

소 난소 저온 보존이 난자의 체외 발달에 미치는 영향

김성우[†], 김민수, 김찬란, 김동교, 김남태, 성환후

농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원센터

Low temperature preservation of bovine ovaries on *in vitro* development of oocytes

Sung Woo Kim[†], Min Su Kim, Chan-Lan Kim, Dongkyo Kim, Namtae Kim, Hwan-Hoo Seong

Animal Genetic Resources Research Center, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon, 55717, Korea

ABSTRACT

During the ovary preservation in low temperature, the cumulus oocyte complexes(COCs) lose their developmental competences after *in vitro* fertilization. We used phosphate-buffered saline (PBS) as a basic solutions of at various temperatures (25, 15 or 5 °C) and supplemented them with 1mM glucose and 0.5mM glutamine as a source of carbohydrate metabolites. After recovery of COCs and *in vitro* fertilization, a significantly higher number of oocytes developed into blastocysts. The developmental competence of embryos that were originated from ovaries preserved at 15 °C was increased compared to those of 25 or 5 °C. The maturation rate of oocytes was not differed between 24 and 36 h at 15 °C but showed lower than control group (71% versus 78%). *In vitro*-fertilized oocytes from ovaries stored at 25 °C for 24 h or at 5 °C for 24 h had a significantly decreased developmental potentials, but at 15 °C did not (27% versus 29% of blastocysts to develop into day 8). With these results, bovine ovaries can be preserved at 15 °C for 36 h without decreasing developmental capacity of *in vitro*-fertilized oocyte at least to the blastocyst stage. This information provides valuable information of preserving ovaries for embryo transfer or *in vitro* embryo production.

(Key word: hypothermal preservation, ovary, *in vitro* embryo, glucose, glutamine)

서론

소의 체외 수정란 생산기법은 일반적으로 도축장 유래 난소로부터 난자-난구세포괴(COCs, cumulus oocyte complex)를 회수하고 난자의 체외 성숙, 체외성숙 및 수정란 발생 및 수정란 이식기법을 활용하여 건강한 송아지를 생산하는데 이용되고 있다. 이 때 사용되는 난소는 일반적으로 0.85% NaCl 용액을 침지되어 30~34°C에 보존되어 6~8시간 이내에 실험실로 이송되어 난자를 회수하는데 이용된다(Iwata 등, 2003). 그러나 난소는 하나의 장기로서 산소의 공급과 영양 성분이 요구되는 것으로 추정되나 이송 과정 동안 혈액의 유실을 통하여 저 산소 상태가 6~8시간 이상 유지되면 난자의 질이 저하되는 것으로 알려져 있다(Yang 등, 1990; Abe 와 Shioya, 1996). 또한, 난소 이송과정 중에서 보존 온도를 높게 유지하게 되면 난소 내 에너지의 대사가 촉진되어 난자의 질적 저하를 야기 할 수 있는 것으로 알려져 있다 장기 이식을 위하여 심장, 신장 및 안구 등의 냉장 보존액에 대한 연구는 50여 년

전부터 실시되어 많은 자료가 축적되었으나(Collins 등, 1972; Jablonski 등, 1980; Guibert 등, 2011), 난소의 이송에 대한 적절한 조건에 관한 연구는 도축장에서 난소를 채취한 후 가급적 짧은 시간(3~6시간)에 사용하는 것이 유리하다는 연구결과가 보고되어 있다(Ball 등, 1983; Yang 등, 1990). 그러나 난소 보존에 대한 다양한 연구나 저온상태에서의 영양소 요구량 등에 관한 연구는 많지 않으며 특히 현장에서 이식에 활용되는 배반포는 그 수량보다는 꾸준하게 생산되는 수정란의 갯수와 질이 더 중요하다고 판단되는데 그 이유는 수란우를 선정하고 이송하는데 필요한 시간적 여유를 확보하는데 더욱 유리하기 때문이다(Reis 등 2002). 그러므로 난소를 보존하여 건강한 수정란을 주간에 걸쳐 꾸준하게 생산하는 연구는 산업적으로 중요한 문제인데 아직까지 난소 저온 저장에 관한 연구는 다른 장기의 저온 보존 방법과 비교해 볼 때 많은 자료를 찾아보기 어렵다.

저온 저장에 관한 연구는 아직 초기 연구단계로서 생체 유래 배반포(*in vivo* blastocyst)를 신선한 상태로 냉장 보존을 실시하

[†] Correspondence : Sung Woo Kim
Tel: +82-63-620-3524
E-mail: sungwoo@korea.kr

여 장기간 저온 저장하는 방법에 관하여 성공적인 연구 결과가 최근 보고되었다(Ideta 등 2013, Ideta 등, 2015). 이런 연구는 이식 가능한 배반포를 계속적으로 공급한다는 점에서 동일한 목적을 가진 기술이라고 판단할 수 있는데(Ideta 등, 2015), 이식 가능한 수정란을 지속적으로 생산하는 것은 생체 유래 배반포를 지속적으로 보존하는 것과 차이가 있으며 난자를 회수하는 시점을 조절함으로써 건강한 배반포를 균일하게 생산하면 더욱 이용성이 높을 것으로 판단된다 따라서 본 연구에서는 도축장으로부터 난소를 이송하고 보존하는 연구를 통하여 난소 보존 방법에 관한 효율적인 방법을 강구하고자 실험을 실시하였다. 도축장에서 채취된 난소를 저온 저장할 때 glucose와 glutamine을 첨가하여 저온보존성을 조사하였으며 적절한 난소 보존 조건을 확보하여 난자 이용성을 증진시키고 동시에 수정란 생산에 대한 시간적 장점을 확보하기 위하여 다양한 조건에서 난자의 성숙율, 체외 수정 및 발생율을 조사하였다

재료 및 방법

1. 난소의 보존

도축장에서 난소를 채취하고 0.85% 생리식염수에 세척하였으며 100U/ml penicillin과 100 μ g/ml streptomycin이 첨가된 인산완충용액(PBS, phosphate buffered saline, calcium magnesium free, Gibco, USA)을 각각 5, 15 및 25 $^{\circ}$ C로 맞추어 보온병에 2시간동안 보존하였다. 실험실로 이송된 난소는 다시 각각의 온도로 조정된 저온배양기(MyClone, MCL-20A, Science & Technology, Korea)로 보존하였으며, 이때 1mM glucose와 0.5mM glutamine을 첨가된 PBS에 난소를 침지하여 24, 36 또는 48시간 동안 보존하였다.

2. 난자의 회수율 및 성숙을 조사

저온 보존된 난소의 난포에서 난자난구세포 복합체(COCs)를 18G 주사침으로 흡입하여 회수하였으며 TCM-199배양액으로 약 22시간동안 성숙배양을 실시하였다. 성숙배양액은 25mM HEPES(Sigma Chemical Co.), 10% FBS(Gibco, Korea), 100 μ M cysteamine (Sigma Chemical Co.)과 0.1IU/ml FSH를 첨가하였고(Ball 등, 1985) 5% CO₂로 조정된 배양기에서 성숙된 난자는 hyaluronidase(Sigma Chemical Co.) 300U/ml을 처리하여 micromanipulator가 장착된 10배 역상 형광현미경으로 hoechst 33342로 염색된 극체의 핵을 관찰하여 성숙율을 판단하였다.

3. 체외 수정

성숙배양이 끝난 난자는 한우 후보씨 수소(KPN 999)를 이용

하여 수정을 실시하였으며 기본 배양액으로 BO배지를 활용하였다(Brackett과 Oliphant, 1975). 용해된 동결정액을 calcium과 magnesium이 없는 PBS 6ml로 800g에서 7분간 원심 분리하여 세정하였으며 thiophillin 0.45 μ g/ml이 첨가된 BO배양액으로 4~6 $\times 10^6$ /ml 농도로 희석하였다. 체외 성숙된 난자 당 5~10 $\times 10^3$ 개가 함유되도록 정자 부유액을 최종 부피가 40~50 μ l 소적이 되도록 첨가하였다. 체외 수정시간은 8시간으로 조정하였으며 수정된 난자를 체외 배양하기 위하여 COCs를 난자와 동일한 크기의 미세 유리관으로 흡입 및 배출을 반복하여 난구세포를 제거하였다.

4. 체외 배양

난구세포가 제거된 난자는 mSOF 발생용 배양액으로 옮겨지며 3mg/ml BSA(Sigma Chemical Co.)가 첨가된 소액에서 2일 동안 5% CO₂, 5% O₂ 와 90% N₂로 조정된 배양기에서 초기 발생을 유도하였으며 배양 3일째에 FBS 10%를 첨가하였다. 배양 3일과 7일에 수정란의 발생단계를 관찰하였으며 난할율과 배반포 형성율을 관찰하였다.

5. 자료 분석

난자의 성숙율, 난할율 및 발생율은 Student's t-test로 분석을 실시하였다. P-값이 0.05보다 낮은 실험군은 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주 되었다.

결 과

1. 난소 저장 온도가 난자의 성숙에 미치는 영향

상온에서 6시간 노출된 난소를 대조군으로 이용하여 서로 다른 온도(5, 15 또는 25 $^{\circ}$ C)에서 각각 저장된 난소에서 난자를 채취하여 성숙배양을 실시하였다(Table 1). 처리군당 10의 난자를 무작위로 배치하고 24시간동안 보존한 후, 난자를 채취하여 22시간 체외 배양을 실시하였다. 난자 성숙율을 MII기 난자의 출현율로 조사하였을 때 대조군은 72.7%, 5 $^{\circ}$ C 처리군은 37.5%, 15 $^{\circ}$ C 처리군은 67.6%를 관찰하였으며 25 $^{\circ}$ C에서 보존된 난자의 경우 27.3%로 성숙율이 낮아졌다. 대조군과 15 $^{\circ}$ C 처리군 사이에는 유의적 차이가 존재하지 않았으며 5 $^{\circ}$ C 처리군과 25 $^{\circ}$ C 처리군 사이에 유의적 차이가 존재하지 않았다 ($P > 0.05$).

2. 난소 저온 저장 시간이 난자의 성숙에 미치는 영향

Table 2에서는 15 $^{\circ}$ C에서 난소를 저장할 때 저장 시간이 난자의 성숙율에 미치는 영향을 조사하였다. 난소에서 성숙배양을 실시하였을 때, 난소 당 난자는 수는 온도가 낮아질수록

회수율은 낮아지는 경향을 관찰하였으나 이는 처리군당 난소 내 난포의 수가 서로 다른 이유에 의하여 나타나는 것으로 추정되었다. 15 °C로 저온 저장된 난소에서 유래된 난자를 22시간 체외 배양하였을 때 MII기 난자의 출현율은 대조군에서는 78.6%, 24시간 보존된 처리군은 72.0%, 36시간 보존될 경우 62.2%로 관찰되었으며 48시간 배양시 38.2%로 관찰되어 보존기간이 증가 할수록 성숙율은 낮아지는 경향을 관찰하였다. 15 °C에서 24시간 또는 36시간 보존된 난소군은 대조군과 유의적 차이가 관찰되지 않았으며 48시간 보존된 난소의 경우 대조군과 유의적 차이를 관찰되었다($P < 0.05$).

3. 난소 저장 온도가 난자의 발생에 미치는 영향

Table 3에서는 5, 15 및 25 °C에서 난소를 24시간 저장할 때 저장 온도가 난자의 발생율에 미치는 영향을 조사하였다. 대조군과 비교하였을 때 5 °C 처리군의 8세포기, 상실기 및 배반포 발생율은 유의적 차이가 관찰되지 않았으며(60.0 % 대 56.8%, 42.2% 대 43.2% 및 33.3% 대 29.5%), 25 °C에서 24시간 보존된 경우 배반포는 생산되지 않았으며($P < 0.05$). 5 °C 처리군의 경우, 8세포기, 상실기 및 배반포 발생율 모두 대조군과 15 °C 처리군에 비하여 유의적으로 낮은 결과를 관찰할 수 있었고 낮은 효율로 배반포를 생산할 수 있었다($P < 0.05$).

Table 1. Effects of preservation temperature of ovaries on the maturation rate of COCs

Treatment (°C/h)	No. of COCs / Ovaries	No. of matured oocyte (%±SD)
25 / 6	44 / 10	32 (72.7±3.6) ^a
5 / 24	32 / 10	12 (37.5±7.8) ^b
15 / 24	37 / 10	25 (67.6±6.8) ^a
25 / 24	33 / 10	9 (27.3±7.6) ^b

a, b Values with different superscripts in column differ significantly ($P < 0.05$).

Table 2. Effects of preservation time of ovaries on the maturation rate of COCs

Treatment (°C/h)	No. of COCs / Ovaries	No. of matured oocyte (%±SD)
25 / 6	56 / 10	44 (78.6±7.2) ^a
15 / 24	50 / 10	36 (72.0±8.4) ^a
15 / 36	45 / 10	28 (62.2±3.8) ^b
15 / 48	34 / 10	13 (38.2±6.3) ^d

a, b Values with different superscripts in column differ significantly ($P < 0.05$).

Table 3. Effects of storage temperature of ovaries for 24 h on the development of in vitro fertilized oocytes

Storage temperature (°C/h)	No. of oocytes used	No. of oocytes developed to (%)		
		8 cells	Morula	Blastocyst
25 / 6	45	27 (60.0±6.7) ^a	19 (42.2±7.7) ^a	15 (33.3±11.5) ^a
5 / 24	46	14 (30.4±3.4) ^b	8 (17.4±10.1) ^b	6 (13.0±6.7) ^b
15 / 24	44	25 (56.8±8.8) ^a	19 (43.2±3.3) ^a	13 (29.5±3.4) ^a
25 / 24	46	11 (23.9±12.5) ^b	4 (8.7±2.8) ^b	0 (0.0±0.0) ^c

a, b, c Values with different superscripts in column differ significantly ($P < 0.05$).

Table 4. Effects of storage time of ovaries at 15°C on the development of in vitro fertilized oocytes

Storage temperature (°C/h)	No. of oocytes used	No. of oocytes developed to (%)		
		8 cells	Morula	Blastocyst
Control	75	41 (54.7±8.4) ^a	27 (36.0±6.1) ^a	22 (29.3±9.1) ^a
15 / 24	74	33 (44.6±8.8) ^a	25 (33.8±8.6) ^a	19 (25.7±5.7) ^a
15 / 36	75	28 (37.3±8.7) ^b	24 (30.7±7.5) ^a	20 (26.7±7.2) ^a
15 / 48	75	27 (36.0±5.3) ^b	13 (17.3±2.5) ^b	9 (12.0±3.1) ^b

a, b, c Values with different superscripts in column differ significantly ($P < 0.05$).

4. 15℃에서 보존시간이 발생에 미치는 영향

Table 4에서는 15℃에서 난소를 24, 36 및 48시간 동안 저장할 때 저장 시간이 난자의 발생율에 미치는 영향을 조사하였다. 대조군과 비교하였을 때 24시간 처리군에서 8세포기는 각각 44.6% 대 54.7%, 33.8% 대 36.0% 및 25.7% 대 29.3%로 유의성이 관찰할 수 없었다($P > 0.05$). 그러나 36시간과 48시간 처리군에서 8세포기 발생율은 37.3% 및 36.0%로 대조군과 유의적 차이가 존재하였으며 48시간 처리군에서 상실기와 배반포기의 발생율은 13.7% 대 36.0% 및 12.0% 대 29.3%은 모두 유의적인 차이가 존재하였다($P < 0.05$).

고찰

본 연구에서는 도축장에서 채취된 소 난소는 2~3시간 안에 실험실로 이송을 실시하고 저온 배양기를 활용하여 보존할 경우 15℃에서 36시간까지는 안정적으로 보존할 수 있음을 증명하였다. 난소의 저온 저장성은 난자의 성숙율과 수정란 발생율을 비교하여 검토하였으며 저온 저장된 난소유래 수정란을 대리모에게 이식을 실시하지 않았으나 실험실에서 PBS를 기본 보존액으로 사용하고 glucose와 glutamine을 첨가하면 난소를 보존할 수 있음을 증명하였다 소의 경우 인공 수정으로 증식하게 되면 많은 개체를 쉽게 확보할 수 있으나 암컷에 대한 유전자원은 상대적으로 낮게 후손에게 전달되는 단점이 존재한다. 이를 극복할 수 있는 방법으로 체외 및 체내 수정란 이식을 실시하게 되는데 수정란 이식의 효율성을 증진시키기 위하여 체외 수정란은 agarose에 포매하여 체내 수정란 및 OPU유래 수정란과 함께 이식하는 방법이 보고되었다(Senatore 등, 2010). 이와 같이 수정란 착상 효율을 증진시키기 위하여 체외 수정란을 실험실에서 지속적으로 생산하는 것은 이식 성적을 증진시키는 실험 재료로서 활용성이 기대되고 있다.

소의 난소 저장에 관하여 Matsushita 등(2004)은 10℃와 20℃에서 24시간 보존할 때, 난자의 성숙율은 차이를 관찰할 수 없다고 하였으나, 본 실험을 실시하였을 때 10℃에서 보존된 난자에서는 우수한 난자의 회수율에 문제가 있는 것으로 판단되었기에(미발표 자료) 본 연구에서는 15℃의 조건을 설정하였다. 특히, 20℃ 보존의 경우, 도축장에서 유래하는 오염균에 의한 감염이 약 5~15%의 출현율로 발견되어 더 낮은 온도에 의한 실험 자료가 필요하다고 판단되었다. 본 연구 결과에 따르면 36시간 동안 보존하여도 배반포가 생산되는 것을 확인하였기에 세포의 생명유지 현상에 반드시 필요한 glucose는 장기의 저온 보존 뿐 아니라 난소의 저온 저장에도 영향을 주는 것으로 판단된다. 장기가 저온에서 산소가

저압상태를 유지할 때, glucose와 glutamine은 영양성분으로 공급됨이 보고되었으나, 난소의 경우 오염균의 영양성분으로서 이용될 가능성이 높은 것으로 판단된다. 그러나 온도를 15℃로 낮추게 되면 조직 내 세포의 대사도 억제됨과 동시에 오염균의 증식 또한 낮출 수 있는 것으로 판단된다. 반면, COCs의 경우, 저온에 대하여 더욱 민감한 것으로 보고되었는데, 채취된 난자를 0℃에서 30분 노출 할 경우 약 1%의 배반포만 발생할 수 있는 것으로 보고되었다(Martino 등, 2004). 그러므로 장기 이식에 이용되는 저온 저장 방법을 응용하여 난소를 보존하는 방법은 균일한 수정란 생산에 중요하며 이에 대한 연구가 더욱 필요하다고 보여진다.

난소를 저온 저장할 때, 성숙율과 수정 후 난할율 및 발생율이 낮아지는 원인은 세포 내 미세소관(MT, microtubule)의 안정성에 의하여 나타나는 현상임을 추론해 볼 수 있다. 세포의 골격을 이루고 있는 미세소관은 저온에서 불안정하다는 것이 식물에서도 밝혀져 있으며(Bokros 등 1996), 대부분의 포유류 세포의 미세소관은 4℃의 저온상태에서 분해되는 것으로 알려져 있다(Wallin과 Strömberg, 1995; Lodish 등 2000). 그러므로 소 난소의 냉장처리과정에서 난자의 세포 골격을 구성하는 MT의 구조는 손상 받은 형태로 남아 있을 수 있고 이것이 난자의 성숙과 발생에 미치는 영향이 클 것으로 추정된다. 본 연구 결과에서도 5℃에서 24시간 보존할 경우 난자 성숙율이 37% (12/32)로 낮아 졌으며 15℃에서는 대조군과 유의적 차이가 없는 수준으로 성숙되는 결과를 얻었고 이러한 결과는 난소를 너무 낮은 온도에 저장할 때 낮은 난자 성숙율이 나타난다는 현상을 설명해 주고 있다. 난소의 저온저장 과정 중에 나타날 수 있는 손상은 저온상태에서 조직과 세포의 대사에 의한 저산소증에 의한 손상(hypoxic injury)을 고려해 볼 수 있다. 저온 보존과정은 난소 조직의 신진 대사를 낮추고 산소 소모를 억제해야 하는데 이것이 충분하지 않을 수 있어 활성화 산소(ROS, reactive oxygen species)가 세포내에 축적되게 되며 세포막의 파괴를 유도할 수 있다. 또한 난자는 배반포로 발생하기 위하여 많은 영양소를 필요하게 되며 아미노산과 비타민이 중요한 성분으로 알려져 있으므로 대사물질의 결핍을 막기 위하여 저온저장 과정에서 영양성분을 공급할 필요성이 존재한다(Rosenkraus와 First, 1991).

본 연구에서 사용된 PBS는 calcium과 Magnesium이 없는 제품을 선택하였는데 이는 세포 내 산성화(acidosis)와 연관하여 제품 특성을 고려하여 선택하였다. 난소의 저온저장과 관련된 칼슘의 기능은 다른 장기의 저온저장 과정 중에 나타날 수 있는 현상과 동일하다고 판단된다(Guibert 2011). 저온 보존에 의하여 더 이상 공급되지 않는 ATP가 고갈되면 세포체의 Ca^{2+} ATPase의 기능이 상실하게 되고 세포질 내 칼슘의 농도가 증가하게 된다고 알려져 있다(Elimadi와 Haddad, 2001).

이런 현상이 지속되면 세포내의 미토콘드리아는 막투과성을 잃어버리게 되며 세포내 calcium, 나트륨 및 물이 축적되어 조직이 회복되지 못하는 수준에 도달하게 된다(Rauen과 de Groot. 2004). 그러므로 장기의 저장 용액으로 사용되는 배양액의 경우, calcium은 비교적 짧은 시간인 24시간 이내에 저온 저장하는 경우에도 상용화되어 있는 보존액에서 생략되거나 첨가되더라도 μM 수준에 불과하다(Rauen과 de Groot. 2004). 세포의 배양에 필수 아미노산으로 가장 많이 사용되는 glutamine은 0.5~10mM 농도의 범위에서 이용되거나 흔히 사용되는 TCM-199, DMEM, GMEM, F-12 등의 배양액에서는 주로 2~4mM을 주로 이용하고 있다(Ozturk와 Palsson. 1990). 저온의 환경에서 glucose가 고갈되었을 때, glutamine은 세포질 내 에너지 대사의 공급원으로서 중요한 역할을 담당할 수 있는데, glutamine은 세포질에서 질고 공급원으로서 작용하여 미토콘드리아의 TCA cycle의 중간물질인 glutamate를 공급함과 동시에 생체 내 NAD와 NADP를 합성하는데 공급되는 질소 원자를 공급하기 때문이다(Matello 등, 2013). 그러므로 무기염류로 이루어진 PBS에 영양성분을 공급하여 난소를 보존하게 되면 보존 능력이 높아지게 되며 조직 내 영양성분이 고갈되더라도 난자의 생존에 필요한 에너지를 공급할 수 있는 것으로 추정된다

결론

본 연구에서는 도축장 유래 소난소를 15°C에서 36시간 보존하는 것은 난자의 발생 능력을 저해하지 않으며 이때 glucose와 glutamine을 첨가된 PBS는 도축장 유래 난소의 활용성과 효율적인 배반포 생산에 유리하게 작용할 수 있음을 밝혔다. 그러나 난소는 5°C와 25°C 온도 범위에서는 난자의 성숙율과 발생율이 낮아 활용도가 떨어지기 때문에 최소한의 대사를 유지하면서 영양 성분에 대한 첨가하는 방법은 대사 관련 연구와 함께 다양한 방법으로 증명되어야 할 것으로 생각되며 앞으로 저온 저장연구의 주요 대상이 될 것으로 판단된다.

사사

본 연구는 2016년도 농촌진흥청 연구사업세부과제명 최소의 번식학적 특성 분석연구 세부과제번호 PJ010293042016)과 2016년도 농촌진흥청 국립축산과학원 박사후연수과정지원사업에 의해 이루어진 것임

REFERENCES

- Abe S and Shioya Y. 1996. Effects of temperature and duration of preservation of bovine ovaries in physiological saline on the development of bovine embryos derived from follicular oocytes matured and fertilized *in vitro*. Anim. Sci. Technol. Jpn. 67:633-638.
- Ball GD, Leibfried ML, Lenz RW, Ax RL, Bavister BD and First NL. 1983. Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. Biol. Reprod. 28:717-725.
- Bokros CL, Hugdahl JD, Blumenthal SSD and Morejohn. 1996. Proteolytic analysis of polymerized maize tubulin: regulation of microtubule stability to low temperature and Ca^{2+} by the carboxyl terminus of β -tubulin. Plant. Cell. Environ. 19:539-548.
- Brackett BG and Oliphant G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. Biol. Reprod. Dev. 40:5-11.
- Collins GM, Hartley LC and Clunie GJ. 1972. Kidney preservation for transportation. Experimental analysis of optimal perfusate composition. Brit. J. Surg. 59:187-189.
- Elimadi A and Haddad PS. 2001. Cold preservation-warm reoxygenation increases hepatocyte steady-state Ca^{++} and response to Ca^{++} -mobilizing agonist. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol. 281:G809-G815.
- Guibert EE, Petrenko AY, Balaban CL, Somov AY, Rodriguez JV and Fuller BJ. 2011. Organ Preservation: Current Concepts and New Strategies for the Next Decade. Transfus. Med. Hemother. 38:125-142.
- Ideta A, Aoyagi Y, Tsuchiya K, Kamijima T, Nishimiya Y and Tsuda S. 2013. A simple medium enables bovine embryos to be held for seven days at 4°C. Sci. Rep. 1173:1-5.
- Ideta Aoyagi Y, Tsuchiya K, Nakamura Y, Hayama K, Shirasawa A, Sakaguch K, Tominaga N, Nishimiya Y and Tsuda S. 2015. Prolonging hypothermic storage (4 C) of bovine embryos with fish antifreeze protein. J. Reprod. Dev. 61:1-6.
- Iwata H, Ohota M, Hashimoto S. and Nagai Y. 2003. Free oxygen radicals are generated at the time of aspiration of oocytes from ovaries that have been stored for a long time. Zygote 11:1-5.
- Jablonski P, Howden B, Marshall V, Scott D. 1980 Evaluation of citrate flushing solution using the isolated perfused rat

- kidney. *Transplantation* 30:239-243.
- Lodish H, Berk A and Zipursky SL. 2000. *Molecular Cell Biology* 4th edition, Freeman WH and Company, Section 19. 2
- Martino A, Pollard JW and Leibo SP. 1996. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. *Mol. Reprod. Dev.* 45:503-512.
- Matello CM, Gameiro PA, Bell EL, Mattaini KR, Yang J, Hiller K, Jewell CM, Johnson JR, Irvine DJ, Guarente L, Kelleher JK, Vander Heiden MG, Iliopoulos O. and Stephanopoulos G. 2012. Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature* 481:380-384.
- Matsushita S, Tani T, Kato Y and Tsunoda Y. 2004. Effect of low-temperature bovine ovary storage on the maturation rate and developmental potential of follicular oocytes after in vitro fertilization, parthenogenetic activation, or somatic cell nucleus transfer. *Anim. Reprod. Sci.* 84:293-301.
- Rauen U and de Groot H. 2004. New insights into the cellular and molecular mechanisms of cold storage injury. *J. Investig. Med.* 52:299-309.
- Reis A, Staines ME, Watt RG, Dolman DF and McEvoy TG. 2002. Embryo production using defined oocyte maturation and zygote culture media following repeated ovum pick-up (OPU) from FSH-stimulated Simmental heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 72:137-151.
- Rosenkraus JCF and First NL. 1991. Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage: effect of amino acids and vitamins. *Theriogenology* 35:266.
- Ozturk SS and Palsson BO. 1990. Chemical decomposition of glutamine in cell culture media: effect of media type, pH, and serum concentration. *Biotechnol. Prog.* 6:121-128.
- Senatore EM, Xu J, Suarez Novac MV, Gong G, Lin T, Bela A, Moreno JF, Mannino ME, Tian X, Presicce GA, Wu SC and Du F. 2010. Improved in vitro development of OPU-derived bovine (*Bos taurus*) embryos by group culture with agarose-embedded helper embryos. *Theriogenology* 74:1643-1651.
- Wallin M and Strömberg E. 1995. Cold-stable and cold-adapted microtubules. *Int. Rev. Cytol.* 157:1-31.
- Yang NS, Lu KH and Gordon I. 1990. In vitro fertilization (IVF) and culture (IVC) of bovine oocytes from stored ovaries. *Theriogenology* 33, 352 (Abstract).

Received July 18, 2016, Revised August 16, 2016,

Accepted September 29, 2016