

## Microdrop과 Straw 방법으로 초자화 동결한 소 난자의 생존율에 관한 연구

양병철\* · 양보석\* · 성환후\* · 임석기\* · 박수봉\* · 장원경\* · 이창규\*\*

농촌진흥청 축산기술연구소\*, 서울대학교 동물자원과학과\*\*

## Studies on the Viability of *In Vitro*-Matured Bovine Oocytes Vitrified by Microdrop and Straw Method

B. C. Yang\*, B. S. Yang\*, H. H. Sung\*, S. K. Im\*, S. B. Park\*, W. K. Chang\* and C. K. Lee\*\*

National Livestock Research Institute, RDA, Suwon 441-706\*,

School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea\*\*

### ABSTRACT

To establish vitrification method for bovine oocytes, mature bovine oocytes were vitrified by microdrop (MD) or straw (Straw) method and the viability of vitrified oocytes with or without cumulus cells (CC) were examined by several methods; a) parthenogenetic activation; b) pronuclear formation after *in vitro* fertilization (IVF); and c) embryonic development after IVF. The survival rate of vitrified oocytes by MD was significantly higher than by Straw (92.50 vs. 74.19%,  $p < 0.05$ ). Most of the oocytes survived from vitrification using the MD methods. Cleavage and blastocyst development of parthenogenetically activated oocytes were higher in MD (45.05% and 10.81%, respectively;  $p < 0.05$ ) than those in Straw method (27.17% and 6.52%, respectively;  $p < 0.05$ ). Male and female pronuclear formation of vitrified-thawed oocytes with or without cumulus cells (CC) after IVF were examined, respectively. The survival rate of vitrified oocytes by MD without CC was no difference between MD and Straw (80.368.14% vs. 67.31%). Normal fertilization (2PN) rates were not different among groups (Fresh; 54.55% vs. MD; 42.22% vs. Straw; 37.14%,  $p > 0.05$ ). While no fertilization (<1PN) rates were significantly different between fresh and vitrified-thawed groups (Fresh; 32.47% vs. MD; 57.78% and Straw 62.86%,  $p < 0.05$ ). The polyspermy (3PN) was appeared in the fresh (12.99%), but no appeared in the vitrified-thawed groups. In the without CC, normal fertilization (2PN) rates were significantly different between fresh and vitrified-thawed oocytes (Fresh; 59.38% vs. MD; 17.31% and Straw; 30.43%,  $p < 0.05$ ). Moreover, no fertilization (<1PN) rates were significantly different between fresh and vitrified-thawed groups (Fresh; 23.44% vs. MD; 73.08% and Straw 58.70%,  $p < 0.05$ ). The polyspermy (3PN, >4PN) was appeared not only fresh but vitrified-thawed groups. After IVF, two-cell developmental rates of vitrified oocytes with CC by MD and Straw were significantly low compared to fresh oocytes (Fresh; 81.76% vs. MD; 22.22% and Straw; 11.36%,  $p < 0.05$ ). Blastocyst developmental rates of vitrified oocytes also were significantly low compared to fresh oocytes (Fresh; 28.38 vs. MD; 1.71% and Straw 0%,  $p < 0.05$ ). In the without CC, two-cell developmental rates were no difference between Fresh and MD (27.59% vs. 19.25%,  $p < 0.05$ ), while blastocyst rates were difference between Fresh and MD or Straw (4.31% vs. 0.62% and 0%, respectively;  $p < 0.05$ ). In conclusion, the results indicate that the vitrified bovine oocytes have the ability to develop to the blastocyst stage after IVF.

(Key words : Vitrification, Bovine oocytes, Cumulus cells, Microdrop, Straw)

## I. 서 론

난자와 수정란의 동결은 종의 보존뿐만 아니라 번식 기술 전반에 걸쳐 매우 넓게 이용되고 있다. 그러나, 난자는 표면적에 대한 용적이 매우 넓으며, 저온에 대한 민감성 때문에 정자나 수정란에 비하여 동결보존 기술의 발달이 미진하였다. 그러므로 저온에 민감한 난자의 동결 방법으로 난자를 최대한 급속히 냉각하여 난자가 저온충격에 노출되는 시간을 적게 함으로서 생존성을 높이는 방법이 이용되고 있으며, 이러한 냉각속도를 증가시키는 방법으로 동결에 사용하는 배양액의 양을 최소화하는 방법이 이용되고 있다. 이들 방법으로는 electron microscope grids (Martino 등, 1996a), microdrops (Yang과 Leibo, 1999; Dinnyes 등, 2000), cryo-loop (Lane 등, 1999), nylon mesh (Matsumoto 등, 2001), open pulled straw (OPS) (Vajta 등, 1998) 등을 이용하여 액체질소에 직접 침지하는 방법이 있다.

동결액을 액체질소 내로 직접 침지하였을 때 동결방법에 따른 냉각속도는 기존의 0.25ml straw의 경우 2,000℃/분 (Hochi 등, 2001)이나 동결액의 양을 최소화 할 수 있는 OPS법은 22,500℃/분 (Vajta 등, 1998) 그리고 electron microscopy grid법은 24,000℃/분으로 (Martino 등, 1996a) 난자가 동결과정 중 저온충격을 받는 시간을 최소화 할 수 있는 냉각속도를 얻을 수 있다. 또한 Dinnyes 등 (2000)에 의하면 microdrop 방법은 동결시 사용하는 동결액의 양을 최소화 할 수 있다고 하였으며, metal surface위에 microdrop 방법으로 소 난자를 초자화 동결융해 후 단위발생, 체외수정 그리고 체세포를 이용한 핵이식 후 높은 발달율을 보였다고 보고하였다. Lane 등 (1999)도 소 난자와 배반포 수정란에서 cryoloop를 사용하여 초급속 동결이 가능함을 보고하였다.

성숙 난자에서 난구세포는 이미 난자성숙에 대한 역할을 다 하였으므로 동결융해에서는 불

필요한 존재일수 있으나 체외수정 과정에서의 다정자 침입 방지 기능이 있는 것으로 알려져 있으므로 동결 융해난자를 체외수정에 이용하기 위하여서는 난구세포가 일부 필요하다고 생각된다. 이에 대한 연구는 Papis 등 (1999)이 체외성숙란에서 난구세포를 제거하고 direct dropping법을 이용한 동결방법으로 융해 후 배반포 단계로 발달이 가능함을 보고하였으며, Dinnyes 등 (2000)도 난구세포가 부착된 상태의 신선란과 metal 표면 위에서 drop 방법으로 초자화 동결 융해한 난자를 활성화 시켜 높은 난분할율을 얻었다고 보고하였다. 하지만 이 방법은 온도의 변화에 매우 민감하므로 아직 개선해야 할 여지가 많이 있는 것으로 사료된다.

최근 난자의 동결보존 기술은 유전자원의 보존뿐만 아니라 형질전환 및 복제와 같은 새로운 기술의 발달과 더불어 그 중요도가 높아지고 있다. 따라서 본 연구는 소 성숙난자를 microdrop 또는 straw 방법을 이용하여 초자화 동결하고, 융해 후 단위발생과 체외수정 및 체외배양 하여 동결방법이 발달에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 난자의 채취 및 성숙

난자-난구세포 복합체 (COCs)는 도축장 유래 난소의 2~7mm 난포에서 채취하였다. 채취한 COCs는 5% FBS (Life Tech., USA)와 antibiotics antimycotic이 포함된 DPBS (Life Tech., USA)로 3회 세척하고 10% FBS가 포함된 TCM199 (Life Tech., USA)로 22시간 동안 38.5℃, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 성숙 배양하였다. 체외성숙 난자는 실험의 목적에 따라 난구세포가 부착된 난자와 난구세포 제거 난자로 분류하였으며 난구세포의 제거는 0.1% hyaluronidase (Sigma, USA)가 포함된 DPBS에서 vortexing하여 난구세포를 제거하였다.

## 2. 초자화 동결 및 융해

체외성숙 난자는 3% ethylene glycol이 포함된 HEPES-TCM199 + 20% FBS에서 약 10분간 전평형 시키고, 이어서 HEPES-TCM199 + 40% EG + 1M sucrose가 포함된 vitrification 액(VS)에서 30초 동안 평형하였다. 평형 후 난자는 VS 액과 같이 micropipette을 사용하여 drop방법으로 액체질소에 직접 떨어뜨리거나(MD), 0.25ml straw에 넣어 액체질소에 바로 침지하여 동결하였으며 (Straw), 동결하지 않은 난자는 대조구로서 사용하였다 (Fresh). 동결된 난자는 최소 1일에서 90일 동안 액체질소에 보존하였다.

동결 난자를 융해하기 위해 straw는 10초 동안 공기에 노출한 후 35℃의 온수에서 융해하였고, MD 방법으로 동결한 난자는 바로 0.3M sucrose가 포함된 배양액에 넣어 3분 동안 수분 재흡수와 동결액의 제거를 유도하였다. 이어서 HEPES-TCM199 + 20% FBS에서 5분동안 정치 후 배양액에 옮겨 배양기에서 체외수정 전까지 배양하였다. 융해한 난자에서 세포질이 변형 또는 변색되거나 투명대와 세포막이 손상된 것은 생존성이 없는 난자로 판단하여 이후의 실험에서 제외하였으며, 정상 모양을 나타내는 난자는 생존 난자로 판정하였다.

## 3. 단위발생 유기

동결융해 및 신선 난자는 10μM calcium ionophore와 1.5mg/ml의 BSA, 5.0% FBS가 포함된 CR1aa에서 5분, 그리고 2mM의 6-dimethylaminopurine (DMAP)에서 3시간동안 activation을 유도하였다. 이후의 배양 조건은 체외수정란의 배양 조건과 같다.

## 4. 체외수정과 전핵 관찰

체외수정은 동결 정자를 이용하여 BO 액으로 (Brackett 과 Oliphant, 1975) 실시하였다. 동

결융해 정자의 체외수정능 획득을 위해 BSA (20mg/ml; Life Tech., USA), heparin (10μg/ml; Sigma)과 2.5 mM의 caffeine이 포함된 BO 액에서 원심분리 하여 세척하고  $1 \times 10^6$  sperm/ml의 농도로 6시간동안 정자와 공배양하여 체외수정을 유도하였다. 체외수정 후 수정란은 10% FBS가 포함된 CR1aa액 (Rosenkranz 과 First, 1991, 1994)에서 38.5℃, 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> 조건하에서 배양하였다. 체외수정 48시간후 난할을 관찰하였고 7일간 배양후 배반포 발달을 확인하였다. 배양액은 약 48시간마다 교환하였다.

체외수정 13시간후 일부의 난자는 전핵관찰을 위하여 고정하였고 1% aceto-orcein으로 염색하여 위상차 현미경으로 전핵을 관찰하였다. 난세포질 내에 정자의 침입이 없으며, 전핵이 관찰되지 않은 것은 미수정으로 판정하였고 (<1PN), 난자의 세포질내 자성전핵과 웅성전핵이 각각 하나씩 관찰된 난자는 정상적으로 수정된 것으로 판정하였으며(2PN), 3개 이상의 전핵이 관찰된 것은 다정자수정으로 판정하였다(3PN, >4PN).

## 5. 통계 분석

본 실험의 자료는 Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., USA) 소프트웨어를 이용하여 처리 평균간 GLM 분석을 하였고, Duncan multiple range test로 유의차를 검증하였다.

## III. 결 과

### 1. 동결 융해 난자의 생존성 및 단위발생능

MD 및 Straw 방법으로 초자화 동결융해한 난자의 생존율과 단위발생 후 발달능력을 검사한 결과는 Table 1에 나타내었다.

초자화 동결 난자의 융해 후 생존율은 MD

Table 1. Effect of vitrification methods on the development of parthenogenetic embryos

Group <sup>1)</sup>	No. of oocytes vitrified	No. of oocytes with normal morphology	No. (%) of development <sup>2)</sup>	
			2 cell	Blastocyst
Fresh	—	132	117(88.64) <sup>a</sup>	42(31.81) <sup>a</sup>
MD	120	111(92.50) <sup>a</sup>	50(45.05) <sup>b</sup>	12(10.81) <sup>b</sup>
Straw	124	92(74.19) <sup>b</sup>	25(27.17) <sup>c</sup>	6( 6.52) <sup>b</sup>

<sup>1)</sup> Before parthenogenesis (Fresh) and vitrification (MD, Straw), cumulus cells of matured oocytes were removed by 0.1% hyaluronidase for 5 min at room temperature and selected oocytes with polar body.

<sup>2)</sup> Based on normal morphology oocytes.

<sup>abc</sup> Values in a column with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

방법이 92.50%로서 Straw 방법의 74.19%보다 유의적으로 높았으며( $p < 0.05$ ), 2세포기 수정란으로의 발달율도 MD 방법이 Straw 방법보다 유의적으로 높았다( $p < 0.05$ ). 그러나 배반포 발달율은 MD 방법이 Straw 방법에 비하여 높았으나 유의적인 차이는 인정되지 않았다. 또한 신선란의 경우는 MD 또는 Straw 방법으로 동결 용해 하였을 때 보다 높은 2세포기와 배반포 발달을 나타냈다 ( $p < 0.05$ ).

## 2. 동결 용해 난자의 전핵형성

동결 용해 난자와 신선란을 이용하여 체외수정 후 전핵형성을 관찰하였다 (Fig. 1).

체외성숙 난자에서 난구세포가 부착된 상태로 MD 또는 Straw 방법에 의해 초자화 동결용해 후 체외수정하여 전핵의 형성 상태를 조사한 결과는 Table 2에 나타내었다. 동결용해 난자의 체외수정 후 정상 전핵형성율 (2PN)은 난구세포 부착 유무에 따라 유의적인 차이는 인정되지 않았으며, 다정자 침입은 Fresh에서만 관찰되었다. 또한 MD 또는 Straw로 동결용해한 난자에서 수정율이 유의적으로 떨어지는 것이 관찰되었다 ( $p < 0.05$ ).

또한 체외성숙 난자에서 난구세포를 제거하고 위란강에 극체가 존재하는 난자만을 선별하였다. 그리고 이 난자를 MD 또는 Straw 방법으로 초자화 동결용해 후 체외수정하여 전핵의

형성 상태를 조사한 결과는 Table 3에 나타내었다. 동결용해 난자에서 난구세포가 제거된 난자는 정상 전핵형성율이 Fresh에 비하여 유의적으로 떨어지는 경향을 보였으며 ( $p < 0.05$ ), 미수정율 (<1PN)에 있어서는 MD, 또는 Straw로 동결용해한 처리에서 Fresh보다 유의적으로 많이 발생하였다 ( $p < 0.05$ ). 그러나 다정자 침입율은 유의적인 차이가 없었으며 모든 처리구에서 발생하였다.

또한 Table 2와 3에서 수정이 이루어지지 않는 (<1PN) 현상은 난구세포의 부착 유무와 관계없이 동결 용해란 (57.78%~73.08%)에서 많이 나타났으나, 다정자 침입 (3PN)은 난구세포가 부착되지 않은 난자에서 많이 발생하였다.

## 3. 동결 용해 난자의 수정란 발달

초자화 동결용해한 난자의 수정란 발달 능력을 알아보기 위하여 체외수정 후 배양을 실시한 결과는 Table 4와 5에 나타내었다. Table 4에서 난구세포가 부착된 난자의 동결 용해후 형태학적 정상율은 유의적인 차이가 없었으나 MD 방법이 Straw 방법에 비하여 다소 높은 정상율을 나타내었다. 또한 동결용해 난자의 체외수정 후 배 발달율은 Fresh에 비하여 유의적으로 감소하였으나 ( $p < 0.05$ ), 동결 난자의 경우 동결방법에 따른 체외수정 후 배 발달율은 유의적인 차이가 인정되지 않았다. 그러나 MD

Fig. 1. Morphology of pronuclei of the oocytes following vitrification.

A : Chromosome of unfertilized oocyte (<1PN>). B : Female and male pronuclei (2PN).  
 C : Three pronuclei (3PN). D : More than 4 pronuclei (>>4PN).

Table 2. Effect of vitrification on the pronucleus formation of fertilized zygotes with cumulus cells

Group	No. of vitrified oocytes	No. of oocytes with normal morphology	No. (%) of development <sup>1)</sup>			
			< 1PN	2PN	3PN	>4PN
Fresh	—	77	25(32.47) <sup>b</sup>	42(54.55)	10(12.99)	0(0)
MD	56	45(80.36)	26(57.78) <sup>a</sup>	19(42.22)	0(0)	0(0)
Straw	52	35(67.31)	22(62.86) <sup>a</sup>	13(37.14)	0(0)	0(0)

<sup>1)</sup> Based on normal morphology oocytes. <1PN: oocytes containing less than one pronuclear, 2PN: oocytes containing both female and male pronuclear, 3PN: oocytes containing 2 pronuclear, >4PN: oocytes containing more than 4 pronuclear.

<sup>ab</sup> Values in a column with different letters are significantly different (p<0.05).

Table 3. Effect of vitrification on the pronucleus formation of fertilized zygotes without cumulus cells

Group	No. of vitrified oocytes	No. of oocytes with normal morphology	No. (%) of development <sup>1)</sup>			
			< 1PN	2PN	3PN	> 4PN
Fresh	—	64	15(23.44) <sup>b</sup>	38(59.38) <sup>a</sup>	8(12.50)	3(4.69)
MD	59	52(88.14)	38(73.08) <sup>a</sup>	9(17.31) <sup>b</sup>	0( 5.77)	2(3.85)
Straw	63	46(73.02)	27(58.70) <sup>a</sup>	14(30.43) <sup>b</sup>	0( 4.35)	3(6.52)

<sup>1)</sup> Based on normal morphology oocytes. <1PN: oocytes containing less than one pronuclear, 2PN: oocytes containing both female and male pronuclear, 3PN: oocytes containing 2 pronuclear, >4PN: oocytes containing more than 4 pronuclear.

<sup>a)</sup> Values in a column with different letters are significantly different (p<0.05).

Table 4. Developmental capacity of *in vitro* fertilized bovine oocytes with cumulus cells following vitrification

Group	No. of vitrified oocytes	No. of oocytes with normal morphology	No. (%) of development <sup>1)</sup>	
			2 cell	Blastocyst
Fresh	—	148	121(81.76) <sup>a</sup>	42(31.38) <sup>a</sup>
MD	134	117(87.31)	26(22.22) <sup>b</sup>	2( 1.71) <sup>b</sup>
Straw	192	125(65.22)	10(11.36) <sup>b</sup>	0(0) <sup>b</sup>

<sup>1)</sup> Based on normal morphology oocytes.

<sup>a)</sup> Values in a column with different letters are significantly different (p<0.05).

Table 5. Developmental capacity of *in vitro* fertilized bovine oocytes without cumulus cells following vitrification

Group	No. of vitrified oocytes	No. of oocytes with normal morphology	No. (%) of development <sup>1)</sup>	
			2 cell	Blastocyst
Fresh	—	116	32(27.59) <sup>a</sup>	5(4.31) <sup>a</sup>
MD	163	161(98.16) <sup>a</sup>	31(19.92) <sup>a</sup>	1(0.62) <sup>b</sup>
Straw	147	107(72.55) <sup>b</sup>	4( 3.74) <sup>b</sup>	0(0) <sup>b</sup>

<sup>1)</sup> Based on normal morphology oocytes.

<sup>a)</sup> Values in a column with different letters are significantly different (p<0.05).

방법이 Straw 방법에 비하여 다소 높은 배 발달율을 보였으며 MD방법으로 동결융해한 난자에서 체외수정 후 배반포로 발생이 가능하였다.

Table 5는 성숙 난자에서 난구세포를 제거하고 극체가 존재하는 난자만을 선별하여 동결융해후 체외수정과 배발달 성적이다. 동결 융해난자의 형태학적 정상율은 MD 방법이 Straw 방법보다 유의적으로 높았다 (p<0.05). 또한

Straw 방법으로 동결 융해한 난자의 체외수정 후 난할율은 MD 또는 Fresh 난자에 비하여 유의적으로 감소하였으나 (p<0.05), MD 방법으로 동결융해한 난자의 난할율은 Fresh 난자와 비교하여 유의적인 차이가 없었다. 그러나 동결 융해 난자의 체외수정 후 배반포 발달은 MD 방법으로 동결 융해한 난자에서만 나타났다.

#### IV. 고 찰

본 실험에서 초자화 동결 용해한 소 성숙 난자의 생존율과 수정란 발달율에 있어서 MD 방법이 Straw 방법보다 높은 결과를 보여주고 있다. 소 난자는 냉각손상에 매우 민감하다는 것이 잘 알려져 있다. 그러므로 냉각에 의한 손상을 피하기 위하여 매우 빠른 cooling rate로 가능한한 빨리 손상을 주는 온도 범위를 통과하는 것이 필요하다. Stepomnkus 등 (1990)은 0℃와 영하의 온도 (<-10℃)에서 냉각 손상에 매우 취약한 *Drosophila melanogaster*의 수정란을 동결하기 위하여 cooling rate를 증가시키는 방법을 이용하였다. 이들은 액체질소 증기를 사용하여 400℃/초의 cooling rate로 0℃와 -60℃의 온도범위를 통과하여 동결 하였다. 또한 Martino 등 (1996b)은 소 난자의 동결에서 매우 높은 cooling rate를 얻기 위하여 grid를 이용하여 액체질소에 직접 난자를 넣음으로서 높은 생존율을 얻었다.

본 실험에서 초자화 동결 용해후 현미경으로 생존율을 검사하였을 때 MD 방법보다 Straw 방법으로 동결 용해한 난자에서 투명대와 세포막 손상이 더 많이 발견되었다. MD 방법으로 동결 용해한 난자는 대부분 투명대와 세포막의 구조가 원래의 상태를 유지하고 있었다. 이 결과로 볼때 0.25ml straw를 사용하여 액체질소에 넣었을 때 cooling rate는 2,000℃/분인 반면 액체질소 증기 또는 액체질소에 직접 넣었을 때는 24,000℃/분, 그리고 open-pulled straw는 22,500℃/분이었다고 Hochi 등 (1996)이 보고한 바와 같이 MD 방법으로 동결한 본 실험의 cooling rate는 아마도 액체질소 증기에 바로 넣었을 때의 24,000℃/분의 속도와 비슷하거나 그보다 높았을 것이라고 생각된다. 본 실험의 결과와 같이 높은 cooling rate는 저온에 민감한 세포의 냉각에 의한 손상을 피하게 하고 동결액에 노출시간을 줄여주므로 세포에 대한 독성을 감소시킬 수 있었다고 생각된다.

Hochi 등 (1996)은 난자를 ethylene glycol에 10분 동안 노출하면 침투성 동결액인 EG이 난자내로 침투하는데 충분한 시간이라고 하였으며, 또한 ficoll/sucrose 가 포함된 액에 난자를 이동하면 난자는 수축을 하게 되고 세포내 EG의 농도가 높아지는 결과를 가져온다고 하였다. 그러므로 세포내 동결액의 농도가 높게 되므로 초자화 동결에 의한 손상을 효과적으로 피하게 되는 역할을 하는 것으로 생각되며, 본 실험에서도 동결과정에서 1단계 EG, 2단계에서 EG+ sucrose액으로 평형시키므로써 삼투압차를 감소시키면서 난자내 동결액의 농도를 증가시키고 수분을 최소화시키므로써 생존율이 증가될 수 있었다고 생각된다.

Dinnyes 등 (2000)은 metal 표면위에서 초자화 동결 용해한 난자의 생존율은 난구세포가 존재하는 난자에서 86%, 난구세포가 제거된 난자에서 79%-81%를 얻었다고 하였다. 그러나 본 실험의 결과 MD 방법으로 동결 용해하였을 때 난구세포가 있는 난자에서는 80.36%, 난구세포가 없는 난자에서는 88.14%를 얻었으며, 최고 92.55% (Table 1)까지 생존율을 나타내는 것으로 보아 본 실험의 microdrop 방법은 유효한 것으로 생각된다.

그리고, Dinnyes 등 (2000)에 의하면 난구세포가 부착된 난자와 제거된 난자를 초자화 동결 용해한 후 단위발생 활성화 시켰을 때 난구세포가 부착된 난자에서 배반포 발달율이 높았으며, 동결용해 난자를 이용하여 핵이식을 하였을 때 난할율과 배반포 발달율에 있어서 Fresh 난자와 차이가 없었다고 보고하였다.

그러나, 본 실험에서 Fresh 난자는 활성화 처리후 난할율 및 배반포 발달율에서 동결 용해한 두 처리보다 유의적으로 높은 2세포기 발달율을 나타냈으나 배반포 발달율에 있어서는 차이가 없었다. 이 결과는 초자화 동결 용해 난자가 단위발생 활성화 처리후 배반포까지 발달할 수 있는 능력이 있음을 나타내 주고 있다.

난자는 정상 수정이 이루어지면 난자의 핵은

자성전핵으로, 정자의 두부는 응성전핵으로 발생하여 두 개의 전핵이 난자내에 존재하게 된다. 본 실험에서 신선란은 정상 수정율 (2PN)에 있어서 난구세포 없이 초자화 동결한 난자보다 높은 결과를 가져왔다. 그러나 난구세포가 부착된 난자의 2PN 발생율은 세 처리간 유의차가 없었다. 이러한 결과들은 지금까지 보고된 바가 없는 것으로 생각된다. 그러나 신선란에서 난구세포의 제거는 자용 전핵의 형성에 영향을 미친다는 보고 (Ball 등, 1983)와 다정자 침입이 많이 발생한다는 보고가 있다 (Behalova와 Greve, 1993). 초자화 동결 용해 난자는 신선란에 비해 높은 미수정란의 발생율 (<1PN)을 나타내고 있다. 여러 연구자들의 보고에서도 동결 용해 난자에서 수정란 발달율은 매우 낮았는데, 그 원인으로는 동결 용해후 투명대 경화 현상 등으로 인해 정자 침입율이 감소하였기 때문이라고 생각된다 (Niemann, 1991; Parks 와 Ruffing, 1992). Mouse에서도 동결 용해후 50%의 난자가 투명대의 변화로 정자의 침입을 방해하였으며, 그 결과로 수정이 이루어지지 않았다고 하여 (Carroll 등, 1990) 본 실험의 결과와 일치한다. 그러나 Hochi 등 (2000)에 의하면 open pulled glass capillary를 이용하여 초자화 동결 용해한 소 난자의 정상수정율 (자성과 응성전핵의 형성) 범위는 50%~73%였다고 보고하였다.

동결 용해 난자는 체외수정 후 난할 및 배반포 발생 능력이 있는지 검사하였다. 난구세포가 존재하는 상태에서 MD 또는 Straw 방법과 비교하였을 때 신선란은 난할율과 배반포 발달율이 감소되는 것으로 나타났다 (Table 4). 또한 난구세포를 제거한 처리에서는 MD 방법이 2 세포기 발달율에서 Fresh 난자와 차이가 없는 것으로 나타났으나 배반포 발달율은 모두 유의적으로 낮은 결과를 나타내고 있다. 또한 Fatehi 등 (2002)은 신선란에서 체외수정시 난구세포에 둘러싸인 난자(56%)는 난구세포가 없는 난자(25%)보다 높은 난할율을 나타냈다고

보고하였다. 본 실험에서도 이와 일치하는 경향을 보여주고 있다. 이 외에도 체외수정시 난구세포가 존재하므로 인해 수정율이 증가되었다는 보고는 mouse (Fraser, 1985; Siddiquey 와 Cohen, 1982), 돼지(Kikuchi 등, 1993), 물소 (Nandi 등, 1998) 그리고 소(Younis 와 Brackett, 1991; Cox 등, 1993; Zhang 등, 1995; Fatehi 등, 2002)에서 보고되었다. 그러나 초자화 동결 용해후 낮은 난할율 및 배반포 발달율의 원인은 난구세포의 제거뿐만 아니라 동결 용해과정 전반에 걸쳐서 축적된 손상들의 영향인 것으로 생각된다.

본 실험에서 MD 방법으로 동결 용해한 난자는 체외수정 후 2세포기 및 배반포까지 발달이 가능함을 나타내 주고 있다. 그러나 동결 용해과정과 용해 후 처리과정에 대하여 더 깊은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## V. 요약

본 연구는 소 난자의 초자화 동결 방법을 설정하기 위하여 체외성숙 소 난자에서 난구세포가 부착된 상태 또는 제거한 상태로 microdrop (MD) 방법과 straw (Straw) 방법을 이용하여 초자화 동결하여 생존율을 검사하였다. 동결 용해난자는 a) 단위발생을 유도하였고 b) 체외수정 후 전핵 형성을 관찰하였으며 c)체외수정 후 수정란 발달을 검사하였다. 초자화 동결 난자의 생존율은 MD 방법을 이용하였을 때 Straw를 이용하였을 때 보다 높았다 (92.50 vs. 74.19%,  $p < 0.05$ ). MD 방법을 이용하였을 때 대부분의 난자가 생존을 하였다. 단위발생을 유도하였을 때 난할율과 배반포 발달율은 MD (45.05%, 10.81%,  $p < 0.05$ )가 Straw 방법 보다 높았다 (27.17%, 6.52%,  $p < 0.05$ ). 난구세포의 부착 유무에 따라 동결 용해 후 체외수정 하여 자용 전핵 형성을 각각 검사하였다. 난구세포 제거 난자에서는 MD와 Straw 방법으로 동결 용해하였을 때 차이가 없었다(80.36% vs. 67.31



%,  $p < 0.05$ ). 정상 수정율 (2PN)에서는 세 처리 간에 차이가 없었다 (Fresh; 54.55% vs. MD; 42.22% vs. Straw; 37.14%,  $p > 0.05$ ). 그러나 미수정란 (<1PN)은 Fresh 난자가 동결용해 난자보다 유의적으로 낮았다 (Fresh; 32.47% vs. MD; 57.78% and Straw 62.86%,  $p < 0.05$ ). 다정자 침입은 (3PN) 신선란 (12,99%)에서 발생하였으나 동결 용해 난자에서는 발생하지 않았다. 난구세포가 제거된 난자에서, 정상 수정율 (2PN)은 Fresh와 동결 용해 난자간에 유의적인 차이를 보였다 (Fresh; 59.38% vs. MD; 17.31% and Straw; 30.43%,  $p < 0.05$ ). 또한 미수정율 (<1PN)에 있어서도 신선란과 동결 용해난은 유의적인 차이를 보였다 (Fresh; 23.44% vs. MD; 73.08% and Straw 58.70%,  $p < 0.05$ ). 다정자 침입 (3PN, >4PN)은 신선란과 동결 용해란 모두에서 나타났다. 체외수정 후, 난구세포가 부착된 난자의 2세포기 발달율은 신선란에 비하여 MD 또는 Straw 처리구에서 유의적으로 낮았다 (Fresh; 81.76% vs. MD; 22.22% and Straw; 11.36%,  $p < 0.05$ ). 동결용해난자는 배반포 발달율에 있어서도 신선란에 비하여 유의적으로 낮았다 (Fresh; 28.38 vs. MD; 1.71% and Straw 0%,  $p < 0.05$ ). 난구세포가 제거된 난자에서 2세포기 발달율은 신선란과 MD에서 차이가 없었다 (27.59% vs. 19.25%,  $p < 0.05$ ), 그러나 배반포 발달율에 있어서는 신선란이 MD 또는 Straw 처리구보다 유의적으로 높았다 (4.31% vs. 0.62% and 0%, respectively;  $p < 0.05$ ). 이상의 결과에서, 초자화 동결용해한 소 난자는 체외수정 후 배반포로 발달이 가능함을 나타내주고 있다.

## VI. 인 용 문 헌

- Ball, G. D., Leibfried, M. L., Lenz, R. W., Ax, R. L., Bavister, B. D. and First, N. L. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. Biol. Reprod. 28:717-725.
- Behalova, E. and Greve. T. 1993. Penetration rate of cumulus enclosed versus denuded bovine eggs fertilized *in vitro*. Theriogenology. 39:186(Abstr.).
- Carroll, J., Wood, M. J. and Whittingham, D. G. 1990. Normal fertilization and development of frozen-thawed mouse oocytes. Protective actin of certain macromolecules. J. Reprod. Fertil. 90: 547-553.
- Cox, J. F., Hormazabal, J. and Santa, M. A. 1993. Effect of cumulus on *in vitro* fertilization of bovine matured oocytes. Theriogenology. 40:1259-1267.
- Dinnyes, A., Dai, Y., Jiang, S. and Yang, X. 2000. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. Biol. Reprod. 63:513-518.
- Fatehi, A. N., Zeinstra, E. C., Kooij, R. V., Colenbrander, B. and Bevers, M. M. 2002. Effect of cumulus cell removal of *in vitro* matured bovine oocytes prior to *in vitro* fertilization on subsequent cleavage rate. Theriogenology. (In press).
- Fraser, L. R. 1985. Albumin is required to support the acrosome reaction but not capacitation in mouse spermatozoa *in vitro*. J. Reprod. Fertil. 74:185-196.
- Hochi, S., Mitsuhiro, A., Minagawa, G., Kimura, K. and Hanada, A. 2001. Effects of cooling and warming rates during vitrification on fertilization of *in vitro*-matures bovine oocytes. Cryobiology. 41:69-73.
- Hochi, S., Akiyama, M., Kimura, K. and Hanada, A. 2000. Vitrification of *in vitro*-matured bovine oocytes in open-pulled glass capillaries of different diameters. Theriogenology. 53:255. abstr.
- Hochi, S., Kozawa, M., Fujimoto, T., Hondo, E., Yamada, J. and Oguri, N. 1996. *In vitro* maturation and transmission electron microscopic observation of horse oocytes after vitrification. Cryobiology. 33:300-310.
- Kikuchi, K., Nagai, T., Motlik, J., Shioya, Y. and Izakie, Y. 1993. Effect of follicle cells on *in vitro* fertilization of pig follicular oocytes. Theriogenology. 39:593-599.
- Lane, M., Bavister, B. D., Lyons, E. A. and

- Forest, K. T. 1999. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos: Adapting a proven method for flash-cooling protein crystals to the cryopreservation of live cells. *Nat. Biotechnol.* 17:1234-1236.
13. Martino, A., Songsasen, N. and Leibo, S. P. 1996a. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol. Reprod.* 54:1059-1069.
14. Martino, A., John, W. P. and Leibo, S. P. 1996b. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. *Mol. Reprod. & Develop.* 45:503-512.
15. Matsumoto, H., Jiang, J. Y., Tanaka, T., Sasada, H. and Sato, E. 2001. Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology.* 42:139-144.
16. Nandi, S., Chauhan, M. S. and Palta, P. 1998. Influence of cumulus cells and sperm concentration on cleavage rate and subsequent embryonic development of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology.* 50:1251-1262.
17. Niemann, H. 1991. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: Current status and research needs. *Theriogenology* 35:109-124.
18. 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.* 51:173(Abstr.).
19. Parks, J. E. and Ruffing, N. A. 1992. Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes. 37:59-73.
20. Rosenkrans, C. F. Jr and First, N. L., 1991. Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage: effect of amino acids and vitamins. *Theriogenology* 35:166.
21. Rosenkrans C. F. and First N. L. 1994: Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes *in vitro*. *J Anim Sci* 72, 434-437.
22. Siddiquey, A. K. S. and Cohen, J. 1982. *In vitro* fertilization in the mouse and the relevance of different sperm/egg concentrations and volumes. *J. Reprod. Fertil.* 66:237-242.
23. Steponkus, P. L., Myers, S. P., Lynch, D. V., Gardner, X., Bronshteyn, V., Leibo, S. P., Rall, W. F., Pitt, R. E., Lin, T. T. and MacIntyre, R. J. 1990. Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. *Nature* 345:170-172.
24. Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P. J., Jacobsen, H., Greve, T. and Callesen, H. 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 51:53-58.
25. Yang, B. S. and Leibo, S. P. 1999. Viability of *in vitro*-derived bovine zygotes cryopreserved in microdrops. *Theriogenology.* 51:178(Abstr.).
26. Younis, A. I. and Brackett, B. G. 1991. Importance of cumulus cells and insemination interval for development of bovine oocytes into morulae and blastocysts *in vitro*. *Theriogenology.* 36:11-21.
27. Zhang, L., Jiang, S., Wozniac, P. J., Yang, X. and Godke, R. A. 1995. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 40:338-344.
- (접수일자 : 2002. 10. 4 / 채택일자 : 2002. 11. 26)