

한우 체외수정란의 동결보존시 평형시간과 배 발달단계가 생존성에 미치는 영향

공일근 · 주영국 · 이은봉* · 김용권** · 박충생

경상대학교 농과대학 축산학과

Effect of Equilibration Time and Cell Stage on the Survival of IVF Bovine Embryos Cryopreserved by Vitrification

I. K. Kong, Y. K. Joo, E. B. Lee*, Y. K. Kim** and C. S. Park

Department of Animal Science, College of Agriculture, Gyeongsang National University

SUMMARY

The present experiments on cryopreservation were designed to examine the effects of solution toxicity, equilibration time and cell stages on the post-thaw survival of bovine IVF embryos. The oocytes were matured *in vitro*(IVM) for 24 hrs. in TCM-199 supplemented with 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FSH, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LH, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ estradiol-17 β and granulosa cells at 39 $^{\circ}\text{C}$ under 5% CO_2 in air. They were fertilized *in vitro*(IVF) by epididymal spermatozoa treated with heparin for 24 hrs., and then the zygotes were co-cultured *in vitro*(IVC) with bovine oviductal epithelial cells for 7 to 9 days. The bovine IVF embryos were exposed to the EFS solution in one step at room temperature, kept in the EFS solution during different period for toxicity test, vitrified in liquid nitrogen, and thawed rapidly.

1. After the bovine blastocysts were exposed to EFS solution for 2 min. at room temperature and then they were washed in 0.5 M sucrose solution and TCM-199, they were cultured to examined cryoprotectant induced injury during exposure. Most of the embryos(95.0%) developed to reexpanded blastocoels. However, when the exposure time was extended to 5 and 10 min, these development rates dropped dramatically in 5 min. (69.5%) and 10 min. (47.4%), respectively.
2. When the bovine IVF embryos were vitrified in EFS solution after the equilibration for 1 and 2 min. exposure, The embryos to have reexpanded blastocoels following thawing, washing and culture processes were found to be 82.6 and 73.9%, respectively. However, when the exposure time was extended to 3 min, this survival rate dropped to 18.2%. The optimal time for equilibration of bovine IVF blastocysts in EFS solution seemed to be 1~2 min.
3. When the bovine IVF embryos were equilibrated for 1 min, the significantly ($P < 0.05$) higher post-thaw survival rates were obtained from the embryos of blastocyst

* 순천대학교 농과대학(Department of Agriculture, Sunchun National University)

** 삼천포 농촌지도소(Samchunpo Office of Rural Guidance)

stage(81.3%) than morulae stage(5.1%). The optimal cell stage for viterification with EFS solution proven to be blastocyst stage in bovine IVF embryos.

4. The number of blastomeres of blastocyst stage was examined with nuclear staining with Hoechst 33342 during 7 to 9 days post-insemination. The cell counts of frozen bovine IVF embryos were found significantly($P < 0.05$) fewer as $63.7 \geq 7.5$ and those of the fresh embryos $76.6 \geq 7.1$, which were cultured in the same period and conditions as frozen embryos.

Key words : bovine, IVM-IVF embryos, cryopreservation

서 론

난포란의 체외성숙, 수정 및 배양에 의한 소 체외 수정란의 생산능력은 지난 몇 년 동안 급속도로 발전되어왔다. 체외수정란의 동결 용해 후 높은 생존율을 얻기 위하여는 동결보존방법의 개선뿐만 아니라 체외성숙과 배양 등의 기술도 개선되어야 한다고 알려지고 있다. 이와 같이 확보된 수정란의 실용화를 위하여는 수정란의 동결보존기술도 개발되어야만 생산된 수정란을 안전하게 장기간 보존할 수 있으며 수란축의 발정동기화의 문제점도 보완할 수 있게 될 것이다. 지금까지는 자동세포동결기에 의한 완만 동결기법으로 동결보존을 실시하였지만 고가의 기자재가 소요되는 단점이 있어서 이러한 기자재를 필요로 하지 않는 새로운 초급속 동결기법의 개발이 수행되어왔다. 그러나 아직 동결 용해한 수정란의 수태율이 낮고, 특히 체외수정란의 동결보존기법에 관하여는 연구가 부진한 실정이다.

Vitrification 방법은 수정란을 고농도의 동결보호제에 부유시켜 세포내 외수를 빙정화시키지 않고 과냉각상태로 유지하여 투명한 유리와 같이 변하게 하는 방법인데, Rall과 Fahy(1985)에 의하여 처음으로 수정란의 동결에 응용되었으며 이후 Rall과 Fahy(1985), Rall(1987)은 vitrification solution-1 (VS-1)을, Massip 등(1986)은 VS-2를, Scheffen 등 (1986), Van Der Zwalmen 등(1988), Smorag 등(1989), Valdez 등(1990) 및 Kobayashi 등(1990)은 VS-3을 개발하였다. Kuwayama 등(1992)은 체외수정란의 배반포기 배를 glycerol과 1,2-propanediol이 각각 22.5%가 함유되어있는 동결보존액에 1, 2, 4, 8, 16 단계로 평형시켜 0, 10, 79, 82, 87%의 생존율을 얻었다.

Ishimori 등(1993)은 과배란에 의한 체내수정란의 배반포기 배를 ethylene glycol과 DMSO를 이용한 동결보존액에 1, 2, 3 분간 평형을 실시한 결과 85, 73, 20%의 생존율을 얻었다. Kasai 등(1990)은 생쥐수정란에서 40% ethylene glycol, 30% ficoll과 0.5 M sucrose의 용액으로 성공적으로 초자화하였다. Ficoll은 비투과성 동결보호제로서 VS 용액의 거대분자에 속하며, 반면에 작은분자량의 sucrose는 수정란의 수축을 일으킨다. 이 용액은 독성이 적고 수정란 평형을 위하여 전냉각이 필요치 않다. 이러한 새로운 방법은 간편하며 비교적 용이하게 현장에 이용할 수 있다. 또한 Kasai 등(1992)은 토끼수정란의 동결보존시 ethylene glycol을 기본으로 하는 EFS 용액으로 성공적으로 vitrification을 실시하였으며, Tachikawa 등(1993)은 소 체외수정란의 배반포기 배를 EFS 용액으로 동결보존 후 약 80%의 생존율을 얻었다.

따라서 본 연구는 한우 난포란으로 부터 효과적이고 안정적인 이식 가능한 체외수정란의 생산하여 실용적인 수정란의 동결보존을 위하여 EFS 용액을 이용한 초급속 동결기법을 확립하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시란자의 채취

난소는 penicillin G(100 units/ml)와 streptomycin(100 μ g/ml)이 함유된 생리식염수(25~28 $^{\circ}$ C)에 넣어 2 시간 이내에 실험실로 운반하였다. 난포란은 중난포(직경 2~6 mm)에서 채취하였으며 4~5 회 기본용액(TCM-199 + 10% FCS)으로 세척하여 난포란의 선발은 Wiemer 등(1991)의 방법에 준하여 난구세포층과 세포질의 충실도에 따라

실시하였다.

즉, 도립현미경(Olympus, 일본) 하에서 4~5 층의 난구세포층이 층만하면서 균일한 세포질을 가진 것을 Grade I, 2~3 층의 난구세포층을 가진 것을 Grade II, 부분적으로 나화된 것을 Grade III으로 구분하였으며, Grade I 과 II의 난포란 만을 실험에 공시하였다.

2. 난포란의 체외성숙 배양액 과 체외성숙

체외성숙 배양액은 TCM-199 배양액에 sodium pyruvate(56 $\mu\text{g}/\text{ml}$), streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), penicillin G(100 units / ml)와 hormone으로는 LH(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), estradiol-17 β (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), FSH(35 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가하였고 혈청으로는 10% FCS를 첨가하였다. 이와 같이 준비된 체외성숙 배양액은 4-well dish에 1 ml씩 분주하여 5% CO₂, 98~99% 습도, 39°C CO₂ incubator에서 18 시간 이상 전배양을 실시하여 평형을 유도하였다. 체외성숙시 과일막세포 포도 2~3 $\times 10^6$ cells /ml의 농도로 난포란과 같이 약 24~26 시간 동안 공배양을 실시하여 난구세포의 팽창과 세포질의 충실도 등으로 체외성숙을 판정하여 체외수정에 공시여부를 판단하였다.

3. 정자준비와 체외수정

체외수정을 위한 정자의 준비는 정소상체미부 정자로서 caffeine(10 μM)이 첨가된 세척용 B. O. medium으로 60 분 동안 swimming-up을 유도하여 부유된 상층의 정자만을 채취하여 500 $\times\text{g}$ 으로 1 회 원심분리한 후, 수정능획득을 위하여 BSA(5 mg / ml), caffeine(5mM) 및 heparin(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 수정용 B. O. medium을 5 ml 첨가하여 다시 500 $\times\text{g}$ 으로 원심분리한 후 약 1 ml의 수정용 B. O. medium을 첨가하여 CO₂ incubator에서 10~15분간 수정능획득을 유도하였다. 체외수정은 성숙된 난포란을 수정용 B. O. medium으로 3~4 회 세척한 다음 수정용 B. O. medium 100 μl drop 당 10~15 개의 난자를 옮긴 후 수정능이 획득된 활력도가 높은 정자의 최종농도가 2~3 $\times 10^6$ sperms /ml이 되게 첨가시켜 약 24 시간 동안 CO₂ 배양기에서 수정을 유도하였다.

4. 수정란의 체외배양

체외수정 후 회수된 수정란을 TCM-199 배양액으로 4~5 회 세척하여 잔여 난구세포와 정자를 제거한 후에 단층을 형성하고 있는 난관상피세포와 공배양시키면서 48 시간마다 신선배양액으로 교환하였으며, 5 일이 경과한 monolayer cells은 신선한 monolayer cells로 교환하면서 수정 후 7~9 일까지 후기배로의 배 발달을 유도하여 상실배와 배반포기 배를 동결실험에 공시하였다.

5. 동결보존액의 준비

동결보존액은 10% FCS를 포함한 D-PBS를 기본 배양액으로 Kasai 등(1992)의 방법에 준하여 EFS solution을 제조하였다. 동결보존액의 제조방법은 기본배양액에 0.3 M sucrose를 첨가하여 완전 용해 후 18%(w/v) Ficoll 70 (average Mw, 70,000)을 첨가하여 용해하고 40% ethylene glycol을 혼합한 후 마지막으로 기본용액으로 용량을 맞추어 제조한다. 이렇게 제조된 EFS solution은 0.2 μm filter로 여과 후 냉장보관하면서 이용하였다.

6. 동결보존액의 독성검사

동결보존액의 적절한 농도, 독성여부 및 평형시간을 알아보기 위하여 EFS solution에 배반포기 배를 2, 5 및 10 분간 평형시킨 후 동결은 실시하지 않고 곧바로 0.5 M sucrose solution에 희석하여 기본용액으로 3~4 회 세척한 후 배양하였다. 이와 같이 실시하여 확장 배반포기 배까지 발육한 것을 생존한 것으로 판정하였으며, 절반정도가 퇴화되고 일부분만 포배를 형성한 것을 거짓배반포기 배로 구분하였다.

7. 체외수정란의 동결과 융해

배의 동결보존은 체외수정 후 상실기와 배반포기까지 발달한 배를 실온에서 1, 2 및 3 분간 petri-dish에 있는 약 1 ml의 EFS solution에 평형하여 다시 Fig. 1과 같이 Kong 등(1991)의 방법으로 동결보존액이 주입되어 있는 0.25 ml plastic straw (IMV, 프랑스) 내의 EFS solution column으로 주입하여 polyvinylalcohol (powder)로 straw 끝부분

을 봉입하였다. 동결보존한 배의 용해는 straw를 액체질소에서 꺼낸 즉시 고농도의 동결보호제에 의한 독성과 삼투압 등의 손상을 방지하기 위하여 20℃의 물에 침적시켜 약 10 초간 흔들면서 용해 후 0.5 M sucrose solution에서 약 5분간 회석하였다. 회석이 완료된 수정란은 다시 기본용액으로 3~4 회 세척하여 약 5 분간 정치시키면서 잔여 동결보호제의 완전제거를 실시한 후 난관상피세포와 공배양하여 생존여부를 판정하였다.

8. 동결 용해 후 생존율 조사

동결 용해한 배는 동결보호제를 제거시키고 기본액에서 5 분간 정치시킨 후 24~48시간동안 난관상피세포와 공배양을 실시하여 확장배반포기 배까지 발달한 것을 생존한것으로 판정하였고 절반 정도가 퇴화하고 일부분만 포배를 형성한 것을 거짓배반포기 배로 분류하고 나머지는 완전퇴화한 것으로 판정하였다.

9. 동결란의 할구수 조사

배의 핵염색은 체외수정후 배반포기 배까지 정상적으로 발육한 것과 동결 용해과정에서 세포의 손상여부를 확인하기 위하여 동결 용해 후 배반포기 배까지 발달한 것을 Hoechst 33342(Sigma Chem. Co., 미국)를 이용한 Pursel 등(1985)의 방법에 준하여 핵염색을 실시하여 형광현미경 200~400 배의 배율하에서 핵의 수를 조사하였다.

10. 통계학적 분석

실험결과와 통계학적 분석은 Microsta computer statistical program package를 사용하여 χ^2 -test 및 T-test를 이용하여 분산분석과 유의차를 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 동결보존액의 독성검사

동결보존시 생존성에 관여하는 중요한 요인으로는 동결보존액의 종류, 농도, 평형시간, 온도 및 배 발달단계 등으로서 이와 같은 요인들을 고려한 적정 평형시간을 찾는 것이 가장 중요하다고 사료된다. 그리고 고농도의 동결보존액에 지나친 노출은 삼투압과 화학적 독성 등의 영향을 받을 수 있기 때문에 동결보존액의 선택과 평형시간 등의 결정시 독성검사는 꼭 필요한 과정이라고 사료된다. 동결보존액에 적절한 평형시간을 알아보고 EFS solution의 독성여부를 판단하기 위하여 배반포기 배를 EFS solution에 2, 5 및 10분간 평형시킨 후 동결은 실시하지 않고 곧바로 0.5 M sucrose solution에 5분간 회석하여 기본용액으로 다시 3~4 회 세척 후 난관상피세포와 공배양하여 확장배반포기 배까지 발달을 유도한 결과는 Table 1에서와 같다. 확장배반포기 배까지 발달한 것을 생존한 것으로 판단하였으며 절반정도가 퇴화되고 일부분만 포배를 형

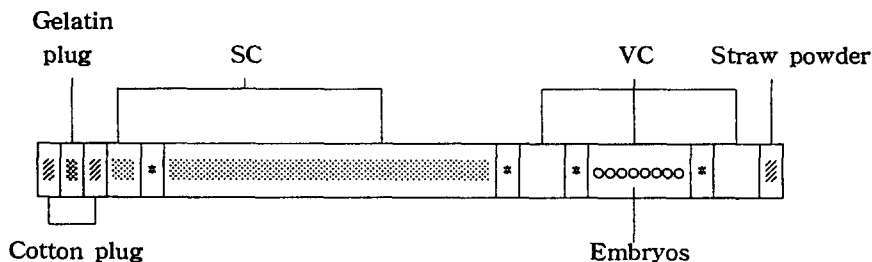


Fig. 1. Diagrammatic representation of 0.25 ml plastic straw loaded with solutions and embryos for vitrification : (SC) 0.5 M sucrose solution column, (VC) vitrification solution, (*) air bubble column, and (o) embryos in vitrification solution.

Table 1. Survival of IVM-IVF bovine blastocysts exposed to vitrification solution for various times at room temperature

Time of exposure (min.)	No. of embryos treated	No. and (%) of embryos developed to		
		Expanded blastocyst	False blastocyst	Degenerated
2	20	19(95.0) ^a	1(5.0)	0(0.0)
5	23	16(69.6) ^b	3(13.0)	4(17.4)
10	19	9(47.4) ^c	2(10.5)	8(42.1)

*Values with different superscripts were significantly different (P<0.05).

성한 것을 거짓 배반포기 배로 구분하였다. 배반포기 배를 EFS solution에 2분간 평형을 실시하였을 때 95%의 생존율을 보였으나, 평형시간이 길어져 5, 10분일 때는 69.6, 47.4%의 생존율로서 급격한 생존율의 감소를 보였다. EFS solution은 Kasai 등 (1990, 1992)에 의하여 생쥐와 토끼 상실배의 동결시 매우 효과적이었다고 보고되었다. 이와 같은 결과에서 EFS solution에서 평형시간이 2분 이상일 경우에는 절대적으로 나쁜 영향을 미치는 것으로 판단되므로 적절한 평형시간은 2분 이내인 것으로 사료된다.

2. 평형시간에 따른 동결 용해 후 생존율

체외수정란의 배반포기 배를 EFS solution으로 동결할 때 적당한 평형시간을 조사하기 위하여 독성검사한 결과 2분 이내가 적당한 평형시간인 것으로 판단되어 1, 2 및 3분간의 평형을 유도하여 동결 보존한 결과는 Table 2에서와 같다. 배반포기 배를 EFS solution에 1, 2 및 3분간 평형을 실시한 결과 각각 82.6, 73.9 및 18.2%의 생존율을 보여 1, 2분의

평형시간 간에는 유의차 없이 높은 생존율을 보인 반면, 3분동안 평형을 실시했을 경우에는 생존율에 치명적인 영향을 미치는 것으로 사료된다. Tachikawa 등(1993)이 체외수정란의 배반포기 배를 2분간 평형시켜 90%의 생존율을 보고한 것과 비슷한 결과를 보이고 있다. 이와 같이 EFS solution에서 ficoll은 거대분자로 안정적인 초차화 형성을 촉진하며(Fahy 등, 1984), 반면에 sucrose는 삼투압의 현상으로 수정란의 탈수를 촉진하므로써 침투성 동결보호제의 독성을 줄여주는 경향이 있다고 보고한 바 있다(Kasai 등, 1990). 그리하여 고농도의 EFS solution에 짧은 노출에 의하여 세포내 동결보호제의 독성을 줄여 줌으로써 소 체외수정유래 배반포기 배의 동결이 성공될 수 있다고 하였다.

이와 같이 1, 2분 동안의 평형시간은 동결 용해 후 생존성에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되나, 3분간의 평형시간은 동결 용해란에 치명적인 영향을 미치는 것으로 판단된다.

그러므로 소 체외수정유래 배반포기 배의 동결시 평형시간을 1~2 분 이내로 조정하여야 할 것으로

Table 2. Effect of equilibration times for cryopreservation on post-thaw survival of IVM-IVF blastocyst embryos

Equilibration time(min.)	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. & (%) of post-thaw embryos developed to		
			Expanded blastocyst	False blastocyst	Degenerated
1	46	46	38(82.6) ^a	2(4.4)	6(13.0)
2	54	46	34(73.9) ^a	2(4.4)	10(21.7)
3	44	44	8(18.2) ^b	4(9.1)	32(72.7)

*Values with different superscripts were significantly different (P<0.05).

사료된다.

3. 배 발달단계에 따른 동결 용해 후 생존율

배반포기 배를 1분간 평형을 실시한 후 동결을 실시한 결과 가장 양호한 결과를 얻었으므로 평형시간을 1분으로 고정하고서 배 발달단계에 따른 동결 용해 후 생존율을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 배반포기 배에서는 81.3%의 양호한 생존율을 보였으나 상실기 배에서는 5.1%의 생존율로서 거의 생존하지 못하였다. 이와 같이 배 발달단계에 따른 동결 용해 후 생존율의 차이에서 알 수 있는 것은 일반적으로는 포유류의 상실배가 동결시 가장 적당한 배 발달단계로 알려져 있으나, 한우 체외수정란의 경우에는 상실배에서 거의 생존율을 얻지 못하였기에 종 특이적인 경향을 나타내고 있는 것으로 사료된다.

Pollard와 Leibo(1993)는 1.5 M ethylene glycol을 동결보호제로 이용한 완만동결법으로 체외 상실배를 동결한 결과 0%(0/80)의 생존율을 얻은 반면 체내 상실배는 64%(18/28)와 체외 배반포기 배는 63.5%(51/80)의 생존율을 보고하였으며, 저온(30~0℃)에 대한 저온민감도(chilling sensitives)의 조사결과 체내 상실배는 거의 100%가 생존한 반면 체외 상실배는 15℃ 이하에서는 거의 모든 배가 퇴화되었다고 보고하였다. 또한 비중 차이를 조사

한 결과 체내 상실배는 2.35 M sucrose solution에서 가라앉아 부력(buoyant density)이 >1.30 이상인데 반하여 체외 상실배는 1.6 M sucrose solution에서도 부유하여 부력이 <1.14 이하이라고 하였는데 이와 같은 부력의 차이는 세포내의 protein과 lipid의 비율에서 차이가 있다고 Leibo와 Loskutoff (1993)와 Pollard와 Leibo(1993)가 보고한바 있다. 지금까지 일반적으로 생쥐(이 등, 1992), 토끼(Kasai 등, 1992) 등과 같은 포유류 수정란의 동결보존시 가장 적합한 배 발달단계는 상실배인 것으로 알려져 있었으나 소의 체외수정란의 경우에는 상실기 배에는 거의 생존율을 얻지 못한 반면 배반포기 배에서 높은 생존율을 얻어 종간에 특이성을 보이고 있으며 또한 체외수정란이었기 때문에 체내수정란과의 부력 등과 같은 차이점으로 인하여 더욱 더 동결 용해시 생존율의 차이를 보이고 있는 것으로 사료된다.

4. 동결란의 할구수 조사

동결·용해과정에서 할구의 손상여부를 판단하기 위하여 Hoechst 33342로 염색하여 fluorescence microscope의 200~400 배율 하에서 할구수를 조사한 결과는 Table 4와 같다. 대조구로서 배반포기 배까지 발육한 체외수정란을 동결은 실시하지 않고 염색하였으며, 동결처리구는 배반포기 배를 1분간

Table 3. Effect of cell stage on post-thaw survival of IVM-IVF bovine embryos cryopreserved by vitrification following equilibration for 1 min.

Cell stage	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. & (%) of post-thaw embryos developed to		
			Expanded blastocyst	False blastocyst	Degenerated
Morula	42	39	2(5.1) ^b	3(7.7)	34(87.2)
Blastocyst	50	48	39(81.3) ^a	2(4.2)	7(14.6)

* Values with different superscripts were significantly different (P<0.05).

Table 4. Effect of cryopreservation on the number of blastomeres in IVM-IVF bovine blastocysts

Type of embryos	No. of embryos used	No. of blastomeres (Mean ± S.E.)
Fresh IVF embryos	28	76.6 ± 7.1 ^a
Frozen IVF embryos	24	63.7 ± 3.5 ^b

* Values with different superscripts were significantly different (P<0.05).

EFS solution에 평형시킨 후 동결 용해후 24 시간 동안 배양 후 확장배반포기 배까지 발달한 것만을 골라 핵염색을 실시하였다. 그 결과 동결 용해란의 할구수가 63.7 ± 3.5 개, 신선란이 76.6 ± 7.1 개로서 동결 용해란이 유의적으로 할구수의 감소를 나타내었다. Lehn-Jensen(1986), Tekeli 등(1987) 및 이 등(1992)은 수정란의 동결보존시 동결 용해 후 할구수의 감소는 동결 용해 과정에서 동결보호제의 독성, 삼투압의 영향 및 결빙형성 등으로 할구의 손상과 체외배양 조건의 부적합 등과 같은 요인에 의한 것으로 보고하였다. 이러한 결과에서 동결 용해 과정에서 할구의 손상 등을 간접적으로 판단할 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

한우 난포란을 이용한 체외성숙, 수정 및 배발달을 유도하여 상실배와 배반포기배까지 발달한 배를 vitrification 방법에 의한 한우 체외수정란의 동결 보존법을 개발하기 위하여 EFS solution으로 동결 보호제의 독성검사, 평형시간 및 배발달 단계가 동결·용해 후 생존성에 미치는 영향 등을 실험한 결과는 다음과 같다.

1. 체외수정란의 동결보존을 위하여 동결보존액에 적절한 평형시간과 독성여부를 판단하기 위하여 배반포기 배를 EFS solution에 2, 5 및 10 분간 평형시킨 후 0.5 M sucrose solution에 희석시킨 결과 95.0, 69.6 및 47.4%의 생존율을 보여 평형시간이 길어질수록 유의적($P < 0.05$)으로 생존율이 감소하는 경향을 보였다.
2. 독성검사 결과 2 분동간의 평형시간이 가장 높은 생존율을 보여 평형시간을 1, 2 및 3분간으로 하여 동결 용해한 결과 82.6, 73.9 및 18.2%의 생존율을 얻었다. 이와 같이 1, 2 분간의 평형시간으로는 유의차 없이 높은 생존율을 보인 반면 3 분동간의 평형시간으로는 급격한 생존율의 감소를 초래하여 vitrification 방법으로 동결시 1, 2 분동간의 평형시간이 적당한 것으로 사료된다.
3. 체외수정란의 배 발달단계가 vitrification 동결시 어떠한 영향을 미치는가를 조사하기 위하

여 상실배와 배반포기배를 1 분간의 평형시간으로 동결을 실시한 결과 5.1%와 81.3%의 생존율을 보여 체외수정란의 동결시 적당한 배발달단계는 배반포기 배인 것으로 사료된다.

4. 동결 용해과정에서 할구의 손상 여부를 판단하기 위하여 Hoechst 33342로 염색하여 할구수를 조사한 결과 동결란과 신선란에서 각각 76.6 ± 7.1 개와 63.7 ± 3.5 개로 조사되어 동결란에서 유의적($P < 0.05$)인 할구의 감소를 보였다.

이상의 실험결과에서 이식 가능한 상실배와 배반포기 배의 동결보존은 EFS solution을 이용한 vitrification 방법으로 배반포기 배를 1 분간의 평형으로 동결을 실시하여 높은생존율을 얻을 수 있으므로 체계적인 체외수정란의 생산과 수정란이식을 위한 안정적인 공급 및 저장이 가능할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA and Merryman HT. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21:407-426.
- Ishimori H, Saeki K, Inai M, Nagao Y, Itasaka J, Miki Y, Seike N and Kainuma H. 1993. Vitrification of bovine embryos in a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. *Theriogenology* 40:427-433.
- Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakura T and Machida T. 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J. Reprod. Fert.* 89:91-97.
- Kasai M, Hamaguchi Y, Zhu SE, Miyake T, Sakura T and Machida T. 1992. High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Biol. Reprod.* 46:1042-1046.
- Kobayashi K, Nagashima H, Yamakaya 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.
- Kong IK, Lee EB, Kang DJ and Park CS. 1991. Effects of equilibration time, precooling and straw loading method on survival of mouse embryos frozen by vitrification. *Korean J. Reprod.* 15:49-57.
- 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. Fert.* 96: 187-193.
- 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. 17-19
- Leibo SP and Loskutoff NM. 1993. Cryobiology of *in vitro* derived bovine embryos. *Theriogenology* 39:81-94.
- Massip A, Van Der Zwalm PP, Scheffen B and Ectors F. 1986. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-Letters* 7:270-273.
- Pollard JW and Leibo SP. 1993. Comparative cryobiology of *in vitro*- and *in vivo*-derived bovine embryos. *Theriogenology* 39:287(abstract).
- Pursel VG, Wall RJ, Roxroad CE, RE Jr, Hammer and Brinster RL. 1985. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenology* 24:687-691.
- Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 313:573-575.
- Rall WF. 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 24:387-402.
- Scheffen B, Van Der Zwalm P and Massip A. 1986. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. *Cryo-Letters* 7:260-269.
- Smorag Z, Gajda B, Wieczorek B and Jura J. 1989. Stage-development viability of vitrified rabbit embryos. *Theriogenology* 31: 1227-1231.
- Tachikawa S, Otoi T, Kondo S, Machida T and Kasai T. 1993. Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by *in vitro* maturation and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 34:266-271.
- Tekeli T, Kweon OK and Kanagawa H. 1987. The viability of deep-frozen aggregated mouse embryos. *Jpn. J. Vet. Res.* 35:283-286.
- Valdez CA, Abas Mazni O, Takahashi Y, Hishinuma M and H Kanagawa. 1990. Effects of equilibration time, precooling and developmental stage on the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology* 33:627-636.
- Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, McKenna AI, Fick GH and Schultz GA. 1991. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 30:330-338.
- 이은봉, 공일근, 강대진, 윤창현, 박충생. 1992. 완만동결법에 의한 생쥐의 정상배 및 분할배의 생존성에 관한 연구. *한국축산학회지* 34:76-81.