

동결액의 평형방법과 희석방법이 초자화 동결된 소 체외수정란의 생존성에 미치는 영향

김정익 · 유재원* · 박춘근 · 양부근 · 정희태
강원대학교 축산대학

Effects of Equilibration and Dilution Methods on the Survival of Vitrified Bovine IVF Embryos

C. I. Kim, J. W. Yoo *, C. K. Park, B. K. Yang and H. T. Cheong
College of Animal Agriculture, Kangwon National University

SUMMARY

This study was conducted to investigate the effects of equilibration and dilution methods on the survival rate of vitrified IVM-IVF bovine blastocysts.

Vitrification solution was composed with 20% glycerol, 20% ethylene glycol, 3/8 M sucrose and 3/8 M dextrose in D-PBS supplemented with 20% FBS (GESD). Embryos were equilibrated in 1 of 3 methods: 3-step (E1), 2-step (E2), or 1-step (E3), and after loading into 0.25-ml straws, were plunged into liquid nitrogen. After warming in water bath at 20°C, cryoprotectants were diluted in 1 of 3 methods: 1) D1(VS+1/2 M sucrose, 1/2 M sucrose and 1/4 M sucrose), 2) D2 (1/2 M sucrose and 1/4 M sucrose), or 3) D3(1/2 M sucrose only). All procedures except warming were conducted at room temperature.

Survival and hatching rates of blastocysts and expanded blastocysts following equilibration methods were 50 and 83.6%, and 27.8 and 67.3%, respectively in E1, which were significantly higher ($P<0.01$) than those of E2 (16.7 and 23.2%, and 7.4 and 12.5%, respectively) and E3 (0 and 3.7%, and 0 and 0%, respectively). Survival and hatching rates of expanded blastocysts were significantly ($P<0.01$) higher than those of blastocysts in E1. Survival rates of blastocysts and expanded blastocysts following dilution methods were 52% and 80.6% in D2, which were significantly higher ($P<0.05$) than those of D1 (29.6 and 48.3%) and D3 (47.2 and 63.8%). Hatching rates of blastocysts were similar in D1, D2 and D3, however in expanded blastocysts, that of D2(61.3%) was significantly higher ($P<0.01$) than that of D1(34.5%). Survival rates of expanded blastocysts in D1 and D2, and hatching rates in D2 and D3 were significantly higher($P<0.01$) than those of blastocysts.

These results indicate that the viability of vitrified blastocysts was improved by the several steps of equilibration, and by 2-steps dilution after warming, independently of their stage of development. The results also indicated that the expanded blastocysts are more profitable to vitrification than blastocysts.

(Key words: vitrification, equilibration, dilution, bovine, IVF embryo)

본 논문은 1997년도 농학계 특성화대학 강원도 연구지원금에 의하여 연구되었음.
*강원도 축산기술연구센터(Livestock Research Center, Kangwon-do)

서 론

포유동물 수정란의 초자화동결은 1985년에 Rall과 Fahy가 DMSO(dimethyl sulfoxide), acetamide, propylene glycol 및 polyethylen glycol을 함유한 초자화 동결액을 이용하여 생쥐 8 세포기 수정란의 초자화 동결에 성공한 것이 최초이다. 그후 생쥐(Scheffen 등, 1986; Kasai 등, 1990), 토끼(Smorag 등, 1989; Kobayashi 등, 1990), 면양(Schiewe 등, 1991; Ali와 Shelton, 1993), 돼지(Dobrinsky와 Johnson, 1993; Kuwayama 등, 1997) 및 소(Massip 등, 1986; Kuwayama 등, 1992) 에서도 초자화 동결에 성공하였다.

Massip 등(1987)은 소의 상설배기에서 초기 배반포기 수정란을 초자화 동결하여 산자를 얻는데 성공하였으나, 동해방지제로 사용한 glycerol 과 1,2-propanediol의 혼합액은 소 배반포의 동결보존에는 비효과적인 것으로 나타났다. 최근, Kuwayama 등(1992)은 glycerol 과 1,2-propanediol의 혼합물에 sucrose를 첨가하여 단계별 평형을 시키는 방법이 소 배반포의 초자화동결에 효과적이라고 보고하였다. 비슷한 방법으로 Saito 등(1994)은 glycerol과 ethylene glycol의 혼합물에 sucrose와 dextrose를 첨가한 GESD액으로 소 체외수정 유래 배반포를 단계적으로 평형시켜 초자화 동결하는 방법으로 높은 생존율을 얻었다고 보고하였다. 한편, 초자화동결과 일반적인 완만동결 후 수정란의 생존율을 비교한 경우, 차이가 없는 것으로 보고되었으며(Van Wagtenonk-De Leeuw 등, 1995), 오히려 2단계 평형에 의한 초자화 동결과 완만동결에 의한 소 체외수정란의 생존율을 검토한 결과, 초자화 동결에 의하여 수정란의 생존율이 증가하였다(Mahmoudzadeh 등, 1994).

초자화 동결란의 생존율에 영향을 미치는 요인으로는 동해방지제의 구성분도 중요하겠으나(Ali와 Shelton, 1993; Saito 등, 1994), 동해방지제의 평형방법과 융해 후 동해방지제의 회석방법이 수정란의 생존율을 좌우하는 것으로 여겨지고 있다(Kuwayama 등, 1994). Kuwayama 등은 glycerol 과 1,2-propanediol의 혼합물을 이용하여 소 체외수정유래 배반포를 2단계와 16단계 평형 후 초자

화 동결한 결과, 16단계 평형방법이 수정란의 생존에 훨씬 유리한 것으로 보고하였다. 한편, Kobayashi 등(1998)은 돼지의 체내회수 배반포를 2단계 평형으로 초자화 동결한 후 융해하여 회석방법에 따라 생존성을 검토한 결과, ethylene glycol 회석없이 배양한 것이나, 1.5 M ethylene glycol로 1단계 회석한 것에 비하여 2단계로 회석하여 배양한 경우가 유의적으로 높은 생존율을 나타내, 융해 후 동해방지제의 회석방법이 초자화 동결 된 수정란의 융해 후 생존성에 영향을 미칠 수 있음을 시사하였다.

본 연구는 소 체외성숙, 체외수정 유래 배반포의 초자화 동결 시 동해방지제의 평형방법과 융해 후 동해방지제의 회석방법이 수정란의 생존성에 미치는 영향을 검토하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 체외성숙 및 수정

도축장에서 회수한 난소의 난포로부터 미성숙 난포란을 채취하고, 난구세포가 치밀하고 세포질이 균질한 난포란만을 선별하여 체외성숙에 공시하였다. 난포란은 mineral oil로 피복된 체외성숙 배양액의 50 μ l 소적 내에 약 10여개씩 넣어, 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 및 95%의 공기조건으로 22~24시간 성숙배양하였다. 체외성숙용 배양액으로는 0.2 mM Na-pyruvate, 0.02U/ml FSH(Sigma, St. Louis, MO, USA), 1 μ g/ml 17 β -estradiol(Sigma), 50 μ g/ml gentamycin(Sigma) 및 10% FBS(fetal bovine serum; GibcoBRL, NY, USA)를 첨가한 TCM-199액(GibcoBRL)을 사용하였다.

체외수정은 한우의 동결정액을 사용하였다. 성숙된 난포란은 5mM caffeine, 10 μ g/ml heparin, 3 μ g/ml BSA 및 2 \times 10⁶ 정자/ml가 함유된 BO액(Brackett 과 Oliphant, 1975) 50 μ l 소적 내에 팽화된 난구세포가 둘러싸인 채로(난구세포-난자복합체) 10여개씩 투입하여, 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 및 95% 공기 조건하에서 12~20시간 배양하였다.

2. 수정란의 체외배양

수정란의 체외배양을 위해서는 0.2mM Na-

pyruvate와 50 µg/ml gentamycin을 함유한 TCM-199 (GibcoBRL) 또는 CR1aa액을 기본배양액으로 사용하였다. 수정 후 난자는 난구세포가 붙어있는 채로 3mg/ml BSA를 함유한 TCM-199액의 소적(50 µl)으로 옮겨 39°C, 5% CO₂ 및 95%의 공기 조건하에서 32~40시간 체외배양하였다. 그후 pipetting에 의해 난구세포와 분리하고, 2 세포기 이상으로 발육된 수정란은 10여개씩 Buffalo rat의 간세포(BRLC; Buffalo rat liver cells)와의 공동배양배지로 옮겨, 39°C, 5% CO₂ 및 95% 공기 조건하에서 7~8일간 추가 배양하였다. BRLC의 공동배양배지는 냉동 보존된 BRLC(CRL 1442; ATCC, Rockville, MD)를 용해하여 10% FBS를 함유한 CR1aa액으로 2회에 걸쳐 500×g로 5분간 원심 분리한 후, 신선한 배양액과 희석하여 배양접시(Nunc, Ø35mm)에 50 µl씩의 소적을 만들고 2~3일간 배양하여 단층을 형성시켰다. 배양액은 매 2~3일 마다 신선한 배양액으로 1/2씩 교환하였다.

3. 초자화동결액 및 희석액의 준비

초자화동결액 (vitrification solution; VS)은 Saito 등(1994)이 사용한 GESD를 수정하여 사용하였다. 동결액의 구성은 20% FBS(Gibco)가 첨가된 D-PBS(Dulbecco's PBS)를 기본액으로 하여,

20% glycerol, 20% ethylene glycol, 3/8 M sucrose 및 3/8 M dextrose가 함유되도록 조정하였다(VS3). 초자화동결액 조제 시, 먼저 동해방지제 및 sugar를 D-PBS액에 최종농도의 1.25배 농도로 용해하여 사용 전에 FBS와 4:1의 비율로 혼합하여 조제하였다. 또한, 동결 전 평형을 위하여 20% FBS가 함유된 D-PBS를 이용하여 VS3액을 각각 50% 및 25%로 희석하여 VS2 및 VS1을 만들었다. 한편, 용해 후 동해방지제의 희석액으로는 20% FBS를 함유한 D-PBS액에 1/2 M sucrose를 첨가하여(S-PBS) 사용하였으며, 단계적 희석을 위하여 1/4 M sucrose액도 같은 방법으로 준비하였다.

4. 동결 전 평형

동결 전 평형(equilibration)방법은 세 처리구로 나누어 비교하였다(Table 1). 첫째는 배반포를 VS1, VS2 및 VS3에 각각 5분, 5분 및 1분간씩 평형시켰으며(E1), 둘째는 VS2 및 VS3에 각각 5분 및 1분간 평형시켰고(E2), 마지막 방법은 VS3에만 1분간 평형시켰다(E3). 모든 평형과정은 실온에서 실시하였다.

5. 수정란의 초자화동결

수정란은 VS3액에 평형하는 1분 이내에 0.25ml

Table 1. Equilibration and dilution steps in each solutions*

Group	Equilibration time(min)			Dilution time(min)		
	VS1	VS2	VS3	VS3+0.5S**	0.5S	0.25S
E1	5	5	1	-	5	5
E2	-	5	1	-	5	5
E3	-	-	1	-	5	5
D1	5	5	1	5	5	5
D2	5	5	1	-	5	5
D3	5	5	1	-	5	-

*VS : Vitrification solution

VS3: 20% glycerol+20% ethylene glycol+3/8M sucrose+3/8M dextrose in D-PBS supplemented with 20% FBS.

VS2: 1 part VS3 + 1 part D-PBS with 20% FBS.

VS1: 1 part VS2 + 1 part D-PBS with 20% FBS.

0.5S and 0.25S: 0.5M and 0.25M sucrose in D-PBS with 20% FBS.

**After thawing content of the straw was expelled into 1 ml of 0.5S within a culture dish and mixed by gentle shaking of the dish.

플라스틱 straw(FHK, Japan) 내로 봉입하였다. 봉입방법은 우선 straw내에 S-PBS 2층(~10 및 ~70 mm), VS3 2층(~3 및 10 mm)을 각각 0.5 mm의 공기 층으로 분리하여 흡인한 뒤 수평으로 유지하였다. 3~6개의 체외수정 유래 배반포를 VS3액에 세척한 후 바로 10 mm의 VS3층에 옮겨 넣고 이어서 VS3 1층(~3 mm) 과 S-PBS(~15 mm) 1층을 만든 후 straw의 끝을 불에 달군 검자를 이용하여 봉입하였다. 수정란이 함유된 straw는 즉시 열 봉인한 쪽부터 LN2내로 침지하였다. 처음 1/2정도는 빠르게 침지하고, 나머지 1/2 부분은 서서히 침지하였으며, VS3에 평형개시부터 1분 이내에 수정란의 straw내 봉인 및 LN2내 침지 과정이 끝나도록 하였다. 동결 straw는 용해 시까지 LN2 용기 내에 보관하였다.

6. 동결란의 용해 및 동해방지제의 희석

초자화동결 후 1일 이상 LN2내에 보관된 동결 straw를 꺼내어 20°C 수조에서 천천히 흔들며, 동결된 S-PBS가 녹기 시작할 때까지(약 10초간) 용해하였다. 그 후 straw내의 내용물을 1 ml의 1/2 M sucrose 가 들어있는 배양접시 내로 배출시키고 배양접시를 천천히 흔들어 액을 혼합하였다. 수정란은 희석방법에 따라 세 구로 구분하여 비교하였다(Table 1). 첫째는 배출시킨 배양액(VS3+1/2 M sucrose)내에서 5분, 1/2 M sucrose 액에서 5분 및 1/4 M sucrose 액 내에서 5분간 유지 후, 20% FBS가 첨가된 D-PBS액으로 세척하였으며(D1), 둘째는 배출된 난자를 즉시 희석하여 1/2 M sucrose와 1/4 M sucrose액에서 각각

5분간 유지 후 세척하였고(D2), 나머지는 1/2 M sucrose액 내에서만 5분간 유지 후 세척하였다(D3). Straw 용해 후의 모든 희석과정은 실온에서 실시하였다.

7. 동결용해란의 체외배양

동결용해란은 세척 후 10여개씩 10% FBS가 첨가된 CR1aa 액으로 준비된 BRLC의 단층세포와의 공동배양배지로 옮겨, 39°C, 5% CO₂ 및 95% 공기 조건하에서 3일간 배양하며 생존율 및 부화(hatching)율을 검사하였다. 수정란의 생존율은 배양 후 24시간 및 48시간에 동결 전 상태 이상으로 재 확장된 배반포의 수로 판정하였다.

8. 통계처리

실험의 결과는 Chi-square test에 의하여 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 평형방법의 영향

소 체외수정 유래 배반포를 각각 다른 평형방법으로 평형시킨 후 초자화 동결 및 용해하여 생존성을 검토한 결과, VS1, VS2 및 VS3에 각각 5분, 5분 및 1분간 평형시킨 E1구에서 배반포가 50%(27/54), 확장배반포가 83.6%(46/55)로, VS2 및 VS3에 각각 5분 및 1분간 평형시킨 E2구(16.7 및 23.2%) 및 VS3에만 1분간 평형시킨 E3구(0 및 3.7%)에 비하여 유의적으로(P<0.01) 높았다(Table 2).

Table 2. Effect of equilibration method on the survival rate of vitrified bovine blastocysts

Group*	No. (%) of blastocyst		No. (%) of expanded blastocyst	
	Thawed	Survival	Thawed	Survival
E1	54	27(50.0) ^{a,A}	55	46(83.6) ^{a,B}
E2	54	9(16.7) ^b	56	13(23.2) ^b
E3	50	0 ^b	54	2(3.7) ^b

* Embryos were equilibrated in VS1, VS2 and VS3 each for 5, 5 and 1 min(E1), for 0, 5 and 1 min(E2), and for 0, 0 and 1 min(E3).

^{a,b} Values with different superscripts in the same column differ(P<0.01).

^{A,B} Values with different superscripts in the same row differ(P<0.01).

Table 3. Effect of equilibration method on the hatching rate of vitrified bovine blastocysts

Group*	No. (%) of blastocyst		No. (%) of expanded blastocyst	
	Thawed	Hatched	Thawed	Hatched
E1	54	15(27.8) ^{a,A}	55	37(67.3) ^{a,B}
E2	54	4(7.4) ^b	56	7(12.5) ^b
E3	50	0 ^b	54	0 ^b

* Embryos were equilibrated in VS1, VS2 and VS3 each for 5, 5 and 1 min(E1), for 0, 5 and 1 min(E2), and for 0, 0 and 1 min(E3). Hatching rate was assessed at 72 hr after culture.

^{a,b} Values with different superscripts in the same column differ(P<0.05).

^{A,B} Values with different superscripts in the same row differ(P<0.01).

Table 4. Effect of dilution method on the survival rate of vitrified bovine blastocysts

Group*	No. (%) of blastocyst		No. (%) of expanded blastocyst	
	Thawed	Survival	Thawed	Survival
D1	54	16(29.6) ^{a,A}	58	28(48.3) ^{a,B}
D2	50	26(52.0) ^{b,A}	62	50(80.6) ^{b,B}
D3	53	25(47.2) ^{ab}	58	37(63.8) ^{ac}

* After thawing, embryos were exposed to each VS3+0.5S, 0.5S and 0.25S for 5 min(D1), each 0.5S and 0.25S for 5 min(D2), and only 0.5S for 5 min(D3).

^{a,b,c} Values with different superscripts in the same column differ(P<0.05).

^{A,B} Values with different superscripts in the same row differ(P<0.01).

한편, 융해 후 72시간 배양하여 배반포 및 확장 배반포의 부화율을 검사한 결과, E1구에서는 각각 27.8%(15/54) 및 67.3%(37/55)가 부화배로 발육된 반면, E2구에서는 각각 7.4% 및 12.5% 로 유의적(P<0.01)으로 낮았으며, E3구에서는 부화된 수정란이 확인되지 않았다(Table 3). 발육단계별 생존율 및 부화율은 E1구에서 확장배반포의 경우가 배반포에 비하여 유의적으로(P<0.01) 높았다.

본 실험의 결과에 기초하여 융해 후 희석방법에 관한 검토실험은 E1방법에 의하여 평형시킨 후 동결하는 방법을 사용하였다.

2. 희석방법의 영향

초자화 동결 및 융해된 소 체외수정 유래 배반포를 각각 다른 희석방법으로 동해방지제를 제거한 후 배양한 결과, 생존율은 0.5 M sucrose 및 0.25 M sucrose 액에 각각 5 분간씩 유지한 후 세

척하여 배양한 D2구에서 배반포가 52.0%(26/50), 확장배반포가 80.6%(50/62) 로, VS3+0.5M sucrose, 0.5 M sucrose 및 0.25 M sucrose에 각각 5분간씩 희석한 D1구(29.6% 및 48.3%) 및 0.5 M sucrose에만 5분간 유지한 D3구(47.2% 및 63.8%)에 비하여 유의적으로(P<0.05) 높았다(Table 4).

한편, 융해 후 72시간 배양하여 배반포 및 확장 배반포의 부화율을 검사한 결과, 배반포의 경우는 세 구간에 차이가 없었으나, 확장배반포의 경우는 D2구에서는 61.3%(38/62)가 부화배로 발육되어, D1구(34.5%)에 비하여 유의적으로(P<0.01) 높게 나타났다(Table 5). D3구의 경우는 유의적인 차이가 인정되지 않았다(46.6%, 27/58). 발육단계별 생존율은 D1 및 D2구에서 확장배반포의 경우가 배반포에 비하여 유의적으로(P<0.01) 높았으며 (Table 4), 부화율은 D2 및 D3구에서 확장배반포가 배반포에 비하여 유의적으로(P<0.01) 높게 나타났다(Table 5).

Table 5. Effect of dilution method on the hatching rate of vitrified bovine blastocysts

Group*	No. (%) of blastocyst		No. (%) of expanded blastocyst	
	Thawed	Hatched	Thawed	Hatched
D1	54	10(18.5)	58	20(34.5) ^a
D2	50	12(24.0) ^A	62	38(61.3) ^{b, B}
D3	53	11(20.7) ^A	58	27(46.6) ^{ab, B}

*After thawing, embryos were exposed to each VS3+0.5S, 0.5S and 0.25S for 5 min (D1), each 0.5S and 0.25S for 5 min (D2), and only 0.5S for 5 min (D3). Hatching rate was assessed at 72 hr after culture.

^{a, b}Values with different superscripts in the same column differ(P<0.01).

^{A, B}Values with different superscripts in the same row differ(P<0.01).

고찰

수정란의 초자화 동결보존에 관한 연구는 주로 동결액의 조성에 관한 연구가 진행되어 왔으며, 평형방법에 관한 실험이 일부 진행되기는 하였으나, 평형방법간의 비교에 의한 평가는 거의 없다. 본 연구에서는 수정란의 초자화동결 시 평형방법과 용해 후 회석방법에 따라 수정란의 생존율 및 부화율을 비교하였다.

포유동물 수정란의 초자화 동결액은 다양하게 개발되어 있다. 종래에는 DMSO, ascetamide, propylene glycol과 polyethylene glycol의 혼합액이 사용되거나(Rall과 Fahy, 1985), glycerol을 기본으로 하여 propylene glycol(Scheffen 등, 1986)이나, BSA의 혼합액(VS3a; Rall, 1987) 등이 사용되어 왔다. 그러나 최근에는 ethylene glycol을 기본으로 하여 sucrose, dextrose, Ficoll, PVP, trehalose 등의 비 침투성 보호제를 혼합하여 사용하고 있으며(Kasai 등, 1990; Ali와 Shelton, 1993; Ohboshi 등, 1997), 그 외에 ethylene glycol DMSO의 혼합액(Ishimori 등, 1993), glycerol, ethylene glycol, sucrose 와 dextrose의 혼합액인 GESD(Saito 등, 1994), glycerol과 1,2-propanediol의 혼합액(Kuwayama 등, 1994,) 등 다양하게 개발되어 사용되고 있다. 보호제의 종류 및 혼합방법, 또는 동물종 및 수정란의 발육단계, 연구자 등에 따라 수정란의 생존성에 차이가 있으나, 본 연구에서는 GESD를 사용하였다. Saito 등(1994)은 GESD를 이용하여 소 체외수정란을 3단

계 평형 후 초자화 동결한 결과, 배반포의 경우 83%가, 그리고 확장배반포의 경우는 96%가 용해 후 생존하였으며, 96시간 배양 후의 부화율도 각각 74% 와 86%로 매우 높았다. 비록 이식 후 산자의 생산은 검증하지 않았지만, sucrose와 dextrose의 첨가가 수정란의 생존에 유리하였다고 보고하였다. Kasai 등(1990)도 ethylene glycol, Ficoll 및 sucrose를 혼합한 초자화 동결액으로 생쥐 상실배를 동결 후 높은 생존율을 얻었다. 동해방지제에 sucrose를 첨가함으로써 다른 동해방지제의 과도한 침투성을 완화하고(Sz ll과 Shelton, 1987), 세포질 내 단백질의 농도를 증가시킴으로써 세포 내 초자화를 돕는 것으로 보고되고 있다(Rall, 1987). Dextrose 도 동해방지제의 독성을 완화하는 것으로 여겨지며(Clark 등, 1984), sucrose와 함께 초자화동결시의 냉각충격을 완화시키고(Sutton, 1992), 동해방지제의 불필요한 세포 내 침투를 감소시키는 역할을 하는 것으로 알려지고 있다(Utsumi 등, 1992).

Kuwayama 등(1994)은 소 체외수정란을 glycerol과 1,2-propanediol의 혼합액으로 초자화 동결 시, 각 단계당 5분씩 평형시킨 2단계 평형과 1분 정도씩 평형시킨 16단계 평형방법을 비교하였다. 실험 결과, 2단계 평형의 경우는 수정란의 생존율이 0%인 반면, 16단계 평형의 경우는 83.3%로 현저한 차이를 보였다. 뿐만 아니라, 세포질의 미세구조에 있어서도 2단계 평형의 경우는 공포(vesicles)가 관찰되어, 초자화 동결 전 평형방법이 수정란의 생존성에 영향을 미칠 수 있음이 시

사되었다. 본 연구에서도, 비록 1, 2, 3단계 평형만을 비교하였으나, 다단계 평형의 경우가 유의적으로 높은 생존율과 부화율을 나타내었다. Kuwayama 등 (1994)의 결과를 고려할 때, 평형 단계를 여러 단계로 하고 짧은 시간동안 평형시키는 것이 유리할 수도 있으나, 본 연구에서는 검토하지 않았다. Ohboshi 등 (1997)은 ethylene glycol, polyethylene glycol 및 sucrose의 혼합액으로 소체외수정 배반포를 초자화동결 시, 1단계평형으로 13%의 생존율을 보인 반면, 2단계 평형에 의해서는 72.7%의 생존율을 얻어, 1단계와 2단계평형 사이에도 현저한 차이를 나타내었다. 적절한 단계의 평형은 고농도의 동결액에 직접 노출함으로써 생길 수 있는 삼투압 충격을 완화하여, 초자화 동결 시 세포막 손상을 최소화하고, 수정란의 초자화를 더욱 안정적으로 유지하는 것으로 사료된다. 한편, Kasai 등 (1992)은 토끼 수정란의 초자화 동결 시 1단계 평형에 의해서도 높은 생존율을 얻었으며, Ishimori 등 (1993)과 Tachikawa 등(1993)도 1단계 평형방법에 의하여 소의 배반포를 초자화 동결하여 비교적 높은 생존율을 얻었다.

본 연구의 결과는 초자화 동결 수정란의 용해 후 동해방지제의 회석방법에 따라서도 수정란의 생존율이 달라질 수 있음을 시사하였다. Kobayashi 등 (1998)은 초자화 동결된 돼지 수정란을 용해하여 회석방법에 따라 생존성을 검토한 결과, 무회석 또는 1.5 M ethylene glycol로 1단계 회석한 것에 비하여 2단계로 회석하여 배양한 경우가 유의적으로 높은 생존율을 나타내었다. 본 연구의 결과도 1단계 회석보다 2단계 회석의 경우에 유의적으로 높은 생존율이 얻어졌다. 그러나 straw 내용물을 0.5 M sucrose액에 배출 후 혼합하여 수정란을 5분간 유지한 경우는 추가적으로 2단계 회석을 시행하더라도 유의적으로 낮은 생존율을 보였다. Straw내에 들어있는 초자화 동결액이 비록 소량이지만, 용해 후 수정란의 생존에는 불리하게 작용한 것으로 사료된다. 한편, 초자화 동결된 소 수정란을 농가에서 간단히 이식에 사용하기 위해서는 straw 내에서 직접 회석하여 사용할 수 있는 방법이 개발되어야 하는데, 본 실험에서 나타난 바와 같이 1단계 회석으로도 비교

적 높은 생존율이 얻어질 수 있어 가능할 것으로 사료된다. Vajta 등(1997)은 소 수정란을 초자화 동결 후 용해하여, straw 내에서 직접 회석하는 방법을 검토하였는데, 86%의 난자가 생존하여, 이중 84%가 부화배로 발육되어 1단계 straw 회석방법이 가능할 것으로 여겨진다.

수정란의 발육단계에 따라 초자화 동결 후 수정란의 생존율에 차이가 있는 것은 Yang 등 (1992)이 보고한 것과 비슷하며, Saito 등 (1994)도 비슷한 결과를 보고하였다. 발육단계에 따른 생존율의 차이는 발육 중 수정란의 구조나 세포막 특성의 변화에 기인된 것으로 사료된다.

본 연구의 결과를 종합하여 볼 때, 초자화 동결된 소 수정란의 용해 후 생존성은 동결 전 평형방법을 다단계로 나누어 실시함으로써 증진될 수 있으며, 용해 후 동해방지제의 회석방법은 동결 전 평형에 비하여 생존율에 큰 영향을 미치지 않는으나, sucrose를 이용한 2단계 회석이 수정란의 생존성을 향상시키는 것으로 나타났다. 또한 발육 단계별 생존성에 있어서는 발육이 진전된 확장배반포 시에 동결하는 것이 배반포기에 동결하는 것 보다 유리한 것으로 나타났다.

적 요

본 연구는 소 체외성숙, 체외수정 유래 배반포의 초자화 동결 시 동해방지제의 평형방법과 용해 후 동해방지제의 회석방법이 수정란의 생존성에 미치는 영향을 검토하고자 실시하였다.

초자화 동결액은 20% FBS (Gibco)가 첨가된 D-PBS에 20% glycerol, 20% ethylene glycol, 3/8 M sucrose, 3/8 M dextrose 가 함유된 GESD를 사용하였다. 동결 전 평형방법은 3단계 (E1), 2단계 (E2), 1단계(E3)로, 용해 후 회석방법도 D1 (VS3+1/2 M sucrose, 1/2 M sucrose, 1/4 M sucrose), D2 (1/2 M sucrose, 1/4 M sucrose) 및 D3 (1/2 M sucrose)로 구분하였다.

초자화동결 및 용해 후 생존율은 E1구에서 배반포가 50% (27/54), 확장배반포가 83.6% (46/55)로, E2구 (16.7 및 23.2%) 및 E3구 (0 및 3.7%)에 비하여 유의적으로 높았다 ($P < 0.01$). 용해 후 72시

간체 부화율은, E1구에서 배반포가 27.8% (15/54), 확장배반포가 67.3% (37/55)로 E2구 (7.4% 및 12.5%) 및 E3구 (0% 및 0%)에 비하여 유의적으로 높았다 ($P<0.01$). 발육단계별 생존율 및 부화율은 E1구에서 확장배반포의 경우가 배반포에 비하여 유의적으로 ($P<0.01$) 높았다. 회석방법에 따른 생존율은 D2구에서 배반포가 52.0% (26/50), 확장배반포가 80.6% (50/62)로, D1구 (29.6% 및 48.3%) 및 D3구 (47.2% 및 63.8%)에 비하여 유의적으로 높았다 ($P<0.05$). 한편, 융해 후 72시간째 부화율은, 배반포의 경우는 세 구간에 차이가 없었으나, 확장배반포의 경우는 D2구에서 61.3% (38/62)로, D1구 (34.5%)에 비하여 유의적으로 높았다 ($P<0.01$). 발육단계별 생존율은 D1 및 D2구에서, 부화율은 D2 및 D3구에서 확장배반포가 배반포에 비하여 유의적으로 ($P<0.01$) 높게 나타났다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 초자화 동결된 소 수정란의 융해 후 생존성은 동결 전 평형방법을 다단계로 나누어 실시하므로써 증진될 수 있으며, 융해 후 동해방지제의 회석방법은 동결 전 평형에 비하여 생존율에 큰 영향을 미치지 않는으나, sucrose를 이용한 2단계 회석이 수정란의 생존성을 향상시키는 것으로 나타났다. 또한 발육단계별 생존성에 있어서는 발육이 진전된 확장배반포 시에 동결하는 것이 배반포기에 동결하는 것 보다 유리한 것으로 나타났다.

참고문헌

- Ali J and Shelton JN. 1993. Successful vitrification of day-6 sheep embryos. J. Reprod. Fertil., 99:65-70.
- Brackett BG and Oliphant G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod., 12:260-274.
- Clark P, Fahy GM and Karow AM, Jr. 1984. Factor influencing renal cryopreservation. II. Toxic effects of three cryoprotectants in combination with three vehicle solution in nonfrozen rabbit cortical slices. Cryobiology, 21:260-273.
- Dobrinsky JR and Johnson LA. 1993. Effect of vitrification media on the *in vitro* development of porcine embryos. Theriogenology, 39:209 (Abstr.)
- Ishimori H, Saeki K, Inai M, Nagao Y, Itasaka J, Miki Y, Seike N and Kainuma H. 1993. Vitrification of bovine embryos in mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. Theriogenology, 40:427-433.
- Kasai M, Hamaguchi Y, Zhu SE, Miyake T, Sakurai T and Machida T. 1992. High survival morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method of rabbit. Biol. Reprod., 46:1042-1046.
- Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H and Sakurai T. 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. J. Reprod. Fertil., 89:91-97.
- Kobayashi S, Takei M, Kano M, Tomita M and Leibo SP. 1998. Piglets produced by transfer of vitrified porcine embryos after stepwise dilution of cryoprotectants. Cryobiology, 36:20-31.
- Kobayashi K, Nagashima H, Yamakawa H, Kato Y and Ogawa S. 1990. The survival of whole and bisected rabbit morulae after cryopreservation by the vitrification method. Theriogenology, 33:777-788.
- Kuwayama M, Fujikawa S and Nagai T. 1994. Ultrastructure of IVM-IVF bovine blastocysts vitrified after equilibration in glycerol 1,2-propanediol using 2-step and 16-step procedures. Cryobiology, 31:415-422.
- Kuwayama M, Hamano S and Nagai T. 1992. Vitrification of bovine blastocysts obtained by *in vitro* culture of oocytes matured and fertilized *in vitro*. J. Reprod. Fertil., 96:187-193.

- Kuwayama M, Holm P, Jacobsen H, Greve T and Callesen H. 1997. Successful cryopreservation of porcine embryos by vitrification. *Vet. Rec.*, 141:365 (Abstr.)
- Mahmoudzadeh AR, Van Soom A, Ysebaert MT and de Kruif A. 1994. Comparison of two-step vitrification versus controlled freezing on survival of *in vitro* produced cattle embryos. *Theriogenology*, 42:1389-1397.
- Massip A, Van der Zwalmen 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. 1986. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-Letters*, 7:270-273.
- Ohboshi S, Fujihara N, Yoshida T and Tomogane H. 1997. Usefulness of polyethylene glycol for cryopreservation by vitrification of *in vitro*-derived bovine blastocysts. *Anim. Reprod. Sci.*, 48:27-36.
- Rall WF. 1987. Factors affecting the survival of vitrified mouse embryos. *Cryobiology*, 24:387-402.
- Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature(Lond.)*, 313:573-575.
- Saito N, Imai K and Tomizawa M. 1994. Effect of sugars-addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced *in vitro*. *Theriogenology*, 41:1053-1060.
- 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.
- Schiewe MC, Rall WF, Stuart LD and Wildt DE. 1991. Analysis of cryoprotectant, cooling rate and *in situ* dilution using conventional freezing or vitrification for cryopreserving sheep embryos. *Theriogenology*, 36:279-293.
- Smorag Z, Gadjia B, Wieczorek B and Jura J. 1989. Stage-dependant viability of vitrified rabbit embryos. *Theriogenology*, 31: 1227-1231.
- Sutton RL. 1992. Critical cooling rates for aqueous cryoprotectants in the presence of sugars and polysaccharides. *Cryobiology*, 29: 585-598.
- Szell AZ and Shelton JN. 1987. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solution on Day-3 mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 80:309-316.
- Tachikawa S, Otoi T, Kondo S, Machida T and Kasai M. 1993. Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by *in vitro* maturation and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.*, 34:266-271.
- Utsumi K, Hochi S and Iritani A. 1992. Cryoprotective effect of polyols on rat embryos during two-step freezing. *Cryobiology*, 29:332-341.
- Vajta G, Holm P, Greve T and Callesen H. 1997. Survival and development of bovine blastocysts produced *in vitro* after assisted hatching, vitrification and in-straw direct rehydration. *J. Reprod. Fertil.*, 111:65-70.
- Yang NS, Lu KH, Gordon I and Polge C. 1992. Vitrification of blastocysts produced *in vitro*. *Theriogenology*, 37:326(Abstr.)

(접수일자 : 1998. 12.1 / 채택일자 : 1998. 12. 23)