

돼지 分割 受精卵의 急速凍結 融解후 生存率에 관한 研究

吳元鎮 · 金相根*

忠南大學校 大學院

Studies on Effects of Cryoprotectants in the Medium on the Survival Rate of Rapidly Frozen Porcine Bisected Demi-Embryos

Oh, W. J. and S. K. Kim*

Graduate School, Chungnam Natl. Univ.

SUMMARY

This study was carried out to investigate the effects of cryoprotectants in the medium on the survival rate of rapidly frozen porcine bisected demi-embryos. The porcine bisected demi-embryos following dehydration by cryoprotectants containing sucrose were directly plunged into liquid nitrogen and thawed in 30°C water bath. Survival rate was defined as development rate on *in vitro* culture or FDA-test.

The results are summarized as follows :

1. The survival rates of without-zona pellucida embryos and 2 blastomeres porcine embryos were 10.0 and 7.1%, respectively. The rate of unfrozen blastomeres (20.00%) was significantly higher than that of non-frozen oocytes.
2. The survival rates of with and without-zona pellucida of bisected porcine embryos by micromanipulator were 20.0 and 14.3%, respectively.
3. The developmental rates of with and without-zona pellucida of bisected porcine embryos by micromanipulator were 13.3 and 7.1%, respectively.

I. 緒 論

受精卵을 이용한 分割胚의 作出에 관한 연구는 최근에 이르러 受精卵 移植의 실용성을 확대 提高시키기 위한 방안으로 微細操作法에 의해 受精卵을 分割하여 一卵性 雙子の 생산 또는 分割卵의 한쪽은 동결 보존하면서 다른쪽은 染色體檢査, 遺傳子

操作 및 移植등에 제공하기 위한 切斷 二分胚의 동결이용이 보고되었다(Nagashima와 Ogawa, 1981; Lehn-Jenson과 Willadsen, 1983; Heyman, 1985). 그러나 생쥐 受精卵에 대한 分割胚의 작성에 의해 染色體 分析 또는 一卵性 雙子에 성공한 예는 있으나 아직까지는 기술의 확립이 이루어지지 않아 초보적 단계에 지나지 않는 실정이며 돼지 受精卵을

* : 忠南大學校 獸醫科大學(Coll. of Vet. Med., Chungnam Natl. Univ.)

이용한 分割胚 작성과 凍結 保存에 관한 연구는 거의 찾아 볼 수 없는 실정이다.

受精卵을 분리한 分割胚의 작성은 생쥐 2세포기 胚를 이용하여 성공한 Nicholas와 Hall(1942)에 이어, Tarkowski(1959)는 mouse의 2세포기 受精卵을 분리한 후 하나를 이식하여 産子를 얻는데 성공하였으며, Willadsen 등(1981)은 분리한 受精卵을 배양하여 57%이상의 桑實胚와 胚盤胞까지의 발생율과 2, 4세포기의 受精卵을 분리 배양후 이식하여 각각 68%와 50%의 妊娠率을 얻었으며, Mullen 등(1970)은 2세포기의 割球를 분리한 후 체외배양중 再分離하여 産子를 얻는데 성공하였다. 그러나 돼지 受精卵은 다른 家畜 受精卵에 비하여 凍結保存에 많은 문제점들을 내포하고 있을 뿐만 아니라 分割卵은 대단히 生存性이 저조하여 이의 改善과 凍結保存 技術의 確立이 시급한 과제라고 생각된다.

이에, 본 研究는 돼지 分割卵의 急速凍結에 따른 生存性을 조사하기 위하여 卵胞卵을 회수하여 체외성숙시킨 후 受精能獲得 精子和 體外受精시켜 수정이 판정된 受精卵을 분할하여 急速凍結 融解후 生存性에 미치는 影響을 조사하고자 실시하였다.

II. 材料 및 方法

1. 材 料

1) 卵胞卵의 回收

屠殺直後の 成熟 雌豚으로부터 卵巢를 적출하여, 100 IU/ml의 penicillin G와, 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate를 첨가한 38°C의 生理食鹽水에 침지하여 실험실로 옮겨 19-guage 주사기로 2~5 mm 크기의 정상 난포로부터 卵胞液을 흡입하여 petri dish에 채취한 후 實體顯微鏡(20~40×) 하에서 형태적으로 우수한 卵胞卵을 선별하여 回收하였다.

2) 培養液

TCM-199(Whittaker, M.A. Bioproducts Co., USA)를 기본 배양액으로 하여 배양액에 10%(v/v)의 FCS(Sigma Co., USA)와 1 μ g/ml의 FSH(Sigma Co., USA), 2 IU/ml의 hCG(Sigma Co., USA), 1 μ g/ml의 17 β -estradiol(Sigma Co., U-

SA), 100 IU/ml의 penicillin G 및 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate가 첨가된 TCM-199 배양액을 이용 하여 사용하기전 멸균 여과시킨 후 사용하였다.

2. 方 法

1) 卵胞卵의 體外受精

卵胞卵의 體外受精은 40~48시간 배양에 의해 체외 성숙이 끝난 卵胞卵을 수정용 배양액으로 3회 세척한 후, 45 μ l의 배양액 小滴에 5개의 卵胞卵과 屠殺 雄豚의 精巢로부터 精巢上體를 적출하여 피부를 절개하고 세절하여 얻은 精子浮游液 0.01 ml와 BO액 2 ml를 시험관에서 잘 혼합하여 배양기에서 1시간 swim up 시킨 다음 약 0.5 ml의 上層液을 2,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 침전된 精子 pellets을 같은 양의 heparin 용액(100 μ g/ml, Sigma Co., USA)과 함께 혼합하여 CO₂ 배양기에서 受精能獲得을 유지시킨 精子浮游液 2 μ l(1~5 × 10⁶ ml)을 주입하고 mineral oil로 피복한 다음 6~7시간동안의 媒精으로 수정시켰으며 수정의 판정은 체외수정후 24~32시간간 켜에 Shea등(1976)과 Ball등(1983)의 방법에 따라 수정여부를 판정하였다.

2) 分割卵의 作成

분할란의 작성은 受精卵을 0.03%의 pronase를 처리하여 透明帶를 연화시켜 pipetting으로 투명대를 제거한 除去胚 또는 受精卵을 micromanipulator에 의해 분할한 切斷 2分胚를 작성하여 시험에 이용하였다.

3) 分割卵의 急速凍結, 融解 및 生存性 判定

分割卵의 急速凍結은 耐凍劑 + 0.25 M sucrose + 20% FCS + TCM-199의 조성으로 제조한 凍結液으로 각각 5분간 평형시킨 후 0.25ml straw내에 充填하고 봉인하여 labelling 한 후 1cm 높이의 액체질소 부표위에 straw를 놓아 5분간 豫冷시킨 다음 液體窒素에 즉시 浸漬함으로써 急速凍結을 실시하였다. 凍結卵의 融解는 straw를 실온에 30초간 방치한 다음 30°C 溫水槽의 溫水에서 融解후 거꾸로 흔들어 10분간 방치한 후 내용물 전체를 petri dish에 옮겨 신선한 기본 배양액으로 2~3회 세척하였다. 용해한 分割卵은 fluorescence diacetate(FDA) test에 의해 생존 여부

를 관정하거나, 배양을 통해 發生狀態를 관찰하면서 관정하였다(Schilling 등, 1982).

Ⅲ. 結果 및 考察

1. 分割卵의 急速凍結 融解후의 生存性

1) 分離 割球의 生存率

돼지 受精卵을 0.03%의 pronase를 처리하여 透明帶를 연화시켜 pipetting으로 투명대를 제거한 후 동결 용해하였을 때 生存率은 Table 1과 같다. Pronase를 처리하여 透明帶를 연화시킨 후 pipetting으로 透明帶를 제거한 分離 割球와 micropipette으로 割球를 흡입시켜 空 透明帶에 주입한 1/2 割球를 작성하여 동결 용해하였을 때 生存率은 각각 10.0%와 7.1%로서 非凍結 割球의 生存率 20.0%에 비해 저조한 生存率을 나타냈다.

돼지 受精卵을 이용한 分離 割球의 작성과 동결보존에 관한 研究報告는 찾아 볼 수 없었다. 본 試驗結果는 시험 對象動物은 다르지만 생쥐 受精卵을 이용하여 透明帶 除去胚에서 VS-3용액으로 동결 용해하였을 때 48%의 生存率을 나타냈다는 Bielanski(1987)의 결과에 비해 저조한 성적이었다.

한편, Hsu 등(1986)은 생쥐의 透明帶 除去胚 및 透明帶내 귀납한 分割胚를 동결 용해한바, 5개중 3개의 透明帶 除去胚와 2개의 分割胚 모두를 胚盤胞까지 발육시켰다고 보고하였다. 李 등(1993)은 透明帶 除去胚와 分割胚의 동결 용해후의 生存率은 73.5%와 68.

8%이었다고 보고하였다.

割球를 분리하는 방법으로서는 蛋白質 分解酵素인 pronase를 장시간 처리하여 透明帶를 제거하거나, 단시간 처리하여 透明帶를 연화시켜 pipetting으로 제거한 후 微細 pipette으로 할구를 분리하거나, micromanipulator에 의해 受精卵에 충격을 주지 않고 한쪽 割球를 제거하는 방법과 양쪽 割球를 모두 분리하는 방법 등이 있으나 돼지 수정란의 분할에는 어느 방법이 적합한지는 좀더 연구되어야 할 것으로 사료된다.

2) 分割卵의 生存率

돼지 受精卵을 micromanipulator에 의해 분할한 切斷 2分胚를 동결액으로 동결 용해하였을 때 生存率과 發生率은 Table 2 및 3과 같다.

受精卵을 micromanipulator에 의해 분할한 切斷 2分胚를 透明帶의 有無에 따라 透明帶 附着胚와 透明帶 除去胚로 분리하여 동결 용해하였을 때 生存率과 發生率은 각각 20.0%와 14.0% 및 13.3%와 7.1%로 나타났다.

본 시험결과와 시험동물은 다르지만 mouse 4세포기의 分離胚를 체외배양하여 胚盤胞까지의 發生率은 81.4%이었다고 보고한 Wilton과 Trounson(1981)의 결과와 비교할 때 저조한 성적이었으나, 생쥐의 8細胞期 分割胚의 체외배양율은 12.9%라고 보고한 Takeda등(1989)의 결과와는 유사한 성적이었다. 한편, 分割胚의 작성에 있어 생쥐 2세포기의 胚를 이용하여 성공한 Nicholas와 Hall(1942)에 이어, Tarkowski(1959)는 mouse의 2세포기 受精卵을 분리한 후 하나

Table 1. Effect of cryoprotectants in the freezing medium on the survival rate of rapidly frozen porcine blastomeres

Culture of embryos	No. of oocytes examined	Degree of FDA test						Survival rate(%)
		A	B	C	D	E	F	
Control	15	1	5	4	2	2	1	3(20.0)
Free-Zona	30	2	10	9	6	2	1	3(10.0)
2 blastomere	14	2	7	3	1	1	0	1(7.1)

Table 2. Effects of cryoprotectants in the medium on the survival rate of rapidly frozen porcine bisected demi-embryos

Culture of embryos	No. of oocytes examined	Degree of FDA test						Survival rate(%)
		A	B	C	D	E	F	
Control	18	0	6	5	2	3	2	5(27.8)
Demi-embryos								
Intact-Zona	15	1	5	4	2	2	1	3(20.0)
Free-Zona	14	2	5	3	2	1	1	2(14.3)

Table 3. Effects of cryoprotectants in the freezing medium on developmental rate of rapidly frozen porcine bisected demi-embryos

Culture of embryos	No. (%) of demi-embryos	No. (%) of embryos developed	
		Normal	Abnormal or degenerated
Control	18	5(27.8)	13(72.2)
Demi-embryos			
Intact-zona	15	2(13.3)	13(86.7)
Free-zona	14	1(7.1)	13(92.9)

를 移植하여 산자를 얻는데 성공하였으며, Willadsen(1979), Willadsen 등(1981)은 분리한 受精卵를 배양하여 57%이상의 桑實胚와 胚盤胞까지의 發生率을 얻었으며, 아울러 2, 4세포기의 受精卵를 분리 배양 후 이식하여 각각 68%와 50%의 妊娠率을 나타냈다고 보고하였으며, Mullen등(1970)은 2세포기의 할구를 분리한 후 체외배양중 再分離하여 産子를 얻는데 성공하였으며, 또한, Willadsen(1979)은 緬羊의 8세포기의 分割胚를 桑實胚까지 유기 배양에 성공하였다.

아울러 分割胚에 대한 凍結保存에 관한 연구보고는 생쥐에서 Nagashima와 Ogawa(1981) 및 Ogawa와 Fujikara(1983) 등은 각각 28.5%, 32.7%의 생존율을 얻었다고 보고하였다. Suzuki와 Shimohira 등(1986)은 소 受精卵의 동결 용해시 sucrose를 첨가하여 분할하면 우수한 성적을 얻는다고 하였으며, McEvoy와 Sreenan(1987)은 토끼에 있어서 透明帶를 제거하지 않고 分割하여 이식에 성공하였다고 하였으며, 박(1991)은 생쥐 桑實胚 및 胚盤胞를 分割하여 배양한 결과 77.2%와 84.1%의 生存率을 얻었다고 보고하였다. 이와 같이 분할배를 이식하여 산자를 얻는데 대한 연구들이 수행되어 괄목할만한 연구결과들이

제시되고 있지만 돼지의 분할란에 관한 보고는 찾아볼 수 없는 실정이므로 이에 관한 연구가 계속 진행되어야 할 것으로 사료된다.

IV. 摘 要

본 연구는 돼지 分割卵의 急速凍結에 따른 生存性을 구명하기 위하여 卵胞卵을 회수하여 體外受精시킨 후 受精能獲得 精子和 體外受精시켜 수정이 판정된 受精卵를 분할하여 急速凍結 融解후 生存性에 미치는 影響을 조사하고자 실시하였다.

1. Pronase를 처리하여 투명대를 연화시킨 후 pipetting으로 투명대를 제거한 할구와 micropipette으로 할구를 흡입시켜 空 透明帶에 주입한 1/2 割球를 작성하여 동결 용해하였을 때 생존율은 각각 10.0%와 7.1%로서 非凍結 割球의 생존율 20.0%에 비해 저조한 생존율을 나타냈다.
2. 受精卵를 micromanipulator에 의해 분할한 절단 2分胚를 투명대의 유무에 따라 투명대 부착배와 투명대 제거배로 분리하여 동결 용해하였을 때 生存率은 20.0%와 14.3%로 나타났다.

3. 受精卵을 micromanipulator에 의해 분할한 절단 2分胚를 투명대의 유무에 따라 투명대 부착배와 투명대 제거배로 분리하여 동결 융해하였을 때 體外發生率은 13.3%와 7.1%로 나타났다.

V. 引用文獻

1. Ball, G. D., M. L. Leibfried, R. W. Lenz, R. L. Ax, B. D. Bavister and N. L. First. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. Biol. Reprod., 28:717-725.
2. Bielanski, A. 1987. Survival *in vitro* of zona pellucidae-free mouse embryos after cooling by conventional two step or vitrification methods. Cryo- Letters, 8:294-301.
3. Heyman, Y. 1985. Factors affecting the survival of whole and half embryos transferred in cattle. Theriogenology, 23:63-75.
4. Hsu, T. T., H. Yamanoi and S. Ogawa. 1986. Survival and transfer test of mouse early embryos frozen by vitrification method. Japan. J. Anim. Reprod., 32:29-32.
5. Len-Jensen, H. and S. M. Willadsen. 1983. Deep-freezing of cow 'Half' and 'Quarter' embryos. Theriogenology, 19:49-54.
6. McEvoy, T. G. and J. M. Sreenan. 1987. The survival of bisected cattle embryos without zonapellucidae. Theriogenology, 27:257.
7. Mullen, R. J., W. K. Whitten and S. C. Carter. 1970. Annual report of the Jacson Laboratory, Bar. Harbor, Maine., 67.
8. Nagashima, H. and S. Ogawa. 1981. Studies on the developmental potential and survival and survival after the deep freezing of microsurgically dichotomized morula embryos in rats and rabbits. Jap. J. Anim. Reprod., 27:12-19.
9. Nicholas, J. S. and B. V. Hall. 1942. Experiments on developing rats. II. The development of isolated blastomeres and fused eggs. J. Exp. Zool., 90:441-459.
10. Ogawa, S. and H. Fjikura. 1983. Cryoviability of the half-embryos isolated by microsurgery from early developmental stage embryos in mice and rabbits. Instit. of Sci. and Tech. Meiji Univ., 62:25-34.
11. Schilling, E., H. Niemann and D. Smidt. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. Cryobiology, 15:245-248.
12. Shea, B. F., J. P. A. Latour, K. N. Berdin and R. D. Baker. 1976. Maturation *in vitro* and the subsequent fertilizability of extra follicular bovine oocytes. J. Anim. Sci., 43:809-815.
13. Suzuki, T. and Shimohira. 1986. Viability of frozen-thawed bovine embryos bisected in sucrose. A preliminary report. Theriogenology, 26:336-339.
14. Takeda, T., T. Takedomi and T. Onihara. 1989. Development of blastomeres isolated at the 4-cell or 8-cell stage and embryos after bisection at the morulae and blastocyst stage in the mouse. Theriogenology, 31(1):262.
15. Tarkowski, A. K. 1959. Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. Nature, 184:1286-1287.
16. Trounson, A., A. Peura and C. Kirby. 1987. Ultrarapid freezing ; a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. Fertil. Steril., 48:843-850.
17. Willadsen, S. M. 1979. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. Nature, 277:298-300.

18. Willadsen, S. M., H. Lehn-Jensen, C. B. Fehilly and R. Newcomb. 1981. The production of monozygotic twins of preselected parentage by micromanipulation of non-surgically collected cow embryos. *Theriogenology*, 15: 23-29.
19. 박희성, 박준규, 정상용, 박충생. 1991. 상실배 및 포배기에 분할한 생쥐 수정란의 체외 발달 속도 및 이식후 수태율. *한국수정란이식연구회지*, 8(1):13-19.
20. 李章熙. 1993. 돼지 卵細胞의 凍結保存과 體外受精에 관한 研究. 中央大 博學位論文, 1-83.

Legend of Figures

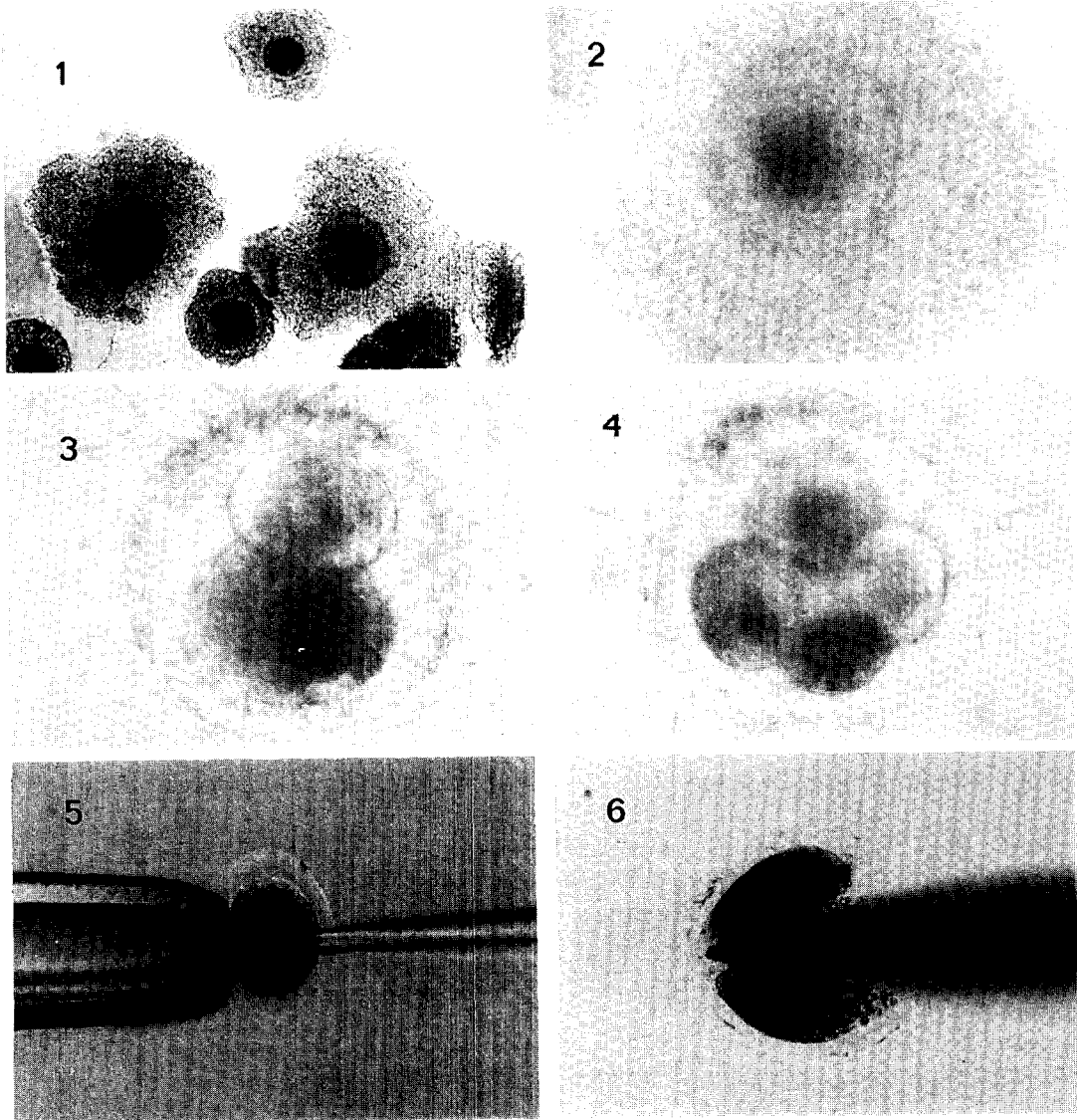


Fig. 1. Types of oocyte-cumulus complex at collection($\times 60$)

Fig. 2. Oocyte-cumulus cells expansion after *in vitro* maturation($\times 100$)

Fig. 3. 2-cell embryo after *in vitro* fertilization($\times 300$)

Fig. 4. 4-cell embryo after *in vitro* fertilization($\times 300$)

Fig. 5. Bisected 2 blastomeres by micropipettes($\times 150$)

Fig. 6. Bisected embryos by micromanipulator($\times 150$)