

소 체외수정란의 체외배양 및 이식후 생존성

정희태 · 유재원* · 박연수* · 양부근 · 김정익

강원대학교 축산대학

Viability of *In Vitro* Fertilized Bovine Embryos Following *In Vitro* Culture and Embryo Transfer

H. T. Cheong, J. W. Yoo*, Y. S. Park*, B. K. Yang and C. I. Kim

College of Animal Agriculture, Kangwon National University

SUMMARY

This study was conducted to examine the condition of *in vitro* culture system and the viability after embryo transfer of *in vitro* matured-*in vitro* fertilized (IVM-IVF) bovine embryos. The *in vitro* development to the blastocyst stage was enhanced by supplying bovine serum albumin(BSA) to co-culture medium with bovine oviduct epithelial tissue(BOET) compared with that in medium supplemented with fetal bovine serum(FBS) (41.2% vs. 26.3%, $P < 0.05$). After transfer of IVM-IVF blastocysts into the uterine horn of recipient females (Aberdeen Angus), one was pregnant to term and produced a head of male Korean native calf. These results confirm that the *in vitro* development of IVM-IVF bovine embryos is affected with different protein source in co-culture with BOET, and IVM-IVF embryos can develop to term after *in vitro* culture and embryo transfer.

서론

수정란이식기술의 확립과 함께 미성숙 난포란의 체외성숙·체외수정기술을 통한 소 수정란의 대량 생산기술이 개발되어(Crister 등, 1986; Hanada, 1986), 이 방법에 의해 얻어진 수정란을 이용한 산자의 생산에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔다(Jiang 등, 1991; Kajihara 등, 1990; Lu 등, 1990; Xu 등, 1990; Eyestone과 First, 1989; Leibfried-Ratledge 등, 1989).

체외성숙·체외수정된 소 수정란을 수란우의 자궁에 이식 가능한 상실배기나 배반포기 단계까지 발육시키기 위해서는 초기배의 체외배양체계의 확립이 필수적이다. 연구의 초기단계에서는 소 체외 수정란을 토끼나 면양의 난관내에서 일시적으로 양

양후 회수하여 상실배기나 배반포기배로 발육된 수정란을 수란우에 이식하는 방법이 이용되었다(Boland, 1988). 최근에는 초기배의 체외배양제로서 SOF(synthetic oviduct fluid; Fukui 등, 1991)나 CR1aa (Rosenkrans 와 First, 1991)와 같은 배양액내에서 수정란을 배양하는 단순배양법과, 소 난관상피세포(bovine oviduct epithelial cells, BOEC: Eyestone과 First, 1989; Fukui와 Ono, 1989), 난구세포(cumulus cells: Goto 등, 1988), 과립막세포(granulosa cells: Goto 등, 1992), Bufflo rat liver cells(BRLC: Rehman 등, 1994; Hernandez-Ledezma 등, 1993)등의 단층세포(monolayer cells)와의 공동배양법이 이용되고 있다.

한편, 공동배양의 방법으로 단층세포대신 소포부 유액(vesicle suspension)을 만들어 수정란의 공동

* 강원도립 종축장(Kangwon Provincial Animal Breeding Station)

배양에 사용하기도 하며(Shamsuddin 등, 1993; Eyestone과 First, 1989), 이 경우 혈청대신 BSA (bovine serum albumin)를 첨가하므로써 수정란의 발육율이 증진될 수 있음이 시사되었다(Park 등, 1992).

본 연구는 소 체외성숙·체외수정란을 소 난관상피조직(bovine oviduct epithelial tissue, BOET)과 공동배양시 FBS(fetal bovine serum)와 BSA 첨가에 따른 발육을 검토와 함께, 배반포로 발육된 체외수정란을 수란우에 이식후 산자 생산능을 검사하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 회수 및 체외성숙

도축장에서 회수한 난소들은 멸균 생리식염수(25~28℃)에 담겨 도축후 2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 난포란은 18 gage 주사침이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 직경 2~6 mm의 난포로 부터 채취하여 성숙배양액(아래참조)으로 3~4회 세척한 후 난구세포가 치밀하고 균질한 세포질을 가진 난포란만을 선별하여 체외성숙에 공시하였다.

난포란의 체외성숙액으로는 TCM-199 배양액(Gibco, NY, USA)에 0.2 mM Na-pyruvate, 0.02 U/ml FSH(Sigma, St. Louis, MO, USA), 1 μ g/ml 17 β -estradiol(Sigma), 50 μ g/ml gentamycin 및 10% FBS(Gibco)를 첨가한 용액을 사용하였다. 체외성숙용 배양액은 배양접시(ϕ 35 mm, Nunc, Denmark)에 50 μ l씩의 배양소적을 만들어 39℃, 5% CO₂ 및 95% 공기조건에서 2시간 이상 평형시킨 후, 각 소적에 약 10개씩의 난포란을 넣어 22~24시간 성숙배양 하였다.

2. 정자의 준비와 체외수정

한우 동결정액 straw를 35~37℃의 온수에서 30 초간 용해하여 15 ml의 원심관에 넣고 10 mM caffeine(Sigma)이 함유된 BSA-free BO액(Brackett와 Oliphant, 1975)을 7~8 ml 첨가하여 700 g 으로 10분간 원심분리하여 세척하고 다시 500 g 으로 5분간 세척한 후 정자농도가 4 \times 10⁶ 정자/ml가 되도록 채부유시켰다. 수정배지는 25 μ l의 정자부유액을

을 6 mg/ml fatty acid free BSA(Sigma)와 20 μ g/ml heparin(Sigma)이 함유된 동량(25 μ l)의 BO액 소적에 첨가하여 제작후 각 소적당 10개씩의 체외성숙난자(난구세포·난자복합체)를 투입하여 39℃, 5% CO₂를 포함한 공기조건하에서 20~22시간 배양하였다. 결국 최종 수정배지는 5 mM caffeine, 10 μ g/ml heparin, 3 mg/ml BSA 및 2 \times 10⁶ 정자/ml를 포함하도록 조정되었다.

3. 체외수정란의 체외배양

수정이 끝난 난자는 TCM-199액으로 세척하여 난구세포가 붙어있는 채로 10% FCS 혹은 3 mg/ml BSA를 함유한 TCM-199액의 배양소적(50 μ l)으로 옮겨 24~30시간 배양하였다. 그후 pipetting에 의해 난구세포를 제거하고 2세포기 이상으로 발육된 수정란은 10여개씩 소 난관상피조직(BOET)과의 공동배양 배지로 옮겨 39℃, 5% CO₂ 및 95%의 공기조건하에서 7일간 체외배양하였다.

4. 공동배양배지의 준비

황체에 있는 소의 난관을 얼음위에서 실험실로 운반하여 난관 표면의 결합조직과 지방조직을 제거하고 약 10 cm 정도로 절단하였다. 난관 상피조직은 멸균된 slide glass를 이용하여 플라스틱 배양접시(ϕ 90 mm) 위에서 난관협부에서 누두부 쪽으로 난관을 압착하여 채취하고 15 ml의 플라스틱 원심관에 회수하였다. 회수된 상피조직에 8~9 ml의 TALP액을 첨가하여 진탕후 5분간 정치하여 상층액을 제거하는 방식으로 4회 세척하고 최종적으로 10% FBS 혹은 3 mg/ml BSA를 첨가한 TCM-199액으로 세척한 후 50배액(1:50)으로 조정하여 조직배양용 플라스틱병(25 ml)에 5 ml를 주입하여 2일간 배양하였다. 그후 배양접시(Falcon, ϕ 35 mm)에 50 μ l의 세포부유액을 만들어 paraffin oil로 피복하고 각 배지마다 약 10개씩의 수정란을 넣고 배양하였다. 배양액은 매 2~3일마다 전체의 1/2씩 교환하였다.

5. 수정란의 이식

수란우로는 강원도립 종축장에서 사육하고 있는 한우 및 육우종 정상 발정주기를 반복하고 있는 미

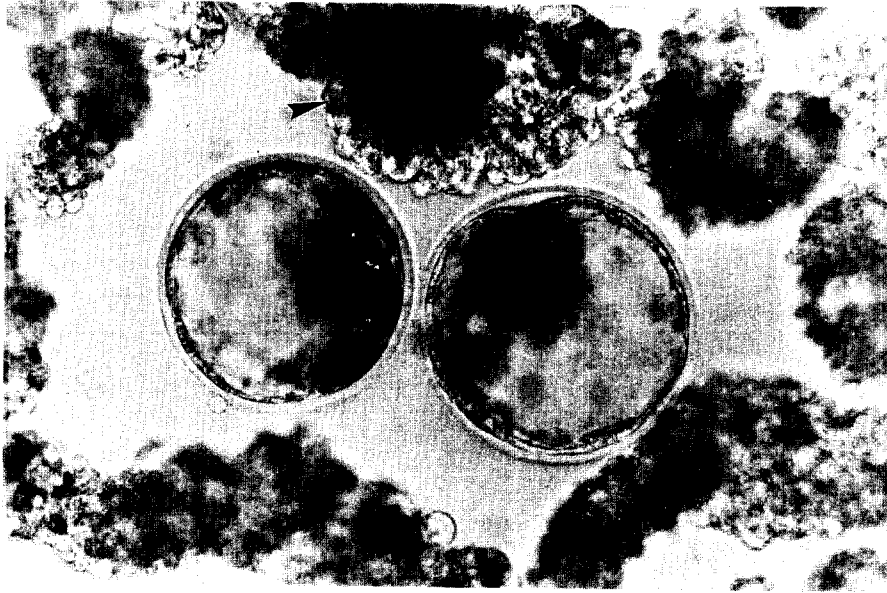


Fig. 1. Two IVF embryo developed to the blastocyst stage 7 days after co-culture with bovine oviduct epithelial tissue(arrow).

경상우 및 경산우로서 자연발정유기후 7일째에 직장검사에 의해 황체가 확인된 소만을 사용하였다.

수정후 7~9일에 배반포기까지 발달한 체외수정란(Fig. 1)을 1~2개씩 20% FBS가 함유된 PBS액과 함께 0.25 ml french straw에 흡인하여 봉인후 약 30℃의 보온병에 넣어 1시간 이내에 이식장소까지 운반하였다. 수정란이식전에 먼저 수란우에게 2% lidocaine액 5 ml로 미추부 경막외 마취를 실시하고, 오염방지를 위하여 외음부와 주위를 소독액 및 멸균 생리식염수로 세정하였다. 수정란의 이식은 straw가 장착된 수정란이식기를 이용하여 비외과적 자궁경관 경유법에 의하여 황체가 존재하는

자궁각 선단부의 상부에 이식하였다. 수태 여부의 판정은 이식후 재발정 여부를 관찰하여 재발정이 오지 않은 수란우는 약 60일경에 직장검사법으로 수태 여부를 판정하였으며, 임신이 확인된 수란우는 임신말기에 분만사로 옮겨 분만시까지 관찰하였다.

결 과

체외수정란을 FBS 또는 BSA 존재하에 소 난관 상피조직과 공동배양한 결과, Table 1에서와 같이 BSA 첨가구가 FBS 첨가구에 비하여 배반포기로

Table 1. *In vitro* development of IVF bovine embryos co-cultured with bovine oviduct epithelial tissue(BOET)

Protein source	No. of* eggs cultured	No. (%) of embryos developed to		
		sub-morula	Morula	Blastocyst
BSA	102	48(47.0)	12(11.8)	42(41.2) ^a
FBS	80	47(58.7)	12(15.0)	21(26.3) ^b

* The embryos cleaved to the 2- to 8- cell stage 48 h after *in vitro* fertilization.

^{a, b} Significantly differ ($P < 0.05$).

의 발육율이 유의적으로 증가하였다(41.2% vs 26.3%, $P < 0.05$).

체외수정란의 체외배양후 배반포기로 발육된 수정란을 수란우에 이식한 결과 2두에서 임신이 확인되어, 1두는 임신 83일에 발정이 재귀되었으나, 나머지 1두(Aberdeen Angus종)는 발정후 293일째 건강한 한우 숫송아지(생시체중 30.5 kg)를 분만하

였다(Table 2, Fig. 2).

고 찰

Eyestone 과 First(1989)는 소난관상피조직의 소포부유액을 이용한 소 수정란의 공동배양 결과 단순배양에 비하여 수정란의 발육율이 현저히 증가하

Table 2. Results of non-surgical transfer of IVF embryos

Strain* of recipient	Stage and** no. of embryos	Recipient on day of estrus	Diagnosis
HF	B, B	7	Returned to estrus day 22
AA	B, HB	7	Calf born at day 293(male)
K	XB	7	Returned to estrus day 41
K	HB	8	Returned to estrus day 21
K	B, XB	7	Returned to estrus day 42
K	HB	8	Returned to estrus day 42
K	XB, XB	8	Returned to estrus day 83
K	XB, XB	8	Returned to estrus day 20

* HF: Hereford, AA: Aberdeen angus, K: Korean native cattle

* B: Blastocyst, XB: Expanded blastocyst, HB: Hatching blastocyst



Fig. 2. A Korean native calf born after transfer of an IVM-IVF embryo to the uterine horn of a female Aberdeen Angus.

었다고 보고하였다. Shamsuddin 등(1993)도 소체외수정란을 소 난관상피조직의 소포부유액과 공동배양한 결과, 상실배기 이상으로의 발육을 및 배의 세포수가 증가하였다고 보고하였다.

한편, 난관상피세포와의 공동배양배지에 첨가되는 단백질원의 종류에 따라 수정란의 발육율이 영향을 받을 수 있음이 시사되었다. Wiemer 등(1991)은 FBS와 ECS(estrus cow serum)를 각각 난관상피세포의 단층세포배지에 첨가한 결과, FBS를 첨가할 때 배반포로의 발육율이 유의적으로 증가하였으며, 상실배로부터 배반포형성 비율도 증가하였다고 보고하였다. 또한 Park 등(1992)은 소체외수정란을 난구세포와 공동배양할 때 혈청(FCS 혹은 CS)을 첨가한 경우에 비하여 BSA를 첨가한 경우가 상실배기 이상으로의 발육율이 현저히 증가하였는데, BSA를 첨가한 경우는 난구세포가 단층을 전혀 형성하지 않았다고 하였다. 소 난관상피조직의 소포부유액이라 할지라도 혈청을 첨가하면 약 2~5일 후에는 소포가 배양접시의 저면에 부착되고, 5~7일 후에는 단층세포를 형성하는 것으로 보고되고 있다(Eyestone 과 First, 1989). 본 실험에서도 공동배양배지에 FBS를 첨가한 경우는 비슷한 시기에 단층세포가 형성되어, 소포가 유동성을 잃었으나, BSA를 첨가한 경우는 소포가 배양접시의 저면에 부착됨이 없이, 단층세포도 형성하지 않은 상태로 소포의 미세섬모의 운동도 활발하였다(미제시). 그러나 본 실험의 결과에서 나타난 발육율의 차이는 소 난관상피세포의 형태가 단층을 형성하였는지, 소포상태로 유동하는지에 의한 것이라기 보다는 FBS와 BSA의 영향인 것으로 판단된다. Eyestone과 First(1989)는 FCS의 존재하에 처음부터 소 난관상피세포의 단층세포를 형성시킨 경우와 소 난관상피조직의 소포부유액을 만들어 소 수정란을 공동배양한 결과, 두 경우 모두 발육율이 향상되었다고 하였다. 뿐만 아니라, 공동배양배지중의 소 난관상피세포는 상피세포의 형태에 관계없이 배양액 내에 배 영양물질을 부여하거나, 수정란의 발육을 억제하는 요소를 제거하는 역할을 한다는 가설이 제시되었다(Kane 등, 1992; Eyestone과 First, 1989; Heyman 등, 1987).

소 체외수정란이식에 의한 최초의 산자생산은

Brackett 등(1982)에 의하여 보고되었으나, 체내성숙난자의 체외수정에 의한 것이었으며, 체외성숙·체외수정란을 이용한 산자의 생산은 Crister 등(1986) 및 Handa(1986)에 의하여 처음 보고되었다. 그러나 후자의 경우도 체외수정란을 토끼나 면양 등의 난관내에서 일시적으로 배양한 후 회수하여 수란우에 이식하는 방법이 이용되었다. 현재와 같은 체외성숙·체외수정·체외배양에 의한 산자의 생산이 Goto 등(1988)에 의하여 보고된 이래 많은 연구결과들이 보고되었고(Jiang 등, 1991; Kajihara 등, 1990; Xu 등, 1990), 국내에서도 황 등(1993)에 이어 박 등(1994), 한 등(1994)이 체외성숙·체외수정란 유래의 송아지 생산을 보고하였다.

본 실험에서는 이식후 임신율이 매우 저조하였으나, 이는 체외수정란의 품질에 기인하기 보다는 이식기술상의 문제점 및 수란우선발의 문제점 등에 원인이 있는 것으로 판단된다. 한편, Jiang 등(1991)은 체외수정란의 이식결과 66%의 임신율을 얻었으며, 그중 50%가 쌍태였다고 보고하여, 체외수정란 유래의 산자생산기술 뿐 아니라 쌍태생산기술의 실용화를 한차원 앞당겼다.

적 요

본 연구는 소 체외성숙·체외수정란의 체외배양 조건을 검토하고, 발육된 체외수정란의 이식후 산자생산능을 검토하고자 하였다. 체외수정란을 FBS 또는 BSA의 존재하에 소 난관상피조직과 공동배양한 결과, BSA 첨가구가 FBS 첨가구에 비하여 배반포로의 발육율이 유의적으로 증가하였다(41.2% vs. 26.3%, $P < 0.05$). 배반포로 발육된 체외수정란을 수란우에 이식한 결과 1두가 임신 293일째에 한우 송아지를 분만하였다. 이상의 결과는 소 체외수정란을 소 난관상피조직과 공동배양시, 체외수정란의 체외발육이 첨가단백질원의 형태에 따라 영향을 받으며, 배반포로 발육된 수정란은 산자로 발생될 수 있음을 확증한다.

참고문헌

Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick

- WJ, Evans JF and Dressel MA. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* 27:147-158.
- Brackett BG and Oliphant G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.* 12:260-274.
- Boland MP. 1988. Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriogenology* 21:126-137.
- Critser ES, Leibfried-Rutledge ML, Eyestone WH, Northey DL and First NL. 1986. Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro*. *Theriogenology* 25:150 (Abstr.).
- Eyestone WH and First NL. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.* 85:715-720.
- Fukui Y, McGowan LT, James, RW, Pugh PA and Tervit HR. 1991. Factors affecting the *in vitro* development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 92:125-131.
- Fukui Y and Ono H. 1989. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J. Reprod. Fert.* 86:501-506.
- Goto K, Iwai N, Takuma Y and Nakanishi Y. 1992. Co-culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with different cell monolayers. *J. Anim. Sci.* 70:1149-1153.
- Goto K, Kajihara Y, Koga M, Kosaka S, 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.
- Hanada A. 1986. *In vitro* fertilization of bovine oocytes. *Consultant for Anim. Sci.* 258:10-15.
- Hernandez-Ledezma JJ, Villanueva C, Sikes JD, Roberts RM. 1993. Effects of CZB verses medium 199 and of conditioning culture media with either bovine oviductal epithelial cells or Buffalo rat liver cells on the development of bovine zygotes derived by *in vitro* maturation-*in vitro* fertilization procedures. *Theriogenology* 39:1267-1277.
- Heyman Y, Menezo Y, Chesne P, Camous S and Garnier V. 1987. *In vitro* cleavage of bovine and ovine early embryos: improved development using co-culture with trophoblastic vesicles. *Theriogenology* 27:59-68.
- Jiang HS, Wang WL, Lu KH, Gordon I and Polge C. 1991. Roles of different cells monolayers in the co-culture of IVF bovine embryos. *Theriogenology* 35:216(Abstr.).
- Kajihara Y, Kometani N, Kobayashi S, Shitanaka Y, Koshiha Y, Hishiyama L, Shiraiwa K and Goto K. 1990. Pregnancy rate and births after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. *Theriogenology* 33:264(Abstr.).
- Kane MT, Carney EW and Ellington JE. 1992. The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in development of preimplantation embryos *in vitro*. *Theriogenology* 38:298-313.
- Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Parrish JJ and First NL. 1989. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 31:61-74.
- Lu KH, Jiang HS, Wang WL and Gordon I. 1990. Pregnancies established in cattle by transfer of fresh and frozen embryos derived from *in vitro* maturation and fertilization of oocytes and their subsequent culture. *Theriogenology* 33:278(Abstr.).
- Park CK, Yuh IS and Kim CI. 1993. Effects of different protein concentrations on the de-

- velopment of bovine zygotes co-cultured with cumulus cells. Korean J. Anim. Reprod. 17:7-12.
- Rehman N, Collins AR, Suh TK and Wright RW. 1994. Development of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes co-cultured with Buffalo rat liver cells. Theriogenology 41:1453-1462.
- Rosenkrans CF, Jr and Firtch NL. 1991. Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage: effects of amino acid and vitamins. Theriogenology 35:266(Abstr.).
- Shamsuddin M, Larsson B, Gustafsson H and Rodriguez-Martinez H. 1993. *In vitro* development up to hatching of bovine *in vitro*-matured and fertilized oocytes with or without support from somatic cells. Theriogenology 39:1067-1079.
- Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, McKenna AI, Fick GH and Schultz GA. 1991. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. Mol. Reprod. Dev. 30:330-338.
- Xu KP, Pollard JW, Rorie RW, Plante L, King WA and Betteridge KJ. 1990. Pregnancy rates following transfer of bovine embryos produced by *in vitro* maturation, fertilization and co-culture. Theriogenology 33:351 (Abstr.).
- 박충생, 공일근, 노규진, 주영국, 송상현, 황영균, 박준규, 조성근, 전병균, 이경미, 윤희준, 최민철, 광대오, 이효중, 최상용. 1994. 체외성숙, 수정 및 배양된 한우 체외수정란의 유우이식에 의한 산자 생산. 한국가축번식학회지 18:47-54.
- 한용만, 이철상, 이정호, 김선정, 신상태, 김동훈, 이훈택, 정병현, 정길생, 김영수, 김영훈, 이곤세, 김교국, 황윤식, 이경광. 1994. 체외수정란 유래의 송아지 생산. 한국가축번식학회지 18:7-13.
- 황우석, 조충호, 이병천, 신태영, 노상호, 김성기, 전병준, 이강남, 신언익, 임홍순. 1993. 한우정액 유래 체외수정 송아지 생산에 관한 연구. 한국수정란이식학회지 8:143-149.