

Open Pulled Straw(OPS) 방법에 의한 체외배양 동결수정란의

경산돈 이식 : 예비실험 결과

김인덕 · 안미현 · 허태영¹ · 홍문표² · 석호봉[†]
단국대학교 생명자원과학대학 동물자원학과

Sow Transfer of Cultured Freezing Embryos by Open Pulled Straw(OPS) Methods : Preliminary Results

I. D. Kim, M. H. Ahn, T. Y. Hur¹, M. P. Hong² and H. B. Seok[†]

Department of Animal Science, College of Bio-Life Science, Dankook University

SUMMARY

The aims of this study are 1) to test oocytes and embryos collected from *in-vitro* to achieving the valuable protocol by culturing, vitrifying and thawing of oocytes/embryos, and 2) to transfer them to recipient, and finally have resulted in pregnancies from recipient females after surgical or nonsurgical transfer.

In vitro maturation and fertilization were performed according to Funahashi et al (1994). Glucose-free NCSU 23 supplemented with 5 mM sodium pyruvate, 0.5 mM sodium lactate and 4 mg/ml bovine serum albumin for 2 days at 39°C, and 10% fetal bovine serum albumin was added to the culture medium thereafter. Embryos were treated with 7.5 µg/ml cytochalasin-B for 30 min, centrifuged at 13,000 rpm for 13 min and then exposed sequentially to an ethylene glycol(EG) vitrification solution, aspirated into OPS, and plunged/thawed into/from liquid nitrogen. *In vivo* embryos were surgically collected from three donors after AI for control group. Forty-nine embryos were washed 3 times in mPBS + 10% FBS, followed treatments : cultured, centrifuged, vitrified, recovered and transferred to recipients as *in vitro* prepared embryos. Three recipients were transferred individually with 100, 100 frozen embryos derived from abattoir and 34 fresh embryos by surgically, and another three recipients were transferred individually with 150, 150 frozen embryos and 100 fresh embryos by nonsurgically, respectively. all recipient sows exhibited delayed returns to estrus. To our knowledge, these results suggest that required an improved techniques, more vigorous embryos preparation and substitute to gilt with cleaner uterous condition.

(Key words : open pulled straw, vitrification, surgical, nonsurgical, sow transfer)

서 론

수정란 동결 기술은 가축에서 유전능력을 최대
로 향상시키는 중요한 도구의 하나로 낮은 비용으

¹ 축산기술연구소(Department of Livestock Improvement, National Livestock Research Institute, Seungwhan)

² 문성돼지농장(Moonseong Pig Farm, Pyeongtaek)

[†] Correspondence : E-mail : hobong@dankook.ac.kr

로 국제간 유전적 재료를 수출입할 수 있고, 질병 전파의 위험을 최소화 할 수 있어 소와 양에서 빈번하게 이용되고 있으나 돼지에서는 그 상황이 아직 원활하지 못하다고 보고되었다(Beebe 등, 2002; Dobrinsky, 2001). 최근 국내 돼지수정란 동결의 연구동향은 도축돈 난포란을 체외배양하여 얻어진 미성숙란의 동결과 성숙돈에서 인공적으로 과배란 처리 후 채란하여 얻어진 수정란을 동결하는 방법으로 대별할 수 있는데 동결수정란의 생존율은 전자의 경우 9.3~11.3% (이장희 등, 1996), 15.8~25% (이장희 등, 1997), 후자의 경우 10~30% (김상근 등, 1998), 54.2% (정진관 등, 1990)의 낮은 생존율을 보고하고 있다. 문제는 아직까지 돼지 수정란을 유리화동결(vitrification)하여 돼지에 이식하여 얻어진 냉동자돈의 출산이 성공되지 못하였는데 이는 돼지 수정란의 특성이 잘 알려지지 않은 상태에서 실험이 진행되어 왔기 때문에 반추류나 다른 동물들보다 성적이 저조하였다. 돼지에 이식될 수정란은 소와 양의 수정란에 비하여 15℃ 이하의 온도에 극히 예민하여 그 감수성은 수정란의 일령 정도에 따라 다르게 나타난다(Dobrinsky 등, 1997; Dobrinsky, 1997).

수정란이 성숙되면서 수정란을 감싸고 있는 투명대에서 탈출되는 부화시기 즉 peri-hatching stages에서 동결처리에 강한 내열성을 보이고, 동결 보존의 성공적 열쇠는 이와 같이 늦은 성숙단계와 관련이 있다고 보고하였다(Beebe 등, 2002; Dobrinsky 등, 2000). 그러나 투명대에서 부화된 수정란은 외부에 오염되거나 질병 전파의 중요 구실을 하기 때문에 동결 난자의 원래 목적인 국제간 수정란 이식사업에 불리해지는 단점이 있다.

그러므로 높은 지방구 함량으로 인하여 동결에는 민감하지만 단단한 투명대를 갖추고 있는 초기배 수정란을 이용하기 위한 여러 가지 실험들이 수행되어져 왔는데, Dobrinsky (2002) 등은 수정란에 함유한 지방구를 cytochalasin, colchicines, taxol과 같은 세포형성 안정제를 이용하여 난자 세포내의 actin filaments를 depolymerizing시킨 다음 원심분리시켜 한쪽으로 모아진 지방구를 다시 미세 조작기로 제거시킨 다음 동결을 성공하였다. 이 방법은 개개의 수정란에 지방구를 제거하기 위한 미세

조작 처리를 해야 하고, 시간 소모가 많으며 값 비싼 조작기가 필요하기 때문에 상업적으로 이용하는데 문제가 많다(Dobrinsky 등 1997; Dobrinsky, 2001). 따라서 적은 비용으로 쉽고 간편하게 동결에 성공하기 위한 여러 가지 효율적인 연구들이 이루어져 왔다.

그 중 하나가 최근 포유동물수정란의 냉동보존 기술에 있어 획기적인 진보를 일으킨 open pulled straw(OPS)(Vajta 등, 1997ab) 방법이다. 이것은 250 μ l plastic straw에 열을 가하여 길게 뽑아내는 방법으로 본래 직경과 벽의 두께가 반으로 감소하게 되는데, 이는 아주 적은 용량으로 수정란을 동결시킬 수 있을 뿐만 아니라 액체질소로의 직접적인 노출을 방어해준다. 따라서 이러한 두가지 요인들은 모두 온도를 매우 급격히 감소시키는데 기여하므로 ice formation에 의한 수정란의 상해를 감소시켜 줄 수 있어 동결에 있어서 매우 유용할 것으로 기대된다.

호주(Beebe 등, 2002), 미국(Dobrinsky 등, 2000), 불란서(Berthelot 등, 2000), 일본(Kobayashi 등, 1998), 덴마크 (Kuwayama 등, 1998; Vajta 등, 2000)등 선진 몇몇 국가에서 동결 처리한 돼지 수정란에서 자돈 생산을 성공적으로 보고한 예가 있으나 국내에서는 아직 성공한 바가 없으며 선진국에서 냉동수정란으로부터 자돈 생산은 물론 이식 후 생존율 향상과 산자수를 증가시키는 새로운 방법이 계속 소개되고 있어 돼지의 번식 효율을 새로운 차원으로 향상시키는 기술과 방법이 절대적으로 요구되고 있다.

따라서 본 연구에서는 도축돈의 미성숙 난자를 IVM-IVF-IVC 처리를 한 후 OPS를 이용하여 유리화 동결처리로 안정된 동결란을 생산, 이를 경산돈에 외과적, 비외과적으로 이식함으로써 냉동수정란으로부터 자돈을 생산할 목적으로 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 미성숙 난포난자의 회수

난소는 도살 직후 돼지에서 회수하여 35~37℃의 생리 식염수가 담긴 보온병에 침지하여 2~3시

간 이내에 실험실로 운반하였다. 생리 식염수로 난소 주위의 이물질과 혈액을 세척한 다음 난포액은 18 gauge로 장착된 10 mL 주사기로 직경 3~6 nm의 포상 난포들로부터 흡입·회수한 후 15 mL 원심분리관에 분주하여 10분간 정치시켰다. 원심분리관 하단의 침전물을 채취하여 TCM-199 (Sigma-Aldrich Co.USA) 배양액에서 난포구가 균일한 난포란만을 선택하여 다시 TCM-199으로 6회 세척한 후 체외성숙배양에 이용하였다.

2. 난자의 체외성숙

체란된 난자는 형태학적으로 균일하고 세포질이 정상인 것만을 선택하여 체외성숙에 이용하였다. 성숙 배양액은 TCM-199 (Sigma-Aldrich Co. USA)에 pyruvic acid (Sigma Chemical. Co. USA), gentamycin (Sigma Chemical. Co. USA), L-cystein (Sigma-Aldrich Co. USA), β -estradiol (Sigma Chemical. Co. USA), FSH 그리고 pFF (pocine follicular fluid)을 첨가하였고, 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 40시간 동안 성숙배양을 실시하였다.

3. 정자의 준비 및 체외수정

성숙 배지에서 체외배양시킨 난포란들은 0.1% hyaluronidase가 포함된 NaCl 113.1 mM, KCl 3.0 mM, CaCl₂ 10.0 mM, Tris 20.0 mM, glucose 11.0 mM, Na-pyruvate 5.0 mM, gentamycin 50 μ g/mL, 0.4% BSA (fatty acid free, Sigma), caffeine 5mM 이 함유된 mTBM (modified Tris-buffered medium)에 노출시켜 cumulus cell을 제거한 뒤, 다시 mTBM 배지에 세 번 세척하여 준비하였다. 그리고 4-well cultured dish에 mTBM 배지를 0.5 mL씩 분주하고 mineral oil로 피복하여 수정 하루전 충분히 평형시킨 수정 배지에 well당 40~50개의 난포란을 적하하고 수정전 약 30분간 CO₂ 배양기에서 평형시켰다. 체외수정을 위한 정자는 동결정액을 percoll 처리를 한 후에 CO₂ 배양기에서 수정능 획득을 유도시킨 정자 부유액을 성숙 난포란에 주입하여 6시간 매정시켰다.

4. 체외배양 및 우수 배아 선발

체외 수정시킨 수정란들은 수정 6시간 후 난자

에 붙어 있는 cumulus cell을 0.1% hyaluronidase을 이용해서 완전히 제거 후 0.5% BSA를 함유하고, pH 7.4, 280~300 mOsmol로 조정된 glucose-free NCSU 23 media에 세 번 세척하고 4-well culture dish에 glucose-free NCSU 23 media를 0.5 mL씩 분주하고 mineral oil로 피복하여 2~3시간 동안 38.5°C, 5% CO₂로 조절된 배양기에서 평형시킨 배지에 수정란들을 48시간 동안 배양시켰다. 그 후 48시간째 배 발달이 시작된 난자들만 따로 모아 0.1 mg/mL cysteine, 10 IU/mL eCG, 10 IU/mL hCG, 10 ng/mL EGF, 0.4% BSA, 10% FBS, 10% pFF가 첨가된 NCSU 23에 옮겨서 체외 배 발달을 유도 하였다. 체외 발달을 유기한지 6일째에 우수한 상실배와 배아를 선발하였다.

5. 동결과 융해

Beebe 등 (2002)의 방법에 따라 동결 융해하였다. 동결과정은 선발된 체외 수정란과 체내 수정란을 30분동안 Cytochalasin B (Sigma-Aldrich Co. USA) 처리를 한 후에 13,000 rpm에서 13분 동안 원심분리하였다. 그리고 각각 처리를 한 난포란의 유리화 동결은 DPBS + 10% FBS 용액 (vitrification solution 1 : VS 1)에 1분간 2회 반복 처리하고 2M EG 용액 (VS 2)에 5분간 침지 후 다시 7% PVP 용액 (VS 3)에 1분간 침지하여 OPS loading vessel에 난포란을 올려 놓고 LN₂에 담겨진 비이커에 즉시 침지함으로써 유리화 동결을 하였다(Fig 1). 유리화 동결된 난포란들은 LN₂에서 최소 2주 이상 보관하였으며, 융해는 이식하기 전 LN₂로부터 2 M EG 용해액에 각 난포란을 2분간 침지시키고 다시 0.5 M EG 용해액에 2분간 침지 후 DPBS + 10% FBS 용액에 2.5분씩 2회 반복처리하여 역순으로 평행한 다음 신선한 배양액으로 3~4회 세척을 실시하였다(Table 1). 이식하기 전 NCSU 23 배지에서 6~8시간 배양시켰다.

6. 공란돈 선발과 수정란의 회수

본 연구의 대조군으로 사용할 목적으로 *in vivo* 수정란을 생산하기 위해 공란돈을 선발하고 수정란을 회수하였다. 공란돈은 1~2회 이상의 규칙적인 발정을 보인 것을 선발하였으며 갈색 듀룩계

통의 체중 80~100 kg의 미경산돈을 공시하였다. 공란돈의 과배란처리방법은 Brüßow 등(2000)과 이광원 등(1988)의 방법에 준하였다. 즉, 1,000 IU PMSG주사 후 72시간에 500 IU hCG 접종을 한 다음 24~38시간 후에 수정시켰으며 GnRH로 배란을 유도하였다. 수정란 채란방법은 외과적으로 개복절개하여 catheter에 의한 자궁각에서 직접 채란하였다(Fig. 2).

7. 이식을 위한 수정란의 준비

전날 유태한 동결 *in vitro* 수정란과 신선한 수정란 그리고 *in vivo*에서 직접 채란한 수정란(Fig. 3)을 각각 plastic straw에 배양액과 공기를 적절히 주입하여 수정란이 중앙에 오도록 장착시킨 후 portable incubator (Minitüb, Germany)에 담아 운반시킨다. 이때 전체 배양액은 0.5 mL 정도의 소량을 주입하도록 조정하였다.



Fig. 1. OPS loading and vitrification.

Table 1. Protocols of vitrification and warming steps

Group	Vitrification solution	Warming solution
Well 1 (VS 1)	DPBS +10% FBS (1min)	DPBS +10% FBS +1MEG (2min)
Well 2 (VS 1)	DPBS +10% FBS (1min)	DPBS +10% FBS +0.5M EG (2min)
Well 3 (VS 2)	DPBS +10% FBS +2M EG (5min)	DPBS +10% FBS (2.5min)
Well 4 (VS 3)	DPBS +10% FBS +7%PVP (1min)	DPBS +10% FBS (2.5min)

EG : ethylene glycol; PVP : polyvinyl-pyrrolidone, stage : 39°C.

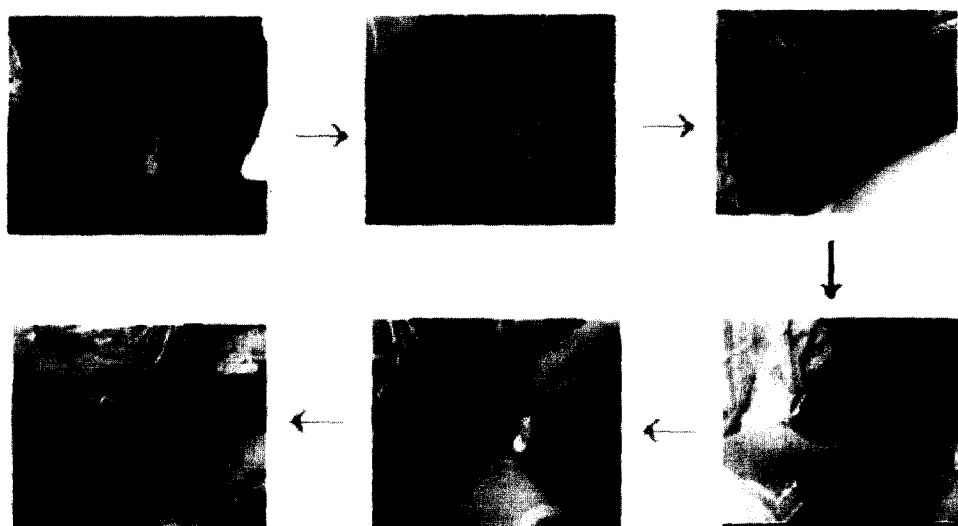


Fig. 2. Embryo recovery from donor gilts.

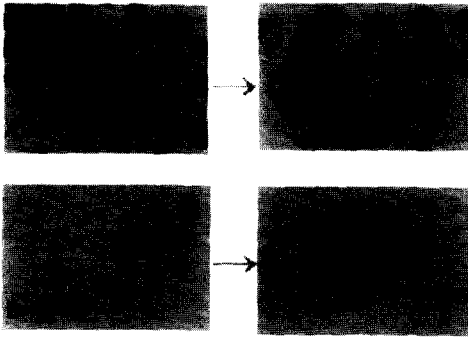


Fig. 3. Cultured fresh embryos derived from *In-vivo*(A) and *In-vitro*(B).

8. 수정란의 외과적·비외과적 이식

수정란의 외과적, 비외과적 이식은 Brüssow 등(2000)과 Dobrinsky 등(2000) 방법을 응용하였다. 본 연구에 이용된 6마리의 수란돈들은 모두 최소 4번 이상의 임신 경험이 있는 경산돈(White Yorkshire, 150 kg±20)으로 선발하였고, 1,000 IU PMSG로 발정동기화를 실시한 후 4일째 되는 날 외과적 비외과적 이식을 하였다. 외과적 이식은 각 3마리의 돼지 복부를 절개하여 자궁각을 신속히 찾아낸 후 CL을 확인하고 자궁각의 상단부에 주사침으로 주입구멍을 내고 카테타에 연결한 straw를 직접 자궁각에 찔러 이식을 실시하였다(Fig. 4). 비외과적 이식은 기존 돼지 인공수정용 polyurethane tubing (inv technologies, France)을 150 cm 정도의 길이로 자체 제작한 카테타를 이용하여 준비된 수정란

을 3마리의 돼지에 한쪽 자궁각에 각각 이식하였다(Fig. 5). 이때 tubing 내에 남은 여액은 공기를 이용하여 완전히 주입하였고 이식한 후 카테타에 수정란의 잔존 여부를 현미경으로 확인하였다.

9. 임신 여부의 검사

이식한 후 임신 여부는 RE법과 간이 임신진단기(Medapar, USA)로 예비측정한 다음 초음파임신진단기(model : SDL-32, Shimadzu, Japan)를 이용하여 최종 확인하였다. 임신 여부의 검사기간은 이식 후 2주부터 8주까지 확인하였다.

결 과

1. 외과적 이식

외과적으로 3두를 이식하였는데, 아래의 Table 2에서 보는 바와 같이 *In vitro* frozen 수정란을 2두에 100개씩, 나머지 1두에는 대조군으로서 *In vivo* fresh의 수정란을 34개로 각각 이식을 하였다. 경산돈은 4~9산차의 수란돈을 이용했으며, 이식 수정란은 compact morula부터 blastocyst stage의 수정란을 이식하였다. 수정란의 상태는 frozen의 경우 fair/poor, *In vivo* fresh의 경우 excellent를 나타내었다. 이식 후의 임상소견을 보면 frozen 수정란을 이식한 2두는 normal한 상태를 보였지만, fresh 수정란을 이식한 돈의 경우 자궁내막염(endometritis)을 보였다. 이식 결과 모두 지연성 발정

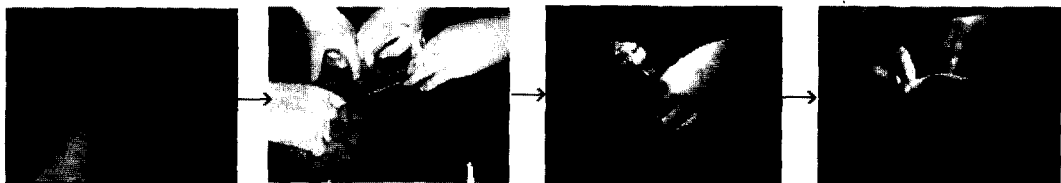


Fig. 4. Surgical embryo transfer



Fig. 5. Non-surgical embryo transfer

Table 2. Sow transfer by surgical transfer

No. of sow ¹	Source of embryos ²	No. of embryos transferred	Transfer condition		Clinical finding after transfer	Results
			Recip.	Embr. ³		
S-1	<i>In vitro</i> , frozen	100	9 th farrow	F/P	Nomal	Delayed return
S-2	<i>In vitro</i> , frozen	100	4 th farrow	F/P	Nomal	Delayed return
S-3	<i>In vivo</i> , fresh*	34	4 th farrow	EX	Endometritis	Delayed return

¹ S : surgical transfer.

² Embryo quality : EX-excellent, F/P-fair/poor.

³ Embryo stage : Compact morulae to blastocysts.

* Control group : Fresh embryos collected from superovulated donor gilts.

Table 3. Sow transfer by non surgical transfer

No. of sow ¹	Source of embryos ²	No. of embryos transferred	Transfer condition		Clinical finding after transfer	Results
			Recip.	Embr. ³		
NS-1	<i>In vitro</i> , frozen	150	5 th farrow	F	Nomal	Delayed return
NS-2	<i>In vitro</i> , frozen	150	4 th farrow	F	Nomal	Delayed return
NS-3	<i>In vitro</i> , fresh*	100	4 th farrow	G	Abdominal hernia	Delayed return

¹ NS : non-surgical transfer.

² Embryo quality : G-good, F-fair.

³ Embryo stage : Compact morulae to blastocysts.

* Control group : Fresh embryos collected from *in vitro*.

(delayed return)을 보였다.

2. 비외과적 이식

비외과적으로 3두를 이식하였으며, 3두 중 2두는 *In vitro* frozen을 150개씩, 나머지는 대조군으로 *In vitro* fresh 수정란을 100개를 각각 이식하였다(Table 3). 경산돈은 4~5산차의 수란돈을 이용했으며, 이식 수정란은 compact morula부터 blastocyst stage의 수정란을 이식하였다. 수정란의 상태는 frozen의 경우 fair, fresh의 경우 good을 나타내었다. 이식 후의 임상 소견을 보면 frozen 수정란을 이식한 2두는 normal한 상태를 보였지만, fresh 수정란을 이식한 돈의 경우 탈장 (Abdominal hernia)을 보였다. 이식 결과 모두 자연성 발정(delayed

return)을 보였다.

고 찰

과거 30년 이상 가축의 수정란 이식 (ET)이 국제적인 산업으로 발달해 왔으며, 소의 경우 매년 500,000개 이상의 수정란이 회수되어 이식 혹은 동결되어 50% 이상이 회수 후 동결하여 이용되어지고 있다(Thibier M, 2000). 이밖에도 생쥐, 토끼, 양 등 다른 실험 동물들에서도 많은 연구 성과와 체계가 확립된 반면 돼지의 경우는 다른 동물들보다 난자내에 많은 지방구를 포함하고 있어 그 동결에 대한 연구가 지금까지도 매우 어려운 실정이고 그 성과가 아직 미흡하다.

고농도의 동결 보존액을 사용함으로써 난자 및 배아의 빙결 형성을 방지하여 포유류 배아의 동결 보존에 적용할 수 있는 새로운 동결 방법인 유리화동결법(vitrification)도 저온에 극도로 예민한 돼지의 경우 세포내에 빙결이 형성되는 문제점을 완전히 극복할 수 없어 아직도 극복해야 할 과제로 남아 있다. 따라서 돼지의 동결 수정란을 이식하여 자돈을 생산한다는 것은 새로이 향상된 기술과 방법이 절대적으로 요구되어진다.

돼지의 수정란을 이식하는 방법에는 외과적 방법과 비외과적 방법의 두 가지가 있으며 외과적보다 비외과적이 비수술형태로서 선호되나 수태율이 낮은 것이 단점이다. 돼지의 비외과적 이식 방법은 정액이식방법과 다르게 수정란을 발정기 지난 후 자궁각 깊숙이 삽입해야만 수태가 가능하다. 따라서 이식기구가 외부의 감염이 배제된 상태에서 자궁경관에 쉽게 삽입되어야 가능하다. 최근 일본, 스페인, 네덜란드에서 비외과 수술기를 고안하여 이식효율을 높이고 있으나(Yonemura 등, 2003; Caamano 등, 2003; Ducro-Steeverink 등, 2004) 아직까지 극대화할 만한 기구가 개발되지 못하고 있으며 앞으로 국제적으로 새로운 이식용 기구개발에 초점을 두고 있다. 돼지의 수정란 이식부위는 좌우 어느 쪽 난관 또는 자궁각에 이식하여도 양쪽 자궁각에 착상하고 수태되기 때문에 편측이식하더라도 좌우 자궁각내에 일정한 간격으로 분산 착상하게 된다.

본 연구에서는 체외배양한 돼지수정란을 Beebe 등(2002)의 방법에 따라 동결하거나 생체배양된 수정란을 비동결하여 대조군으로하여 6마리의 경산돈에 각각 외과적 비외과적으로 이식하였다. 외과적, 비외과적 이식을 한 6마리의 경산돈 모두 지연성 발정(delayed return)을 나타내었다. 이식한 후 외과적 이식에서 비동결수정란을 이식한 경우 자궁내막염이 비외과적 이식에서 비동결 수정란을 이식한 경우 복강탈장이 발생하였으나 그 외 동결 수정란을 이식한 경우는 이식후 임상적이상이 없었다. 복강탈장과 자궁내막염은 시술미숙과 야외 수술에 의한 감염 또는 수정란 오염에 의한 것이 중요 원인인 것으로 생각된다. 비외과적 이식의 경우 난자의 이동과 수송도중 좋지 않은 영향과 이

식기 주입 미숙이 중요 원인으로 생각된다. 이러한 결과는 보다 능숙한 기술의 중요성, 더 좋은 활력의 수정란 준비 그리고 청결한 자궁 상태(미경산돈 이용)가 요구됨을 보여주었다.

Berthelot 등(2000)은 unhatched blastocysts 상태의 수정란을 미경산돈으로부터 회수하여 dimethyl sulfoxide (Me2SO)와 ethylene glycol (EG) 그리고 Sucrose를 포함한 용액에 평형시킨 다음 OPS 방법으로 동결 용해하여 11마리의 모돈에 400개의 배아를 이식한 결과 38마리의 자돈이 생산되었다. Dobrinsky 등(2000)은 *in vitro* 돼지 배아의 유리화 동결시 cytochalasin B를 전처리함으로써 유리화 동결 용해 후에 7마리의 모돈 내에 224개의 배아를 이식하여 29 마리의 자돈을 생산하였다는 연구 결과를 발표하였으며, Beebe 등(2002)은 Kobayashi 등(1998) 방법에 따라 early blastocysts를 8 M ethylene glycol과 7% PVP를 포함한 동결액으로 처리한 후 OPS 방법으로 동결 용해 후 4마리에 모돈에 147개의 배아를 이식한 결과 5마리의 자돈을 생산할 수 있었다. 또한 Kouji 등(2003)도 돼지의 배아를 morulae와 early blastocysts 상태에서 다른 전처리 없이 microdroplet 방법으로 동결 용해하여 5마리의 모돈 내에 171개의 배아를 이식한 결과 17마리의 자돈을 생산했다고 보고하였다. 이처럼 몇몇 국가에서 동결처리한 돼지 수정란을 수란돈에 이식하여 자돈을 성공적으로 생산한 보고가 있으나 국내에서는 아직 자돈 생산을 성공한 예가 전혀 없으며 이에 관련된 연구 성과도 거의 없는 실정이다.

비록 본 연구에서 돼지 동결 수정란으로부터의 자돈 생산을 이루지는 못하였으나 앞으로 국내외 연구기관에서 이루어진 돼지 수정란 동결과 이식에 대한 연구를 바탕으로 여러 가지 기술들이 안전한 체계 하에서 계속적으로 보안 및 개선되어진다면 국내에서도 돼지 유전자원 보존을 'ice bank' 형태로 장기간 보존 활용할 수 있어 차세대 생명공학 연구의 기초가 되는 ice gene bank 구축이 가능하리라 사료된다.

적 요

본 연구는 도축돈의 난소로부터 난자를 채취하여 체외배양시킨 후 세포 안정제와 원심분리 그리고 OPS를 이용한 유리화동결 하였다. 동결 용해한 수정란을 경산돈에 외과적 또는 비외과적으로 이식하여 자돈을 생산하는 것을 목적으로 수행하였다.

- 도축돈 난소로부터 채란되어진 돼지 미성숙난은 Funahashi 등(1994) 방법에 따라 체외성숙-수정-배양하였다. 체외배양액은 glucose- free NCSU 23을 이용하였으며, 5일째에 10% fetal bovine serum (FBS)을 첨가 배반포로 발달을 유도하였다.
- 체외배양된 수정란은 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cytochalasin B에 30분 처리 후 13,000 rpm에 13분간 원심분리하였고, ethylene glycol(EG) 동결액으로 처리한 뒤 OPS를 이용하여 동결 · 용해하였다.
- 동결수정란과 비동결수정란을 plastic straw에 loading한 후 3두에는 경산돈에 외과적 방법으로 각각 100개, 100개의 동결수정란과 대조군으로 34개의 비동결수정란을 이식하였고 다른 3두에는 비외과적 방법으로 각각 150개, 150개의 동결수정란과 대조군으로 100개의 비동결수정란을 각각 이식하였다. 외과적이식돈의 대조군에 사용한 신선수정란은 비경산돈 3두에서 채란하였다.
- 이식 결과 6두 모두 지연성 발정을 보였으며 이중 동결수정란이식돈은 임상적으로 정상이었으나 비동결수정란을 이식한 경우는 자궁내막염과 복강탈장이 관찰되었다. 주요 원인은 시술시 기술의 미숙과 야외수술에 의한 감염, 난자의 이동과 수술에 의한 영향 그리고 주입 미숙 등이 주요 원인인 것으로 생각되며 용해 후 생존효율이 높은 수정란의 준비, 이식 기술의 개선과 자궁상태가 청결한 비경산돈의 이식으로 임신율을 높일 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

Beebe FS, Cameron RDA, Blackshaw AW, Higgins

A and Nottle MB. 2002. Piglets born from vitrified zona-intact blastocysts, *Theriogenology*, 57:2155-2165.

Berthelot F, Martinat-Botte F, Locatelli A, Perreau C and Terqui M. 2000. Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method. *Cryobiology*, 41(2):116-124.

Brüssow KP, Torner H, Kanitz W and Rátky J. 2000. *In vitro* technologies related to pig embryo transfer. *Reprod. Nutr. Dev.*, 40:469-480.

Caamano JN, Wu GM, McCauley TC, Rieke AR, Cantley TC, Mao J, Didion BA, Prather RS, Martinez EA and Day BN. 2003. Non-surgical embryo transfer in swine : preliminary results. *Theriogenology*, 59(1):361, abstracts.

Dobrinsky JR, Long CR and Johnson LA. 1997. Stability of microfilaments during swine embryos cryopreservation. *Theriogenology*, 47: 343, abstracts.

Dobrinsky JR. 1997. Cryopreservation of pig embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 52:301-312.

Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR and Johnson LA. 2000. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol. Reprod.*, 62(3): 564-570.

Dobrinsky JR. 2001. Cryopreservation of swine embryo : A chilly past with a vitrifying future. *Theriogenology*, 56:1333-1344.

Ducro-Steverink DWB, Peters CGW, Maters CC, Hazeleger W and Merks JWM. 2004. Reproduction results and offspring performance after non-surgical embryo transfer in pigs. *Theriogenology*, 62:522-531.

Funahashi H, Stumpt TT, Terlouw SL, Cantley TC, Rieke A and Day BN. 1994. Developmental ability of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 41:1425-1433.

Kuwayama M, Holm P, Jacobsen H, Greve T and Callesen H. 1997. Successful cryopreservation

- of porcine embryos by vitrification. The Vet. Rec., 141(14):365.
- Kobayashi S, Takei M, Kano M, Tomita M and Leibo SP. 1998. Piglets produced by transfer of vitrified porcine embryos after stepwise dilution of cryoprotectants. Cryobiology, 36(1):20-31.
- Kouji M, Misae S, Shuji S and Norio S. 2003. Successful production of piglets derived from vitrified morulae and early blastocysts using a microdroplet method. Theriogenology, 8836:1-8.
- Thibier M. 2000. The IETS statistics of embryo transfer in livestock in the world for the year 1999: A new record for bovine *in vivo*-driven embryos transferred. Embryo transfer Newsletter, 18:24-28.
- Vajta G, Booth PJ, Holm P, Greve T and Callesen H. 1997a. Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw(OPS) method. Cryo-Letters, 18:191-195.
- Vajta G, Holm P, Greve T and Callesen H. 1997b. Vitrification of porcine embryos using open pulled straw method. Acta. Vet. Scand., 38:349-352.
- Yonemura I, Miyamoto K and Nishida M. 2003. Non-surgical transfer of porcine embryos. Theriogenology, 59(1):378, abstracts.
- 김상근, 이명현, 남윤이. 1998. 돼지 수정란 및 미성숙난자의 동결융해 후의 생존율에 관한 연구. 한국가축번식학회지, 22(2):187-194.
- 이광원, 손동수, 김상철, 김일화, 김대규, 유일선, 이종관, 지설하, 박창식, 석호봉. 1988. 돼지 수정란이식에 관한 연구 II. 수정란의 회수 및 이식. 한국축산학회지, 30(7):403-405.
- 이장희, 김창근, 정영채. 1996. 돼지 난포란의 동결과 체외수정. 한국가축번식학회지, 21(4):335-362.
- 이장희, 김창근, 박충생. 1997. 동결-융해된 돼지 난포란의 생존성에 대한 항해동제와 평형시간의 영향. 한국수정란이식학회지, 12(3):315-324.
- 정진관, 장원경, 유승환. 1990. 돼지 수정란의 동결에 관한 연구. 한국축산학회지, 32(8):445-449.

(접수일: 2004. 2. 15/ 채택일: 2004. 4. 24)