

동결액 조성이 소 난자의 체외성숙, 발육능 및 생존성에 미치는 영향

류일선 · 양병철 · 연성흠 · 이동원 · 서국현 · 손동수 · 이병천* · 황우석*

농촌진흥청 축산기술연구소

Effect of Different Cryoprotectants on the Viability, Maturation and Development of *In Vitro* Bovine Oocytes

I. S. Ryu, B. C. Yang, S. H. Yeon, D. W. Lee, G. H. Suh, D. S. Son,

B. C. Lee* and W. S. Hwang*

National Livestock Research Institute, Rural Development Administration

SUMMARY

This study was conducted to investigate the effects of *in vitro* fertilization, culture and embryo development according to *in vitro* maturation rate, protectant composition and equilibrium time after frozen /thawing of bovine immature oocytes.

This results obtained in studies on the effect of different cryoprotectants on the viability, maturation and development of *in vitro* bovine oocytes were as follow:

1. The post-thawing of immature oocytes matured to metaphase II during culture time for 0 to 26 h, and those group (62.3%) were low than control group (76.7%). The optimal maturation time of frozen-thawed immature oocytes was at 24 h.
2. The viability of cryopreserved immature oocytes was not affected by sort of cryoprotectants. The developmental competence of frozen-thawed oocytes was not affected by cryoprotectants.

These results indicate that an optimal maturation time of frozen/thawed immature oocytes was at 24h. Furthermore the viability of cryopreserved immature oocytes was not affected by sort of cryoprotectants and developmental competence of frozen/thawed oocytes.

(Key words : oocytes, maturation rate, cryoprotectants, survival rate)

서 론

소 난자의 동결보존에 관한 연구는 미성숙난자의 생존성이 보고된(Heyman 등, 1986; Vincent 등, 1985) 이래, 동결보호제별 효과조사(Sathananthan 등, 1987), 체외성숙 후 수정율(Lim 등, 1991; Schellander 등, 1988), propylene glycol에의 동결

(Xu 등, 1992), 동결란의 체외수정율과 형태(Parks 등, 1992), 미성숙난자의 동결 후 체외수정란의 작성 및 이의 이식에 의한 쌍태분만(Fuku 등, 1992), 성숙난자의 동결융해 후 체외수정, 배양과정을 거친 수정란이식에 의한 임신(Otoi 등, 1995; 1992)과 GV단계난자의 동결융해 후 생산된 수정란 이식에 의한 산자 생산(Suzuki 등, 1996)의 많은 연구가 이루어지고 있다.

*서울대학교 수의과대학(College of Veterinary Medicine, Seoul National University)

미성숙난자의 동결은 일부 성공예에도 불구하고 후기수정란보다 동결보존성적이 저조한 바, 이는 동결융해 후 낮은 수정율과 세포질의 손상에 기인된다는 주장들이 있다(Parks 등, 1992; Vincent 등, 1992; Van Blerkom 등, 1991).

동결보호제중 glycerol, dimethylsulfoxide, ethylene glycol(EG), 1,2 propanediol(propylene glycol; PROH)등은 저분자량 및 수분과의 친화성이 높아 세포내로 투과하여 동결시 세포내의 빙정형성을 감소시켜 주는 반면, sucrose나 polyvinylpyrrolidone(PVP)은 비투과성 세포외부의 보호제로서 sucrose는 세포의 용적을 감소시켜 주고, PVP 또는 dextran은 세포막의 외부를 coating하여 세포를 보호하는 것으로 알려져 있다(中原 등, 1989). 난자의 동결보존시 주로 이용된 동결보호제는 미성숙난자의 경우 1.0 M glycerol(Lim 등, 1992), PROH와 glycerol(Suzuki 등, 1992), PROH(Otoi 등, 1995)이었으며, 성숙난자에서는 1.0M 또는 1.5M glycerol + sucrose, 0.25M 또는 0.5M PROH(Lim 등, 1991), 1.6 MPROH, 1.5M PROH + sucrose(Martino 등, 1996; 菅井 등, 1992; Otoi 등, 1992; Fuku 등, 1992)등이 있다.

동결법의 개선은 동결보호제의 독성과 동결시 민감성의 요인이 되는 손상 정도를 최소화하는 조처 및 동결손상의 기전을 구명하고 적절한 동결 protocol을 설정하는 통합연구의 수행이 요구된다 하겠다. 그러나 최근 소에서 체외성숙, 수정, 배양술의 급속한 진전(Goto 등, 1988; Sirard 등, 1988)은 저온에서 난자보존의 새로운 동기를 유발하였으며, 난자의 동결효과를 개선하기 위해 동결과정과 동결보호제의 독성으로 인한 손상을 최소화시킬 연구의 필요성이 제기되고 있다. 체외성숙난자가 미성숙난자보다 동결저항성이 강하며(Fuku 등, 1992; Lim 등, 1991), 포유동물의 초기 수정란은 동결융해 후 생존성 유지를 위해 세포막 투과성 동결보호제의 필요성이 제기되었다(Maurer, 1978).

난자의 동결 후 성숙과 발육능은 미성숙난자내 미세소기관의 배열이 동결충격에 민감한 미세기관 구조로 되어있는 것과 연관성이 있다는 보고가 있고(Lim 등, 1992; Sundstorm 등, 1988; Hyttel 등, 1986), 난자의 동결성은 난세포질에서 일어나는 단

백질합성(Lim 등, 1992), 난자성숙 중 난세포질에서의 단백질합성활동의 역할(Hunter 등, 1987; Fulka 등, 1986; Moor 등, 1986) 및 동결과정 자체가 난세포질에 손상을 가하며 이로 인해 단백질합성활동에 영향을 준다(Lim 등, 1992)는 주장도 있다. 또한 난구세포는 동결 후 생존성에 중요한 역할을 하기 때문에 난구세포도 동결성에 영향을 미친다고 하였다(Lim 등, 1992; Schroeder 등, 1990; Pellicer 등, 1988).

소 미성숙난자의 동결보존이 성공적으로 이루어지면 체외성숙, 수정의 적기 선택폭이 확대되며 유전개량의 진보를 위한 소 난자의 동결은행(Frozen bank)의 효율성이 증진되고 기초연구를 위한 난자의 이용 가능성을 제고할 수 있게 되어 번식기술의 이용성을 광범위하게 증대시킬 수 있게 될 것이다.

성숙난자에 비해 미성숙난자의 동결보존연구가 미흡하였으나, 최근에는 우량유전형질을 지닌 고능력우에서 초음파를 이용한 경질법으로 미성숙 난자의 반복채취가 가능하게 됨에 따라(Bols 등, 1995) 미성숙난자의 동결보존에 대한 연구의 필요성이 확대되고, 동결된 미성숙난자를 이용한, 체외성숙, 수정 및 배양실험이 활발하게 이뤄지고 있는 실정이다.

이에 본 연구는 소의 미성숙난자 및 성숙난자의 효과적 동결보존을 위한 동결액의 조성, 동결보호제에서의 평형 및 노출시간에 따른 생존율, 동결융해 후 성숙율, 체외수정 후 발육율에 미치는 영향을 조사하여 최적조건을 설정함으로써 난자의 이용 가치를 제고하기 위한 방안을 모색하기 위해 실시하였다.

재료 및 방법

1. 미성숙난자의 회수

도살된 한우 암소로부터 난소를 채취하여 100IU/ml의 penicillin과 100 μ g/ml의 streptomycin을 첨가한 25~30 $^{\circ}$ C의 생리식염수에 보존하여 2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 난소는 38 $^{\circ}$ C의 생리식염수로 2~3회 세정한 후 표면의 수분과 혈액을 paper towel로 제거한 다음, 3~7mm직경의 소난포가 있는 난소의 표면을 면도칼을 이용하여 1 mm 간

적으로 조밀하게 세절(mincing)하였다. 세절된 난소를 10%(v/v) fetal bovine serum(Gibco BRL, U.S.A.; FBS)를 첨가한 38℃의 tissue culture medium 199(Sigma Chemical Co., U.S.A.; TCM 199액)이 들어 있는 500ml들이 beaker에 2~3회 세정한 후 상층부분을 제거하고, 90×20mm tissue culture dish(Corning Glass Works, U.S.A.)에 분주하여 10~20분간 정치하였다. 미성숙 난자는 Wiemer 등(1992)의 기준에 따라 난자 주위의 난구 세포층이 치밀하게 부착되어 있고 세포질이 균질한 정상적인 난자만을 실체 현미경하에서 선별회수하여 실험에 공시하였다.

2. 난자의 동결 및 융해

1) 동결 보존액의 제조

동결보존액의 제조는 10% FBS첨가 TCM 199액에 1.8M ethylene glycol(EG; Sigma Chemical Co., U.S.A.), 고분자물질인 5%(w/v) polyvinylpyrrolidone(PVP), 저분자물질인 0.05M trehalose(Sigma Chemical Co., U.S.A.)를 혼합하여 제조하였다(EPT). 고분자 물질인 ficoll(Sigma Chemical Co., U.S.A.)과 저분자물질인 sucrose(Sigma Chemical Co., U.S.A.) 및 trehalose의 첨가효과를 검토하기 위하여 1.8 M EG에 각각 다른 농도로 희석하였으며, 동결보호제는 Table 1과 같이 조성하였다.

각각의 동결보존액은 0.25 μ m membrane filter에 여과시킨 후 -35℃에 사용시까지 보존하였다.

2) 동 결

동결보존액은 1ml 플라스틱주사기가 부착된 0.25ml straw에 동결보존액, 공기층, 동결보존액, 공기층, 동결보존액과 미성숙난자, 공기층, 동결보존액, 공기층 및 동결보존액 순으로 주입하여 straw

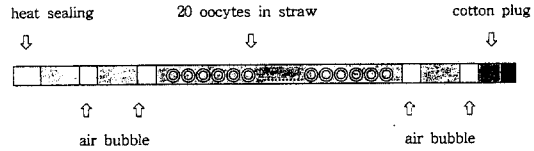


Fig. 1. Oocytes loading method into 0.25ml straw before freezing.

끝을 열봉하였다(Fig. 1).

Straw당 난자를 20개씩 주입하여 실온에서 15분간 평형시킨 후 0℃에 냉각된 수정란 동결기(Freezer Control CL-863, Cryologic, Australia)에 넣고 2분간 정치시킨 다음, 1℃/min 속도로 -7℃까지 냉각시키고 2분간 정치하고 나서 식빙하였다. 식빙 8분 후 -30℃까지 0.3℃/min 속도로 냉각시키고 -196℃ LN₂에 침지, 동결보존하였다.

3) 융 해

난자가 동결보존된 스트로를 실온에서 10초간 융해 후 35℃의 온수중에 10초간 침지 융해하였다. 융해 후 난자내의 동결보호제를 제거하기 위해 10% FBS첨가 TCM 199에 15분간 평형한 후 3회 세정하고 나서 실험에 공여하였다. 또한 동결·융해된 난자의 생존율은 FDA(Fluorescein diacetate, Sigma Chemical, Co., U.S.A.) test와 체외배양으로 판정하였다.

4) 생존율 판정

생존율 판정을 위한 FDA용액은 Linda 등(1980)의 방법에 준해 5mg FDA/ml acetone의 stock solution을 제조하여 사용전에 1:400,000의 비율로 TCM199액에 희석하였다. 융해난자를 실온(27±1℃)에서 15분간 FDA에 노출시키면서 위상차 형광현미경의 UV light하에서 생사 여부를 판정하였다. FDA-test에서는 난자 전체가 녹색형광을 발하는 것을 기준으로 생사 여부를 판단하였다.

Table 1. The composition of cryoprotectants

An abbreviation word	Composition of cryoprotectants
EPS	1.8M EG + 5% PVP + 0.05M sucrose
EFT	1.8M EG + 5% ficoll + 0.05M trehalose
EFS	1.8M EG + 5% ficoll + 0.05M sucrose

3. 체외성숙

체외성숙은 10% FBS첨가 TCM 199액에 5 μ g/ml FSH(Sigma Chemical Co., U.S.A.), 10 IU hCG(Chorulone, Intervet, Holland), 1 μ l/ml estradiol-17 β (Sigma Chemical Co., U.S.A.)를 첨가하여 0.5ml 씩 분주한 4-well dish(Nunc, Denmark)에서 실시하였다. 육안적 소견상 정상으로 인정되는 직경 5~10mm의 난포로부터 회수한 과립막 세포를 채취하여 10% FBS첨가 TCM 199액으로 3회 원심분리(700 \times g, 5분)하여 세정한 후 1 \times 10⁶ cells/ml농도가 되도록 각각의 well에 첨가하여 전배양하였다. 선별된 난자는 각각의 well내에 20개씩 첨가하여 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 24시간동안 성숙배양하였다. 난자의 성숙배양시간과 동결 여부에 따른 Metaphase II (M II)에 도달되는 성숙율을 조사하기 위해 slide glass중앙에 0.5% hyaluronidase(Sigma Chemical Co., U.S.A.)가 첨가된 10% FBS 첨가 TCM199액에 3분간 침지시킨 후 2분간 vortexing 또는 pipetting하여 난구세포를 제거하였다. 준비된 난자 10~20개를 slide glass에 소량의 배양액과 준비하고 cover glass로 가볍게 눌러 고정시킨 다음, acetic acid : methyl alcohol = 1 : 3혼합액에 24시간 이상 탈지고정하고 1% acetorcein액으로 5분간 염색 후 aceto-glycerol액(acetic acid : glycerol : distilled water = 1 : 1 : 3)혼합액을 주입하여 반대측에서 여과지로 염색액을 흡인제거하였다. 이때 배양액의 증발을 방지하기 위해 cover glass주위를 manicure로 봉하였고, 염색된 표본은 미분간섭현미경하에서 검경관찰하여 난자의 염색체 및 핵분열상의 변화를 Sirard 등(1989)의 방법에 준해 구분하였다.

4. 체외수정

정액은 0.5ml straw당 5 \times 10⁷개의 정자가 포함된 한우 동결정액(축협중앙회 개량사업본부 한우개량부 제조)을 이용하였으며 기본배양액은 10mM caffeine이 첨가된 Brackett and Oliphant(BO)의 등장액을 사용하였다. 동결정액은 38 $^{\circ}$ C 수조에 30초간 침지하여 융해시켰다. BO액으로 2회 원심분리(700 \times g, 5분)하여 상층액을 제거하였다. 새로운 BO액

을 2~3ml을 보충해 주는 방법으로 2회 세정하여 생존성있는 활력정자를 선별하는 한편, 동결보호제 및 회석액을 제거하였다.

이후 정자의 수정능획득 및 침체반응을 유도하기 위하여 5mM caffeine, 0.5% BSA가 첨가된 BO액에 원심분리(80 \times g, 1분)하고 최종 정자농도가 1 \times 10⁶cell/ml가 되도록 하여 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에 15분간 정치하였다.

미성숙난자를 22시간 체외성숙배양하여 준비된 정자소적에 넣고 CO₂ incubator에서 22시간동안 배양하여 체외수정을 유도하였다.

5. 체외배양

난소에 초기황체가 존재하는 난관을 채취하여 여분의 결제조직을 제거한 후 관류법에 의해 난관상피세포를 채취하여 10% FBS첨가 TCM 199액으로 2회 원심분리(200 \times g, 5분)하였다. 난관상피세포는 10% FBS첨가 TCM 199액을 0.5ml씩 분주한 4-well culture plate(Falcon, Becton Dickinson Co., U.S.A.)에서 72시간동안 배양하여 난관상피세포 monolayer를 작성하였다. 체외수정된 난자를 3~4회 세정하여 난구세포와 정자를 제거한 후 난관상피가 배양되고 있는 10% FBS첨가 TCM 199액에 옮겨 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 체외배양중 48시간 간격으로 50%의 신선한 배양액으로 교환하였고 10일까지 후기배로의 발육율을 조사하였다.

6. 통계학적 분석

모든 실험결과는 Chi-square test를 실시하여 실험군간 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 동결, 융해 후 배양시간에 따른 체외성숙율

미성숙난자를 5% FBS첨가 TCM 199액을 기초로 하여 1.8 M ethylene glycol, 5%(w/v) polyvinylpyrrolidone, 0.05 M trehalose에 용해한 후 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 10% FBS첨가 TCM 199액을 이용하여 0, 18, 20, 22, 24 및 26시간 동안 체외성숙배양시킨 다음, 난포란내의 염색질 및 핵

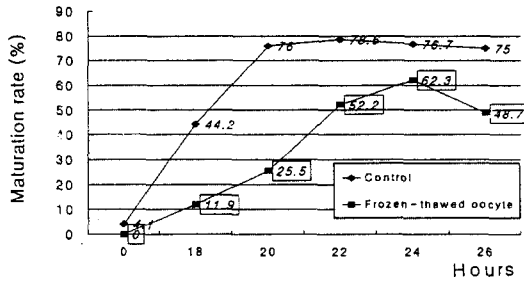


Fig. 2. The developmental capacity of frozen-thawed immature oocytes (Metaphase II).

분열상의 변화에 따른 수정적기인 M II에 도달되는 성숙율을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다.

미성숙난자를 동결융해한 후 체외성숙배양시간 별로 M II에 도달율을 보면, 18, 20, 22, 24 및 26시간에 각각 11.9, 25.5, 51.1, 62.3 및 48.7%로, 24시간에서 성숙율이 가장 높게 나타났다. 동결융해한 미성숙난자의 성숙율은 대조군에 비해 M II에 도달되는 시간이 약 2시간 가량 연장되는 것을 알 수 있

었다.

2. 소 난포란의 동결보호제 조성에 따른 융해 후 생존성 및 체외발육능(FDA-test)

난자의 동결융해 후 생존성을 판정하기 위하여 미성숙난자의 생존성을 초기에 판정할 수 있는 FDA-test(3',6'-diacetyl-fluorescence)를 실시한 결과는 Table 2와 같다. 동결융해한 후 미성숙난자의 생존율은 동결보호제의 종류와 첨가수준에 따라서 각 처리군간에 44.1~53.1%를 나타냈고, 유의성은 인정되지 않았다.

미성숙 난자를 10% FBS첨가 TCM 199액에 동결보호제의 조성에 따른 체외성숙, 수정 및 배양을 실시한 결과는 Table 3과 같다. 2세포기 이상의 배발육율, 배반포기발육율 및 변성율은 19.2~22.6, 1.2~4.5 및 67.4~80.8%로 나타났으며, 미성숙난포란의 동결보존시 체외발육율은 동결보호제에 따른 유의차가 인정되지 않았다.

Table 2. Effects of cryoprotectants on frozen/ thawed bovine oocytes with FDA-test

Cryoprotectants	No. of oocytes assessed	No(%) oocytes invested	
		Survived	Degenerated
1.8M ethylene glycol(EG)	143	63(44.1)	80(55.9)
1.8M EG + 0.05M trehalose	73	36(49.3)	37(50.7)
1.8M EG + 0.05M sucrose	70	32(45.7)	38(54.3)
1.8M EG + 0.1M trehalose	255	131(51.4)	124(48.6)
1.8M EG + 0.1M sucrose	164	87(53.1)	77(46.9)

Table 3. Effects of cryoprotectants on the development capacity of bovine primary oocytes fertilized *in vitro*

Cryopro- tectants	No. of oocytes	No(%) of embryos developed						
		2-cell	4-cell	8-cell	16-cell	Morula	Blastocyst	Degenerated
EPT*	511	27 (5.3)	36 (7.1)	26 (5.1)	19 (3.7)	13 (2.5)	23 (4.5)	367 (71.8)
EFS**	261	17 (6.5)	11 (4.2)	6 (2.3)	9 (3.5)	4 (1.5)	3 (1.2)	211 (80.8)
EFT***	175	20 (11.4)	15 (8.6)	8 (4.6)	5 (2.9)	4 (2.3)	5 (2.9)	118 (67.4)

* EPT : 1.8M ethylene glycol + 5% PVP + 0.05M trehalose

** EFS : 1.8M ethylene glycol + 5% ficoll + 0.05M sucrose

*** EFT : 1.8M ethylene glycol + 5% ficoll + 0.05M trehalose

Table 4. Effects of cryoprotectants on development capacity of bovine secondary oocytes fertilized *in vitro*

Cryoprotectants	Total	No(%). of embryos developed						
		2-cell	4-cell	8-cell	16-cell	Morula	Blastocyst	Degenerated
EPT*	117	6 (5.1)	6 (5.1)	6 (5.1)	2 (1.7)	3 (2.6)	1 (0.8)	93 (79.5)
EFS**	174	17 (9.8)	14 (8.0)	5 (2.9)	6 (3.4)	7 (4.0)	—	125 (71.9)
EFT***	120	2 (1.7)	3 (2.5)	5 (4.1)	2 (1.7)	—	—	108 (90.0)

* EPT : 1.8M ethylene glycol + 5% PVP + 0.05M trehalose

** EFS : 1.8M ethylene glycol + 5% ficoll + 0.05M sucrose

*** EFT : 1.8M ethylene glycol + 5% ficoll + 0.05M trehalose

3. 동결보호제 조성이 소 성숙난자의 체외발육능에 미치는 영향

회수된 미성숙난자를 39°C, 5% CO₂ 배양기내에서 10% FBS첨가 TCM 199액으로 성숙배양한 후 5% FBS첨가 TCM 199액에 1.8M ethylene glycol + 5% PVP + 0.05M trehalose, 1.8M ethylene glycol + 5% ficoll + 0.05M sucrose와 1.8M ethylene glycol + 5% ficoll + 0.05M trehalose로 동결보호제를 각각 다르게 첨가하여 동결융해한 후 수정 및 배양과정을 거쳐 배발육율을 조사한 결과는 Table 4와 같다. 성숙난자의 동결군에서의 2세포기이상 배발육율, 배반포기발육율 및 변성율은 각각 10.0~18.1, 0~0.8 및 71.9~90.0%로 나타났다. 성숙난자의 동결 후 배발육율에 미치는 동결보호제의 종류에 따른 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

고 찰

1. 소 미성숙난자의 동결, 융해 후 체외성숙율에 미치는 영향

일반적으로 포유동물의 난모세포를 성숙배양하면 감수분열이 재개되어 핵성숙과 세포질의 기능적인 성숙을 동반하여 제 1극체가 방출되는 제 2감수분열중기(M II)에 도달하게 된다(中原 등, 1989). 미성숙난자의 동결융해 후 발육능이 저조한 이유에 대해 Sathananthan 등(1987)은 성숙과정의 활성화된 염색질이 동결과정 중에서 심한 독성을 입기 때

문이라고 하였으며, Hyttel 등(1986)과 Sundstorm 및 Nilsson (1988)은 미성숙 난자의 동결융해 후 성숙과 발육능은 미성숙난자 중의 microorganelles배열이 동결충격에 민감하며, 이는 미세기관의 구조와 밀접한 관련이 있다고 하였으며, Hunter 등(1987), Moor 등(1986)과 Fulka 등(1986)은 난자의 동결성은 난세포질의 성숙 중에 이루어지는 단백질의 합성과 관련된다고 하였다. 저조한 체외성숙율은 난구세포와 난자간의 대사결합에 기인된다는설(De Loos 등, 1991)과, 대사산물인 choline, uridine과 inositol의 수가 난구세포를 지나 난자내로 들어가거나 연결군(junctional complexes)을 지나 직접 세포간이송에 관여하거나(Chian 등, 1994), 또는 미성숙난자가 성숙난자에 비해 동결보호제의 독성작용에 민감하기 때문이라고 하였다(Taha 등, 1992; Parks 등, 1992). 또한 난구세포가 제거된(denuded) 미성숙난자의 성숙율이 낮은 것은 난구세포의 제거에 의한 gap junction의 손상에 기인되며(Lim 등, 1992), 동결 후 난자 주위에 남아있는 난구세포가 미성숙난자의 성숙에 좋은 영향을 가해 난구세포층이 치밀한 난자에서 성숙중에 잘 확장된다고 하였다(Lim 등, 1992). 도축장에서 회수한 미성숙난자를 동결융해한 후 39°C, 5% CO₂ 배양기내에서 10% FBS첨가 TCM 199액을 사용하여 체외성숙배양 0, 18, 20, 22, 24 및 26시간동안 과립막세포와 공배양하여 체외성숙시킨 다음, M II에 도달되는 성숙율을 보면 각각 11.9, 25.5, 51.1, 62.3 및 48.7%이었으며, 대조군에서는 각각 44.2, 76.0, 78.6, 76.7 및 75.0%로 나타나, 동결융해처리군의

성숙율이 24시간 배양에서 62.3%로 가장 높게 나타났다.

이러한 결과는 미성숙난자를 PBS + 15% FCS 용액에 동결보호제로 DMSO와 PROH를 이용하여 동결 후 39℃, 5% CO₂ 배양기내에서 15% FCS첨가 TCM 199액으로 24시간 성숙배양한, 오 등(1993)의 74.4%와 78.9%나 Suzuki 등(1996)의 77.8%보다는 다소 낮은 수준이었으나, 1.5 M PROH과 1.5M DMSO에 동결용해 후 난구세포가 치밀히 부착된 난자는 배양 18시간과 24시간에서 성숙율이 44%로서 비부착된 난자의 30%보다 유의적으로 높았다는 김 등(1995)의 성적보다는 다소 좋은 결과였다. 미성숙난자를 10%(v/v) DMSO, ethylene glycol, glycerol 또는 PROH에 5분간 노출 후 성숙배양시 M II 도달비율이 43~74%로 감소된다고 하였다(Depiesse 등, 1991). 미성숙난자의 동결용해 후 성숙율은 비동결군에 비해 저조하고 M II 도달시간이 연장되며 체외성숙시간이 경과할수록 다소 높아진다는 사실을 제시하고 있다 하겠다. 따라서 미성숙난자의 동결용해 후 성숙율을 향상시키는 것이 수정율 및 배발육율을 향상시키는 관건이므로 동결보호제의 선택이 보다 중요할 것으로 사료된다.

2. 소 난포란의 동결보호제의 조성에 따른 동결 후 생존성 및 체외 발육능 (FDA-test)

Gabor(1997)는 난자의 동결보존을 위해서는 높은 생존율과 수정율이 필수적이나 다음의 4가지 난제를 극복하지 않으면 안된다고 하였다.

첫째, 난자는 포유동물의 가장 큰 세포로서 용적·표면적의 비율이 높고 고농도의 동결보호제는 평형 중 세포에 대한 독성장애와 불충분한 동결보호를 초래하고, 삼투압효과는 회석과 평형 후 증가되어 난자의 막과 세포질의 장애를 유발하여 변형을 초래한다.

둘째, 냉각장애로서 난자의 저온 민감성은 서로 다른 두 요인에 관련되는 바, Aman 등(1994)과 Martino(1996)는 다수의 lipid droplets의 손상외에도 난자의 meiotic spindle은 4℃에 냉각시나 25℃에서도 냉각시에는 심한 손상을 입는다고 하였다. 지질의 변경과 달리, 단기간 저온에 노출 후 염색사

의 손상은 가역적이나 수정과정 중에 장애를 입을 수 있다(Gabor, 1997).

셋째, 투명대의 변화로서, Wood 등(1988), Johnson 등(1988, 1989), Carroll 등(1990)과 Fuku 등(1995)은 4℃에서 동결하거나, 4℃이상에서 동결보호제에 노출시 투명대의 변화는 냉각과정의 oocyte cortex내 cortical granules의 감수를 야기시키는 미성숙 cortical granule exocytosis와 투명대가 단백질해효소에 의한 용해에 저항하는 zona hardening에 의해 수정율의 감소를 초래한다고 하였다.

넷째, 난구세포의 제거 여부로서 Behalova 등(1993)과 Chian 등(1995)은 체내와는 달리 체외에서는 난구세포의 부착 정도가 수정능획득에 관여하거나 polyspermy를 방지하여 체외수정시 유리하게 작용한다고 하였다.

본 실험에서 회수된 미성숙난자의 동결시 미성숙난자의 생존율을 FDA-test한 결과, 동결보호제의 첨가수준에 따른 생존율이 44.1~53.1%로서 Whittingham 등(1972, 1977)의 mouse 미성숙난자에서 4~13% 및 65~76%를 보여 이들 성적과 유사하거나 다소 낮은 결과를 보였다. Human 성숙난자에서 난구세포가 부착된 상태로 동결 후 2시간배양에서의 생존율이 54.5%로서 비부착된 26.6%(Daniel 등, 1992)와 본 실험 성적은 유사한 결과를 나타냈다. 또한 rat와 mouse에서는 난구세포층이 풍부한 난자는 동결과정에서 높은 생존성을 보였다고 하였다(Schroeder 등, 1990; Pellicer 등, 1988).

수정전 미성숙·성숙 난자의 동결보존이 가능하게 되면 체외수정술을 응용하여 우량유전자의 이용영역이 확대되고 genetic bank로서 embryo bank에 유전자의 계통보존 및 가축의 개량기술이 조기에 향상될 것이다.

본 실험에서 사용된 동결보호제 중에서 1.8M EG + 0.1M sucrose를 이용하여 미성숙 난자를 동결한 처리군이 53.1%의 생존율을 보였으며, 다른 동결보호제도 비슷한 성적이 도출되어 동결보호제의 조성에 따른 생존율은 큰 차이가 없는 것으로 사료된다.

또한 Carroll 등(1990, 1989)은 mouse의 미성숙난자를 동결 후 polyploidy의 출현빈도가 16.2%로서 대조군의 3.7%보다 유의적으로 높았고 수정율은 대조군의 97.0%에 비해 48.8%로 감소되었다고

하였는데, 이는 비동결 난자보다 동결 난자에 정자 침투율의 감소(Martino 등, 1996), 수정율의 감소와 투명대 손상에 의한 polyploidy 및 aneuploidy 발생증가에 인한 염색체 이상(Kola 등, 1988; Glenister 등, 1987; Al Hasani 등, 1987; Petzelt, 1979)과 원형질막의 붕괴, 난세포원형질의 광범위한 조직붕괴와 동결중 spindle apparatus의 손상에 기인된다고 하였다(Mohr 등, 1981; Sathanathan 등, 1987; Glenister 등, 1987; Carroll 등, 1990).

소 미성숙난자의 수분 전도성은 성숙난자의 절반 정도이며(Ruffing 등, 1993), 난자는 동결보호제의 직접적인 독성작용보다도 삼투압 변화에 의해 손상을 받는다(Martino 등, 1996)고 하였다. 동결난자의 배발육을 감소는 난세포질의 광범위한 붕괴와 투명대 손상, 동결용해 과정 중의 난자와 난구세포 사이의 분리결과로 저수정율의 원인이 된다고 하였다(Yang 등, 1994; Carroll 등, 1990; Sathanathan 등, 1987).

본 실험에서 미성숙난자의 동결 후 2세포기 이상의 배발육율, 배반포기발육율 및 변성율은 각각 19.2~22.6, 1.2~4.5, 67.4~80.8%로 나타났는데 이는 Hamano 등(1992)과 Suzuki 등(1996)이 보고한 배발육율 27.3% 및 10.5~42.1%와는 유사한 성적이었으나, 배반포기발육율 10.2~18.8%에 비해서는 극히 저조하였고, Suzuki 등(1996)의 0~3.1%, Otoi 등(1995)의 3%에 비하면 다소 낮은 성적이다. 이와 같이 낮은 성적은 동결된 난자는 수정능이 저하되고 이로 인해 발육의 정지 또는 지연되는 것으로 추정되며 향후 추가연구에 의해 해결되어야 할 과제로 사료된다.

3. 동결보호제조성에 따른 소 성숙난자의 체외발육능에 미치는 영향

본 실험에서는 성숙배양된 난자를 동결 후 체외 배양하여 배발육율을 조사한 결과 2세포기 이상의 배발육율, 배반포기발육율 및 변성율은 각각 10.0~18.1, 0~0.8 및 71.9~90.0%로 나타나, 홉井 등(1991)과 Otoi 등(1992)은 2세포기 이상의 분할율이 각각 40.4, 20.6 및 18.3%, 배반포기발육율이 각각 3.1, 4.8 및 0.9%로, 또한 Lim 등(1991)은 배반포기의 발육율이 10.4% 등의 성적보다 낮은 성적이

었다.

본 연구결과 성숙난자의 동결시 사용하는 동결보호제조성에 대해서도 요인별 추가 검토가 필요할 것으로 사료된다.

적 요

소 미성숙난자의 동결 후 핵성숙율, 동결액 조성에 따른 FDA-test에 의한 생존율과 배발육율 등을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 미성숙난자의 동결 후 성숙배양시간별 MII도달율은 18, 20, 22, 24, 26시간에서 각각 11.9, 25.5, 51.1, 62.3, 48.7%로서 동결 미성숙난자의 최적성숙시간은 배양 후 24시간임을 알 수 있었다.
2. 동결보호제의 첨가수준 및 동결보호제 종류에 따른 생존율의 차이는 없었으며 동결보호제의 조성에 따른 유의차를 보이지 않았다.

이상의 결과 미성숙난자의 최적성숙배양은 24시간이었으나 동결보호제 조성에 따른 생존율 및 배발육율은 영향을 받지 않는 것으로 확인되었다.

참고문헌

- Al-Hasani S, Diedrich K, Ven der Ven H, Reiniekce A, Hartje M and Krebs D. 1987. Cryopreservation of human oocytes. Human Reprod., 2:696-700.
- Aman RR and Parks JE. 1994. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of *in vitro* matured bovine oocytes. Biol. Reprod., 50:103-110.
- Bols PEJ, Vandenheede A, Van Soom and De Kruif A. 1995. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: A new disposable needle guidance system. Theriogenology, 43:677-687.
- Behalova E and Greve T. 1993. Penetration rate of cumulus enclosed versus denuded eggs fertilized *in vitro*. Theriogenology, 39:186.
- Carroll J, Warnes GM and Matthews CD. 1989.

- Increase in digyny explains polyploidy after *in-vitro* fertilization of frozen-thawed mouse oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 85:489-494.
- Carroll J, Whittingham DG, Wood MJ, Telfer E and Gosden RG. 1990. Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *J. Reprod. Fert.*, 90:321-327.
- Chian RC, Niwa K and Sirard MA. 1994. Effects of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 41:1499-1508.
- Chian RC and Niwa K. 1995. Influence of cumulus cells on *in vitro* fertilization of bovine oocytes derived from *in vitro* maturation. *Anim. Reprod. Sci.*, 38:37-48.
- Daniel GI and Sigue AB. 1992. Survival of human oocytes cryopreserved with or without the cumulus in 1,2-propanediol. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 9:4.
- De Loos F, Kastrop P, Van Beneden TH and Kruip TAM. 1991. Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. *Mol. Reprod. Dev.*, 28:255-259.
- Depiesse V, Massip A and Dessy F. 1991. Study of the effect of different cryoprotectants on the maturation of immature bovine oocytes. *Cryobiology*, 28:570.
- Fuku E, Kojima T, Shioya Y, Marcus GJ and Downey BR. 1992. *In vitro* fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. *Cryobiology*, 29:485-492.
- Fuku E, Xia L and Downey BR. 1995. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, 32:139-156.
- Fulka JJr, Motlik J, Fulka L and Jilek F. 1986. Effect of cycloheximide on nuclear maturation of pig and mouse oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 77:281-285.
- Gabor V. 1997. Vitrification of bovine oocytes and embryos. *Embryo transfer newsletter*, 15(2)12-18.
- Glenister PH, Wood MJ, Kirby C and Whittingham DG. 1987. Incidence of chromosome anomalies in first-cleavage mouse embryos obtained from frozen-thawed oocytes fertilized *in vitro*. *Gamete Res.*, 16:205-216.
- Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanishi Y and Ogawa K. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* matured follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 83:753-758.
- Hamano S and Kuwayama M. 1992. Development of *in-vitro* matured oocytes after cryopreservation by vitrification and *in-vitro* fertilization. *Proc. 12th Int. Congr. Anim. Reprod.*, The Hague, The Netherlands, Aug., 1421-1423.
- Heyman Y, Smorag Z, Katska L, Vincent C, Garneir V and Cognie Y. 1986. Influence of carbohydrates, cooling and rapid freezing on viability of bovine non-matured oocytes or 1-cell fertilized eggs. *CryoLett.*, 7:170-183.
- Hunter AG and Moor RM 1987. Stage-dependent effects of inhibiting ribonucleic acids protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*. *J. Dairy Sci.*, 70:1646-1651.
- Hyttel P, Xu KP, Smith S and Greve T. 1986. Ultrastructure of *in vitro* oocytes maturation in cattle. *J. Reprod. Fert.*, 78:615-625.
- Johnson MH, Pickering SJ and George MA. 1988. The influence of cooling on the properties of the zona pellucida of the mouse oocytes. *Hum. Reprod.*, 3:383-387.
- Johnson MH. 1989. The effect on the fertilization of exposure of mouse oocytes to dimethylsulphoxide : an optimal protocol. *J. in*

- vitro* fert embryo transfer, 6:168-175.
- Kola I, Kirby C, Shaw J, Davey A and Trounson A. 1988. Vitrification of mouse oocytes results in aneuploid zygotes and malformed fetuses. *Teratology*, 38: 67-474.
- Lim JM, Fukui Y and Ono H. 1991. The post-thaw developmental capacity of frozen bovine oocytes following *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology*, 35:1225-1235.
- Lim JM, Fukui Y and Ono H. 1992. Developmental competence of bovine oocytes frozen at various maturation stages followed by *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology*, 37: 351-361.
- Linda RM and Trounson AO. 1980. The use of fluorescein diacetate to assess embryo viability in the mouse. *J. Reprod. Fert.*, 58:189-196.
- Martino A, Pollard JA and Leibo SP. 1996. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. *Mol. Reprod. Dev.*, 45:503-512.
- Maurer RR. 1978. Freezing mammalian embryos. A review of the techniques. *Theriogenology*, 9:45-68.
- Mohr LR and Trounson AO. 1981. Structural changes associated with freezing of bovine embryos. *Biol. Reprod.*, 25:1009-1025.
- Moor RM and Crosby IM. 1986. Protein requirements for germinal vesicle breakdown ovine oocytes. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 94:207-220.
- Otoi T, Tachigawa S, Kondo S and Suzuki T. 1992. Developmental capacity of bovine oocytes cryopreserved after maturation *in vitro* and of frozen-thawed bovine embryos derived from frozen mature oocytes. *Theriogenology*, 38:711-719.
- Otoi T, Yamamoto K, Koyama N and Suzuki T. 1995. *In vitro* fertilization and development of immature and mature bovine oocytes cryopreserved by ethylene glycol with sucrose. *Cryobiology*, 32:455-460.
- Parks JE and Ruffing NA. 1992. Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes. *Theriogenology*, 37:59-73.
- Pellicer A, Lightman A, Parmer TG, Behrman HR and De Cherney AH. 1988. Morphologic and functional studies of immature rat oocyte-cumulus complexes after cryopreservation. *Fertil. Steril.*, 50:805-810.
- Petzelt C. 1979. Biochemistry of the meiotic spindle. *Int. Rev. Cytol.*, 60:53-92.
- Ruffing NA, Steponkus PL, Pitt RE and Parks JE. 1993. Osmometric behavior, hydraulic conductivity, and incidence of intracellular ice formation in bovine oocytes at different development stages. *Cryobiology*, 30:562-580.
- Sathananthan AH, Trounson A and Freeman L. 1987. Morphology and fertilizability of frozen human oocytes. *Gamete Res.*, 16:343-354.
- Schellander K, Brackett BG, Fuhrer F and Schleger W. 1988. *In vitro* fertilization of frozen thawed cattle oocytes. 11th Int. Cong. Anim. Reprod., AI (Dubulin), 3:349.
- Schroeder AC, Champlin AK, Mobraaten LE and Eppig JJ. 1990. Developmental capacity of mouse oocytes cryopreserved before and after maturation *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 89:43-50.
- Sirard MA, Parish JJ, Ware CB, Leibfried-Rutledge ML and First NL. 1988. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol. Reprod.*, 39:546-552.
- Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML and First NL. 1989. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, 40:

- 1257-1263.
- Sundstrom P and Nilsson BO. 1988. Meiotic and cytoplasmic maturation of oocytes collected in stimulated cycle is asynchronous. Hum. Reprod., 3:613-619.
- Suzuki T and Nishikata Y. 1992. Fertilization and cleavage of frozen thawed bovine oocytes by one step dilution method *in vitro*. Theriogenology, 37:306.
- Suzuki T, Boediono A, Takaki M, Saha S and Sumantri C. 1996. Fertilization and development of frozen-thawed germinal vesicle bovine oocytes by a one-step dilution method *in vitro*. Cryobiology, 33:515-524.
- Taha TA and Schellander K. 1992. Developmental capacity of immature and *in vitro* matured bovine oocytes after exposure to vitrification solutions. Theriogenology, 37:307.
- Van Blerkom J. 1991. Microtubule mediation of cytoplasmic and nuclear maturation during the early stages of resumed meiosis in cultured mouse oocytes; Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 88: 5031-5035.
- Vincent C, Heyman Y, Garnier V, Smorag Z and Renard JP. 1985. *In vitro* survival of early stage rabbit and cow embryos directly frozen to intermediate temperature (-25 to -30°C) before plunging in liquid nitrogen. Theriogenology, 23:234.
- Vincent C and Johnson MH. 1992. Cooling cryoprotectants and the cytoskeleton of the mammalian oocytes. Oxford Reviews of Reproductive Biology, 14:72-100.
- Whittingham DG, Leibo SP and Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -296°C. Science, 178:411-414.
- Whittingham DG. 1977. Fertilization *in vitro* and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196°C. J. Reprod. Fert., 49:89-94.
- Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, McKenna AI, Fick GH and Schultz GA. 1992. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. Mol. Reprod., 18:139-148.
- Wood MJ, Lee SH, and Whittingham DG. 1988. Oocyte freezing inhibits subsequent sperm penetration of zona pellucida. J. Reprod. Fert. Abstr. Ser., 1:12.
- Xu KP and Betteridge KJ. 1992. Cryopreservation of bovine oocytes using propylene glycol: Preliminary results. Theriogenology, 37:324.
- Yang QZ, Sun QY, Liu GY, Qin PC and Feng HL. 1994. Developmental competence and ultrastructure damage of cryopreserved GV-stage bovine oocytes. Theriogenology, 41:342.
- 김태영, 남상규, 석호봉. 1995. 침투성 및 비침투성 동결보호제를 이용한 생쥐 수정란의 급속동결에 따른 생존성에 관한 연구. 한국수정란이식학회지, 10:193-202.
- 中原達夫 外 13人. 1989. 家畜人工授精講習會テキスト(家畜受精卵移植編), pp.217.
- 오강택, 이중환, 박기상, 최승철, 유형진, 이상호. 1993. 동결보존 소 난포란의 체외성숙 및 처녀 발생. 한국수정란이식학회지, 8:133-138.
- 菅井威重, 立川 進, 近藤正治. 1991. 牛未受精卵の凍結保存. 日本産業動物獸醫學會 平成3年度學會年次大會會報, 46-47.

(접수일 : 1998. 3. 12 / 채택일자 : 1998. 5. 1)