

## 돼지 동결 정액을 이용한 체외 수정란 생산 효율

조상래\*, 김현중, 최창용, 손동수, 최선호, 손준규, 김성재, 김재범, 한만희, 진현주  
농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장

### Effect of Production *In Vitro* Embryo using Boar Frozen Semen

Sang-Rae Cho\*, Hyun-Jong Kim, Changyong Choe, Dong-Soo Son, Sun-Ho Choi, Jun-Kyu Son,  
Sung-Jae Kim, Jae-Bum Kim, Man-Hye Han and Hyun-Ju Jin

Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea

#### ABSTRACT

This study was carried out to investigate the effective genetic resources preservation system using the frozen boar semen. The porcine oocytes were matured for 44 hours in NCSU-23 medium with or without 10% Porcine Follicle Fluid (PFF), 0.5  $\mu$ g/ml porcine FSH, 0.5  $\mu$ g/ml equine LH, 1.0  $\mu$ g/ml 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) and 10 ng/ml Epidermal Growth Factor (EGF) under mineral oil at 38.5°C in humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air. After 44 h of culture, the oocytes were inseminated with frozen-thawed semen and fresh semen prepared with mTBM medium for 6 h. Later, set of 50 presumptive zygotes were transferred into 4-well dish (500  $\mu$ l) of IVC medium. for embryos freezing, slow-freezing and vitrification methods were used as a cryopreservation. Differences among treatments were analyzed using General Linear Model Procedure by SAS Package (version 6.12) differences were considered significant when  $p < 0.05$ . Following IVF and IVC, the rates of cleavage and blastocysts formation were significantly higher ( $p < 0.05$ ) in hormone supplemented group than that of hormone-free group (25.7 vs, 12.1). The development rates to cleavage and blastocysts were significantly higher in PZM-5 group than NCSU-23 group (60.3%, 46.6% vs 27.4%, 11.1%). Further improvement was achieved when PZM-5 was supplemented with FBS. Cleavage rates was significantly higher in fresh semen source group than frozen semen (66.7% vs 43.7%). However in blastocysts rates was similar two groups. Post-thaw survival rates of embryos were 1.2% and 2.2% in slow-freezing and vitrification groups, respectively. The results of our study suggest that it is still possible to improve the culture conditions and boar semen cryopreservation for enhance reproductive technology and animal genetic resources conservation.

(Key words : porcine, embryo, cryopreservation, semen, genetic resources)

#### 서론

정자와 난자 그리고 수정란과 체세포를 이용한 생명공학 분야에서 응용은 현재 다양한 축종과 방법으로 연구가 이루어지고 있다. 특히, 이러한 기술은 바이오신약, 장기 그리고 형질전환 분야에서 연구가 활발히 진행되고 있다. 소에 있어서는 정액을 이용한 인공수정과 수정란이식 기술들이 가축의 개량 수단뿐만 아니라 희소 품종의 경우에는 유전자원의 보존 및 증식의 수단으로 이용이 되고 있다. 현재는 국가적으로 생물종의 다양성에 대한 중요성이 국제적으로 쟁점화 되어 가고 있으며, 기후 변화에 따른 멸실 위험종들의 국가적인 보호 차원에서 유전자원의 확보는 매우 중요한 사안으로 부각되고 있다. 그 결과로 축산업이 농업에서 차지하는 비중이 높은 실정이다.

가축에 있어서 질적으로 우수한 수정란을 생산하는 목적도 이와 같이 유전자원의 보존 측면에서 대단히 중요한 사항이다. 수정란은 신선란과 동결란을 사용하여 산업적 활용으로 이용을 증대시키고 있다. 그러나 동결 수정란은 동결 용해 후의 생존성이 높을 때만이 복원력을 높일 수 있기 때문이다. 특히, 돼지 수정란 수정란의 생존성을 높이기 위해서는 동결 전까지 질적으로 우수한 수정란을 생산하는 것이 무엇보다도 중요한 사항이다(Dorbrinsky, 1997). Edwards 등(1965)은 도축 난소 이용으로 수정란을 생산하기 위해서는 먼저 난포로부터 돼지 미성숙 난포란을 채취하여 체외성숙을 유도하기 위해서 43~46시간 동안 체외 배양하였을 때가 수정적인 제2감수분열 증기에 도달하였다고 보고하였으며, Iritani 등(1978)은 완전히 체외성숙된 돼지 난포란을 이용하여 체외수정을 유도한 결과 성공적으로 수정을 시킬 수 있었다고 보고하였다. 그리

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

고, Mattiori 등(1989)은 체외수정란을 생산하여 수란우에 이식하여 최초로 산자를 생산할 수 있었다. 돼지 미성숙 난포란의 경우는 다른 가축의 난자와 비교하였을 때 난자의 핵과 세포질의 성숙이 불완전하게 일어나게 되는 비율이 높아 체외수정을 시켰을 경우는 다정자의 침입에 의한 염색체의 이상을 일으켜 세포의 발달 중지 현상을 일으키기도 한다. 돼지수정란 생산을 위해서는 아직도 해결해야 할 문제점이 많이 남아 있다. Wang 등(1997)은 난포란의 체외성숙 배양액으로는 NCSU-23, TCM-199 및 Modified Whitten's medium을 비교한 결과 핵성숙, 정자의 침투, 응성전핵의 형성, 다정자 침입 및 난 분할술에서는 세가지 배양액간에는 차이는 없었으나, 배반포까지의 발달 및 배반포기배의 세포수에서는 차이를 보여 NCSU-23이 가장 좋다고 보고하였다. 그러나 Coy 등(1999)은 배양액간의 성숙 및 수정율에는 차이가 없었다고 보고하였지만 응성 전핵의 형성율에서는 Waymouth medium이 다른 두 배양액보다 높았다고 보고하였다. 돼지 정액의 동결 보존에 이용되는 보존액으로는 egg yolk-glucose 등이 있으며, 대부분의 보존액에는 난황이 포함되어 있다(Polge 등, 1970). 또한, 돼지의 정자가 동결 융해되는 과정에서 일어나는 화학적 반응과 삼투압의 변화 등으로 인한 손상을 막기 위하여 여러 가지 항동해제가 이용되고 있다. Almid와 Johnson(1988)은 glycerol이 많은 포유동물의 정자에 대한 항동해제로 널리 이용되고 있지만 돼지 정자는 다른 가축의 정자에 비해 그 농도에 훨씬 민감하다고 보고하였다. 그리고 glycerol은 세포막의 투과성을 변화시켜 정자의 침체에 손상을 입힌다고 보고하였으며, Bamba와 Cran(1988)은 glycerol이 돼지의 정자의 활력과 정상 침체의 비율이 감소하는 이유로서 glycerol의 화학적 독성이나 급속 융해시의 삼투압 충격 때문이라고 하였다. 모든 종류의 세포는 항동해제의 종류와 동결 속도간의 상호작용에 영향을 받기 때문에 glycerol 농도는 냉각 속도, 정액의 양이나 포장방법에 따른 동결 속도 등을 고려하여 결정해야 한다(Johnson 등, 2000). 정자의 활력에 유리한 적정 glycerol의 농도는 3~4%이고 정상 모두율에는 0~1%가 최적이며, 동결 속도는 30°C/min의 속도로 냉각시키는 것이 가장 좋은 것으로 밝혀졌다(Johnson 등, 2000). Paquignon(1985) 등은 exythriol, xylitol 및 adonitol, acetamide 그리고 DMSO 등을 저농도로 첨가하였을 때 융해 후 정자의 활력은 개선되었으나 정상 모두율은 감소하였다고 보고하였다. 여러 가지 항동해제가 검토되었지만 Watson(1995)은 돼지의 정액 보존에는 glycerol이 가장 우수한 것으로 보고하기도 하였으나, glycerol의 독성 때문에 정자가 저온에 대한 저항성이 낮고, 융해시 온도 및 희석액의 조건에 의해 동결 융해한 정자의 생존율과 정상 침체율 차이에 따라서 수정율에 차이가 있음을 보고하기도 하였다. 수정란의 동결 보존과 비외과적 수정란이식은 현장 적용을 위해서는 지속적인 연구를 수행해야 할 분야라고 생각이 든

다. 따라서 본 연구에서는 돼지 동결 정액의 사용으로 체외수정에 이용되는 효율성과 그리고 동결 방법에 따른 동결 융해 후의 생존성을 조사하여 유전 자원 확보의 다양한 방법을 모색하고자 본 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 난포란의 채취

돼지의 체외수정란 생산을 위해서 난소는 도축장의 도축난소로부터 회수하였다. 난소수송은 100 units/ml의 penicillin G와 100 µg/ml의 streptomycin이 함유된 36°C 생리식염수에 담아 3시간 내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 불필요한 조직을 잘라낸 후 항생제가 첨가된 생리식염수로 3~4회 세척한 후 18 gauge 주사 바늘이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 흡입에 의한 방법(aspiration)으로 난포란을 채취하였다. 채취한 난포란은 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(D-PBS)에 0.1% polyvinyl alcohol(PVA)이 첨가된 배양액으로 2회 이상 세척 후 실체 현미경하에서 회수하였다. 회수된 난포란은 0.1% PVA가 함유된 D-PBS로 3~4회 세척한 후 등급을 분류하였다. 등급의 분류는 난구세포의 부착 정도와 세포질의 충실도에 따라 Wiemer 등(1991)의 난포란 등급 분류 방법을 따랐다. 난구세포가 4층 이상이고 세포질이 균일한 것은 Grade I, 난구세포가 2~3층인 것은 Grade II, 난구세포가 한 층이거나 나화되었으며, 세포질이 균일한 것은 Grade III, 전체가 나화되었고, 퇴화된 것은 Grade IV로 분류하였으며, 이들 중 Grade I과 Grade II의 난포란만을 본 실험에 사용하였다.

### 2. 난포란의 체외성숙

회수된 난포란은 porcine zygote medium-5(PZM-5) 또는 North Carolina State University(NCSU)-23 기본 배양액에 10% 돼지난포액(porcine follicular fluid, PFF), 0.5 µg/ml porcine FSH, 0.5 µg/ml equine LH, 1.0 µg/ml 17β-estradiol(E<sub>2</sub>) 및 10 ng/ml Epidermal Growth Factor(EGF)를 첨가하여 체외배양하였다. 난포란의 체외성숙용 배양액을 4-well dish(Nunc, Denmark)의 각 well당 500 µl씩 넣어 38.5°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 동안 전배양하였다. 회수한 난자는 HEPES-Buffer 배양액으로 3회 세정하고, 체외성숙용 배양액으로 1회 세정하였다. 세정된 미성숙 난포란을 4-well dish 각 well당 50개씩 넣어 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 호르몬이 첨가된 배양액에서 22시간 배양한 후, 호르몬이 첨가되지 않은 신선 배양액으로 옮겨 22~26시간 더 배양하였다.

돼지 난포액은 5 mm 이상 크기의 가시난포에서 난포액을 채취하여 4°C에서 3,000 rpm으로 30분간 원심분리시킨 후 pellet을 제외한 상층액만 회수하여 0.8 µm와 0.45 µm 필터를 이용하여 여과한 후 -20°C에 냉동 보관하였다. 그리고 체

외성숙 및 배양 시에는 0.2  $\mu\text{m}$  필터를 사용하여 필터 후 사용하였다.

### 3. 정액의 제조 및 체외수정

돼지정액의 채취는 요오크셔 종 수컷 1두에서 주 1회 수압법에 의하여 채취하였으며, 필터를 부착한 500 ml 보온병에 농후 정액만 분리 채취하였다. 동결정액의 제조는 정액을 채취 즉시 동온의 BTS(Beltsville Thawing Solution) 보존액으로 1:1 희석하여 실험실로 옮겨 22~25°C 까지 약 2시간에 걸쳐 서서히 온도를 낮춘다. 그리고 실온에서 15 ml 시험관에 분주하여 1,500 rpm으로 15분간 원심분리하여 상층액은 버리고 정자 펠렛만 회수하여 동결에 사용한다. 정자의 희석과 동결방법은 김 등(2002)의 방법에 준하여 실시하였다. 돼지 체외수정을 2.5 mM caffeine과 0.1% BSA가 첨가된 mTBM에서 이루어졌다. 44시간 동안 체외성숙된 돼지 난포란은 0.1% Hyaluronidase(Sigma)가 함유된 D-PBS 용액에 넣어 난구세포를 제거하고 mTBM 용액으로 세정하였다. 세정 후, 15~20 개의 성숙난자는 수정용 mTBM 100  $\mu\text{l}$  소적에 정자의 최종 농도를  $1.5 \times 10^5$  sperm/ml로 조정하여 미세 소적에 넣어 6시간 동안 38.5°C의 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 수정을 유도하였다.

### 4. 수정란의 체외배양

돼지 체외수정란의 배양은 체외수정 후 3일 동안 0.4% BSA가 함유된 PZM-5과 NCSU-23에서 이루어졌다. 체외수정란은 TL-HEPES 배양액으로 세정한 후 각 well당 500  $\mu\text{l}$ 의 배양액이 들어있는 4-well dish에서 배양하였다(50개 수정란/500  $\mu\text{l}$  배양액). 체외배양 4일째부터는 수정란을 10% Fetal Bovine Serum (FBS)이 함유된 PZM-5 배양액과 혈청이 첨가되지 않은 NCSU 배양액으로 옮겨 배양하였다. 체외발달의 확인은 체외수정 후 2일째에 수정율을 조사하였으며, 7일째에 배반포기배 발달율을 조사하였다.

### 5. 수정란 동결

수정란의 완만 동결을 위한 동결 보호제로서 1.8 M ethylene glycol(EG, Sigma) 0.25M sucrose를 사용하였으며, 그리고 평형 배양액은 D-PBS(Gibco, U.S.A) 배양액에 0.5% BSA(Bovine Serum Albumin, Sigma)를 첨가하여 사용하였다. 수정란의 동결을 위해서는 프로그램화된 자동동결기(CL 863, Cryogenic U.S.A)를 사용하여 동결을 실시하였다. 수정란 동결은 0.25 ml 플라스틱 스트로우에 장착 후 액체 질소에 침지된 chamber내에 위치시킨 후, chamber 온도는 -7°C에서 시작하여 10분간 정지시키는데 약 3분 후에 인위적인 빙정 형성 유도를 위하여 액체질소에 침지한 펌셋으로 스트로우 식빙을 실시한다. 그리고 -35°C까지 -0.3°C/분 속도로 냉각시킨 후 -35°C에 도달하였을 때 액체질소에 바로 침지하였다. 동결

후 보존 수정란을 2주 정도 보관 후에 생존성을 확인하기 위하여 스트로우를 보관고로 부터 꺼내어 공기 중에서 약 10초 동안 그리고 37°C의 항온 수조에서 약 20초간 용해 후 TL-HEPES 배양액에서 2~3회 세척 후 체외배양액으로 옮겨 24시간 이상 배양하여 배반포기배의 재형성과 확장 배반포기배 및 부화 단계까지의 발달로서 생존율을 확인하였다.

돼지수정란의 초자화 동결을 위한 VS1(vitrification solution 1)용액의 조성은 10% glycerin, 0.1 M glucose, 0.1 M sucrose, 1% polyethylenglycol(PEG)를 혼합하여 사용하였고, VS2는 10% glycerin, 10% ethylene glycol(EG), 0.2 M glucose, 0.2 M sucrose, 2% PEG, 그리고 VS3은 10% glycerin, 30% EG, 0.3 M glucose, 0.3 M sucrose, 3% PEG의 조성으로 동결을 실시하였다. 수정란의 초자화 동결의 평형 시간과 동결 방법은 VS1 용액에서 5분, VS2 용액에서 5분, 그리고 VS3 용액에서 0.25 ml 스트로우에 장착하기까지의 시간은 1분 이내에 완료하여 액체질소에 침지하였다. 초자화로 동결된 수정란의 용해 방법은 Pugh 등(2000)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 항온 수조의 37°C에서 스트로우를 용해한 후 0.3 M sucrose 용액에서 2~3회 세척하고 무혈청 배양액에서 2회 세척 후 배양하였다. 생존성 확인을 위해서 용해 후 16시간 이상 배양하여 평가하였다.

### 6. 통계 분석

실험 결과의 통계학적 분석은 SAS package(version 6.12)이 용과 GLM producer를 사용하여 각 처리구간 유의성을 검증하였다.

## 결과 및 고찰

Table 1은 체외성숙시에 호르몬을 첨가 유·무에 따라서 수정란의 분할율과 배반포기까지의 발달율을 조사한 결과이다. 총 사용된 난자수는 379개의 난자를 이용하였다. 체외성숙 조건에서 호르몬의 첨가는 핵의 성숙뿐만 아니라 세포질의 성숙도 동시에 일어나야 하므로 호르몬의 첨가는 이러한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 특히 Abeydeera 등(1998)은 성숙배양액의 어떤 성분이나 첨가물과의 상호작용에 의해 특정 물질의 첨가가 난자의 발달에 영향을 미친다고 보고하기도 하였다. 핵과 세포질의 성숙을 위해서 체외배양시 표피 성장 인자를 첨가할 때 다소 높은 핵성숙율을 보인다고 Ding과 Foxcroft(1994)는 보고하였다. 이러한 결과는 본 실험에서도 EGF를 첨가하여 높은 핵성숙율을 보인 것과 유사한 결과를 나타내어 체외성숙시 EGF의 첨가로 체외수정란 생산 효율을 증대시킬 수 있을 것이라고 사료된다. 난포란의 체외성숙율의 성공은 수정란의 후기배로의 발달과 정상적인 수정란의 형태로 발달을 할 수 있는 것이다. 난포란의 체외성숙 효율을 높이기

Table 1. Development of porcine embryos in different culture conditions supplemented with or without hormones

Treat-ments	No. oocytes used	Developed to (%)	
		Cleavage	Blastocysts
With	186	144 (77.4) <sup>a</sup>	37 (25.7) <sup>a</sup>
Without	193	116 (60.1) <sup>b</sup>	14 (12.1) <sup>b</sup>

With : FSH 0.5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml LH, E<sub>2</sub> 1  $\mu$ g/ml.

Without : PFF와 EGF만 첨가.

<sup>a,b</sup> Percentage with different superscripts within columns indicate significant different ( $p < 0.05$ ).

Replicates 6.

위해서 여러 가지 성숙인자를 첨가하거나 혈청, 호르몬 그리고 아미노산 등을 첨가하여 체외성숙을 유도하여 효과적인 결과를 보고하였다(Younis 등, 1989). 본 연구에서 체외성숙을 유도하기 위해서 EGF, LH, FSH 그리고 E<sub>2</sub>를 배양액에 첨가하였다. 본 실험에서는 혈청의 첨가 그룹에서 수정 후 분할율과 배반포기배의 발달율은 77.4%와 25.7%로서 첨가하지 않은 그룹보다 유의적으로( $p < 0.05$ ) 높은 결과를 보여 호르몬의 첨가가 돼지 난포란의 분할율과 배발달율에 중요한 영향을 미치는 것으로 나타났다. 난자의 체외성숙은 체외배양 후 44시간 이상 배양하였을 때 Metaphase II 단계까지 도달하는 난자의 비율로서 평가되는데 체외성숙율의 차이 또한 다양한 원인에 의하여 수정란까지의 발달율에 영향을 미친다. Day와 Funashashi(1996) 등은 비슷한 발육 단계에 있는 돼지의 미성숙 난포란 사이에 크기에 따라서 제1감수 분열 전기 상태의 차이에서 기인된다고 하였다(Day와 Funashashi, 1996). 이와 같이 돼지 난포란의 체외성숙에 미치는 요인은 매우 다양하게 나타나는 것으로 사료된다.

Table 2에서는 돼지 수정란을 서로 다른 배양 조건하에서 배양시켰을 때 수정 후 분할율과 배반포기배까지의 발달율을 조사한 결과이다. 두 처리간의 분할율과 배반포기배 모두 PZM-5

Table 2. Development of IVP porcine embryos in different culture medium

Medium	No. oocytes used	Developed to (%)	
		Cleavage	Blastocysts
PZM-5	350	211 (60.3) <sup>a</sup>	58 (27.4) <sup>a</sup>
NCSU-23	348	162 (46.6) <sup>b</sup>	18 (11.1) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Percentage with different superscripts within columns indicate significant different ( $p < 0.05$ ).

Replicates 7.

배양액 조건에서 분할율(60.3 vs, 46.6%)과 배반포기배의 발달율이 PZM-5 배양액(27.4 vs, 11.1%)에서 유의적으로 높은 발달율을 보였다. 수정란의 배양조건에 따라서 발달율은 다소 차이를 보이기도 한다. 아미노산과 insulin 등과 같은 성장인자와 항산화제와 같은 첨가 물질을 넣어 배양했을 때는 더 높은 발달율을 보고하기도 하였다(Cosby 등, 1988; Joenje, 1989). Swine 등(2001)은 배양 조건에 따른 수정란의 발달 개선을 위해서는 체내 배양 조건에 맞는 최적화된 배양 조건을 확립해 나아가야 한다고 보고하였다. 그리고 Coy 등(1999)은 배양액간의 성숙을 및 수정율에는 차이가 없었다고 보고하였지만 웅성 전핵의 형성율에서는 Waymouth medium이 다른 두 배양액보다 높았다고 보고하였다. 체외배양시 혈청의 첨가는 수정란의 발달을 촉진하는 에너지원뿐만 아니라 성장인자로서도 중요한 역할을 수행한다고 보고하였다(Bavister, 1995). 배양액의 조건에 따른 수정란의 발달을 조사에 대한 보고로서 Okada 등(2006)은 수정 후 4일째 PZM 배양액에 10%의 혈청을 첨가하였을 때 배반포기배의 발달율은 47%의 결과를 나타내었고, 세포수에 있어서도 57개 수준으로 첨가하지 않은 그룹보다 유의적으로 높은 배발달율을 보였다. 이러한 연구 결과로 미루어 볼 때 수정란의 분할율과 후기배로의 배발달율에도 기본 배양액에 10% 혈청을 첨가하는 것이 더 높은 발달율을 높일 수 있을 것으로 사료된다. 그리고 최 등(2009)은 체외수정 후 2~4세포기 수정란을 외과적으로 이식하여 산자를 생산하기도 하였으나, 배반포기 수정란의 비외과적 이식을 위해서는 아직도 돼지 수정란의 배양체계에 관한 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Table 3은 동결정액과 신선정액을 이용하여 체외수정을 시켰을 때 난포란의 수정율과 후기배로의 배발달율을 조사한 결과이다. 전체 사용한 수정란은 588개의 난자를 공시하여 실험에 사용하였다. 수정 후 분할율에 있어서는 신선정액이 66.7%로서 43.7%인 동결정액을 사용한 것보다 유의적으로( $p < 0.05$ ) 높은 발달율을 보였다. 그리고 배반포기배의 발달율에서도 신선정액이 21.5%로서 동결 정액의 6.8%보다 다소 높은 결과를 나타내어 동결 정액보다는 신선정액에서 난포란의 수정

Table 3. Development of IVP porcine embryos by different semen source

Semen	No. oocytes used	Developed to (%)	
		Cleavage	Blastocysts
Fresh	286	191 (66.7) <sup>a</sup>	41 (21.5)
Frozen	302	132 (43.7) <sup>b</sup>	16 (12.1)

<sup>a,b</sup> Percentage with different superscripts within columns indicate significant different ( $p < 0.05$ ).

Replicates 6.

울과 배반포기배까지의 높은 결과를 얻을 수 있었다. 본 연구에서 동결정액을 이용하여 수정에 사용한 이유는 멸종 위험성의 문제를 안고 있는 재래가축의 유전 자원 확보의 차원에서 정액을 안전하게 보존하여 생물의 유전적 다양성을 확보해 나가는 방법으로서 동결 정액의 효율성을 조사하고자 본 실험을 실시하였다. 동결 정액에서의 수정율이 저조한 이유로서는 Bamba와 Cran(1988)은 정액의 동결 시 glycerol이 돼지의 정자의 활력과 정상체체의 비율이 감소와 함께 glycerol의 화학적 독성이나 금속 용해시의 삼투압 충격 때문이라고 하였다. 본 실험의 결과로 미루어 볼 때 분할율과 배반포기배까지의 발달율의 저조는 이러한 이유와 상관이 있는 것으로 여겨진다. 이러한 점을 극복하기 위하여 비침투성 동결 보호제로 사용되는 sucrose를 동결 보호제에 첨가함으로써 수정란에 유해한 삼투압의 변화를 피하여 손상을 최대한 줄이기 위해서 (Cuello 등, 2004b) 사용되기도 한다. 동결 정액의 제조 방법을 비롯한 수정 방법의 개선 및 배양 조건 개선을 통하여 보다 효과적인 정액 생산 체계에 따른 연구가 더 많이 수행되어야 할 것으로 사료된다.

Table 4에서는 체외 생산된 돼지 수정란의 동결 방법에 따른 생존율을 조사한 실험이다. 수정란의 동결 방법은 일반적으로 완만 동결 방법과 초자화 동결 방법을 이용하여 수정란 동결을 실시하는데 완만 동결 보다는 초자화 동결 방법이 수정란내에 빙정 형성이 되지 않기 때문에 생존성이 강하며 특히 돼지 체외수정란의 동결보존은 다른 가축에 비해서 저온에 대한 민감성이 높기 때문에 초자화 방법의 동결보존을 이용하게 된다(Nagasima 등, 1995a). 돼지의 수정란은 낮은 온도로 냉각되면 심각한 손상을 입을 수 있다, Wilmut(1972)는 15~20℃로 냉각시킨 돼지 수정란은 이식 후 임신은 되었지만 5~10℃까지 냉각시킨 것은 임신이 되지 않았다고 보고하여 돼지 수정란의 저온에 대한 감수성에 대해 처음으로 언급하였다. 수정란의 손상이 오는 임계 온도는 15℃로 보고하였으며, 이 온도까지의 냉각 속도는 수정란의 생존성에 영향을 미치지 않는다고 하였다. 생존성에 영향을 미치는 주된 원인으로서는 세포질내에 존재하는 높은 지방 성분의 함유에 기인하는 것으로 보고 있다(Fahning과 Garcia, 1992). 그리고, 항동

해제를 처리를 하여도 돼지 수정란의 생존성이 개선되지 않는 이유는 돼지 수정란에 지질 함량이 높기 때문일 것으로 추측하였다(Niimura와 Ishida, 1980; Toner 등, 1986). 동결 용해 후 형태적으로 원래의 수정란으로 되돌아오는 재확장과 재확장 후 부화 단계까지의 생존성의 조사에서 각 처리구에서는 유의적인 차이를 보이지는 않았다. 완만 동결에서의 재확장율은 약 10% 수준이며, 초자화 동결 방법에서는 13% 수준으로서 초자화 동결이 다소 높은 재확장율을 보였다. 그러나 부화단계까지는 두 그룹에서 1~2% 수준으로 낮은 결과를 보였다. 수정란의 생존율과 밀접하게 연관되는 것은 동결 보호제의 종류에 따라서도 많은 차이를 보이고 있다. 돼지수정란에서는 1.4M glycerol을 사용하고 완만 동결을 이용하였을 때의 25.3%가 생존하였다고 보고하였으나, 1.5M ethylene glycol로 항동해제로 변경하였을 때는 어떤 발육 단계에서는 생존하지 못하였다. 그러나 본 실험에서는 1.8 M Ethylene을 사용함으로써 다른 동결 보호제보다 독성이 적어 부화 단계까지 수정란이 발달할 수 있었던 것으로 사료된다. 그리고 Nagashima 등(1995b)은 1.8 M Glycerol 동결 보호제를 이용하였을 때 배반포 수정란이 회복된 비율은 23.6%로 보고하여 연구자간의 실험 조건에 따라서도 생존율은 다양하게 나타나는 것으로 보아 돼지 수정란의 동결 보존에 대한 연구는 더 많이 진행되어야 하며, 동결 연구의 궁극적인 목적은 멸종 위기 동물이나 희귀품종 또는 우수한 형질을 지닌 개체의 유전자원의 확보와 보존 측면에서 더 많은 연구가 진행되어야 할 것이다.

결 론

본 연구는 돼지의 체외배양 조건에 따른 난포란의 체외성숙과 발달율, 동결정액과 신선정액을 이용한 체외수정율과 발달율 그리고, 수정란의 동결 방법에 따른 생존성의 효율을 조사하여 다양한 유전자원의 보존 방법을 구명하고자 본 연구를 실시하였다. 체외성숙시에 호르몬의 첨가 유·무에 따른 난포란의 수정율에서 호르몬의 첨가 그룹은 분할율이 77.4%, 배반포기 발달율은 25.7%로서 첨가하지 않은 그룹의 분할율 60.1%와 배반포기까지 발달율 12.1%보다 유의적으로( $p < 0.05$ ) 높은 발달율을 나타내었다. 체외배양 조건에서 호르몬의 첨가 그룹이 분할율과 발달율에서 유의적( $p < 0.05$ )으로 높은 결과를 보였다. 체외수정후 체외배양 조건에 따른 수정란의 분할율과 배반포기배의 발달율에서는 PZM-5 그룹이 NCSU 그룹보다 분할율(60.3 vs 46.6%)과 배반포기까지 발달율에서는 유의적으로( $p < 0.05$ ) 높은 결과를 보였다(27.4 vs, 11%). 신선정액과 동결정액의 사용에 의한 분할율에서는 신선정액이 유의적( $p < 0.05$ )으로 높은 결과(66.7 vs 43.7%)를 보였으나, 후기배로의 발달율(21.5 vs 12.1%)에는 차이가 나타나지 않았다. 돼지 체외수

Table 4. Survivability of frozen-thawed blastocysts produced *in vitro* by different freezing methods

Methods	No. oocytes used	Survivability to(%)	
		Re-expansion	Hatched blastocysts
Slow-freezing	86	9 ( 9.6)	1 (1.2)
Vitrification	90	12 (13.3)	2 (2.2)

Replicate 5.

정란의 동결 용해 후 생존성에서는 재확장율과 부화수정란의 생존성에서도 두 그룹간의 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 초자화 동결보존 방법에서 다소 높은 경향을 보였다. 결론적으로 돼지 수정란의 생산과 동결 보존 기술의 확립으로 유전 자원의 효율적인 보존과 복원을 위해서 체외배양체계와 동결 방법 개선, 그리고 정액의 동결 보존 기술 개발에 보다 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

### 참고문헌

- Abeydeera LR, Wang WH, Prather RS and Day BN. 1998. maturation *in vitro* of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. Biol. Reprod. 58:1316-1320.
- Almlid T and Johnson LA. 1988. Effect of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. J. Anim. Sci. 66:2899-2905.
- Bamba K and Cran DG. 1988. Further studies on rapid dilution and warming of boar semen. J. Reprod. Fertil. 82:509-518.
- Bavister BD. 1995. Culture of preimplantation embryos: Facts and artifacts. Hum. Reprod. Update.1:91-148.
- Cosby IM, Gandolfi F and Moor RM. 1988. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. J. Reprod. Fertil. 82:769-775.
- Coy P, Ruiz S, Romar R, Campos I and Gadea J. 1999. Maturation, fertilization and complete development of porcine oocytes under different systems. Theriogenology 51:799-812.
- Cuello C, Gil MA, Parrilla I, Tornel J, Vázquez JM, Roca J, Berthelot F, Martinat-Botté, F and Martínez EA. 2004b. *In vitro* development following one-step dilution of OPS-vitrified porcine blastocysts. Theriogenology 62:1144-1152.
- Day BN and Funashashi H. 1996. *In vitro* maturation and fertilization of pig oocytes. In : Miller., Pursel, V. G and Norman(eds), H. D. Beltsville Symposia in Agricultural Research XX. Bio-technology's Role in the Genetic Improvement of Farm Animals. Savoy, IL: American Society of Animal Science; 125-144.
- Ding J and Foxcroft GR. 1994. Epidermal growth factor enhances oocyte maturation in pig. Mol. Reprod. Dev. 39:30-40.
- Dorbrinsky JR. 1997. Cryopreservation of pig embryos. J. Reprod. Fertil. Suppl. 52:301-312.
- Edwards RG. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. Nature 208:347-351.
- Fahning ML and Garcia MA. 1992. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. Cryobiology 29:1-18.
- Iritani A, Niwa K and Imai H. 1978. Sperm penetration *in vitro* of pig follicularoocytes matured in culture. J. Reprod. Fertil. 54:379-383.
- Joenje H. 1989. Genetic toxicology of oxygen. Mut. Res. 291: 193-208.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P and Maxwell WMC. 2000. Storage of boar semen. Anim. Reprod. Sci. 62:143-172.
- Mattioli M, Bacci ML, Galeati G and Seren E. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. Theriogenology 46:1201-1207.
- Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman R and Nottle MB. 1995b. Improved survival of porcine hatched blastocysts cryopreserved with glycerol and sucrose. J. Reprod. Dev. 41: 165-170.
- Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG and Nottle MB. 1995a. Cryopreservation of porcine embryos. Nature 374, 416.
- Niimura, S and Ishida K. 1980. Histochemical observation of lipid droplets in mammalian eggs during the early development. Jpn. J. Anim. Reprod. 26, 46-49.
- Okada K, Krylov V, Kren R and Fulka J. 2006. Development of pig embryos after electro-activation and *in vitro* Fertilization in PZM-3 or PZM supplemented with fetal bovine serum. J. Reprod. Dev. 52:91-98.
- Paquignon M. 1985. Freezing and thawing extenders for boar spermatozoa. In: Johnson, L. A and Larsson K(Eds). Deep Freezing Boar Semen Proc. 1st Int. Conf. Deep Freezing of Boar Semen. Swedish Univ. Agric. Sci. Uppsala. pp. 129-145.
- Polge C, Salamon S and Wilmut I. 1970. Fertilizing capacity of frozen semen following surgical insemination. Vet. Rec. 87:424-428.
- Pugh PA, Tervit HR and Niemann H. 2000. Effect of vitrification medium composition on the survival of bovine *in vitro* produced embryos, following in straw-dilution, *in vitro* and *in vivo* following transfer. Anim. Reprod. Sci. 58:9-22.
- Swine JE, Bormann CL and Krisherl RL. 2001. Development and viability of *in vitro* derived porcine blastocysts cultured in NCSU23 and G1.2/G2.2 sequential medium. Theriogenology 56:459-469.

- Toner M, Carvalho EG, Ebert KM and Overstrim EW. 1986. Cryobiophysical properties of porcine embryos. *Biol. Reprod.* 34, 98.
- Wang WH, Abeydeera LR, Cntley TC and Day BN. 1997. Effect of oocytes maturation media on development of pig embryos produced by *in vitro* fertilization. *J. Reprod. Fertil.* 111:101-108.
- Watson PF. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7:871-891.
- Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, McKenna AI and Fick GH. 1991. Effect of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 30:330-338.
- Wilmot I. 1972. The low temperature preservation of mammalian embryos. *J. Reprod. Fertil.* 31:513-514.
- Younis AI, Brackett BC and Fayrer-Hosken RA. 1989. Influence of serum and hormones on bovine oocytes maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete Res.* 23;189-201.
- 김인철, 이장희, 김현중, 이성호, 박창식. 2002. 돼지 동결정액을 이용한 인공수정시 종모돈의 품종, 인공수정 횟수, 정자농도, 농장 및 연도가 번식성적에 미치는 영향. *한국가축번식학회지* 26(2):111-117.
- 최창용, 김현중, 조상래, 연성흠, 한만희, 김재범, 김성재, 강다원, 손동수. 2009. 돼지 초기배 체외수정란 이식으로 산자 생산 24(1):71-76.

---

(접수일: 2009. 8. 29 / 채택일: 2009. 9. 10)