

한우 체외수정란의 재동결에 관한 연구

이명식 · 박수봉 · 박진기 · 백광수 · 오성중 · 성환후 · 장원경 · 정진관
축산기술연구소

A Study on Survival Ability of Refrozen-Thawed Bovine IVF Embryos

M. S. Lee, S. B. Park, J. K. Park, K. S. Baek, S. J. Ohh,
H. H. Seong, W. K. Chang and J. K. Jung
National Livestock Research Institute

SUMMARY

This study was conducted to investigate the survival and hatching rates after refrozen-thawed bovine IVF blastocysts.

The survival rates after refrozen-thawed bovine IVF blastocysts produced on day 7, day 8 and day 9, were 66.6%(16/24), 62.5%(15/24) and 65.3%(17/26), respectively.

The survival and hatching rates after the first frozen-thawed bovine IVF blastocysts were 90.0%(27/30) and 70.0%(21/30), but in refrozen-thawed bovine IVF blastocysts were 66.2%(49/74) and 45.9%(34/74), respectively.

The results of this study were suggest that refrozen-thawed bovine IVF embryos had survival ability.

(Key words: bovine, IVF, embryos, survival rate, refrozen-thawed, ethylene glycol)

서 론

수정란의 생산은 과배란치리에 따른 체내수정란의 회수와 체외배양법에 의한 체외수정란 생산방법이 있다.

유전능력이 우수한 수정란 생산을 위해서 우량개체의 체내수정란을 이용한 상업적 판매가 일반화되고 있으나, 고가의 비용과 생산수정란수의 한계성 및 반복채란시 효율 저하 등의 문제점이 있으며 최근에는 생체내 난자 채취후 체외배양법이 시도되고 있다.

체외수정란 생산법은 유전능력에 대한 정보가 빈약한 개체의 난소로부터 체외수정란을 생산하였을 때 개량효과나 근친 정도를 제어할 수 없는 단점을 내포하므로 수정란이식에 이용되기에는 많은 제약

이 따르나, 금후 개체 전산화가 완료되면 가장 저렴하게 우량한 체외수정란을 생산 및 이용하게 될 것으로 전망된다.

더우기 소의 수정란은 일반적으로 많이 이용하는 3단계 동결법뿐만 아니라 1 단계동결법(Leibo SP, 1984; Suzuki 등, 1993), 초자화동결법(Kuwayama 등, 1992)에서도 동결·융해후 생존성이 잘 입증되어 있다.

그 실례로써 체내수정란 뿐만 아니라 동결체외수정란의 이식 (Goto 등, 1988 ; Reichenbach 등, 1992)에서도 많은 연구자에 의해서 송아지 생산보고가 있었으며, 국내에서도 축산기술연구소, 축협 한우개량부, 대학 및 각도 수정란생산센터에서 수정란생산·동결·이식 기술을 확보하고 있다.

한편 Wurth 등(1994)에 의하면 동결체외수정란의 수태율조사는 제한된 수란우의 수, 난산예방과

수태율 향상을 위해서 1회에 2개 이상의 수정란을 이식하므로 동결체외수정란의 융해후 생존성과 임신으로의 발달 가능성을 예측하기가 곤란함을 보고하였다.

따라서 본 연구는 수정란의 내동성에 대한 연구로써 동결반복에 따른 생존 여부 및 발생 가능성을 체외배양법으로 평가하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

1. 한우 체외수정란 생산

한우 난소를 25℃~32℃의 생리적 식염수에 담가 3시간 이내에 실험실로 운반한 후, 3% FCS(우태아 혈청)가 첨가된 D-PBS액을 무균주사기(Furtuna, 독일)에 1ml 넣은 다음에 매난소의 난포로부터 흡입한 후 미성숙난포란을 현미경하에서 회수하였다.

5% FCS와 1% antibio-antimycotic solution (Sigma, 미국)이 첨가된 M-199(Gibco, 미국)액으로 5회 세척한 후 400 μ l 소적당 50~60개의 난포란을 넣어 38.5℃ 탄산가스배양기에서 20~22시간 배양하여 체외성숙을 유도하였다.

체외수정용 정자는 축협한우 동결정액을 융해하여 Brackett 등(1975)의 BO액을 부분변형하여 정자세척시에는 BO액에 caffeine을 5mM, 체외수정시에 BSA 5mg/ml, heparin 10 μ g/ml, 및 caffeine 2.5mM을 첨가하고 정자농도를 5 \times 10⁶ cell/ml로 조정하여 체외수정액 100 μ l 소적당 20개의 난포란을 넣어 6시간동안 수정하였다.

발생배양액은 M-199에 5% FCS, 1% antibio-antimycotic solution을 첨가하여 사용하였고, 수정 이후 발생배양액에서 난구세포와 공배양하여 7, 8, 9일령의 소 체외수정란을 생산하였다.

2. 한우 체외수정란의 1차 동결

동결액은 D-PBS 에 20% FCS, 1.8M ethylene glycol을 첨가하여 사용하였고 동결방법은 Voelkel 등(1992)의 직접이식 동결법에 따라 확장중체외수정란을 20~25℃ 온도의 동결액에서 10~15분 평형시키고 0.25 스트로당 1개의 수정란을 적재한 후 -7℃ 수정란동결기내로 이동시키고 2분 경과후에 스트로 상단에 식빙하고 다시 8분을 경과시켜 수정

란이 적재된 부위에 얼음결정이 침투하게 하였으며 이후 -30℃까지 매분당 -0.3℃씩 하강시킨 후 액체질소통에 보관하였다.

3. 한우 체외수정란의 2차 동결

1차 동결후 -196 액소질소내에서 10~15일간 저장한 후 20℃의 온수에서 7~10 초간 융해하고 5% FCS 가 첨가된 M-199 발생배양액으로 5회 세척한 후 준비된 난구세포 단층세포와 공동배양을 15~20 시간 실시하여 1차 동결전의 확장중 배반포로 원상 회복된 수정란만을 임신하여 공시하였으며, 배반포강의 정상회복이 늦어지거나 빠르게 진행되어 부화중 또는 부화된 수정란은 2차 동결시험에 제공하지 않았다.

수정란의 2차 동결방법은 1차 동결시와 마찬가지로 1.8M ethylene glycol을 사용하였으며 Fig. 1에서 보는 바와 같이 수정란을 매 스트로당 1개씩 주입하여 동결하였다.

4. 수정란의 생존성 검사

1차 동결 혹은 2차 동결 보존 후 융해하여 신선한 발생배양액으로 5회 세척하고 난구세포와 15~20시간 이상 공배양한 후, 배반포강을 재형성하여 동결전의 상태로 회복하거나 다음 단계인 부화 배반포로 발달한 수정란을 생존한 것으로 판단하였다.

융해후 24시간 배양한 것은 Day 1로 기준하여, 이때 일차적인 생존성 검사를 하였으며 2차 동결-융해후 생존성 검사는 매 24시간마다 4일째까지 조사하였다.

결과 및 고찰

소 체외수정란의 발생일령별 재동결에 따른 융해

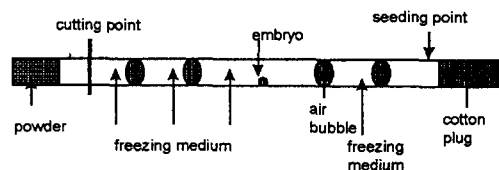


Fig. 1. Embryo loading.

후 생존율은 Table 1과 같다. 체외수정시를 Day 0으로 기준하여 Day 7, Day 8 및 Day 9에 수확한 확장중배반포를 1차 동결-융해후 재동결-융해하여 24시간 배양한 후 생존율은 각각 66.6%(16/24), 62.5%(15/24) 및 65.3%(17/26)이었다.

수정란의 발생일령에 따라 재동결시 생존율에 차이를 보이지 않았으나 평균생존율이 64.8%(48/74)로써 소수정란이 1차 동결융해후 동결에 따른 손상된 세포가 회복되는 배양 24시간 정도에 재동결 가능성을 확인할 수 있었으며 2차적으로 수정란 이식 등에 재차 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

한편 Takagi 등(1994)은 소 체외수정란의 일차 동결-융해후 생존성이 7일령 배반포가 8일령이나 9일령보다 좋았다고 보고한 바 있어 본 연구결과와 일치되지 않았던 것은 본 시험이 수정란의 재동결이라는 방법상의 차이와 동결시 수정란의 질이 발생단계보다 더 많은 영향을 미치었던 것을 생각할 수 있다.

한우 체외수정란의 1차 동결과 2차 동결에 따른 생존율과 부화율은 Table 2에서 보는 바와 같이 각각 90.0%(27/30)와 70.0%(21/30), 66.2%(49/

74) 와 45.9%(34/74)였다.

1차 동결-융해후의 생존성은 90.0%(27/30)로써 Twagiramungu 등(1997)의 79%, Imai 등(1997)의 72%보다 다소 높았는데 그러한 차이점은 비슷한 구성의 직접이식법이라 할지라도 본 시험에서 선택한 1.8M ethylene glycol이 체외수정란의 1차 동결에 더 적합한 것으로 생각되는데, 그 예로써 Suzuki 등(1993)이 같은 방법의 시험에서 생존율은 89.8%(79/88)로써 유사하였으며, 부화율은 50.0%(44/88)로써 다소 낮은 성적을 보고하였는데 이는 동결과정이 아니라 발생배양에서의 차이에 기인한 것으로 사료된다.

한편 1차 동결구와 2차 동결구 사이에 유의차가 인정되게 생존율과 부화율의 차이를 보였는데, 수정란세포는 내세포괴와 영양아세포구로 이루어졌으며 동결-융해후 각각 28%, 22.9%가 사멸하나 (Heyman 등, 1987), 융해후 배양을 통해서 살아있는 세포의 증식이 이루어져 다음 단계로 발달하게 되는데 2차 동결은 배반포강의 원상회복과 부화이전에 시도해야 하므로 다소 불충분하게 세포가 증식된 상태에서 재동결함으로 내동성이 떨어져 생존

Table 1. Survival rates after refrozen -thawed bovine IVF blastocyst according to developmental day

Embryo ages	No. of refrozen embryos	No. of survived embryos after refrozen-thawed	Survival rates(%)
Day 7 Ex-BL ¹⁾	24	16	66.6
Day 8 Ex-BL	24	15	62.5
Day 9 Ex-BL	26	17	65.3
Total	74	48	64.8

Experiments were contemporaneously repeated 3 times in each group.

There is no significant differences.

EX-BL¹⁾ : Expanding blastocysts.

Table 2. Survival and hatching rates after the first and the second frozen -thawed IVF bovine embryos

Treatment group	No. of embryos	No. of survived embryos (%)	No. of embryos developed to the hatched blastocyst(%)
The first frozen -thawed	30	27 (90.0)	21 (70) ^a
The second frozen -thawed	74	49 (66.2)	34 (45.9) ^b

Means with different superscript are significant different (p<0.05).

Table 3. Developmental capacity after refrozen-thawed bovine embryos produced *in vitro*

No. of embryos used	Embryos stage	After embryos refrozen-thawed survival rate at			
		Day 1(%)	Day 2(%)	Day 3(%)	Day 4(%)
46	Reforming blastocoele	29(63.0)	4(8.7)	2(4.3)	4(8.7)
	Expanded blastocysts	—	26(56.5)	25(54.3)	7(15.2)
	Hatched blastocysts	—	—	4(8.7)	19(41.3)
	Total	29(63.0)	30(65.2)	31(67.3)	30(65.2)

율과 부화율이 낮았던 것으로 추측된다.

한우 체외수정란의 재동결 후 발생 가능성은 Table 3에서 보는 바와 같이 용해후 24시간에 63.0%(29/46)가 배반포강을 원상회복하였고, 3일 배양후에 8.7%(4/46)가 부화되었으며 4일 배양후에는 41.3%(19/46)가 부화되어 본 연구에서 소체외 수정란의 재동결에 따른 발생 가능성을 확인할 수 있었다.

적 요

한우 체외수정란의 1차 동결용해후 재동결시 생존 가능성과 발생 가능성을 조사하기 위하여 본 연구를 수행한 결과,

1. 발생일령 Day 7, Day 8 및 Day 9에 따라 재동결-용해후 생존율은 각각 66.6%(16/24), 62.5%(15/24) 및 65.3%(17/26)로써 발생일령이 수정란 재동결에 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다.
2. 1차 동결-용해후 생존율과 부화율은 각각 90.0%(27/30), 70.0%(21/30)였고, 재동결-용해후 생존율과 부화율은 각각 66.2%(49/74), 45.9%(34/74)로써 한우 체외수정란의 재동결 가능성이 입증되었다.
3. 재동결 수정란은 용해후 체외배양에서 배양 24시간에 63.0%(29/46)가 배반포강을 회복하였고 배양 2일째에 56.5%(26/46)가 확장배반포로 발달하였으며 배양4일째에 41.3%(19/46)가 부화하여 수정란 이식사업에서 재이용 가능성과 수정란 내동성에 관한 기초자료로 이용될 수 있을 것이다.

참고문헌

- Brackett BG and Oliphant G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod. 12:260-274.
- Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanishi Y and Ogawa K. 1988. Pregnancies after coculture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. J. Reprod. Fertil. 83:753-758.
- Heyman Y, Chesne P, Chupin D and Menezo. 1987. Improvement of survival rate of frozen cattle blastocysts after transfer with tropoblastic vesicles. Theriogenology. 27(3) 477-484.
- Imai K, Kobayashi S, Goto Y, Dochi O and Shimohira I. 1997. Cryopreservation of bovine embryos obtained by *in vitro* culture of IVM-IVF oocytes in the presence of linoleic acid albumin. Theriogenology. abstract. 47 (1) 347.
- Kuwayama M, Hamano S and Nagai T. 1992. Vitrification of bovine blastocysts obtained by *in vitro* culture of oocytes matured and fertilized *in vitro*. J. Reprod. Fertil. 96: 187-193.
- Leibo SP. 1984. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. Theriogenology. 21:767-790.
- Reichebach HD, Liebrich J, Berg U and Brem G. 1992. Pregnancy rates and births after unilateral or bilateral transfer of bovine em-

- bryos produced *in vitro*. J. Reprod. Fertil. 95:363-370.
- Suzuki T, Takagi M, Yamamoto M, Boediono A, Saha S, Sakakibara H and Oe M. 1993. Pregnancy rate and survival in culture of *in vitro* fertilized bovine embryos frozen in various cryoprotectants and thawed using a one-step system. Theriogenology. 40:651-659.
- Takagi M, Otoi T, Boediono A, Saha S and Suzuki T. 1994. Viability of frozen-thawed bovine IVM /IVF embryos in relation to aging using various cryoprotectants. Theriogenology. 41:915-921.
- Twagiramungu H, Morin N, Bordignon V, Smith LC. and Bousquet D. 1997. Influence of serum in culture system on the production and cryopreservation of *in vitro*-derived bovine embryos. Theriogenology. abstract. 47 (1) 356.
- Voelkel SA and Hu YX. 1992. Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. Theriogenology. 37:687-697.
- Wurth YA, Reinders JMC, Rall WF and Kruip TH AM. 1994. Developmental potential of *in vitro* produced bovine embryos following cryopreservation and single-embryo transfer. Theriogenology. 42:1275-1284.
-

(접수일자 : 1997. 12. 26 / 채택일자 : 1998. 2. 11)