

형질전환 소 난자의 동결보존기술 개발

엄상준¹, 양정석¹, 이수민¹, 조소영¹, 임준교², 허영태², 허영남², 구분철³, 정기수⁴, 김광재⁴, 김지태⁴, 김남형², 고대환^{1*}

¹상지영서대학교 동물생명산업과, ²충북대학교 축산학과, ³대구가톨릭대학교 의학과, ⁴강원도가축위생시험소 남부지소

Development of Cryopreservation Technique of Transgenic Bovine Embryos

Sang Jun Uhm¹, Jung Seok Yang¹, Su Min Lee¹, So Young Joe¹, Joon Gyo Lim², Young-Tae Heo², Yong-Nan Xu², Bon-Chul Koo³, Ki-Soo Cheong⁴, Kwang Jae kim⁴, Ji Tae Kim⁴, Nam-Hyung Kim² and Dae Hwan Ko^{1*}

¹Department of Animal Science and Biotechnology, Sangji Youngseo College, Wonju 220-713, Korea

²Department of Animal Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

³Department of Physiology, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu 705-718, Korea

⁴South Branch of Gangwondo Veterinary Service LAB, Gangwon 220-170, Korea

ABSTRACT

The purpose of this study is to improve production efficiency of vitrified-thawed transgenic bovine embryos. Transgenic bovine embryos were produced by injection of FIV-GFP lentiviral vector into perivitelline space of *in vitro* matured MII stage oocytes, and then *in vitro* fertilization. EGFP-expressing transgenic bovine blastocysts were cultured in serum-containing and serum - free medium. These blastocysts were vitrified by pull and cut (PNC) container made with 0.25 cm plastic straw. Results indicate that total developmental rates of normal IVF embryo cultured in serum-containing and - free medium into blastocyst were not significantly different (22.3 vs 21.5%) and those of GFP-expressing transgenic bovine embryo into blastocyst showed no significant difference between serum-containing (13.9%) and - free medium (13.1%). However, developmental rate of GFP transgenic embryo was significantly ($P<0.05$) lower than its of normal IVF embryos. In additional study, we vitrified GFP transgenic normal bovine blastocysts using PNC vitrification method. Survival rate of vitrified-thawed GFP transgenic blastocyst (23.1%) was significantly ($P<0.05$) lower than its of normal blastocysts (68.9%). Although, survival rate of vitrified-thawed GFP transgenic blastocyst was lower than its of normal blastocyst, our result may suggested that PNC vitrification method is feasible to cryopreserve transgenic embryos. Our next plan will be the production of GFP express transgenic bovine derived from vitrified-thawed embryos using PNC method.

(Key words : vitrification, PNC, lentivirus, GFP, bovine)

서 론

난자의 동결보존 기술은 인간의 불임치료뿐만 아니라, 동물의 유전자원 보존을 위하여 매우 중요한 기술이다(Gandini 등, 2007; Saragusty와 Arav, 2011). 그러나 동결은 난자내의 중요한 미세기관들의 손상으로 인하여 난자의 해동 후 생존율 및 발달율의 저하를 야기한다. 대표적인 난자의 손상으로 투명대의 경화, actin filament의 기형 유도, chromosome의 손상 및 부화과 착상의 저하 등이 있으며(Drobnis 등, 1988; Cohen 등, 1992; De Vos와 Van Steirteghem, 2000), 난자 할구의 부분적 분해현상(lysis)으로 인한 난자의 사멸을 야기한다

(El-Toukhy 등, 2003). 따라서 이러한 문제점들의 해결 없이는 성공적인 난자의 동결보존이 어려운 실정이다.

이러한 동결의 문제점을 해결하고자 Rall과 Fahy(1985)에 의하여 마우스에서 초자화 동결(Vitrification)방법이 개발되어 세포내 icecrystal 형성을 억제하며, 동결과정의 간소화 및 시간 단축을 이루어 동결보존에 비약적 발전을 이루었다(Dochi 등, 2008). 이러한 초자화 동결방법은 여러 연구자들에 의해서 개선되어 modified droplet-vitrification(Riha, 1991), electron microscopic grids(Park 등, 1999), cryotop (Kuwayama 등, 2005) 및 open pulled straws(Vajta 등, 1998) 등의 동결용기들이 개발되었다. 이러한 개선된 동결용기들의 공통점은 최소량(0.1

* 본 논문은 농촌진흥청 차세대 바이오그린21사업(과제번호: PJ009587, PJ009046, PJ00908001)의 지원에 의해 이루어진 것임.

* Correspondence : E-mail : dhko@sy.ac.kr

~1.0 μ l)의 초자화 동결액을 이용하여 난자를 급속냉각시키는 것이며(Aray 등, 1993), 이 최소량의 초자화 동결액의 사용 기술은 냉각과 해동의 속도를 증가시켜 초자화 동결액이 난자에 미치는 독성의 감소를 가져오고 있다(Boldt, 2011). 특히 최근에는 사람의 배반포와 분할란의 초자화 동결용기로써 0.25 ml straw를 이용하여 만든 PNC(pull and cut straw)를 사용하였을 때 동결비용의 감소와 우수한 난자의 생존율을 얻은 결과가 보고되었다(Kim 등, 2010b).

최근 본 연구진은 lentivirus를 소의 성숙란(MII stage)의 위란강에 주입하는 방법으로 GFP 발현 형질전환 소를 생산하였다(Xu 등, 2013). 이 연구로 기존에 광범위하게 사용되고 있는 1~5% 수준의 형질전환 산자 생산효율을 지닌 수정란의 전핵에 유전자를 미세 주입하는 기술(Wall, 1996) 내지는 Schnieke 등(1997)에 의하여 개발된 체세포 복제 기술보다 월등히 개선된 효율로 형질전환 소를 생산하였다. 하지만 과잉 생산된 형질전환 난자를 효율적으로 이식하기 위해서는 효율적인 난자의 동결보존이 필요하였다. 그렇지만 현재까지는 효율적인 형질전환 난자의 동결보존 기술은 확립이 되어 있지는 않은 실정이다.

따라서 본 연구는 형질전환 소 난자의 동결보존 기술을 개발하여 형질전환 소 생산 효율성을 보다 증진시키고자 실시하였다. 이를 위하여 최근 개발된 PNC 동결용기를 이용한 초자화 동결방법을 응용하여 GFP가 발현되는 형질전환 소 배반포를 동결하였다.

재료 및 방법

1. 소 미성숙난자의 회수 및 체외성숙 유도

소 미성숙난자의 회수를 위해서는 도축된 소의 난소들을 38°C에 보관하여 실험실로 수송 후 18 gauge의 주사침이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 흡인하였으며, 2~6 mm 크기의 가시난포만을 회수하여 이를 15 ml 원심 분리관에 분주하고 10분간 정치시켰다. 이후 원심 분리관 하단의 침전물을 채취하여 TL-HEPES 배양액을 첨가 후 실체현미경 하에서 난자의 세포질이 균일하고, 난구세포가 치밀한 미성숙 난포란만을 회수하여 실험에 공시하였다. 미성숙 난포란의 체외성숙을 위해서는 TCM-199 배양액(Gibco)에 10% FBS, 5 μ g/ml Folltropin, 1 μ g/ml estradiol 17- β 가 첨가된 체외성숙용 배양액을 사용하였으며, 난포란은 50 μ l 체외성숙 배양액에 10개씩 투입하여 5% CO₂체의 배양기에서 24시간 동안 체외성숙을 유도하였다.

2. Lentivirus Vector 생산

본 실험에 사용한 lentivirus vector는 Feline immunodeficiency virus(FIV)에 근간을 둔 FIV-GFP로서, 표지 유전자인 GFP

유전자를 전이시키기 위한 목적으로 구축하였다. FIV-GFP는 pCDF1-MCS2-EF1-Puro(System Biosciences, USA) vector에 GFP 표지 유전자(Clontech, USA)와 외래 유전자 발현을 증가시키기 위한 인자인 woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element(WPRE) 서열을 도입하여 구축하였다. 이렇게 구축된 FIV-GFP vector는 난자 내에 GFP 유전자의 도입을 위해서 고농도의 virus stock을 생산하였다. 293FT 세포에 각각의 expression vector와 packaging vector들을 calcium phosphate 방법으로 co-transfection 시켜서 virus를 생산하였으며, 4°C에서 16,700 rpm으로 90분간 vertical rotor(Beckman 70Ti, CA, USA)를 이용한 초원심 분리 방법으로 1,000배 이상 농축하였다. 이후 상층액을 완전히 제거한 후 침전물에 DMEM/FBS를 첨가하여 4°C에서 16시간 방치한 후 재부유하였다. 이렇게 생산된 농축된 virus stock은 0.45 μ m pore-size의 cellulose acetate filter를 이용하여 여과한 후 -70°C에 보관하였다.

3. 난자 위란강에 Lentivirus vector의 미세 주입

FIV-GFP vector를 난자 내 도입을 위해서 미성숙난자를 체외성숙 후 18시간째에 난구세포를 제거 후 미세조작기를 이용하여 위란강 내로 5~10 pl의 바이럴 벡터를 주입하였다. 이후 바이럴 벡터가 주입된 난자는 배양기에서 24시간까지 체외성숙을 유도한 후 체외수정을 실시하였다.

4. 소 성숙난자 체외수정 및 배발달

본 연구의 체외수정을 위해서는 동결정액을 용해하여 체외수정을 실시하였으며, 동결정액은 37°C에서 용해 후 용해된 동결정액을 10 ml BO(Brackett와 Oliphant) 배양액과 혼합하여 원심분리 방법으로 세척한 후, 체외 성숙된 난자가 각각 10개씩 침지가 되어 있는 50 μ l Fert-TALP 배양액에서 처리된 정자를 1 \times 10⁶/ml 농도로 주입 후 18시간 동안 공배양함으로써 체외수정을 유도하였다.

5. 소 체외수정란의 배발달

체외수정란은 IVD(*In Vitro Development*) 배양액(기능성펩타이드연구소, 일본)과 CR1aa 배양액에서 배발달을 유도하였다. IVD 배양액의 경우, 체외수정란은 IVD 배양액으로 2~3회 세정 후 전배양으로 평형이 끝난 100 μ l IVD 배양액에 15개의 난자를 48시간 배양하였고, 이후 배양 48시간마다 신선한 IVD배양액으로 교체하였다. CR1aa 배양액의 경우 체외수정란은 100 μ l의 0.3% BSA가 첨가된 CR1aa 배양액으로 48시간동안 배양시킨 후 분할이 이루어진 난자만을 선별하였으며, 이후 48시간마다 신선한 20% FBS가 첨가된 CR1aa 배양액으로 교체하였다. 이들 체외수정란의 배양은 7~9일 동안 실시하여 배반포로의 발달을 유도하였다.

6. 배반포의 동결 응해

생산된 체외수정 유래 배반포의 동결을 위해서는 10% glycerol + 10% FBS가 함유된 PBS 용액(37℃)에 5분간, 10% glycerol + 20% ethylene glycol + 10% FBS가 함유된 PBS에 5분, 25% glycerol + 25% ethylene glycol + 10% FBS가 함유된 PBS에 1분 각각 배반포를 침지 후 5개 정도의 배반포를 Kim 등(2010)에 의해서 개발된 방법을 응용하여 개발된 0.25 ml straw를 이용하여 만든 PNC에 loading한 후 액체질소에 침지하여 동결하였다(Fig. 1). 이후 동결보존 중인 배반포의 응해를 위해서는 액체질소에 침지된 PNC를 꺼내어 손으로 전체를 잡고 해동 후 즉시 37℃의 0.5 M, 0.25 M와 0.125 M sucrose가 함유된 PBS에 각각 1분간 침지 후 회수된 배반포는 IVD 배양액에서 배양하였다.

7. 통계분석

실험결과와 처리군 간의 유의성 검정을 위한 통계처리를 위해서는 SAS program의 Chi-square를 실시하였으며, 유의성은 $p < 0.05$ 이하만을 인정하였다.

결 과

1. GFP 형질전환 수정란의 배발달

체외수정란을 체외배양 시 배양액에 혈청을 첨가 유무에 따른 배발달을 조사한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같이 일반 체외수정란의 경우에 있어서 배양액에 혈청을 첨가하여 배양

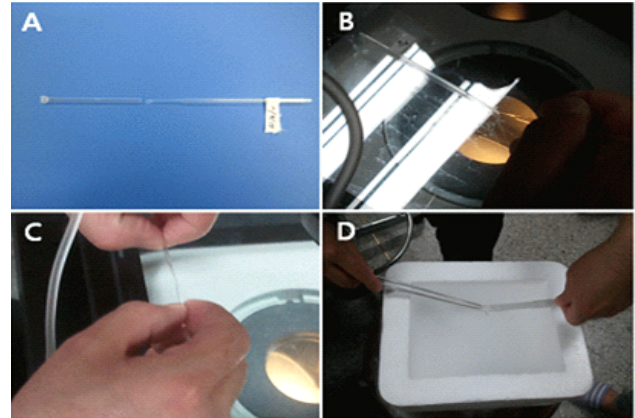


Fig. 1. Vitrification of bovine embryos by using PNC method (A : PNC straw, B : Loading of bovine blastocyst on PNC straw, C : Installation of PNC straw, D : Direct plunge of PNC straw into LN₂).

하였을 때에는 배반포의 발달율은 22.3%로써 무혈청 배양액으로 배양하였을 때의 21.5%와 차이가 없었으며, GFP 발현 형질전환 수정란의 경우에 있어서도 배반포의 발달은 배양액에 혈청을 첨가하여 배양하였을 때에는 13.9%로써 무혈청 배양액에서 배양하였을 때의 13.1%와 차이가 없었다. 그러나 일반 체외수정란과 GFP 발현 형질전환 수정란 간의 배반포의 배발달에 있어서는 유의적으로 GFP 발현 형질전환 수정란이 낮은 배반포율을 보였다($P < 0.05$).

또한 Table 2에서 보는 바와 같이 배반포를 이식용 straw에

Table 1. Development of bovine embryo following serum supplementation on culture media

Groups	Serum supplementation *	No. of embryos	No.(%) embryos cleaved	No. (%) of blastocysts
Normal IVF embryo	+	3,124	2,561(82.0 ± 4.1) ^a	697(22.3 ± 3.2) ^a
	-	1,064	881(82.8 ± 3.8) ^a	229(21.5 ± 3.7) ^a
GFP Tg embryo	+	503	389(77.3 ± 3.5) ^b	70(13.9 ± 2.4) ^b
	-	397	313(78.8 ± 3.8) ^b	52(13.1 ± 2.9) ^b

* Serum supplemented medium : CR1aa + 20% FCS, Non-serum supplemented medium : IVD medium.

^{a,b} Within a row, values without a common superscript differed($P < 0.05$).

Table 2. Pre-estimate analysis of development after re-culture of blastocysts under serum supplement and non-serum supplement condition

Groups	Serum supplementation *	No. expand blastocysts	No.(%) of blastocysts hatched	No.(%) of blastocysts degenerated
Normal IVF embryo	-	240	221(92.1 ± 3.4) ^a	19(7.9 ± 1.8) ^a
	+	120	79(65.8 ± 4.2) ^b	41(34.2 ± 3.6) ^b
GFP Tg embryo	-	288	196(68.1 ± 4.8) ^b	92(31.9 ± 4.0) ^b

* Serum supplemented medium : CR1aa + 20% FCS, Non-serum supplemented medium : IVD medium.

^{a,b} Within a row, values without a common superscript differed($P < 0.05$).

장착 후 일부는 현장에서 대리모에 이식하고, 나머지는 회수하여 연구실의 배양기에서 재배양하여 부화율로 생존율을 조사한 결과에 있어서는, 일반 체외수정란 유래의 배반포는 부화율이 92.1%인 반면, GFP 발현 형질전환 수정란 유래의 배반포의 경우에는 부화율이 혈청 첨가 배양에서 배양되었을 때에는 65.8%와 무혈청 배양액에서 배양되었을 때에는 68.1%로써, 일반 체외수정란 유래의 배반포에 비교하여 GFP 발현 형질전환 수정란 유래의 배반포는 유의하게 낮은 부화율을 보였다($P < 0.05$). 그러나 혈청첨가 배양액과 무혈청 배양액에서 배양된 GFP 발현 형질전환 수정란 유래의 배반포 사이에서는 부화율에 유의적인 차이는 보이지 않았다.

2. GFP 발현 형질전환 수정란의 동결 보존

소 GFP 발현 형질전환 수정란은 0.25 ml straw와 PNC 동결용기를 이용하여 초자화 동결 방법으로 동결 용해 후 생존율을 조사하였다(Table 3). 그 결과, 0.25 ml straw와 PNC 초자화 동결 방법을 이용하였을 경우에 동결 용해 후 회수율은 각각 95.7%와 98.5%로 차이가 없었지만, 생존율에 있어서는 각각 57.1%와 72.5%로써 PNC가 straw보다 현저하게 높았다($P < 0.05$).

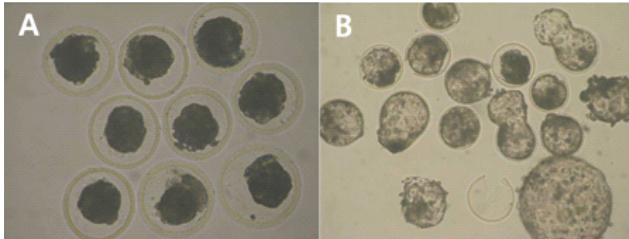


Fig. 2. Vitrified-thawed blastocysts by using PNC(A: Shrunken blastocysts at 0 hours after thaw, B: Survived blastocysts at 24 hours after thaw).

Table 3. Survival rate of vitrified-thawed bovine blastocysts

Groups	No. of blastocysts vitrified	No. (%) of blastocysts recovered after thaw	No. (%) of blastocysts survived
Straw	60	59(95.7 ± 2.2)	34(57.1 ± 5.1) ^a
PNC	68	67(98.5 ± 1.4)	48(72.5 ± 4.2) ^b

^{a,b} Within a row, values without a common superscript differed($P < 0.05$).

Table 4. Development of normal and GFP expressed bovine blastocysts vitrified-thawed using PNC method

Groups	No. of blastocysts vitrified-thawed	No. (%) of blastocysts survived	No. (%) of blastocysts degenerated
Normal IVF blastocysts	248	171(68.9 ± 4.5) ^a	77(31.1 ± 3.8) ^a
GFP expressed blastocysts	273	63(23.1 ± 3.1) ^b	210(76.9 ± 5.2) ^b

^{a,b} Within a row, values without a common superscript differed($P < 0.05$).

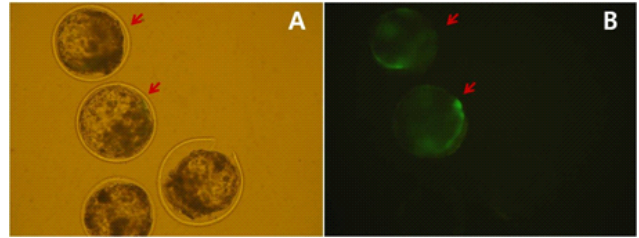


Fig. 3. Vitrified-thawed GFP expressed blastocysts by using PNC method(arrow indicate GFP expressed blastocysts).

이러한 PNC 동결방법을 이용하여 일반 체외수정란과 GFP 형질전환 수정란 유래의 배반포를 동결용해 후 부화율과 퇴행률을 조사한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같이 일반 체외수정란 유래의 배반포는 부화율과 퇴행률이 각각 68.9%와 31.1%로써, GFP 발현 형질전환 수정란 유래의 배반포의 23.1%와 76.9%보다 현저하게 부화율은 높았고, 퇴행률은 낮았다($P < 0.05$).

고찰

최근 본 연구진은 EGFP 발현 형질전환 소를 생산하였다(Xu 등, 2013). 하지만 수란우에 이식 후 과잉 형질전환 난자의 손실이 있었으며, 이러한 문제를 해결하고자, 본 연구는 형질전환 소 수정란의 동결 보존 후 산자 생산 효율성 증진을 위하여 실시하였다. 우선 소 형질전환 수정란의 이식 후 수태율을 높이고, 형질전환 송아지 생산을 성공시키기 위하여 형질전환 수정란의 체외배양을 위한 최적의 무혈청 배양법을 개발하고자 실시하였다. 그 결과, Table 1에서 보는 바와 같이 일반 체외수정란과 GFP 발현 형질전환 수정란의 경우에 있어서, 일반 체외수정란과 GFP 발현 형질전환 수정란 간의 배반포로의 배발달에 있어서는 유의적으로 GFP 발현 형질전환 수

정란이 낮은 배반포율을 보였지만($P<0.05$), 각각 배반포의 발달은 배양액에 혈청을 첨가하여 배양하였을 때와 무혈청 배양액에서 배양하였을 때의 차이가 없었다. 또한 GFP 발현 형질전환 수정란 유래 배반포의 대리모에 이식 후 배발생능을 검정하기 위하여, 본 연구에서 확립된 무혈청 배양법과 혈청 첨가배양법으로 발생시킨 GFP 발현 형질전환 수정란 유래의 배반포를 이식용 straw에 장착 후 일부는 현장에서 대리모에 이식하고, 나머지는 회수하여 연구실의 배양기에서 재배양하여 부화율로 생존율을 조사하였다. 그 결과, 일반 체외수정란 유래의 배반포는 부화율에 비교하여 GFP 발현 형질전환 수정란 유래의 배반포의 부화율이 유의하게 낮았지만($P<0.05$), GFP 발현 형질전환 수정란 유래의 배반포 사이에서는 배양액에 혈청 첨가 유무에 따른 부화율에 차이는 보이지 않았다. 이러한 GFP 발현 형질전환 수정란이 일반 체외수정란의 배발달보다 낮은 이유는, 난자에 lentiviral vector system을 이용하여 GFP 유전자 도입을 위한 미세조작과 외래유전자인 GFP 유전자의 난자 내로의 도입 및 발현에 따른 원인이 발달 저해 현상을 야기시킨 것으로 사료된다. 그렇지만 본 결과에서는 일반 체외수정란 간과 GFP 발현 형질전환 수정란 간의 체외배양에는 무혈청 배양액과 혈청 배양액 간의 유의적 차이가 없었다. 이러한 무혈청 배양액으로 배양하였을 경우에 혈청배양액을 사용하였을 때와 배발달에 차이가 없는 원인으로는 현재 시판 중인 무혈청 배양액은 항산화제와 성장인자인 selenium, taurine, insulin, bFGF(Basic Fibroblast Growth Factor) 등 여러 배발달 증진 물질들이 함유되어 있기 때문에, 혈청의 첨가 없이 무혈청 배양액만으로도 배발생이 가능한 것으로 사료된다. 이러한 결과는 Kim 등(2010a)이 연구한 항산화제인 플라보노이드의 배양액내의 첨가는 소 난자의 배발달을 증진시킨다는 결과와도 유사하다.

이렇게 생산된 소 GFP 발현 형질전환 수정란은 수란우에 이식 후 과잉 형질전환 난자의 손실을 방지하고, 산자 생산 효율성을 높이고자 초자화 동결 방법을 개발하였다. Park 등(1999)은 체외수정 유래의 소 배반포를 0.25 ml straw와 grid를 동결용기로 이용하여 초자화 동결 후 융해하였을 경우, 부화율이 각각 53.3%와 67.8%로 grid를 동결용기로 이용하였을 때보다 좋은 결과를 보였다. 본 연구 결과에서도 PNC를 동결 용기로 이용하였을 때에 초자화 동결 융해 후 부화율이 68.9%로써, Park 등(1999)이 grid를 동결 용기로 이용한 결과와 유사한 결과를 얻었다. 또한 체외수정란 유래의 소 배반포를 straw를 동결 용기로 이용하는 것보다 PNC를 동결 용기로 사용하는 것이 Table 3에서 보는 바와 같이 유의적으로 생존율이 높았다($P<0.05$). 본 연구에서 사용된 PNC 동결 용기를 이용한 초자화 동결 방법은 Kim 등(2010b)이 사람의 배반포를 동결을 위하여 사용한 방법을 응용한 것으로, Kim 등

(2010b)은 PNC 동결 용기를 이용하여 초자화 동결 융해된 사람의 배반포를 이식 후 임신율에 좋은 효과를 보였다. 비록 일반 체외수정란 유래의 배반포를 초자화 동결 융해를 하였을 때 0.25 ml straw보다는 PNC를 동결 용기로 이용하는 것이 좋았지만, 이 PNC 초자화 동결 방법을 이용하여 GFP 발현 형질전환 수정란 유래의 배반포를 동결 융해를 하였을 때는 일반 체외수정란 유래의 배반포보다 현저하게 부화율은 낮았고, 퇴화율은 높았다($P<0.05$). 이러한 이유는 형질전환 수정란의 경우 미세 조작으로 인한 투명대의 손상으로 인하여 동결 시 난자에 손상으로 기인된 것으로 사료된다. 또한 일반 체외 수정란을 이용하여 초자화 동결에 대한 연구가 진행되었지만(Kim 등, 1999; Park 등, 1999; Ha 등, 2010), 형질전환 수정란에 대한 연구는 미비한 실정이므로 형질전환 수정란의 산자 생산의 증진을 위해서는 앞으로도 형질전환 수정란의 동결 보존 기술방법에 대한 연구가 필요한 실정이다.

이상의 결과로 현재 PNC를 동결 용기로 사용하여 소 배반포를 초자화 동결하는 방법은 본 연구진에 의해서 최초로 수행된 결과이며, 비록 일반 체외 수정란 유래의 배반포보다는 동결 융해 후 많은 배반포가 퇴행이 되었지만, GFP 발현 형질전환 수정란 유래의 배반포는 성공적으로 동결 보존에 성공하였다. 우리는 이후의 연구에서는 이렇게 동결 보존된 GFP 발현 형질전환 소 배반포를 대리모에 이식하여 산자를 생산할 것이다.

결론

본 연구는 형질전환 소 수정란의 동결 보존 후 산자 생산 효율성 증진을 위하여 실시하였다. 본 연구를 위해서 형질전환 소 수정란의 생산은 FIV-GFP 바이럴 벡터를 체외 성숙된 소 난자의 위관강에 주입 후 체외수정을 통하여 생산하였으며, 이렇게 생산된 GFP 발현 형질전환 수정란 유래의 배반포를 PNC를 이용하여 동결하였다. 그 결과, 우선 일반 체외수정란의 경우에 있어서 배양액에 혈청을 첨가하여 배양 시 배반포로의 발달율은 22.3%로써 무혈청 배양 시 21.5%와 차이가 없었으며, GFP 발현 형질전환 수정란의 배발달에 있어서 배양액에 혈청을 첨가하여 배양 시 배반포로의 발달율은 13.9%로써 무혈청 배양 시 13.1%와 차이가 없었다. 그러나 일반 체외수정란에 비교하여 GFP 발현 형질전환 수정란의 배발달에 있어서 유의적으로 낮았다($P<0.05$). 또한 GFP 발현 형질전환 수정란 유래 배반포를 동결 보존하기 위하여 PNC 초자화 동결 방법을 이용하여 GFP 발현 형질전환 수정란 유래 배반포를 동결 융해를 하였을 경우에는 부화율이 23.1%로써 일반 체외 수정란 유래 배반포는 68.9% 보다는 유의하게 낮게 나타났다($P<0.05$). 따라서 이상의 결과는 비록 PNC 초자화 동

결 방법을 이용하여 GFP 발현 형질전환 수정란 유래 배반포를 동결 용해를 하였을 경우, 일반 체외 수정란 유래의 배반포 보다는 생존율이 낮았지만, 성공적으로 동결 보존을 하는데 성공하였다. 추후 동결 보존된 GFP 발현 형질전환 수정란 유래 배반포를 대리모에 이식을 통하여 GFP 발현 형질전환소를 생산할 것이다.

참 고 문 헌

- Arav A, Shehu D and Mattioli M. 1993. Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 99: 353-58.
- Boldt J. 2011 Current results with slow freezing and vitrification of the human oocyte. *Reprod. Biomed. Online.* 23: 314-22.
- Cohen J, Alikani M and Trowbridge J. 1992. Implantation enhancement by selected assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis. *Hum. Reprod.* 7: 685-91.
- De Vos A and Van Steirteghem A. 2000. Zona hardening, zona drilling and assisted hatching: new achievements in assisted reproduction. *Cells Tissues Organs* 166: 220-7.
- Dochi O, Takahashi K, Hirai T, Hayakawa H, Tanisawa M and Yamamoto Y. 2008. The use of embryo transfer to produce pregnancies in repeat-breeding dairy cattle. *Theriogenology* 69: 124-8.
- Drobnis EZ, Andrew JB and Katz DF. 1988. Biophysical properties of the zona pellucida measured by capillary suction: is zona hardening a mechanical phenomenon. *J. Exp. Zool.* 245: 206-19.
- El-Toukhy T, Khalaf Y, Al-Darazi K, Andritsos V, Taylor A and Braude P. 2003. Effect of blastomere loss on the outcome of frozen embryo replacement cycles. *Fertil. Steril.* 79: 1106-11.
- Gandini G, Pizzi F, Stella A and Boettcher PJ. 2007. The costs of breed reconstruction from cryopreserved material in mammalian livestock species. *Genet. Sel. Evol.* 39:465-79.
- Ha AN, Cho SJ, Deb GK, Bang JI, Kwon TH, Choi BH and Kong IK. 2010. Effect of the artificial shrinkage on the development of the vitrified bovine embryos. *Korean J. Emb. Trans.* 25: 9-14.
- Kim EY, Kim DI, Park NH, Weon YS, Nam HK, Lee KS, Park SY, Yoon SH, Park SP, Chung KS and Lim JH. 1999. Systems for production of calves from Hanwoo (Korean Cattle) IVM/IVF/IVC blastocyst III. Vitrification and one-step dilution of Hanwoo blastocyst. *Korean J. Animal. Reprod.* 23: 293-301.
- Kim EY, Kim YO, Kim JY, Park MJ, Park HY, Han YJ, Mun SH, Oh CE, Kim YH, Lee SS, Ko MS and Park SP. 2010a. *In vitro* development of somatic cell nuclear transfer embryo treated with flavonoid and production of cloned Jeju Black Cattle. *Reprod. Dev. Biol.* 34: 127-134.
- Kim HJ, Kim CH, Lee JY, Kwon JH, Hwang D and Kim KC. 2010b. Effect of cryopreservation day on pregnancy outcomes in frozen-thawed blastocyst transfer. *Korean J. Reprod. Med.* 37: 57-64.
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O and Leibo SP. 2005. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod. Biomed. Online* 11: 300-8.
- Park SP, Kim EY, Kim DI, Park NH, Won YS and Yoon SH. 1999. Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscope grids. *Hum. Reprod.* 14: 2838-43.
- Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* 313: 573-5.
- Riha J. 1991. Vitrification of cattle embryos by direct dropping into liquid nitrogen and embryo survival after nonsurgical transfer. *Zivoc. Vir.* 36: 113-20.
- Saragusty J and Arav A. 2011. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction* 141: 1-19.
- Schiewe MC, Hazeleger NL, Sclimenti C and Balmaceda JP. 1995. Physical characterisation of blastocyst hatching mechanisms by use of a mouse anti-hatching mode. *Fertil. Steril.* 63: 288-94.
- Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A and Campbell KH. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 278: 2130-3.
- Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H and Greve T. 1998. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 51: 53-58.
- Wall RJ. 1996. Transgenic livestock: progress and prospects for the future. *Theriogenology* 45: 57-68.
- Xu YN, Uhm SJ, Koo BC, Kwon MS, Roh JY, Yang JS, Choi HY, Heo YT, Cui XS, Yoon JH, Ko DH, Kim T and Kim NH. 2013. Production of transgenic Korean native cattle expressing enhanced green fluorescent protein using a

FIV-based lentiviral vector injected into MII oocytes. J.
Genet. Genomics 40: 37-43.

(접수: 2013. 07. 05/ 심사: 2013. 07. 08/ 채택: 2013. 08. 01)