

한우 체내·외 유래 소 수정란의 생존성 비교

조상래*, 최선호, 최창용, 손준규, 고응규, 이풍연, 조인철, 한상현, 고문석, 김현종
농촌진흥청 국립축산과학원

Comparison of Viability on *In Vivo* and *In Vitro*-derived Bovine Embryos in Korean Native Cattle (Hanwoo)

Sang-Rae Cho*, Sun-Ho Choi, Changyong Choe, Jun-Kyu Son, Yeoung-Kyu Ko, Poongyeon Lee, In-Cheol Cho, Sang-Hyun Han, Moon-Suck Ko and Hyun-Jong Kim

National Institute of Animal Science, RDA, Jeju 690-150, Korea

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the efficiency of the conventional slow freezing and vitrification methods for cryopreserving *in vivo* and *in vitro*-produced bovine embryos. Morphology of post-thawed embryos was evaluated and normal embryos were used for successive culture for 72 h. In experiment I, In embryo viability, There was no significant differences in blastocyst re-expansion rates were found between *in vivo* and *in vitro* embryos(89.6% vs. 81.5%). whereas hatched-BL and total cell number rates was significantly higher ($p<0.05$) for *in vivo*-derived embryos (76.9%, 136 ± 3.6 vs. 43.4%, 107 ± 3.8). In experiment II, There was no significant differences in blastocyst re-expansion and Expansion-BL rates were found between in slow freezing and vitrification methods (91.3% vs. 85.7% and 71.4% vs. 75.0%, respectively). in conclusion, These results suggested that the field application for bovine embryo transfer is in part supported by improvements of technologies in embryo conventional slow freezing and vitrification cryopreservation.

(Key words : bovine, embryos, *in vitro*, *in vivo*, cryopreservation)

서 론

포유동물 수정란들의 동결보존은 상업적인 수정란이식을 위한 필수적인 부분이다(Leibo 등, 1986). 또한 소 수정란 동결에 대한 연구는 최근 기후 변화에 따른 지구의 식생 변화와 희귀 품종 및 멸실 위험 동물의 보존을 통한 개체의 증식과 복원 등 그 이용 측면이 다양화 되고 있다. 포유동물의 수정란 동결보존은 완만동결(conventional freezing)과 초자화동결(vitrification) 방법을 주로 이용하고 있다(Fahning 등, 1992; Pereira 등, 2002). 완만동결은 가장 일반적인 방법이며, 수정란을 직접 이식할 수 있는 방법이지만, 초자화 동결은 조작은 간편하고 비용이 절약되는 경제적인 특징이 있으나, 현장에서 직접 사용하는 것은 어려운 편이다. 왜냐하면 고농도의 동결보호제 성분 때문에 순차적인 용해 절차가 뒤따르는 번거로운 단점 때문이다(Saito 등, 1994). 수정란의 동결에서 가장 중요한 사항은 동결 시 발생하는 빙정 형성이 일어나지 않도록 동결보호제를 사용하게 되며, 수정란의 생존성은 체내수정란 보다 체외에

서 생산된 수정란이 동결 용해 과정에서 훨씬 더 민감하다(Hasler 등, 1995). 이러한 결과는 수정란의 배양 조건과 발달 단계와 같은 다양한 원인에 의해서 생존성의 결과는 다르게 나타날 수 있다고 보고하였으며(Leibo와 Loskutoff, 1993), 마찬가지로 체외수정란 배양 시 초기 배발달에 있어서 수많은 지방 구들이 세포내에 존재하기 때문에 체외수정란의 생존율은 급격히 저하된다(Plante와 King, 1994). 수정란의 생존성 향상과 상업적으로 수정란 활용을 위해서는 초기배 수정란보다는 배반포 수정란을 이용하는 것이 좋으며 효과적이다(Hochi 등, 1996). 수정란의 동결과 용해에 따른 생존율 개선을 위해서 많은 연구자들이 연구를 수행(Martino 등, 1996; Vajta 등, 1998; Lane 등, 1999; Cho 등, 2002; Misumi 등, 2003; Cremades 등, 2004; Kuwayama 등, 2005)하였으며, 특히 난자와 수정란의 초자화 동결 시 다양한 기구들을 활용하여 연구를 진행하기도 하였다(Rios 등, 2010). 따라서 본 연구는 소 체내·외에서 생산된 수정란의 동결성 비교를 통한 산업적 활용의 기초 자료를 얻기 위해서 실시하였다.

* Correspondence : E-mail : chosr@korea.kr

재료 및 방법

1. 체외성숙

한우 도축 암소로부터 적출된 난소를 회수하여 실험실로 운반하여 실험에 공시하였다. 본 실험의 조건에 맞춘 난소 수송 온도는 0.9% 생리식염수의 온도를 25°C 조건으로 맞추어 보온병에 담아 실험실로 2시간 이내로 운반하였다. 직경이 2~6 mm의 난포로부터 난포란을 난포액과 함께 18 gauge 주사침이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 흡입 방법으로 난모세포를 채취하였다. 난포란의 선별은 실체현미경하에서 체외성숙을 위한 난모세포는 난구세포가 치밀하고 세포질이 균일한 1, 2등급(IETS 기준)만을 사용하였다. 체외성숙은 TCM199(Sigma, U.S.A)를 기본 배양액으로 5% fetal bovine serum(FBS, Gibco, U.S.A), 10 µg/ml LH(Sigma, U.S.A) 및 35 µg/ml FSH(Sigma, U.S.A)를 첨가하여 38.5°C, 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 22시간 동안 실시하였다.

2. 체외수정

체외수정에 사용된 정액은 한우동결정액(KPN)을 이용하였으며, 정자분리는 BO medium을 이용하여 1,800 rpm에서 5분 동안 2회 원심분리 후 체외수정용 배양액에서 1회 원심 분리한 후 체외수정에 사용하였다. 사용된 정액의 최종 농도는 1×10⁷ sperm/ml 이었다. 체외성숙된 난포란의 난구세포 일부를 제거하기 위해서 0.1% PVA(polyvinyl alcohol)가 첨가된 D-PBS(Sigma) 배양액에서 약 10초간 vortexing 후 수정 배양액인 50 µl IVF 100 (IFP, Japan) 50 µl 미소적에 약 20개의 체외성숙된 난포란과 정자를 공동 배양하여 38.5°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 6시간 동안 체외수정을 유도하였다.

3. 수정란의 체외배양

수정란의 체외배양은 체외수정 후 무혈청 배양액 IVMD(IFP, Japan)와 난구세포로 공동 배양을 2일간 실시하였으며, 그 이후 CR1aa는 배양액에 0.3% Bovine Serum Albumin(Sigma, U.S.A)를 첨가하여 7, 8, 9일까지 배양하였다. 배양액 교환은 2일째 4일째, 6일째 3회 실시하였다. 수정란 배양 조건은 38.5°C 온도에서 5% CO₂, 5% O₂ 그리고 90% 질소가 포함된 배양 조건에서 수정란을 배양하였다. 분할률은 체외수정 후 48시간에 확인하였으며, 3일과 5일째 신선한 배양액으로 배양액 교환을 하였으며, 수정란은 수정 후 7~9일째 생산된 배반포 수정란을 실험에 공시하였다.

4. 체내수정란 생산

체내수정란 생산을 위해서 한우 공란우의 처리는 발정발현과 무관하게 progesterone releasing intravaginal device인 CIDR

(CIDR-plus, InterAg, New Zealand)을 질 내에 삽입하고 CIDR 삽입 7~8일째부터 FSH(Antorin R-10[®], Kawasaki, Japan) 28 AU를 감량법으로 12시간 간격으로 4일간 나누어서 근육주사를 실시하였으며, FSH 투여량은 5회째에 PGF₂α 제제인 Lutalyse[®](Belgium)를 25 mg, 6회째에 15 mg을 근육주사하였고, CIDR을 제거하였다. 발정징후를 나타내는 공란우는 12시간 간격으로 2회 인공수정을 실시하였다, 인공수정 후 7일째 비외과적인 방법으로 수정란을 채란하여 수정란 동결 실험에 공시하였다.

5. 수정란의 동결 보존

수정란의 완만 동결을 위해서는 1.8M Ethylene Glycol(IFP, Japan)을 사용한다. 동결은 Autocomputer Programmable 동결기(CL 863, U.S.A)를 이용하였다. 수정란은 0.25 ml 스트로우에 장착한 후 스트로우 양끝에는 D-PBS 층과 공기층을 형성하고 동결보호제와 수정란이 혼합된 부분이 스트로우 중간에 위치하게 한 다음 스트로우를 동결기의 chamber에 넣고 약 3분간 정지(-7°C, 10분간)한 후, 구리선이 감겨진 핀셋을 이용하여 식빙(seeding)을 실시하였다. 그 후 -35°C까지 동결 시킨 후 액체질소에 침지하여 1개월 이상 보관 한 다음 생존을 실험에 공시하였다. 동결수정란의 용해는 37°C로 가온된 HEPES-Buffer 배양액에서 스트로우를 용해한 후 동일한 배양액에서 3회 이상 세척한 다음 인큐베이터에서 수정란 배양을 통한 생존을 평가를 실시하였다. 수정란 초자화동결은 VS1(10% Glycerin, 0.1 M glucose, 0.1 M sucrose, poly ethylene glycol(PEG) 1%)에서 5분간 처리 후, VS2(10% glycerin, 10% EG, 0.2 M glucose, 0.2 M Sucrose, PEG 2%)에서 5분, VS3(10% glycerin, 30% EG, 0.3 M glucose, 0.3 M sucrose, PEG 3%)에서 1분간 침지 후 0.25 ml 스트로우에 장착 후 액체질소 위에서 10초간 냉각 후 액체질소에 침지하여 수정란을 동결하였다. 그리고 open pulled straw는 가는 유리관을 이용하여 약 2.3 mm 직경을 만들어 사용하였으며, 수정란과 항동해제 양은 약 3 µl 정도 혼입하여 초자화 동결을 실시하였다. 동결 수정란보관은 최소 2주간 이상 보관을 실시하였다. 수정란 용해 후 생존을 확인을 위하여 스트로우를 보관고에서 꺼내어 공기 중에 약 10초간 노출 시킨 후 37°C로 가온된 HEPES-Buffer 배양액에 직접 침지 후 0.13 M sucrose 첨가 배양액에서 4분간, 0.075 M sucrose에서 5분 동안 처리 후 체외배양액으로 옮겨 1회 세척한 다음 배양 48시간과 72시간에 수정란의 재확장 및 부화 여부로 생존성을 판단하였다.

6. 통계처리

수정란의 동결 후 체내 및 체외수정란의 생존을 조사에 대한 결과 비교는 Chi-square Test 방법을 이용하여 유의성 검정

($p < 0.05$)을 실시하였다.

결과 및 고찰

Table 1은 도축 난소를 이용한 체외수정란과 한우 과배란처리 프로그램으로 생산된 수정란을 완만동결 방법으로 동결한 후 생존율을 조사한 결과이다. 실험에 공시된 체내 및 체외수정란은 인공수정 후 7일째 생산된 배반포기 및 확장배반포기 수정란을 사용하였다. 본 실험에서는 29개의 수정란을 사용하여 수정란이 재확장된 비율은 89.6%(26/29), 체외수정란의 81.5%(53/65)의 결과를 보였으나, 두 처리군간의 유의적인 차이는 보이지 않았다. 그러나 확장된 수정란 중에서 수정란이 부화된 경우는 체내수정란을 96시간까지 배양하였을 때 부화된 수정란을 조사하였다. 체내수정란은 76.9%(20/26), 체외수정란은 43.4%(23/53)가 부화되었다. 체내수정란에서 유의적으로($p < 0.05$) 높은 결과를 보였다. Abe 등(2003)은 혈청이 첨가되지 않은 배양액 IVMD101에서 배양 후 수정란의 생존율은 배반포 단계에서 94.7%와 부화된 수정란은 74.7%의 결과를 보고하였다. 본 실험의 결과와 비교하였을 때보다는 다소 높은 경향을 보였으나, 혈청이 첨가된 그룹에서는 75%(48/65) 생존율과 50%(32/64)의 부화율을 보였다. 본 실험에서도 혈청이 첨가되지 않은 배양 시스템을 활용하였다. 수정란의 생존율은 동결 시 세포의 손상을 최소화 시키는 것이 중요한 요인이다. 따라서 혈청의 첨가로 생산된 수정란의 세포기관 내 지방 성분의 침착됨에 따라서 태아의 발달에 영향을 주어 염색체 이상에 따른 비정상적인 태아를 분만할 확률이 높아진다고 보고하였다. 또한 수정란의 부화율에 영향을 미치는 요인 중에서 산소 소비율($F \times 10^{14} / \text{mol s}^{-1}$)이 $F \geq 1.0$ 일 때 수정란의 확장률과 부화율이 가장 높다고 보고하여(Abe 등, 2003) 수정란의 동결성은 배양 체계와 동결보호제 종류 그리고 산소 소비율과 밀접한 관련이 있는 것으로 사료된다, 그리고 산소 소비량은 수정란의 착상에도 중대한 영향을 미치는 것으로 보고하였다(Mills와 Brinster, 1967). 생존 수정란의 총세포수 조사는 체내수정란이 136 ± 3.6 개, 체외수정란이 107 ± 3.8 개로서 체내수정란에서 유의적으로($p < 0.05$) 높은 결과를 나타내었다. 체내수정란의 생

생존성이 체외수정란보다 상대적으로 높은 것은 배양 조건에 따른 수정란의 질적인 차이로 사료된다. 최근에는 체외수정란 생산 기술이 향상되어 서로 다른 배양 조건하에서 다양한 배양액 조성을 통해서 성공적인 효과를 거두는 것으로 보고하고 있다(Gray 등, 1992). 체외수정란의 안정적인 생산 시스템은 유전 자원의 활용성 제고를 위해서 더 많은 연구가 수행되어야 할 것이며, 특히 수정란이식을 위해서는 우수한 유전력을 지닌 개체 또는 멸실 위험 축종에 대한 유전자원의 확보를 위하여 생체 내 난자 채취(Ovum Pick Up) 및 도축 난소 이용 개체 식별로 우수한 혈통 보유축에 대한 체외수정란을 생산하기 위해서도 배양 체계에 대한 연구는 지속적으로 연구가 수행되어야 할 것이다.

Table 2의 실험에서는 체내수정란을 사용한 완만동결과 초자화 동결간의 수정란의 생존율을 비교 조사한 결과이다. 체내수정란으로 완만동결을 실시 후 융해하였을 때 수정란의 배반포로의 재확장률은 91.3%의 결과를 보였으며, 이들 수정란을 48시간 이상 배양하였을 때 수정란의 확장배반포율은 71.4%의 결과를 보였으며, OPS 방법에 따른 수정란의 동결성 조사에서 재확장률은 85.7%였으며, 재확장 수정란 중에서 확장배반포까지 발달한 수정란은 75%의 결과를 나타내었으나, 완만 동결법과 OPS 동결 방법 간에는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 수정란의 동결성을 향상 시키기 위해서는 무엇보다도 수정란에 대한 특징을 잘 이해하고 있어야 하며, 발달 단계에 따른 수정란의

Table 2. Effect of two freezing methods on survival of *in vivo* produced bovine embryos

Freezing methods	No. of used embryos	No. of surviving embryos (%)	
		Re-expansion	Expansion-BL
Slow freezing	23	21 (91.3)	15 (71.4)
OPS vitrification	14	12 (85.7)	9 (75.0)

Different superscripts indicate significant difference ($p < 0.05$). Replicates 5.

Table 1. Viability of post conventional slow frozen-warmed *in vivo* and *in vitro* embryos

Embryo source	No. of used embryos	No. of embryos (%)		
		Re-expansion	Hatched BL	Cell number (Mean \pm SD.)
<i>In vivo</i>	29	26 (89.6)	20 (76.9) ^a	136 \pm 3.6 ^a
<i>In vitro</i>	65	53 (81.5)	23 (43.4) ^b	107 \pm 3.8 ^b

Different superscripts indicate significant difference ($p < 0.05$). Replicates 7.

객관적인 선별 기준을 갖추고 있어야 한다(Niemann, 1991; Rall, 1992; Leibo and Loskutoff, 1993; Massip 등, 1995). 한편, Iwasaki 등(1994)에 의하면 소 수정란의 동결에 대한 손상은 동결 보호제의 유독한 성분 그리고 동결 온도 및 냉각 속도를 비롯한 동결의 전반적인 기술과도 연관이 있는 것으로 보인다고 추측하였다. 수정란의 생존성을 향상시키기 위해서는 배양액의 구성에 대한 연구와 배양 체계 개선에 따른 수정란의 질적인 향상 그리고 동결에 방법에 대한 연구를 지속적으로 수행을 할 때 수정란의 생존성 향상으로 다양한 목적에 따라 이용될 수 있을 것이다(Semple 등, 1995). Rizos 등은(2002) 수정란의 동결 용해 후 생존성의 향상에 기인하는 원인으로서 가장 중요한 것은 수정란의 질적인 부분이며, 질 좋은 수정란은 동결 용해 후의 생존성 향상으로 수란우에 이식하였을 때 착상률에 중요한 영향을 줄 수 있다고 보고하였다.

적 요

포유동물 수정란의 동결보존기술은 최근 기후 변화에 따른 생물종 다양성을 보존하기 위해서 중요하게 여겨지는 연구 분야이다. 따라서 멸실 위험에 처한 동물의 개량과 증식, 보존과 복원 및 생명공학의 분야에 이르기까지 응용 기술은 다양하게 이용되어진다. 본 연구에서는 한우 수정란의 동결 후 생존성 향상을 위해서 동결 방법에 따른 체내·외수정란의 내동성을 조사하였다. 완만동결에 따른 체내·외수정란의 동결 용해 후 수정란의 재확장률은 89.6%와 81.5% 그리고 72시간 배양하였을 때 부화된 수정란은 76.9%와 43.4%, 생존수정란의 총세포수는 136±3.6개와 107±3.8개의 결과를 보여 동결 용해 후 생존율에서는 차이를 보이지 않았으나, 수정란의 부화율과 세포수 조사에서는 체내수정란이 유의적으로($p<0.05$) 높은 결과를 보였다. 체내수정란의 완만동결 후 배반포 회복률은 91.3% 그리고 12시간 이상 배양하였을 때 확장배반포까지의 발달률은 71.4%의 결과를 보였으며, 초자화 동결에서는 85.7%와 75.0%의 결과를 보였다. 결과적으로 본 연구에서 수행된 체내·외 수정란의 동결기술을 이용한다면 수정란이식 현장에서 효과적인 활용이 가능할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Abe H and Hoshi H. 2003. Evaluation of bovine embryos produced high performance serum-free media. J. Reprod. Dev. 49:193-202.
- Cho SK, Cho SG, Bae IH, Park CS and Kong IK. 2002. Improvement in post-thaw viability of *in vitro*-produced bovine blastocysts vitrified by glass micropipette (GMP). Anim. Reprod. Sci. 73:151-158.
- Cremades N, Sousa M, Silva J, Viana P, Sousa S, Oliveira C, Teixeira da Silva J and Barros A. 2004. Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using fine diameter plastic micropipettes. Hum. Reprod. 19: 300-305.
- Fahning ML and Garcia MA. 1992. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. Cryobiology 29:1-18.
- Gray CW, Morgan PM and Kane MT. 1992. Purification of an embryotrophic factor from commercial bovine serum albumin and its identification as citrate. J. Reprod. Fertil. 94: 471-480.
- Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, NeeLy B, Shuey LS, Stokes JE and Trimmer SA. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. Theriogenology 43: 141-152.
- Hochi S, Semple E and Leibo SP. 1996. Effect of cooling and warming rates during cryopreservation on survival of *in vitro*-produced bovine embryos. Theriogenology 46:837-847.
- Iwasaki S, Yoshikane Y, Li X, Watanabe S and Nakahara T. 1994. Effects of freezing of bovine preimplantation embryos derived from oocytes fertilized *in vitro* on survival of their inner cell mass cells. Mole. Reprod and Develop. 37:272-275.
- Kuwayama M, Vajta G, Ieda S and Kato O. 2005. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. Reprod. Biomed. 11:608-614.
- Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK and Phil D. 1999. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryo-loop container-less technique. Fertil. Steril. 72:1073-1078.
- Leibo SP and Loskutoff NM. 1993. Cryobiology of *in vitro* derived bovine embryos. Theriogenology 39:81-94.
- Leibo SP. 1986. Cryobiology : Preservation of mammalian embryos. Basic Life Sci. 37:251-272.
- Martino A, Songsasen N and Leibo SP. 1996. Developmental into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. Biol. Reprod. 54:1059-1069.
- Massip A, Mermillod P and Dhmyes A. 1995. Morphology and biochemistry of *in-vitro* produced bovine : Implications for their cryopreservation. Human Reproduction 10:3004-3011.
- Mills RM and Brinster RL. 1967. Oxygen consumption of preimplantation mouse embryos. Exp. Cell. Res. 116:373-378.
- Misumi K, Suzuki M, Sato S and Saito N. 2003. Successful production of piglets derived from vitrified morulae and

- early blastocysts using a microdroplet method. *Theriogenology* 60:253-260.
- Niemann H. 1991. Cryopreservation of ova and embryos from livestock current status and research needs. *Theriogenology* 35:109-124.
- Pereira PV, Dayan A, Watanabe MR, Avila FM, Marchizeli JC, Accorsi MF and Watanabe YF. 2002. Pregnancy rate following transfer of cryopreservation *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology* 57:475.
- Plante L and King WA. 1994. Light and electron microscopic analysis of bovine embryos derived by *in vitro* and *in vivo* fertilization. *J. Assist. Reprod. Genet.* 11:515-529.
- Rall WF. 1992. Cryopreservation of oocytes and embryos: Methods and applications. *Anim. Reprod. Sci.* 28:237-245.
- Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 313:573-575.
- Rios GL, Mucci NC, Kaiser GG and Alberio RH. 2010. Effect of container, vitrification volume and warming solution on cryosurvival of *in vitro*-produced bovine embryos. *Animal Reprod. Sci.* 118:19-24.
- Rizos D, Lonergan P, Ward F, Papadopoulos S and Boland MP. 2002. Developmental, qualitative and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 62:320-327.
- Saito N, Imai K and Tomizawa M. 1994. Effect of sugars addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced *in vitro*. *Theriogenology* 41:1053-1060.
- Semple ME, Betteridge KJ and Leibo SP. 1995. Cryopreservation of *in vitro*-derived bovine embryos produced in a serum-free culture system. *Theriogenology* 43:320.
- Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T and Callensen H. 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 51:53-58.

(접수: 2011. 8. 7 / 심사: 2011. 8. 9 / 채택: 2011. 8. 25)