

## 수정란의 급속동결융해법에 관한 연구.

### Ⅲ. 소 동결수정란에 대한 1단계 Straw법이 난자 생존성에 미치는 영향

석호봉 · 이광원\* · 손동수\* · 김일화\*

단국대학교 농과대학 축산학과

\*국립종축원

## Studies on Quick Freezing and Thawing of Embryos.

### Ⅲ. Survival Effects of Bovine Embryos Cryopreserved and Diluted by One-Step Straw Method for Handling of Frozen-Thawed Embryos

H. B. Seok, K. W. Lee\*, D. S. Son\* and I. W. Kim\*

Department of Animal Science, College of Agriculture, Dankook University

\*National Animal Breeding Institute

#### Summary

The objective of this experiment was to study some possibilities to simplify freezing, thawing and transfer procedure of one-step straw method comparing with the conventional methods using bovine embryos. The previous work are also designed to investigate the thawing effect by development stage and its quality using the embryos. Results obtained were summarized as follows:

1. A total of 87 embryos from 14 donor cows were frozen-thawed and an average of frozen embryo/donor was 6.2.
2. The survival rates of morula stage(65.4%) were higher than those of blastocyst stage(57.1%) and vice versa in rate of morphological recovery (80% vs 95.4%). However, no significant difference was denoted between them.
3. In difference between the groups of good quality and poor quality, good quality was resulted in a significantly higher embryo survival rate(75%) and recovery rates(95%) than poor quality( $P < 0.01$ ).
4. In effects of non-permeable sugar dilution in added to 1.0M glycerol, higher survival rates were orderd in sucrose, lactose, raffinose and xylose. But lactose-raffinose, sucrose-trehalose and xylose in added to 2.0M glycerol.
5. The highest survival rates were obtained by direct plunge into the liquid nitrogen with 3.0M concentration both of glycerol and trehalose.
6. The survival rates in *in vitro* condition of one-step and direct plunge methods(75%-87.5%) were significantly higher than those of multiple steps (21.4-52.6%) in *in vitro* ( $P < 0.01$ ). However, the results of single-step were critical in comparing to other steps of final pregnant conformation.

#### 서 론

Whittingham 등(1971)과 Wilmut(1972)에 의하여 마우스 수정란을 액체질소에서 동결융해한 후 그

생존성이 증명된 이래 많은 학자들에 의하여 소의 수정란이식 연구에 관계하여 왔다. 특히 유용한 유전 물질을 보존하고 수란우에 즉시 공급할 수 있으며 수정란의 원거리 이동으로 국제간에 상품화로 인정을

\*이 연구는 1989년도 한국과학재단 연구비 지원에 의한 결과임(과제번호:891-1505-038-2)\*

받고 있다(석, 1989; Fahning과 Garcia, 1989; 김, 1986; Fahning, 1986; Wright, 1985; 석 등, 1983 a, 1983b, 1984; Bilton과 Moore, 1977).

소 수정란이식에 관련된 가장 중요한 문제는 동결 용해한 후 수태율을 향상시키는 것이다. 따라서 실험실 보다는 field에서 더 많은 연구가 필요하며, 이식술도 간단하고 신속하며 노력이 적게 드는 쪽의 수태율이 높은 냉동기술을 요구하고 있다(Fahning과 Garcia, 1989; Massip 등, 1987a; 鈴木, 1986; Niemann, 1986; Franks 등, 1986; Leibo, 1985; Voelkel, 1984). 또한 동결용기도 1/4ml French straw를 사용하므로써 과거에 사용하던 분량이 많은 straw, 초자류 및 plastic ampules 보다는 편리하게 이용하고 있다(Takeda, 1987; Wright, 1985; 鈴木 등, 1984; Renard 등, 1982a; Lohn-Jensen과 Greve, 1978).

1973년 Wilmut와 Rowson에 의하여 2.0M DMSO 또는 0.3M sucrose 용액에 동결한 소 수정란에서 송아지가 탄생된 이래 여러 학자들에 의해 성공적으로 수행되었다.(Nelson과 Nelson, 1988; 高見 등, 1987; Chupin, 1986; Rodrigues 등, 1986; 鈴木과 下平, 1985; Voelkel 등, 1985; Wright, 1985; Renard 등, 1981; Leibo와 Mazur, 1978; Trounson 등, 19

76; Wilmut 등, 1975).

최근 Leibo와 Mazur(1978)는 sucrose와 같은 비침투성 동결보호제에 단계적으로 희석하므로써 일정한 삼투압 유지로 동결과정에서 일어나는 수정란의 손상을 방지할 수 있다고 하였다. Glycerol과 같은 침투성 동결보호제보다 더 신속하게 수분이 이동을 하기 때문에 수정란내의 삼투성 평형을 유지하는데 도움을 준다. 만일 동결수정란을 용해하고 세포내 보호제를 함유하지 않았을 때의 수정란은 sucrose와 같은 비침투성 용액의 삼투압으로 수축되었다가 PBS로 신속하게 희석하면 생존율을 유지할 수 있는 이론적 근거를 가지고 있다.

현재 많이 사용하는 step-wise dilution법은 6단계법과 3단계법과 1단계법이 있다. 6단계와 3단계는 수정란이 외부의 수분과의 삼투압 차이를 좁히는 장점이 있으나 시간이 많이 걸리고 현미경 조작에서 이루어지는 난점이 있기 때문에 야외에서 현미경 경검을 필요치 않고 인공수정시 정액과 같은 조작으로 이식할 수 있는 1단계법으로 바뀌어지고 있다. 1단계 희석법의 원리는 Leibo(1984)가 주장한 Fig. 1.과 같다.

즉, 수정란은 1단계 희석으로 1.5M glycerol 용액에서 1.08M의 sucrose 용액으로 전환될 때 glycerol은

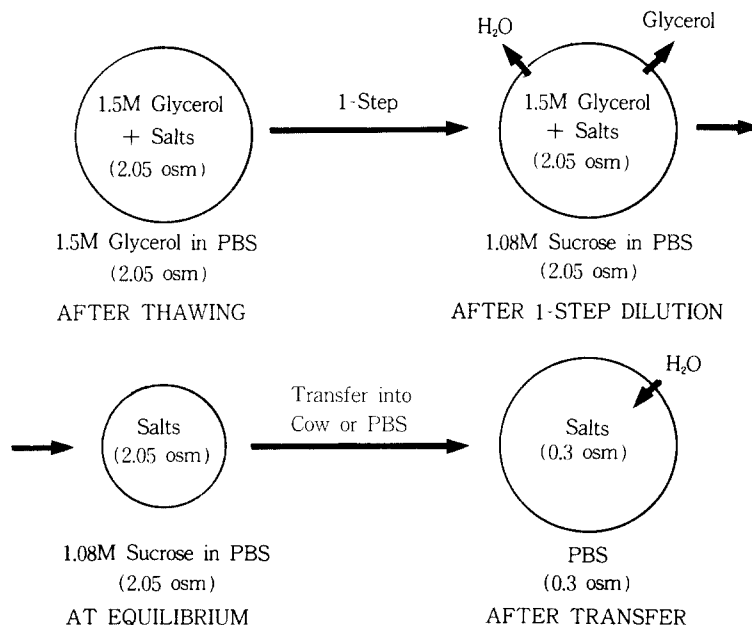


Fig. 1. Rationale for one-step dilution.

수정란 밖으로 용출되고 삼투성 평형을 유지하기 위해 수분유출 현상이 일어나며 다시 이식된 소의 자궁액이나 PBS와 같은 등장액과 섞었을 때는 수분의 재흡수가 일어나 원래의 수정란 모양으로 되돌아온다. 소 수정란의 동결융해 처리를 sucrose 1단계 희석법으로 보고된 방법들은 많이 있으나(鈴木, 1984; Chupin과 Procureur, 1984; Renard, 1982b; Niemann 등, 1981) 다른 비침투성 희석액인 lactose (Takahashi와 Kanagawa, 1985), raffinose(Takahashi 와 Kanagawa, 1985; 강 등, 1988), trehalose (Smorag, 1990; Robertson, 1989; Krag 등, 1985) 등으로 처리한 성적은 실험동물이었으며 경제동물에 대한 실험은 거의 알려지지 않고 있다. 최근에 수정란을 평형처리 하지 않고 직접 액체질소에 침적하는 수정란의 초사화(vitrification)로 동결기 없이 동결이 가능하며 융해도 간편히 시행되고 있으나, blastocyst stage와 같은 적정시기에 있는 발육수정란이 오히려 수태율이 떨어지고 있다는 것이 해결해야 할 과제이다(Lopez-Gatius와 Camon-Urgel, 1989; Van Der Zwalmen 등, 1989; Fahning과 Garcia, 1989; Massip 등, 1987b; Chupin, 1987).

I 보에서 마우스 수정란을 동결기기로 이용해서 여러가지 동결보호제의 효과를 검토하였고, II 보에서 마우스 수정란을 동결기기로 이용하지 않고 액체질소에 직접 침적하는 방법을 연구하였다.

본 연구에서는 경제동물인 소 수정란을 이용하여 침투성과 비침투성 용액에서 1단계 straw 방법으로 동결처리된 난자의 생존성을 조사하였고 1단계법이 6단계, 3단계 및 직접 침적하는 실험과 비교하므로써 이식기술의 간편화 또는 실용화의 가능성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시 동물

국립종축원에서 사용하고 있는 홀스타인종 젖소로서 임상적으로 생식기 질환에 이환되지 않은 건강한 젖소를 공란우로 사용하였다. 사육방법은 국립종축원 관행에 의거 사사 또는 방목 사육하였다.

### 2. 보존제, 동결보호제 및 체외 배양제

채란 및 보존제로는 fetal calf serum(FCS)을 2

% 및 20% 첨가한 modified Dulbecco's phosphate buffered saline(m-DPBS)을 사용하였다. 삼투성 동결보호제로는 lactose, raffinose, sucrose, trehalose, xylose 등 2당~5당류의 sugars 용액으로 농도는 0.5M을 사용하였다. 기존으로 사용된 동결보호제중 glycerol의 6단계는 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.3M에, 3단계는 0.4, 0.8, 1.4M에 각각 10분간 계단희석으로 평형처리하여 1단계법과 비교하였다. 융해시에는 동결의 역순으로 실시하였다. 체외배양제는 Ham's F-10배지(GIBCO, U.S.A.)를 사용하였다. 모든 용액은 실험전날 준비하여 사용시 1회용 filter(25mm, 0.2 $\mu$ m, Nalgene, U.S.A.)로 여과하였고 한번 사용한 용액은 가능한한 재사용을 하지 않았다.

### 3. 과배란 처리

공란우 발정주기 9~12일째에 직장검사를 실시하여 정상적인 자궁 및 난소상태를 가진 공란우를 선발하여 MOT액(7.5% sodium bicarbonate와 gentocin합제) 50ml를 주사하고 그 다음날부터 FSH-P(Burns-Biotech Lab, U.S.A.) 40mg을 12시간 간격으로 5일간 근육내로 투여하였으며, FSH-P 투여 3일째에 PGF $_{2\alpha}$  제제인 dinoprost(Lutalyse, Upjohn, U.S.A.) 45mg을 2회 분할 근육주사하여 과배란 및 발정동기화를 유도하였다.

### 4. 공란우 인공수정

공란우가 발정이 발현된 후 LH-Rh(conceral, 동방) 200mg을 근육주사하고 정액 5 straws를 12시간 간격으로 3회에 나누어 수정을 실시하였다.

### 5. 수정란 채란 및 검검

공란우의 발정이 발현된 이후 7~8일째에 2% lidocaine 으로 경막내 마취를 실시한 후 foley catheter를 사용한 비외과적 방법으로 각 자궁마다 채란액 700ml로 자궁을 관류하여 수정란을 회수하였다. 회수된 채란액을 직경 9cm 사례에 분주하여  $\times 10 \sim 63$ 배의 실체현미경 또는  $\times 100 \sim 200$ 배의 위상차 현미경으로 수정란의 형태와 발육단계(stage) 및 질(quality)을 조사하였다. 수정란의 발육 stage와 quality는 일반적인 수정란 감별법에 준하였다. Stage는 morula와 blastocyst로 간단히 구분하였고 cell cleavage stage나 hatched된 수정란은 제외하였고

이상란, 기형란, 결손란, 부정란은 모두 동결에 이용하지 않았다.

## 6. 수정란 선별, Straw조작 및 동결

실체현미경에 의한 채취수정란을 감별하여 이상란을 제거하여 형태학적으로 정상적인 morula 또는 blastocyst stage의 것을 선별하였다. 보존액으로 3회 세척하고 glycerol 용액으로 각 단계별로 10분간 평형하였다. 수정란을 1/4ml plastic straw(IMV, France)에 6단계와 3단계는 기존방법(Garcia, 1986; 석 등, 1983a)으로 1단계는 I보의 Fig. 1과 같이 각각 straw당 1개씩 수정란을 분주하였다. 동결은 Table 1과 같은 방법으로 냉각하였다. 동결기기를 사용하여  $-6^{\circ}\text{C}$ 까지는  $1^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 으로 하강한 후 ice seeding을 하면서 10분간 hold 하였다가  $-35^{\circ}\text{C}$ 까지는  $0.3^{\circ}\text{C}/\text{분}$ ,  $-38^{\circ}\text{C}$ 까지는  $0.1^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 으로 계속 냉각하고 액체질소에 침적하였다. 3단계의 일부와 1단계는  $-38^{\circ}\text{C}$  처리를 생략하였다. 동결기기를 사용하지 않는 직접침적법(direct plunge)은 II보와 같은 방법으로 실시하였다.

## 7. 수정란 용해

6단계와 3단계는  $30-32^{\circ}\text{C}$ 에, 1단계는  $37^{\circ}\text{C}$ 와  $20^{\circ}\text{C}$ 의 항온수조에 각각 10초간 급속용해하였다. 용해 후 샤프에 옮겨 동결시 평형처리의 역순으로 glycerol 고농도에서 저농도로 단계희석하였다. 1단계 희석법은 straw내에서의 평형처리를 위해 I보의 방법과 같이 straw를 수직으로 세우고 상부를 손가락으로 가볍게 치면서(finger-flip) 공기층을 윗부분으로 올림으로서 수정란액과 비침투성액을 합치도록 하였다. 실온에서 10분간 유지하였다가 멸균샤프에 옮겨 m-DPBS +10% FCS액에 3회이상 세척한 후 Ham's F-10배지가 담긴 배양용 샤프로 옮기고 액체 paraffin을 coating한 다음 습윤한  $5\%\text{CO}_2$  유지의  $37^{\circ}\text{C}$  부란기에 배양하여 I보와 같은 방법으로 시간별로 배반포 발생율과 변성율을 조사하여 생존율의 유무를 확인하였다.

## 8. 수정란이식 및 임신진단

이식은 자연발정된 처녀우(heifer)를 수란우로 준비하여 발정 후 7일째에 직장검사로 황체를 확인한 후 비외과 이식기로 황체가 확인된 자궁각의 심부에

이식하였다.

진단은 이식후 60일에 직장검사로 임신여부를 판정하였다. 실험에서 얻어진 data는  $\chi^2$ -test로 통계적인 유의성을 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 채란 및 동결처리 결과

실험에 착수한 1989년 3월부터 1991년 1월까지 동결용해법에 사용한 젓소 14두에서 89개의 수정란을 채란하여 87개를 동결용해하였다(Table 2). 두당 평균 채란수는 6.4개였고 두당 평균 동결수는 6.2개였다. Straw 동결방법은 수평식(horizontal type)으로 처리하였다.

### 2. 수정란 발육단계별 생존효과

동결수정란을 용해한 후 형태학적인 조사와 생체내 이식한 후 임신율과 시험관내에서 배반포 발생율로 발육단계별 난자의 생존성을 조사한 결과는 Table 3과 같다.

Morula stage의 수정란은 blastocyst stage에 비하여 정상란 회수율은 낮았고 ( $80\%$ 와  $95.4\%$ ) 생존율은 높았으나( $65.4\%$ 와  $57.1\%$ ) 통계적 유의차는 인정되지 않았다. Stage별 용해 효과는 동결액의 농도, 온도, 처리시간과 동결용해 조건에 따라 차이가 있다고 본다.

동결을 하지 않은 수정란에서는 어느정도 발육이 진행된 blastocyst stage가 morula stage나 cell stage의 수정란에 비하여 수태율이 높다는 것은 다 알려진 사실이나(김, 1986) 동결수정란에서는 꼭 그렇지 않다. 오히려 부피가 늘어난 expanded blastocyst보다 compact되어 있는 morula stage의 수정란이 동결과정에서 있을 수 있는 동해의 상해를 덜 받는것 같다.

Morula stage가 blastocyst stage에 비하여 생존율이 약간 높으나 유의성이 없었다는 성적은 Leibo(1984, 1985, 1986), Niemann(1986), Niemann 등(1987)의 Morula와 blastocyst간에 별차이가 없었다는 보고와 일치하나 blastocyst가 높았다는 Trounson 등(1976, 1978), Elsdon 등(1982), Kennedy 등(1983)과는 상이하다. Vitrification에 의한 동결수정란의 발육단계는 blastocyst stage보다 morula stage가

Table 1. Procedures of freezing, cryoprotectant addition and their removal bovine embryos

| Method of procedure | Freezing procedure        |                          |   | Additional procedure |                                     |                   | Removal procedure |                         |
|---------------------|---------------------------|--------------------------|---|----------------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------------|
|                     | Room temp to seeding temp | Hold time & seeding temp | Seeding to plunge   | Cryoprotectant       | Cryoprotectant concentration        | Method of removal | Thawing temp      | Holding time of removal |
| 6 steps machine     | 1°C / min                 | -6°C, 10min              | 0.3°C / m to -35°C<br>0.1 to -38°C  | Glycerol             | 0.25, 0.5, 0.75,<br>1.0, 1.25, 1.3M | 6 steps reverse   | 30 ~ 32°C         | 10 min                  |
| 3 steps machine     | 1°C / min                 | -6°C, 10min              | 0.3°C / m to -35°C<br>0.1 to -38°C or<br>0.3°C / m to -30°C<br>0.1 to -35°C | Glycerol             | 0.4, 0.8, 1.4M                      | 3 steps reverse   | 30 ~ 32°C         | 10 min                  |
| 1 step machine      | 1°C / min                 | -6°C, 10min              | 0.3°C / m to -35°C<br>10min hold  | G+sugars             | 1.0MG-2.0MG                         | 0.5M<br>sugars    | 37°C              | 10 min                  |
| 1 step direct       | -                         | -                        | direct plunge<br>into LN <sub>2</sub>                                       | G+sugars             | 1.4M-3.5MG<br>2.5M-3.5MG            | 0.5MS<br>0.5MT    | 37°C              | 10 min                  |
| 1 step direct       | -                         | -                        | direct plunge<br>into LN <sub>2</sub>                                       | G+sugars             | 25%G+25%PROH                        | 1.25MS            | 20°C              | 10 min                  |

G: glycerol, S: sucrose, T: trehalose, PROH: 1,2 propanediol, M: mol, m: minute

Table 2. Results of superovulation and collection of bovine embryos

| Year  | No. of donor treated | No. of treated | Mean of collect / head | No. of frozen & thaw | Mean of frozen / head |
|-------|----------------------|----------------|------------------------|----------------------|-----------------------|
| 1989  | 6                    | 14             | 2.3                    | 14                   | 2.3                   |
| 1990  | 7                    | 62             | 8.9                    | 60                   | 8.6                   |
| 1991* | 1                    | 13             | 13.0                   | 13                   | 13.0                  |
| Total | 14                   | 89             | 6.4                    | 87                   | 6.2                   |

\* Up to Jan, 1991.

Table 3. Effects of developmental stage of bovine embryos developed to expanded blastocysts or pregnancy rate after transfer

| Embryo stage | No. of embryos |        |                  |      | No.* of survival(%) |
|--------------|----------------|--------|------------------|------|---------------------|
|              | Frozen         | Thawed | Normal recovered | %    |                     |
| Morula       | 65             | 65     | 52               | 80.0 | 34(65.4)            |
| Blastocyst   | 22             | 22     | 21               | 95.4 | 12(57.1)            |
| Total        | 87             | 87     | 73               | 83.9 | 46(63.0)            |

\* No. of pregnancy after transfer & No. of embryos developed to expanded blastocysts were included.

더욱 안전하다(Massip 등, 1987b, 1989; Lopez-Gatius, 1989; Van Der Zwalman, 1989).

### 3. 수정란 Quality별 생존효과

수정란을 현미경으로 선별하여 quality가 가장 좋은 것부터 good, fair, poor로 등급하여 융해시 형태학적인 정상란 회수율과 생존율을 조사한 결과는 Table 4와 같다.

Good의 회수율 95%와 생존율 79%는 fair의 83.3%와 40%, poor의 65.2%와 53.3%보다 각각 높았고 생존율은 고도의 유의성( $P < 0.01$ )을 보였다. 수정란의 quality는 수태율에 미치는 영향이 큰 것으로 알려져 있으며 Shea(1983), Kennedy 등(1983), Niemann (1986), Prather 등(1987)의 소 수정란

quality는 수태율과 비례하였다는 보고와 일치한다.

### 4. 비침투성 동결보호 Sugar제의 처리효과

5종의 sugar 0.5M씩과 1.0M과 2.0M의 glycerol과 동결융해 처리한 후 72시간까지 시험관 배양으로 시간별 생존율지속수를 조사하므로서 비침투성 보호제의 동결효과의 결과는 Table 5와 같다. 처리당 3개씩 총 30개의 수정란을 시험한 결과 sugar 종류별, 시간경과별로 cell mass내의 변성물질이 많아지고 전체적인 활성이 떨어진 상태를 보였다(Fig. 2). 1.0M glycerol에서는 sucrose, trehalose, lactose, raffinose, xylose순으로, 2.0M glycerol에서는 lactose와 raffinose, sucrose와 trehalose, xylose 순으로 각각 생존성이 낮아졌다. I 보의 마우스 수정란에서 비침

Table 4. Effect of embryos quality on *in vitro* development or pregnancy rate after transfer

| Embryo quality | No. of embryos |        |                  |      | No.* of survival(%)    |
|----------------|----------------|--------|------------------|------|------------------------|
|                | Frozen         | Thawed | Normal recovered | %    |                        |
| Good           | 40             | 40     | 38               | 95.0 | 30(79.0 <sup>a</sup> ) |
| Fair           | 24             | 24     | 20               | 83.3 | 8(40.0 <sup>b</sup> )  |
| Poor           | 23             | 23     | 15               | 65.2 | 8(53.3 <sup>b</sup> )  |
| Total          | 87             | 87     | 73               | 83.9 | 46(63.0)               |

\* No. of pregnancy after transfer & No. of embryos developed to expanded blastocysts were included.

<sup>ab</sup> Different superscripts denote significant difference within column ( $P < 0.01$ ).

Table 5. Effects of non-permeable cryoprotectant sugars on *in vitro* development of frozen bovine embryos after post-thaw

| Cryoprotectants |   |                | No. of frozen embryos | No. of embryos survival after CO <sub>2</sub> incubation at 37°C |         |      |      |      |
|-----------------|---|----------------|-----------------------|--|---------|------|------|------|
|                 |   |                |                       | 0 hr   | 12~18hr | 24hr | 48hr | 72hr |
| 1.0M            | + | 0.5M lactose   | 3                     | 3  | 3       | 3    | 2    | 0    |
| glycerol        | + | 0.5M raffinose | 3                     | 3  | 3       | 2    | 2    | 0    |
|                 | + | 0.5M sucrose   | 3                     | 3  | 3       | 3    | 3    | 1    |
|                 | + | 0.5M trehalose | 3                     | 3  | 3       | 3    | 3    | 0    |
|                 | + | 0.5M xylose    | 3                     | 3  | 2       | 1    | 0    | 0    |
|                 |   | Subtotal       | 15                    | 15   | 14      | 12   | 10   | 1    |
| 2.0M            | + | 0.5M lactose   | 3                     | 3  | 3       | 2    | 2    | 0    |
| glycerol        | + | 0.5M raffinose | 3                     | 3  | 3       | 2    | 2    | 0    |
|                 | + | 0.5M sucrose   | 3                     | 3  | 3       | 3    | 0    | 0    |
|                 | + | 0.5M trehalose | 3                     | 3  | 3       | 3    | 0    | 0    |
|                 | + | 0.5M xylose    | 3                     | 3  | 1       | 0    | 0    | 0    |
|                 |   | Subtotal       | 15                    | 15   | 13      | 10   | 4    | 0    |
| Total           |   |                | 30                    | 30   | 27      | 22   | 14   | 1    |

투성 동결보호 sugar제의 효과는 1.0M glycerol의 경우 sucrose, trehalose, raffinose순으로 높았다는 것과 2.0M glycerol의 경우 raffinose, lactose, trehalose 순으로 높았다는 것과는 약간의 차이가 있으나 거의 비슷한 결과를 보였다. Sample량이 적어서 앞으로 추가확인이 필요하지만 전체적으로 보아서 소 수정란도 마우스 수정란과 같이 동결융해시 비침투성 보호제는 sucrose이외에 trehalose, lactose 및 raffinose의 사용도 가능하다는 것을 제시해 주고 있다.

강 등(1988)과 김 등(1989)이 각각 raffinose와 trehalose를 급속동결한 후 동결희석제로 사용하였으나 마우스에 대한 것이며 소에 대한 실험은 없다. 소에 대하여 sucrose 이외의 보호제를 사용한 성적은 Richards 등(1988)의 raffinose 보고 외에는 거의 없다.

앞으로의 과제는 1단계 희석법으로 sample량을 증가하여 sugar의 유효농도, glycerol 이외의 침투성 보호제와의 적정농도, 수정란 발육단계별 생존율 등의 조사가 생체내 이식실험으로 확인되어야 할 것이다.

##### 5. 동결보호제 Glycerol의 농도효과

0.5M sucrose와 0.5M trehalose가 첨가된 glycerol 동결보호제의 농도별 효과를 조사하기 위하여 소 수정란을 1단계 straw 희석법에 의한 초급속 동결융해(직접침적법)한 수정란을 시험관내 배양 후 시간별 수정란의 생존율지속수를 조사한 성적은 Table 6과 같다.

Sucrose의 경우는 glycerol이 1.4M, 2.5M, 3.0M, 3.5M중에 3.0M에서 72시간 생존하여 가장 좋은 유효농도였고 trehalose의 경우에서도 3.0M에서 수정란의 생존이 오래 지속되었다. 동결기기를 사용하지 않는 직접침적 처리할 때는 glycerol의 농도가 3.0M 이상이 3.0M이하보다 생존효과가 높았다. 동결기기를 사용하지 않는 직접침적법은 동결보호제의 종류, mol농도, 수정란 stage와 quality, 융해방법 등에 대해 앞으로 개선되어야 할 문제가 많다. 그중에서 Massip 등(1987b)이 주장하는 blastocyst stage의 수태율 저조와 고농도의 glycerol과 sucrose의 독성문제(Renard, 1982; Farning, 1989) 등이 해결되어야 한다.

II보의 마우스 수정란의 glycerol 농도효과에서 sucrose와 trehalose의 경우 3.5M의 농도가 2.0M, 2.5M, 3.0M, 4.0M에 비하여 배반포 발생율이 높았다

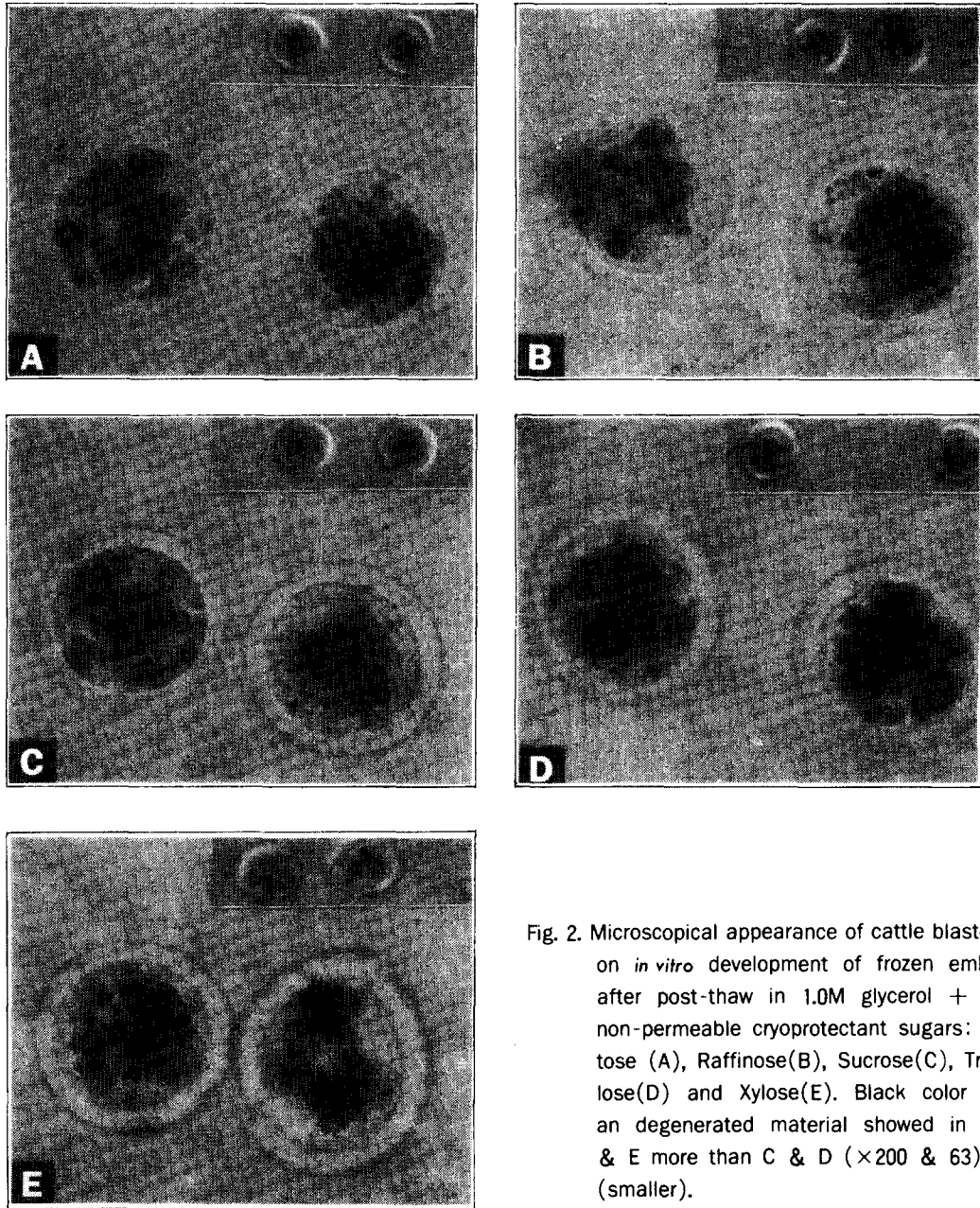


Fig. 2. Microscopical appearance of cattle blastocyst on *in vitro* development of frozen embryos after post-thaw in 1.0M glycerol + 0.5M non-permeable cryoprotectant sugars: Lactose (A), Raffinose(B), Sucrose(C), Trehalose(D) and Xylose(E). Black color alike an degenerated material showed in A, B & E more than C & D ( $\times 200$  & 63) (smaller).

는 것과 약간 차이가 있으나 3.0M이상의 고농도의 효과에서는 서로 일치하고 있다.

이 성적은 Van Der Zwalmen 등(1989)이 3.4 MG + 0.25MS에서 50%의 배반포 발생율, Chupin (1986, 1987)이 2.8MG+0.25M에서 17.3~56.4%, 2.1MG+0.25M에서 18.5~67.3%의 배반포 발생율을 각각 나타낸 것과 비교된다. 또 Massip 등(1987b,

1989)이 25%(3.4M)G+25%PROH에서 수태율 38.1%, 鈴木(1984)이 10%G+0.3~0.6MS에서 수태율 50~100%, Leibo(1984)이 1.5MG+1.08MS에서 3년간 수태율 26%, Massip 등(1987a)이 1.35MG+0.25MS에서 50%의 수태율을 보고한 것과 비교된다.



Table 6. Effects of glycerol dilution on survival on *in vitro* development of bovine embryos frozen by direct plunging into liquid nitrogen

| Cryoprotectant  | No. of frozen embryos | No. of embryos survival after CO <sub>2</sub> incubation at 37°C |         |      |      |      |
|-----------------|-----------------------|--|---------|------|------|------|
|                 |                       | 0 hr   | 12-18hr | 24hr | 48hr | 72hr |
| 1.4M G + 0.5M S | 3                     | 3  | 1       | 1    | 1    | 0    |
| 2.5M G + 0.5M S | 3                     | 3  | 2       | 2    | 1    | 0    |
| 3.0M G + 0.5M S | 3                     | 3  | 3       | 3    | 3    | 2    |
| 3.5M G + 0.5M S | 3                     | 3  | 3       | 3    | 3    | 0    |
| Subtotal        | 12                    | 12   | 9       | 9    | 8    | 2    |
| 2.5M G + 0.5M T | 3                     | 3  | 2       | 2    | 2    | 0    |
| 3.0M G + 0.5M T | 3                     | 3  | 3       | 3    | 3    | 1    |
| 3.5M G + 0.5M T | 3                     | 3  | 3       | 3    | 2    | 0    |
| Subtotal        | 9                     | 9  | 8       | 8    | 7    | 1    |
| Total           | 21                    | 21   | 17      | 17   | 15   | 3    |

G:glycerol, S:sucrose, T:trehalose.

## 6. 희석단계별 비교

융해후 48시간동안 시험관내에 배반포 발생과 사멸을 조사한 1단계 straw 희석법과 생체내 수태결과로 조사된 3단계와 6단계의 정상란 회수율, 생존율 및 동결융해 조작에 소요되는 시간을 비교한 결과는 Table 7과 같다.

동결기기를 이용한 1단계법과 기기를 이용하지 않고 직접 침적법에 의해 처리된 수정란의 회수율은 64~83.3%였고 생존율은 75~87.5%로서 다단계 희석법의 회수율(79.2~100%)보다 낮았고 생존율(21.4~52.6%)보다는 유의성 있게 높았다( $P < 0.01$ ). 특히 1단계, 3단계, 6단계법간의 수정란 생존율은 각각 고도의 통계적 유의차가 인정되었다. 1단계법의 시험

관내와 다단계의 생체내의 동일조건이 아닌데서 오는 차이로서 일치된 성적비교는 할 수 없으나 수정란 생존여부에는 서로 일치하고 있다.

각 단계별로 동결진, 동결, 융해처리에 소요되는 평균시간을 산출하면 동결기기를 사용한 6단계가 4.5~4.0hr, 3단계가 3.0~3.5hr, 1단계가 2.0~2.5hr 였고 기기없이 직접 침적하는 경우는 단지 20~30 min의 시간이 소요되어 수태율만 높다면 1단계법 또는 직접침적법이 훨씬 유리하다.

Leibo와 Mazur(1978)의 단계희석법이 고안된 이래 동결융해 후 생존율이 향상되었으며 간편한 조작법으로 개선되었다. Renard 등(1982)은 1M sucrose로 희석한 1단계 융해에서 82%의 배반포 발생율을 보고

Table 7. Comparison of survival effects and spending times for the handling of one-step straw method and other steps

| Method of addition | Spending time of preparation | No. of frozen-thawed | No. of normal recovered(%) | No.* of survival & fertility(%) |
|--------------------|------------------------------|----------------------|----------------------------|---------------------------------|
| 6-steps            | 4.5-4.0 hr                   | 14                   | 14(100.0)                  | 3 (21.4 <sup>a</sup> )          |
| 3-steps            | 3.0-3.5 hr                   | 24                   | 19( 79.2)                  | 10 (52.6 <sup>b</sup> )         |
| 1-step             | 2.0-2.5 hr                   | 25                   | 16( 64.0)                  | 14*(87.5 <sup>c</sup> )         |
| Direct pluge       | 20-30 min                    | 24                   | 20( 83.3)                  | 15*(75.0 <sup>c</sup> )         |
| Total              |                              | 87                   | 69( 79.3)                  | 42 (60.9 )                      |

\* No. of embryos developed to expanded blastocyst on *in-vitro* culture.

<sup>abc</sup> Different superscripts denote significant difference within column( $P < 0.01$ ).

하였고 Chupin(1984)은 수태율이 높은 방법을 선택하기 위하여 Leibo(1982)의 방법과 Renard 등(1982)의 방법을 비교하였다. 鈴木(1984)과 下平(1985)은 0.3M과 0.6MS의 1단계 희석된 수정란 24개를 이식하여 10두(41.6%)의 임신을 확인하였다.

그러나 Franks 등(1985, 1986), Bielanski 등(1985, 1986), Takeda 등(1985), Prather 등(1987)은 1-2단계가 3단계, 6단계에 비하여 통계적 유의차가 없이 비슷하다는 결과를 보고하였다. 특히 Bielanski 등(1985)은 sucrose로 제기한 것은 glycerol 3단계 희석보다 생존율이 유의성있게 높았으나 용기(straw와 ampule)와 동결시 straw위치(수평과 수직)의 차이에는 유의성이 없었다고 하였다. 따라서 1단계의 생체실험과 동결용기나 straw 위치에 대한 추가실험이 보완되어야 할 것이다.

이상의 성적을 정리하면 소 수정란은 마우스 수정란과 비슷한 동결용해 조건을 보이고 있으나 조작방법의 간편화를 위해서는 보다 양질의 stage 및 quality가 요구되므로 집약된 검사방법이 필요하고 기기없이 동결하는 직접침적 방법은 가장 편리하면서도 보다 세밀한 동결용해 방법의 추가 연구가 필요하다.

## 적 요

실험기간 1989년 3월부터 1991년 1월까지 소 수정란을 이용하여 발육 stage와 quality에 의한 용해효과를 검토하였고 동결보호제에 의한 1단계 straw 희석법으로 수정란 생존성을 조사하여 다른 기존방법과 비교함으로써 이식기술의 간편화 또는 실용화의 가능성을 연구하였다. 얻어진 결과는 다음과 같다.

1. 젖소 공란우 14두에서 89개의 수정란을 채란하고 87개를 동결용해하여 두당 평균 동결수는 6.2개였다.

2. Morula stage의 란은 blastocyst stage에 비하여 용해후 정상 회수율은 (80%대 95.4%)은 낮았고, 생존율(65.4%대 57.1%)은 높았으나 두 처리간의 유의차는 없었다.

3. Good quality의 동결수정란을 용해한 후 정상 회수율은 95%, 생존율은 75%로서 fair와 poor quality 간에는 유의차가 있었다( $P < 0.01$ ).

4. 비침투성 보호제의 용해효과로 1.0M glycerol

의 경우는 sucrose, trehalose, lactose, raffinose, xylose 순으로, 2.0M glycerol의 경우는 lactose와 raffinose, sucrose와 trehalose, xylose순으로 각각 생존성의 차이를 보였다.

5. 직접침적법에 의한 glycerol과 trehalose의 농도 효과는 각각 3.0M에서 수정란의 생존성이 높았다.

6. 시험관 조건에서의 1단계 희석법의 생존율 75~87.5%는 생체조건의 3단계(52.6%)와 6단계(21.4%)보다 높아 세 처리간의 유의성은 인정되나 ( $P < 0.01$ ) 동일조건이 아닌데서 오는 것 같다.

## 참고문헌

- Bielanski A, Schneider U, Pawlyshyn V and Mapletoft RJ. 1985. Effect of sample container and cryoprotectantremoval method on survival of deep frozen bovine embryos. *Theriogenology*, 23(1):179.
- Bielanski A, Schneider U, Pawlyshyn VP and Mapletoft RJ. 1986. Factors affecting survival of deep frozen bovine embryos *in vitro*: The effect of freezing container and method of removing cryoprotectant. *Theriogenology*, 25(3):429-437.
- Bilton RJ and Moore NW. 1977. Successful transport of frozen cattle embryos from New Zealand to Australia. *J. Reprod. Fertil.*, 50:363-364.
- Chupin D. 1986. Quick freezing of bovine blastocysts. *Theriogenology*, 25(1):147.
- Chupin D. 1987. Quick freezing of day 7 bovine blastocysts: Optimum parameters of dehydration step. *Theriogenology*, 27(1):219.
- Chupin D and Procureur R. 1984. Glycerol equilibration for deep freezing of cattle blastocysts: Effect of number of steps and of total duration. *Theriogenology*, 21(1):230.
- Chupin D, Florin B and Procureur R. 1984. Comparison of two methods for one-step in straw thawing and direct transfer of cattle blastocysts. *Theriogenology*, 21(3):445-459.
- Elsden RP, Seidel GE, Jr, Takeda T and Farrand GD. 1982. Field experiments with frozen-thawed bovine embryos transferred nonsurgically. *Theriogenology*, 17(1):1-10.

- Farning ML. 1986. Embryo transfer in cattle in U.S.A. Korean. J. Emb. Trans. 1:3-8.
- Fahning ML and Garcia MA. 1989. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. Reports of CryovaTech International Inc. Hudson, WI, USA, pp. 1-33.
- Franks GC, Coley SL, Betterbed B and Page RD. 1985. The effects of cryoprotective agents, dilution rates, freezing rates, and freezing units on the survival of bovine embryos. *Theriogenology*, 23(1):194.
- Franks GC, Coley SL, Betterbed B and Page RD. 1986. The effect of freezer type, cryoprotectant, and processing methods on viability of frozen embryos. *Theriogenology*, 26(2):135-144.
- Garcia MA. 1986. Cryopreservation of bovine embryos: State of the Art. Korean. J. Emb. Trans. 1:9-15.
- Krag KT, Koehler I-M and Wright RW. 1985. Trehalose: A non-permeable cryoprotectant for direct freezing of early stage murine embryos. *Theriogenology*, 23:200.
- Kennedy LG, Boland MP and Goldon I. 1983. The effect of embryo quality at freezing on subsequent development of thawed cow embryos. *Theriogenology*, 19(6):823-832.
- Lehn-Jensen H and Greve T. 1978. Low temperature preservation of cattle blastocysts. *Theriogenology*, 9:313-322.
- Leibo SP. 1982. A one step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. In: International Congress: "Embryo Transfer in Mammals". Annecy, France, p. 97.
- Leibo, SP. 1984. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 21(5):767-790.
- Leibo SP. 1985. Field trial of one-step diluted frozen-thawed bovine embryos: An update. *Theriogenology*, 23(1):201.
- Leibo SP. 1986. Commercial production of pregnancies from one-step diluted frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 25(1):166.
- Leibo SP and Mazur P. 1978. Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. In: Daniel, J.C., Jr. (ed) *Methods in Mammalian Reproduction*. Academic Press, New York, pp. 179-201.
- Linder GM and Ellis DE. 1985. Refrigeration of bovine embryos. *Theriogenology*, 23(1):202.
- Lopez-Gatius F and Camon-Urgel J. 1989. Pregnancies and live off-spring following transfer of one-step vitrified bovine embryos. *Zuchthg.*, 24:255-258.
- Massip A, Van Der Zwalmen P and Ectors F. 1987a. Cryoconservation de l'embryon bovin: techniques et resultats. *Ann. Med. Vet.*, 131:515-528.
- Massip A, Van Der Zwalmen P and Ectors F. 1987b. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology*, 27(1):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.
- Nelson CF and Nelson LD. 1988. Cryopreservation of 7- to 9-day bovine embryos. *Theriogenology*, 29(1):281.
- Niemann H. 1986. Recent results of freezing experiments with embryos from farm animals. Progress Workshop on Embryos and Oocytes freezing. Annecy, France, 197-204.
- Niemann H, Pryor JH and Bondioli KR. 1987. Effects of slitting the zona pellucida and its subsequent sealing on freeze-thaw survival of day 7 bovine embryos. *Theriogenology*, 28(5):675-681.
- Niemann H, Brem G, Sacher B, Smidt D and Krausslich H. 1981. An approach to successful freezing of demi-embryos derived from day-7 bovine embryos. *Theriogenology*, 25(4):519-524.
- Prather RS, Spire MF, and Schalles RR. 1987. Evaluation of cryopreservation techniques for bovine embryos. *Theriogenology*, 28(2):195-204.
- Renard, JP, Ozil JP and Heyman Y. 1981. Cervical transfer of deep frozen cattle embryos. *Theriogenology*, 15(3):311-320.
- Renard JP, Heyman Y, Ozil JP. 1982a. Congelation de l'embryon bovin: une nouvelle methode de decongelation pour le transfert cervical d'embryons conditionnes une seule fois en paillettes. *Ann. Med. Vet.*, 126:23-32.

- Renard JP, Heyman Y and Ozil JP. 1982b. Sucrose dilution: one way for direct transfer of in-straw frozen bovine embryos. *J. Physiol. Ann.* 13:29.
- Richards DW, Sikes JD and Murphy CN. 1988. Non-surgical transfer and the survival of frozen-thawed bovine embryos supplemented with raffinose. *Theriogenology*, 29(1):295.
- Rodrigues JL and Gregory RM. 1986. Alternative mechanical system to freezing embryos. *Theriogenology*, 25(1):191.
- Robertson JL, Minhas BS, Randall GW, Dodson MG, Palmer TV and Ricker DD. 1989. Ultrarapid freezing of mouse embryos with DMSO and trehalose. *Theriogenology*, 31:250.
- Shea BF, Janzen RE, McAlister RJ and McDermid DP. 1983. Freezing of bovine embryos: Effects of embryo quality, time from thawing to transfer and number frozen per vial. *Theriogenology*, 20(2):205-211.
- Smorag Z, Heyman Y, Garnier V and Gajda B. 1990. The effect of sucrose and trehalose on viability of one and two-cell rabbit embryos. *Theriogenology*, 33:741-747.
- Takahashi Y and Kanagawa H. 1985. Quick freezing of mouse embryos by direct plunge into liquid nitrogen vapor: Effects of sugars. *Jpn. J. Vet. Res.*, 33:141-144.
- Takahashi Y and Kanagawa H. 1988. The role of lactose in quick freezing of mouse embryos. *Theriogenology*, 29(1):315.
- Takeda T, Elsdon RP and Seidel GE Jr. 1985. Survival of cryopreserved bovine embryos cooled at 0.5 or 1 °C/minute. *Theriogenology*, 23(1):232.
- Takeda T, Henderson WB and Hasler JF. 1987. Deep freezing of split and intact bovine embryos. *Theriogenology*, 27(1):285.
- Trounson AO, Willadsen SM and Rowson LEA. 1976. The influence of *in-vitro* culture and cooling on the survival and development of cow embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 47:367-370.
- Trounson AO, 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.
- Trounson AO, Shea BF, Oillis GW and Jacobson ME. 1978. Frozen storage and transfer of bovine embryos. *J. Anim. Sci.*, 47(3):677-681.
- Van Der Zwalmann P, Touati K, Ectors FJ, Massip A, Beckers JF and Ectors F. 1989. Vitrification of bovine blastocysts. *Theriogenology*, 31(1):270.
- Voelkel SA, Viker SD, Lambeth VA and Godke RA. 1984. A new approach to freezing bovine embryos without the use of liquid cooling agents. *Theriogenology*, 21(1):272.
- Whittingham DG. 1971. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature*, 233:125-126.
- Wilmut I. 1972. The low temperature preservation of mammalian embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 31 (Abstr.): 513-514.
- Wilmut I and Rowson LEA. 1973. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.*, 92:686-690.
- Wilmut 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.
- Wright JM. 1985. Commercial freezing of bovine embryos in straws. *Theriogenology*, 23(1):17-19.
- 高見澤稔, 宮崎幸吉, 西村輝雄, 兩再吉三. 1987. 簡易凍結器具による牛受精卵凍結保存試験. *畜産の研究*, 41(6):77-78.
- 鈴木達行. 1986. 牛受精卵凍結保存技術とその新しい展望. *畜産の研究*, 40(4):7-11.
- 鈴木達行, 下平乙夫. 1985. ウシ凍結受精卵用の1段階ストロー法の改良. *家畜繁殖誌*, 31(1):28-30.
- 鈴木達行, 下平乙夫, 藤山雅照. 1984. 蔗糖を用いた1段階ストロー法によるウシ凍結融卵の生存性と非手術的移植. *家畜繁殖誌*, 30(4):211-215.
- 강만중, 김영훈, 문성호, 김중계. 1988. Mouse 수정란의 급속동결에 관한 연구. I. 급속동결에 있어서 glycerol과 sucrose, raffinose의 첨가농도 결정. *한국가축번식학회 논문초록*, p. 17.
- 金熙錫. 1986. 소受精卵移植技術과實用上の問題點. *한국가축번식학회*, 10:145-160.
- 석호봉, 이관용, 신용식, 조운연, 지철하, 오대균, 임경순, 알피엘스텐. 1983a. 소의 동결 수정란의 수태에 미치는 영향. 1. 그리세롤 부유액에 의한 6단계 평형의 영향.

- 한축지. 25(4):369-374.
- 석호봉, 이광원, 신용식, 김호중, 조윤연, 오대균, 지설하, 임경순, 알디베이커. 1983b. 소의 동결 수정란의 수태에 미치는 영향. 2. 서당부유액에 의한 2단계 평형의 영향. 한축지, 25(5):430-437.
- 석호봉, 이광원, 오성룡, 손동수, 윤충근, 김호중, 조윤연, 오대균, 지설하, 지디마흔. 1984. 소의 동결 수정란이 수태에 미치는 영향. 3. 5단계 부유에 의한 그리세롤 제거란의 외과적 이식의 영향. 한축지, 26(5):429-434.
- 석호봉. 1989. 가축 수정란 동결 보존의 최근 이용방법. 韓國受精卵移植研究會誌, 4(1):1-13.
- 석호봉, 이광원, 전대진. 1991a. 수정란의 급속동결용해법에 관한 연구. I. 마우스 동결수정란에 대한 1단계 Straw 법이 난자생존성에 미치는 영향. 한축지, 33(1):1-12.
- 석호봉, 이광원, 손동수, 김일화. 1991b. 수정란의 급속동결용해법에 관한 연구. II. 비침투성 동결보호제가 급속동결한 마우스 수정란의 생존성에 미치는 영향. 한축지, 33(7):
- 정진관. 1984. 소의 수정란 냉동 방법. 한축지, 26(2): 145-149.
- 조충호, 황우석, 정창국, 전윤성, 이홍식, 이창우. 1987. 젓소 수정란의 급속동결법 개발에 관한 연구. 韓國臨床獸醫學會誌, 4(2):5-9.