

牛受精卵의 凍結保存에 관한 研究*

II. 凍結保存후 融解卵자의 生存性

金正翊 · 梁富根 · 南相憲 · 李相榮** · 任石基**

高光斗 江原大學校 農科大學

Study on the Freezing of Bovine Embryos.

II. Bovine embryos survival after freezing and thawing

Kim, C. I., B. K. Yang, S. H. Nam, S. Y. Lee, S. K. Yim, and K. D. Goh

College of Agriculture, Kangweon National University

Summary

This experiment was carried out to investigate the morphology of bovine embryos thawed after deep freezing at -196°C and the development of frozen-thawed embryos after in vitro culture in Ham's F-10 medium with 10% NBCS.

The results obtained were summarized as follows:

1. The proportion of embryos which appeared morphologically normal was averaged 77.5% (79/102).
2. The morphologically normal rate of frozen-thawed blastocyst (78.6%) was higher than that of morula (76.7%), but there was no significant difference.
3. Normal development was observed in 20 of 68 embryos cultured for 24-72hr in medium and overall survival rate was 29.4%.
4. Survival rate of blastocyst (33.3%) was higher than that of morula (25.7%).

I. 緒 論

포유동물에서 수정란의 凍結保存은 Whittingham (1971) 등과 Wilmut 등 (1972)에 의하여 mouse 종에서 처음으로 실시되어 實驗動物種을 중심으로 많은 연구가 진행되었다.

한편 Wilmut와 Rowson (1973)은 Whittingham 등 (1971)이 실시한 mouse 受精卵의 凍結法을 소의 受精卵에 응용하여 仔牛생산에 성공하게 되었다. 그후 牛 受精卵의 凍結保存에 관한 연구가 진전되어 외국에서는 실용화의 단계에 있으나, 국내에서는 鄭 등 (1983)과 石 등 (1983, 1984)이 외국에서 동결한 受精卵를 도입하여 국내의 受卵牛에 移植하여 仔牛을 분婣시킨 보고가 있을 뿐이다.

본 실험은 凍結保存한 牛 受精卵의 生存性을 검토하기 위하여 過排卵의 처리후에 人工授精을 실시하여 6~7 일째에 非外科의으로 回收한 受精卵의 發

育段階를 검사하여 形態의으로 정상인 受精卵를 凍結融解後에 體外培養(37°C , 5% CO_2 in air)하여 發育成績을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 受精卵의 凍結保存

牛 受精卵의 凍結方法은 Elsdon과 Seidel (1982) 등의 방법에 준하여 실시하였다. 凍結에 사용된 保存液은 PBS (phosphate buffered saline)에 20%의 新生仔牛血清 (New Born calf serum; NBCS)을 첨가하였다.

본 실험에 사용된 NBCS는 生後 1주일 이내에 건강한 仔牛에서 採取한 血液을 실온에서 2시간 定置한후에 1,500rpm으로 10~15분간 원심분리하여 상층부분을 분리채취, 56°C 에서 30분간 처리하여 -20°C 에서 보존한 非動化 血清을 사용하였다.

* 本研究은 韓國科學材團의 연구비와 三養畜産開發(株)의 協助로 수행되었음.

** 三養畜産開發(株)

凍害防止劑로 Glycerol을 위의 보존액에 3.3%, 6.7% 첨가한 보존액내에서 10분간씩, 10% 첨가액내에서 30분간 受精卵를 배양하여 凍害防止劑의 平衡을 실시하였다. 10% Glycerol의 최종온도에서 30분간 배양한 受精卵를 0.25ml plastic straw내로 옮겨 封入하였다.

受精卵이 封入된 straw는 ethanol bath내로 옮겨 小片의 dry ice의 첨가량을 조절하여 分當 1°C(1°C/min)의 냉각속도로 실온에서 -7°C까지 下降, 植氷(seeding)하여 5분간 定置후에 分當 0.3°C의 냉각속도(0.3°C/min)로 -350°C까지 냉각시켰다. 계속해서 -38°C까지 냉각시킨 후에 -196°C의 액체질소(LN₂)중에 침적하여 1주에서 1개월간 보관하였다.

植氷은 液体窒素 gas(LN₂ gas)로 豫冷시킨 Straw핀셋으로 受精卵이 들어있는 Straw의 외부를 접촉하여 실시하였다.

2. 凍結保存卵의 融解와 檢査

액체질소(LN₂)내에 보존된 Straw내의 受精卵을 37°C의 Water bath내에서 용해(360°C/min)시킨 후에 凍害防止劑의 평형시와는 逆順으로 8.3, 6.7, 5.0, 3.3 및 1.7% glycerol이 첨가된 보존액 내에서 각각 10분간씩 배양한 후에 신선한 보존액(PBS+20% N BCS)로 옮겨 glycerol를 제거하였다.

용해한 受精卵은 신선한 보존액으로 2회이상 세척하여 37°C에서 30분간 定置한 후에 실험현미경으로 형태적 정상성을 검사하였다.

3. 凍結融解卵의 培養

凍結融解卵의 生存性을 검사하기 위하여 形態의 으로 정상인 卵子를 Ham's F-10(Common wealth serum Lab, Australia)에 10%NBCS을 첨가한 배양액과 함께 탄산가스 배양기(37°C, 5%CO₂ in air)내에서 배양하였다. 배양전 受精卵中 상실배는 48~

72시간, 배반포는 24~36시간 배양하여 初期胚盤胞에서 後期胚盤胞의 發育象을 관찰하였다.

III. 結果 및 고찰

1. 凍結融解卵의 形態의 正常性

回收된 受精卵중 형태적으로 正常인 상실배 64個와 배반포 42個, 총 106개를 凍結保存한 후에 融解하여 形態의 정상성을 검사한 결과는 표1과 같다.

融解後에 회수한 102개의 受精卵중 형태적으로 正常인 卵子의 數는 79개로서 正常卵子의 비율은 77.5%였다. 이와같은 成績은 凍害防止劑로 1.5DMSO를 사용하여 4단계 凍結方法으로 -120°C로 凍結하여 -196°C에 보존한 후에 10°C/min의 속도로 용해한 卵子의 정상비율이 70%(7/10)였다는 Willadsen 등(1975)의 성적보다는 다소 상회하고 있으나 1.5M DMSO를 사용하여 0.1~0.3°C/min의 속도로 -30°C~-60°C까지 하강하여 -196°C에 보존한 후에 4°C/min의 속도로 -10°C까지 온도를 상승시킨후, 20°C의 온수에서 용해하여 正常卵子의 비율이 83.0%였다는 Willadsen 등(1978)의 성적에는 미치지 못하였다.

한편 발육단계별 성적에서는 상실배와 배반포기에서 각각 76.7%와 78.6%로서 배반포의 성적이 약간 상회하고 있으나 통계적 유의차는 인정되지 않았다. 이와 같은 성적은 凍害防止劑로 1.0M DMSO를 사용하여 0.06~1.4°C/min씩 하강하여 -196°C에서 12~13일간 보존한 후에 1~4°C/min의 속도로 融解하는 方法으로 排卵후 6~7일째에 採卵한 受精卵의 凍結融解후 正常卵의 비율을 비교 조사한 결과 상실배에서 22.2%(2/9), 배반포에서 73.5%(11/13)였다는 杉江 등(1979)의 성적과 일치하지는 않으나 비슷한 경향을 보였다.

이상의 結果는 본실험에서 凍結時에 사용된 凍害

Table 1. Morphology of frozen/thawed bovine embryos.

Stage of development	No. of eggs frozen	No. of eggs recovered after thawing	Morphology after thawing		
			Intact(%)	Partial damaged(%)	Complete damaged(%)
Morula	64	60	46(76.7)	5(8.3)	9(15.0)
Blastocyst	42	42	33(78.6)	3(7.1)	6(14.3)
Total	106	102	79(77.5)	8(7.8)	15(14.7)

防止劑의 종류와 凍結方法 및 凍結과 融해속도의 차이에 기인된 것으로 생각된다.

2. 凍結融解卵의 培養

凍結保存卵의 生存性を 조사하기 위하여 融解後 形態가 정상으로 판정된 총 68개의 受精卵을 Ham's F-10에 10% 新生仔牛血清(NBCS)을 첨가한 배양액을 사용하여 CO₂Incubator(37°C, 5% CO₂ in air) 내에서 상실배(35개)와 배반포(33개)를 각각 48~60시간 및 24~36시간 배양하여 初期배반포에서 後期배반포(expanded blastocyst)로의 발육상을 조사한 성적은 표 2와 같다.

體外培養한 전체의 受精卵 68개중 正常發育한 卵子數는 20개로서 生存率은 29.4%였다. 이러한 성적은 동일한 方法으로 31~34%의 생존율을 얻었다는 Bondioli(1984)의 보고와는 유사하나, 1.5M DMSO

의 동해방지제와 0.3°C/min의 냉각속도 및 10°C/min의 융해속도로 동결융해한 受精卵을 배양하여 54.3%(28/51)의 발육성적을 얻었다는 Willadsen등(1975)의 성적에는 미치지 못하였다.

한편 발육단계별 생존율은 배반포가 33.3%로서 상실배의 25.7%보다 우수하였다. 이와같은 결과는 8~32세포기의 受精卵을 凍結融解後에 배양했을 때 발육단계가 진전됨에 따라 생존율이 향상(74~82%)되었다는 Kanagawa(1982)의 성적과 발육단계별 凍結融解後 생존율을 비교한 실험에서 배반포의 성적이 상실배기의 성적(20%)보다는 월등하였다는 Lucia cacheiro등(1983)의 보고와 대체적으로 일치하는 경향을 보였다.

본실험의 결과로 볼때 牛受精卵의 凍結保存時 耐凍性은 후기상실배기(32세포기)이후의 受精卵이 우수한 것으로 생각된다.

Table 2. Development of frozen embryos in vitro Ham's F-10 medium with 10% NBCS.

Stage of development	No. of embryos cultured	Development in culture		Percentage of	
		24-36 hrs.	48-60 hrs.	Normal development	degenerate
Morula	35		9	25.7	74.3
Blastocyst	33	11		33.3	66.7
Total	68	11	9	29.4	70.6

IV. 要 約

凍結融解卵의 生存性を 調査하기 위하여 Dulbecco's m-PBS 용액에 glycerol을 10% 첨가한 保存液을 使用하여 冷凍保存한 후에 融해하여 受精卵의 형태학적 정상성을 검사하고, 형태가 정상으로 판정된 受精卵을 Ham's F-10에 10% NBCS를 첨가한 배양액으로 체외배양하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 凍結融解後 회수된 卵子중 형태학적으로 정상인 卵子의 비율은 평균 77.5%(79/102)였다.
2. 발육단계별 성적은 상실배와 배반포기의 胚에서 각각 76.7%와 78.6%로 배반포기의 성적이 우수하였다.
3. 체외배양한 受精卵 68개중 정상발육한 난자수는 20개로서 생존율은 29.4%였다.
4. 발육단계별 생존율은 배반포기가 33.3%로서 상실배의 25.7%보다 높았다.

引用 文 献

1. Bondioli, K.R., C.B. Brunson, C.R. Looney and J.M. Massey 1984. In vitro survival of bovine embryos frozen in media supplemented with new-born calf serum or bovine serum albumin. *Theriogenology*, 21:223 (abstr.)
2. Elsdon, R.P. and G.E. Seidel, JR. (1982) Embryo transfer procedure for cattle. Colorado state Univ. Exp. Station in cooperation with Ani. Reprod. *Lad. General series*, 1011.
3. Kanagawa, H. (1982) Short-term preservation of bovine embryos. In: *In vitro fertilization and embryo transfer.* (ed. E.S.E. Hafez., K. Semn) International medical publishers, pp.343-347.
4. Lucia, C., R. Gerlach, N. Cacheiro and L. Mac. Propsey(1983) Bovine embryo survival after freezing and thawing. *Theriogenology*, 19(1):116

(26str.)

5. Whittingham, D.G. (1971) Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature (Lond)*, 233:125-126.
6. Willadsen, S.M., C. Polge and L.E.A. Rowson (1978) The viability of deep frozen cow embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 52:391-393.
7. Willadsen, S., A.O. Trounson, C. Polge, L.E.A. Rowson and R. Newcomb (1975) Low temperature preservation of cow eggs. In: Egg transfer in cattle (ed. L.E.A. Rowson) Commission of the European Communities. pp. 117-124.
8. Wilmut, I. (1972) Effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sci.*, 11:1071-1079.
9. Wilmut, I. and L.E.A. Rowson (1973) Experiment on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.*, 92:686-690.
10. 杉江等(1979) 牛の凍結保存卵移植試験, 日本家畜繁殖誌, 25卷4號 203-205.
11. 石湖峰, 李光源, 申浴植, 金浩重, 高潤衍, 吳大均, 池高夏, 任景淳, 알피에스텐(1983)소의凍結受精卵의 受胎에 미치는 영향. I. 글리세롤浮遊液에 의한 6段階平衡의 影響. 韓畜誌, 25(4): 369-374
12. 石湖峰, 李光源, 吳成龍, 孫東秀, 尹忠根, 金浩重, 趙潤衍, 吳大均, 池高夏, 任景淳, 지디미론(1984)소의凍結受精卵이 受胎에 미치는 영향. III. 5段階浮遊에 의한 글리세롤除去卵의外科的移植에 영향. 韓畜誌, 26(5): 429-434.
13. 鄭吉生, 李勳澤, 鄭柄鎬, 柳承煥, 羅鎮洙(1983)受精卵移植에 의한 牛의 雙胎誘起에 관한 研究. I. 性腺刺戟호르몬의 投與에 대한 卵巢反應에 影響을 미치는 要因. 韓畜誌, 25(3): 205-209.
14. Shea. B.R., D. Hines., D.E. Lightfoot., G.W. Ollis and S.M. Olson 1976. The transfer of bovine embryo. In: Egg transfer in cattle. (ed. L.E.A. Rowson) Commission of the European Communities, Luxembourg. EUR 5491. pp.145-152.
15. Sreenan, J.M. (1983) Method of consistent supply, recovery and transfer of embryos in cattle. In: Strategies for the most efficient beef production. Proc. Intern. Sym. Prod. Kyoto Japan, pp.197-212.
16. Sreenan, J.M., D. Beehan and P. Malvehill (1975) Egg transfer in the cow. Factors affecting pregnancy and thawing rates following bilateral transfers. *J. Reprod. Fert.*, 44:77-85.
17. Testart, J. and C. Godard-siour (1975) Recovery of uterine eggs in cow by transvaginal routes. Luxembourg, pp.93-98.
18. Warwick, B.L. and R.O. Berry (1949) Intergenic and intra specific embryos transfer. *J. Hered.*, 40:297.
19. Warwick, B.L., R.O. Berry and W.R. Horlacher (1934) Result of mating rams to Angora female goats. Proc. 27th. Ann. Meet Amer. Soc. Anim. Prod., pp.225-227.
20. Willet, E.L., W.G. Black., L.E. Casida, W.H. Stone and D.J. Bucker (1951) Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science.*, 113:247.
21. 高光斗, 鄭吉生, 李基萬(1981) 韓牛의 受精卵移植에 관한 研究. I. G. TH單獨投與에 의한 韓牛의 雙胎誘起, 韓畜誌, 23(4): 315-321.
22. 具滋弘, 鄭量國(1982) 젓소의 非手術的 受精卵回收 및 移植試驗. 大韓獸醫師會誌, 18: 45-82.
23. 任景淳, 李用武, 鄭丘敏(1983) 소에 있어서 非外科的方法에 의한 受精卵의 採卵技術開發에 관한 研究. 韓畜誌, 25(3): 244-254.
24. 鄭吉生, 李勳澤, 鄭柄鎬, 柳承煥, 羅鎮洙(1983)受精卵移植에 의한 牛의 雙胎誘起에 관한 研究. I. 性腺刺戟호르몬의 投與에 대한 卵巢反應에 影響을 미치는 要因. 韓畜誌, 25(3): 205-209.