있다(Dobrinisky 등, 1996). 실험결과, FBS 및 BSA가 첨가된 배양액에서 치밀상실배 및 배반포로의 발육에는 차이가 없는 것으로 나타났으나 혈청이 포배강 형성 이후 탈출배반포로의 발생에 어떠한 영향을 미칠 수 있는지 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

혈청의 불명확한 작용으로 말미암아 체세포의

배양 시 혈청대체물질로 ITS를 사용하는데 혈청 대신에 ITS를 BSA와 함께 첨가하여 수정란의 배양에 적용한 보고가 있다(Shamsuddin 등, 1994). 본 실험에서는 BSA의 농도를 달리하면서 ITS를 첨가하였는데 BSA의 첨가농도가 증가할수록 발육률이 높았으며 ITS의 첨가 또한 발육률을 개선하는 효과를 가져왔다. 일반적으로 배양액내의 단백질(BSA)은 독성물질과 chelation을 통해 detoxication하는 것이 주된 역할로 알려져 있다(Flood와 Shirley, 1991). ITS는 단독으로 수정란 발생에 영향을 미치는 것이 아니라 단백질 및 탄수화물과 상승작용을 일으키는 것으로 보고되어 있다(Zhang과 Armstrong, 1990). Insulin은 DNA, RNA, 단백질 및 지질의 합성을 촉진하고 세포원형질막, 세포골격, 세포 내 효소 및 핵에서 조절인자로 기능한다(Harvey와 Kaye, 1988). Insulin 효과로 개선된 세포막 및 세포골격은 수정란이 동결될 경우 세포막의 저항성을 증진시키는 역할을 한다. 증가된 glucose 이용 및 단백질 합성은 동결용해과정중의 삼투압 손상에 맞서는데 중요한 역할을 한다. 혈청 내 globulin으로서 transferrin은 중요 역할인 철분결합 및 세포 내로의 이동과 더불어 배양액내 독성 금속을 제거하여 단백질의 독소를 제거하는 역할을 한다(Barnes, 1980). Selenium은 glutathione peroxidase activity를 조절하여 포유류세포의 산화 손상을 막는 역할을 한다. Selenium은 또한 필수영양소로 많은 체세포의 계대배양시 촉진인자로 알려져 있다(Barnes, 1980). 무혈청 배지 내의 ITS는 혈청함유 배양액에 비하여 긴 기간동안 정상세포 형태 및 기능적 분화를 유지한다(Shamsuddin 등, 1994). 이것은 수정란의 생존성 또한 혈청첨가 배양액보다 더 오래 지속될 가능성을 시사한다. 본 실험에서

BSA의 농도를 1 mg/ml까지 낮추었을 때 ITS의 효과가 두드러지게 나타낸 것은 BSA 농도가 감소되면서 나타나는 발육률의 저하를 ITS가 상쇄시킨 것으로 설명할 수 있다. BSA는 금속이온 및 독소와의 chelation에 의한 해독작용뿐만 아니라 수정란에 의해 흡수된 후 분해되어 에너지원 및 아미노산으로 활용되는데(Pemble과 Kaye, 1986) ITS가 이러한 작용을 활성화 시켰을 가능성이 있다. BSA 대신에 PVA를 첨가한 군에서도 ITS 첨가군의 발육률이 높게 나타났으나 전반적인 발육률이 극히 저조하여 ITS가 무단백 배양액 내에서 효과가 있는 지는 확인할 수 없었다. 배양체계의 개선을 통해 무단백 배양액 내에서의 발육률을 일정 수준이상 유지할 수 있다면 ITS가 단백질 혹은 다른 에너지원과 어떻게 상호작용하는 지에 관한 연구가 가능할 것으로 생각된다. 본 실험에서 ITS를 첨가할 경우 BSA가 3 mg/ml 이상 함유되어 있으면 안정적인 후기배로의 발육률을 보여 이후 배양액에 첨가하는 BSA의 농도를 3 mg/ml로 고정하였다.

소 수정란의 배양에 한정배양액을 이용할 경우 NaCl의 농도를 89 mM 정도로 낮추는 것이 발육에 효과적이라는 보고가 있으며(Lim 등, 1994), 마우스에서 높은 삼투압은 수정란의 발육에 유해하다고 알려져 있다(Lawitts와 Biggers, 1992). 본 실험에서 기초배양액으로 1% ITS를 첨가한 TALP (BSA; 3 mg/ml)를 이용하고 배양액내의 NaCl 농도를 114 mM에서 90 mM로 낮추어 수정란을 배양한 결과 후기배로의 발육에 개선효과를 가져왔다. 배양액내의 NaCl 농도를 줄인 후의 삼투압은 265 mOsm 전후였으며 이것은 기존 TALP의 300 mOsm 전후에 비하여 매우 낮은 수준이다. 결과는 제시하지 않았으나 본 실험실의 환경 하에서 삼투압이 280 mOsm 이상이면 발육률이 저하되는 현상을 보였다. 그러나 SOF 등 일반적으로 사용하는 배양액의 삼투압수준이 290~300 mOsm 내외인 것을 감안하면 삼투압에 의한 유해성이 다른 환경적 요인에 의해서 영향을 받았을 가능성도 있다. 예를 들어 Lim 등(1994)은 전술한 논문에서 본 실험에서와 동일한 공기 및 5% CO₂ 환경 하에서 수정란을 배양하였으나 Keskinpeter

와 Brackett (1996)은 5% CO₂, 5% O₂ 및 90% N₂의 환경 하에서 SOF를 사용하여 배양, 후기배로의 높은 발육성적을 보고하였다. 따라서 삼투압과 다른 요인들과의 관계에 관한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

적 요

적정 배양액의 선정, ITS의 첨가와 BSA의 농도조절 및 NaCl 농도의 조절을 통해 소 수정란의 무혈청, 체세포배 배양체계를 확립하기 위하여 수행한 실험에서 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 배양액으로 CRI_{aa}, TALP 및 SOF를 사용하여 발육률을 검토한 결과, 발육률의 유의적인 차이는 나타나지 않았다.
2. 배양액내의 고분자물질원으로 BSA, FBS 및 PVA를 첨가하여 사용한 결과 BSA 및 FBS 첨가군이 PVA 첨가군보다 유의적으로 높은 발육률을 나타내었다(p<0.01).
3. 배양액내의 BSA 농도를 달리 하면서(1, 3, 8 mg/ml) 1% ITS를 첨가하여 실험한 결과 BSA의 농도가 증가할수록 후기배로의 발육률이 높았으며 모든 군에서 ITS 첨가군이 후기배로의 발육률이 높았으나 BSA가 1 mg/ml로 첨가된 군에서만 ITS 첨가에 따른 유의적인 차이가 인정되었다(p<0.05).
4. 배양액내의 NaCl 농도를 114 mM과 90 mM로 나누어 소 수정란을 배양한 결과 90 mM군의 후기배로의 발육률이 114 mM군에 비해 유의적으로 높게 나타났(p<0.05).

참고문헌

- Bavister BD. 1987. Studies on the developmental blocks in cultured hamster embryos. In "The Mammalian Preimplantation Embryo." New York Plenum Press, pp. 219-249.
- Barnes D and Sato G. 1980. Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. Analytical Biochem., 2:255-270.

- Boland MP. 1988. Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriogenology*, 21:126-137.
- Camous S, Heyman Y, Meziou W and Menezo Y. 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer or early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J. Reprod. Fert.*, 72:479-485.
- Dobrinisky JR, Johnson LA and Rath D. 1996. Development of a culture medium (BECM-3) for porcine embryos: Effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on embryo development. *Biol. Reprod.*, 55:1069-1074.
- 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.
- Flood LP and Shirley B. 1991. Reduction of embryotoxicity by protein in embryo culture media. *Mol. Reprod. Dev.*, 26:40-46.
- Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanishi Y and Ogawa K. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in-vitro* fertilization of *in-vitro* matured follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 83:753-758.
- Harvey MB, Kaye PL. 1988. Insulin stimulates protein synthesis in compacted mouse embryos. *Endocrinology*, 122:1182-1184.
- Keskintepe L and Brackett BG. 1996. *In vitro* developmental competence of *in vitro*-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biol. Reprod.*, 55:333-339.
- Kim JH, Niwa K, Lim JM and Okuda K. 1993. Effects of phosphate, energy substrates, and amino acids on development of *in vitro*-matured, *in vitro* fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. *Biol. Reprod.*, 48:1320-1325.
- Lawitts JA and Biggers JD. 1992. Joint effects of sodium chloride, glutamine and glucose in mouse preimplantation embryo culture media. *Mol. Reprod. Dev.*, 46:470-474.
- Lim JM, Okitsu O, Okuda K and Niwa K. 1994. Effects of calf serum in culture medium on development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 41:1091-1098.
- Matsuyama K, Miyakoshi H and Fukui Y. 1993. Effect of glucose levels during the *in vitro* culture in synthetic oviduct fluid medium on *in vitro* development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 40:595-605.
- Pemble LB and Kaye PL. 1986. Whole protein uptake by mouse blastocysts. *J. Reprod. Fert.*, 78:149-157.
- Pinyopummintr T and Bavister BD. 1991. *In vitro*-matured/*in vitro*-fertilized bovine oocytes can develop into morula/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. *Biol. Reprod.*, 45:736-742.
- Rosenkrans CF Jr. and First NL. 1991. Culture of bovine zygote to blastocyst stage: effects of amino acids and vitamins. *Theriogenology*, 35:266.
- 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.
- 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.

- 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.
- Takahashi Y and First NL. 1992. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology*, 37:963-978.
- Thompson JG. 1996. Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology*, 45:27-40.
- Zhang X, Armstrong DT. 1990. Presence of amino acids and insulin in a chemically defined medium in proves development of 8-cell rat embryos *in vitro* and subsequent implantation *in vivo*. *Biol. Reprod.*, 42:662-668.
-
- (접수일자 : 1998. 9. 8/채택일자 : 1998. 12. 4)

