

碩士學位論文

肉牛의 過排卵 誘起와 凍結方法이
卵子の 生存率에 미치는 影響

濟州大學校 大學院

畜産學科



1992年 12月

肉牛의 過排卵 誘起와 凍結方法이 卵子の 生存率에 미치는 影響

指導教授 金 重 桂

文 星 豪

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함

1992年 12月

文 星 豪의 農學 碩士學位 論文을 認准함



審査委員長 _____

委 員 _____

委 員 _____

濟州大學校 大學院

1992年 12月

EFFECTS OF SUPEROVULATION AND FREEZING
METHODS ON THE SURVIVAL OF BOVINE EMBRYOS

Seong-Ho, Moon

(Under the Supervision of Professor Jung-Kye, Kim)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF AGRICULTURE

DEPARTMENT OF ANIMAL SCIENCE
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1992. 12

目 次

Summary	1
I. 緒 論	4
II. 研 究 史	6
1. 過排卵 誘起	6
2. 耐凍劑	8
3. 凍結方法	11
III. 材 料 및 方 法	15
1. 試驗期間 및 場所	15
2. 供試 動物 및 飼養管理	15
3. 試驗方法	16
4. 統計處理	22
IV. 結 果 및 考 察	23
1. 過排卵 處理와 卵巢 反應	23
2. 受精卵과 卵胞卵의 凍結	30
V. 情 要	34
參 考 文 獻	36

SUMMARY

The effects of superovulation(PMSG, FSH treatment) on the ovarian response of matured cows were tested. The survival rates of bovine embryos and ovarian oocytes frozen by slow, rapid freezing and vitrification were investigated.

A total of 15 heads of cow were divided into 3 groups by injection dose of GTH(PMSG, FSH). Each group was superovulated with injections of 2500, 3000 IU PMSG and 40 mg FSH followed by injection of 30mg PGF_{2α}.

Embryos were non-surgically recovered from superovulated cows 6-7 days after estrus. The recovered embryos were frozen in 10% glycerol + 10% sucrose by slow and rapid freezing. Ovarian oocytes were frozen in 20% glycerol + 10% ethylene glycol + 30% Ficoll + 10% sucrose by vitrification and the survival of frozen embryos and ovarian oocytes were judged by FDA-test.

The results are summarized as follows:

1. Estrus after the injection of 2500, 3000 I.U. PMSG and 40mg FSH were 32.8, 35.0 and 43.4, and the duration of estrus were 18.6, 18.8 and 22.4 hours, respectively.

2. The average sizes of the left ovaries were 5.4cm(2500 IU PMSG), 5.1cm(3000 IU PMSG) and 6.4cm(FSH), and the right were 6.2cm(2500 IU PMSG), 5.7cm(3000 IU PMSG) and 7.8cm(FSH), respectively. There were significant differences in the right ovaries among treatments($P<0.05$).

3. The average number of ovarian follicles in the left ovaries were 4.8(2500 IU PMSG), 5.2(3000 IU PMSG) and 5.6(FSH), and in the right were 5.6(2500 IU PMSG), 6.2(3000 IU PMSG) and 7.8(FSH), respectively. There were significant difference in the right ovaries among treatments($P<0,05$).

4. In the average numbers of ovulation points in the left ovaries were 3.0(2500 IU PMSG), 3.2(3000 IU PMSG) and 4.4(FSH), respectively, and the right were 7.2(2500 IU PMSG), 7.8(3000 IU PMSG) and 11.4(FSH). There were significant differences in the right ovaries among treatments($P<0.05$).

5. The numbers of the recovered embryos were 20(2500 IU PMSG), 19(3000 IU PMSG) and 21(FSH), respectively, and oocytes and degenerated oocytes were 6.5 and 11. Estrus periods of post parturation were 52.4days(2500 IU PMSG), 69.8days(3000 IU PMSG) and

62.4days(FSH), respectively.

6. The FDA score of cow morulae frozen in 10% glycerol + 10% sucrose by slow and rapid freezing was higher in slow(3.12) than in rapid freezing(1.28). The FDA-scores of cow, pig and rabbit ovarian oocytes frozen in 20% glycerol + 10% ethylene glycol + 30% Ficoll + 10% sucrose by vitrification were higher in cows(4.1) than in pigs(3.5) and rabbits(3.1).



I. 緒 論

大家畜의 凍結精液을 利用한 人工授精은 家畜 改良을 위하여 開發된 技術 中에서 現實的으로 가장 效率的인 方法이라는 것이 立證되었으나, 이 技術은 優秀한 牲畜의 遺傳形質을 家畜改良에 活用하는 方法에 지나지 않는다. 家畜育種의 側面에서 본다면 目標한 바에 到達하는데 상당한 時日이 걸리고, 또한 經濟的으로도 값비싼 種牲畜을 保有해야 하는 缺陷도 있다. 牛 受精卵移植은 1973년에 受精卵을 凍結하여 産仔를 얻은 후 많은 研究가 報告되고 있으며(Wilmot와 Rowson, 1973), 1980年代 부터 産業化되어 美國의 World-wide Sires, American Breeders Service (ABS), Sire Power, Tri-state Breeders, Federated Genetics, Lendmark Genetics 등과 英國의 Milk Marketing Board (MMB)와 Premier Embryos 그리고 Canada의 Semex에서는 受精卵移植을 利用하여 Holstein 種牝牛를 生産하여 乳牛改良計劃에 크게 寄與하고 있는 實情이다. 人工授精을 活用한 乳牛의 年間泌乳能力에 改良指數를 100으로 했을때 人工授精과 受精卵移植을 結合시켰을때의 泌乳能力의 改良指數는 158이 된다(Vanvleck, 1980). 受精卵의 凍結保存은 後代 檢定時의 世代間隔을 短縮시켜 주며 遺傳的 漂流에 대한 假說 및 母側의 仔畜에 대한 影響을 淸明하고 있다.

우리 나라의 受精卵移植에 관한 研究는 1970年代부터 시작되어 mouse, rabbit, goat에 대한 初步的인 實驗이 試圖되었고, 1980年代에 이르러 大家

축에서 本格的인 研究가 進行되어 多數의 研究 結果가 報告되고 있다. 牛 受精卵移植 事業의 定着을 위해서는 採卵率, 凍結後 受精卵의 生存率, 妊娠率의 向上과 凍結後 受胎率을 높이는 것이 最優先 課題이다. 牛 受精卵의 凍結은 주로 Programable freezer(cell freezer)를 利用되어 왔으며, 簡易凍結로 Two-step freezing (Bouyssou와 Chupin, 1982; Kennedy 등, 1983; Frank 등, 1986), LN₂ container를 使用한 凍結方法등이 試圖되었으나 確固하게 定立되지 못하고 있는 實情이다 (Williams와 John, 1985; 宮木 등, 1986).

더욱 One-step straw의 移植方法을 簡便化 시켜서 生存率은 向上되고 있으며(鈴木 등, 1983, 1986; Bielanski, 1985, 1986; 松崎 등, 1986), 最近 Vitrification solution을 利用한 mouse 受精卵의 高濃度에 超急速凍結 (Rall과 Fahy, 1985; Kono 등, 1987; Kasai 등, 1990; Kim 등, 1990)의 良好한 成績이 報告되고 있으나 供試畜關係로 大家畜에서는 많은 研究(Massip 등, 1986, 1987; Osamu Douchi, 1990)가 遂行되지 못하고 있다.

그러므로 本 試驗은 肉牛 過排卵誘起에 있어서 PMSG와 FSH水準을 比較 檢討하고, mouse에서 開發한 Vitrification solution을 利用하여 牛 卵子를 超急速凍結 後에 FDA - test를 하였고, 凍結方法에 따른 牛 卵子(受精卵과 卵胞卵)의 生存率에 미치는 影響을 究明하는 데 그 目的을 두고 實施하였다.

Ⅱ. 研究史

家畜改良을 위한 牛의 受精卵移植技術은 Willet 등(1951)이 供卵牛를 屠殺하여 回收한 受精卵을 外科的方法으로 受卵牛에 移植하여 分娩시킴으로서 受精卵移植으로 仔畜이 태어나기에 이르렀다.

非外科的 採卵方法은 Rowson과 Dowling(1969)에 의해 試圖되었으며, Mutter와 Garden(1964)에 의하여 最初로 非外科的方法으로 移植이 成功되었다. 그 후 Wilmut와 Rowson(1973)은 受精卵을 凍結保存하여 仔牛를 分娩했으며, 受精卵의 性鑑別로 仔牛를 生産하였다(Hare 등, 1978, 1980).

Willadson 등(1981)은 受精卵의 顯微鏡的 微細分離에 의한 雙仔生産, Brackett 등(1982)에 의하여 體外受精으로 仔牛를 分娩하면서 많은 研究가 進行되고 있다.



1. 過排卵 誘起

初期의 過排卵 誘起에는 羊 또는 馬의 腦下垂體 抽出物을 使用하였으나 호르몬의 精製技術이 發達함에 따라 豚의 卵胞刺戟hormone과 妊馬血清性 性腺刺戟hormone이 많이 利用되기 시작하였다.

Hafez 등(1963)은 發情後 16 - 19일에 3,000 - 7,000IU의 PMSG, 19日과 20日에 estradiol-17 β , 21日에 2,000IU의 HCG를 處理한 結果 3,000IU의

PMSG 處理區에서는 平均 33個, 4,000 - 7,000IU PMSG에서는 平均 12個의 排卵을 誘起시켰다. 1970年代 부터 過排卵處理時의 黃體退行時間에 變異를 調節하기 위하여 estradiol-17 β 와 HCG대신에 prostaglandin을 使用하기 시작하였다(Hill 등, 1973; Elsdén, 1974; Moore, 1975). PMSG와 PGF₂ α 를 同時에 處理했을 境遇는 48時間의 間隔을 주었을 때 보다 排卵率과 卵子的 生存率이 低下되었으며(Hill 등, 1973), Tervit 등(1973)은 投與間隔이 24時間 정도는 卵巢反應에 差異가 없었다고 하였다. 일반적으로 PMSG와 PGF₂ α 의 處理間隔은 40 - 48時間이 適當하다고 報告되고 있다(Betteridge, 1977).

性腺刺戟hormone의 處理時期에 따른 卵巢反應은 Sreenan과 Beehan(1976)이 2,000IU의 PMSG를 發情週期 3 - 8日과 8 - 12日에 處理한 結果 排卵數는 平均 6.9와 11.9個로서 發情週期 前期보다는 中期에 卵巢反應이 좋다고 報告하였다. 過排卵誘起는 發情週期 7 - 14日에 性腺刺戟hormone劑인 PMSG 또는 FSH를 處理하여 Prostaglandin F₂ α 의 投與로 發情과排卵을 誘導하여왔다.

Greeve 등(1979)은 PMSG의 投與水準에 따른 採卵數는 2,000IU에서 5.9 \pm 1.2個, 2,500IU는 5.8 \pm 0.8個, 3,000IU에서 6.9 \pm 1.2個로 投與量이 높아짐에 따라 採卵數는 增加하는 傾向을 報告하였다. 그러나 Kim 등(1985)은 2,500IU에서 5.3 \pm 1.2個, 3,000IU는 5.0 \pm 2.7個로 hormone水準을 增加시켜도 採卵數는 유의적으로 減少하였고, 移植可能한 卵子的 數도 적어지는 傾向을 發表하였고, Horiuchi 등(1991)은 2,000IU PMSG를 投與하여 10.5個의 受精卵을 回收하였다.

FSH의 投與水準에 따른 採卵數에 있어서 Donaldson(1984)은 24mg에서 12.5個, 28mg에서 14.9個, 38mg은 11.1個, 40mg은 12.5個, 50 - 52mg에서는 7.4個로 報告하여, 採卵數는 28mg投與時 14.9個로 많았지만, 移植可能한受精卵의 比率는 24mg투여가 57%로서 가장 높다고 發表하였다. Bugrov 등 (1990)은 33mg의 FSH를 投與하여 採卵數는 9.5個였고, Sovetkin(1989)는 50, 40, 32mg 處理時에 受精卵은 各各 2.75, 3.35, 3.43個를 報告하였다. 그리고 Laster(1973)는 PMSG 2,000IU와 FSH 40mg으로 比較 處理한 結果 排卵數는 各各 1.6 ± 1.0 과 4.4 ± 4.9 個였으며, Elsdon 등(1978)은 1,800IU에 PMSG와 32mg에 FSH를 處理하여 各各 6.4 및 11.7個로서 PMSG보다 FSH가 卵巢反應에 유의성 있게 좋은 結果를 報告하였다.

2. 耐凍劑

受精卵凍結에 添加하는 耐凍劑에는 内部細胞를 保護하는 透過性 溶質과 外部細胞膜을 保護하는 非透過性 溶質로 區別할 수 있다(Szell과 Shelton, 1986, b).

耐凍劑는 細胞膜 内外에 存在하는 水分의 平衡(Chemical potential equilibrium)을 維持시켜 주며, 細胞水의 量을 調節하고(Leibo, 1977), 細胞內로 透過하여 細胞內의 凍結溫度를 낮추고, 細胞割球를 維持하여 주며 細胞小器官의 構造的 安定성을 持續한다(Leibo, 1974; Whittingham, 1980). 透過性溶質(DMSO, glycerol, propanediol)의 未受精卵에서 透過速度는

propanediol이 가장 빠르고 glycerol이 가장 느리며 DMSO는 中間 程度이다 (Jackowsky, 1980; Bernard 등, 1985). 그리고 細胞膜에 대한 透過速度는 細胞膜의 特性和 耐凍劑의 種類 및 溫度에 따라서 달라진다고 하였다 (Jackowski 등, 1980).

內部細胞를 保護하는 耐凍劑로 DMSO(dimethylsulfoxide)를 初期에 利用하였고 (Wilmut, 1972; Leibo et al, 1974; Whittingham et al, 1975, 1979; Kasai et al, 1980), Bilton과 Moore(1977)는 牛 受精卵凍結에서 glycerol의 耐凍效果를 確認된 바 있다. 그 後 受精卵凍結에서 glycerol이 DMSO보다 優秀한 生存率을 보여 glycerol은 受精卵凍結에서 重要的 耐凍劑로 알려지게 되었다. 그리고 propylen glycol은 glycerol과 DMSO보다 透過速度가 빠르며 滲透壓變化에 따른 損傷을 현저히 줄일 수 있다고 하였으며(Renard 등, 1981, 1984), 특히 propanediol은 다른 耐凍劑보다 有毒性이 매우 낮으므로 混合 利用하면 生存率을 높일 수 있다고 報告한 바 있다(Friedler 등, 1988).

이 밖에 內部細胞를 保護하는 耐凍劑로서 ethylene glycol(Miyamoto와 Ishibashi, 1977, 1978; Miyamoto et al, 1986; 浦野 등, 1986)에 대하여 實驗되었으나, 受精卵凍結에 있어서 耐凍劑로는 glycerol을 많이 利用하고 있는 實情이다(Kasai et al, 1982; Merry et al, 1983; Miyamoto et al, 1983, 1986).

外部細胞膜을 保護하는 耐凍劑인 sucrose는 Kasai et al(1980)에 의해 처음으로 사용되어 높은 生存率을 얻었고, Renard et al(1984), Williams와

Johnson(1985), Chupin과 Reviere(1986)등에 의하여 sucrose의 濃度, 添加時期에 대한 繼續的인 研究가 이루어 지고 있다. 그 밖에 monosaccharide (glucose와 hexose), disaccharide(sucrose와 trehalose) 및 trisaccharide (raffinose)등이 使用되고 있다.

外部細胞膜을 保護하는 耐凍劑는 分子量이 크므로 細胞膜을 通過할 수 없으며, 細胞膜에서 作用하여 透過性 耐凍劑의 移動速度를 調節함으로써 滲透壓衝擊으로 인한 受精卵을 保護하는 役割을 한다(Rudolph 등, 1985).

그러므로 Leibo(1984)는 凍結液에 sucrose를 添加하여 凍結前 細胞內의 自由水를 脫水시켜 急速凍結의 可能性을 提示하였고, 凍結 以前에 sucrose를 添加한 境遇에 있어서 Miyamoto et al(1986)은 mouse 受精卵에서 72%의 生存率을, Chupin과 Reviere(1986)는 rat 受精卵에서 87 - 96%의 높은 生存率을 얻을 수 있었다고 發表하였다. 또한 耐凍劑 除去에 sucrose를 利用하면 滲透壓의 差異에 의해 受精卵內의 glycerol을 外部變化없이 除去시킬수 있어 直接 One - step除去가 可能한 것으로 알려졌다 (Leibo, 1983, 1984; Renard et al, 1983; Merry et al, 1983).

한편 Kasai et al(1980), Leibo(1983), 鈴木(1983)등은 凍結前後 凍結液과 除去液에 sucrose를 添加시켜 One - step straw를 製造하였으며, 이 方法은 이미 實用化 段階에 이르고 있다.

Williams와 Johnson(1986)은 One - step straw를 利用하여 mouse 受精卵에서 86%의 生存率을 얻었다고 報告하였고, 牛 受精卵은 Chupin과 Precureor(1984), Renard et al(1983), 鈴木 등(1983)은 40 - 60%의 生存率

을 發表하였다.

最近에는 mouse와 牛에서 高濃度의 耐凍劑를 利用하여 超急速凍結하는 研究가 활발하게 進行되고 있다(Szell과 Shelton, 1986 a, b, 1987; Miyamoto 등, 1986; Chupin과 Reviere, 1986; Trounson 등, 1987; Nakagata, 1989). Rall과 Fahy(1985)는 高濃度 耐凍劑 保護物質(Vitrification solution)을 製造하여 LN₂ container내에서의 蒸氣로 直接 凍結에 成功하였다(Hsu 등, 1986; 松本 등, 1987).

3. 凍結方法

牛 受精卵의 凍結方法은 緩慢凍結(0.3 - 1°C/min), Two - step 凍結 (3 - 15°C/min), 急速凍結(LN₂ container 上面에서 直接 凍結), 超急速凍結 (220°C/sec)로 區分할 수 있다.

緩慢凍結은 주로 實驗動物을 對象으로 耐凍劑를 利用하여 凍結時 細胞內의 脫水로 水晶形成을 減少시킬 수 있는 方法이며, Whittingham 등(1972)에 의해 mouse 受精卵에서 成功한 後, rat(Whittingham 등, 1975), 家兔(Bank와 Maurer, 1974), 羊(Wiladsen 등, 1976), 牛(Bilton과 Moor, 1976; Niemann, 1985)등이 報告되었다.

Kanagawa(1983)는 乳牛 受精卵에서 0.3 - 0.33°C/min로 -36°C까지 下降시켜 凍結했을 때 22%의 낮은 受胎率을 報告하였고, Bielanski 등(1984)은 肉牛 受精卵을 0.3°C/min로 -35°C까지 凍結시켰을 때 75%의 生存率을 發表

한 바 있다. 그리하여, Mazur(1977, 1980)는 細胞內 水晶形成에 의한 傷害를 防止하기 위하여 水分의 脫水가 充分히 일어날 수 있는 低速 冷却速度(1°C 이하/min)를 行하지 않으면 안된다고 指摘하였다. 한편, Whittingham 등(1979)은 凍結速度를 0.3°C/min로 하였을 때 最終 凍結溫度가 낮아질 수록(-80°C) 融解速度(20°C/min)는 緩慢하게 進行되어야만 높은 生存率을 얻을 수 있다고 報告하였으며, Willadsen(1977)은 最終 凍結速度가 -40°C일 때 融解速度는 500°C/min로 適合하였다고 發表하였다.

Mouse 受精卵의 凍結速度에 관해서 陳 등(1986)은 1.5M DMSO와 glycerol을 使用하여 -50°C까지 1°C/min로 凍結시켰을 때 43 - 49%의 生存率을 보였으며, 3°C/min에서는 13.2 - 16.9%로 生存率은 急激히 低下되었고, 7°C/min 이상에서는 生存率이 0%였다고 報告하였다.

家兎 受精卵凍結에서 金(1987)은 glycerol을 利用하여 -35°C까지 0.3°C/min로 凍結시켰을 때 78%의 높은 生存率을 보였고, 3 - 5°C/min로 -80°C까지 凍結시켰을 때는 71%, 15°C/min인 境遇에는 62%로 凍結速度가 빨라짐에 따라 生存率은 低下된다고 하였다.

凍結液에 sucrose의 添加 效果를 實驗한 金 등(1983)은 10% glycerol과 sucrose를 使用하여 mouse 受精卵에서 凍結速度가 빨라져도 sucrose添加時에는 受精卵 生存率에 큰 影響을 주지 않았다고 報告하였다.

Two - step 凍結方法은 Bouyssou와 Chupin(1982)에 의해서 試圖되었으며, 牛 受精卵을 利用하여 -30°C의 冷凍室에서 30分間 受精卵을 放置한 後 -196°C에 浸漬시켜 凍結하는 方法으로 緩慢凍結의 生存率과 큰 差異가 없다

고 報告하여 Two - step 凍結의 可能性을 提示하였다. Two - step 凍結을 利用한 Renard et al(1984)은 2.2M propanediol을 凍結液에 使用하여 家兔 受精卵을 -30°C 에 30 - 40分間 保管한 後 LN_2 container로 옮겨 凍結融解하여 77 - 88%의 높은 生存率을 얻었다고 報告하였다. Miyamoto와 Ishibashi(1983)는 mouse 受精卵을 利用하여 62%의 生存率을 얻어 Two - step 凍結이 簡便하고 빠르며, 經濟的으로 利用價値가 높다고 하였다.

Williams와 Johnson(1986)은 mouse 受精卵을 凍結시켰을 때 72 - 86%의 生存率을 얻었다고 報告하였으며, Chupin과 Reviere(1986)도 rat 受精卵을 2.8M glycerol과 0.25 또는 0.5M sucrose를 添加한 凍結液을 利用 Two - step 凍結時 70.8 - 84.4%의 生存率을 보여, 急速 凍結에서 47.6 - 50.0%의 生存率보다 優秀하였다고 報告하였다.

急速凍結에 관해서는 Wood와 Farrant(1980)에 의해 mouse에서 처음으로 報告되었다. 凍結液에서 脫水시킨 後 -9°C 로 植水後 -20°C 에서 15 - 30分間 保管하여 LN_2 container로 옮겨 凍結 融解시켜서 66%의 生存率을 發表하였다. Kasai 등(1980, 1981)은 morula stage와 blastocyst stage의 mouse 受精卵을 Three - step 凍結(20°C , -20°C 및 -100°C 에서 10分間 放置 後 LN_2 container에 凍結하는 方法)에 의해 45 - 85%의 生存率을 얻었고, 急速凍結된 受精卵은 緩慢融解보다는 急速融解할 때 生存率이 높다고 結論을내렸다. Takeda 등(1984)은 2.8M glycerol에서 One - step 凍結(常溫에서 脫水 後 LN_2 에서 凍結하는 方法)을 報告하였다.

그 後 急速凍結은 Quick-freezing(Williams와 Johnson, 1985), Direct -

plunging(Krag 등, 1985; Biery 등, 1986; Reichenbach와 Rodrigues, 1988), Fast-freezing (Zu 등, 1988)등이 주로 mouse 受精卵을 利用하여 65-85%의 生存率이 發表되었다.

Rall과 Fahy(1985)는 高濃度 耐凍劑 保護物質(vitrification solution)을 使用하여 LN₂ container 內에서 凍結에 成功하면서 超急速凍結研究가 활발하게 進行되게 되었다(Szell과 Shelton, 1986,a,b, 1987; Miyamoto 등, 1986; Chupin과 Reviere, 1986; Trounson 등, 1987; Nakagata, 1989).

超急速凍結은 凍結液內에 약 50%의 耐凍劑가 添加되기 때문에 耐凍劑의 毒性을 줄이기 위해 5℃에서 操作을 하는 vitrification 方法과 細胞內外를 保護하는 耐凍劑를 凍結前 細胞內의 自由水를 脫水시키는 方法이 있다.

Trounson 등(1987)은 mouse 受精卵으로 超急速凍結을 利用하여 65%의 生存率을 報告하였고, Szell과 Shelton(1987)은 5.0M glycerol과 0.5M sucrose를 添加한 凍結液에서 95%의 生存率을 發表하였다. 金 등(1991)은 牛의 體外受精卵을 2.5M glycerol과 0.25M sucrose에서 超急速凍結하여 72%의 生存率을 報告하였다.

Ⅱ. 材料 및 方法

1. 試驗期間 및 場所

本 試驗은 1988年 4月부터 1992年 9月까지 濟州試驗場과 畜産事業所 및 濟州大學校 農科大學 畜産學科 家畜繁殖學 實驗室에서 實施하였다.

2. 供試動物 및 飼養管理

正常的인 發情週期가 反復되는 濟州韓牛交雜種 15頭를 供卵牛로 供試하였다(Table 1).

Table 1. Reproductive status of cows and heifers

Group	No. of cows	Age (years)	Body weight (kg)	Parity times (time)	Estrus cycle (day)
Cow	10	6.1±0.83	383.8±28.8	2.4±0.91	21.0±0.77
Heifer	5	3.0±0.0	364.6±12.8	0	20.4±0.48

飼養管理는 放牧期인 5 - 10月은 牧草地에서 放牧하여 自由菜食시켰으며, 舍飼期인 11 - 4月은 Italian ryegrass 乾草와 Italian ryegrass silage 및 corn silage를 爲主로 飼養하였고, 濃厚飼料는 舍飼期에 한하여 體重의

0.8 - 1.0%를 給與하였다.

3. 試驗方法

1) 過排卵誘起 및 人工授精

發情週期 9 - 14일에 直腸檢査를 實施하여 黃體 開花期에 있는 供卵牛에 PMSG 2,500 - 3,000IU를 筋肉注射하고, 48時間後 30mg의 $PGF_2\alpha$ (Upjohn CO, Lutalyse)를 筋肉注射하였다. FSH(Sigma, F8001, L9510)處理는 40mg을 減量 投與方法으로 4日間 投與하고 3日後 $PGF_2\alpha$ 를 30mg 筋肉注射하여 過排卵을 誘起시킨 後 發情이 發現되면 standing - estrus를 捕捉하여 1次 人工授精을 實施하고, 12-15時間 間隔으로 2次 및 3次 人工授精을 追加로 實施하였다.

2) 受精卵의 採卵 및 選別

受精卵의 採卵은 最初 人工授精後 6 - 7일에 非外科的인 方法으로 回收하였다. 後驅麻酔는 2% Lidocaine 6 - 8ml을 第1과 第2 尾椎사이에 注射하였으며, 子宮頸 擴張棒으로 子宮頸管을 擴張한 後 twoways foley catheter를 子宮腔內에 固定한다. catheter固定 後 PBS液 2,000 - 2,500ml를 重力에 의하여 流入되게 裝置하고, 流入이 中止되면 回收하는 反復回收方法에 의하여 1,000 ml回收병에 回收하였다. 回收用 灌流液은 DPBS(sigma, D5527)와 m-PBS를 製造하여 使用하였으며, 灌流液 組成은 Table 2와 같다.

回收된 採卵液은 常溫에서 30分間 放置한 後 低面에 있는 液을 一定量 watching glass에 취하여 phase microscope下에서 20 - 40倍率로 卵子를 檢

索하였다. 採卵된 卵子 中에서 正常的인 形態의 桑實胚와 胚盤胞만을 選別하여 凍結에 利用하였고 未受精卵 및 形態의 異常卵은 實驗에서 除外하였다.

Table 2. Composition of modified Dulbecco's phosphate buffered saline(m-PBS)

Component	Concentration
NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
CaCl ₂	0.1 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.1 g
Glucose	1.0 g
Na pyruvate	0.036 g
Bovine serum albumin	3.0 g
Streptomycin sulfate	50mg
Kanamycin	100mg
Fetal Bovine serum	10ml
Triple - distilled water	1,000ml

3). 卵胞卵 採卵

濟州畜協 畜産物 處理場에서 屠殺된 經産牛와 未經産豚의 卵巢를 採取後 實驗室로 운반하여 試驗하였다. 滅菌生理食鹽水로 洗滌後 18 gauge 注射器 (10ml)로 卵胞液과 卵胞卵을 吸入하여 watching glass에 옮겨 卵胞卵을 回收하여서 超急速凍結에 供試하였다.

4) 凍結方法

卵子の 凍結은 LN₂를 利用하여 緩慢과 急速 및 超急速凍結方法으로 區分하여 LN₂ container(XC33 I.M.V, France)內에서 實施하였다(Fig 1).

(1) 緩慢凍結

常溫에서 -7℃까지 1℃/min로 下降시킨 後 5分間 靜置한 다음 -35℃까지는 0.3℃/min로 下降시켜 곧바로 -196℃ LN₂에 straw를 浸漬 凍結後 8 - 12週間 保管하였다.

(2) 急速凍結

straw를 常溫에서 1分 以內에 LN₂表面 2 - 3mm까지 下降시킨 다음 5分間 靜置後 LN₂에 浸漬 8 - 12週間 保管하였다.

凍結溫度의 確認은 凍結液을 채운 straw에 cell - freezer(R204, Planner product, England)의 sensor를 끼워서 固定한 後 auto - recorder의 記錄에 의하였다.

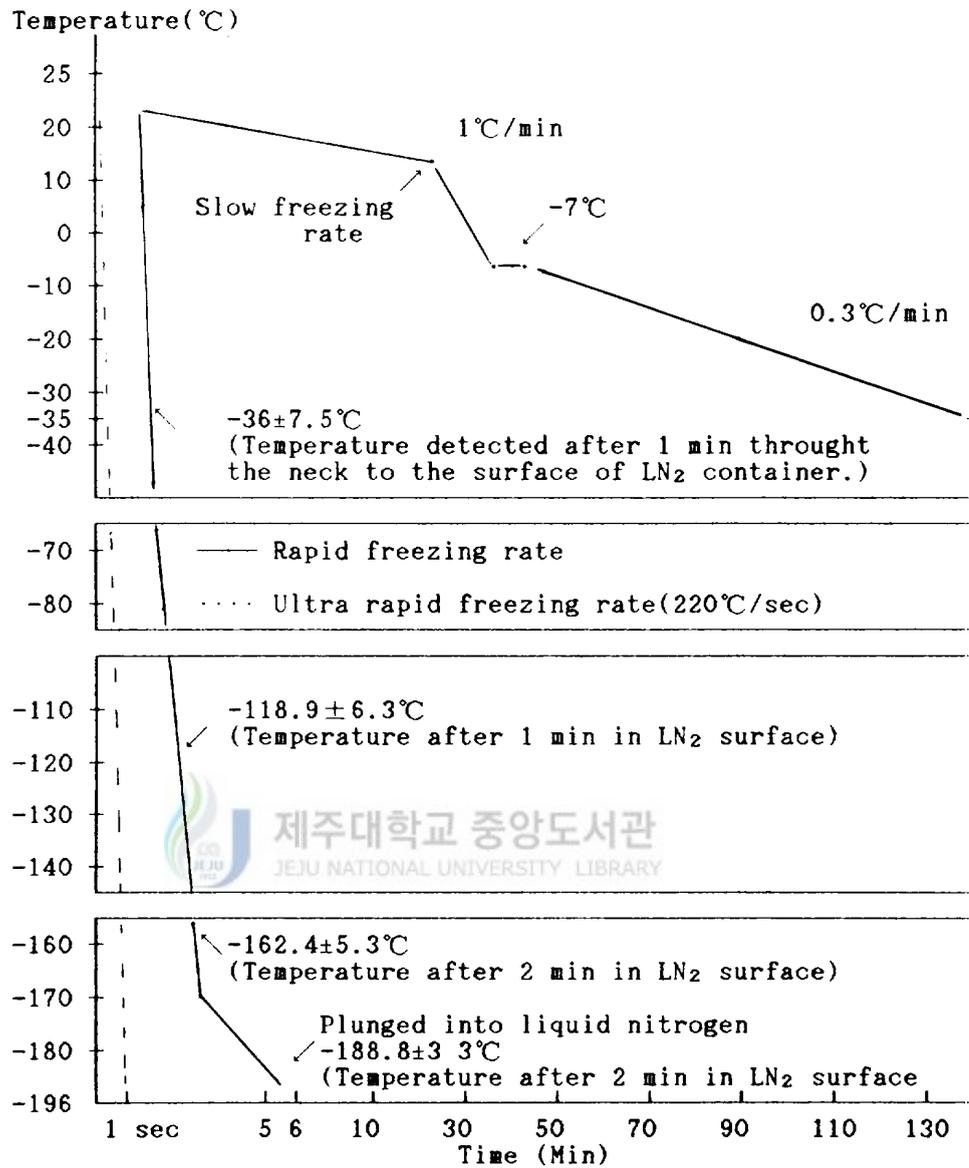


Figure 1. Rates of temperature change for slow, rapid and ultra rapid freezing rate

(3) 超急速凍結

Vitrification solution은 1ml 注射器가 연결된 0.5ml straw에 PS(PBS + sucrose), air, PS를 注入하여 準備하였다.

卵子를 含有한 drop을 準備된 straw에 注入한 後 air bulble, PS순으로 吸入하여 straw powder로 封入하였다. 常溫에서 10分間 平衡시킨 다음 LN₂에서 220°C/sec로 凍結하였다(Fig 2).

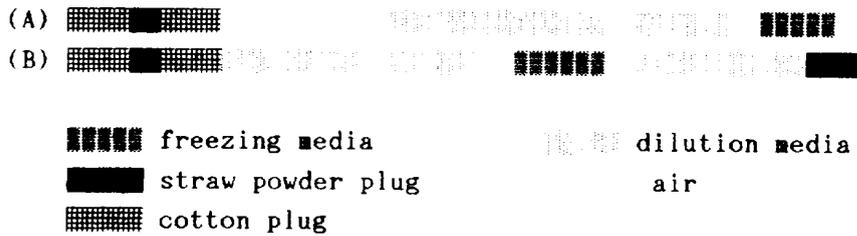


Figure 2. Configuration of freezing medium, dilution medium and air in 0.5 ml straw, just before loading eggs(A) and after sealing with straw powder(B)

5) 卵子的 融解

卵子的 融解는 38°C溫水에서 straw內的 氷片이 거의 녹을 때까지 하였고, 所要時間은 約 10秒 程度였다.

6) 耐凍劑의 除去

耐凍劑 除去液은 耐凍劑 添加와 같은 one - step方法에 의하여 PBS에 10% sucrose를 添加한 除去液(PS)에서 耐凍劑를 除去하였다.

7) 生死判定

生死判定에 使用한 FDA液은 3', 6' - diacetyl fluorescence(FDA) 1mg을

acetone 1ml에 融解시킨 後 PBS液에 600,000 : 1로 稀釋 製造하였다.

卵子の 生死判定은 FDA液에 耐凍劑가 除去된 卵子を 넣고 常溫에서 3分 동안 培養한 後 FDA가 없는 PBS에 옮겨 位相差螢光顯微鏡(Nikon, TMD - diaphat, Japan) 100倍下에서 觀察, score를 決定하였다. score는 6 段階로 區分하여 정했고 이를 處理別 平均 score로 換算하였다.

FDA score는 다음과 같은 基準에 의하여 判定하였다.

Positive - 5 : 卵子の 分割球 全體가 綠色螢光을 強하게 發散하는 것 (5點; 100%).

Positive - 4 : 卵子 分割球 中 80%以上 綠色螢光을 띠거나 Positive - 5보다 全體가 弱하게 螢光을 發散하는 것(4點; 80%).

Partial - 3 : 卵子 分割球 中 60%以上 綠色螢光을 띠는 것 또는 Positive - 4보다 全體가 弱하게 螢光을 發散하는 것(3點; 60%).

Partial - 2 : 卵子 分割球의 40%以上이 綠色螢光을 發散하거나 또는 Partial - 3보다 全體가 弱하게 螢光을 發散하는 것(2點; 40%).

Partial - 1 : 卵子 分割球의 20%以下가 綠色螢光을 發散하는 것(1點; 20%).

Negative - 0 : 綠色螢光이 전혀 띠지 않는 卵子(0點; 0%).

平均 score 算出方法

$$=(a \times 5) + (b \times 4) + (c \times 3) + (d \times 2) + (e \times 1) + (f \times 0)/N$$

a : Positive - 5의 生存 卵子數

b : Positive - 4의 生存 卵子數

- c : Partial - 3의 生存 卵子數
- d : Partial - 2의 生存 卵子數
- e : Partial - 1의 生存 卵子數
- f : Negative - 0의 卵子數
- N : 凍結 融解後 回收된 卵子數

4. 統計處理

統計處理는 分散分析을 하였고, 分散分析 後 有意性이 認定된 境邊 duncan의 多重檢定法에 의하여 各 處理間의 有意差를 檢定하였다.



IV. 結果 및 考察

1. 過排卵處理와 卵巢反應

供卵牛에 過排卵處理時 發情發現, 發情持續時間 그리고 直腸檢査에 의한 卵巢反應狀態를 조사한 것은 Table 3과 같다.

Table 3. Estrus states and ovarian size of cows after PMSG, FSH treatment by palpation

Treatment (unit)	No. of heads	Time of estrus sign after PGF ₂ α (hr)	Duration of estrus (hr)	Ovarians size before PMSG or FSH treatment (cm)		Ovarians size at estrus (cm)	
				Left (L×W)*	Right (L×W)	Left (L×W)	Right (L×W)
PMSG (2,500IU)	5	32.8 ± 1.7	18.6 ± 0.8	2.7 ± 0.1	3.0 ± 0.2	5.4 ± 0.5	6.2 ± 0.3 ^b
				×	×	×	×
PMSG (3,000IU)	5	35.0 ± 2.8	18.8 ± 2.4	2.3 ± 2.2	2.3 ± 0.3	4.5 ± 0.4	4.7 ± 0.6
				2.8 ± 0.2	3.1 ± 0.2	5.1 ± 1.1	5.7 ± 0.9 ^a
FSH (40mg)	5	43.4 ± 2.9	22.4 ± 2.9	×	×	×	×
				2.3 ± 0.3	2.4 ± 0.3	4.1 ± 0.5	4.3 ± 0.4
				2.8 ± 0.4	3.1 ± 0.6	6.4 ± 1.5	7.8 ± 0.6 ^c
				×	×	×	×
				2.2 ± 0.3	2.4 ± 0.2	4.5 ± 0.4	5.9 ± 1.2

* L: Length, W:Width, *Mean ± S.D.

Different supercripts denote significant differences within columns (P<0.05)

PGF₂α 投與後 發情開始時間은 PMSG 2,500IU에서 32.8時間, PMSG 3,000에서 35.0時間, 그리고 FSH 40mg는 43.4時間을 나타내었고, 發情持續時間 각각 18.6, 18.8, 22.4時間으로 FSH 40mg 處理區가 PMSG처리구 보다 대차 길었으며, PMSG 2,500 IU와 3,000 IU에서는 약간의 差異가 있었으나 有差는 없었다.

Greve 등(1979)은 經産牛에서 PGF₂α 投與後 發情開始는 40時間 以前 나타나고 48時間 以後는 卵子的 回收率과 生存率이 낮아진다고 하였다. 橋 등(1983)도 發情開始時間이 길어질수록 平均 排卵率이 有意하게 낮다고 보고하였다(全川 등, 1976; Fahning, 1986).

Yadav 등(1985)은 Cloprostenol(prostaglandin)을 投與後 41.3±1.25時에 發情이 開始된다고 하여 本 實驗結果와 比較했을 때 FSH 40mg 處理區 差異가 없었으나, PMSG 處理區는 發情開始時間에서 약간 差異가 있었다.

卵巢의 크기에 있어서는 hormone 投與前은 差異가 없었으며, 投與後에 側卵巢의 길이는 各各 5.4±0.5, 5.1±1.1, 6.4±1.5cm이고, 폭은 4.5±0.4, 4.1±0.5, 4.5±0.4로 統計的 有意差는 없었다. 그러나 右側卵巢는 각각 6.2±0.3, 5.7±0.9, 7.8±0.6cm이고, 폭은 4.7±0.6, 4.3±0.5, 5.9±1.2cm로 FSH 40mg은 投與後에 매우 크게 나타나고 있으며, 右側卵巢의 길이는 處理後에 유의적인 차를 보였다(P<0.05).

이는 過排卵 處理時 FSH 40mg에서는 많은수의 卵胞가 成長하였으나 適宜한 排卵이 안되고 閉鎖卵胞 또는 estradiol-17β의 濃度가 낮고, 卵胞의 inhibin activity가 變化되지 않아 FSH에 分泌를 抑制시키지 못하여 卵이 되지 않는 것으로 報告되었다(Padmanabham 등, 1984).

Ireland 등(1982, 1983)은 PGF₂α 注射後 6mm以上 卵胞에서 E-A卵胞(estrogen-active follicle)와 E-I卵胞(estrogen-inactive follicle)가 成되는 데, E-A卵胞는 卵胞液內 estradiol-17β의 濃度가 높고, 顆粒膜이

에서 125 I-HCG의 특異的結合이 增加하여 排卵卵胞가 되며, E-I卵胞는 卵胞液內 estradiol의 濃度가 낮은 반면, progesterone과 androgen은 濃度가 높고, 顆粒膜細胞의 數가 줄어들어서 125 I-HCG와의 結合이 低下되므로 閉鎖卵胞가 된다고 報告하였다.

過排卵處理後 卵胞數, 排卵數 그리고 受精卵의 回收率에 성적은 Table 4에 提示한 것과 같다.

Table 4. Effect of levels of PMSG, FSH injection on ovulation point and recovery rate of cows egg after superovulation by palpation

Dosage (unit)	No. of heads	No. of ovarians follicles			No. of ovulation points			No. of recovery embryos	Recovery rate (%)
		Left	Right	Total	Left	Right	Total		
PMSG (2,500IU)	5	4.8 ±0.7	5.6 ^a ±0.4	10.4 ±1.0	3.0 ±0.6	4.2 ^a ±1.1	7.2 ^a ±1.3	5.2 ±1.3	72
PMSG (3,000IU)	5	5.2 ±1.4	6.2 ^b ±1.3	11.4 ±2.3	3.2 ±1.1	4.6 ^a ±1.8	7.8 ^a ±2.6	4.8 ±1.7	61
FSH (40mg)	5	5.6 ±1.0	7.8 ^b ±1.1	13.2 ±1.9	4.4 ±1.0	7.0 ^b ±1.4	11.4 ^b ±1.2	6.4 ±2.7	56

*Mean ± S.D.

Different supercripts denote significant differences within columns (P<0.05)

PMSG 2,500IU, 3,000IU 그리고 FSH 40mg 處理區에 있어서 直腸檢査에 의한 卵胞數에 있어서 直腸檢査에 의한 左側卵巢에서 各各 4.8±0.7, 5.2±1.4, 5.6±1.0個로 統計的 有意差는 없었다. 그러나 右側卵巢는 5.6±0.4,

6.2±1.3, 7.8±1.1個로 各 處理區에서 有意性이 있었다(P<0.05).

排卵數는 左側卵巢에서 各各 3.0±0.6, 3.2± 1.1, 4.4±1.0個로 有意差는 없었고, 右側卵巢는 4.2±1.1, 4.6±1.8, 7.0±1.4個로 處理間에 有意的인 差를 보였다(P<0.05). 이에 反하여 전체 回收卵子數를 보면 各 hormone 處理別로 5.2개, 4.8개, 6.4개로서 差異가 없었으며, 특히 回收率은PMSG 2,500IU에서 72%, PMSG 3,000IU에서 61%이고, FSH 40mg에서는 56%로 다소 떨어지는 成績을 보였다. FSH 處理區가 回收率이 낮은 原因은 採卵時期가 여름철에 偏重되었고, 방목지에서 遂行하였기 때문인 것으로 思料된다.

排卵數는 過排卵 處理後 채란일에 黃體發育狀態를 直腸檢査에 의해서 조사하였는데, PMSG 2,500IU에서는 大形黃體(5mm 이상)가 均일하게 분포하였으며, PMSG 3,000IU와 FSH 40mg은 小型黃體(5mm 이하)가 出現하였다. 특히 FSH 처리구는 황체발달이 均일하지 못하였고, 小型黃體와 排卵되지 않은 卵胞가 나타나고 있었다. 小型黃體의 出現에 대하여 명확히 규명되지 않았지만 Elsdén(1982)은 卵巢反應이 나쁜 개체에서 딱딱하고 적은 黃體가 發生한다고 보고하였다. Monniaux 등(1983)은 Charolais 經産牛 28頭에 PMSG 2500IU를 投與하여 8.1±7.4個의 排卵數를 報告하였고, Vesetinovic 등(1984)도 Holstein 經産牛 12頭에서 PMSG 3,000IU를 注射하여 平均 12.7個의 排卵成績을 얻었다. 그리고 韓牛에서 高 등(1981)은 PMSG 2,000IU를 使用하여 平均 6.5個, 任 등 (1984)은 同量의 PMSG로 平均 6.0個를 發表하였다. 本 實驗에서 PMSG 2,500IU와 3,000IU 投與後 排卵數는 各各 7.2, 7.8個로 Sergeev 등(1990)의 11.2個 보다는 떨어지는 成績이었다.

過排卵處理時 FSH投與는 Chupin과 Procureur(1983)가 32mg, 50mg을 利用하여 8.9, 9.7個의 排卵數를 報告하였고, Bugrov 등(1990)은 33mg을 未經産牛에 注射하여 11.3個에 比하여, Sovetkim 등(1989)의 Holstein 經産牛에서 50, 40, 32mg의 FSH를 投與하여 5.8, 6.8, 6.8個의 排卵成績과 비슷하였고,

2.75, 3.35, 3.43個의 受精卵을 回收한것보다는 다소 양호한 성적이었다.

過排卵處理時 個體間의 差異는 各 個體의 營養 또는 遺傳的인 差異에 起因한다고 報告(Sreenan 등, 1976; Dunn, 1980)한 바와 같이 本 實驗에서도 같은 結果를 볼 수 있었다. 過排卵處理時 發情週期 6 - 7日에 採卵한 卵子の 形態는 Table 5와 같이 hormone 處理別 回收卵數는 各各 26, 24, 32個이고, 이中 正常卵은 各各 20(77%), 19(79%), 21(66%)個였으며, 未受精卵은 5, 2, 5個, 退行卵은 1, 3, 6個로서 非正常卵이 많이 發見되였다.

Greve 등(1979)은 Holstein 經産牛에서 PMSG 2,000IU를 投與하여 平均 6.2個의 受精卵을 回收하였으며, Monniaux 등(1983)은 Charolais 經産牛에 2,500IU의 PMSG를 利用하여 6.0±6.4個를 採卵하였고, Gorlach 등(1984)은 PMSG 2,000 - 3,000IU를 使用하여 平均 7.19個의 受精卵을 回收하였다.

Table 5. Development stages of embryos recovered on 6-7 days after estrus

Treatment (unit)	No. of eggs recovered	No. of normal embryos			No. of atypical embryos		
		Morulae	Blast-ocysts	Total (%)	UF* eggs	Deg** embryos	Total (%)
PMSG (2,500 IU)	26	14	6	20 (77)	5	1	6 (23)
PMSG (3,000 IU)	24	12	7	19 (79)	2	3	5 (21)
FSH (40mg)	32	19	2	21 (66)	5	6	11 (34)

* unfertilized eggs, ** Degenerated embryos

Wubishet 등(1986)은 Holstein 經産牛에서 FSH 50mg의 投與로 8.2個의 受精卵을 採卵하여 桑實胚 2.3個, 胚殼胞期 4.2個, 未受精卵 2.3個를 發表했으며, 南 등(1985)은 平均 5.0개의 卵子를 回收하여 桑實胚 1.7개(32.8%), 胚殼胞期 1.8개(35.8%), 退行卵은 1.4개(28.4%)를 報告하였고, 本 實驗에서 卵子의 採卵은 各 처리별 平均 5.2, 4.8, 6.4個 였으며, 正常卵은 各各 4.0, 3.8, 4.2個를 나타내었다. 發育段階別로 볼때 수정란은 PMSG 2500IU에서 桑實胚는 2.8개(54%), 胚殼胞基 1.2개(23%), 未受精卵과 退行卵 1.2개(23%)였고, PMSG 3000IU는 桑實胚 2.4개(50%), 胚殼胞基 1.4개(29%), 未受精卵과 退行卵 1.0개(21%)였으며, FSH 40mg은 桑實胚 3.8개(59%), 胚殼胞基 0.4개(6%), 未受精卵과 退行卵 2.3개(34%)를 나타내었다.

正常受精卵의 比率은 PMSG 2,500IU는 77%였고, PMSG 3,000IU에서 79%였으며, FSH 40mg에서는 66%의 성적을 얻었다. Elsdon 등(1976)과 Ozil 등(1979)의 正常受精卵 比率 70%의 보고와 本 實驗의 PMSG 2,500IU, 3,000IU에서는 비슷한 성적을 보였으나, FSH 40mg처리구는 正常卵 比率이 다소 떨어져 있었다. FSH 40mg처리구에서 退行卵이 많이 발생한것은 다른 처리구에 비해 發情持續時間도 길었으며, 따라서 排卵時間도 적기에 排卵이 안되어 배란지연에 의해서 退行卵이 多發한것으로 사료된다.

過排卵 處理後에 正常 發情再歸日의 發現狀態는 Table 6과 같이, 過排卵 處理後에 정상적인 發情 증세는 PMSG 2,500IU에서 52.4일, PMSG 3,000IU에서 69.8일 그리고 FSH 40mg에서는 62.4일에 發現되었다. PMSG 2,500IU에서 發情再歸日이 짧은 것은 적은 量의 hormone투여에 起因한 것으로 생각된다.

그러나 PMSG 3,000IU와 FSH 40mg에서 正常 發情再歸日이 길어 지는것은 過排卵處理時 형성된 黃體가 萎縮되는 상태로 장기간 지속되었고, 또한 閉鎖卵胞도 休止된 狀態로 오랫동안 지속 되고 있었다. Table에는 提示하지

않았지만, 過排卵 處理後에 正常 發情發現時 子宮頸管粘液 pH는 8-10 정도로 높게 나타나고 있으며, 卵巢內 Graafian follicle도 成長이 低調하였으며 排卵時間도 지연되는 현상을 볼 수 있었다. Hormone 처리하여 產後 發情再歸日에 관해서 Lubbadah 등(1980)은 乳牛에 PMSG 3,000IU를 처리한 후 正常 發情再歸日은 29-66일(평균 48일)로 報告 하였으나, 本 實驗에서는 이보다 다소 길게 나타나고 있었다.

Table 6. Effect of PMSG and FSH administration on interval of spontaneous estrus

Treatment	No. of heads	Spontaneous estrus	
		Range(day)	Mean \pm S.D.
PMSG 2,500 IU	5	32 - 70	52.4 \pm 14.1
PMSG 3,000 IU	5	42 - 92	69.8 \pm 16.6
FSH 40mg	5	41 - 73	62.4 \pm 11.5

한편, 發情再歸發現日의 길이와 頻度가 不規則적으로 變化하는 데 있어서 Spilman 등(1973)과 Booth 등(1975)은 發情再歸가 延長 되는 現狀은 progesterone 水準의 間歇적으로 上昇된데 起因한다고 보았으며, progesterone 水準의 上昇은 過排卵 處理後에 形成된 黃體로부터 由來하여 部分的으로 閉鎖卵胞에서도 起因한다고 하였다. 따라서 progesterone 水準은 過排卵 處理後 形成된 黃體數와 正의 相關關係가 있다고 報告하고 있다 (Both, 1975; Brand 등, 1977).

2. 受精卵과 卵胞卵의 凍結

牛 受精卵의 緩慢凍結과 急速凍結時 生存率(FDA - score)에 미치는 影響을 比較 調査한 結果는 Table 7과 같다.

Table 7. Effect of slow and rapid freezing procedures with freezing media containing 1.4M glycerol on the survival rate (evaluated by FDA - test) after freezing and thawing

Method of freezing	No. of recovered embryos post - thaw	No. of survival embryos evaluated by FDA - test						FDA score
		P ₅	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	N	
Slow freezing (Cell Freezer)	25	5	9	4	2	1	4	3.1
Rapid freezing (LN ₂ container)	27	-	6	3	7	2	9	1.2

The composition of slow and rapid freezing media was 10% glycerol + 10% sucrose with PBS

牛 受精卵의 凍結融解後 FDA - score는 緩慢凍結이 3.1(62%)로서 急速凍結의 1.2(24%)보다 높게 나타나고 있으며, 緩慢凍結에서 P₅와 P₃의 FDA score는 72%로 良好한 生存率을 나타내고 있었고, 急速凍結은 P₅와 P₃에서 33%로 낮은 生存率을 보여주고 있다. 이러한 結果는 凍結液에 添加된

glycerol 濃度を 1.4M로 同一한 處理方法과 凍結用器具(cell freezer와 LN₂ container)의 差異도 原因으로 볼 수 있다.

일반적으로 受精卵의 凍結處理에 있어서 細胞死滅에 主原因은 脫水狀態, 水晶形成, 平衡時間등을 들 수 있는데 凍結과 融解시 細胞内外部에서 生成되는 適當한 脫水, 水晶形成은 細胞質에 物理的 壓力을 가하게 되므로서 細胞質이 死滅하게 된다. 그리고 平衡時間도 凍結液內도 透過性 物質과 細胞內의 水分移動時에 적절한 시간과 融解後 細胞內의 耐凍劑 이동이 細胞의 生存에 영향을 미쳐서, 生存率이 저하되는 것이다(Wood & Farrant, 1980; Leibo, 1984). 특히 本實驗의 急速凍結 處理區에서 受精卵의 透明帶 손상은 없었으나 割球細胞가 파괴되어 死滅한것을 볼수있었는데, 이러한 현상은 耐凍劑 添加水準(glycerol 1.4M)이 낮아 凍結前 수정란 내부의 수분이 脫水되지 않은 상태에서 LN₂(-196℃)에 급속히 침지함에 따라 형성된 水晶이 細胞膜을 파괴시킨 것으로 사료된다.

Bilton 등(1981)은 glycerol 1.0M로 牛 受精卵를 緩慢凍結과 急速凍結時 각각 28.8%, 47.7%로 生存率에서 急速凍結이 優秀하다고 發表했으나, Lehn - Jensen(1983)은 glycerol 1.4M로 胚般胞期에 牛 受精卵를 緩慢凍結하여 57%의 受胎率을 報告하였다.

새로운 vitrification solution(glycerol 20%, ethylene glycol 10%, Ficoll 30%, sucrose 10%)으로 牛, 돼지 및 家兎등의 未成熟卵子를 超急速凍結後 融解한 生存率(FDA - score)비교는 Table 8과 같다.

Table 8에서 나타난 바와 같이 牛, 돼지, 家兎등의 卵胞卵의 生存率(FDA-score)은 각각 4.1(82%), 3.5(70%), 3.1(62%)로 緩慢凍結(Table 7) 보다 높은 生存率을 보여주었다. 耐凍劑를 高濃度로 混合하여 超急速凍結時 牛 卵子(卵胞卵)에서 FDA score의 P₅ - P₃比率은 90%로 높은 生存率을 나타내고 있으며 돼지와 家兎도 각각 71, 70%의 좋은 成績을 얻을 수 있었다.

Table 8. The comparison of the survival of vitrified cow, pig, and rabbit ovarian oocytes by FDA test

Breed	No. of oocytes frozen	No. of oocytes evaluated by FDA test						FDA score
		P ₅	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	P ₀	
Cow	31	17	10	1	0	0	3	4.1
Pig	42	19	3	8	7	4	1	3.5
Rabbit	34	10	1	13	6	0	4	3.1

The composition of vitrification solution was 20% glycerol + 10% ethylene glycol + 30% Ficoll + 10% sucrose with PBS

超急速凍結에 사용된 Ficoll은 高分子物質(分子量 70,000)로서凍結時琉璃화를促進시키는非透過性物質인 반면, sucrose는 低分子物質(分子量 342)로 内部細胞의 수분이나, 融解時 内部細胞에 투과되어 있던 동결액을脫水시키는 역할을 하므로서(Mazur, 1970); Kasai 등, 1980)生存率을 向上시킬수 있다고 하였다. 과거 이러한 vitrification 방법은 4°C에서 受精卵을 平衡하기전 100% vitrification solution의 毒性을 제거하기 위해서 5°C에서 낮은 濃度에서부터 높은 농도의 vitrification solution로 여러번 平衡시켜야만 하였다(Rall 과 Fahy, 1985; Rall 등, 1987). 姜 등(1990)은 mouse 2-cell 受精卵을 超急速凍結하여 89.9%의 生存率을 發表하였고, Massip 등(1986)은 牛 受精卵을 vitrification solution로 凍結時 各各 42.8%와 53.8%의 生存率을 報告한것에 비하여 높은 생존율을 보여 주었다.

최근에 鄭 등(1990)은 1-2 cell의 mouse 난자에서 20% HCS + 3.5M DMSO + 0.25M sucrose를 제조하여 동결속도 5°C/sec 와 200°C/sec로 동결하였을때

생존율은 각각 94.6%, 75.4%로 성적을 발표하였다. 그리고 金 등(1991)은 牛의 體外受精卵을 超急速凍結 20% FCS + 2.0M glycerol + 0.25M sucrose를 이용하여 75%의 생존율을 발표하였다. 그러므로 本 實驗에서 牛 卵子(卵胞卵)로 vitrification solution을 이용할때 난자의 直徑(150-160 μ)이 크더라도 良好한 結果를 보이고 있어 今後 vitrification solution을 利用한 超急速凍結에서 採卵된 受精卵의 發育段階에 따른 좀 더 깊이 있는 研究의 必要性을 提示해 주고 있다. 그리고 돼지와 家兎의 卵胞卵이 牛의 成績보다 떨어진것은 家兎는 卵子周圍에 mucin層이 있고, 돼지의 卵子는 脂肪이 많이 함유되어 있어 凍結이 어렵다고 보고한 것으로서 Bank 등(1974)보다 높은 生存率을 보였으며, 앞으로 이에 관한 추가 實驗이 要望된다.

그러므로 本 實驗은 새로운 vitrification과정을 室溫에서 간단한 방법으로 遂行할수있고, 凍結方法이 예비동결없이 常溫에서 超急速으로 직접 液體 窒素에 침지하여 凍結시키는데 意義가 있었으며, 특히 mouse는 물론 그외 卵子에서 크기가 큰 大家畜 受精卵의 凍結 可能性을 提示해 주었다.



摘 要

本 研究는 過排卵 處理 호르몬인 PMSG, FSH處理가 肉牛의 卵巢反應에 미치는 影響과 緩慢, 急速凍結 및 超急速 凍結(vitrification)이 採取卵 (morulae)과 난포난(ovarian oocytes)의 생존율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 實行되었다. 總 15頭의 肉牛를 3 처리구(2500IU ; 3000IU, 40mg FSH)로 분류하여 PMSG 또는 FSH 처리후 PGF₂α 30mg으로 발정을 유도하였다. 採卵된 受精卵은 10% glycerol + 10% sucrose凍結液에서 緩慢과 急速凍結方法으로 卵胞卵은 20% glycerol + 10% ethylenglycerol + 30% Ficoll + 10% sucrose 로 조성된 vitrification solution에서 超急速凍結로 동결하여 저장 한후 FDA-test를 이용하여 生存率을 判定하였다.

要約된 結果는 다음과 같다.

1. PMSG와 FSH處理區에서 2500IU, 3000IU PMSG와 FSH 40mg 을 투여한후 發情이 發現되는 時間은 각각 32.8, 35.0, 43.4시간째 發情徵候를 보였으며, 發情持續時間은 각각 18.6, 18.8, 22.4 시간이었다.

2. 2500IU와 3000IU PMSG , FSH 40mg 처리구에서의 卵巢크기는 좌측난소가 각각 5.4, 5.1, 6.4cm으로서 有意性이 없었으나, 우측난소에서는 6.2, 5.7, 7.8cm로서 有意性이 있었다(P<0.05).

3. 2500IU, 3000IU PMSG 및 FSH 40mg처리구에서의 卵胞發育數는 좌측난소에서 4.8, 5.2, 5.6개로 有意性이 없었으나, 우측난소에서는 5.6, 6.2, 7.8개로 有意性이 있었다(P<0.05).

4. 2500IU, 3000IU PMSG, FSH 40mg처리구에서의 排卵數는 좌측난소에서 3.0, 3.2, 4.4개로 有意性이 없었으며, 우측난소에서 7.2, 7.8, 11.4개로 有意性이 있었다($P < 0.05$).

5. 2500IU, 3000IU PMSG, FSH 40mg처리구에서 채란된 정상난자수는 20, 19, 25개이었으며, 未受精卵과 退行卵은 각각 6, 5, 11개었다. PMSG 2500IU, 3000IU, FSH 40mg처리구에서 過排卵處理後 發情發現日數는 각각 52.4, 69.8, 62.4일로 PMSG 2500IU 처리구가 가장 좋은 것으로 나타났다.

6. 緩慢凍結과 急速凍結을 이용하여 10% glycerol + 10% sucrose 凍結液에 受精卵을 凍結한 後 FDA-test를 이용하여 生存率을 判定하였을때 FDA-score는 각각 3.1(62%)와 1.2(24%)로서 緩慢凍結에서 더 높은 成績을 얻었으며, 20% glycerol + 10% ethylenglycol + 30% Ficoll + 10% sucrose 로 造成된 vitrification solution(VS)에서 소, 돼지 및 토끼의 卵胞卵을 超急速 凍結한 後의 生存率은 돼지(3.5)와 토끼(3.1)보다 소(4.1)에서 더 높은 것으로 나타났다.

參考文獻

1. Bielanski, A.V., V.P. Schneider and R. J. Maoletoft. 1986. Factors affecting survival of deep frozen bovine embryos in vitro : The effect of freezing container and method of removing cryoprotectant. *Theriogenology*, 25:429-437.
2. Bilton, R.J. and Moore, N.W. 1977. Successful transport of frozen cattle embryos from New Zealand to Australia. *J. Reprod. Fert.*, 50,363.
3. Bouyssou, B. and D. Chupin. 1982. Two-step freezing of cattle blastocysts in french-straws. *Theriogenology* 17(1):80(Abstr).
4. Brackett, B. G., Bousquet, M. L. Boice, W. J. Donawick, J. F. Evans and M. A. Dressel. 1982. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* 27:147-158.
5. Bugrov, A.D. and N.A. Nevinny, 1990. Embryo transfer at a large dairy farm. *Zootehniya.*, No.5, 67-69.
6. Fahy, G. H., D. R. MacFarlane, C. A. Angell, H.T. Meryman, 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21:407-426.

7. Frank, G. C., S. L. Coley, B. Betterbed and R. D. Page. 1986. The effect of freezer type, cryoprotectant and processing methods on viability of frozen embryos. *Theriogenology*, 26:134-144.
8. Gavrikov, A., A. Alekseenko and TS. Maslev, 1989. The effectiveness of various for freezing and thawing embryos. *Zootekhnika*. No.7, 54-55.
9. Greve, T., H. Lehn-Jensen and N.O. Rasbech. 1979. Morphological evaluation of bovine embryos recovered non-surgically from superovulation dairy cows on days 6 1/2, 7 1/2: A field study. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* 19(5):1599-1611.
10. Hafez, E.S.E., T. Sugie and W.L. Hunt. 1963. Superovulation and related phenomena in the beef cow. II. Effect of oestrogen administration on production of ova. *J. Reprod. Fert.*, 5:381-388.
11. Hill, J.R., J.F. Dickey and D.M. Henricks. 1973. Estrus and ovulation in PGF₂α Alpha/PMS treated heifers. *J. Anim. Sci* 37:315(Abstr).
12. 정길생. 이훈택. 정병현. 유승환. 라진수. 1983a. 수정란 이식에 의한 소의 쌍태유기에 관한 연구. (1) : 성선자극 호르몬의 투여에 대한 난소반응에 미치는 요인. *한축지*, 25:205-209.

13. 정길생, 윤종삼, 이훈택, 유승환, 김정익. 1983b. 수정난이식에 의한 소의 쌍태유기에 관한 연구. (4) : 비외과적으로 이식한 신선 및 동결 수정난의 분만성적. 한축지, 24:425-429.
14. 정구민. 1990. 소와 생쥐 초기난자의 체외 발생 능력과 초급속 동결에 영향하는 생리적, 물리적 요인에 관한 연구. 서울대학교 박사학위 논문.
15. 강만종, 김영훈, 문성호, 김중계. 1989a. Mouse 수정란의 급속동결에 관한 연구: 제 I 보 내동계 농도가 mouse 수정란 급속동결시 생존율에 미치는 영향. 한국가축번식학회보, 13(3) : 134-140.
16. 강만종, 김영훈, 문성호, 김중계. 1989b. Mouse 수정란의 급속동결에 관한 연구: 제 II 보 Mouse 수정란 급속동결에 있어서 수정란의 발육단계와 식빙(seeding)이 생존율에 미치는 영향. 한국가축번식학회보, 13(3):141-148.
17. Kang, M. S., S. H. Sohn and M. Kasai, 1991. Vitrification of mouse morulae. Korean J. Anim. Reprod., 15(3):173-177.
18. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani, 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. J. Reprod. Fert., 59:51-56.
19. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani, 1982. Survival of rat embryos after freezing. J. Reprod. Fert., 66:367-370.



20. Kasai, M., J. H. Komi, A. Takakamo, H. Tsudera, T. Sakurai and T. Machida, 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J. Reprod. Fert.*, 89:91-97.
21. 김중계.이규훈.강만종.김영훈.문성호.김승호. 1988. 육우 수정란 간이 동결 및 동결방법에 관한 연구: 제6보 내동제에 Sucrose 첨가에 따른 액체질소 container에서 제 동결방법의 Mouse 수정란 생존율에 미치는 영향. *한국가축번식학회보*, 12(2):77-83.
22. 김희석.오성종.양보석.이근상.유승환.김종국. 1986. 소에 있어서 이식 수정란의 생존성에 영향을 미치는 요인에 관한 연구. *한축지*, 28(9):578-583.
23. 김상근.이봉구.이규승. 1991. 소 체외수정란의 초급속동결에 관한 연구: I. 소 체외수정란의 완만 및 초급속동결 용해후의 생존성에 관한 연구. *한국가축번식학회보*, 15(2):133-139.
24. Kono, T. and Y. Tsunoda, 1987. Frozen storage of mouse embryos by vitrification. *Japan. J. Anim. Reprod.*, 33:77-81.
25. 이정호.박향균.조민희.1986. 수정란 이식에 있어서 수란우와 수정란의 상호작용이 수태율에 미치는 영향. *한국수정란이식연구회지*.(1):76-80.
26. Leibo, S. P. 1983. A one-step in situ dilution method for frozen-thawed bovine embryos. *cryo-Letters*, 4:387-400.

27. Leibo, S. P. and P. Mazur, 1978. Preservation of mammalian embryos by freezing. Academic Press, New York:179-197.
28. Leibo, S. P., and Mazur, P., 1978. Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. In Methods in Mammalian Reproduction. 179-201.
29. Leibo, S. P., P. Mazur and S. C. Jackowski, 1974. Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. Exptl. Cell. Res., 89:79-88.
30. Lubbadah, W.F., C. N. Graves and S. L. Spahr. 1980. Effect of repeated superovulation on ovulatory response of dairy cows. J. Anim. Sci. 50(1):124-127.
31. Massip, A., P. Van der Zwalm, F. Puissant, M. Camus and F. Leroy, 1984. Effects of in vitro fertilization, culture, freezing and transfer on the ability of mouse embryos to implant and survive. J. Reprod. Fert., 71:199-204.
32. Mazur, R. R. 1977. Slow freezing injury in mammalian embryos : In the freezing of mammals embryos (Elliott k & Whelan eds) Ciba Fndn symp. No.52. 19, Elsevier/North Holland Amsterdam.
33. Monniaux, D., D. Chupin and J. Saumande. 1983. Superovulated

responses in cattle. *Theriogenology.*, 19(1):55-81.

34. Mutter, L.R., A.P. Graden and D. Olds. 1964. Successful non-surgical bovine embryo transfer. *A.I. Digest.* 12:3.
35. Nakagata, N. 1989. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J. Reprod. Fert.*, 87:479 - 483.
36. 남상헌. 양부근. 성홍룡. 고광두. 김정우. 1985. 우 수정란의 동결 보존에 관한 연구: I. 성선 자극호르몬과 $PGF_2\alpha$ 의 투여에 따른 난소 반응. *한국가축번식학회보*, 9(1):31-35.
37. Rall, W. F. and G. M. Fahy, 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 by vitrification. *Nature Vol.* 313:573-575.
38. Rowson, L.E.A., R.M. Moor and R.A.S. Lawson. 1969. Fertility following egg transfer in the cow. *J. Reprod. Fert.*, 18:517-523.
39. Schilling. E. and H. H. Dopke., 1978. A rapid diagnostic test for the viability of early cattle and rabbit embryos using diacetyl-fluorescein. *Naturwissenschaften.* 65:658-659.
40. Schilling. E., H. Niemann. and D. Smidt., 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. In *Vitro Fertilization and Embryo Transfer.* 349-355.

41. 석호봉. 이광원. 오성종. 윤충근. 김호중. 조윤희. 오대균. 지설하. 임경순 & G. D. Mahon, 1984. 소의 동결수정란이 수태에 미치는 영향. (3) ; 5 단계부유에 의한 glycerol 제거란의 외과적 이식의 영향. 한축지. 26 (5):429-434.
42. Sreenan, J.M. and D. Beehan. 1976. Method of induction of superovulation in the cow and transfer results. In "Egg transfer in cattle"(L.E.A. Rowson, ed, Commission for the European Communities, Luxemburg, EUR 5491.19-34.
43. Szell, A. and J. N. Shelton, 1986b. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. J. Reprod. Fert., 78:699-703.
44. Szell, A. and J. N. Shelton, 1987. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol - sucrose solutions Day - 3 mouse embryos. J. Reprod. Fert., 80:309-316.
45. Tervit, H.R., L.E.A. Rowson and A.Brand. 1973. Synchronization of oestrus in cattle using & PGF₂α analogue(ICI 79939). J. Reprod.Fert., 34:179-181.
46. Trounson, A. O., A. Brand and M. H. Aarats, 1978. Non-surgical transfer of deep-frozen bovine embryos. Theriogenology., 10:111-115

-
47. Whittingham, D. G., 1975. Survival of rat embryos after freezing and thawing. *J. Reprod. Fert.*, 47:269-274.
48. Willet, E.L. 1951. Successful transplatation of a fertilized bovine Ovum. *Science* 113, 247.
49. Wilmut, U., 1972. The effects of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sci.*, 11:1071-1079.
50. Wittingham, D. G, M. J. Wood, E. Telfer and R. G. Gosden. 1990. Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *J.Repod. Fert*, 321-327.
51. Willadsen, S. M., H. Len-Jensen, C. G. Fehilly and R. Newcomb. 1981. The production of monozygotic twins of preselected perentage by micromanipulation of non-surgically collected cow embryos. *Theriogenology*. 15:23-29.
52. Williams, T. J. and S. E. Johnson, 1985. Quick-Freezing of day four mouse embryos. *Theriogenology*, 23 : 235.
53. Wilmut, I and L. E. A. Rowson. 1973. Experiments of the low temperature preservation of cow embryos. *Vet.Rec.* 92:686-690.

-
54. Wubishet, A.C.N. Greaves, S.L. Spahr, D.J. Kesler and Favero. 1986. Effects of GnRH treatment on superovulatory responses of dairy cows. *Theriogenology* 25:423-427.
55. Yadav, M. C., K. E. Leslie and J. S. Walton. 1985. The onset and duration of ovulation in superovulated beef heifers. *Theriogenology* 23(1):237. Abstr.



謝 辭

본 논문이 완성되기까지 많은 성원과 배려를 하여 주신 많은 분들께 이 글을 빌어 심심한 감사롤 드립니다.

대학원에서 자상하게 보살펴 주시고 부족함이 없도록 많은 심혈을 기울여 주신 김중계 박사님께 진심으로 감사롤 드립니다. 아울러 바쁘신 가운데도 좋은 논문이 되도록 심사하여 주신 이현종 박사님, 양영훈 박사님을 비롯한 축산학과 여러 교수님들께 감사롤 드립니다.

또한 실험수행에 많은 도움을 주신 제주 시험장 강태홍 장장님, 김희석 박사님, 김동철 박사님, 이희석 연구사님, 오운용 연구사님과 가축번식학 실험실 고경래, 양병철, 고혁진 학형에게 진심으로 감사드립니다.

제주전문대학 축산학과 양승주 교수님, 장덕지 교수님, 오성환 교수님, 이병훈 교수님 그리고 홀스틴 동우회 송정은 회장님, 김원석 총무님, 회원분들과 농원목장 이성철님, 동인목장 정동휴님, 제영목장 홍창운님, 흥미목장 조홍수님, 삼돌목장 송병호님, 동일목장 이태협님께 감사한 마음을 드립니다.

그리고 어려운 여건속에서도 지원과 사랑을 아끼지 않으신 어머님께 이 기쁨을 드리오며, 사랑하는 해현엄마에게 이 작은 기쁨을 함께 하고자 합니다.