

소 체외수정란의 초자화 동결에 관한 연구

이명식 · 오성종 · 양보석 · 백광수 · 성환후 · 정진관 · 장원경 · 박수봉

축산기술연구소

Studies on Vitrification of Bovine Blastocysts Fertilized *In Vitro*

Lee, M. S., S. J. Oh, B. S. Yang, K. S. Baek, H. H. Seong, J. K. Jung

W. K. Chang and S. B. Park

National Livestock Research Institute

SUMMARY

Two experiments were conducted to study the production of *in vitro* fertilized bovine embryos and the viability of blastocysts cryopreserved by vitrification. In experiment 1, production rate of *in vitro* matured bovine oocytes after fertilization in medium containing bovine oviduct epithelial cells (BOEC), cumulus cells and granulosa cells to blastocysts were 18.4, 14.6 and 13.1 %, respectively. Developmental percentages of blastocysts produced at day 6, 7 and 8 were 8.5, 10.6 and 15.2% respectively. Hatching rate of bovine embryos produced was 60.0%. In experiment 2, post-thawed surviving embryos in a vitrification solution consisting of 7.15M ethylene glycol, 2.5 mM ficoll and 0.3 M sucrose were 36.4% (56/154). Also, survival rate of bovine embryos after exposed to vitrification solution at 1, 2, 3, 4 and 5 min were 84.0, 88.0, 71.0, 48.0 and 24.0% respectively.

(Key words : bovine, *in vitro* fertilization, embryo, vitrification)

I. 서 론

최근 생명공학 기술의 급속한 발전과 더불어 난소에서 난포란을 채란하여 체외성숙시킨 후 체외수정 및 체외배양을 통하여 상실배기, 배반포기 그리고 탈출배반포기배 생산까지 가능하게 되었다(Prokofiev 등, 1992). 이러한 체외 수정란을 이식하여 건강한 송아지 생산이 보고된 이래 (Hanada 등, 1986) 공배양체계를 도입하여 8 cell block을 부분적으로 해결하였고 (Mochizuki 등, 1991 ; Bavister 등, 1992), 한편 Herrler 등 (1992)은 insulin-like growth factor-I을 첨가하여 체외수정란 생산효율이 증가되었음을 보고하였다. 따라서 생산된 체외수정란의 동결보존방법이 정립되어야 수정란 이식사업의 산업화 및 핵이식에

의한 가축생산 등 첨단생명공학연구 추진에 중요한 역할을 할 것이다.

소의 체외수정란동결에 관해서 중요성을 인식하여 최근에 들어서 많은 연구가 수행되고 있는데 (Kuwayama 등, 1991 ; Tachikawa 등, 1993), 일반적으로 수란우로부터 채란된 체내소수정란은 항동해제로 glycerol 용액 (Farrand 등, 1990)을 많이 사용하고 사람수정란에서는 1, 2 propanediol 용액 (Bruno Lassalle 등, 1985)을 첨가하여 동결기를 이용한 단계적 동결, 즉 상온에서 -7°C 까지 분당 1°C 씩 하강시키고 식빙 후 10분간 평형시킨 후 -35°C 까지 0.3°C 씩 하강하여 액체질소에 침적시키는 방법을 사용하나 시간이 많이 소요되는 결점이 있다. 시간과 항동해제 독성을 적게 받을 수 있는 동결방법으로 glycerol과 1, 2 propanediol을 45% 첨가하여 만든

동결액으로 2단계 평형후 직접 액체 질소에 넣어 보존하는 초자화동결법으로 동결한 소수정란을 이식하여 송아지 출생에 성공한 보고도 있으나(Massip 등, 1987) 아직 소 체외수정란의 초자화 동결에 관한 연구는 초보적인 시도단계이다.

본 연구는 소 체외 수정란의 동결 보존시 적합한 항동해제 및 동결방법을 구명하고 이에 따르는 초자화 동결후 생존성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 실시하였다.

II. 시험재료 및 방법

1. 난포란의 채란

본 시험에 공시된 난포란은 천안도축장에서 도살된 한우 암소(임신우 포함)중에서 정상 생식기를 가진 1, 000 두의 양측 난소를 채취하여 항생제를 첨가한 생리적 식염수액으로 2~3회 세척한 후 25~32°C의 온도를 유지하여 37°C 항온실험실로 운반하였으며 직경 2~5 mm 난포로부터 흡입채란하여 실체현미경하에서 난구세포층이 충실하게 부착되고 세포질이 응축되지 않은 난포란을 선별하여 공시하였다.

2. 체외성숙 배양액의 조성 및 난포란의 체외성숙

기본배양액으로 TCM 199(Gibco, U. S. A.)을 사용하였고 FCS (우태아혈청)를 5% 첨가하였으며 미생물의 오염을 방지하기 위하여 배양액 100 ml에 antibiotic antimycotic(Sigma, U.S.A.)용액을 1 ml, kanamycin(Sigma, U.S.A.)을 100 μ l 첨가한 후 0.22 μ m millipore filter(Gelman, U. S. A.)로 여과하여 사용하였다. 난포란의 체외성숙은 400 μ l 소적에 50~70개의 난포란을 넣어 38.5°C, 60% 수분 및 5% 탄산가스 배양기에서 20~22시간동안 배양하였다.

3. 정자처리

본 시험에서는 체외수정시 축협 한우개량사업소에서 생산된 한우 정액을 사용하였는데 기본 배양액으로 Brackett와 Oliphant의 BO액을 사용하였고, 이 등(1993)의 방법에 따라 정자세척용 BO액에서는 BSA를 함유시키지 않았고 caffeine을 5mM 첨가하였으며 수정용 BO 액에서는 BSA를 5mg/ml, heparin을 10 μ g/ml 및 caffeine 2.5mM을 첨가하여 사용하였

으며 최종 정자온도는 1~2 $\times 10^6$ cell/ml로 조정하였다.

4. 체외수정

미성숙 난포란을 22시간 체외성숙 시킨 후 수정용 BO액에서 3회 세척하였으며 최종 세척이 끝난 정자를 30분간 전배양시킨 다음 swim-up 법으로 분리한 후 35 n m petridish에서 100 μ l 소적위에 멸균 파라핀 oil(Squibb, U. S. A.)을 피복하고 소적당 10~12개의 난포란을 넣어 6~12시간 동안 수정시켰다.

5. 체외수정란의 배양

체외수정 직후 1세포기 수정란을 TCM 199에 FCS를 5% 첨가하여 사용하였고 과일막 세포, 난관상피세포(BOEC), 또는 난구세포와 공배양하여 38.5°C, 5% CO₂ 배양기내에서 배양하였으며 배양액은 48시간마다 신선 배양액으로 교체하였고 공배양 세포가 수정란을 배양집시 표면에 부착시키는 것을 방지하기 위하여 24시간마다 흔들어서 분리하였다.

6. 초자화 동결액의 제조

기본액은 mPBS액으로 각각 20%의 우태아혈청을 첨가한 후 초자화 동결액 VS I은 7.15 M ethylene glycol, 2.5 mM ficoll과 0.3 M sucrose를 넣어 제조하였고 초자화 동결액 VS II는 22.5% glycerol과 22.5 % propanediol을 혼합하여 사용하였으며 각각 6, 7, 8 일째에 수확한 체외수정란 중에서 양질의 배반

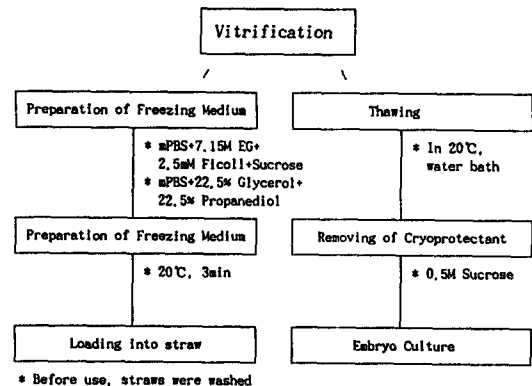


Fig. 1. Procedures of vitrification.

포들 혹은 확장된 배반포를 동결시험에 공시하여 Fig. 1과 같이 20°C에서 3 min 이내로 평형하였고 동결을 해후 5% 우태아혈청이 첨가된 TCM 199 배양액에서 난구세포와 72시간 공배양하여 부화배반포기로의 발달을 조사하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 소의 체외수정란 생산 및 발달을 조사

한우난포란을 채란하여 체외수정후 배반포기로의 발달에 있어서 난관상피세포, 난구세포 및 과립막세포와의 공배양효과는 Table 1과 같다.

난분할율은 평균 65%로써 처리간 차이가 적었으며 배반포기배의 생산성은 난관상피세포와의 공배양이 18.4%로 가장 높았으며 난구세포 단층배양구가 14.6%, 과립막세포 단층배양구가 13.1%로 평균 15.2%로써 이는 Zhang 등 (1992)이 난구세포 단층배양구

에서 난분할율 73%, 배반포기배 생산율 14%, Karen Moore 등(1993)이 난관상피 단층배양구에서 난분할율 62%, 배반포기배생산율 14%로 보고한 성적과 비슷하였으며 본 시험의 결과로 볼 때 공배양효과는 인정되나 공배양 세포간의 차이는 크지 않는 것으로 사료된다.

소 체외수정란의 체외발달율은 Table 2에서 보는 바와 같이 수정후 24시간에 5% 정도가 난분할되기 시작하여 2일째에 57.9%가 난분할되었으며 6일째에 상실배기이상인 20.8%, 8일째에 배반포기배가 15.2% 생산되었으며 Goto 등 (1988)이 수정후 3~4일에 25%가 8세포기, 5~6일에 상실배기 21.1% 및 7~8일에 배반포기 15.1%로 보고한 결과와 비슷한 체외발달율을 보였다.

체외수정란의 부화배반포기배로의 발달율은 Table 3에서 나타난 바와 같이 수정후 8일째 수확된 배반포기배 75개를 공시하여 5일동안 체외배양한 결과 45개

Table 1. Production of blastocysts after *in vitro* fertilization in medium containing BOEC, cumulus cell and granulosa cell

Cell type	No. oocytes used	No. cleaved oocytes(%)	No. blastocysts (%)
BOEC	559	351(62.8)	103(18.4)
Cumulus cell	706	496(70.2)	103(14.6)
Granulosa cell	687	422(61.4)	90(13.1)
Total	1,952	1,269(65.0)	296(15.2)

BOEC : bovine oviduct epithelial cells

Table 2. Development of embryos fertilized *in vitro*

Stage	Day 1(%)	Day 2(%)	Day 6(%)	Day 7(%)	Day 8(%)
1-cell	1,856(95)	823(43.2)	683(35.0)	683(35.0)	683(35.0)
Cleaved ova (2-4 cell)	96(5)	909(46.6)	568(29.0)	568(29.0)	568(29.0)
8-cell		220(11.3)	294(15.1)	228(11.7)	234(12.0)
Morulae			241(12.3)	266(13.6)	171(8.8)
Blastocyst			166(8.5)	207(10.6)	296(15.2)

Table 3. Hatching rate of IVF bovine embryos

Embryo stages	No. blastocysts used	Development on day 11		Day 13	
		No. Expanded blastocysts(%)	No. Hatched blastocysts(%)	No. Expanded blastocysts(%)	No. Hatched blastocysts(%)
Blastocyst	75	35(46.0)	36(48.0)	27(36.0)	45(60.0)

가 부화하여 60%의 부화율을 보였고 수정란 발달시기가 늦은 것보다 빠르거나 평균 발생과정을 보이는 것이 계속된 배양에서 다음 단계로의 높은 발생율을 보이는 점으로 미루어 보아 양질수정란의 판단기준으로 설정될 수 있을 것이라고 사료된다.

2. 체외수정란의 초자화동결 보존 후 생존율 조사

생산된 체외수정란을 초자화동결 보존 후 24~48시간에 융해하여 배양했을 때 부화배반포기배로의 발달율은 Table 4에 나타나 있다. 시험 1에서 glycerol 25%와 1, 2 propanediol 25%를 첨가하여 제조된 초자화동결액을 사용했을 때 융해 직후 생존율이 14.7%이었고 이후 72시간 동안 계속배양한 결과 생존한 수정란 중 29.4%만이 부화하였다. 이와 같은 방법은 Scheffen 등 (1986)이 Mouse 수정란 동결에 사용했던 방법으로 Kuwayama 등 (1992)이 소 체외수정란을 이용하여 16단계로 평형시킨 후 87%에 달하는 높은 생존성을 보고한 성적과 비교할 때 생존성이 낮았는데 이는 본 시험에서 간편한 동결과정을 위하여 1단계 평형방법을 시도한 결과 고농도 동해방지제의 독성에 의해 세포질이 크게 손상된 것으로 사료된다.

한편 시험 2에서 7.15 M ethylene glycol, 2.5 mM ficoll 및 0.3 M sucrose 로 제조된 초자화 동결액을 사용했을 때 융해 후 생존율은 36.4%이었고 체외배양결과 46.4%가 부화하였다. Mahmoudzadeh 등은 같은 방법으로 시험을 수행하였을 때 융해 후 생존율을 75%로 놓았다고 보고하였으나 이는 체내 소수정란을 이용하였기 때문이며 또 48시간 배양후 1개의 수정란만이 확장배반포로 발달하였고 부화성적은 없었다. 강 등 (1990)은 DMSO를 이용한 초자화동결액

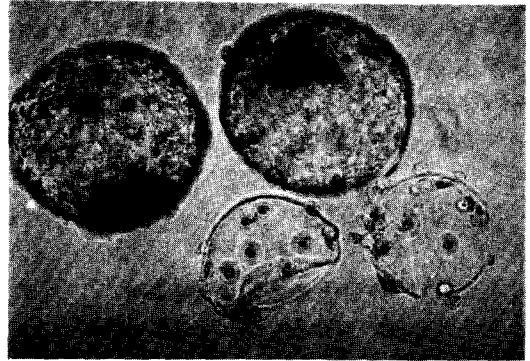


Fig. 2. Bovine blastocysts from oocytes matured and fertilized *in vitro*, cryopreserved by vitrification.

으로 생쥐수정란을 동결융해하여 84.6%의 생존성을 보고하여 그 가능성을 시사하였고 또한 강 등(1991)도 DMSO를 이용하였을 때 생존율이 극히 저조하였으나 ethylene glycol을 이용했을 때 생존율이 극히 저조하였으나 ethylene glycol을 이용했을 때 Eo 대부분 확장배반포기까지 생존하였다고 보고하였으나 그 이후 발생에 대한 언급은 없었다.

따라서 본 시험에서는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 1단계 평형법 초자화 동결후 부화배반포기배까지 발달하는 것으로 보아 ethylene glycol을 이용하여 동결 융해 후 생존한 수정란은 부분적으로 손상된 세포질을 회복하면서 계속 발육하는 데 큰 문제가 없을 것으로 사료된다.

초자화 동결액에서 3분간 평형시켰을 때 생존율

Table 4. Survival rate of vitrified IVF bovine embryos

Vitrification solution	Cryoprotectant	No. of embryos vitrified	No. of post-thawed surviving embryos(%)	Hatching rate of post-thawed surviving embryos(%)
Experiment 1 (VS I)	Glycerol 25% + 1,2 propanediol	116	17(14.7)	29.4
Experiment 2 (VS II)	Ethylene glycol + ficoll + sucrose	154	56(36.4)	46.4

* VS : Vitrification solution

Table 5. Survival rate of bovine embryos after exposed to vitrification solution

Vitrification sol	No. of survived /No. of exposed embryos				
	1 min	2 min	3 min	4 min	5 min
EG + ficoll + sucrose	21 /25	22 /25	18 /25	12 /25	6 /25
Survival rate(%)	84.0	88.0	72.0	48.0	24.0
Hatched embryos(%)	15(71.4)	14(63.7)	11(61.1)	5(41.7)	1(16.7)

72% 이상으로 높게 나타났고 5분이 경과하였을 때는 24%의 생존율을 보여 시간이 경과했을 때 첨가된 항동해제의 독성영향을 받으므로 평형에서 액체질소에 들어가기까지 3분 이내로 단축하는 것이 필요하다.

IV. 적 요

소 체외수정란을 초자화 동결보존에 사용하기 위하여 한우 1,000 두의 난소를 본 시험에 공시하였다. 체외수정란 생산에 있어서 난포란의 체외성숙 및 체외수정후 체외발생체계로써 난관상피세포, 난구세포 및 과립막세포와 공배양한 결과 배반포기배 생산율이 각각 18.4%, 14.6% 및 13.1%로 나타났다. 배반포기배의 출현율은 수정후 6일째에 8.5%, 7일째에 10.6% 그리고 8일째에 15.2%로 나타났다. 소 체외수정란의 수정후 13일째에 60.0%가 부화배반포기배로의 발생율을 보였다. 한편 생산된 소 체외수정란의 초자화 동결보존후 시험 2의 방법으로 36.4%가 생존하였으며 초자화 동결보존액에서 1, 2, 3, 4, 및 5분간 노출한 후 생존율은 각각 84.0%, 88.0%, 72.0%, 48.0% 및 24.0%이었다. 본 시험의 결과로 보아 소 체외수정란의 초자화 동결액으로 VS II액이 적합하였으며 동결 과정에 소요되는 시간은 3분 이내에 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 인용문헌

1. Bavister, B. D., A. Tereasa, Rose-Hellekant and Tanu Pinyopummintr. 1992. Development of *in vitro* matured /*in vitro* fertilized bovine embryos into morulare and blastocysts in defined cultrue media. *Theriogenology*. 37:127-143.
2. Brackett, B. G. and G. Oliphant. 1975. Cap-

acitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.* 12:260-274.

3. Bruno Lassalle, Jacques Testart and Jean-Paul Renard. 1985. Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1, 2 propanediol. *Fert and steril.* 44:645-651.
4. Farrand, G. D. and R. P. Elsdon. 1990. Freezing of embryos. *Bovine embryo transfer*. 1990. Short course proceedings. 133-140.
5. Goto, K., Y. Kajihara, S. Kosaka, Y. Nakanishi and K. Ogawa. 1988. Pregancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* maturation follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.* 83:753-758.
6. Hanada, A., Y. Shioya and T. Suzuki. 1986. Birth of calves from nonsurgical transfer of blastocysts originated from *in vitro* fertilized oocytes matured *in vitro*. 78th Annu. Meet, *Jpn. Soc. Zootech. Sci.* 1:18
7. Herrler, A, A. Lucas-Hahn and H. Niemann. 1992. Effects of insulin-like growth factor- I on *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*. 37:1213-1224.
8. Karen Moore and Kenneth R. Bondioli. 1993. Glycine end alanine supplementantation of culture medium enhances development of *in vitro* matured and fertilized cattle embryos *Biol. Reprod.* 48:833-840.
9. Kuwayama, M., S. Hamano and T. Nagai. 1992. Vitrification of bovine blastocysts obtained by *in vitro* culture of oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*

- 96:187-193.
10. Mahmoudzadeh, A. R., A. Van Soom., I. Van Vlaenderen and A. De Kruif. 1993. A comparative study of the effect of one step addition of different vitrification solutions on *in vitro* survival of vitrified bovine embryos. *Theriogenology*, 39:1291-1302.
 11. Massip, A., Van Der Zwalmen, P. and F. Ectors. 1987. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology*, 27:69-79.
 12. Mochizuki, H., Y. Fukui and H. Ono. 1991. Effect of the number of granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization and development of bovine oocytes. *Theriogenology*, 36:973-986.
 13. Prokofiev, M. I., L. K. Ernst, N. M. Suraeva, I. S. Lagutina, N. N. Udavlennikova, A. Z. Kesyan and A. I. Dolgohatskiy. 1992. Bovine oocyte maturation, fertilization and further development *in vitro* and after transfer into recipients. *Theriogenology*, 38:461-469.
 14. Scheffen, B., P. Van der Zwalmen., and A. Massip. 1986. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. *Cryo letters* 7:260-269.
 15. Tachikawa, S., T. Oti, S. Kondo, T. Machida and M. Kasai. 1993. Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by *in vitro* maturation and fertilization. *Mol. Repro. Dev.* 34:266-271.
 16. Zhang, L., D. M. Barry, R. S. Denniston, T. D. Bunch and R. A. Godke. 1992. Successful transfer of frozen-thawed IVF-derived bovine embryos. *Theriogenology*, 27(1):221. Abstract.
 17. 강만중, 이철상, 한용만, 유대열, 이경광. 1990. 생쥐 2-세포기 수정란의 초급속동결. *한국가축번식학회지*, 14:9-16.
 18. 강민수, 손시환, M. Kasai. 1991. 마우스 상질배의 Vitrification에 관한 연구. *한국가축번식학회지*, 15:173-177.
 19. 이명식, 양보석, 정진관, 오성종, 최화식, 박성재, 이근상. 1993. 이식 가능한 소 체외수정란 생산에 관한 연구. *농업과학논문집*, 35:513-516.