

가축 수정란 동결보존의 최근 이용방법

석 호 봉

단국대학교 축산학과

Current Application of Embryo Cryopreservation for Farm Animals

Ho Bong Seok

Department of Animal Science, Dankook University, Cheonan.

Summary

This paper reviews the most important steps that have generated consistent progress in principles and developmental progress of embryo cryopreservation, and also study on freezing procedure and its application by conventional method and current improved method for freezing procedure and its application of embryo cryopreservation in farm animals. Four were of particular interest:

1. The transport of water across the cell membrane (zona pellucida) during freezing and thawing accordingly plays a role in determining whether the cell survives. This movement of water is controlled mainly by extracellular phase changes and by the nature and concentration of any cryoprotective agent present. The rates of cooling, freezing and warming, and the intervals over which they are applied are further decisive factors in determining whether a cryopreservation procedure allows survival after thawing.
2. The first successful deep freezing experiments with sheep morula and blastocysts during the seventies were based on the early procedures used for mouse embryos. Current research during the eighties is developed with the aim of simplifying and improving current procedures such as one-step dilution and rapid or ultra-rapid cooling by using the model of laboratory animals.
3. The conventional method for the embryo cryopreservation is described. An alternative to this method which may result in high survival and also in reducing of the freezing and thawing time is done by combing a permeable cryoprotectant such as glycerol, DMSO or propanediol and a non-permeable compound such as sucrose, trehalose, raffinose or lactose.
4. Finally a different approach to the preservation of embryos, named vitrification, is introduced. This procedure depends upon the ability of concentrated solutions of cryoprotective agents such as glycerol and propanediol to supercool to very low temperature (-196°C) during rapid cooling before solidifying without formation of ice. However, more complete data are necessary for successful vitrification of blastocysts.

서 론

지난 30년에 걸쳐 가축번식에 응용된 연구업적으로 가축의 빠른 유전개량을 위한 수단으로 우수한 종축을 확보하는 일이었다. 근래에서 가장 중요한 발전중의 하나는 후대검정종모우로부터 생산된 냉

동정액의 인공수정에 의한 활용과 또한나는 과배란과 수정란이식을 통한 무량 절소의 숫컷인 증가라 할수 있다.

소수정란이식 기술의 발전은 특히 수정란선발과 효율적인 관리체계등에 많은 도움을 주고 있다.

수정란을 동결하는 방법이 마우스에서 처음 알려

진(Whittingham 등, 1972; Wilmut, 1972) 이래 17년 이 지난 지금 사람과 가축을 포함하는 여러종류의 포유류에서 수정란을 동결하는 방법이 지속적으로 발전되어 왔다.

수정란의 동결기준은 수란우의 적정수이상 초과 생산된 수정란을 활용할 수 있고 우량종축의 국제간 교역을 편리하게 하며 공란축에 연중생산된 수정란을 동결보존 함으로써 수란축을 적절한 시기에 이식할 수 있고 어떤 후대종모축 검토에 활용되며 희귀 또한 중요품종을 장기 보존하여 질병 자연재해 사회적 변화에 대비할 수 있다. 그외 수정란의 체외수정, 성감별, 핵치환이식술등 예측되는 가축 육종 번식에 대한 학문적연구를 실용적인 목적으로 접근하도록 만든다.

본 원고에서 지금까지 보고한 선인들의 문헌 및 우리들의 시험결과를 참고로 수정란 동결보존의 원리, 발달, 동결처리 및 이용방법에 대하여 검토하고자 한다.

수정란 보존의 원리

포유동물의 수정란과 각종 세포조직등의 대사과정을 냉동처리에 의해서 멈추게 하여 살아있는 상태로 무한정 보존시킬 수 있다. 이들 세포, 즉 수정란을 동결이나 용해를 하는 동안 수정란 세포막을 통과하는 수분의 이동이 수정란이 잠수 있는지를 결정하는 중요한 역할을 한다. 이 수분이동은 세포외적변화(extracellular phase changes)와 그 성질 및 어떤 동결보호제의 농도에 의해 조절되며 냉각속도, 동결속도, 가온(용해) 속도와 그 시간적 간격이 결정적인 요인으로 추가되고 있다(Polge 등, 1949; Meryman, 1966; Mazur 등, 1977, Mazur, 1977, Farrent 등, 1977; Lehn-Jensen, 1986). 다시 말해서 동결이나 용해시에 수정란이 살아있는 가능성은 동결속도와 용해속도, 동결보호제의 종류와 농도, 수정란의 종류에 의존하며 이러한 요인들이 상호작용을 하게 된다. 최적 동결속도는 포유동물 수정란의 분당, 0.3°C (whittingham 등, 1972)부터 사람 시험구의 분당 수천°C (Rapatz 등, 1968)에 이르기 까지 다양하다. 최적 동결속도는 적어도 2 가지 기전에 대해서 달라질 수 있다(Mazur, 1970). 하나는 적정 동결속도 이상일 경우로 세포내 빙정

(ice)의 형성으로 수정란이 죽게되고 다른 하나는 적정속도 이하일 경우로 수정란의 적정동결속도는 세포막의 수분 침투력, 용적에 대한 표면적 비율에 의해 결정된다.(Mazur, 1970).

Fig. 1에서 마우스 수정란의 동결효과를 비교한 것으로 세포내 빙정의 양과 크기는 동결 속도에 의존 한다는 것을 보여주고 있으며 적정속도(0.2°C/min)에서는 수축되나 빙정형성을 볼 수가 없다.

따라서 기본원리는 이들 세포의 생존생물학특성 즉 수정란의 특성에 맞는 적정 동결속도를 연구 개발하는 것으로 소 수정란이면 소 수정란에 알맞는 독특한 동결 프로토콜(protocol)을 개발하여 반응시켜야 한다.

수정란 동결보호제는 크게 두가지로 구분되며 그 기능은 이산의 차이가 있다(Doebbler, 1966; Mazur 등, 1969; Meryman, 1971; Lehn-Jensen, 1986). 즉 glycerol, DMSO, glycols류와 alcohols류등은 침투성 보호제로 동결시 수정란 세포내로 침투하여 얼 농도를 증가 시킴으로써 수분량을 감소시켜 빙형형

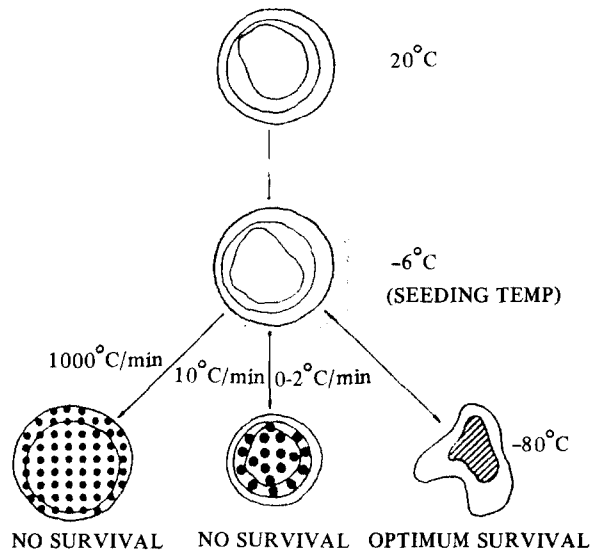


Fig. 1. Effect of cooling on mouse 1-cell embryos. At seeding temperature ice is induced to form outside the zona pellucida. If further cooling is at an optimum rate (around 0.2°C/min), no visible ice forms within the embryo, which becomes shrunken. If the cooling rate is 10° or 1000°C, ice forms within the embryo, and at the faster rate in the zona pellucida (Mazur, 1970)

성을 적게 해서 보호하는 역할을 하는 대신에 sucrose, raffinose, lactose, trehalose, PVP, dextran, serum과 albumin등 비 침투성 보호제는 동결 전에 세포를 수축시켜 수분평형을 변화시키며 동결과 융해시 세포막의 결손을 보호해준다. 수정란을 포함한 포유동물의 세포는 배양액내 어떤 동결보호제 없이도 -196°C 에 생존이 가능하지만 동결 융해시 세포의 결손이 심하게 일어난다(Lehn-Jenson, 1986). 동결보호제의 농도와 동결속도와의 관계는 Fig. 2의 예와 같이 DMSO와 glycerol과 같은 보호제는 완속동결시에 일어나는 세포결손을 보호함으로써 생존율을 높이나(solution effect) 급속동결시는 세포내 결빙형성(formation of intracellular ice)으로 세포결손 효과에는 영향을 주지 못하였다고 하였다(Leibo등, 1970; Mazur 등, 1970).

따라서 수정란의 생존율 향상을 위해서는 동결·융해속도와 보호제의 농도가 적정결합을 이루어야 하는데 만일 완속동결 융해시는 solution effect에 의해서 수정란 배양과 수정란내의 염농도 증가로, 급속동결 융해시는 intracellular ice 형성으로 각각 상해의 원인이 된다고 하였다.

가축 수정란은 축종에 따라 일정한 온도로 하강했을 때 나타나는 반응이 다르다. 돼지 수정란은 15°C 이하의 온도에서 소위 cold shock에 약한 반응을 나타내는 반면에(Wilmut, 1986) (Table 1) 소와 면양 수정란은 발육 단계별로 차이가 나나 대체로 cold shock에 강한 반응을 나타내고 있다(Wilmut 등, 1975, 1986; Willadsen 등, 1976; Niemann, 1988) (Table 2).

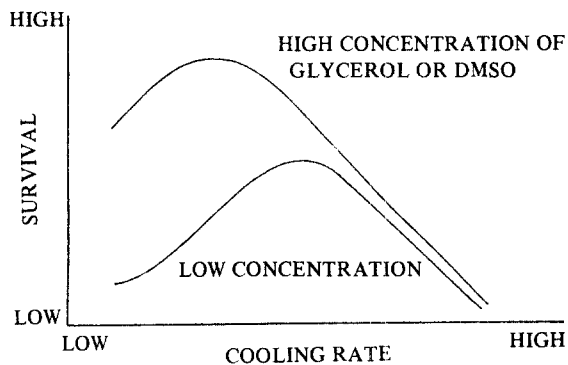


Fig. 2. Glycerol or DMSO protect at low freezing rates, but not at rapid rates (Farrant, 1980).

Table 1. Effect of cooling to a temperature between room temperature and 0°C on subsequent development in culture of 8-cell pig embryos

	Lowest temperature ($^{\circ}\text{C}$)			
	5	10	15	20
No. developed	0	0	16	13
No. cultured	20	18	19	16
% developed	0	0	84	81

(Wilmut, 1986)

Table 2. Percent morphologically intact embryos of various species using an identical cryopreservation protocol

		Cattle		Sheep		Pig		Rabbit	
		Mo	Bl	Mo	Bl	Mo	Bl	Mo	Bl
Total	n	28	36	22	15	10	10	109	21
Morpholog. intact	n	27	34	11	14	0	0	73	13
	%	96.5	94.4	50.0	93.3	0	0	67.0	61.9

Mo = morulae, Bl = blastocysts

(Niemann, 1988)

수정란 동결 보존의 발달

포유동물 수정란의 동결 보존을 생물학, 농학, 의학적 방법의 반복된 실험과정에 의해 표준화 되고 있다. 현재 약 15종의 포유동물의 수정란 수정 개가 성공적으로 보존되고 있다(Lehn-Jensen, 1986).

가축수정란은 농업적 이용 목적을 위해 현재 상업적 이용 판매에 까지 활용되고 있으나 각 육종별 신품종은 활용하지 못하고 있다(Table 3).

1950년대 초에 수정란의 성공적인 냉동기술을 기초로(Smith와 Polge, 1950) 토끼 마우스등 실험 동물의 수정란 동결 보존의 일련의 적용 시험이 있었다. 1960년대에 들어와서는 기본 냉동기술이 개선된 결과로(Mazur, 1963; Mazur 등, 1969;1970) 마우스 수정란의 냉동방법 즉 DMSO와 glycerol을 사용하는 방법이 개발되었다(Whittingham 등 1972; Wilmut, 1972). 이어서 노끼와 쥐 수정란이 같은

방법으로 개발 되었으며 1970년대에 들어와서는 실험동물 보다는 가축에 대한 연구가 활발해 지기 시작하였다. 가축중 처음으로 냉동실험에 성공한 종은 편양으로 마우스 수정란의 동결방법을 기초로 개발되었다(Willadsen 등, 1974; 1976).

소 수정란의 발육 단계인 compacted morula (day 6 1/2)기가 blastocysts (day 7 1/2)기까 다른 기에 비해 저온 처리에 강하다는 결론을 얻었다(Wilmut 등, 1975; Traunson 등, 1976) 또 말의 blastocysts (day 6)기 역시 저온 처리에 잘 견디는 결과가 나왔다(Willadsen, 1980; Yamamoto, 1982; Slade 등, 1984). 1980년대에 들어와 마우스와 토끼등의 무한한 실험재료를 활용하여 여러종의 경제 가축에 대한 수정란 동결 처리가 더욱 간편해지고 실험적인 방향으로 연구되고 있다. 예를 들면 1단계 스트로 희석법(one-step straw dilution method) 흡입 또는 초급속 동결법(rapid or ultrarapid freezing method) 등의 새로운 연구방법등을 할 수 있다(Table 3).

Table 3. Interspecies variation in developmental stages that survive between conventional and rapid cryopreservations

Species	Conventional cryopreservation		Rapid or ultra rapid cryopreservation	
	Develop. stages	References	Develop. stages	References
Mouse	Unfertilized oocyte	Whittingham et al., 1972	2-8 cell	Rall & Fahy, 1985
	1-8 cell, morula, blastocyst	Wilmut, 1972 Whittingham, 1974, 1977	Morula & early blastocyst	Rall et al., 1987 Miyamoto & Ishibashi, 1986 Sheffen et al., 1986
Rat	2-8 cell	Whittingham, 1975	Compacted morula, expanding blastocyst	Chupin, 1986
Rabbit	2-8 cell, morula, blastocyst	Whittingham & Adams, 1974, 1976 Maurer, 1977	2 cell	Vincent et al., 1988
Sheep	Morula, blastocyst	Willadsen et al., 1974, 1976, 1977	Day 6½-7½	McGinnis, 1989
	Compacted morula blastocyst	Trounson, 1976 Willadsen, 1980 Wilmut et al., 1975	Morula, expanded blastocyst	Chupin, 1987 Massip et al., 1987, 1989
Horse	Early blastocyst	Yamamoto, 1982 Slade et al., 1984		

Table 4. Effect of embryo quality on conception rate after transfer of cattle embryos with or without freezing and thawing

Embryo quality	Direct transfer	Frozen and thawed	Proportion surviving freezing and thawing
1	217/276 (78.6)	238/340 (68.8)	87.5
2	43/68 (63.2)	30/66 (45.5)	71.2
3	20/48 (41.7)	3/11 (27.3)	65.5
Overall			74.7

(Wilmot, 1986)

수정란 동결 처리의 기준방법

수정란의 동결 처리방법중 가장 널리 사용하고 있는 기준방법 (Conventional method)을 개략하면 다음과 같고 저온 이 방법에 조금씩 개선 또는 추가 되고 있다.

1. 수정란 선발 (Selection of embryos)

과배란 처리된 방란관에서 수집된 수정란을 임체 현미경을 이용해서 동결 보존용 수정란으로의 적부 판정을 해야한다. 검사기준에 의거 excellent (grades 1)이나 good (grades 2)으로 판정된 것이 다른 것에 비해서 수태율이 높았다 (Table 4).

2. 평형처리 (Equilibration in cryoprotective solution)

수정란의 동결 처리 전에 유해 효과를 최소화하기 위한 보존용 첨가액에 평형 처리가 필요하다. 널리 사용되는 액으로는 MOPBS (modified duebacco phosphate-buffered saline)에 1.5 M glycerol을 첨가한 액이다. Fig. 3과 같이 1-2M (10~20%) glycerol농도 일 때가 solution effect가 적은 낮은 농도를 유지할 수 있다고 하였다 (Wilmot, 1986).

평형 처리는 수정란을 이용액에 넣고 실온에서 약 10~30분간 침두시키 동결 처리용 용기에 넣는다.

3. 동결처리 (Controlled cooling)

동결 과정은 세포내 빙정의 과다 형성으로 치명적 손상을 피하기 위한 적절한 냉수 과정을 지켜야 한다. 이렇게 함으로써 수정란 부유액 내에 빙정의

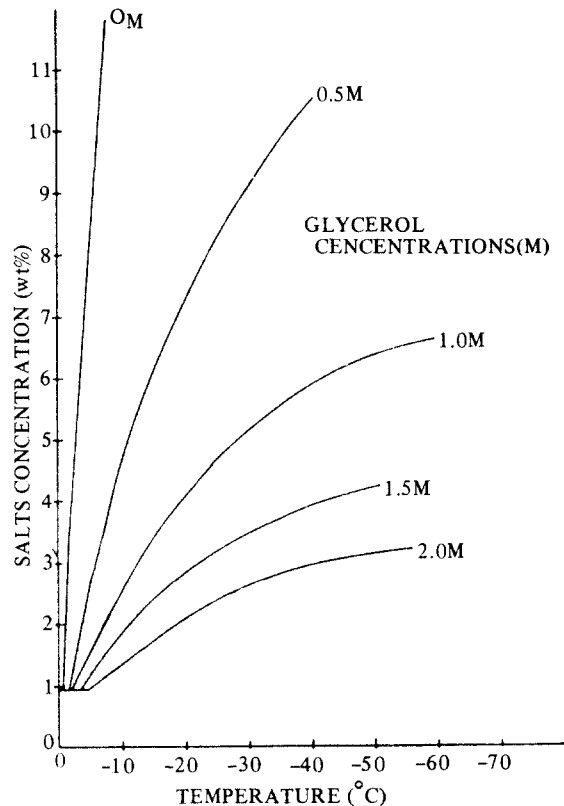


Fig. 3. Effect of glycerol concentration on the concentration of salts in phosphate-buffered physiological saline cooled to subzero temperatures (Wilmot, 1986).

형성과 발육을 조절할 수 있도록 한다. 처리는 실온에서 -6~-7°C 까지 분당 1°C 속도로 급속 냉동 (super cooling)시키며 일정시간 (5~10분) holding 하면서 수정란을 집하고 있는 용액을 빙정형성 (ice seeding)이 되도록 유도한다. Seeding 하는 이유는 수정란이 포함된 보존액이 실제 결빙하기 직전에

인공적으로 결빙시킴으로써 돌발적인 냉각을 방지하기 위해서 이다(Fig. 4).

이어서 분당 0.25~0.4°C 속도로 -30°C~-38°C 까지 천천히 동결한후 짧은시간(5~10분) 마지막 온도에서 holding하였다가 -196°C 액체 질소에 넣어 보존한다.

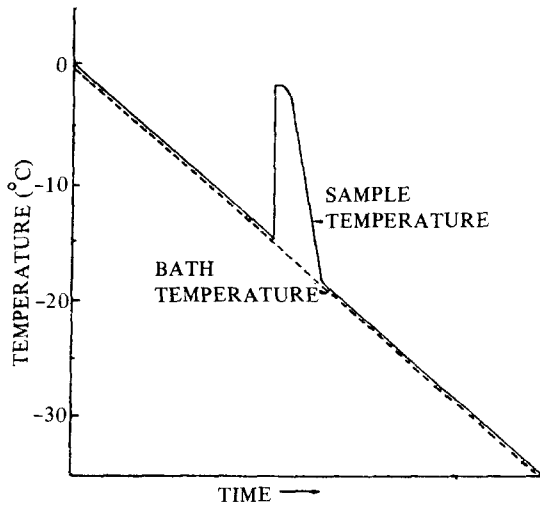


Fig. 4. Effect of supercooling on sample temperature when the sample was held in a cooling bath without seeding (Wilmot, 1972, 1986)

4. 보존 조건(Storage condition)

장기간 보존을 액체 질소속에 보존함으로써 가능하다. 물리, 화학적, 생물, 방사능학적 연구 계산에 의하면 어와 같이 보존된 수정란은 수백, 수천 년 동안 생존이 가능하다고 하였다. 그러나 일단 응해(가온)한 후 재동결 했을 때는 되돌릴 수 없는 상해를 받게된다.

5. 가온처리(Controlled warming)

처리된 동결 수정란을 액체 질소에 넣기 전의 온도와 속도에 의하여 가온처리가 다르다(Table 5, 6과 7).

일반적으로 급속 동결에는 급속 가온처리가 최적 생존을 유지할 수 있다. 사용한 용기가 ampales 이나 straws에 따라 달라지나 온도조 보류 장치(+20°C~+37°C)중에 노출시킨다.

Table 5. Effect on survival of sheep embryos of varying the rate of warming and the temperature from which the samples were transferred to liquid nitrogen^{a, b}

Transfer temperature (°C)	Slow warming (4°C/min)	Rapid warming (360°/min)
-30	—	2/5 (40)
-36	0/5 (0)	7/10 (70)
-42	2/15 (13)	4/15 (27)
-48	8/20 (40)	7/20 (35)
-54	15/20 (75)	6/20 (30)
-60	12/18 (67)	4/20 (20)

^a Morulae and blastocysts in the presence of 1.5 M DMSO were cooled at 0.3 or 0.1°C/min to one of the temperatures shown (See Willadsen, 1977, for details.)

^b Proportion of embryos surviving with the percentage shown in parentheses

Table 6. Effect of warming rate on survival of 8-cell mouse embryos cooled at 0.5°C/min to -80°C in the presence of 1.5 M glycerol

	Warming rate (°C/min)		
	2	25	500
No. of embryos (replicates)	131 (9)	137 (9)	108 (7)
% survival (mean ± SE)	86.0 ± 2.5	80.6 ± 4.1	75.4 ± 4.9

(Rall and Polge, 1984)

Table 7. Effect of warming rate on the survival of 8-cell mouse embryos cooled at 0.5°C/min to -65°C in the presence of 1.5 M propylene glycol

	Warming rate (°C/min)			
	2	25	500	800
No. embryos (replicates)	114 (6)	120 (6)	116 (5)	77 (5)
% survival (mean ± SE)	73.6 ± 4.4	70.5 ± 4.3	83.1 ± 3.9	69.5 ± 4.2

(Rall and Polge, 1984)

6. 동결 보호제 희석(Dilution of cryoprotective additives)

용해된 수정란을 수란속에 이식하기 전에 수정란과 같이 있는 동결 보호제를 제거시켜야 하는데 이렇게 함으로써 과도의 osmotic swelling과 물리적 상해를 피할 수 있다. 두가지 방법에 의한 희석법을 사용하고 있는데 첫째는 계단 희석법(stepwise dilution method)으로 수정란 부유액에 있는 보호제 농도를 5~10분 간격으로 단계 희석시키는 방법이다. 두번째는 sucrose 희석법(sucrose dilution method)으로 보존액을 sucrose와 같은 비 침투성 액을 첨가 함으로써 첫번째와 같은 농도로 희석되도록 한다. sucrose는 보존액이 수정란 밖으로 유출되므로써 일어나는 osmotic swelling을 방지할 수 있다. 보존액으로부터 수정란이 분리되어 sucrose가 빨리 희석되면서 이식할 준비가 된다(one-step dilution).

7. 수정란 생존 능력 평가(Evaluation of embryos)

수정란을 현미경으로 경검해서 형태적으로 오염되었거나 상해를 받은 것은 제외시켜 수태율을 향상시킬 수 있다. 수정란의 생존 여부는 형태적으로 판단하기 어렵기 때문에 CO₂ 배양 색소염색 및 형

광염색 등으로 확인할 수 있지만 문제는 이식하기까지 정상 수정란으로 유지시켜야 하며 생존에 어떤 영향이 미치는 처리 과정은 피해야 한다.

수정란 동결 처리의 새로운 방법

가축 수정란의 저온 보존을 위한 실험의 모델로써 마우스 수정란을 이용하여 여러가지 기본 실험을 거쳐 간단하고 효과적인 방법을 빠르고 실질적인 방법으로 개선해 왔다.

Fig. 5는 지금까지 알려진 4가지 동결방법을 도해한 그림(Massip 등, 1989)으로 Fig. 5의 a는 전통적인 기준방법(conventional method)에 의한 동결 방법으로 노력과 시간이 많이 소모되는 것으로 각국의 여러 학자에 의해 개선된 방법이 소개되고 있다. 최근 Willadsen(1977)은 멸양 수정란에서 계속적인 최저 온도로 위한 동결에 의한 평형이 이루어 지지 않는 상태에서 생존율이 높았다는 사실로 기존의 평형 처리를 이용하지 않고도 동결할 수 있다고 하였다.

Fig. 5의 b는 Fig. 5의 a에 의해서 걸리는 시간의 반이 절약되며 임상적 조건하에서 상해된 과정의 동결 처리가 가능하다. 이 처리과정에서 동결된 세포 외액과 탈수된 세포질이 응결되지 않고 빙점 이

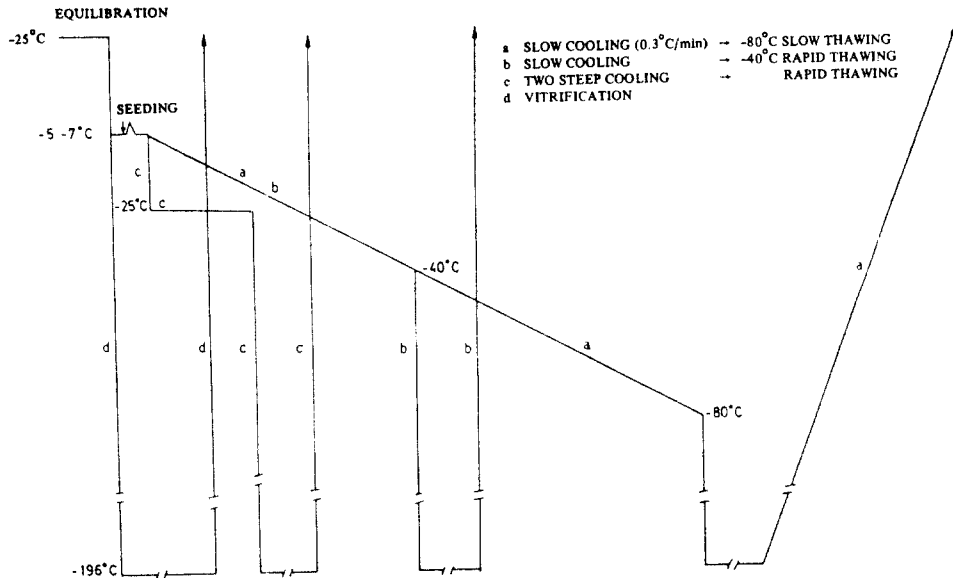


Fig. 5. Schematic representation of the different cryopreservation methods (Massip et al., 1989)

하로 냉각되면서 급속 냉각처리에 따른 안결한 유리(glass)와 현상으로 바꾸어 진다(Rall 등, 1984).

이때 가온 처리는 유리화된 세포질과 세포 외액의 탈 유리화(빙결화)를 방지하기 위하여 급속 가온 방법이 필요하다. 이 방법으로 수정란을 최종 냉각후 액체집소에 옮기기 직전 같은 온도에서 holding 처리(Smorag 등, 1981)하거나 Fig. 5의 c와 같이 단계 냉각처리(Kasai 등, 1980; Wood와 Farrant, 1980)로 보다 빠르고 효율적인 동결 처리법이 소개되고 있다.

동결 수정란의 생존율을 높이기 위한 방법으로 glycerol이나 propanediol 같은 침투성 보호제와 sucrose(Renard 등, 1984; Chupin; 1986), trehalose(Smorag 등, 1986), raffinose(Richard 등, 1988)와 lactose(Takahashi와 Kanagawa, 1988)와 같은 비침투성 화합물을 같이 사용한다.

수정란을 동결하고 용해하는 과정에서 보호액이 중요하다. 동도 선택은 중요하다(Smorag 등, 1981; Whittingham, 1981; Miyamoto와 Ishibashi; 1983; Renard, 1985; Miyamoto와 Ishibashi, 1986). 예를 들면 고농도는 급속 냉동을 필요로 하나 대신에 독성 효과가 크다. 용해후 세포내 남아있는 보호제를 제거해야만 osmotic stress로 인한 장애를 방지할 수 있다. 낮은 농도에서 높은 농도로 단계 희석하게 함으로써 세포와 보호액의 농도를 낮출 수 있다. 침투성 보호제가 제거되는 동안 수정란의 osmotic swelling이 더 이상 일어나지 않도록 만들며 비 침투액인 sucrose에 의해 세포가 수축되도록 한

다(Leibo와 Mazur, 1978).

동결 보존액을 다른 2가지 제기 과정으로 달리 했을 때 나타나는 효과는 Fig. 6과 같다(Renard, 1986).

Sucrose 첨가 방법은 다른 방법에 비하여 수정란의 양적 변화를 적게 함으로써 나쁜 악영향을 방지할 수 있다(Schneider와 Mazur, 1984).

Sucrose 희석 방법은 Renard 등(1982)과 Leibo (1984)에 의해 0.25ml 표준 정액의 수정용 plastic straw로 대신하게 되어 소위 "1 단계 처리법"이 소개되었다. Straw에 동결액(수정란)과 sucrose 액을 약 1:10의 비율로 하여 경계부위를 air bubble로 충전하였다(Leibo, 1984) (Fig. 7).

용해후 수정란이 sucrose액과 잘 섞이도록 한후 비희석액으로 정액 주입과 같은 방법으로 이식한다. 소에서 이 방법 또는 응용된 방법으로 얻어진 성적은 Leibo(1986, 1985)가 42.4~45.2%,鈴木(1986)이 47.2~55.8%, Massip 등(1989)이 51.8%의 임신율로 아직 낮은 비율이다. 최근 Rall과 Fahy (1985)는 비수소 수정란을 유리화(vitrification)에 의한 방법으로 성공적으로 동결할 수 있었다.

Fig. 5의 d와 같이 PBS에 포함된 농축된 보호제를 냉각시 빙결화하지 않고 집조화 되면서 유리화 같이 딱딱하게 변한다. 이때 동결되는 수정란이 고 침투성 상태나 세포 빙결 형상으로 부티의 문제점을 없지만 보호제의 농도나 침투성 장애를 받을 수 있는데 보호제의 농도, 노출 시간 및 온도에 영향을 받는다. Rall과 Fahy는 이러한 요인을 여러가

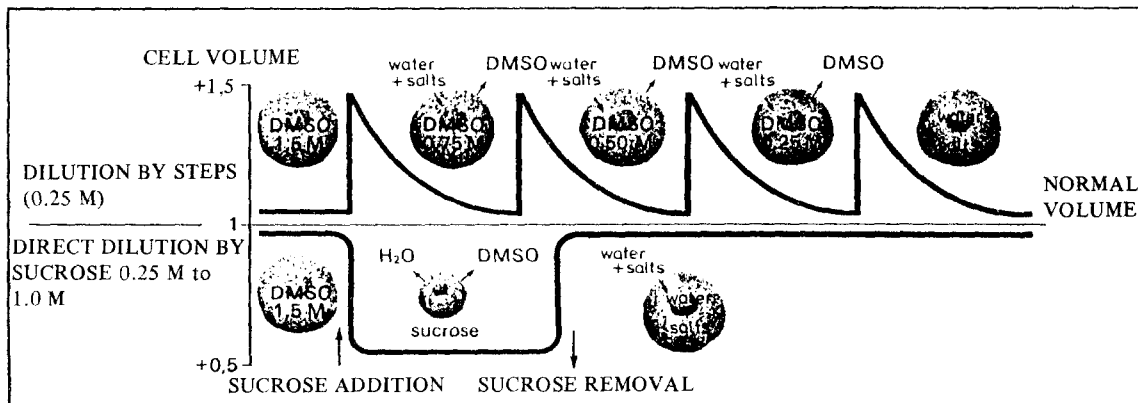


Fig. 6. The two procedures for dilution of cryoprotectant, DMSO 1.5 M (Renard, 1986).

RIO VISTA "ONE-STEP" STRAW

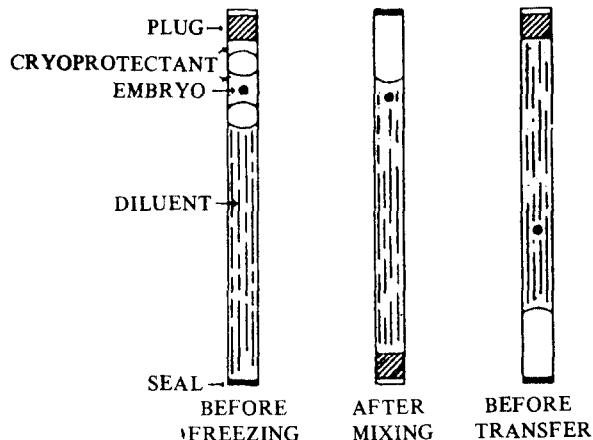


Fig. 7. One step in situ dilution method of Leibo (1984).

Glycerol은 수정란에 널리 이용되는 보호제이며 propanediol 역시 생존율이 높고 독성이 적은 안전한 화합물이다(Boutron과 Kaufmann, 1979). 최근 Massip 등(1989)은 마우스 수정란의 유리화 동결처리로 좋은 성적을 보고 하였으나(Table 8) 소수정란은 38.1%의 수태율로 저조하였고 배반포기의 수정란은 전혀 수태되지 않았다(Table 9).

새로운 방법에 의한 동결 처리의 요점을 소개하면 동결 보호제 중 glycerol과 propanediol의 적정 비율은 독성이 적고 propanediol의 비결성 상태를 유지하기 위하여 각각 10~20%의 농도로 평형처리 했으며 동결액의 비유리화를 피하기 위하여 25~25%의 2 가지 혼합 용액과 1 Mol의 sucrose 희석액을 straw에 분리 충전하여 직접 액체질소통에 담구어 동결하였다(Fig. 8).

Table 8. In vitro survival of day 4 embryos vitrified after 10 min at ambient temperature in the equilibration medium

Stage of development	No. of embryos frozen/thawed (no. replicates)	In vitro (%)	σ
Compacted morula	136 (7)	80.1	0.08
Early blastocyst	151 (7)	80.8	0.049
Blastocyst	223 (10)	39	0.199

(Scheffen et al., 1986 & Massip et al., 1989)

Table 9. Results of 3 months gestation after transplantation non-surgically with vitrified embryos

Stage of development	Gestations/Embryos vitrifies	%
Late morulas or early blastocysts	16/42	38.1
Blastocysts	0/13	0.0

(Massip, 1987, 1989)

지 노출온도와 시간에서 DMSO, acetamide, propylene glycol 및 polyethylene glycol 등 4 가지 보호제를 비교하였다. 최근 마우스(Miyamoto와 Ishibashi, 1986; Ko와 Thelfall, 1988)와 소(Massip 등, 1989) 수정란을 동결하는데 glycerol과 1,2 propanediol을 사용하여 높은 생존율을 보고하고 있다.

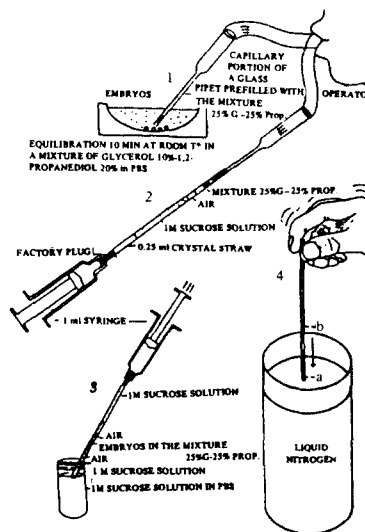


Fig. 8. Schematic representation of the different steps of the vitrification procedure (Massip et al., 1987).

참 고 문 헌

이 성적(Table 8) 중 쌍살배나 초기 배반포기의 성적(80%)은 좋으나 배반포기의 수정란 동결 성적(39%)은 떨어져 삼투작용과 보호제의 투과율 또는 희석 과정등에 대한 추가 연구보고(Chupin, 1987)가 있으나 아직까지 어느 한쪽이 획기적으로 진전된 바는 없다. 따라서 유리화에 의한 동결방법은 현재 많은 관심이 집중되고 있지만 실용적인 면에서 생존율 향상을 위해 특히 처리방법과 보호제에 관한 추가연구가 있어야 할 것이다.

결 론

본 원고는 지금까지 보고된 선인들의 문헌 및 시험결과를 참고로 수정란 동결보존의 원리, 발달과정과 동결처리 및 이용방법에 대하여 기존방법과 최근 실용적인 개선방법을 중심으로 검토하였다.

1. 수정란의 세포막(투명대)을 통과하는 수분의 이동이 수정란 생존여부를 결정하는 중요 역할을 한다. 수분이동은 세포외적 변화와 그 성질 및 동결보호제의 농도에 의해 조절되며 냉각속도 동결속도, 융해속도와 2 시간적 간격이 결정적인 요인이 된다.

2. 가축의 동결수정란에 대한 첫연구는 1970년대에 면양에서 마우스 수정란의 동결방법을 기초로 개발되었다. 1980년대에 들어와 실험동물을 모델로 가축의 수정란 동결처리가 보다 간편해지고 실용적인 방법 즉 1단계 희석법과 급속 또는 초급속 동결법이 소개되었다.

3. 수정란 동결처리의 기존방법에 대하여 기술하였다. 기존방법의 동결 및 융해시간을 줄이고 생존율을 높이기 위한 방법으로 glycerol, DMSO, propanediol 같은 침투성보호제와 sucrose, trehalose, raffinose, lactose 같은 비침투성 보호제의 사용으로 단계희석의 축소 또는 1단계 희석법을 택한다.

4. 수정란을 유리화하므로써 동결처리하는 다른 방법이 소개되었다.

적절한 동결보호제 즉 glycerol과 propanediol의 일정농도로 직접 액체질소(-196°C)에 급속냉동 시킴으로써 빙결이 형성되는 대신에 유리모양의 고형화로 동결된다. 배반포기의 동결성적이 떨어져 이에 대한 보완이 요구된다.

- Boutron P and Kaufman A. 1979. Stability of the amorphous state in the system water 1-2 propanediol. *Cryobiology*, 16:557-568.
- Chupin D. 1986. Quick freezing of rat and cow embryos after dehydration at room temperature. Workshop on embryos and oocytes freezing. In: Y. Menezes and Ch. Merieux (Editors), Collection Fondation Marcel Merieux, Lyon, pp.165-176.
- Chupin D. 1987. Quick freezing of day 7 bovine blastocysts: Optimum parameters of dehydration step. *Theriogenology*, 27:219.
- Doebbler GF. 1966. Cryoprotective compounds. Review and discussion on structure and function. *Cryobiology*, 3:2-11.
- Farrant J. 1980. General observation on cell preservation. In: Low temperature preservation in medicine and biology. Ditman medical (Ashwood-Smith, M.J. & Farrant, J. eds) pp.1-18.
- Johnson MH and Pickering SJ. 1987. The effect of dimethyl sulfoxide on the microtubular system of the mouse oocyte. *Development*, 100: 313-324.
- Kasai M, Niwa K and Iritani A. 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J. Reprod. Fertil.*, 59: 51-56.
- Ko Y and Threlfall WR. 1988. The effects of 1,2-propanediol as a cryoprotectant on the freezing of mouse oocytes. *Theriogenology*, 29: 987-995.
- Lehn-Jensen H. 1986. Cryopreservation of bovine embryos: An evaluation of factors influencing the survival of day 6.5-7.5 embryos during freezing and thawing. A/S Carl. Fr. Mortensen, Copenhagen, pp.17-30.
- Leibo SP. 1983. A one-step in situ dilution method for frozen thawed bovine embryos. *Cryo-Letters*, 4:387-400.
- Leibo SP. 1984. A one-step method for direct nonsurgical transfer frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 21:767-790.
- Leibo SP. 1985. Field trial of one-step diluted frozen-thawed bovine embryos: An update. *Theriogenology*, 23:201.

- Leibo SP. 1986. Commercial production of pregnancies from one-step frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 25:166.
- Leibo SP and Mazur P. 1978. Methods for the preservation of embryos by freezing. In: J.C. Daniel (Editor), *Methods in Mammalian Reproduction*. Academic Press, New York, NY, pp.179-201.
- Leibo SP, Farrant J, Marzur P, Hanna MG and Smith LH. 1970. Effect of freezing on marrow stem cell suspension: Interactions of cooling and warming rate in the presence of P.V.P., sucrose or glycerol. *Cryobiology*, 6:315-332.
- McGinnis LK, Duplantis, SC, Jr, Waller SL and Youngs CR. 1989. The use of ethylene glycol for cryopreservation of sheep embryos. *Theriogenology*, 31:226.
- Massip A and Sohneider U. 1986. Osmotic response of preimplantative mouse and bovine embryos and their cryobiological implications cell. *Biophysics*, 8:259-284.
- Massip A, Van der Zwalman P and Ectors F. 1987. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology*, 27:69-79.
- Massip A, Van der Zwalmen P, Scheffen B and Ectors F. 1989. Some significant steps in the cryopreservation of mammalian embryos with a note on a vitrification procedure. *Anim. Reprod. Sci.*, 19: 117-129.
- Mazur P. 1963. Kinetics of water loss from cells at sub-zero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J. Gen. Physiol.*, 47:47-369.
- Mazur P. 1970. The freezing of biological systems. *Cryobiology*, 168:939-949.
- Mazur P. 1977. Slow-freezing injury in mammalian cells. In: *The freezing of mammalian embryos*. (Elliott, K. & Whelan, J. eds.). Ciba Found. Symp. No. 52. Elsevier, Amsterdam, pp.19-42.
- Mazur P, Farrant J, Leibo SP and Chu EHY. 1969. Survival of hamster tissue cells after freezing: Interaction between protective solutes and cooling and warming rates. *Cryobiology*, 6:1-9.
- Mazur P, Leibo SP, Farrant J, Chu EHY, Hanna MG and Smith LH 1970. Interaction of cooling rate warming rate and protective additive on the survival of frozen mammalian cells. In: *The frozen cell*. (Wolstenholme C.E.W. & O'Connon, M. eds.) Ciba Found. Symp. Chulchill, London, 69-85.
- Meryman HT. 1966. Review of biological freezing. In: *Cryobiology*. (Meryman, H.T. ed.). Academic Press, N.Y. pp.1-144.
- Meryman HT 1971. Cryoprotective agents. *Cryobiology*, 8:173-183.
- Miyamoto H and Ishibashi T. 1983. Solid CO₂ freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 67:107-111.
- Miyamoto H and Ishibashi T. 1986. Liquid nitrogen vapour freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 78:471-478.
- Moor RM and Crosby IM. 1985. Temperature induced abnormalities in sheep oocytes during maturation, *J. Reprod. Fert.*, 75:467-473.
- Niemann H. 1988. Recent results of freezing experiments with embryos from farm animals. *Workshops on embryos and oocytes freezing*, Coolection Fondation Marcel Merieux, pp.195-204.
- Pickering SJ and Johnson MH. 1987. The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Human Reprod.*, 2:207-216.
- Polge C, Smith AU and Parkes AS. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature (Lond)*, 164:666.
- Rall WF. 1986. Embryo cryopreservation: Current application prospects for the future. In: *Proceedings of the Annual Conference on Artificial Insemination National Association of Animal Breeders*, Denver, Colorado, 48-52.
- Rall WF. 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, 24:387-402.
- Rall WF, and Polge C. 1984. Effect of warming rate on mouse embryos frozen and thawed in glycerol. *J. Reprod. Fertil.*, 70:285-292.
- Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 313:573-575.
- Rall WF, Reid DS and Farrant J. 1980. Innocuous biological freezing during warming. *Nature*, 286:

- 511-514.
- Rall WF, Wood MJ, Kirby C and Whittingham DG. 1987. Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification, *J. Reprod Fertil.*, 80:499-504.
- Rapatz G, Sullivan JJ and Luyet B. 1968. Preservation of erythrocyte in blood containing various cryoprotective agents, frozen at various rates and brought to a give feral temperature, *Cryobiology*, 5:18-25.
- Renard JP. 1985. The cryopreservation of mammalian embryos. In: J. Testard and R. Frydman (Editors), *Human Fertilization In Vitro, Actual Problems and Prospects*. Elsevier, Amsterdam, p.201.
- Renard JP. 1986. La congelation de l'embryon humain. *Medecine/Science*, 2:26-34.
- Renard JP, Heyman Y and Ozil JP. 1982. Congelation de l'embryon bovin: Une nouvelle methode de decongelation pour le transfert cervical d'embryons conditionnes une seule fois en paillettes. *Ann. Med. Vert.* 126:23-32.
- Renard JP, Bui Xuan Nguyen N and Garnier V. 1984. Two-step freezing of two-cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. *J. Reprod. Fertil.*, 71:573-580.
- Richards DW, Sikes JD and Murphy CN. 1988. Nonsurgical transfer and the survival of frozen-thawed bovine embryos supplemented with raffinose. *Thriogenology*, 29:296.
- Scheffen B, Van Der Zwalmen P and Massip A. 1986. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. *Cryo-Letters*, 7:260-269.
- Schneider U and Mazur P. 1984. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen thawed embryos. *Theriogenology*, 21:68-79.
- Slade NP, Takeda T Squires EL and Elsdon RP. 1984. Development and viability of frozen-thawed equine embryos. *Theriogenology*, 21:263 (Abstr.).
- Smith AU and Polge C. 1950. Storage of bull spermatozoa at low temperatures. *Vet. Rec.*, 62:115-116.
- Smorag Z, Katska L and Wierzchos E. 1981. Some factors affecting the viability of mouse and cattle embryos frozen to -40°C before transfer to liquid nitrogen. *Anim. Reprod. Sci.*, 4:65-72.
- Smorag Z, Katska L and Wierzbowski S. 1981. Some factors affecting the success of embryo-freezing: Storage before freezing, superovulation rate, PBS concentration, cooling and thawing rates. In: G.H. Zeilmaker (Editor), *Frozen Storage of Laboratory Animals*. Fischer, Stuttgart, pp.45-53.
- Smorag Z, Katska L, Skrzyszowska M and Wieczorek B. 1986. Freezability of oocytes and embryos of laboratory and domestic animal. In: Y. Menezes and Ch. Merieux (Editor), *Work-shop on embryos and oocytes freezing*. Collection Fondation Marcel Merieux, pp.59-77.
- Szell A and Shelton JN. 1986. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. *J. Reprod. Fertil.* 76:401-408.
- Szell A and Shelton JN. 1987. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solutions on day-3 mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.* 80:309-316.
- Takahashi Y and Kanagawa H. 1988. The role of lactose in quick freezing of mouse embryos. *Theriogenology*, 29:315.
- Trounson A, Peura A and Kirby C. 1987. Ultra rapid freezing; A new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil. Steril.*, 48:843-850.
- Trounson A, Willadsen SM, Rowson LEA and Newcomb R. 1976. The storage of cow eggs at room temperature and at low temperatures. *J. Reprod. Fertil.*, 46: 173-178.
- Van Der Zwalmen P, Gaurois B, Ectors F-J, Touati, K, Massip, A. and Ectors F. 1988. Some factors affecting successful vitrification of mouse blastocysts. *Theriogenology*, 30:1177-1183.
- Van Der Zwalmen P, Touati K, Ectors FJ, Massip A, Beckers JF and Ectors 1989. Vitrification of bovine blastocysts. *Theriogenology*, 31:270.
- Vincent C, Heyman Y, Garnier V and Renard JP. 1988. Cryopreservation of ovulated rabbit oocytes: Cryoprotectant effect on microfilament and

- microtubule organization. *Cryobiology*, 25:100-102.
- Whittingham DG. 1974. The viability of frozen thawed mouse blastocysts. *J. Reprod. Fertil.*, 37:159-162.
- Whittingham DG, Leibo SP and Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -129°C . *Science N.Y.*, 178:411-414.
- Willadsen SM. 1977. Factors affecting the survival of sheep embryos during freezing and thawing. In: K. Elliot, I. Whelan, *Ciba Found. Symp. No. 52, The freezing of Mammalian Embryos*. Elsevier, Amsterdam, pp.175-201.
- Willadsen SM. 1980. Deep freezing of embryos in the large domestic species. In: *Proc. 9th Int. Cong. Anim. Reprod. & AI., Madrid II: 255-261*.
- Willadsen SM, Polge C, Rowson LEA and Moor RM. 1974. Preservation of sheep embryos in liquid nitrogen. *Cryobiology*, 11:560 (Abst.).
- Willadsen SM, Polge C, Rowson LEA and Moor RM. 1976. Deep freezing of sheep embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 46:151-154.
- Wilmot I. 1972. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse during freezing and thawing. *Life Sci.*, 2:1072-079.
- Wilmot I. 1986. Cryopreservation of mammalian eggs and embryos. In: *Developmental biology, a comprehensive synthesis (vol 4), manipulation of mammalian development (Gwatkin, R.L. eds.) Plenum Press, pp.217-247*.
- Wilmot I, Polge C and Rowson LEA. 1975. The effect on cow embryos of cooling to 20.0 and -196°C . *J. Reprod. Fertil.*, 45:409-411.
- Whittingham DG. 1981. Sensitivity of mouse embryos to the rate of thawing. In: G.H. Zeilmaker (Editor), *Frozen Storage of Laboratory Animals*. Fischer, pp.21-32.
- Wood MJ and Farrant J. 1980. Preservation of mouse embryos by two-step freezing. *Cryobiology*, 17:178-180.
- Yamaoto Y, Oguri N, Tsutsumi Y and Hachinohe Y. 1982. Experiments in the freezing and storage of equine embryos. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)* 32:399-403.
- 鈴木達行. 1986. 牛受精卵凍結保存技術と新しい展望: 1段階ストロー法, 畜産の研究, 40:7-11.