

젓소 수정란의 급속동결법 개발에 관한 연구

조충호 · 황우석 · 정창국 · 전윤성 · 이홍식 · 이창우

서울대학교 수의과대학

서 론

동물수정란의 동결보존은 융해후 높은 생존율을 획득할 수 있게 됨에 따라 포유류유전학 및 산업동물번식에 있어 실용화 계기를 마련하게 되었다. 현재에는 유용한 실험동물의 계통보존, 특이유전형질의 보호, 특정품종의 일시적 품귀 등에 대한 대비책으로 응용되고 있으며 산업동물의 번식에서는 소의 수정란 이식술의 필수분야로 자리잡고 있다.^{31, 32, 34}

Whittingham 및 Whitten⁴³은 산업적 목적으로의 동물 수출·입에 있어 동물대신 凍結卵을 이용하는 가능성을 제기하였다. 동물수정란의 동결보존은 비교적 완만한 속도의 냉각(0.2~2.0°C/분)과 융해(4~25°C/분)로 마우스 수정란⁴²에서 성공한 이래 이 방법을 응용하여 rat,⁴¹ 羊,⁴⁶ 소,⁸ 및 토끼 등^{2, 19, 39} 여러동물에서 보고가 계속되었다. 그후 Polge 및 Willadsen²⁶은 좀더 신속한 냉각(0.3°C/분) 및 급속융해법(36°C/분)으로 개량하여 조작과정을 단축시켰으나, 이 방법 역시 장시간이 소요되며 高價의 복잡한 생물학적 냉동기를 필요로 하고있다.

Hamster의 2세포기란은 채란액에서 20분정도 작용하면 생존성을 잃게되는 사실¹²과 같이 동물에 따라 차는 있으나 채란에서 동결까지의 경과

시간은 대부분의 동물수정란에 유해한 요인이 되기때문에 동결과정을 가능한 단축시켜야 한다. 또한 동결 및 융해단계중의 수정란의 분실을 적게하여 卵回收率을 향상시키기 위해서는 조작과정의 단순화가 요구된다. 체외조작단계에서 경과시간의 단기화와 과정의 단순화를 위해 마우스 수정란에서 2단계 동결법(two-step freezing method)이 Wood 및 Farrant⁴⁹에 의해 성공한 이래, 마우스,^{14, 18, 23, 24, 35} 토끼³⁰ 및 소^{4, 40}에서의 보고가 있었다. 細胞外의 氷晶形成과 함께 세포내 수분이 脫水된다는 사실²에 근거하여 완만동결법이 細胞의 脫水를 이루기위해 일정량의 완만한 단계적 냉각법^{10, 44, 45}을 취하는 반면에 2단계 동결법은 동결개시전에 실온에서의 부분적 前脫水과정을 거쳐 액체질소내 투입하기전에 -30°C까지의 준급속동결과정으로 탈수작업을 완결시킨다는 이론^{9, 35}에 기초하고 있다. 최근에는 이와 같은 고장액을 이용한 前脫水처리법에 의해 혈액^{22, 28} 및 섬유종세포^{1, 11}의 급속동결법이 성공을 거두어 동결과정 및 소요시간이 극히 간결, 단축되었으며 이는 곧 마우스,^{3, 15, 16, 25, 27, 36, 38, 47} rat⁸ 및 소 수정란^{5, 7}에서의 동결에도 계속되었다. 그러나 주요산업동물인 소 수정란의 급속동결법에 관한 동결보호제별, 농도별, 처리단계별 및 액체질소와의 접촉법 등에 대한 상세한 연구보문은

※ 이 논문은 1986년도 대학부설연구소(학술연구조성비)지원금으로 수행되었음.

아직 접할 수 없다. 이에 소 수정란이식의 야외에서 실용성 제고를 위한 간략한 급속 동결법을 개발코자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

수정란: 임상적으로 생식기 질환에 이환되어 있지 않은 것으로 확인된 홀스타인종 젖소(1산-6산차)를 供卵牛로 사용하였다. 과잉배란 처리는 Elsdon 등⁹⁾의 방법에 준해 follicular stimulating hormone(FSH: Antrin, 덴소카製藥, 日本)을 감량법에 의해 4일간 8회투여(32mg)하였으며 FSH 투여개시 3일째에 Prostaglandin F_{2α}제제(Lutalys-e, Upjohn, USA) 12.5mg을 12시간 간격으로 2회 주사하였다. 수정란의 회수는 수정후 6~7일에 비외과적 자궁관류법에 의해 실시하였고, 채란액은 minimum essential medium(MEM; Eagle, U.S.A)을 이용하였다. 현미경 검사로서 Renard 및 Heyman²⁰⁾의 분류에 의해 정상상실배 및 배반포란을 선택하여 실험에 사용하였다.

동결보호제: 삼투성동결보호제로는 glycerol, ethylene glycol을 각각 2M의 농도로서, 비삼투성동결보호제로는 0.5M 및 1.0M의 sucrose용액을 선택하였다.

동결액 및 체외배양액: 동결액, 체외배양액 및 이식액은 20%의 송아지 혈청이 첨가된 phosphate-

buffered saline(PBS+20% CS)을 이용하였다.

동결보호제의 첨가: PBS+20%CS액에 0.5M 및 1.0M의 sucrose를 첨가하고 여기에 glycerol 또는 ethylene glycol을 각 2M의 농도가 되도록 첨가하여 실험군을 설정하였다. 각 실험군은 실온에서 5분동안 평형시킨 후 0.25ml의 프라스틱 straw에 수정란 1개씩을 흡입하여 봉하였다(Fig. 1).

동결: 본 연구팀이 제작한 Fig. 2와 같은 styrofoam boat를 액체질소 표면 에 올려놓고 그위에 수정란을 함유한 straw를 2분동안 올려놓은 후(-170℃), 액체질소내로 직접 침지시켰다(Fig. 3). 동결 수정란은 액체질소내에 7~180일간 보존하였다.

융해 및 동결보호제의 제거: 동결수정란의 융해는 37℃수조에서 30초간 진탕시키는 급속융해법을 응용하였다. 융해시킨 수정란은 동결시와 동일한 sucrose 농도가 함유된 PBS+20%CS에 10분간 작용시킨 후 PBS+20%CS액에 각 5분씩 3회 세척하였다.

생존성 판정: 동결융해후의 생존성은 PBS+20%

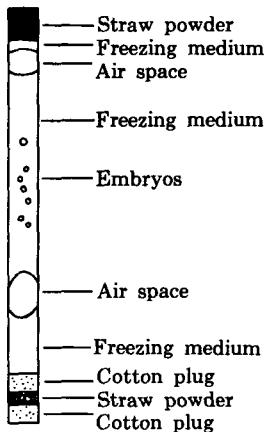


Fig. 1. Diagrammatic representation of a 0.25ml french straw loaded with the freezing medium and embryos

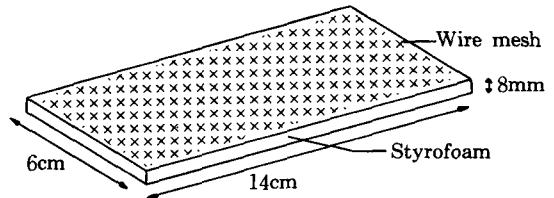


Fig. 2. Styrofoam boat on which straw was place.

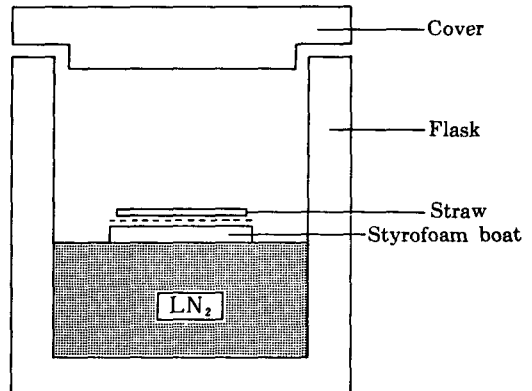


Fig. 3. Liquid nitrogen flask with straw placed horizontally on the styrofoam boat.

CS액에 5% CO₂, 37℃의 배양조건하에서 24~48 시간 체외배양을하여 확대배반포 또는 부화배반포로 발육이 이루어지면 생존한것으로 평가하였다.

이식 및 수태율판정: 체외배양 실험과는 별도로 각 실험군의 동결수정란 중 동결보호제를 제거한 후 형태가 정상으로 인정되는 수정란을 발정주기 7일의 홀스타인종 受卵牛에 자궁경관경유법으로 이식하고, 이식후 45 ~60일에 직장검사를 통해 임신여부를 확인하였다. 대조군으로는 동결과정을 거치지않은 신선수정란을 受卵牛에 이식하여 수태율을 조사하였다.

결 과

소 수정란을 급속동결시키기 위해 PBS+20% CS액에 투과성 동결보호제로서 glycerol과 ethylene glycol을 2M로 고정하고 sucrose를 0.5M 및 1.0M로 첨가하여 부분탈수 후 동결 및 융해과정을 거쳐 체외배양한 결과 생존율은 Table 1에 나타난 바와 같다. 즉 0.5M의 sucrose 첨가군에서는 glycerol에서 18개의 수정란 중 10개가, ethylene glycol에서는 15개중 8개가 발육하여 각각 55.6% 및 53.3 %의 생존율로 두 종류의 동결보호제간에는 동결효과의 차를 인정할 수 없었다. 한편, 1.0M의 sucrose 실험군에서는 glycerol에서 38.1%, ethylene glycol에서 31.6%의 생존율을 보여 0.5M군에서와 마찬가지로 glycerol과 ethylene glycol간의 동결효과 차를 발견할 수 없었다(Table 1).

그러나 sucrose의 농도별로는 glycerol을 이용

한 실험군에서는 생존율이 0.5M에서 55.6%, 1.0M에서 38.1%로서 유의차가 인정되었다($p < 0.05$). ethylene glycol이 이용된 실험군에서도 sucrose의 농도에 따라 0.5M에서 53.3%, 1.0M에서 31.6%의 생존성을 보여 유의차가 인정되었다($p < 0.05$). 체외배양실험과 별도로 융해후 형태가 정상으로 인정되는 수정란과, 동결융해 과정을 거치지않은 신선수정란을 대조군으로하여 발정주기 7일째의 受卵牛에 이식하여 얻은 sucrose를 0.5M의 농도로 첨가한 glycerol군에서는 22두에 이식하여 9두가 수태되었으며 (40.9%), ethylene glycol군에서는 20두의 수란우에 이식하여 8두가 임신, 수태율은 40.0%로서 양 동결보호제군간에 차가 없었다. sucrose농도가 1.0M인 glycerol군에서의 수태율은 26.3%(5/19)였고, ethylene glycol군에서는 27.2%(6/22)로서 양 동결보호제군간에 차가 없었다. 그러나 sucrose의 농도차에 따라 분류해보면 glycerol군에서 0.5M sucrose에서는 40.9%, 1.0M sucrose에서는 26.3%로서 유의차가 인정되었다($p < 0.05$). ethylene glycol군에서도 sucrose 첨가농도가 0.5M 및 1.0M에서 각각 40.0% 및 27.2%의 수태율로서 농도변화에 따른 수태성적차가 인정되었다($p < 0.05$). 한편, 동결과정을 거치지 않은 신선수정란은 25두의 수란우에 이식하여 14두에서 임신이 확인되어 56.0%의 수태율로서 이는 sucrose의 농도별 또는 glycerol 및 ethylene glycol 실험군간 어느 성적과도 유의차가 인정되었다 ($p < 0.05$).

고 찰

Table 1. Effects of Cryoprotectants on the Viability of Bovine Embryos after Rapid Freezing(% of Expanded or Hatched Blastocysts after 24-48 h *in vitro* Culture)

Type of cryoprotectant	Sucrose concentration	No. embryos frozen	No. embryos developed	Viable rate (%)
2 M Glycerol	0.5	18	10	55.6 ^a
	1.0	21	8	38.1 ^b
2 M Ethylene glycol	0.5	15	8	53.3 ^a
	1.0	19	6	31.6 ^b

a,b: Values with different superscripts were significant different ($p < 0.05$)

Table 2. Pregnant Rates of Bovine Embryos after Rapid Freezing with Sucrose, Glycerol and Ethylene Glycol as Cryoprotectant

	Fresh embryos	Frozen embryos				
		Type of cryoprotectant	Glycerol (2M)		Ethylene glycol (2M)	
			Sucrose concentration			
		0.5M	1.0M	0.5M	1.0M	
No. recipients transferred	25	22	19	20	22	
No. recipients confirmed pregnant	14	9	5	8	6	
Pregnant rates (%)	56.0 ^a	40.9 ^b	26.3 ^c	40.0 ^b	27.2 ^c	

a,b,c: Values with different superscripts were significant different ($p < 0.05$).

최근 수년동안 급속동결법을 이용한 동물수정란의 보존에 관한 연구가 괄목할 수준으로 진전되고 있다. 본 연구결과 소의 수정란도 前脫水와 급속동결 조작으로 생존할 수 있다는 사실을 알 수 있었으며 그 생존율은 완만동결법¹⁰⁾이나 2단계 동결법^{21, 23)}, 1단계동결법⁴²⁾에서와 유사한 성적으로 실용적 수준으로 향상시킬 수 있음을 시사한다 하겠다. 1단계, 2단계 동결법에서와 마찬가지로 급속동결법에서도 前脫水 과정을 거쳐야 하는데 이는 sucrose 등과 같은 고농도 非透過性糖類에 의해 세포내 수분이 탈취되고, 수정란의 용적이 50% 정도 위축되어⁵⁾ 細胞內水晶形成이 저하되고,²⁰⁾ 植水조작 없이도 급속동결이 가능해지기 때문이다. 본 실험에서 채택한 동결보호제의 농도는 Miyamoto 등²⁵⁾ Bui-Xuam-Nguyen 등⁵⁾과 William 및 Johnson⁴⁷⁾의 결과를 원용하여 2M로 고정했으며 농도변화에 따른 급속동결의 생존율차는 확인할 수 없었으나 sucrose의 농도는 1.0M에 비해 0.5M의 경우가 체외배양의 생존율 및 이식수태율에 있어 유의성 있게 높았다. 이 결과는 sucrose농도가 1.0M과 같이 고농도일 경우는 過脫水로 인해 수정란의 용적감소 허용기준인 40% 이하로 감량되어 0.5M보다도 생존성이 저하된다는 결과³³⁾나 0.5 M이 최적농도라는 결과⁶⁾와는 일치하나 0.5M보다 1.0M이 최적이라는 보고⁹⁾와는 일치하지 않는다. 융해후 동결보호제 제거(회식) 단계에서는 동결전 첨가한 sucrose농도에 관계없이 제거과정에서 이용되는

최적 sucrose농도는 0.5M⁶⁾과 0.25M⁹⁾이라는 두 결과가 보고되어 있으나 본 연구의 제거과정에서 채택된 요인이 없어 비교가 불가능하다. 본 실험에서의 동결과정중 植水조작이 없었으나 이는 styrofoam boat가 액체질소와 접하는 부분의 온도가 -150℃ ~ -170℃⁶⁾가 되기때문에 이곳에서 예비 동결하는 2분간의 시간이 straw내에 水晶을 형성시켜 植水の 역할을 하는것으로 추측된다. 한편, 본 실험의 0.5M sucrose에서 이식수태율은 2단계 동결법⁵⁾이나 완만동결법^{13, 17, 31)}에서의 성적과 유사하였으나 신선란의 수태율보다는 현저히 저조한 결과였다. 급속동결법은 고가의 정교한 동결기가 요구되며 장시간이 소요되는 완만동결법에 비해 경제적으로 저렴하며 간단하기 때문에 이의 개발은 학문적, 실용적 측면에서 절실한 실정이다. 본 연구결과 소의 수정란도 급속동결에 의한 보존이 가능한 것으로 밝혀졌다. 그러나 이를 실용화가 가능 수준까지 향상시키기 위해서는 前脫水の 기전, 동결보호제의 종류, 최적농도, 제거법등에 대한 향후 계속적인 연구가 요망된다 하겠다.

결 론

소 수정란 이식의 실용성 제고를 위한 야외에서의 간편한 동결보존법을 개발할 목적으로 홀스타인종 젖소에서 수정란을 채취하고 glycerol (2M), ethylene glycol(2M) 및 sucrose(0.5M,

1.0M)를 이용, 급속동결, 용해를 거쳐 체외배양과 수란우에 이식실험을 하였다.

1. Ethylene glycol은 젖소 수정란의 급속동결용 동결보호제로 이용할 수 있음이 밝혀졌다.
2. 탈수목적으로 첨가된 sucrose는 고농도(1.0M)보다는 0.5M이 적합한 것으로 나타났다.
3. 급속동결법에 의한 수정란의 수태율은 신선란에 비해 저조하였다.

참 고 문 헌

1. Ashwood-Smith, M.J.: Current concerning radioprotective and cryoprotective properties of dimethylsulfoxide in cellular systems. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (1975) 243:246.
2. Bank, H. and Maurer, R.R.: Survival of frozen rabbit embryos. *Exp. Cell Res.* (1974) 89:188.
3. Biery, K.A., Seidel, G.E. Jr. and Elsdén, R.P.: Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging in liquid nitrogen. *Theriogenology* (1986) 25:140 (Abstr.).
4. Bouyssou, B. and Chupin, D.: Two-step freezing of cattle blastocysts with dimethylsulfoxide(DMSO) or glycerol. *Theriogenology* (1982) 17:159.
5. Bui-Xuan-Nguyen, H., Heymen, Y. and Renard, J.P.: Direct freezing of cattle embryos after partial dehydration at room temperature. *Theriogenology* (1984) 22:389.
6. Chupin, D.: The present state of art of embryo transfer in France. In: "The reproductive potential of cattle and sheep", *Les Colloques de l'INRA, Versailles*, (1984) p. 235.
7. Chupin, D.: Quick freezing of bovine blastocysts. *Theriogenology* (1986) 25:147.
8. Chupin, D. and De Reviere, M.M.: Quick freezing of rat embryos. *Theriogenology* (1986) 26:157.
9. Elsdén, R.P., Nelson, L.D. and Seidel, G.E.: Superovulating cows with FSH and PMSG. *Theriogenology* (1978) 9:17.
10. Elsdén, R.P., Seidel, G.E. Jr., Takeda, T. and Farrand, G. D.: Field experiments with frozen-thawed bovine embryos transferred nonsurgically. *Theriogenology* (1982) 17:1.
11. Farrant, J., Walter, C.A., Lee, H. and McGann, L.E.: Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing. *Cryobiology* (1977) 14:273.
12. Farrell, P.S. and Bavister, B.D.: Short term exposure of two-cell hamster embryos to collection media is detrimental to viability. *Biol. Reprod.* (1984) 31:109.
13. Heyman, Y. and Chesne, P.: Freezing bovine embryos: survival after cervical transfer of one half, one or two blastocysts frozen in straws. *Theriogenology* (1984) 21:240 (Abstr.).
14. Kasai, M., Niwa, K. and Iritani, A.: Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.* (1981) 63:175.
15. Krag, K.T., Koehler, I.M. and Wright, R.W. Jr.: A method for freezing early murine embryos by plunging directly into liquid nitrogen. *Theriogenology* (1985) 23:199 (Abstr.).
16. Krag, K.T., Koehler, I.M. and Wright, R.W. Jr.: Trehalose: a nonpermeable cryoprotectant for direct freezing of early stage murine embryos. *Theriogenology* (1985) 23:200 (Abstr.).
17. Leibo, S.P.: Field trial of one-step frozen bovine embryos transferred non-surgically. *Theriogenology* (1983) 19:139 (Abstr.).
18. Massip, A. and Van der Zwalmen, P.: *In vitro* survival of mouse embryos frozen in glycerol or glycerol-sucrose. *Cryo-letters* (1982) 3:326 (Abstr.).
19. Maurer, R.R. and Haseman, J.K.: Freezing morula stage rabbit embryos. *Biol. Reprod.* (1976) 14:256.
20. Mazur, P.: Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science*, (1970) 168:939.
21. Mazur, P.: Kinetics of water loss from cells at sub-zero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J. Gen. Physiol.* (1963) 47:347.
22. Mazur, P., Miller, R.H. and Leibo, S.P.: Survival of frozen-thawed bovine red cells as a function of the permeation of glycerol and sucrose. *J. Membr. Biol.* (1974) 15:137.
23. Miyamoto, H., Fukuroda, T. and Ishibashi, T.: Two-step freezing of mouse embryos using dry ice. *Jpn. J. Zootech. Sci.* (1983) 54:447.
24. Miyamoto, H. and Ishibashi, T.: Solid CO freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.* (1983) 67:

107.

25. Miyamoto, H., Miyamoto, Y. and Ishibashi, T.: Some factors affecting the survival of mouse embryos frozen rapidly by liquid nitrogen vapor. *Jpn. J. Anim. Reprod.* (1986) 32:36.
26. Polge, C. and Willadsen, S.M.: Freezing eggs and embryo of farm animals. *Cryobiology* (1978) 15: 370.
27. Rall, W.F. and Fahy, G.M.: Vitrification: a new approach to embryo cryopreservation. *Theriogenology* (1985) 23:220 (Abstr.).
28. Rapatz, G. and Luyet, B.: The cryopreservation of blood by the method of two-step freezing. *Biodynamica* (1973) 11:169.
29. Renard, J.P., Bui-Xuan-Nguyen, N. and Garnier, V.: Freezing of two-celled rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. *J. Reprod. Fertil.* (1984) 71:573.
30. Renard, J.P. and Heyman, Y.: Variable development of superovulated bovine embryos between day 6 and day 12. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* (1970) 19:119.
31. Renard, J.P., de Rochambeau, H. and Lauvergne, J.J.: Utilization of gametes and embryos banking for the preservation and study of genetic resources in farm animals. In: Fifth World Conf. on Anim. Production, Tokyo, Aug., Scientific Program Committee Tokyo, Plenary session (1983) p. 4.
32. Schneider, J.: Freezing embryos and new technologies. In: Proceedings from the Annual Conf. on A.I. and E.T. in beef cattle. I.E.T.S., Denver January. National Association of Animal Breeders Columbia, MO. (1983) p. 68.
33. Schneider, U. and Mazur, P.: Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology* (1984) 21:68.
34. Seidel, G.E.: Superovulation and embryos transfer in cattle. *Science* (1981) 211:351.
35. Smorag, Z., Katska, L. and Wierzbowski, S.: Some factors affecting the success of embryo freezing, storage before freezing, superovulation rate, PBS concentration, cooling and thawing rates. In: Frozen storage of laboratory animals. Stuttgart. Gustav Fisher (1981) p. 45.
36. Szell, A. and Shelton, J.N.: Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapor. *J. Reprod. Fertil.* (1986) 76:401.
37. Takahashi, Y. and Kanagawa, H.: Quick freezing of mouse embryos by direct plunge into liquid nitrogen vapor: Effects of sugars. *Jpn. J. Vet. Res.* (1985) 33:141.
38. Takeda, T., Elsdon, R.P. and Seidel, G.E., Jr.: Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen. *Theriogenology* (1984) 21:266 (Abstr.).
39. Tsunoda, Y. and Sugie, T.: Survival of rabbit eggs preserved in plastic straws in liquid nitrogen. *J. Reprod. Fertil.* (1977) 49:173.
40. Vincent, C., Heyman, Y., Garnier, V., Smorag, Z. and Renard, J.P.: *In vitro* survival of early-stage rabbit and cow embryos directly frozen to intermediate temperature (-25 to -30°C) before plunging in liquid nitrogen. *Theriogenology* (1985) 23:234 (Abstr.).
41. Whittingham, D.G.: Survival of rat embryos after freezing and thawing. *J. Reprod. Fertil.* (1975) 43:575.
42. Whittingham, D.G., Leibo, S.P. and Mazur, P.: Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -296°C. *Science* (1972) 178:411.
43. Whittingham, D.G. and Whitten, W.K.: Long-term storage and aerial transport of frozen mouse embryo. *J. Reprod. Fertil.* (1974) 36:433.
44. Whittingham, D.G., Wood, M., Farrant, J., Lee, H. and Halsey, J.A.: Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196°C. *J. Reprod. Fertil.* (1979) 56:11.
45. Willadsen, S.M., Polge, C. and Rowson, L.E.A.: The viability of deep-frozen cow embryos. *J. Reprod. Fertil.* (1978) 52:391.
46. Willadsen, S.M., Polge, C., Rowson, L.E.A. and Moor, R.M.: Preservation of sheep embryos in liquid nitrogen. *Cryobiology* (1974) 11:560 (Abstr.).
47. Williams, T.J. and Johnson, S.E.: Quick-freezing of day four mouse embryos. *Theriogenology* (1985) 23:235 (Abstr.).
48. Wilmut, I. and Rowson, L.E.A.: Experiment on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.* (1973) 92:686.
49. Wood, M.J. and Farrant, J.: Preservation of mouse embryos by two-step freezing. *Cryobiology* (1980) 17:178.

Quick Freezing of Bovine Embryos

Chung-Ho Jo, D.V.M., Ph.D., Woo-Suk Hwang, D.V.M., Ph.D., Chang-Kook Cheong, D.V.M., Ph.D.,
Yun-Seong Jeon, D.V.M., Ph.D., Heung-Shik Lee, D.V.M., Ph.D.,
Chang-Woo Lee, D.V.M., Ph.D.,

College of Veterinary Medicine, Seoul National University

Abstract

Quick freezing of bovine embryos was attempted after they were predehydrated at room temperature. Combined solutions of 2M glycerol or 2M ethylene glycol in the presence of either 0.5 or 1.0M sucrose in phosphated buffered saline+20% calf serum were compared.

The quick freezing method in which embryos were directly transferred in liquid nitrogen vapor for 2 minutes at -170°C before being plunged into liquid nitrogen was used.

Post-thaw survival rates in 2M glycerol and 2M ethylene glycol were high with 0.5M (55.6% and 53.3%) versus 1.0M (38.1% and 31.6%) sucrose ($p < 0.05$). But survival rates with 2M glycerol and 2M ethylene glycol were not significantly different.

Transfer thawed embryos frozen with 2M glycerol and 2M ethylene glycol by 0.5M sucrose resulted in birthrates of 40.9% and 40.0%, respectively compared to 26.3% and 27.2%, respectively, for 1.0M sucrose ($p < 0.05$). This was 56.0% for fresh control.