



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

한우 체외 수정란 발육 및  
초자화 동결시  $\alpha$ -Tocopherol  
첨가효과에 대한 研究

濟州大學校 大學院

動物資源科學科

鄭 眞 羽

2011年 2月

# 한우 체외 수정란 발육 및 초자화 동결시 $\alpha$ -Tocopherol 첨가효과에 대한 研究

指導教授 康 珉 秀

鄭 眞 羽

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2011년 2월

鄭眞羽의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_\_ (甲)

委 員 \_\_\_\_\_ (甲)

委 員 \_\_\_\_\_ (甲)

濟州大學校 大學院

2011年 2月

**EFFECT OF  $\alpha$ -TOCOPHEROL ON THE  
DEVELOPMENT AND VITRIFICATION OF  
HANWOO IVM/IVF EMBRYOS**

**Jin-Woo Jung**

**(Supervised by professor Min-Soo Kang)**

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

2011. 2.

THIS THESIS HAS BEEN EXAMINED AND APPROVED

DEPARTMENT OF ANIMAL BIOTECHNOLOGY

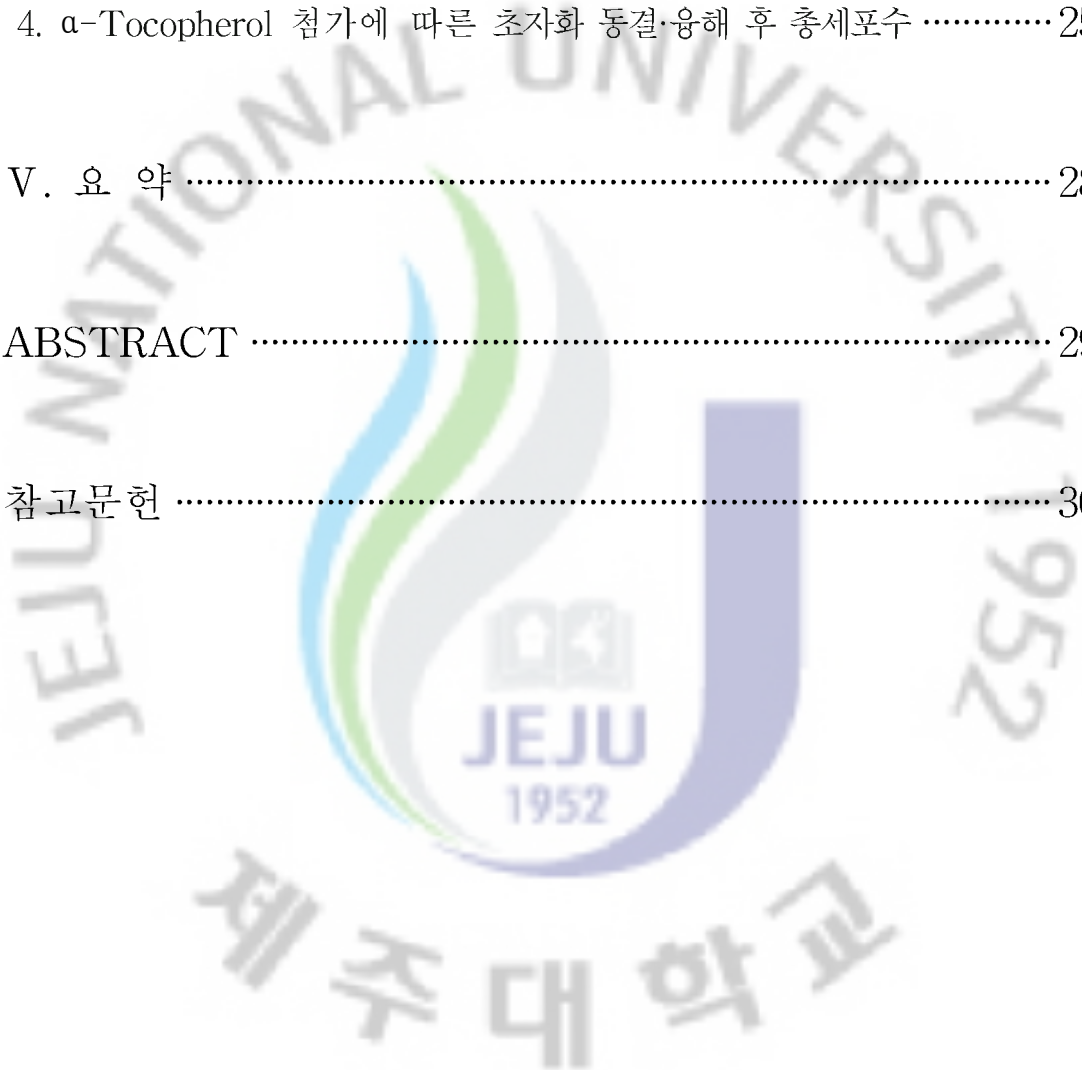
GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

# 목 차

I. 서 론 .....	1
II. 연구사 .....	4
III. 재료 및 방법 .....	11
1. $\alpha$ -Tocopherol 첨가에 의한 체외수정란 생산 .....	11
1) 난포란의 채취 .....	11
2) 난포란의 체외성숙 .....	11
3) 난포란의 체외수정 .....	12
4) 체외 수정란의 체외배양 .....	12
5) $\alpha$ -Tocopherol 첨가 배양 .....	13
2. 초자화 동결 및 융해 .....	14
1) 수정란의 초자화 동결 .....	14
2) 동결된 수정란의 융해 .....	14
3. 동결 전·후 체외 수정란의 세포수 조사 .....	15
4. 통계분석 .....	16

IV. 결과 및 고찰 .....	17
1. $\alpha$ -Tocopherol 첨가에 따른 분할율 .....	17
2. $\alpha$ -Tocopherol 첨가에 따른 배반포 발달율 .....	21
3. $\alpha$ -Tocopherol 첨가에 따른 총 세포수 .....	23
4. $\alpha$ -Tocopherol 첨가에 따른 초자화 동결·융해 후 총세포수 .....	25
V. 요약 .....	28
ABSTRACT .....	29
참고문헌 .....	30



## I. 서 론

가축 즉, 경제동물에서 번식의 궁극적인 목적은 가축의 양적, 질적 증식과 가축 개량을 위한 수단으로서 오래전부터 가축의 우수한 경제형질 발현빈도를 증가시키기 위해 선발 및 교배법이 이용되었다. 우수한 경제 형질을 가지고 있는 가축을 선발하여 후대에게 계획 교배함으로써 유전적으로 보다 우수한 형질의 가축이 생산되도록 하여 축산업의 생산성을 향상시키는 것은 물론 국내 축산업의 국제 경쟁력 확보와 농가의 소득 증대에 기여할 수 있어 그 중요성이 매우 크다. 가축의 생산성을 향상시키는 대표적인 방법으로 인공수정이 있다. 동물에 대한 인공수정은 1780년 이탈리아의 생물학자 Spallanzani가 개에서 채취한 정액으로 30마리의 암캐에 주입하여 18마리를 수태시킨 일이 시초가 되었으나 현재 사용되고 있는 인공수정은 1907년 러시아의 Ivanov에 의하여 정액의 채취, 보존 및 주입 등에 관한 연구를 수행하고 확립하여 여러 동물의 인공수정에 성공하였다(고 등, 2003). 그러나 인공수정은 우수한 모계의 유전인자를 다수의 후대에게 단기간 내에 전달할 수 없는 한계를 가지고 있으므로 모계의 우수형질에 대한 개량효과가 적은 것이 단점이다.

소 역시 오래전부터 개체 개량을 위하여 인공수정을 실시하여 왔으나, 이는 형질이 우수한 종모축에 대한 개량에는 그 한계성이 있다(Ruane, 1988; Sreenan, 1988). 최근에는 인공수정의 단점을 보완하는 기술로 수정란 이식(embryo transfer)에 관련된 연구가 많이 진행되고 있다. 수정란 이식은 우수한 유전형질을 가진 종빈축으로부터 다수의 수정란을 회수하여 이를 동일품종 또는 타품종의 개체에 이식하여 자축을 생산함으로써 종빈축의 번식효율 향상과 유전형질이 동일한 다수의 자손을 단기간에 증식이 가능하므로 선발강도를 높일 수 있고, 후보종빈축의 후대검정을 효과적으로 수행하는 것이 가능하여 가축의 개량에 매우 유용한 방법이다(Simth, 1984; Gibson과 Smith, 1986; Christensen, 1991; Lohuis, 1997; 원, 1999). 보다 빠른 가축 개량 및 우수형질 보존이 가능한 수정란을 이용한 최신 생명공학기법으로 우수한 형질을 가진 수정란을 생산하여 이용함으로써 새로운 번식과 육종기술의 개발이 가능하게 되었다(Sturman 등, 2000).

기존의 후대검정으로는 유전적 능력이 확인될 때까지 최소한 7~8년의 기간이 필요하였지만, 수정란이식 기법으로 전형제우를 생산하여 형제검정법을 도입하면 2~3년이 단축되어 결과적으로 가축의 증식과 개량을 촉진시킬 수 있다. 또한 체외수정을 통한 수정란이식 기술을 토대로 급속히 발전하고 있는 유전공학 기법에 의한 복제동물, 형질전환 동물과 인체 대체장기 생산을 위해서도 우량한 수정란을 생산함으로써 번식기술과 육종기술의 개선 뿐 만 아니라 인간의 질병 치료에도 많은 공헌을 하게 되었다(Forsberg, 2005; Wang와 Zhou, 2003).

포유동물의 수정란 체외배양 시 수정란의 발육에 영향을 미치는 요인으로는 온도, 가스조건, 배양액의 성분 및 배양액에 첨가되는 호르몬 및 여러 종류의 단백질 등 보고되었다(Nakao와 Nakatsuji, 1990; Thibodeaux 등, 1993). 체외발육 억제 현상의 원인은 아직 명확하게 규명되어 있지는 않지만, 초기 배 수정란에서 체외배양시 산소를 함유한 활성산소(free radical)가 다량 생성되어 발생하는 산화적 스트레스 및 일산화 질소(nitric oxide)와 같은 독성을 제공하는 요소들에 의해서 일어난다고 보고하였다(Corsby 등, 1988; Joenje, 1989). 또한, 미성숙 난자와 수정란의 체외발달 중 유발되는 산화스트레스는 미토콘드리아의 호흡작용 억제와 DNA 손상을 초래하여 난자의 성숙 및 체외발달의 저해 요인으로 작용된다. 그리고 수정란의 세포막 지질의 과잉 산화, 효소 불활성화, RNA의 손상 및 생체내 지질과 단백질 등 주요 물질의 변성과 파괴의 원인으로 알려진 활성산소는 특정한 발육 단계에서 체외수정란의 발육을 억제하는 요인으로 보고되고 있으며(Jones, 1985; Bize 등, 1991; Miyazake 등, 1991), 이러한 활성 산소를 제거하기 위한 방법으로서 체외배양액 내에  $\alpha$ -tocopherol, glutathione,  $\beta$ -carotene, catalase, taurin 등과 같은 항산화제를 첨가하여 체외배양의 조건을 개선시키는 연구가 활발히 진행되고 있다(Saikhunal 등, 2008; Thiyagarajan와 Valivittan, 2009; Marques 등, 2010).

동결보존이란 세포를 동결상태에서 장기간 보존하는 것을 의미하는데 가축번식 분야에서는 정액, 수정란 그리고 체세포 등을 액체질소에서 동결보존함으로써 그 보존기간이 반영구적으로 가능하게 되었으며, 소에 있어서 우수한 형질의 수정란 동결보존은 가축 선발과 계통보존 그리고 희소성 및 멸실 위험이 있는 가축 유전 자원을 보존 할 수 있는 장점을 지니고 있다.



수정란을 실온이나 저온에서 보존하면 생존과 수태율이 급격히 저하되기 때문에 액체질소를 이용한 동결보존이 최선의 방법이다(Voelkel과 Hu, 1992; Kuwayama 1995; Carvalho 등, 1996). 그러나, 현재까지의 기술로는 신선 수정란에 비하여 동결 보존된 수정란의 생존성과 수태율이 낮은 실정이나 생존성과 수태율 높이기 위한 다각적인 연구가 진행되고 있다.

본 연구는 한우의 난포란 제외성숙시 항산화제인  $\alpha$ -tocopherol을 첨가하였을 때 제외배양과 수정란의 동결보존 및 융해시 제외발육에 미치는 효과를 비교 조사하고자 실시하였다.



## II. 연구사

### 1. 활성산소(Reactive Oxygen Species, ROS)

세포는 대사과정에서 생성되는 전자(electronic)를 전자수용체인 산소분자에 물을 생성하며 이 때 생성되는 에너지를 이용한다. 그러나 산소가 완전 환원되어 물만 생성된다면 문제가 없지만 산소분자는 전자각에서의 전자배열의 특수성 때문에 부분환원 또는 전자각에서의 전자의 재배치 등으로 반응성이 높은 산소화합물로 변화되는데 이들을 통칭하여 활성산소(Reactive Oxygen Species, ROS), 유해산소(toxicoxygenes) 혹은 산소라디칼(oxyges radicals)이라고 일컫는데 이들은 모두 반응성이 높은 특징을 가지고 있다. 활성산소 대사물에 의하여 세포에 산화적 스트레스가 가해지면 세포막 지방질을 과산화시키고 세포막투과성의 변화를 초래하거나 DNA 손상을 유발시킨다(Ames 등, 1993; Fruehauf 등, 2007). 이러한 활성산소 대사물을 제거하기 위해 세포내의 항산화 효소계와 비효소적 항산화 물질은 활성산소에 의한 산화적 손상으로부터 세포를 보호한다. 항산화 효소계인 glutathion peroxidase(GP), glutathion reductase(GR), superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT)등은 자유라디칼을 제거시켜 생체를 보호하며(Ji, 1993), 비효소적 항산화 화합물인 비타민 C와 E, caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic 등의 페놀화합물, catechine 등의 탄닌류, quercetin, kampferol 등의 플라보노이드류, 카로티노이드류 등과 같은 물질들이 활성산소 대사물의 생성과 제거 사이에 균형을 갖추어 세포 기능을 유지하고 있다(Polidon 등, 2001). 산화적 스트레스 증가는 세포의 항상성 상실을 가져와 노화를 비롯하여 암, 동맥경화증, 당뇨병 등 많은 질환들을 초래하는 것으로 알려져 있다(Willcox 등, 2004). 또한 활성산소는 정자에 있어서 원형질막의 지방과산화(lipid peroxidation)를 초래하여 정자의 운동성, 수정능력획득 및 침체반응을 억제시키며(Mammoto 등, 1996) 미성숙난자 및 수정란의 체외배양시에는 미토콘드리아의 호흡작용억제, 세포막의 유동성 감소, 효소의 불활성화 및 DNA의 손상을 초래하여 그 이용성을 감소시킨다(Corsby와 Gandolfi, 1988).

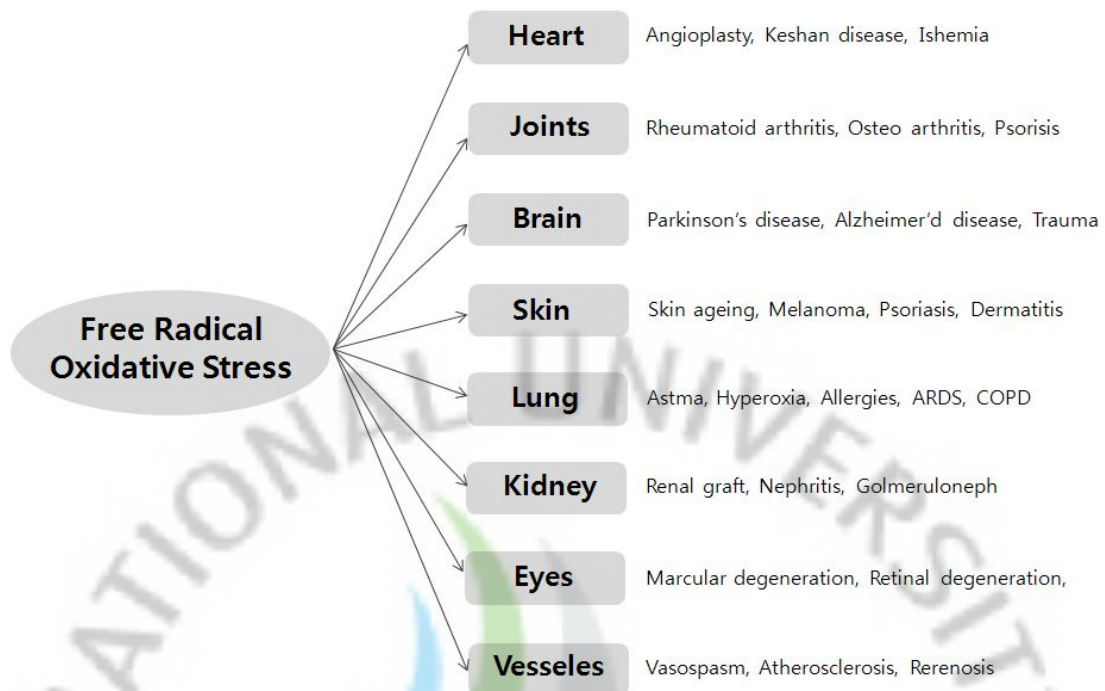


Fig 1. Diagram of diversity free radical oxidative stress in celluer.

## 2. 항산화제

세포 내에는 산소화합물에 의한 산화적 스트레스로부터 조직을 보호하기 위해 항산화 비타민, 무기질, 효소 등의 항산화 체계가 조직적으로 구성되어 있으며, 이들은 상호작용을 통해서 유해환경에 노출되어 생긴 활성산소와 유리기를 보다 반응성이 약한 분자로 변화시키거나 반응을 차단하여 산화적 스트레스의 위험을 감소시킨다(Goldfarb, 1993). Free radical로부터 세포를 보호하는 항산화제는 생체내에서 free radical을 사전에 막는 system I 과 이미 생성된 free radical을 포착하여 제거하는 system II 로 나뉘어지며, system I에는 catalase, glutathione peroxidase, lactoferrin 및 transferine등이 있으며, system II 에는 superoxide dismutase, reduced glutathione, ascorbate, vitamin C 및 vitamin E 등이 존재한다(Fridovich, 1993; Tappel, 1973).

세포의 체외배양시 세포내의 과산화물은 세포에 독성물질로 작용하는데 이러한 과산화물( $H_2O_2$ )을 환원시켜 세포의 독성 제거를 위해 항산화물질이 필요하다. 체내에서와는 대조적으로 체외에서는 항산화제가 배양액 내에 존재하지 않을 경우

세포의 성장을 억제한다(Murray 등, 1990). 활성산소 생성과 방어계에 의한 제거 사이의 불균형 및 미세한 시간차에 의해 반응성이 큰 활성 산소들이 생체내 물질들의 손상을 유도할 수도 있으나, 최근 항산화 비타민의 유익한 작용들이 여러 연구자들에 의해 밝혀지고 있다(Machlin 와 Bendich, 1987; Schmidt, 1991; Yeum 등, 1992).

소 체외수정란의 체외발육을 통한 생존성을 향상시킬 목적으로 배양액내에 생성되는 free radical을 제거하기 위하여, 최근에는 배양액내에  $\beta$ -mercaptoethanol, cysteamine 등과 같은 thiol 화합물의 첨가 및 catalase, glutathione 및 superoxide dismutase(SOD) 및 taurine과 같이 다양한 항산화제를 첨가한 결과 체외발육에 좋은 효과가 있는 것으로 보고되었다(Ealy 등, 1992; Arechiga 등, 1995).



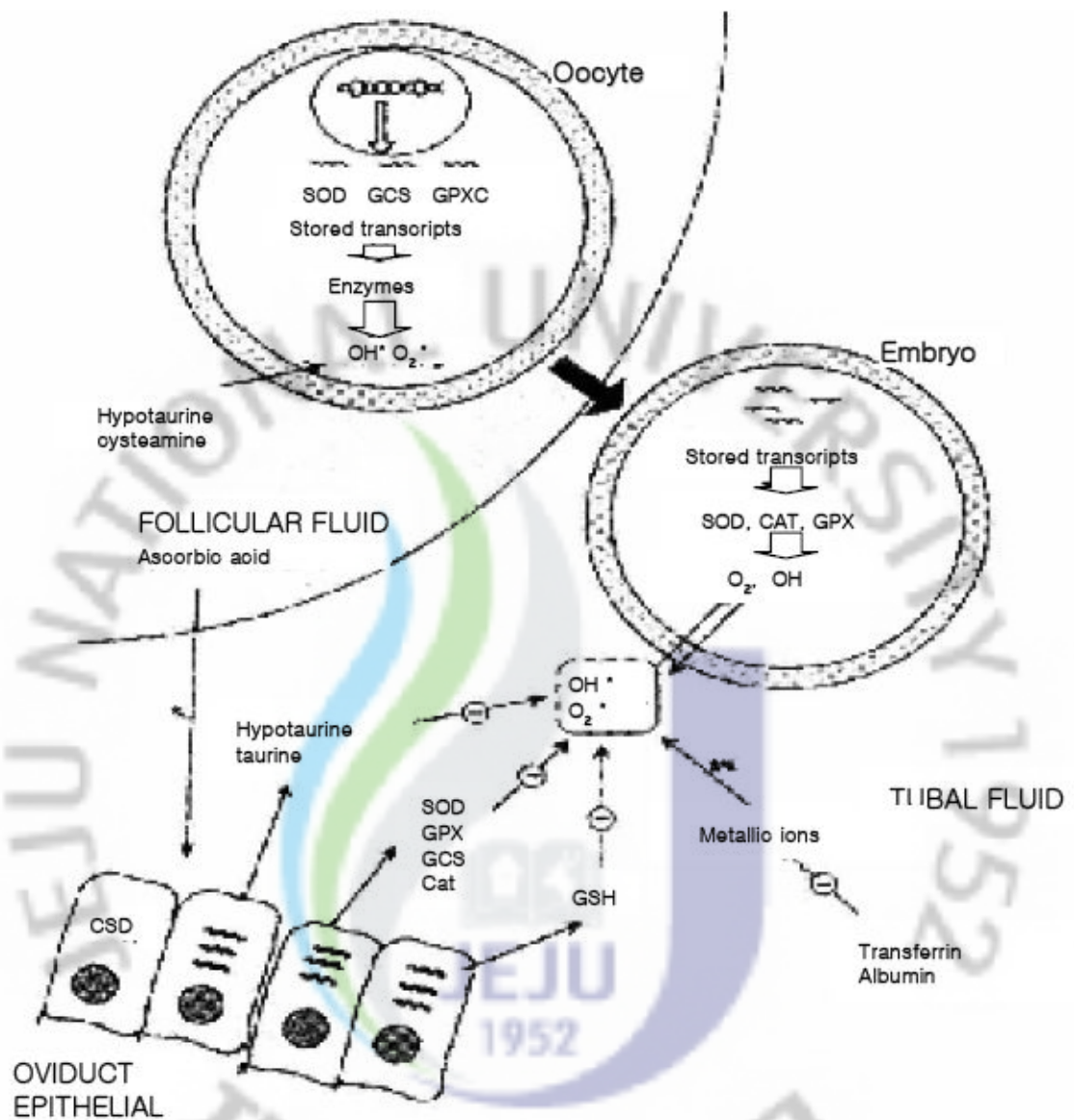


Fig 2. Schematic representation of some complementary antioxidant protections for oocytes and embryos (Kong, 2006)

### 3. 체외수정란 생산(*In vitro* Production, IVP)

포유동물 체외수정란의 생산은 체내에서의 수정 기작을 구명하는 연구에 필수적이며, 수정란이식과 핵이식을 통한 복제동물의 생산 등의 기술을 이용한 가축번식 분야의 첨단 기술을 연구하기 위해서는 우선적으로 다수의 수정란을 확보하는 것이 필요하다. 발생공학의 기본 재료가 되는 수정란 확보는 가축의 난소내에 다량 존재하는 미성숙 난포란을 채취하여 체외에서 성숙배양하여 수정시키는 방법인데, 보다 효과적인 체외 배양체계를 확립하면 다량의 수정란의 확보가 가능해지며, 가축번식 연구에 유용하게 사용된다. 포유동물의 난소에는 출생시에 수십만 개의 원시 난자를 가지고 있으나, 일생동안 극히 일부분만이 성숙난자로 성숙되어 번식에 이용될 뿐이고 대부분의 난자는 성숙하지 못하거나 일정단계까지 성숙이 진행된 후 퇴화하게 된다. 우수한 경제 형질을 보유하고 있는 암소를 도축 후 폐기되는 난소로부터 미성숙 난포란을 채취하여 체외성숙과 체외수정 및 체외배양 등의 일련의 과정을 거쳐 생산된 수정란으로부터 송아지를 생산 할 수 있게 되었고, 더 나아가 쌍자생산, 핵이식에 의한 복제동물 및 유전자 전이에 의한 형질전환 동물 생산 등에 대한 연구와 기술개발에 크게 기여 하였다. 그러나 수정란 이식에 의한 산자의 생산 효율은 극히 저조하며, 특히 체외 수정란의 이식에 의한 산자 생산율은 20% 이하로서 그 성공이 극히 저조하다고 보고되었다(Hasler, 2003).

Pincus와 Enzmann(1935)은 토끼에서 제 1차 난모세포를 난포로부터 유리시키면 자발적인 감수분열이 일어난다고 보고하였으며 그 후 Edwards(1962)는 여러 동물의 난포로 유래된 난자의 성숙을 보고하였다. 과거에는 체외수정을 위하여 체내에서 성숙 배란된 난자를 이용하였으나 1980년 중반 이후에는 체외성숙 난자를 이용하여 수정란을 생산하였다. Austin과 Chang(1951)은 체외수정에 관한 연구를 하던 중 토끼 정자는 자궁내에서 수정능을 획득한다는 사실을 발견하였다. Austin 과 Chang(1959)은 교미 12 시간 후에 자궁으로부터 회수한 정자를 이용하여 최초로 토끼에서 체외수정에 의해 산자를 생산하는데 성공했다. 한편, Whittingham (1968)은 생쥐의 자궁에서 회수한 정자를 이용하여 체외수정에 성공 하였다.

#### 4. 초자화 동결(Vitrification)

소에 있어서 체외수정란 생산을 이용한 동결보존 기술은 배양체계의 개선으로 내동성이 향상되었으나 아직도 더 많은 연구가 필요하다. 아직 완벽한 방법으로 개선된 것은 아니지만 최근의 동결보존기술인 급속 동결이 급속도로 발전하고 있다. 급속동결인 유리화 동결과정에서는 배양액, 동해방지제, 평형시간 그리고 회석과정에 초점을 두고 개선하고 있고, 유리화 동결은 냉각에 의한 세포의 손상을 줄일 수 있는 장점이 있다. 최근 연구되어지고 있는 유리화 동결방법으로서는 직접 난자를 액체질소에 넣는 미소적(microdropping), 그리드(grid), 루프(Cryo-Loop)를 이용한 방법 그리고 OPS(Open Pull Straw) 방법들이 이러한 노력들의 일환으로 시도되고 있다.

Martino 등(1996)과 Arav와 Zeron(1997)은 스트로를 이용하지 않고 전자 현미경용 그리드(Grid)를 이용하여 소의 난자를 동결하였다. 이 방법은 고농도의 동해방지제를 이용하는 것으로 유리화 동결법과 비슷하나 난자가 들어있는 동결액을 그리드 위에 놓고 액체질소에 직접 침지하거나 액체질소 증기에 넣는 방법이 다르다. Arav와 Zeron(1997)은 소의 난자를 동결 융해하였을 때 30%가 발달하였고 15%가 배반포로 발달을 보고하였다. Vanderzwalmen 등(2002)은 사람의 난자를 이용하여 그리드 방법에 미세조작기법을 하였을 때 동결용액에서의 탈수를 용이하게 함으로써 동결·융해 후 생존을 70.6%로 그리드(Grid)방법만을 사용하여 동결·융해한 58.5%보다 높은 생존을 보고하였다. 또 다른 유리화 동결방법은 OPS방법이 있다. 이 방법에서는 0.25ml 스트로를 가열하여 가늘게 늘린 직경이 원래 스트로의 약 반 정도로 되게 만든 스트로의 끝에 난자와 수정란을 모세관 현상(capillary effect)을 이용하여 넣는다. 액체질소에 스트로를 직접 넣어 동결액과 액체질소가 서로 닿도록 하고, 융해 시에는 스트로의 끝을 배양액에 넣어 동결액이 회석되도록 한다. 이 방법을 사용하여 수정 후 2, 3, 4일이 경과된 초기 단계의 소 수정란을 유리화 동결하였을 때 각각 27, 43, 52%가 배반포로 발달하였다(Vajta 등, 1997). 그리고 Hurtt 등(1999)은 OPS 방법으로 말과 소의 난자를 동결 융해하여 체외성숙을 유도하였을 때 각각 81%, 71%의 높은 결과를 얻었다고 보고하였다.

Riha 등(1991)은 체내에서 생산된 수정란을 미세소적(microdrops)을 액체질소에 직접 떨어뜨리는 방법으로 유리화 동결한 후 이식하였을 때 57.8%의 수태을 나타냈다고 보고하였다(Yang and Leibo, 1999).

Papis 등(1999)와 Dinnyes 등(2000)은 microdrop 동결방법이 신선란을 이용하였을 때와 비슷한 배반포 발달을 나타냈다고 보고하였다. 그리고 그리드(Grid), OPS, microdrops 유리화 동결법은 현재 높은 배 발달을 보이지만 그리드방법과 OPS방법은 저장하는데 용이하지 못하다는 단점을 가지고 있고, 동결하는 작업자의 숙련도에 따라 큰 영향을 받는다. microdrop 방법은 아직 소 배반포 동결에서는 보고된 연구결과가 없지만, 저장의 용이성과 작업이 간단하여 동결보호제 노출시간을 최소화 할 수 있다는 장점을 가지고 있다.





### Ⅲ. 재료 및 방법

#### 1. 체외 수정란 생산

##### 1) 난포란의 채취

본 실험에 공시된 난소는 계절별 난포란의 체외성숙 및 체외배양 시  $\alpha$ -tocopherol의 첨가영향을 알아보기 위하여 7월에서 10월까지 도축장에서 적출한 한우의 난소를 사용하였다. 적출된 난소는 antibiotic-antimycotic(GIBCO, USA)를 첨가한 난소 수송용 PBS(Phosphate Buffered Saline)에 25~28℃로 유지하여 3~4 시간 이내에 실험실로 운반 하였다. 실험실로 운반된 난소는 혈액과 이물질을 제거하기 위하여 PBS로 3회 세척하였다. 난포란의 채취는 가시난포의 직경 2~6 mm에서 미성숙 난포란을 18G needle이 부착된 10ml syringe(HSW, Germany)로 흡입하여 채취하였다. 채취된 난포란은 50 ml tube에 담아 5~10분 동안 상온에 정치시키고 상층액을 제거한 후 5% FBS(fetal bovine serum)가 첨가된 TCM-199(Sigma, USA)배양액으로 3회 세척하였다. 최종 침전물은 직경 87 mm Petri dish(SPL, Korea)에 옮겨 40 배의 실체현미경(Olympus Co, Japan)에서 난포란을 회수하여 HEPES가 첨가된 TCM-199 배양액으로 2~3회 세척하였다. 본 실험에 공시한 난포란은 난구세포가 전체적으로 치밀하고 균일하게 부착되어있으며, 세포질이 충실한 것만을 공시하였다.

##### 2) 난포란의 체외성숙

난포란의 체외성숙을 위하여 사용한 기본 배양액은 TCM-199으로 LH(Luteinizing Hormone, Sigma) 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , FSH(Follicle Stimulating Hormone, Sigma) 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 10% FBS(Fetal Bovine Serum, Gibco)를 첨가하여 사용하였다. 난포란 성숙을 위한 배양액은 4-well dish(Nunc, Denmark)에 well 1개당 500  $\mu\text{l}$ 씩 분주하고 pore size 0.2  $\mu\text{m}$  filter로 여과시킨 mineral oil(Sigma, USA) 300  $\mu\text{l}$ 을 도포하여 실험 전까지 CO<sub>2</sub> incubator(5% CO<sub>2</sub>, 95% relative humidity, 38.5℃)에서 평형을 실시하였다. 세척과 선별을 마친 미성숙 난포란을 각 well당 50 개씩 넣고, CO<sub>2</sub> incubator에서 22시간 배양하였고, 난구세포의 팽창 정도와 세포

질의 충실도 등을 형태학적으로 판정하여 체외수정에 공시하였다.

### 3) 난포란의 체외수정

체외수정용 배양액은 IVF100(IFP, Japan)으로 cell culture dish에 10  $\mu\text{l}$ 의 소적을 만들고, mineral oil을 도포한 후 각 소적에 IVF100을 30  $\mu\text{l}$  씩 추가 분주하여 최종 용적이 50  $\mu\text{l}$ 가 되도록 하였다.

체외에서 20~22시간 동안 배양하여 체외성숙을 유도한 후, 난구세포가 균일하게 확장된 성숙난포란을 5% FBS가 첨가된 TCM-199 성숙배양액 내에서 반복 pipetting 방법으로 난구세포의 일부를 제거하고, IVF100 배양액에서 2회 세척하여 성숙배양액과 동일한 방법으로 평형이 완료된 체외수정 소적에 각각 15~20개의 성숙난포란을 옮겨 넣었다.

체외수정에 사용된 정액은 농협중앙회 한우개량사업소에서 구입한 한우동결정액(KPN)를 이용하였다. 정액 용해는 0.5 ml(straw)의 동결정액을 상온에 10초, 37  $^{\circ}\text{C}$ 의 항온수조에서 30초간 용해시켰다. 용해된 정액은 Na caffein-benzoate(5 mM)와 10  $\mu\text{l}/\text{ml}$  heparin이 첨가된 정자 세척용 배양액인 BO medium 5 ml에 혼합, 원심분리기 1500 rpm에서 5분간 원심분리를 실시한 다음 상층액을 제거한 후 IVF100(IFP, Japan) 3 ml로 2회 원심분리를 반복 실시로 동결 보호제 제거 및 정자 두부의 침체반응을 유도시켰다. 체외수정 유도를 위한 정자의 최종농도는  $2.0 \times 10^6/\text{ml}$  되도록 조정하고, 10  $\mu\text{l}$ 의 정자를 소적에 주입하고 최종 용적이 50  $\mu\text{l}$ 가 되게 한 후, 6~7시간 동안 정자와 공동으로  $\text{CO}_2$  incubator 내에서 수정을 실시하였다.

### 4) 수정란의 체외 배양

수정란의 체외배양액은 CR1aa 배양액을 사용하였다(NaCl 108 mM; KCl 3 mM;  $\text{NaHCO}_3$  25 mM; Ca Lactate 0.5 mM; Glutamine 1 mM; Pruvate 0.4 mM, 100 ml). 배양액은 12시간 정도  $\text{CO}_2$  incubator에서 평형을 유도시킨 후, BSA(Bovine Serum Albimin, Sigma), L-glutamine, L-lactate, Pyruvate stock, Gentamycine, BME, MEM을 첨가 용해하고, 0.2  $\mu\text{m}$  filter로 여과하여 CR1aa 배양액을 준비하였다. 준비된 CR1aa 배양액은 4-well dish에 500  $\mu\text{l}$  씩 분주하고 mineral oil 300

$\mu\text{l}$  도포하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 3~4시간 동안 정치 시켜 체외배양액으로 사용하였다.

체외수정된 난포란은 1.5 ml tube에 5% FBS가 첨가된 TCM-199용액을 함께 넣어 반복 pipetting 방법으로 난구세포를 완전히 제거하였다. 난구세포가 제거된 난포란은 CR1aa 배양액으로 옮겨 2회 세척한 후, 4-well dish에 각 well 당 50개씩 넣고, CO<sub>2</sub> · O<sub>2</sub> incubator(5% CO<sub>2</sub> , 5% O<sub>2</sub> , 95% relative humidity, 38.5 °C)에서 48시간 배양을 하였다. 체외수정 44~48시간 후에 정상적으로 분할된 2~8세포기 수정란만을 선별하여 분할율을 확인하였다. 분할이 확인된 수정란은 10% FBS가 첨가된 CR1aa 배양액으로 교체한 후 매 48시간 간격으로 10% FBS가 첨가된 신선한 CR1aa 배양액을 200  $\mu\text{l}$ 씩 교환하였다. 배반포기 수정란 확인은 6~8일간 실시하였고 7~9일째 생산된 배반포 및 확장배반포만 선별하여 실험에 공시하였다.

#### 5) $\alpha$ -Tocopherol 첨가 배양

본 실험에 사용한  $\alpha$ -tocopherol(T-3251, Sigma, USA)은 실험 18~20시간 전에 99.9% ethanol에 용해하여 차광 후 5 °C 이하 냉장보관하여 본 실험에 사용하였다. 체외성숙/체외배양액에 각각  $\alpha$ -tocopherol을 0, 100, 200 and 400  $\mu\text{M}$  농도로 첨가하였다.

##### ① $\alpha$ -Tocopherol 첨가 농도에 따른 체외성숙

준비된  $\alpha$ -tocopherol의 최종 ethanol 농도는 0.05% 이하가 되도록 하였으며 TCM-199 배양액에 100, 200 그리고 400  $\mu\text{M}$ 의 농도가 되도록 첨가하여 앞에서 기술한 체외성숙과 동일한 방법으로 수행하였다.

##### ② $\alpha$ -Tocopherol 첨가 농도에 따른 체외배양

준비된  $\alpha$ -tocopherol의 최종 ethanol 농도는 0.05% 이하가 되도록 하였으며 CR1aa 배양액에 100, 200 그리고 400  $\mu\text{M}$ 의 농도가 되도록 첨가하여 앞에서 기술한 체외배양과 동일한 방법으로 수행하였다.

## 2. 초자화 동결 및 융해

### 1) 수정란의 초자화 동결

수정란의 동결을 위해서 0.25 ml straw (IMV, France)를 사용한 초자화 동결 방법을 이용하였다. 수정란 동결은 초자화 동결(Vitrification, Prentice 등, 2008) 방법을 수정 보완하여, 0.25 ml straw (IMV, France)를 사용하였다. 동결보존액은 CO<sub>2</sub> incubator(5% CO<sub>2</sub> , 95% relative humidity, 38.5°C)에서 평형을 시킨 D-PBS(Sigma, U.S.A)에 Glycine Etyleneglycol(EG) 30%를 용해하여 Vitrification Solution을 제조하여 채외수정 후 7~9일 경과된 확장 배반포기 수정란 중에서 형태학적으로 우수한 수정란만을 선별하여 초자화 동결을 실시하였다. 선별된 수정란은 D-PBS에 1분 동안 침지 하였을 때 변형이 없는 수정란만을 선별하였다. 초자화 동결은 Vitrification Solution에서 수정란을 0.25ml Straw에서 20초 이내에 장전한 다음 액체질소 상단부에서 약 5초 동안 과냉각 후 액체질소 속으로 즉시 침지하여 동결 보존을 실시하였으며, 융해 후 생존성 평가 실험을 위해서 최소 1주일 이상 액체질소(Liquid Nitrogen) 탱크에서 보존을 실시하였다.

### 2) 수정란의 융해

수정란 융해에 사용된 완충액은 TCM-199 배양액에 10% FBS, 0.25 M Sucrose 와 0.15 M Sucrose를 각각 제조하여 4-well dish에 well당 500  $\mu$ l씩 분주하여 실험 전까지 CO<sub>2</sub> incubator에서 6시간 이상 평형을 유도하였다.

수정란의 융해는 동결된 수정란이 들어있는 0.25 ml straw를 실온 공기 중에 5초간 노출 후 37.5°C의 항온수조에 침지하여 10초간 융해시켰다. 융해된 수정란은 0.25 M sucrose 완충액에서 5분간 노출하고 다시 0.15 M sucrose 완충액에서 5분간 평형 및 동결보호제를 제거한 다음, CR1aa 용액에서 3회 세척한 다음 배양용 CR1aa 배양액으로 옮겨 CO<sub>2</sub> incubator에서 12시간 이상 배양을 실시한 후 형태학적으로 이상이 없는 재확장 및 부화된 수정란을 생존한 것으로 평가하였다.

### 3. 동결 전·후 체외수정란의 세포수 조사

수정란의 세포수 조사는 Long 등(1999)의 방법에 준하여 실시하였다. 간단하게 요약하면,  $\alpha$ -tocopherol 100, 200 and 400  $\mu$ M 처리구와  $\alpha$ -tocopherol이 첨가되지 않은 대조구에서 형태학적으로 변형이 없는 7~9일이 경과된 확장배반포와 초자화동결 후 융해시킨 배반포를 Hoechst 33342 stain solution(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 1회 세척하고 250  $\mu$ l에 15 분간 염색하였다. 염색된 세포수 확인을 위하여 346nm 자외선 파장 필터가 장착되어있는 현광현미경(Olympus, Japan)에서 200배 배율로 관찰하였다.

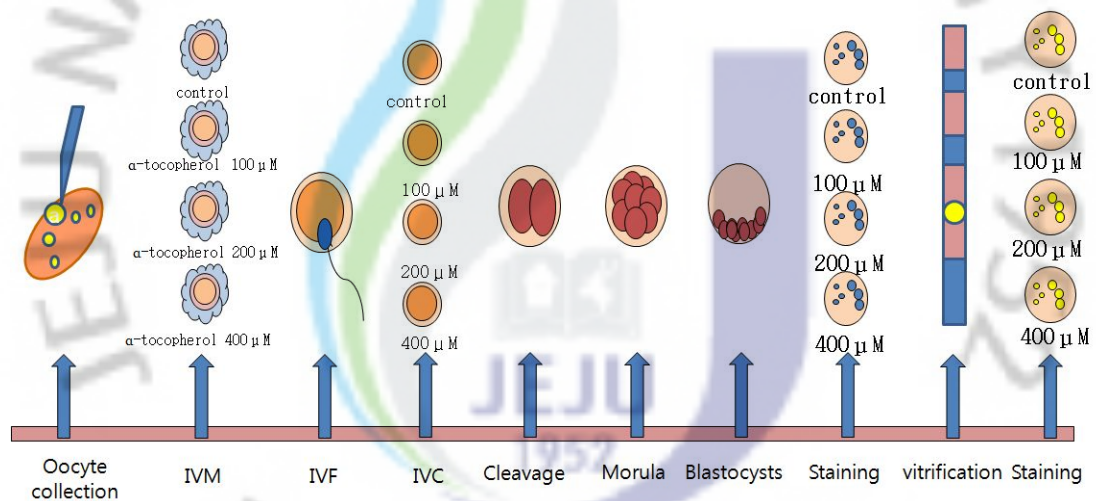


Fig. 3. Schematic diagram : Immature bovine oocytes were matured/fertilized and cleavage/blastocysts ratio observed by fluorescent staining.

#### 4. 통계분석

본 실험에서 얻어진 수정란의 난할, 배반포 발생을 그리고 수정란의 초자화 동결 전·후 세포수에 대한 통계처리는 SPSS(Statistical Package for the Social Sciences) 12.0(Chicago University, 1968) two-way ANOVA(Analysis of variance, R.A. Fisher) Tukey-Kramer Multiple Comparisons test를 적용하여 유의성을 검정하였다.  $p < 0.05$ 일 때 각 처리구간의 유의성을 인정하였고, 평균과 표준편차(Mean  $\pm$  S.D.)를 나타내었다.



## IV. 결과 및 고찰

### 1. $\alpha$ -Tocopherol 첨가에 따른 분할율

본 연구는 한우의 도축 난소유래 난포란을 회수하여 체외에서 성숙과 수정을 실시한 다음, 체외배양 시 항산화제인  $\alpha$ -tocopherol의 첨가배양에 따른 수정란의 발달을 조사 및 동결 융해 후 수정란의 생존성에 미치는 영향을 알아보하고자 실시하였다.

Table 1에서는  $\alpha$ -tocopherol을 체외성숙액에 첨가한 후 각 농도별과 월별 평균 분할율을 비교한 결과는 다음과 같다.

농도별 분할율에서는  $\alpha$ -tocopherol 200  $\mu$ M 처리구가 62.97 $\pm$ 6.86%로서 대조구 및 다른 처리구(0  $\mu$ M, 56.14 $\pm$ 5.66%; 100  $\mu$ M, 58.18 $\pm$ 8.00%; 400  $\mu$ M, 51.17 $\pm$ 7.28%)보다 높게 나타났으나, 통계적 유의차는 인정되지 않았다. Thiyagarajan 등(2009)의 연구에 버팔로의 경우 20% 산소농도에서  $\alpha$ -tocopherol 100  $\mu$ M 처리 하였을 때 분할율과 배반포 발생율이 높았지만, 유의성은 인정되지 않았다고 보고 되었다. 이와 비교하여 볼 때, 한우에서는 버팔로의 난포란 체외성숙 시와 다르게  $\alpha$ -tocopherol 200  $\mu$ M 첨가 처리구에서 분할율이 높게 나타났다. 이는 난구세포(Tatemoto 등, 2000)가 산화 스트레스에 의해 발생된 apoptosis로부터 난포란을 보호하는 역할을 한다고 보고하였다. 이러한 이유로 인해 분할율은  $\alpha$ -tocopherol 첨가 농도에 따라 대조구와 처리구간의 통계적 유의차는 인정되지 않았다. 그리고 월별  $\alpha$ -tocopherol 첨가 농도에 따른 분할율을 비교 조사한 결과 여름 계절이 시작되는 시점인 7월에는  $\alpha$ -tocopherol 200  $\mu$ M 처리구가 55.80 $\pm$ 5.05%로서 대조구 및 다른 처리구(0  $\mu$ M, 54.29 $\pm$ 4.66%; 100  $\mu$ M, 52.41 $\pm$ 4.70%; 400  $\mu$ M, 46.07 $\pm$ 4.82%)보다 높게 나타났으며, 여름 계절의 절정 시점인 8월의  $\alpha$ -tocopherol 첨가 결과는 200  $\mu$ M 처리구가 72.00 $\pm$ 11.71%로서 대조구 및 다른 처리구(0  $\mu$ M, 61.82 $\pm$ 8.12%; 100  $\mu$ M, 65.52  $\pm$ 13.38%; 400  $\mu$ M 58.89 $\pm$ 12.29%)보다 유의적으로 높게( $p < 0.05$ ) 나타났다. 또한, 가을 계절의 시작 시점인 9월의  $\alpha$ -tocopherol 200  $\mu$ M 처리구가 60.49 $\pm$ 3.95%로서 대조구 및 다른 처리구(0  $\mu$ M, 46.97 $\pm$ 2.35%; 100  $\mu$ M, 54.68 $\pm$ 5.23%;

Table 1. Effect of  $\alpha$ -tocopherol on cleavage rate by months.

$\alpha$ -tocopherol Con(uM)	No. of oocytes inseminated(n)	No. of Development to cleavage				
		Average	July	August	September	October
0	650	56.14 $\pm$ 5.66	54.29 $\pm$ 4.66	61.82 $\pm$ 8.12	46.97 $\pm$ 2.35	61.46 $\pm$ 5.22
100	650	58.18 $\pm$ 8.00	52.41 $\pm$ 4.70	65.52 $\pm$ 13.38	54.68 $\pm$ 5.23	60.12 $\pm$ 9.19
200	650	62.97 $\pm$ 6.86	55.80 $\pm$ 5.05	72.00 $\pm$ 11.71	60.49 $\pm$ 3.95	63.61 $\pm$ 5.34
400	650	51.17 $\pm$ 7.28	46.07 $\pm$ 4.82	58.89 $\pm$ 12.29	51.62 $\pm$ 1.85	48.11 $\pm$ 8.85

Values are listed as Mean  $\pm$  S.E.M.



400  $\mu\text{M}$ ,  $51.62 \pm 1.85\%$ )보다 높은 경향을 보였다. 가을 계절의 정점인 10월달의  $\alpha$ -tocopherol 200  $\mu\text{M}$  처리구가  $63.61 \pm 5.34\%$ 로서 대조구 및 다른 처리구(0  $\mu\text{M}$ ,  $61.46 \pm 5.22\%$ ; 100  $\mu\text{M}$ ,  $60.12 \pm 9.19\%$ ; 400  $\mu\text{M}$ ,  $48.11 \pm 8.85\%$ )보다 높게 나타났다. 7~10월 대조구와 처리구의 분석결과 통계적 유의차는 인정되지 않았다. 이전의 체외수정란 생산에 관한 실험 결과에서는 난포란의 체외성숙을 위한 가장 중요한 요소는 체외성숙 배양액의 조성과 미성숙 난포란의 질(quality)에 의해 결정되었고 체외성숙 배양체계의 개발은 체외에서 배아를 성공적으로 생산을 위해 필수적이었다. 최근에는 체외성숙 중에 일어난 산화 스트레스의 원인에 의해 체외생산 된 배아의 낮은 분할율과 배반포 발생을 및 수정란의 질(quality)에 영향을 주었으며, 외부의 장시간 노출 및 환경적 요인에 의해서도 결정 될 수 있다고 보고 하였다.(choi, 2001).

Quinn 등(2005)은 초기 생쥐 수정란의 체외배양에 대한 연구에서 5% 산소농도가 발육에 적절하다고 보고하였고, 마우스 체외수정란의 체외배양에 대한 연구에서는 20% 산소농도 조건에서 zygotes의 배양은 형태학적인 평가에서 정상적으로 보였으나 blastocysts 까지의 배발달은 나타나지 않았다(Karagenc 등, 2004). 체외수정란의 발육에서 산소농도는 중요한 요인이지만, 오히려 20% 이상의 높은 산소농도 조건에서는 free radical을 형성시켜 체외배양액을 산화시키게 된다(Johnson 등, 1994). 최근에 산화작용을 하는 free radical을 제거하고, 체외수정란의 발달율을 향상시키기 위하여 배양액내에 여러 가지 성장인자 및 항산화제의 첨가 등으로 좋은 체외발육 성적을 얻게 되었다(Choie 등 2001). 그리고 비타민 첨가에 의한 항산화효과는 전자 반응에 의해 산화효과로서 인한 손상을 줄일 수 있다고 발표하였고(Carlson 등, 1993; Rodgers 등, 1995), 그 중  $\alpha$ -tocopherol은 강력한 지질 용해 항산화제로 낮은 농도에도 불구하고 주요 산화 방지제로서의 기능을 하는 것으로 알려져 있다(Kontush 등, 1996).

Table 2. Effect of  $\alpha$ -tocopherol in medium on IVP development to blastocyst by months.

$\alpha$ -tocopherol Con( $\mu$ M)	No. of oocytes inseminated(n)	No(%). of Development to blastocyst				
		Average	July	August	September	October
0	650	29.30 $\pm$ 5.24 <sup>AB</sup>	38.83 $\pm$ 1.20 <sup>c</sup>	34.69 $\pm$ 1.12 <sup>bc,A</sup>	30.48 $\pm$ 2.29 <sup>b,AB</sup>	13.20 $\pm$ 0.67 <sup>a,AB</sup>
100	650	31.60 $\pm$ 5.14 <sup>AB</sup>	40.87 $\pm$ 3.03 <sup>b</sup>	37.36 $\pm$ 1.15 <sup>b,A</sup>	31.97 $\pm$ 0.73 <sup>b,AB</sup>	16.19 $\pm$ 0.87 <sup>a,A</sup>
200	650	38.60 $\pm$ 7.12 <sup>B</sup>	42.17 $\pm$ 1.58 <sup>c</sup>	55.31 $\pm$ 6.62 <sup>bc,B</sup>	35.85 $\pm$ 1.73 <sup>ab,B</sup>	21.05 $\pm$ 1.20 <sup>a,B</sup>
400	650	26.37 $\pm$ 4.18 <sup>A</sup>	33.65 $\pm$ 1.52 <sup>c</sup>	32.48 $\pm$ 0.74 <sup>c,A</sup>	25.28 $\pm$ 1.18 <sup>b,A</sup>	14.06 $\pm$ 0.73 <sup>a,A</sup>

A-B : Means in the same column with different superscripts were significantly different ( $p < 0.05$ )

a-c : Means in the same row with different superscripts were significantly different ( $p < 0.05$ )

Values are listed as Mean  $\pm$  S.E.M.

## 2. $\alpha$ -Tocopherol 첨가에 따른 배반포 발달율

Table 2에서는  $\alpha$ -tocopherol을 체외배양액에 첨가한 후 각 농도별과 월별 평균 배반포 발생율을 조사한 바,  $\alpha$ -tocopherol 200  $\mu$ M 처리구 38.60 $\pm$ 7.12%로서 대조구 및 다른 처리구(0  $\mu$ M, 29.30 $\pm$ 5.24%; 100  $\mu$ M, 31.60 $\pm$ 5.14%; 400  $\mu$ M, 26.37 $\pm$ 4.18%)보다 높게 나타났으나, 각 처리구간의 통계적 유의차는 인정되지 않았다. 그러나 Choi 등 (2001)과 비교하여 보면 돼지의 경우 2~8세포기 체외수정란을 배양액에 항산화제인 NAC을 2mM 첨가구가 대조구와 다른 처리구보다 유의적으로 높게( $p < 0.05$ ) 나타냈다. 이와 같이 서로 다른 축종에서 다른 항산화제의 적절한 농도 사용은 체외수정란 발육에 영향을 미치는 것으로 나타난다. 체외수정란의 체외배양 시 일어나는 발육억제현상은 초기배 수정란의 genome 활성화 유·무와 free radical에 의해 일어난다고 알려져 있고, 또한 산화과정을 통해 pyruvate와 포도당을 연소하여 ATP는 생산 과정에서 산소와 에너지의 증가에 의해서 free radical이 생성 된다고 보고하였다(Thompson 등, 1996). 또한 ATP 작용은 체외수정란 생산에 기여하고 세포내 산화 환원 상태에서는 세포의 활성화 차이를 나타 낼 수 있다고 보고하였다(Wales, 1975; Leese, 1995).

월별  $\alpha$ -tocopherol 첨가 농도에 따른 배반포 발생율을 비교 조사한 결과, 7월의 배반포 발생율 또한 분할율과 동일하게  $\alpha$ -tocopherol 200  $\mu$ M 처리구 42.17 $\pm$ 1.58%가 대조구와 다른 처리구들(0  $\mu$ M, 38.83 $\pm$ 1.20%; 100  $\mu$ M, 40.87 $\pm$ 3.03%; 400  $\mu$ M, 33.65 $\pm$ 1.52%)보다 높게 나타났으나, 통계적 유의차는 인정되지 않았다. 8월의 배반포 발생율은  $\alpha$ -tocopherol 200  $\mu$ M 처리구가 55.31 $\pm$ 6.62%로서 대조구 및 다른 처리구(0  $\mu$ M, 34.69 $\pm$ 1.12%; 100  $\mu$ M, 37.36 $\pm$ 1.15%; 400  $\mu$ M, 32.48 $\pm$ 0.74%)보다 유의적으로 높은( $p < 0.05$ ) 발달율을 보였으며, 9월의 배반포 발생율의 경우  $\alpha$ -tocopherol 200  $\mu$ M 처리구 35.85 $\pm$ 1.73%로서 대조구 및 다른 처리구(0  $\mu$ M, 30.48 $\pm$ 2.29%; 100  $\mu$ M, 31.97 $\pm$ 0.73%; 400  $\mu$ M, 25.28 $\pm$ 1.18%)보다 다소 높은 경향을 보였으나 400  $\mu$ M 처리구를 제외한 대조구 및 다른 처리구에서 통계적 유의차는 인정되지 않았다. 10월의 배반포 발생율의 경우  $\alpha$ -tocopherol 200  $\mu$ M 처리구 21.05 $\pm$ 1.20%로서 대조구 및 다른 처리구(0  $\mu$ M, 13.20 $\pm$ 0.67%; 100  $\mu$ M, 16.19 $\pm$ 0.87%; 400  $\mu$ M, 14.06 $\pm$ 0.73%)보다 유의적으로 높은( $p < 0.05$ ) 결과를 내었다.

이와 같은 결과로 볼 때,  $\alpha$ -tocopherol의 첨가는 peroxidation(섬유원형질막의 지질의

과산화)을 방지하는 효과가 있어,  $\alpha$ -tocopherol 200  $\mu$ M 첨가된 처리구에서 한우 수정란의 배발달을 증가하는 항산화 효과가 원인일 수 있다고 사료되어진다. 월별 배반포 발생율이 7~8월의 고온의 날씨에도 불구하고 9~10월 보다 배반포기 발생율이 유의적으로 높게( $p < 0.05$ ) 나타났다. 선행연구와 비교하여 보면, 과배란 처리 후 계절별 수정란 회수율에서 Monty 등(1987)은 총 난자수와 수정란수가 여름에 영향을 받지 않았으며, Basile 등(1998)도 기후 변화에 영향을 받지 않았다고 보고하였다. 손 등(2000)은 4계절 중 겨울철에 이식가능한 수정란을 가장 많이 채란되었다고 보고하였다. 체외수정란과는 상대적으로 체내의 경우 위와 같이 고온에 의한 스트레스로 인한 열충격단백질(heat shock protein, HSP)에 의해 수정란이 보호되어진다. HSP는 열충격과 같은 다양한 스트레스에 의해 유도 합성되는 단백질이면서, estrogen이나 progesterone과 같은 성호르몬의 표적세포에서도 널리 관찰 되고 있다(Ciocca 등, 1993). HSP는 고체온(hyperthermia)으로 부터 임신 중인 산모에 열 자극이 가해지면 신경계통에서 열충격단백질이 발현되어 신경세포를 보호하고 기형을 예방하는 역할을 수행하지만, 본 실험에서와 같이 체외수정란의 경우 고온스트레스로부터 보호할 수 있는 특정 단백질을 첨가하지 않아 7~8월에 받은 고온 스트레스가 9~10월에 배반포기 발생율의 감소로 나타나는 것으로 사료 되어진다.

Table 3. Effect of  $\alpha$ -tocopherol in medium on total cell number by months.

$\alpha$ -tocopherol Con( $\mu$ M)	No. of oocytes inseminated(n)	Total cell number				
		Average	July	August	September	October
0	650	109.14 $\pm$ 5.89 <sup>B</sup>	116.00 $\pm$ 2.29 <sup>b,B</sup>	110.50 $\pm$ 1.94 <sup>b,B</sup>	108.25 $\pm$ 1.03 <sup>ab,BC</sup>	101.67 $\pm$ 2.02 <sup>a,B</sup>
100	650	104.23 $\pm$ 6.57 <sup>B</sup>	108.75 $\pm$ 4.55 <sup>AB</sup>	103.33 $\pm$ 1.26 <sup>AB</sup>	104.33 $\pm$ 0.76 <sup>AB</sup>	99.50 $\pm$ 4.60 <sup>AB</sup>
200	650	115.80 $\pm$ 6.61 <sup>C</sup>	119.75 $\pm$ 1.89 <sup>b,B</sup>	119.50 $\pm$ 2.10 <sup>b,C</sup>	116.00 $\pm$ 1.78 <sup>b,C</sup>	105.33 $\pm$ 2.02 <sup>a,B</sup>
400	650	96.00 $\pm$ 7.06 <sup>A</sup>	100.67 $\pm$ 2.36 <sup>b,A</sup>	99.67 $\pm$ 1.53 <sup>b,A</sup>	96.75 $\pm$ 3.17 <sup>ab,A</sup>	86.67 $\pm$ 2.36 <sup>a,A</sup>

A-C : Means in the same column with different superscripts were significantly different ( $p < 0.05$ )

a-b : Means in the same row with different superscripts were significantly different ( $p < 0.05$ )

Values are listed as Mean  $\pm$  S.E.M.

### 3. $\alpha$ -Tocopherol 첨가에 따른 총 세포수

Table 3에서는  $\alpha$ -tocopherol을 체외배양액에 첨가한 후 각 농도별과 월별 평균 총세포수를 조사한 결과,  $\alpha$ -tocopherol 200  $\mu$ M을 첨가한 처리구는 115.80 $\pm$ 6.61로서 대조구 및 다른 처리구(0  $\mu$ M, 109.14 $\pm$ 5.89; 100  $\mu$ M, 104.23 $\pm$ 6.57; 400  $\mu$ M, 96.00 $\pm$ 7.06)보다 유의적으로 높게( $p < 0.05$ ) 관찰되었다. 선행 연구에서 소의 수정란배양에서 비타민 E를 첨가한 결과 초기배반포와 확장배반포가 더 많이 발달되었고 돼지의 경우에 있어서도 체외배양액에 비타민 E와 함께 배양한 결과 처리구에서 대조구보다 체세포핵 전달과 체외수정란의 배반포 질이 높다는 연구 보고가 있었다(Jeong 등, 2006). 월별  $\alpha$ -tocopherol 첨가 농도에 따른 총세포수의 결과는 7월의 총세포수가  $\alpha$ -tocopherol 200  $\mu$ M에서 119.75 $\pm$ 1.89로 높게 나타났으나, 400  $\mu$ M 처리구를 제외한 나머지 대조구 및 다른 처리구에서 통계적 유의차는 인정되지 않았다. 8월의  $\alpha$ -tocopherol 첨가 농도에 따른 총세포수는  $\alpha$ -tocopherol 200  $\mu$ M 처리구가 119.50 $\pm$ 2.10로 대조구 및 다른 처리구(0  $\mu$ M, 110.50 $\pm$ 1.94; 100  $\mu$ M, 103.33 $\pm$ 1.26; 400,  $\mu$ M, 99.67 $\pm$ 1.53)보다 유의적으로 높게( $p < 0.05$ ) 나타났다. 9월의  $\alpha$ -tocopherol 첨가 농도에 따른 총세포수는  $\alpha$ -tocopherol 200  $\mu$ M 처리구가 116.00 $\pm$ 1.78로 다른 처리구(100  $\mu$ M, 104.33 $\pm$ 0.76; 400  $\mu$ M, 96.75 $\pm$ 3.17)에서 대조구를 제외한 나머지 처리구에서 유의적으로 높게( $p < 0.05$ ) 나타났다. 10월의  $\alpha$ -tocopherol 첨가 농도에 따른 총세포수는  $\alpha$ -tocopherol 200  $\mu$ M 처리구가 105.33 $\pm$ 2.02로 대조구 및 다른 처리구(0  $\mu$ M, 101.67 $\pm$ 2.02; 100  $\mu$ M, 99.50 $\pm$ 4.60; 400  $\mu$ M, 86.67 $\pm$ 2.36)보다 다소 높은 경향을 보였으나, 통계적 유의차는 인정되지 않았다.

월별 총세포수의 변화를 살펴보면 배반포기 발생율과 동일하게 7~8월에 비해 9~10월의 처리구와 대조구 모두 총세포수가 유의적으로( $p < 0.05$ ) 감소하는 결과를 보였다.

선행 연구에서 보면 배반포 수정란의 세포수가 체외수정란의 발달에 영향을 미친다고 보고하였다(Thiyagarajan 등, 2009). 이러한 원인은 배반포 수정란의 발생율에 영향을 미치는 것으로 보여 진다. 또한  $\alpha$ -tocopherol 200  $\mu$ M 첨가는 대조구를 비롯한 다른 처리구들보다 높은 결과를 나타내는 것으로 보아 HSP와 비슷한 효과를 나타내는 것으로 보이며, 여름계절의 고온 스트레스로 인해 9~10월 배반포율이 감소와 마찬가지로, 세포수 감소로 이어지는 것으로 사료 되어진다.

Table 4. Effect of  $\alpha$ -tocopherol in medium on total cell number after vitrification by months

$\alpha$ -tocopherol Con(uM)	No. of oocytes inseminated(n)	Total cell number after vitrification				
		Average	July	August	September	October
0	650	101.36 $\pm$ 5.12 <sup>BC</sup>	101.33 $\pm$ 4.07	103.67 $\pm$ 2.08 <sup>AB</sup>	102.00 $\pm$ 2.83 <sup>AB</sup>	98.67 $\pm$ 1.76 <sup>B</sup>
100	650	97.27 $\pm$ 2.87 <sup>AB</sup>	99.00 $\pm$ 2.00	101.33 $\pm$ 2.02 <sup>AB</sup>	98.00 $\pm$ 2.83 <sup>A</sup>	91.00 $\pm$ 2.65 <sup>AB</sup>
200	650	106.33 $\pm$ 3.50 <sup>C</sup>	107.00 $\pm$ 3.16 <sup>ab</sup>	110.33 $\pm$ 1.26 <sup>b,B</sup>	112.50 $\pm$ 1.06 <sup>b,B</sup>	97.33 $\pm$ 2.02 <sup>a,B</sup>
400	650	91.23 $\pm$ 7.52 <sup>A</sup>	95.33 $\pm$ 3.25 <sup>b</sup>	96.33 $\pm$ 2.08 <sup>b,A</sup>	92.25 $\pm$ 0.48 <sup>ab,A</sup>	80.67 $\pm$ 3.33 <sup>aA</sup>

A-C : Means in the same column with different superscripts were significantly different ( $p < 0.05$ )

a-b : Means in the same row with different superscripts were significantly different ( $p < 0.05$ )

Values are listed as Mean  $\pm$  S.E.M.

#### 4. $\alpha$ -Tocopherol 첨가에 따른 초자화 동결·융해 후 총세포수

Table 4에서는 월별  $\alpha$ -tocopherol 첨가 농도에 따른 동결 융해 후 총세포수를 비교 조사한 바,  $\alpha$ -tocopherol의 첨가 농도에 따라 평균 초자화 동결에 따른 총세포수는  $\alpha$ -tocopherol 200  $\mu$ M 첨가한 처리구 106.33 $\pm$ 3.50로서 대조구 및 다른 처리구(0  $\mu$ M, 101.36 $\pm$ 5.12; 100  $\mu$ M, 97.27 $\pm$ 2.87; 400  $\mu$ M, 91.23 $\pm$ 7.52)보다 유의적으로 높게( $p < 0.05$ ) 나타났지만, 대조구와의 차이에서 통계적 유의차는 인정되지 않았다. 월별 초자화 동결 융해 후 총세포수의 결과는 7월의 경우,  $\alpha$ -tocopherol 200  $\mu$ M 처리구가 107.00 $\pm$ 3.16로 대조구 및 다른 처리구(0  $\mu$ M, 101.33 $\pm$ 4.07; 100  $\mu$ M, 99.00 $\pm$ 2.00; 400  $\mu$ M, 95.33 $\pm$ 3.25)보다 높게 나타났으나, 400  $\mu$ M 처리구를 제외한 나머지 대조구 및 다른 처리구에서 통계적 유의차는 인정되지 않았다. 8월의 초자화 동결 융해 후 총세포수는  $\alpha$ -tocopherol 200  $\mu$ M 처리구 110.33 $\pm$ 1.26로 대조구 및 다른 처리구(0  $\mu$ M, 103.67 $\pm$ 2.08; 100  $\mu$ M, 101.33 $\pm$ 2.02; 400  $\mu$ M, 96.33 $\pm$ 2.08)보다 높게 나타났으나, 400  $\mu$ M 처리구를 제외한 대조구 및 다른 처리구에서는 통계적 유의차는 인정되지 않았다. 9월의 초자화 동결 융해 후 총세포수는  $\alpha$ -tocopherol 200  $\mu$ M 처리구가 112.50 $\pm$ 1.06로 대조구 및 다른 처리구(0  $\mu$ M, 102.00 $\pm$ 2.83; 100  $\mu$ M, 98.00 $\pm$ 2.83; 400  $\mu$ M, 92.25 $\pm$ 0.48)에서 대조구를 제외한 나머지 처리구에서 유의적으로 높게( $p < 0.05$ ) 나타났다. 10월의 초자화 동결 융해 후 총세포수는  $\alpha$ -tocopherol 200  $\mu$ M 처리구가 97.33 $\pm$ 2.02로 대조구 및 다른 처리구(0  $\mu$ M, 98.67 $\pm$ 1.76; 100  $\mu$ M, 91.00 $\pm$ 2.65; 400  $\mu$ M, 80.67 $\pm$ 3.33)보다 높게 나타났으나, 400  $\mu$ M 처리구를 제외한 대조구 및 다른 처리구에서 통계적 유의차는 인정되지 않았다.

본 실험에서 초자화 동결법을 사용한 이유는 완만동결법은 세포의 탈수를 유도하고 천천히 냉각시켜 식빙을 하고 일정 온도에 도달하게 한 후 보존하는 방법으로 매우 복잡한 단계를 거치는 동결과 해빙과정 동안 세포의 손상을 유발할 수 있는 (Bautista 등, 1998) 반면에, 초자화 동결은 세포가 동결되는 동안 동결용액의 점성을 점차 증가시켜 세포내·외의 빙정 형성을 방지하는 동결법으로 간단하고 경제적이며 시간이 적게 소비되는 장점이 있다. 그러나 초자화된 동결용액은 낮은 온도에서 과냉각되기 때문에 해빙 과정동안 재결정화가 일어나 세포에 손상을 줄 수 있다. 따라서 융해과정에서 재빙정이 이루어지지 않도록 투과력이 높은 고농도의 동결 보존액을 사용해야 한다(Rall 등, 1987). Fahy 등(1992)이 처음으로 8-세포기 생쥐배아를 초자화 동결법으로 성공시킨 이후 다양한 초자화 동결보존액, 동물의 종 및 배아의



발생시기에 따라 많은 연구가 이루어지고 있다. 그리고 초자화 동결법으로 마우스 배아를 동결·융해 하였을 때 정상적인 형태를 보이며 기형을 유발하지 않고 정상적인 산자를 생산하였다는 보고가 있다(Ali 등, 1993a ; Ali 등, 1993b). 또한, 최근에 가장 독성이 약한 것으로 알려진 ethylene glycol을 많이 사용하고 있고(Bautista 등, 1998), 현재 보편적으로 사용 하는 완만동결 방법 대신 초자화동결 방법을 사용할 경우 대부분의 발달단계에서 좋은 결과를 보이고 있다. 이를 토대로 비추어 볼 때 초자화 동결 융해 후 총세포수의 경우 동결 전 총세포수와 많은 차이를 나타내지 않는 것으로 보아 생식세포 및 수정란 동결은 다양한 목적에 따라서 효율적으로 이용이 가능할 것으로 사료된다.



## V. 요 약

본 연구는 한우의 체외수정란 생산에서 체외성숙, 체외배양시 배양액에 항산화제인  $\alpha$ -tocopherol의 첨가 농도에 따른 대조구와 처리구 난포란의 발달과 배반포 발생 및 초자화 동결 전 후 배반포 내의 세포수를 비교하여  $\alpha$ -tocopherol이 체외수정란생산에 미치는 영향을 구명하고자 실험한 결과를 요약하면 다음과 같다.

$\alpha$ -tocopherol 첨가 농도에 따른 분할율에서는 7~10월까지 비교한 결과,  $\alpha$ -tocopherol 200  $\mu$ M 첨가된 처리구가 대조구 및 타 처리구보다 높은 경향을 보였으나, 유의적 차이는 없었다. 배반포 발생율에서는 8~10월에서  $\alpha$ -tocopherol 200  $\mu$ M 첨가된 처리구 38.60 $\pm$ 7.12%가 대조구 및 타 처리구들보다 유의적으로 높게( $p<0.05$ ) 나타났다. 초자화 동결 전·후의 총세포수는  $\alpha$ -tocopherol 200  $\mu$ M 처리구에서 115.80 $\pm$ 6.61개, 106.33 $\pm$ 3.50개로서 다른 대조구 및 타 처리구 보다 높은 세포수를 보였다. 월별에 따른 수정란의 배반포 발생율 및 동결 전후의 총세포수에서는 7~8월이 9~10월보다 유의적으로 높게( $p<0.05$ ) 나타났다.

이러한 결과로 보아  $\alpha$ -tocopherol 항산화제의 첨가가 소의 체외수정란 생산 및 동결 보존에 있어 효과적이라 할 수 있으며, 앞으로 다양한 항산화제의 역할 구명과 동결 방법 개선으로 양질의 체외수정란을 생산할 수 있을 것으로 사료된다.

## ABSTRACT

### Effect of $\alpha$ -Tocopherol on the development and vitrification of Hanwoo IVM/IVF

**Jin-Woo Jung**

Department of Animal Biotechnology, Graduate School  
Jeju National University, Jeju, Korea

This study was undertaken to find if supplementation of vitamin E in culture medium could ameliorate the developmental competence of preimplantation Hanwoo embryos. Methods  $\alpha$ -tocopherol was supplemented in maturation / embryo culture medium at concentrations of 0, 100, 200 and 400  $\mu$ M. The developmental competence of Hanwoo embryos were assessed by observing the cleavage, blastocyst rate, total cell number and cell count after vitrification. Cleavage rate from July to October compared to the results,  $\alpha$ -tocopherol 200  $\mu$ M supplemented with  $\alpha$ -tocopherol 200  $\mu$ M treatment groups and was higher than the other treatments that had no significant effect in maturation medium. In the blastocyst rate of August to October,  $\alpha$ -tocopherol in embryo culture medium. Treatment groups containing  $\alpha$ -tocopherol 200  $\mu$ M 38.60 $\pm$ 7.12% were significantly higher ( $p < 0.05$ ) than control and other treatments. Before and After vitrification of the total cell numbers in treated  $\alpha$ -tocopherol 200  $\mu$ M, 115.80 $\pm$ 6.61, 106.33 $\pm$ 3.50, respectively, and control cells was higher than the other treatment groups. According to monthly, the blastocyst rate and the freezing of embryos in the total cell number that July to August was significantly higher ( $p < 0.05$ ) than September to October. These results suggest that the addition of antioxidants in vitro bovine embryo production and cryopreservation may be beneficial in the future to identify and freeze the other way as antioxidants to improve the quality looks to be able to produce embryos.

## 참고문헌

- Ali J and Shelton N. 1993a. Vitrification on preimplantation stage of mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.* 98:459-465.
- Ali J and Shelton N. 1993b. Design of vitrification solution for the cryopreservation of embryos. *J. Reprod. Fertil.* 99:471-477.
- Ames BN, Shigenaga MK and Hagen TM. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90(17): 7915 - 7922.
- András Dinnyés, Yunping Dai, Shie Jiang and Xiangzhong Yang. 2000. High Developmental Rates of Vitrified Bovine Oocytes Following Parthenogenetic Activation, In Vitro Fertilization, and Somatic Cell Nuclear Transfer. *Biol. Reprod.* 63(2):513-518.
- Arav A and Zeron Y. 1997. Vitrification of bovine oocytes using modified minimum drop size technique (MDS) is effected by the composition and the concentration of the vitrification solution and by the cooling conditions. *Theriogenology.* 47(1):341-341.
- Arechiga CF, Ealy AD and Hansen PJ. 1995. Evidence that glutathione is involved in thermotolerance of preimplantation murine embryos. *Biol. Reprod.* 52(6):1296-1301.
- Austin CR. 1951. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res. B.* 4(4):581-96.

- Baruselli PS, de Sá Filho MF, Martins CM, Nasser LF, Nogueira MF, Barros CM and Bó GA. 2006. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*. 65:77-88.
- Basile JR, Chebel RJ and Basile LF. 1998. Effect of season on embryo transfer in superovulated Holstein cows with PMSG. *Br J Vet Res Anim Sci*. 35:257-259.
- Bautista JAN, Dela Pena EC, Katagiri S, Takahashi Y and Kanagawa H. 1998. In vitro viability of mouse oocytes vitrified in an ethylene glycol-based solution. *Jpn. J. Res.* 46(1):13-18.
- Bize I, Santander G, Cabello P, Driscoll D and Sharpe C. 1991. Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation in vitro. *Biol. Reprod.* 44: 398-403.
- Carlson JC, Wu XM and Sawada M. 1993. Oxygen radicals and the control of ovarian corpus luteum function. *Free. Radic. Biol. Med.* 14:79-84.
- Carvalho RV, Del Campo MR, Palasza AT, Planteb Y and Mapletofta RJ. 1996. Survival rates and sex ratio of bovine IVE embryos frozen at different developmental stages on day 7. *Theriogenology*. 45:489-498.
- CHANG MC. 1951. Fertilizing Capacity of Spermatozoa deposited into the Fallopian Tubes. *Nature*. 168:697-698.
- CHANG MC. 1959. Fertilization of Rabbit Ova in vitro. *Nature*. 184:466-467.
- Christensen LG. 1991. Use of embryo transfer in future cattle breeding schemes. *Theriogenology*. 35:141-149.

- Ciocca DR and Oesterreich S. 1993. Biological and Clinical Implications of Heat Shock Protein 27000 (Hsp27). *JNCI. J. Natl. Cancer. Inst.* 85(19): 1558-1570.
- Crosby IM, Gandolfi F and Moor RM. 1988. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *J. Reprod. Fertil.* 82:769-775.
- Ealy AD, Drost M, Barros CM and Hansen PJ. 1992. Thermoprotection of preimplantation bovine embryos from heat shock by glutathione and taurine. *Cell. Biol. International Reports.* 16(2):125-131.
- Forsberg EJ. 2005. Commercial applications of nuclear transfer cloning: three examples. *Reprod. Fertil and Develop.* 17(2):59 - 68.
- Fridovich I. 1983. Superoxide Radical: An Endogenous Toxicant. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 23:239-257.
- Gibson JP and Smith C. 1986. Technology and animal breeding; Application in livestock production. 3rd world Cong. on genetics Applied to Livestock Prod. 12 :96-105.
- Goldfarb AH. 1993. Antioxidants role of supplementation to prevent exercise induced oxidative stress. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 52(2):232-236.
- Hasler JF. 2003. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Anim. Reprod. Science.* 79:245-264.
- Jeong YW, Park SW, Hossein MS, Kim S, Kim JH, Lee SH, Kang SK, Lee BC and Hwang WS. 2006. Antiapoptotic and embryotropic effects of alpha-tocopherol and L-ascorbic acid on porcine embryos derived

- from in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology*. 66:2104-2112.
- Ji LL. 1993. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med Sci Sports Exerc*. Feb;25(2):225-31.
- Joenje H. 1989. Genetic toxicology of oxygen. *Mutation research*. 1219:193-208.
- Johnson MH and Nasr-Esfahani MH. 1994. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro? *Bioessays*. 16:31-38.
- Jones DP. 1985. Oxygen supply In : *Oxidative stress*, London: Academic Press. 167-170.
- Karagenc L, Sertkaya Z, Ciray N, Ulug U and Bahçeci M. 2004. Impact of oxygen concentration on embryonic development of mouse zygotes. *Reprod. Biomed*. 9:409-417.
- Kontush A, Finckh B, Karten B, Kohlschütter A and Beisiegel U. 1996. Antioxidant and prooxidant activity of alpha-tocopherol in human plasma and low density lipoprotein. *J. Lipid. Res*. 37:1436-1448.
- Kransnickii AV. 1951. Interbreed ova transplantation. *Sovetsk. Zooteh*. 1:36-42.
- Kuwayama M. 1995. Vitrification of IVMFC bovine embryos at various developmental stages and of different quality. *Theriogenology*. 43:257-257.
- Leese HJ. 1995. Metabolic control during preimplantation mammalian

- development. Hum. Reprod. Update. 1:63-72.
- Lohuis MM. 1997. Strategy for dairy cattle improvement utilizing MOTE in anada. Anim. Genetic and Breed. 1:224-226.
- Machlin LJ and Bendich A. 1987. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. The FASEB. Journal. 1:441-445.
- Long C R, J R Dovrinsky and L A Johnson. 1999. In vitro production of pig embryos: comparisons of culture media and boars. Theriogenology. 51:1375- 1390.
- Mammoto A, Masumoto N, Tahara M, Ikebuchi Y, Ohmichi M, Tasaka K and Miyake A. 1996. Reactive oxygen species block sperm-egg fusion via oxidation of sperm sulfhydryl proteins in mice. Biol. Reprod. 55:1063-1068.
- Marques A, Santos P, Antunes G, Chaveiro A and Moreira da Siva F. 2010. Effect of  $\alpha$ -Tocopherol on Bovine In Vitro Fertilization. Reprod. Dom. Anim. 45: 81-85.
- Martino A, N Songsasen and S P Leibo. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling Biol. Reprod. 54(5):1059-1069.
- Miyazaki T, Sueoka K, Dharmarajan AM, Atlas SJ, Bulkley GB and Wallach EE. 1991. Effect of inhibition of oxygen free radical on ovulation and progesterone production by the in-vitro perfused rabbit ovary. J. Reprod. Fert. 91:207-212.
- Monty Jr DE and Racowsky C. 1987. In vitro evaluation of early embryo



- viability and development in summer heat stressed, superovulated dairy cows. *Theriogenology*. 28:451-465.
- Murray PK, Granner DK, Mayes PA and Rodwell VW. 1990. Lipid peroxidation is a source of free radicals in vivo. *Bio. chem.* 142-143.
- Nakao H, and Nakasuji N. 1990. Effects of co-culture, medium components and gas phase on in vitro culture of in vitro matured and in vitro fertilized bovine embryos. *Theriogenology*. 33:591-600.
- Papis K, Shimizu M and Izaike Y. 1999, The Effect of Gentle Pre-Equilibration on Survival and Development Rates Of Bovine In Vitro Matured Oocytes Vitrified in Droplets. *Theriogenology*. 1:51.
- Pincus G and Enzmann EV. 1935. The comparative behavior of mammalian eggs in vitro and in vivo. *J. Experi. Med.* 62:665-675.
- Prentice J R, Singh J, Dochi O and Anzar M. 2008. 73 Vitrification of bovine oocytes: Effect of Packaging and Equilibration time on nuclear maturation. *Reprod. Fertil and Develop.* 21(1):136-137.
- Quinn P and Gaye M. 2005. The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro. *J. Experi. Zoo.* 206(1):73-80.
- Edeards RG. 1962. Meiosis in Ovarian Oocytes of Adult Mammals. *Nature*. 196:446-450.
- Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*. 313:573-575.

- Rall WF, Wood MJ, Kirby C and Whittingham DG. 1987. Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *J. Reprod. Fertil.* 80:499-504.
- Riha J and Machatkova, M. 2002. Pavlok, A. Viability of fresh and frozen transferred IVP bovine embryos. *Czech. J. Anim. Sci.* 47(7):261-267.
- Rodgers RJ, Lavranos TC, Rodgers HF, Young FM and Vella CA. 1995. The physiology of the ovary: maturation of ovarian granulosa cells and a novel role for antioxidants in the corpus luteum. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 53:241-246.
- Rowson LEA. 1971. The role of reproductive research in animal production. *J. Reprod. Fertil.* 26:113-126.
- Ruane J. 1988. Review of the use of embryo transfer in the genetic improvement of dairy cattle. *Anim. Breed.* 56:437-446.
- Saikhuna1 K, Faisaikarma1 T, Ming Z, Lu KH, and Kitiyanant Y. 2008.  $\alpha$ -Tocopherol and l-ascorbic acid increase the in vitro development of IVM/IVF swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Animal.* 2(10):1486-1490
- Schmidt K. 1991. Antioxidant vitamins and beta-carotene: effects on immunocompetence. *American J. Clin. Nut.* 53:383-385.
- Smith C. 1984. Genetic improvement of livestock, using nucleus breeding units. *World. Anim. Rev.* 65:2-10.
- Sreenan JM. 1988. Embryo transfer: its uses and recent development. *Veterinary Record.* 122:624-629.

- Sturman H, Oltenacu EA and Foote RH. 2000. Importance of inseminating only cows in estrus. *Theriogenology*. 53(8):1657-1667.
- Tappel AL. 1973. Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed. Proc.* 32:1870-1874.
- Tatemoto H, Sakurai N and Muto N. 2000. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during In vitro maturation: role of cumulus cells. *Biol. Reprod.* 63:805.
- Thibodeaux JK, Del Vecchio RP and Hansel W. 1993. Role of platelet-derived growth factor in development of in vitro matured and in vitro fertilized bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.* 98:61-66.
- Thiyagarajan B and Valivittan K. 2009. Ameliorating effect of vitamin E on in vitro development of preimplantation buffalo embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.* 26:217-225.
- Thompson JG, Partridge RJ, Houghton FD, Cox CI and Leese HJ. 1996. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.* 106:299-306.
- Vajta G, P. Hyttel and H. Callesen. 1997. Morphological changes of in-vitro-produced bovine blastocysts after vitrification, in-straw direct rehydration, and culture *Mol. Reprod. Dev.* 48(1):9-17.
- Vanderzwalmen P, G Bertin, Ch Debauche, V Standaert, E. van Roosendaal, M Vandervorst, N Bollen, H Zech, T Mukaida, K Takahashi and R Schoysman. 2002. Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before

- vitrication. Hum. Reprod. 17(3): 744-751.
- Voelkel SA and Hu YX. 1992. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. Theriogenology. 37:23-37.
- Wales RG. 1975. Maturation of the mammalian embryo: biochemical aspects. Biol Reprod. 12:66-81.
- Wang B and Zhou J. 2003. Specific genetic modifications of domestic animals by gene targeting and animal cloning. Reprod. Biol. Endo. 1:103.
- Warwick BL and Berry Ro. 1949. Inter-generic and intra-specific embryo transfers. J. Hered. 40:297-303.
- Whittingham DG. 1968. Fertilization of Mouse Eggs in vitro. Nature. 220:592-593
- Willcox, Joye K, Ash, Sarah L, Catignani and George L. 2004. Antioxidants and Prevention of Chronic Disease Critical Reviews. Food. Sci. Nut. 44(4):275-95.
- Willett EL, Black WG, Casida LE, Stone WH and Buckner PG. 1951. Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. Science. 113:247.
- YANG BS and LEIBO SP. 1999. Viability of in vitro-derived bovine zygotes cryopreserved in microdrops. Theriogenology. 51:178-178.
- Yeum KJ, Lee Kim YC, Lee KY, Kim BS, Roh JK and Park KS. 1992. The serum levels of retinoids, beta-carotene and alpha-tocopherol of cancer patients. J. Korean. Cancer. Assoc. 24(3):343-351.

고광두, 정길생, 이기만. 1981. 한우의 수정란이식에 관한 연구 제1보. GTH  
단독투여에 의한 한우의 쌍태유기. 한국축산학회지. 23:315-321.

고대환 등, 2003. 동물번식학, 선진문화사. 194.

공홍식. 2006. Bovine 생식세포의 유전자 발현특성 및 microsatellite 표지인자  
의 경제형질관리 연관성 규명. 한경대학교 박사학위논문.

손동수, 김일화, 류일선, 연성흠, 서국현, 이동원, 최선호, 박수봉, 이충섭.  
2000. 젓소 MOET scheme의 추진을 위한 수정란 생산 및 이식. 한국수정란  
이식학회지. 15(1): 57-65.

원유석. 1999. 한우의 최적 육종계획 수립에 관한 연구 ; 새로운 육종기법에  
관한 연구. 충북대학교 박사학위 논문.

최영진. 2001, 돼지 체외 수정란의 체외발육에 대한 항산화제의 첨가효과.  
강원대학교 석사학위 논문.

황우석, 조충호, 이병천, 신태영, 노상호, 김성기, 전병준, 이강남, 신언익, 임홍순.  
1993. 한우정액 유래 체외수정 송아지 생산에 관한 연구. 한국수정란이식  
학회지. 8:143-149.