

체외배양기술로 생산된 초기배에 의한 한우 송아지 생산기술
Ⅲ. 배반포 발생에 미치는 발생배지의 효과와 동결융해후의
생존율에 미치는 Sucrose와 Trehalose의 효과⁺

서경덕 · 김호중 · 김갑수* · 김광식
연암축산원에대학

Development of Production Techniques for Korean Native Cattle
Calves from Embryos by *In Vitro* Technology
Ⅲ. Effects of Culture Medium on Blastocyst Development and
Effects of Sucrose and Trehalose on the Survival Rate
of *In Vitro* Developed Embryos after Thawing

K. D. Seo, H. J. Kim, K. S. Kim* and K. S. Kim

Yonam College of Agriculture

SUMMARY

The objective of this study was to evaluate the embryonic development ability and the appearance of blastocysts of bovine *in vitro* fertilized oocytes cultured in different culture media, and also to evaluate survival rate after thawing of frozen embryos by using 1.5 or 1.8M ethylene glycol(EG) with sucrose or trehalose.

Fertilized oocytes were divided into three groups; i) monolayer of cumulus /granulosa cell prepared by TCM 199+5% calf serum(TCM199), ii) CR1aa+5% CS, iii) SOF+5% CS, and they were cultured after insemination for 9 days, at 39°C, under 5% CO₂ in air, but SOF+5% CS was cultured at 39°C, under 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂. Blastocysts derived from CR1aa + 5% CS on day 7~8 after insemination were frozen by using 1.5M EG or 1.8M EG with /without 0.2M sucrose or 0.1M trehalose.

The development rate of blastocysts on day 7 after insemination in SOF+5% CS was significant higher than in TCM199 or CR1aa(P<0.05). The appearance rate of blastocysts on day 7~8 after insemination was higher than in TCM199, when fertilized oocytes were cultured in CR1aa or SOF. The survival rate of frozen blastocysts after thawing tended to increase, when blastocysts were frozen by using 1.8M EG with 0.2M sucrose or 0.1M trehalose. These results indicated that SOF or CR1aa media with amino acids was superior to TCM199 with monolayer in terms of blastocyst development in culturing of *in vitro* fertilized bovine oocytes, and sucrose or trehalose was supposed to prevent embryos from the freezing shock.

(Key words: culture medium, blastocyst, ethylene glycol, survival rate)

⁺ 본 연구는 1996년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

* 영농조합법인 엠바이오텍(Embiotec Co., Inc ET World Wide)

서 론

최근 소 체외수정란의 체외배양법과 발생된 초기배의 동결보존 기술이 현저한 발달을 보여, 배반포 발생율과 동결융해 한 초기배의 이식에 있어서 그 수태율이 증가되고 있다.

종전부터 체외배양에 사용되어 왔던 TCM199을 대신하여 KSOM, HECM, SOF, CR1 등의 단순 조성의 배양액에서도 수정후의 배반포 발생이 가능하게 되었으나, 아직 체외배양체계가 확립되어 있지 않으며, 특히 체외에서 생산한 초기배의 배양에 있어서 8~16세포기에 세포분열중지 현상이 나타나기 때문에 이식 또는 동결을 위한 수정란의 대량 확보에 큰 장애요인이 되고 있다. 이러한 세포분열중지 현상을 극복하기 위한 방법으로 TCM199 배양액을 이용한 체세포와의 공배양이 이루어지고 있다. 사실 체세포와 초기배를 공배양할 경우, 단층형성이 용이하지 않으며, 장기간 배양에 따른 세포유지의 어려움 및 오염의 위험성이 크다는 문제점이 제기되고 있다(Xu 등, 1992). 또한 초기배에 대한 기초연구에서 체세포와의 공배양은 초기배의 배양과 발달시의 정확한 영양소 요구량과 초기배 대사작용의 명확한 이해를 막는다고 보고하였다(Takahashi와 First, 1992). 이와 같은 배양체계의 문제점들을 해결하기 위하여 체세포 free 배양액을 이용하는 방법이 제시되었는데, 면양의 난관분비액을 기초로 하여 구성된 SOF(Tervit 등, 1972; Takahashi 와 First, 1992)와 CR1(Rosenkrans와 First, 1994) 배양액이 개발되었으며, CR1 배양액에 필수 및 비필수 아미노산을 첨가하였을 때 양호한 배발생을 얻었다고 하였다.

한편, 소의 동결란을 융해후 스트로우에서 꺼내지 않고 직접이식하는 기술의 확립은 농가수준에 있어 수정란 이식기술의 보급에 불가결한 문제로 되어 있다. 따라서 융해후 직접이식을 위한 동결방법의 확립은 수정란 이식기술의 보급화에 있어 중요한 과제라고 할 수 있다. 그러나 이에 선행하여 융해후에 안정된 생존율을 확보하는 것이 중요하다. 직접이식을 위하여 융해한 수정란에 가장 큰 영향을 주는 것은 동결액의 삼투압에 의한 수정란의

투명대와 세포질의 손상이라고 할 수 있다. 이것은 융해후 세포 내외의 삼투압 차이에 의한 급격한 수분이동이 일어나기 때문이다. 따라서 세포에 대한 독성이 적고, 세포 내외의 수분이동을 조절하는 기능이 탁월한 물질을 동결시 동결액 중에 첨가하여 동결하는 것으로 융해시의 세포 내외에서 일어나는 삼투압 변화에 대하여 수정란을 보호할 수 있을 것이다.

따라서 본 실험에서는 체외성숙, 수정한 초기배를 TCM199로 준비한 공배양 시스템과 단순배양액인 CR1 또는 SOF에 필수 및 비필수 아미노산을 첨가한 배양액으로 배양하였을 때, 배반포 발생과 배반포 출현에 미치는 효과를 검토하였으며, 한편 CR1aa 배양액에서 발생한 배반포를 융해후에 삼투압에 따른 수분이동의 속도를 조절하는 것으로 알려진 sucrose 또는 trehalose를 첨가한 1.5 또는 1.8M ethylene glycol을 이용하여 동결, 융해한 배반포를 직접 CR1aa 배양액 중에 넣어 배양 후 그 생존율을 관찰하여 효과를 검토하였다.

재료 및 방법

1. 소 난포란의 체외성숙, 수정 및 배양

도축된 한우 난소에서 채취한 난구-난자 복합체(난포란)를 TCM-199에 10%의 소 난포액을 첨가한 배지에서 20~24시간 동안 성숙배양 시킨 후 10 μ g/ml heparin과 5mM caffeine, 10mg/ml BSA를 첨가한 B.O. 용액 중에서 2 \times 10⁶의 농도로 준비한 정자와 6시간 동안 수정시켰다(김 등, 1988). 수정후 난포란에 부착한 정자 및 난구세포를 피펫을 이용하여 제거한 후, 난포란 채란시 회수한 난구/과립막세포를 TCM-199+5% CS 중에서 30시간 배양하고 수정한 난포란을 옮겨 배양을 하였다. 한편, 단순조성의 배양액인 CR1aa와 SOF에 각각 5% CS를 첨가하여 발생용 배양액으로 사용하였다. 발생조건은 TCM-199와 CR1aa은 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ in air에서, SOF는 39 $^{\circ}$ C, 5% O₂, 5% CO₂에서 배양을 하고 수정후 7, 8, 9일에 배반포 발생과 일령에 따른 배반포의 출현을 관찰하였다.

2. 배반포의 동결과 융해

SOF+5% CS 중에서 배양하고 체외수정후 7 또는 8일째에 배반포~확장 배반포로 발생한 배반포만을 선별하여 동결에 공시하였다(배발생실험과 동결실험은 별개의 실험입니다). 20% CS를 첨가한 PBS에 1.5M 또는 1.8M ethylene glycol(EG)를 첨가하고, 여기에 부가적으로 0.2M sucrose 또는 0.1M trehalose를 각각 첨가하여 동해방지제로 사용하고, 20% CS를 첨가한 PBS로 3회 세척한 후, 각각의 동해방지제와 배반포를 0.25ml straw에 흡입하여 10분간 실온에서 평형을 시키고, -7℃로 준비된 program 동결기에 넣고 2분후 식빙을 하고 8분간 유지하고, -30℃까지 -0.3℃/분으로 냉각하고 액체질소중에 넣어 1주일 이상 보존하였다. 용해는 straw를 액체질소 중에서 꺼내어 공기중에 5초간 유지한 후 35℃의 온수 중에 넣어 용해하였다. 용해한 배반포를 SOF+5% CS에 옮겨 48시간 배양하고, 24시간과 48시간에 각각 관찰하여 동결전의 형태 이상으로 확장한 배반포를 생존한 배반포로 판정하였다

3. 통계학적 분석

본 실험의 통계처리는 3~5회 반복한 결과를 종합하여 분산분석(ANOVA)과 Fisher의 protected least significant difference(PLSD) 으로 하였다.

결과 및 고찰

1. 배양액에 따른 배발생

수정후 2일째의 분할율에 있어서는 어느 배양액 중에서 배양을 하여도 그 차이가 인정되지 않았다. 수정후 7일째의 배반포 발생율에 있어서는 SOF에서 배양한 경우가 TCM199과 CR1aa에 비하여 유의하게 높았으며($P < 0.05$, Table 1), 8일째의 배반

포 발생에 있어서는 SOF와 CR1aa에서 27.9와 27.9%로 TCM199의 20.7%에 비하여 유의하게 높았다($P < 0.05$). 그러나 9일째의 배반포 발생율에 있어서는 차이가 인정되지 않았다. 한편 배반포로 발생한 배의 출현율에 있어서는 전체 배반포 발생율에 있어서는 TCM199이 28.7%, CR1aa이 33.3%, SOF가 32.0%로 유사하였으나, 배반포로 발생한 배중 80% 이상이 CR1aa와 SOF에 있어서는 수정후 8일째에 출현하여 TCM199의 70%에 비하여 빠른 경향을 나타냈다(Fig. 1).

CR1aa 배양액은 Keefer 등(1993)과 Rosenkrans와 First(1994)에 의하여 보고되어 배발생의 단순 배양액으로 사용되어지고 있다. 김 등(1994)도 CR1aa 배양액으로 2~4세포기의 소 배를 배양하였을 때 TCM199으로 준비한 난구세포의 단층에서 배양한 것보다 배반포당 세포수에 있어서는 차이가 인정되지 않았으나, 발생한 배반포 중에서 부화율이 유의하게 높았다고 보고하였으며, Table 1에서도 TCM199으로 준비한 난구/과립막세포 단층에서 수정후 배양하였을 때보다도 CR1aa에서 배양하는 것이 수정후 8일째의 배반포 발생율이 유의하게 높게 나타나($P < 0.05$) 비슷한 결과가 인정되었다. 또한 SOF 배양액도 Tervit 등(1972)이 처음으로 1세포와 8세포기 배를 배양하여 성공적으로 배반포까지 발생되는 것을 관찰한 이래 Takaha-

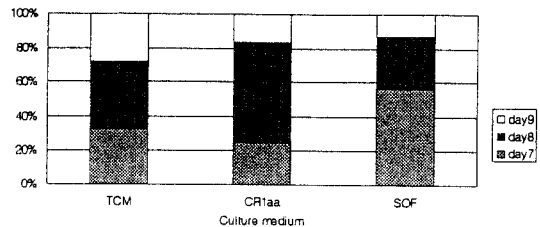


Fig. 1. Appearace of blastocyst after IVF.

Table 1. Development to blastocyst stage of IVF bovine oocytes

Culture medium	No. of oocytes examined	No. of (%) cleaved	No. of (%) develop to blastocyst at		
			day 7	day 8	day 9
TCM-199	150	118(78.7)	14(9.3) ^a	31(20.7) ^a	43(28.7)
CR1aa	781	670(85.8)	65(9.7) ^a	218(27.9) ^b	260(33.3)
SOF	591	459(77.7)	106(17.9) ^b	165(27.9) ^b	189(32.0)

^{a,b}; The values with different superscripts are significantly different($P < 0.05$).

shi와 First(1992)에 의하여 SOF 배양액 조성이 일부 수정되어 소의 발생용 배양액으로 사용되어지고 있다. 이 두 배양액이 TCM199과 다른 특징은 각각에 필수 아미노산과 비필수 아미노산이 함유되어 있는 점이며, Kim 등 (1993), Rosenkrans 와 First(1994)와 Keskinetepe 등(1995)은 배발생 배양액에 이러한 아미노산을 첨가하는 것에 의하여 발생률이 촉진되었다고 보고하였다. 본 실험에서 필수 또는 비필수 아미노산의 효과를 검토하지 않았으나, CR1와 SOF에 각각 첨가하였을 때, 그 효과가 수정후에 배반포의 출현율에서 확인되었다. 또한 SOF 배양액으로 배 배양을 실시한 경우, 다른 두 배양액의 배양조건은 산소농도가 20%인 것에 반하여 5%로 조절된 배양기 중에서 배양한다는 점이며, 일반적으로 SOF 배양액으로 배양을 실시할 경우는 20% 산소농도보다는 5%의 산소농도 중에서 사용되어지는 것으로 되어 있다(Gordon, 1994). 기상중의 산소농도는 배의 발달에 영향을 주어 20% 보다 낮은 5~10% 농도의 산소를 포함한 기상중에서 배양하는 것에 의하여 우량배의 발생이 개선되는 것은 오래전에 보고된(Tervit 등, 1972) 이후 소의 체외수정기술의 발달과 함께 산소농도의 영향이 다시 주목되게 되었으며, 2~8 세포기의 소 배를 배양할 때에는 4~12%의 산소농도가 적당하다는 보고도 있다(Thompson 등, 1990). Taniguchi 등(1995)도 수정후 48시간에 분할된 소 초기배의 배반포 및 부화 배반포율에 있어서 5%의 산소 농도 중에서 배양하는 것이 20%의 산소농도 중에서 배양하는 것보다도 유의하게 높았다고 보고하고 있다. 본 실험의 결과에서도 5% 산소농도 중에서 SOF 배양액을 이용하여 배양할 경우 배양액은 다르지만 20% 산소

농도 중인 조건하의 CR1aa 또는 TCM199 보다도 수정후 7일째에 발생하는 배반포 발생률과 발생한 배반포 중에 7일째에 발생하는 배반포의 수에 있어서 전체 발생된 배반포중 50% 이상이 출현되어 다른 두 배양액보다도 월등하게 높게 나타났다.

2. 융해후의 생존율

체외수정후 7 또는 8일째에 배반포~확장 배반포로 발생한 배반포를 1.5M 또는 1.8M EG에 0.2M sucrose 또는 0.1M trehalose를 각각 첨가한 것을 이용하여 동결하고, 융해후의 생존율을 관찰하고 EG 농도에 따른 sucrose 또는 trehalose가 생존성에 미치는 효과를 검토한 결과 Table 2와 같다. 1.5M EG의 경우, sucrose 또는 trehalose의 첨가 여부에 관계없이 융해후 24시간과 48시간의 생존율에 있어서 차이가 인정되지 않았다. 1.8M EG에 있어서는 유의적인 차이는 인정되지 않았으나 sucrose 또는 trehalose를 첨가하여 동결한 배반포의 융해후 생존율에 있어서 유의한 차이는 인정되지 않았으나, 높은 경향을 보였다. 최근 융해후 직접 이식을 위한 소 배반포의 동결에 이용되는 동해방지제로써는 1.8M EG가 대표적으로 사용되어지고 있고(Ookutsu 등, 1995), EG은 1.8M까지는 배세포에 독성이 거의 없고, 분자량이 작기 때문에 세포 투과성이 높고, 융해시에도 배세포에 커다란 손상을 주지 않으며, 자궁내에서 용이하게 분산되어지는 것으로 사료된다고 보고되어 있다(Voelkel 과 Hu, 1992).

융해시 배세포내외의 삼투압 차이에 의해 세포내로 급격한 수분이동이 일어나고, 이 때문에 배세포가 과도하게 팽만될 위험성이 있다. 즉 삼투압 쇼크

Table 2. Survival rates of IVF bovine embryos after thawing and freezing

Cryopreservant agent	No. of blastocyst	Survival rates(%)	
		24hrs	48hrs
1.5M EG*	40	23(57.5)	16(40.0)
1.5M EG+0.2M sucrose	33	18(54.5)	15(45.5)
1.5M EG+0.1M trehalose	35	19(54.2)	16(45.7)
1.8M EG	60	45(75.0)	42(70.0)
1.8M EG+0.2M sucrose	33	28(84.8)	23(79.7)
1.8M EG+0.1M trehalose	35	29(82.9)	24(78.6)

*Ethylene glycol

참고문헌

에 의해 투명대를 포함한 배세포질의 파괴가 일어날 수 있다. 천연 2당류인 trehalose는 세포외의 내동해제로 알려진 sucrose와 유사하게 비투과성 물질이기 때문에 용해시 배내의 삼투압 쇼크를 완화시키는 것으로 생각된다고 보고되어 있다(Massip 등, 1987). 또한 trehalose는 구조식에 있어서 몇 개의 물분자를 함유한 구조를 하고 있기 때문에 동결전의 동해방지에 의한 탈수과정에서 세포막의 인지질과 반응하여 인지질 2중구조를 보호하는 것에 의하여 세포막의 투과성을 보호하는 작용이 있는 것으로 알려져 있다(Goto 등, 1988). 본 실험에서는 용해후의 전체적인 생존율이 낮기 때문에 충분히 설명을 할 수는 없으나, 1.8M EG에 0.1M의 trehalose 또는 0.2M의 sucrose를 첨가하는 것에 의하여 생존율이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

적 요

본 연구는 TCM199의 공배양 시스템과 SOF, CR1 배양액에 필수 및 비필수 아미노산을 첨가한 배양액이 체외성숙, 수정한 초기배의 배반포 발생과 배반포의 출현율에 미치는 효과를 검토하였으며, 아울러 용해시의 trehalose와 sucrose가 동결용해한 수정란의 생존율에 미치는 효과를 검토하였다.

수정후 7일째의 배반포 발생율에 있어서는 SOF에서 배양한 경우가 TCM199과 CR1a에 비하여 유의하게 높았으며($P < 0.05$, Table 1), 8일째의 배반포 발생에 있어서도 SOF와 CR1a에서 27.9%로 TCM199의 20.7%에 비하여 유의하게 높았다($P < 0.05$). 배반포의 출현율에 있어서도 CR1a와 SOF에 있어서는 80% 이상이 수정후 8일째에 출현하였다.

체외수정후 7 또는 8일째에 배반포~확장 배반포로 발생한 배반포를 1.5M 또는 1.8M EG에 0.2M sucrose 또는 0.1M trahalose를 각각 첨가한 것을 이용하여 동결하고, 용해후의 생존율을 관찰한 결과 sucrose 또는 trehalose를 첨가하여 동결한 배반포가 용해후 생존율에 있어서 유의차는 없었으나 높은 경향을 보였다.

- Gordon I. 1994. Laboratory production of cattle embryos. Cambridge, UK. pp 246-248.
- 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.
- Keefer CL, Stice SL and Dobrinsky J. 1993. Effect of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during bovine *in vitro* maturation on development following *in vitro* fertilization and nuclear transfer. Mol. Reprod. Dev., 36:469-474.
- Keskintepe L, Burnley CA and Brackett BG. 1995. Production of viable bovine blastocysts in defined *in vitro* conditions. Biol. Reprod., 52:1410-1417.
- Kim JH, Niwa K, Lim MJ and Okuda K. 1993. Effects of phosphate, energy substrates, and amino acids on development of *in vitro* mature, *in vitro* fertilized, bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. Biol. Reprod., 48:1320-1325.
- Massip A, Van Der Zwahlen P, Hanzen C and Ectors F. 1987. Resent progress in cryopreservation of cattle embryos. Theriogenology, 27:69-79.
- Ookutsu S, Tanimoto Y, Goto K, Nakanishi Y, Yanagita K and Inohae S. 1995. Direct transfer of bovine blastocysts derived from *in vitro* fertilization after freezing and thawing by using ethylene glycol-trehalose as a cryoprotectant. Japan Emb. Trans. Soci., 17: 177-182.
- Rosenkrans CF and First NL. 1994. Effects of free amino acids and vitamins on cleavage and development rate of bovine zygotes *in vitro*. J. Anim. Sci., 72:434-437.

- 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: 1101-1110.
- Taniguchi S, Goto K, Ookutsu S and Nakanish Y. 1995. Hatching of bovine embryos derived from *in vitro* fertilization in a cell-free, chemically defined medium. *Japan Emb. Trans. Soci.*, 17:170-176.
- Tervit HR, Whittingham DG and Rowson LEA. 1972. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fert.*, 30:493-497.
- Thompson JGE, Simpson AC, Pugh PA, Donnelly PE and Tervit HR. 1990. Effect of oxygen concentration on *in vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J. Reprod. Fert.*, 89:573-578.
- Voelkel SA and Hu YX. 1992. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 37:23-37.
- Xu KP, Yadav BR, Rorie RW, Plante L, Betteridge KF and King WA. 1992. Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized *in vitro* and co-cultured with bovine oviductal epithelial cells. *J. Reprod. Fert.*, 94:33-43.
- 김광식, 서경덕, 송해범. 1998. 소 난자의 체외성숙에 있어서 난구세포부착이 수정후의 배발생에 미치는 효과. *한국수정란이식학회지*, 13(1):29-36.
- 김동훈, 정형민, 박세필, 이훈택, 정길생. 1994. 우 난구세포의 공동배양과 CR1aa 배양액이 체외 생산된 우 수정란의 체외 발생에 미치는 요인. *한국가축번식학회지*, 17(4):271-278.

(접수일자 : 1998. 6. 10 / 채택일자 : 1998. 7. 20)