

가토 수정란의 단기 체외보존에 관한 연구

문 승 주

전남대학교 농과대학

Short Term *In Vitro* Preservation of Embryos in Domestic Rabbit

Moon, S. J.

College of Agriculture, Chonnam National University

SUMMARY

This experiment was performed to develop simple practical methods for short term preservation of rabbit embryos. A total of 55 cross bred does were superovulated by intramuscular injection of PMSG and HCG. Embryos were recovered at 25~30 hrs, 60~65 hrs and 80~85 hrs after mating and selected by morphological examination. Four cell stage, morulae and blastocyst embryos were stored in PBS enrich with 1, 10, 20 and 40% heat-treated FCS at 4, 20, 30 and 37°C, respectively. Embryos were examined morphologically at 24, 48 and 72 hrs following storage. The result obtained in this experiment were summarized as follows:

The superovulation was induced by PMSG 200 IU and HCG 100 IU. The average number of ovulation points and embryos recovered by collection time were 19.0, 15.6(25~30 hr), 17.3, 13.5 (60~65 hr) and 19.2, 14.4(80~85 hr), respectively.

And recovery rates of embryos recovered at 25~30 hr, 60~65 hr and 80~85 hr after mating were 82.1%, 75.0% and 72.7%, respectively. Developmental stage of embryos recovered at 25~30 hr, 60~65 hr and 80~85 hr after mating were 62.8%(4 cell), 84.7%(morulae) and 79.6%(blastocyst), respectively.

On the other hand, the average number of ovulation points collected by the no. of operations for the repeated collection was 17.3(60~65 hr), 19.2(80~85 hr) in 1st and 9.4(60~65 hr), 10.6 (80~85 hr) in 2nd surgery, respectively. There was a significant decrease($P<0.05$) in the number of ovulation points the 2nd surgery as compared to the 1st surgery.

All of the 4-cell stage embryos stored at 4°C for 48 hrs showed the same morphology through the storage period, on the contrary, 4-cell stage embryos stored at 20°C and 30°C for 48 hrs showed degeneration embryos and stored at 37°C for 24 hrs showed degeneration embryos. Morulae and blastocyst stored at 4, 20, 30 and 37°C for 24 hrs showed degeneration embryos. All of the blastocyst stored at 37°C for 72 hrs showed degeneration embryos.

(Key-Word : rabbits, embryos, *in vitro* preservation)

*본 연구는 1991년도 한국과학재단 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

I. 서론

근래 가축의 번식효율과 생산성을 높이고 폐쇄집단 내 새로운 유전인자를 안전하게 도입할 수 있는 효율적인 가축개량을 위하여 수정란이식이 산업적 기술로 개발 발전되면서 수정란의 체외 보존방법이 중요한 문제로 제기되고 있다.

수정란을 단순처리하여 장기간 보존할 수 있다면 필요시 수란축에 이식시킬 수 있어 발정동기화 과정이 불필요하므로 경제적으로도 유리할 것이다. 수정란 보존방법중 동결보존방법은 후대검정시 세대간격을 단축시켜 주며(Whittingham, 1971), 모체효과를 규명할 수 있고 유전형질의 보존(Whittingham, 1974)과 장거리 수송을 가능케 하는 등 많은 장점이 있으나 동결처리에 의한 수정란의 손실, 동결융해시에 소요되는 시간과 경비, 동결융해 절차의 복잡성 및 수태율 저하 등 개선되어야 할 많은 문제점이 있는 것으로 지적되고 있다. 지금까지 수정란을 체외보존하는데 영향을 미치는 보존온도(Chang, 1948a; Maurer 등, 1970; Lawson 등, 1972; Pope와 Day, 1977; James 등, 1980; Yang, 1990), 보존액(Hafetz, 1963; Brinster, 1968; Bavister 등, 1983; Kameyama 등, 1990), 산소농도(Joseph, 1968), 대기압(Elliott 등, 1974) 및 수소이온농도(Kane, 1974) 등에 관한 다양

한 연구가 있었으나 수정란이식기술을 실용화 하기 위해서는 보다 간편한 체외 보존 방법의 개발이 요구되고 있다.

수정란을 체외 보존하는데는 보존온도 및 보존액이 중요한 요인으로 지적되고 있다. 따라서 본 연구는 수정란을 단기간 보존할 수 있는 실용적인 방법을 찾기 위하여 수정란의 발달단계에 따라 보존온도 및 보존액 중 FCS(fetal calf serum) 첨가수준이 가토 수정란의 단기체외보존에 미치는 영향을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험기간 및 장소

본 시험은 1991년 4월부터 1992년 1월까지 전남대학교 농과대학 부속동물사육장 및 실험실에서 실시하였다.

2. 공시동물 및 사양관리

공시동물은 캘리포니아종과 일본 백색종간의 교잡종 가토 60두(♂5, ♀55)를 토상(45cm × 45cm × 45cm)에 1두씩 수용하여 사육하였으며 사료는 청초와 알팔파 펠렛 사료를 급여하였고 음수는 자유롭게 마시게 하였다.

3. 시험방법

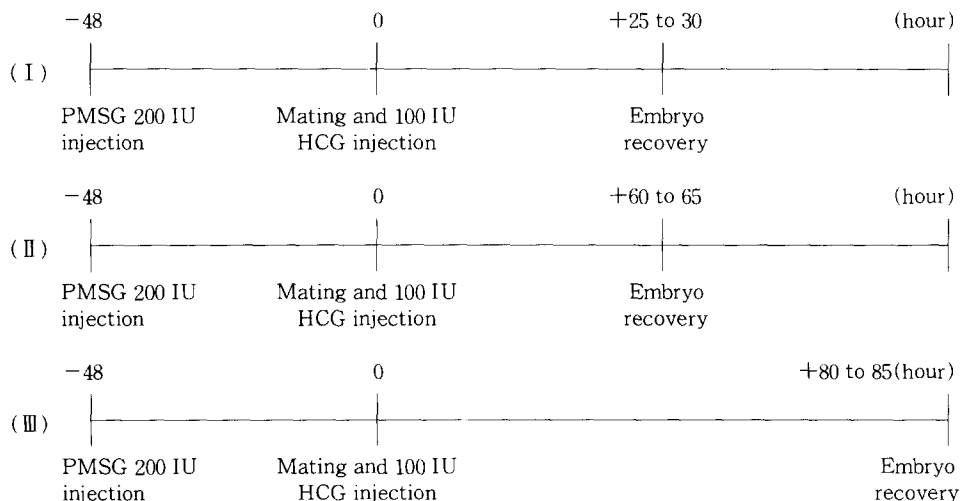


Fig. 1. Induction of superovulation and embryo recovery in donors

1) 다배란유기

다배란 유기처리, 교배 및 수정란 회수는 Fig. 1에 제시한 바와 같이 교배전 48시간에 PMSG(三共社, 日本) 200IU를 1회 근육주사하고 2회 이상 반복 자연 교배를 실시함과 동시에 HCG(三共社, 日本) 100IU를 1회 정맥주사하여 배란을 촉진한 후 수정란의 발달 단계가 4세포기(I), 상실배(II), 배반포배(III)인 난을 각각 교배후 25~30시간, 60~65시간, 80~85시간 사이에 회수하였다.

2) 수정란 회수

(1) 관류액 및 보존액

수정란 회수용 관류액은 Table 1에 제시한 Modified Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS, Seidel 등, 1980)에 56℃ 수온에서 30분간 비동화 처리된 fetal calf serum(FCS)을 1% 수준으로 첨가하고 pH 7.2~7.4로 조종하여 사용직전에 0.2 μ m membrane filter로 여과하였다. 수정란의 체외보존액은 PBS에 각 시험구별로 FCS를 1%, 10%, 20%, 40% 첨가하여 사용하였다.

(2) 수정란 회수 및 검사

체중 kg당 Strensil(Janssen pharmaceutica /Beerse /Belgium) 0.2 ml를 근육주사하여 예비마취하고 체중 kg당 Hypnodil(Janssen pharmaceutica /Beerse /Belgium) 0.6 ml를 복강내에 주입하여 본 마취를 실시한 후 복복 수술하여 채란하였다. 수

정란 회수용 관류액은 37℃로 가온 사용하였으며 90배의 실체 현미경하에서 형태학적으로 정상인 수정란을 선별하여 관류액으로 2~3회 세척한 다음 직경 3.5 cm인 조직배양 접시에 옮겨 각 시험구별로 배치하였다. 수정란의 형태적 검사는 미수정란, 난할단계, 난할구의 형태, 분할구의 난황상태 및 색조, 투명대 및 난황막의 이상 유무(Joseph 등, 1981; Shea, 1981; Elsdon 등, 1982) 등을 고려하여 평가하였다.

(3) 수정란의 보존

보존온도가 각각 4℃, 20℃, 30℃ 및 37℃에서 보존액중 FCS 첨가수준이 각각 1%, 10%, 20%, 40%로 조성된 4개의 시험구(Table 2)에 4세포기, 상실배,

Table 1. Composition of flushing medium*

Component	Amount (g)
CaCl ₂	0.1
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.1
NaCl	8.0
KCl	0.2
Na ₂ HPO ₄	1.15
KH ₂ PO ₄	0.2
Glucose	1.0
Na pyruvate	0.036
Streptomycin sulphate	0.05
Na penicillin G	100,000 units
Distilled water	1,000 ml

* Modified Dulbecco's phosphate buffered saline

Table 2. The experimental design

Temperature (°C)	Cell stage	No. of embryos examined by FCS concentration			
		1%	10%	20%	40%
4	4 cell	15	15	15	15
	Morulae	15	17	18	16
	Blastocyst	18	16	17	15
20	4 cell	15	15	15	15
	Morulae	16	17	16	19
	Blastocyst	15	15	17	14
30	4 cell	15	15	15	15
	Morulae	17	16	18	15
	Blastocyst	14	14	17	15
37	4 cell	15	15	15	15
	Morulae	17	18	18	19
	Blastocyst	17	15	16	15

배란포기배를 직경 3.5cm인 조직배양 접시에 옮겨 보존하였으며 보존후 24시간 간격으로 보존개시시의 수정란의 상태와 비교 검토하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 다배란 유기 성적

교배후 채란시간에 따른 공시가토의 배란수 및 수정란 회수율은 Table 3, 4, 5에 제시하였다.

Table 3에 제시한 바와 같이 교배 25~30시간후 수정란 회수시 공시가토의 평균배란점은 좌우 난소에서 각각 9.36, 9.64개, 평균 회수 수정란수는 15.6개였으며 회수율은 82.1%였다. 이러한 결과는 Tsutsumi 등(1980)이 가토에 다배란처리 결과 평균회수 수정란수가 36.2~42.2개였다는 보고보다는 상당히 낮았으나 김 등(1988)이 가토에 PMSG 투여 수준을 달리하여 다배란처리 결과 PMSG 200 IU를 투여했을 때 평균 배란점은 16.2개 평균회수 수정란수는 13.1개였다고

한 보고와 비교할 때 본 시험의 결과가 다소 높게 나타났다.

또한 교배후 각각 60~65시간과 80~85시간에 회수한 공시가토의 배란수와 회수율은 Table 4와 5에 제시한 바와 같이 평균 배란점은 교배후 60~65시간에 회수시 좌우 난소에서 각각 8.07개, 9.20개 평균 회수 수정란수는 13.5개, 회수율은 73.9%였고 교배후 80~85시간에 회수시는 평균배란점이 좌우 난소에서 각각 9.13개, 10.07개, 평균회수 수정란수는 14.4개, 회수율은 74.3%였다. 한편 30~40일 간격으로 반복 채란을 위하여 1차와 2차 수술에 의한 회수성적은 교배후 60~65시간과 80~85시간에 회수시 2차 수술시는 평균 배란점이 좌측 난소에서 4.47개와 4.73개 우측난소에서 4.93개와 5.33개 회수율은 69.1%와 67.5%로 1차 수술에 의한 회수성적보다 유의적($P < 0.05$)으로 낮게 나타났다.

이러한 결과는 한(1984)이 반복 과배란을 위하여 17일과 30일 간격으로 PMSG와 HCG를 투여하여 조

Table 3. Number of ovulation point and embryo recovered at 25~30 hr after mating

No. of does	No. of ovulation point		Recovered embryos	
	Left ovary	Right ovary	No. of embryos recovered	Recovery rate (%)
25	9.36±1.89*	9.64±1.58	15.6±1.24	82.1

* Mean±SE

Table 4. Number of ovulation point and embryo recovered at 60~65 hr after mating

No. of does	No. of recovery	No. of ovulation point		Recovered embryos	
		Left ovary	Right ovary	No. of embryos recovered	Recovery rate (%)
15	1st	8.07±1.23 ^{*a}	9.23±1.52 ^a	13.5±1.38 ^a	78.2 ^a
	2nd	4.47±1.57 ^b	4.93±1.73 ^b	6.5±1.92 ^b	69.1 ^b

* Mean±SE

a,b : means with different superscript significantly differ ($p < 0.05$)

Table 5. Number of ovulation point and embryo recovered at 80~85 hr after mating

No. of does	No. of recovery	No. of ovulation point		Recovered embryos	
		Left ovary	Right ovary	No. of embryos recovered	Recovery rate (%)
15	1st	9.13±1.22 ^{*a}	10.07±1.09 ^a	14.4±1.04 ^a	74.3 ^a
	2nd	4.73±1.33 ^b	5.33±1.15 ^b	6.9±1.32 ^b	67.5 ^b

* Mean±SE

a,b : means with different superscript significantly differ ($p < 0.05$)

사한 결과 1차 배란때 배란수는 평균 22.1개였으며 17일 간격으로 투여한 경우 2차 반복 과배란시 7.0개, 30일 간격으로 투여한 경우 2차 반복 과배란시는 13.4개로 유의적($P < 0.05$)으로 적었다는 보고와 Maurer 등(1968)이 가토에 16주 간격으로 반복 과배란을 위한 실험에서 FSH-LH 병용 투여시는 1차에서 평균 배란수가 46.5개였으며 3차에서는 25.2개로 크게 감소하였고, PMSG-HCG 병용 투여시 1차에서는 평균 배란수가 13.6개, 2차에서는 5.7개로 감소율이 FSH-LH 병용 투여시보다 훨씬 컸다고 한 보고와 일치하는 경향이었다.

이와 같이 반복 수술시 배란수의 감소 원인은 동일 호르몬 제제의 연속투여에 따른 체내의 항체 형성(Lubbadech 등, 1980), 수정란의 채란과정에서 발생할 수 있는 난소의 유착 및 손상(Willet 등, 1953)과 반복투여에 따른 난소내 난포수의 감소(Maurer와 Foote, 1971) 등에 있는 것 같다. 공시가토에서 교배 후 시간의 경과에 따라 회수한 수정란의 발달단계는 Table 6에 제시하였다. 본 시험에서 채란한 수정란의 발달단계는 교배후 25~30시간에 회수한 것은 62.7%가 4세포기였고 교배후 60~65시간에 회수한 것은 상실배가 84.7%로 대부분이었고 교배후 80~85시간에 회수한 것은 배반포배가 79.6%로 다수 회수되었다.

이러한 결과는 회수 수정란의 대부분이 교배후 2.5일에 회수시 상실배, 3.5일에 회수시는 배반포배였다는 Adams(1958), Betteridge(1977), Hodgson과 Pauerstein(1976) 등의 보고와 유사하였다. 본 시험

의 결과로 보아 가토에서 상실배를 채란할 때는 교배 후 60~65시간에 배반포배는 교배후 80~85시간에 채란하는 것이 가장 효과적이라고 생각된다.

2. 수정란 보존 성적

회수된 가토 수정란을 보존온도와 보존액에 첨가한 FCS농도별로 보존한 성적은 Table 7, 8, 9에 제시하였다. Table 7에 제시한 바와 같이 4세포기 공시란을 4℃에서 형태적으로 검사한 성적은 공시란의 형태가 보존개시시와 동일하게 유지되었으나 보존 72시간째에는 정상란이 11~12개(73.3~80.0%)로 생존율의 감소가 관찰되었으며 20℃에 보존한 성적은 보존개시 48시간째에 생존율이 73.3~80.0%, 72시간째에는 40.0~60.0%로 급격한 감소를 보였다.

30℃와 37℃에서는 보존개시 24시간부터 변성란이 관찰되었으며 72시간째에는 정상란이 각각 3~25개와 2~3개로 급격한 감소를 보였다. 한편 37℃에 보존할 경우 보존시간이 경과함에 따라 8세포기와 16세포기 등으로 난할이 일어남을 관찰할 수 있었다. Chang(1948b)이 2세포기 가토 수정란을 37℃에서 72시간 보존했을 때 급속한 생존율의 감소를 보였고 가토수정란을 37℃에서 보존하여 보존시간이 경과함에 따라 서서히 생존율이 감소하였고 96시간 이후에 생존하지 않았다(Adams, 1970)는 보고와 Chang(1948a)이 토끼 난자를 체외성숙시킨 실험에서 38℃에 배양한 후 5℃에서 24시간, 48시간, 72시간 보존하여 정상적으로 난할을 보인 난이 각각 78.3%, 66.2%, 54.2%였으며

Table 6. Developmental stage of embryos

Collection time(hr)	No. of		Recovery rate(%)	No. of embryos by developmental stage(%)	
	Ovulation point	Embryos recovered			
25~30	475	390	82.1	1~2 cell	124 (31.8)
				4 cell	245 (62.8)
				8 cell	21 (5.4)
60~65	400	300	75.0	degenerated	46 (15.3)
				Morulae	254 (84.7)
				Blastocyste	0 (0.0)
80~85	439	319	72.7	degenerated	47 (14.7)
				Morulae	18 (5.6)
				Blastocyste	254 (79.0)

Table 7. Effect of temperature and FCS concentration on storage *in vitro* of rabbit 4-cell embryos

Storage temperature (°C)	FCS concentration (%)	No. of embryos stored	Morphologically normal embryos by storage time(hr)		
			24	48	72
			%	%	%
4	1	15	15(100)	15(100)	11(73.3)
	10	15	15(100)	15(100)	11(73.3)
	20	15	15(100)	15(100)	11(73.3)
	40	15	15(100)	15(100)	12(80.0)
20	1	15	15(100)	11(73.3)	6(40.0)
	10	15	15(100)	12(80.0)	7(46.7)
	20	15	15(100)	13(80.7)	6(60.0)
	40	15	15(100)	12(80.0)	7(53.3)
30	1	15	12(80.0)	9(60.0)	3(20.0)
	10	15	12(80.0)	6(40.0)	4(26.7)
	20	15	12(80.0)	10(66.7)	5(33.3)
	40	15	12(80.0)	9(60.0)	4(26.7)
37	1	15	11(73.3)	8(75.3)	2(13.3)
	10	15	13(80.0)	8(75.3)	3(20.0)
	20	15	12(73.3)	9(60.0)	2(13.3)
	40	15	13(80.0)	9(60.0)	3(20.0)

Table 8. Effect of temperature and FCS concentration on storage *in vitro* of rabbit morulae

Storage temperature (°C)	FCS concentration (%)	No. of embryos stored	Morphologically normal embryos by storage time(hr)		
			24	48	72
			%	%	%
4	1	15	13(86.7)	9(60.6)	7(46.7)
	10	17	15(88.2)	10(58.8)	8(47.1)
	20	18	15(83.3)	11(61.1)	8(44.4)
	40	16	14(87.5)	10(62.5)	7(43.8)
20	1	16	13(81.3)	8(50.0)	5(31.3)
	10	17	15(88.2)	8(47.1)	6(35.3)
	20	16	13(81.3)	7(43.8)	5(31.3)
	40	19	15(78.9)	8(47.4)	6(31.6)
30	1	17	13(76.5)	5(29.4)	2(11.8)
	10	16	12(75.0)	6(37.5)	2(12.5)
	20	18	14(77.8)	6(33.3)	2(11.1)
	40	15	11(73.3)	5(33.3)	2(13.3)
37	1	17	12(70.6)	4(23.5)	0(0.0)
	10	18	13(72.2)	5(27.8)	1(5.6)
	20	18	13(72.2)	5(27.8)	1(5.6)
	40	19	14(73.7)	5(26.3)	1(5.3)

Table 9. Effect of temperature and FCS concentration on storage *in vitro* of rabbit blastocyst

Storage temperature (°C)	FCS concentration (%)	No. of embryos stored	Morphologically normal embryos by storage time(hr)		
			24	48	72
			%	%	%
4	1	19	13(68.4)	9(47.4)	8(42.1)
	10	16	12(75.0)	8(50.0)	7(43.8)
	20	17	13(76.5)	8(47.1)	7(41.2)
	40	15	11(73.3)	8(53.3)	7(46.7)
20	1	15	11(73.3)	6(40.0)	4(26.7)
	10	15	11(73.3)	7(46.7)	4(26.7)
	20	17	13(76.5)	7(41.2)	5(29.4)
	40	14	10(71.4)	6(57.1)	4(28.6)
30	1	14	9(64.3)	4(28.6)	1(7.14)
	10	14	10(71.4)	5(35.7)	1(7.14)
	20	17	12(70.6)	5(29.4)	2(11.8)
	40	15	10(66.7)	5(33.3)	1(6.7)
37	1	17	9(52.9)	3(17.6)	0(0)
	10	15	8(53.3)	3(20.0)	0(0)
	20	16	9(56.3)	3(18.8)	0(0)
	40	15	8(53.3)	3(20.0)	0(0)

20℃에서 보존하여 각각 37.2%, 10.0%, 0%였다는 보고들과 보존시간이 경과함에 따라 변성란이 현저하게 증가한 본 실험의 결과와 비교할 때 대체로 유사한 경향이였다.

가토 수정란의 발달단계가 상실배인 공시란을 보존한 성적은 Table 8에 제시한 바와 같이 보존 24시간째부터 변성란이 관찰되어 생존율이 4℃에서 43.8~47.1%, 20℃에서 78.9~88.2%, 30℃에서 73.3~77.8%, 37℃에서 70.6~73.7%로 보존온도가 증가함에 따라 변성란의 수도 증가하였으며 보존 72시간째는 생존율이 4℃에서 43.8~47.1%, 20℃에서 31.3~35.6%, 30℃에서 11.1~13.5%, 37℃에서 0~5.6%로 보존시간이 경과함에 따라 변성란의 수가 급증하였다.

Linder 등(1983)이 소 상실배를 4℃에서 48시간 보존하여 31% 생존율을 얻었으며, Kasai 등(1981)이 생쥐 상실배를 20℃에서 24시간, 48시간, 72시간 동안 PBS에 보존하여 각각 80%, 30%, 10% 정도가 정상으로 발달하였으며 Boland(1984)가 소 상실배를 2~3일동안 토끼 난관에 저장한 후 86%의 정상 수정란을 회수하였으며, Mark 등(1982)이 가토 상실배를

4℃에서 7일, 10일, 14일, 15일동안 보존한 후 37℃에서 배양하여 정상란이 각각 76%, 45%, 44%, 28%였다고 보고하였는데 이들 보고내용이 공시동물과 보존액 등이 다르지만 수정란의 보존성적으로 보아 본 실험의 결과와 유사하였다.

Trounson등(1976)은 소 수정란을 PBS에 FCS 20%를 첨가한 배양액에 24시간과 48시간동안 배양하여 각각 82%와 62%의 생존율을 얻었는데 이는 본 시험에서 보존 48시간째에 변성란의 출현이 더욱 증가된 결과와 일치되는 경향이였다.

한편 가토 수정란의 발달단계가 배반포배인 공시란을 보존한 성적은 Table 9에 제시하였다. Table 9에서 보는 바와 같이 보존 24시간째부터 보존온도와 상관없이 변성란이 관찰되었는데 37℃에서 72시간째 보존했을시는 FCS 첨가농도에 관계없이 정상란을 관찰할 수 없었으며 대체적으로 상실배 보존성적보다 보존온도와 보존시간에 따라 생존율이 낮은 편이였다.

Linder 등(1982)은 소 배반포를 4℃에서 24시간, 48시간, 72시간 보존하여 각각 77%, 55%, 53%의 생존율을 얻었는데 본 실험의 결과보다 생존율은 높았으

나 보존시간에 따른 생존율의 감소 경향은 유사하였다. 또한 Bon Durant 등(1981)도 소 배반포를 4℃에서 PBS에 FCS 10% 첨가된 보존액에 48시간 보존하여 32%의 생존율을 얻었으며, Chang(1950)이 토끼 배반포를 0℃와 10℃에서 24시간동안 보존하여 각각 97%와 9%, 48시간동안 보존하여 각각 64%와 13%의 생존율을 얻었다고 하였다. 한편 본 실험에서 수정란의 발달단계별 FCS 농도에 따른 큰 차이를 볼 수 없었는데 이것은 Linder 등(1983)과 Kameyama 등(1990)이 보고한 내용과 유사하였다.

본 실험의 결과를 종합하면 공시란을 보존하여 형태적으로 정상란이라고 관찰된 난을 수란가토에 이식하여 수태성적을 확인하지 않았기 때문에 정확한 수정란의 생존 여부는 알 수 없었으나 4세포기 수정란은 4℃에서 48시간동안 보존하여도 변성란의 출현이 없었고 공시란의 발달단계별 보존성적은 전반적으로 4세포기에서 배반포배로 갈수록 변성란의 출현율이 높았으며 37℃에서 보존할 때 변성란의 출현율이 가장 높았다. 또한 보존온도별로 보아 FCS의 첨가수준에 따른 큰 차이를 발견할 수 없었다.

IV. 적 요

본 실험은 수정란을 실험적으로 체외에서 단기간 보존할 수 있는 방법을 찾기 위하여 교잡종 가토 55두에 PMSG와 HCG를 병용투여하여 다배란을 유기한 후 수정란의 발달단계별로 회수한 가토 수정란을 보존온도, 보존시간 및 보존액중 FCS첨가 준에 따라 수정란의 형태적 검사를 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

PMSG를 투여하여 교배 25~30시간 후 수정란 회수시 공시가토의 평균배란점은 19.0개, 회수난자수는 15.6개, 60~62시간후 회수시는 평균배란점이 17.3개, 회수난자수는 13.5개, 80~85시간후 회수시는 평균배란점이 19.2개, 회수난자수는 14.4개였다. 교배 25~30시간후에 회수시 회수율은 82.1%였으며 62.8%가 4세포기였고 60~65시간후 회수시 회수율은 75.0%였으며 84.7%가 상실배였고 80~85시간후에 회수시 회수율은 72.7%였으며 79.6%가 배반포배였다. 반복채란을 위하여 두 차례의 수술에 의한 회수 성적은 교배 60~65시간에 회수시 평균 배란점은 1차에서 17.3개, 2차에서 9.4개, 교배 80~85시간에 회수시

1차에서 19.2개, 2차에서 10.6개로 1차 회수시에 비하여 유의적으로 적었다($P < 0.05$).

4세포기 초기배를 4℃에서 48시간 동안 보존한 결과 공시란 모두가 시험개시시의 형태와 동일하였으며 20℃에서는 보존 48시간에, 30℃와 37℃에서는 보존 24시간에 변성란이 나타났다. 가토 상실배와 배반포배를 보존한 결과 보존 24시간부터 변성란이 나타났으며 배반포배의 경우 37℃에서 72시간 동안 보존한 결과 공시란 모두가 변성란으로 나타났다.

V. 引用文獻

1. Adams, C.E. 1970. The development of rabbit eggs after culture *in vitro* for 1-4 days. J. Embryol. Exp. Morphol., 23:21-34.
2. Adams, C.E. 1958. Egg development in the rabbit : the influence of the post coital ligation of the utrine tube and a ovariectomy. J. Endocrin., 16:283.
3. Bavister, B.D., M. Lorraine Leifried and Gay Liberman. 1983. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. Bio. of Reprod., 28:235-247.
4. Betteridge, K.J. 1977. Embryo transfer in farm animals : A review of techniques and applications. Canada Department of Agriculture Monograph, No. 16.
5. Boland, M.P. 1984. Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. Theriogenology, 21:126-135.
6. Bon Durant, R.H., G.B. Anderson., M. Boland., P.T. Cupps and M.A. Hughes. 1982. Pregnancy rates and embryo survival following transfer of bovine embryos stored at 4℃. Theriogenology, (15)1:112.
7. Brinster, R.L. 1968. Effect of glutathione on the development of two-cell mouse embryos *in vitro*. J. Reprod. Fert., 17:521-525.
8. Chang, M.C. 1950. Transplantation of rabbit blastocysts at late stage: Probability of nor-

- mal development and viability at low temperature. *Science*, (111):544-545.
9. Chang, M.C. 1948a. The effects of low temperature on fertilized rabbit ova *in vitro*, and the normal development of ova kept at low temperature several days. *J. Gen. Physiol.*, 31:385.
 10. Chang, M. C. 1948b. Transplantation of fertilized rabbit ova : The effect on viability of age, *in vitro* storage period, and storage temperature. *Nature London*, 161:978-979.
 11. Elliot, D.S., Maurer, R.R. and Staphes, R.E. 1974. Development of mammalian embryos *in vitro* with increased atmospheric pressure. *Bio. Reprod.*, 11:162-167.
 12. Elsdon, R.P. and G.E. Siedel, Jr. 1982. Embryo transfer for cattle. *Theriogenology*, 14:251-256.
 13. Hafez, E.S.E. 1963. Storage of fertilized ova. *Int. J. Fert.*, 8:459-466.
 14. Hodgson, B.J. and C. Pauerstein. 1976. Comparison of oviductal transport of fertilized and unfertilized ova after HCG or witus induced ovulation in rabbits. *Biol. Reprod.*, 14:377.
 15. James, J.E., D. Resser, D.L. Davis, E.C. Stration, A.C. Talbot and C. Polge. 1980. Culture and long distance shipment of swine embryos. *Theriogenology*, 80.
 16. Joseph M. Wright. 1981. Non-surgical embryo transfer in cattle. *Theriogenology*, 15 (1):42-56.
 17. Joseph, Daniel, Jr. 1968. Oxygen concentration for culture of rabbit blastocysts. *J. Reprod. Fert.*, 17:187-190.
 18. Kameyama, K., T. Takeda and T. Onihara. 1990. Effects of storage methods of fetal calf serum on the development of mouse embryos. *Theriogenology*, 33(1).
 19. Kane, M.T. 1974. The effects of pH on culture of one-cell rabbit ova to blastocyst in bicarbonate-buffered medium. *J. Reprod. Fert.*, 38:477-480.
 20. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1981. Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 63:175-180.
 21. Lawson, L. E., L. E. A. Rowson and C. E. Adams. 1972. The development of cow eggs in the rabbit oviduct and their viability after re-transfer to heifers. *J. Reprod. Fert.*, 28:313-315.
 22. Linder, G. M., G. B. Anderson., R. M. Bondurant and P.T. Cupps. 1983. Survival of bovine embryos stored at 4°C. *Theriogenology*, 20:311.
 23. Linder, G.M., G.B. Anderson., R.H. Bondurant., P.T. Cupps and G.G. Goemann. 1982. Development of bobine embryos after storage at 4°C. *Theriogenology*, (17)1:96.
 24. Lubbadach, W.F., C.N. Graves and S.L. Spahr. 1980. Effect of repeated superovulation on ovulatory response of dairy cows. *J. Anim. Sci.*, 50:124-127.
 25. Mark A. Hughes and Gary B. Anderson. 1982. Short-term storage of rabbit embryos at 4°C. *Theriogenology*, 18:275-282.
 26. Maurer, R.R. and R. H. Foote. 1971. Maternal aging and embryonic mortality in the rabbit. I. Repeated superovulation, embryo culture and transfer. *J. Reprod. Fert.*, 25:329-341.
 27. Maurer, R.R., H. Onuma and R.H. Foote. 1970. Viability of cultured and transferred rabbit embryos. *J. Reprod. Fert.*, 21:417-422.
 28. Maurer, R.R., W.L. Hunt and R.H. Foote. 1968. Repeated superovulation, following administration of exogenous gonadotropins in duch-belted rabbits. *J. Reprod. Fert.*, 15:93-102.
 29. Pope, C.C. and B.N. Day. 1977. Transfer of preim plantation pig embryos following *in*

- vitro* culture for 24 or 48 hours. J. of Animal Sci., 44:1036-1040.
30. Seidel, G.E., S.M. Seidel and R.A. Bowen. 1980. Bovine embryo transfer procedures. general series No. 975. Fort Collins, Colorado State University.
 31. Shea, B.F. 1981. Evaluating the bovine embryo. Theriogenology, 15:31-42.
 32. Trounson A.O., S.M. Willadsen., L.E.A Rowson and R. Newcomb. 1976. The storage of cow eggs at room temperature and at low temperature. J. of Reprod. Fert., 46:173-178.
 33. Tsutsumi, Y., Y. Terami, T. Takeda, H. Suzuki and S. Matsui. 1980. *In vivo* egg recovery from the vagine and the pattern of egg distribution in superovulated rabbits. Jap. J. Anim. Reprod., 26:6.
 34. Willet, E.L., P.J. Buckner and W.H. Mcshan. 1953. Refractoriness of cows repeatedly superovulated with gonadotrophins. J. Dairy Sci., 36:1083-1088.
 35. Whittingham, D.G. 1974. Embryo banks in the future of development genetics. Genetics, 78:395-402.
 36. Whittingham, D.G. 1971. Survival of mouse embryos after freeing and trawing. Nature, London. 223:125-126.
 37. Yang, X., L. Zhang., A. Kovacs., C. Tobbak and R.M. Foote. 1990. Isolation and culture of single 8 cell blastomeres in rabbit with a novel approach. Theriogenology, 33:(1).
 38. 金重桂, 金哲均, 李揆勳, 金東哲, 康珉秀. 1988. 肉牛受精卵의 簡易凍結 및 融解方法에 관한 연구. I. PMSG, HCG 投與가 家兔 過排卵 誘起에 미치는 영향. 한국축산학회지. 30(9):519-524.
 39. 韓基暎. 1984. 反復過排卵 토끼의 卵巢反應에 關한 研究.