

## 생쥐 1-세포기배의 초급속 동결에 있어서 평형 온도와 노출시간의 영향

현대 산부인과 불임 연구실, \*동국대학교 응용생물학과

정덕수 · 김형국 · 박인국\*

### The Effect of Equilibration Temperature and Exposure Time on the Ultrarapid Freezing of 1-cell Mouse Zygote

Duk Soo Chung, Hyung Kuk Kim and In Kook Park\*

*Infertility Clinic, Hyun Dae Obstetrics and Gynecology, \*Department of Applied Biology, Dongguk University*

#### = Abstract =

The present study was to assess the effect of ultrarapid freezing on the development of 1-cell mouse zygote using cryoprotectants, DMSO (dimethyl sulfoxide) or PROH (1,2-propanediol). We investigated the effect of the type and concentration of cryoprotectant, and of the temperature and time of prefreezing equilibration on their capacity to develop to the blastocyst stage in vitro.

The concentration, the equilibration temperature, and the exposure time seemed to serve as an important factor in ultrarapid freezing of 1-cell mouse zygotes. In addition to the exposure time and the concentration of cryoprotectant appeared to play a key role in the development of the embryo. In general, the development of the embryo was more effective at 3°C than 23°C and 4.5 M than 3 M for 3 to 5 minutes. At 23°C the development of the embryo was stimulated by DMSO while at 3°C it was stimulated by PROH. Thus it has been suggested that there exists a correlation between the concentration of cryoprotectants and exposure time in the development of the embryo.

In conclusion, we found that for ultrarapid freezing of mouse 1-cell embryos in DMSO, or PROH-based solution, viability shown optimum depending on the cryoprotectant, the concentration of the cryoprotectant and on the temperature and the duration of equilibration.

**Key Words:** Ultrarapid freezing, Cryoprotectant, DMSO, PROH

#### 서 론

포유동물의 배를 동결하는데 세포보호를 위해 첨가되는 DMSO (dimethylsulfoxide), PROH (propanediol), glycerol 및 ethylene glycol과 같은 항동해제의 효과는 그 물질들의 용해성, 세포투과성 및 독성에 달려있다. 항동해제의 세포독성은 세포의 형태, 온도, 노출시간, 배양액의 조성 및 항동해제

의 농도 등에 따라 달라진다 (Whittingham, 1980; Kasai *et al.*, 1981; Szell & Shelton, 1986; Frieder *et al.*, 1988; Takahashi & Kanagawa, 1990; Bermart *et al.*, 1996). 그리고 동결보존후 배아의 생존율은 동결·용해 과정중에 사용되는 항동해제의 종류, 동결방법과 용해속도 등에 많은 영향을 받는다 (Nowshari *et al.*, 1995). 또한 동결시 세포주기와 발생시기 및 배의 종간의 차이도 동결보존후 생존율과 깊은 관계를 갖는다 (Friedler *et al.*, 1988;

Balakier *et al.*, 1991).

배의 생존율과 발달율을 높이고 동결과정을 단순화하는 연구가 최근 활발히 진행되고 있는데 그중의 하나가 초급속 동결이다 (Rall & Fach, 1985; Trounson *et al.*, 1987). 이들 방법은 기존의 동결방법에 비해 동결과정에서 일어나는 세포내 ice crystallization을 막을 수 있고, 시간을 절약할 수 있는 장점이 있다. 한편, 항동해제로써 DMSO와 PROH를 이용한 초급속 동결은 배의 동결에 드는 비용을 절감하고, 매우 간단하며 효과적인 방법이라 할 수 있다.

초급속 동결을 위한 항동해제로써 PROH는 현재 많은 연구가 진행되고 있지만 DMSO에 동결한 것 보다도 비효과적인 것으로 보고하고 있다 (Trounson *et al.*, 1988; Wilson and Quinn, 1989; Van der Auwera *et al.*, 1990; Macas *et al.*, 1991; Van der Elst *et al.*, 1993). 그러나 생쥐배에서 PROH를 이용할 때 낮은 생존율은 낮은 온도에서 평형을 실시하고, 노출 시간을 줄임으로써 좋은 효과를 기대할 수 있다. Van der Elst 등 (1992)은 실온과 0°C 사이의 온도에서 평형을 실시하고 PROH 1.5 M 농도에서 평형시간을 짧게 했을 때 배의 생존율은 높고 발달율은 낮다고 보고하였다. 최근의 연구에 의하면 1~4.5 M DMSO의 농도에 생쥐의 1-세포기에서 배반포배를 평형을 실시할 때 양호한 성적을 얻어 이들 농도가 추천되어 왔으나 그 이상 농도의 항동해제는 염색체의 이상을 초래함으로써 사용되지 않고 있다 (Shaw *et al.*, 1991).

1-세포기배부터 배반포단계까지의 배의 동결 보존에 대한 기술은 인간을 포함하여 여러동물에서 보고되었다 (Renard *et al.*, 1984; Laselle *et al.*, 1985; Miyamoto & Ishibashi, 1986). 그러나 초급속 동결을 이용한 동결방법은 아직 많이 알려져 있지 않다.

이에 본 연구는 생쥐 1-세포기배를 이용하여 초급속 동결을 할 때 항동해제 첨가후 평형온도 및 노출시간이 배의 발달에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

본 실험에 사용된 PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin), Hyaluronidase (bovine testes, type I-s), PROH (1,2-propanediol), DMSO (dimethyl sulfoxide),

Sucrose는 Sigma Chemical Co. (U.S.A)로부터, HCG (Human Chorionic Gonadotropin, Pregnyl)는 Organon Co. (Holland)로부터 구입하였다.

### 2. 공시동물과 배양액

공시동물인 F1 hybrid (C57BL X CBA)생쥐는 국제동물로부터 구입하였다. 실험에 사용한 기본 배양액은 HEPES-buffered M2 (Quinn *et al.*, 1982) 배양액을 그리고 체외배양용 배양액은 T6 (Quinn *et al.*, 1982)배양액을 사용하였다.

### 3. 과배란 처리와 난자의 회수

본 실험에 사용된 실험동물은 생후 3~5주된 암컷생쥐로, 이들은 복강에 5 IU의 PMSG를 주사한후 46~48시간체에 동일한 방법으로 5 IU의 HCG를 주사하여 과배란 처리를 하였고, 수정란을 얻기 위해서는 HCG주사직후 6~8주령된 동종의 수컷 생쥐와 합사시켜 교미를 유도하였다.

한편, 난자의 회수를 위해 1-세포기배는 HCG 주사후 22~24시간체에 회수하여 난구세포는 배양액에 1 mg/ml hyaluronidase를 첨가한 용액에 노출하여 난구세포가 느슨할 때 pipetting하여 완전히 제거한 다음 신선한 배양액에 3~4회 세척 후 실험에 공시하였다.

### 4. 항동해제 비처리군의 체외배양

항동해제를 처리하지 않은 군은 체외에서 배의 발달상태를 관찰하기 위하여 생쥐의 1-세포기배 4~11개를 각각 채취할 때마다 선별하여 50회 반복 실험하였다.

### 5. 초급속 동결을 위한 항동해제 독성실험

항동해제 독성실험을 위한 항동해제로써 3 M 및 4.5 M의 PROH 혹은 DMSO를 0.25 M sucrose가 첨가되어 있는 M2배양액에 첨가하여 23°C에서 10, 20 및 30분간 1-세포기배를 계속적인 동결 없이 노출만 하였다. 동결액의 노출이 끝난 배는 용해액인 1 M sucrose가 함유된 배양액에 10분간 노출한 후 3 ml의 신선한 배양액에 옮겨서 3~4회 배를 세척한 후 T6배양액에 배양하면서 배반포까지 배의 발달상태를 관찰하였다.

### 6. 항동해제 PROH와 DMSO를 이용한 초급속 동결

동결용액은 M2배양액에 0.25 M sucrose와 각

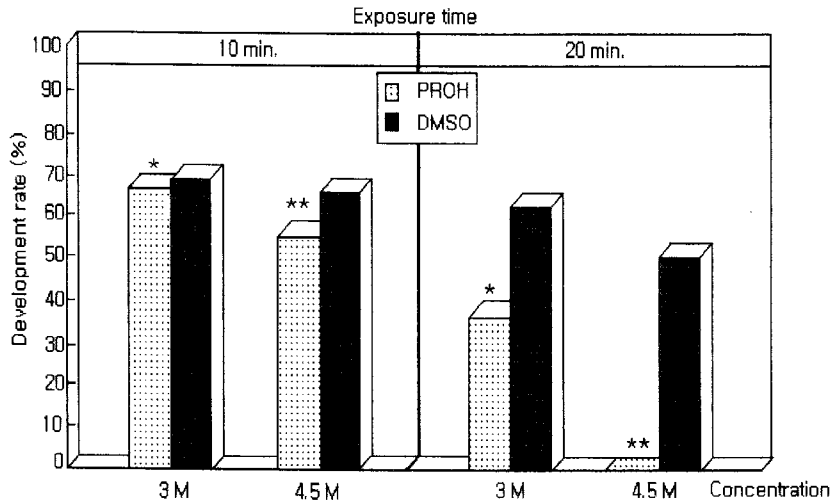


Fig. 1. Embryo development rate according to cryoprotectant concentration and exposure time. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

각 3 M, 4.5 M의 PROH와 DMSO를 첨가하여 제조하였다. 난구 세포가 제거된 1-세포기배는 위와 같이 제조된 동결용 배양액에 넣은 후 23°C와 3°C에서 1, 5, 10 및 20분간 노출시켰다. 평형 시간이 끝날 무렵 동결용 0.25 ml straw에 흡입한 직후 액체질소통으로 넣었다. 그리고 straw에 배의 흡입 시간과 액체질소에 담그기까지의 시간은 노출 시간을 넘기지 않았으며, 액체질소에 보존 기간은 1~3일째로 하였다.

용해는 액체질소통에서 꺼낸 straw를 25°C 수조에서 5~10초간 담구었다가 꺼내 예리한 면도용 칼로 잘라서 빈 배양용 접시에 내용물을 부었다. 여기서 찾은 난자는 1 M sucrose가 첨가된 용해액에 옮겨서 10분간 노출한 다음 3 ml의 신선한 배양액으로 옮겨서 3~4회 세척 후, 생존한 배만 선별하여 T6배양액에 배양하면서 배반포까지 배의 발달 상태를 관찰하였다.

#### 7. 동결·용해후 체외배양

배 발달 실험을 위해 생쥐 1-세포기배를 이용하여 각각 다른 농도의 항동해제를 첨가하여 동결·용해후 얻은 배는 CO<sub>2</sub>배양기에서 밤새 동안 선배양한 20 µl T6배양액 소적에 넣고 배양하면서 배반포까지 배의 발달 상태를 관찰하였다.

#### 8. 통계처리

항동해제 독성 실험과 동결·용해후 항동해제

의 농도 및 노출 시간의 효과에 대한 통계는 Fisher's exact test에 의하여 평가하였고, 유의차에 대한 수준은  $p$ 값이 0.05보다 작은 경우에 유의성이 있다고 판단하였다.

## 결 과

### 1. 항동해제 비처리군의 체외배양

항동해제를 처리하지 않은 군을 체외에서 배의 발달 상태를 관찰하기 위하여 생쥐의 1-세포기배 4~10개를 각각 채취할 때마다 선별하여 50회 반복 실험하였다. 그 결과 총 284개의 난자를 공시하여 체외배양한 후 배반포까지 배의 발달율은 84.51%로 나타났다.

### 2. 초급속 동결을 위한 항동해제 독성 실험

생쥐의 1-세포기 수정란을 23°C에서 3 M 혹은 4.5 M PROH 및 DMSO에 0.2 M sucrose를 함유한 M2배양액에 10분 및 20분 동안 노출한 후 동결을 하지 않은 배의 발달율은 그림 1에서 보는 바와 같다. 3 M 농도의 PROH에서 배의 발달율은 노출 시간이 10분일 때 70.2% 그리고 20분일 때 38.8%였다. 배의 발달율은 노출 시간이 길어짐에 따라 현저하게 감소하였다 ( $p < 0.05$ ). 특히 4.5 M 농도에서 10분 동안 노출했을 때 배의 생존율은 55% 그리고 20분 동안 노출했 때는 0%로 노출 시간이 경과함에 따라서 급격히 감소하였다 ( $p < 0.01$ ). 따라

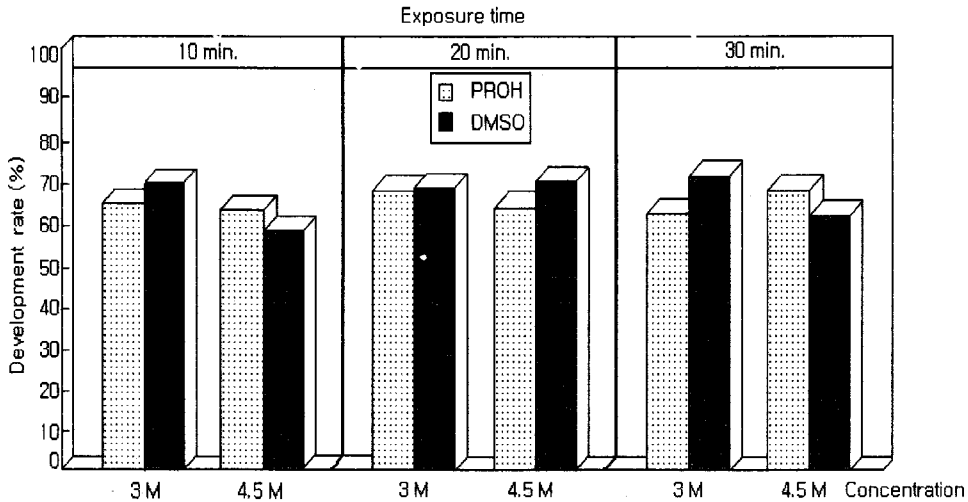


Fig. 2. Embryo development rate according to cryoprotectant concentration and exposure time.

Table 1. Development rates of mouse zygotes after ultrarapid freezing for different time at 23°C

Cryoprotectant*	Development rate according to exposure time				
	Concentration	1 min	3 min	5 min	10 min
PROH	3.0 M	15.8±2.1	33.1±3.7	42.5±4.3	19.4±3.0
	4.5 M	45.5±4.2 <sup>a</sup>	37.0±4.2 <sup>c</sup>	17.9±4.7 <sup>c</sup>	11.5±5.0 <sup>b</sup>
DMSO	3.0 M	14.3±5.5	44.2±4.9	17.4±3.6	17.9±5.7
	4.5 M	26.5±3.6	46.1±3.6	48.5±3.7	32.6±6.1

\*These cryoprotectants were contained each 0.25M sucrose.

PROH = 1,2-propanediol, DMSO = dimethyl sulfoxide

Values are expressed as mean ± SD

<sup>a</sup> vs <sup>b</sup>: p<0.05, <sup>a</sup> vs <sup>c</sup>: not significant

서 23°C에서는 3 M농도의 항동해제가 세포를 보호하는 효과가 큰 것으로 관찰되었다.

23°C에서 DMSO의 효과를 보면 3 M농도에서 노출시간이 10분일 때 72.7% 그리고 20분일 때 68%로 배의 발달율은 노출시간이 경과함에 따라서 큰 차이를 보이지 않았으나 4.5 M농도에서는 노출시간이 10분일 때 70.7% 그리고 20분일 때 50.9로 노출시간이 증가함에 따라서 발달율이 다소 감소하였다. 그러므로 3 M농도가 4.5 M농도보다 배의 발달율에 미치는 영향이 적다고 볼 수 있다.

한편, 3°C에서 배의 발달율은 항동해제 첨가농도에 큰 영향을 받지 않았고 더욱이 노출시간을 30분으로 증가시켜도 배의 생존율에는 큰 변화가 없었다 (그림 2).

### 3. 23°C에서 초급속 동결 실험

생쥐 1-세포기배를 이용하여 0.25 M농도의 sucrose가 함유된 배양액에 항동해제 PROH와 DMSO를 각각 3 M 혹은 4.5 M를 첨가하여 1, 5 및 10분간 노출한 후 초급속 동결을 실시하였다. 융해한 후 배를 체외에서 배양했을 때 배의 발달율을 보이면은 표1과 같다.

배의 발달율은 3 M PROH에서 동결·융해후 초기에는 낮고 시간이 지날수록 높아지다가 어느 시점을 지나면서 다시 낮아졌다. 따라서 3 M에서 5분동안 노출했을 때 42.5%로 좋은 발달율을 나타내는 것으로 보아 이 조건이 배의 발달율에 경계점임을 관찰할 수 있었다. 한편, 4.5 M에서는 노출시간이 경과함에 따라서 현저하게 배의

**Table 2.** Development rates of mouse zygotes after ultrarapid freezing for different time at 3°C

Cryoprotectant*	Development rate according to exposure time				
	1 min	3 min	5 min	10 min	20 min
PROH 3.0 M <sup>a</sup>	0.0±0.0	15.4±3.5	41.0±6.8	18.3±5.1	30.9±5.1
4.5 M <sup>b</sup>	19.4±4.8 <sup>c</sup>	61.0±3.3 <sup>d</sup>	52.4±9.3 <sup>d</sup>	42.1±3.3 <sup>c</sup>	20.6±5.8 <sup>c</sup>
DMSO 3.0 M	0.0±0.0	0.0±0.0	12.2±6.7	20.5±3.3	12.5±2.3
4.5 M	0.0±0.0 <sup>f</sup>	14.6±2.6 <sup>b</sup>	42.6±4.4 <sup>b</sup>	50.9±4.3 <sup>b</sup>	21.5±2.8 <sup>b</sup>

\*These cryoprotectants were contained each 0.25 M sucrose.

PROH = 1,2-propanediol, DMSO = dimethyl sulfoxide

Values are expressed as mean ± SD

<sup>a</sup> vs <sup>b</sup>, <sup>c</sup> vs <sup>d</sup>: p<0.05, <sup>f</sup> vs <sup>b</sup>: p<0.01, <sup>c</sup> vs <sup>e</sup>, <sup>f</sup> vs <sup>h</sup>: not significant

발달율이 감소하였는데 1분에서는 45.5%, 10분에서는 11.5%로 배의 발달율에 있어서 현저한 차이를 보였다 (p<0.05). 그러나 3 M과 4.5 M의 농도에 따른 효과에 대한 양상의 차이는 아마도 PROH의 농도와 노출시간과 어떤 상관관계가 있는 것으로 추정된다.

항동해제 DMSO를 배양액에 첨가하여 동결·융해 후 배의 발달율을 보면 3 M에서 3분동안 노출했을 때가 44.2%, 4.5 M에서 5분동안 노출했을 때 48.5%로 발달율이 가장 좋았다. 그러나 4.5 M에서 3분동안 노출시켰을 때도 46.1%로 높은 발달율을 보여 DMSO는 농도가 높을수록 동결·융해 후 배의 생존성에 좋은 효과를 나타냈다.

이상을 종합해 보면 23°C에서 첨가된 항동해제는 동결·융해 후 PROH는 4.5 M을 1~3분간 노출했을 경우, 그리고 DMSO는 4.5 M에 3~5분간 노출했을 경우에 높은 배의 발달율을 확인하였다.

#### 4. 3°C에서 초급속동결 실험

생쥐 1-세포기배를 0.25 M의 sucrose가 함유된 M2배양액에 항동해제 PROH와 DMSO를 각각 3 M 혹은 4.5 M를 첨가하여 1, 3, 5, 10 및 20분간 노출한 후 초급속 동결을 실시하고 융해한 후 배를 체외에서 배양했을 때 배의 발달율은 표2와 같다.

배의 발달율은 3 M PROH에서 1분동안 노출했을 때는 0%였으나 5분인 경우 41%였다. 따라서 노출시간에 따라 큰 영향을 받는 것을 볼 수 있었다. 그리고 4.5 M에서는 3분간 노출하였을 때 배의 발달율은 61%로 가장 높았으며 노출시간에 따라서 현저한 차이가 났다 (p<0.05). 그리고 4.5 M농도가 3 M농도보다 초급속 동결을 하는데 배

에 대한 보호작용이 현저하게 나온 것으로 나타났다 (p<0.05).

한편, 3 M DMSO에서 노출시간이 짧은 1~3분은 0%로 나타나 노출시간이 5분 (12.2%) 이상 되어야만 배의 발달율이 향상되었다. 그리고 배의 발달율이 가장 좋은 것은 노출시간을 10분으로 하였을 때 20.5%로 이 시간이 가장 적절한 노출시간으로 나타났다. 한편, 4.5 M에서는 노출시간이 증가함에 따라서 배의 발달율이 좋아지다가 10분 (50.9%)을 기점으로 하여 노출시간이 더 길어진 20분이 되었을 때는 21.5%로 급격히 감소하였다 (p<0.01).

이상에서 보는 바와 같이 4°C에서 초급속 동결·융해 후 배의 생존성은 PROH는 3~5분, DMSO는 5~10분정도가 적절한 배의 노출시간으로 나타났다.

Table 1과 2를 종합해 보면 생쥐배 1-세포기를 이용하여 초급속 동결·융해 후 배의 생존율은 23°C에서는 4.5 M DMSO에서 3~5분, 3°C에서는 4.5 M PROH에서 3~5분이 동결·융해를 했을 때 좋은 결과를 가져왔다.

## 고 찰

세포를 동결하는데 첨가되는 항동해제의 효과는 그 물질들의 세포투과성 및 독성에 달려있다. 동결보존 후 배아의 생존율은 동결, 융해 과정에서 사용되는 항동해제의 종류, 동결방법과 융해 속도 등에 많은 영향을 받고 (Vander Auwera *et al.*, 1992), 또한 동결되는 배의 세포주기와 발생시기의 차이도 동결보존 후 생존율과 깊은 관계를 갖는다 (Friedler *et al.*, 1988; Balakier *et al.*, 1991;

Veek *et al.*, 1993; Nowshari *et al.*, 1995).

동결보존에 대한 연구는 배의 발달율을 높임과 동시에 그 과정을 단순화하려는 노력들이 많이 진행되고 있는데 그중의 하나가 초급속 동결이다 (Trounson *et al.*, 1987). 초급속 동결방법은 세포가 동결되는 동안 동결용액의 점성증가로 세포내외의 ice crystallization을 줄이는 동결법으로 시간을 절약하고 비용을 절감할 수 있다.

항동해제 독성에 대하여 알아보기 위해 23℃에서 동결없이 노출만 실시해서 배의 발달을 관찰했을 때 DMSO 보다는 PROH가 독성이 다소 크게 나타났다. 그러나 온도를 낮게한 3℃에서는 노출시간에만 영향을 받았고 항동해제 독성에 관해서는 큰 영향을 받지 않았다. 이것은 초급속 동결을 했을 때 항동해제 독성보다는 다른 요인들이 중요함을 시사한다. 즉, 동결·용해후 생존성에 도움을 주는 요인중의 하나인 세포내 ice crystallization 형성을 줄이는 것인데 이러한 현상이 낮은 온도에서 작용했을 것으로 추정된다 (Mazur, 1990).

초급속 동결을 했을 때 배의 발달율은 항동해제 간에는 큰 차이를 보이지 않았지만 DMSO는 23℃에서, PROH는 3℃에서 다소 높은 경향을 나타냈다. 이러한 결과는 특히 PROH는 낮은 온도에서 평형을 실시하면 배의 발달율을 높일 수 있다고 보고한 Van der Elst 등 (1993)의 결과와 일치했다. 23℃에서 항동해제 PROH를 처리했을 때 배의 발달율은 노출시간이 경과함에 따라 현저하게 감소하였다 ( $p < 0.05$ ). 그러므로 노출시간은 항동해제가 배의 세포질내로 침투하는데 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

동결·용해 후 체외에서 배양했을 때 배의 발달율은 3 M 보다는 고농도인 4.5 M이 높은 것으로 나타났다. 따라서 초급속 동결용액은 낮은 온도에서 과냉각 되기 때문에 용해되는 동안 ice crystallization이 이루어져 세포에 손상을 줄수도 있다. 따라서 용해되는 동안 ice crystallization을 막기 위해서는 높은 농도의 투과성이 있는 항동해제가 필수적이다 (Rall *et al.*, 1987). 또한 초급속 동결용액은 고농도이기 때문에 노출시간을 짧게 했을 때 배의 발달율이 높은 것으로 보고한 Van der Elst 등 (1995)의 결과와 일치했다.

생쥐 초기배의 초급속 동결을 위하여 항동해제로써 PROH도 많은 연구가 진행되고 있지만 DMSO에 의한 동결방법 보다도 비효율적인 것

로 보고되었으며 (Trounson *et al.*, 1988; Wilson & Quinn, 1989; Macas *et al.*, 1991; Van der Elst *et al.*, 1993), 생쥐배를 25℃ 및 36℃에서 DMSO나 PROH와 같은 항동해제에 노출시켰을 때 온도, 농도 및 시간에 따라서 생쥐배의 미세관 구조에 손상을 주는 것이 관찰되었다 (Johnson & Pickering, 1987). 그러나 생쥐배에서 PROH를 이용할 때 낮은 생존율은 낮은 온도에서 평형을 실시하고, 노출 시간을 줄임으로써 좋은 효과를 볼 수 있다. Van der Elst 등 (1992)은 실온과 0℃ 사이의 온도에서 평형을 실시하고 그리고 1.5 M PROH에 짧은 시간에 평형을 실시할 때 높은 생존율은 얻었다고 보고했다. 본 실험에서도 이것과 일치하는 결과를 얻었으나 낮은 온도에서 배의 생존율이 높은 것에 대한 것은 더 많은 연구가 있어야 될 것으로 사료된다.

생쥐의 1-세포기배를 초급속동결을 실시했을 때, 동결·용해후 배의 발달율은 23℃에서는 4.5 M DMSO에서 3~5분, 3℃에서는 4.5 M PROH에서 3~5분이 동결·용해를 했을 때 좋은 것으로 나타나 항동해제의 농도나 형태 뿐만 아니라 평형시간과 온도에 의해서도 영향을 받는 것이 확인되었다.

## 결 론

본 연구는 생쥐 1-세포기배를 이용하여 초급속 동결을 할 때 항동해제 첨가후 평형온도 및 노출시간이 배의 발달에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 항동해제 독성실험으로 생쥐의 1세포기 수정란을 23℃에서 PROH 3 M 및 4.5 M에 10분간 노출 후 배의 발달율은 각각 70.2%, 55%였으며, DMSO는 3 M 및 4.5 M에 10분간 노출 후 배의 발생율은 각각 72.8%, 70.7%였다. 그리고 PROH 3 M 및 4.5 M에 20분간 노출 후 배의 발생율은 각각 38.8%, 0%였으며, DMSO는 3 M 및 4.5 M에 20분간 노출 후 배의 발생율은 각각 68%, 50.7%였다.

2. 항동해제 독성실험으로 3℃에서 PROH 3 M 및 4.5 M에 10분간 노출 후 배의 발생율은 각각 66.7%, 65.6%였으며, DMSO는 3 M 및 4.5 M에 10분간 노출 후 배의 발생율은 각각 71.4%, 60.9%였다. PROH 3 M 및 4.5 M에 20분간 노출 후 배의 발생율은 각각 68.6%, 65.2%였으며, DMSO는

3 M 및 4.5 M에 20분간 노출 후 배의 발생율은 각각 69.6%, 70.8%였다. 그리고 PROH 3 M 및 4.5 M에 30분간 노출 후 배의 발생율은 각각 64.9%, 67.7% 였으며, DMSO는 3 M 및 4.5 M에 20분간 노출 후 배의 발생율은 각각 72.2%, 64.8%였다.

3. 23℃에서 동결·융해후 배의 발달율을 보면 PROH 3 M에 1, 3, 5, 10분간 노출했을 때 각각 15.8%, 33.1%, 42.5%, 19.4%였고, 4.5 M에 1, 3, 5, 10분간 노출했을 때 각각 45.5%, 37%, 17.9%, 11.5%였다. 그리고 DMSO 3 M에 1, 3, 5, 10분간 노출했을 때 각각 14.3%, 44.2%, 17.4%, 17.9%였고, 4.5 M에 1, 3, 5 및 10분간 노출했을 때 각각 26.5%, 46.1, 48.5%, 32.6%였다.

4. 3℃에서 동결·융해후 배의 발달율을 보면 PROH 3 M에 1, 3, 5, 10, 20분간 노출했을 때 각각 0%, 15.4%, 41%, 18.3%, 30.9%였고, 4.5 M에 1, 3, 5, 10, 20분간 노출했을 때 각각 19.4%, 61%, 52.4%, 42.1%, 20.6%였다. 그리고 DMSO 3 M에 1, 3, 5, 10, 20분간 노출했을 때 각각 0%, 0%, 12.2%, 20.5%, 12.5%였고, 4.5 M에 1, 3, 5, 10, 20분간 노출했을 때 각각 0%, 14.6%, 42.6%, 50.9%, 21.5%였다.

위의 결과와 같이 생쥐 1-세포기배를 초급속 동결을 실시할 때 낮은 온도인 3℃에서 배의 노출시간을 3~10분으로 했을 때 다소 양호한 성적을 얻었다. 그러므로 동결·융해 후 배의 생존율을 높이기 위해서는 낮은 온도에서 더 많은 연구가 후행되어야 할 것으로 사료된다.

## 인 용 문 헌

- Balakier H, Zenzes M, Wang P, McLusky NJ, Casper RF: The effect of cryopreservation on the development of S- and G2-phase mouse embryos. *J In Vitro Fertility Embryo Transfer* 1991, 8, 89-95.
- Bermart W, Kamel M, Neulen J, Breckwoldt M: Influence of the development stage and the equilibration time on the outcome of ultrarapid cryopreservation of mouse embryos. *Hum Reprod* 1994, 9, 100-102.
- Fahy GM: The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology* 1986, 23, 1-13.
- Frieder S, Guidance LC, Lamb EJ: Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil Steril* 1988, 49, 743-764.
- Johnson MH, Pickering SJ: The effect of dimethylsulfoxide on the microtubular system of the mouse oocyte. *Development* 1987, 313-324.
- Kasai M, Niwa K, Iritani A: Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. *J Reprod Fertil* 1981, 63, 175-180.
- Laselle B, Testard J, Renard JP: Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2-propanediol. *Fertil Steril* 1985, 44, 645-651.
- Macas E, Xie M, Keller PJ, Imthurn B, Rulicke T: Developmental capacities of two-cell mouse embryos frozen by three methods. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1991, 8, 208-212.
- Mazur, P: Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophys* 1990, 17, 53-92.
- Miyamoto H, Ishibashi T: The effect of equilibration with cryoprotectants at 0℃ prior to freezing on the survival of mouse embryos frozen by the two-step method. *Experimentia* 1986, 42, 815-816.
- Nowshari MA, Nayudu PI, Hodges JH: Effect of cryoprotectant and their concentration on post-thaw survival and development of rapid frozen-thawed pronuclear stage mouse embryos. *Hum Reprod* 1995, 10, 281-285.
- Rall WF, Fach GM: Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196℃ by vitrification. *Nature* 1985, 313, 573-575.
- Renard JP, Nguyen BX, Gardier V: Two-step freezing of two cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. *J Reprod Fertil* 1984, 71, 573-580.
- Shaw JM, Diotallevi L, Trounson AO: A simple rapid 4.5 M dimethylsulfoxide freezing technique for the cryopreservation of one-cell to blastocyst stage preimplantation stage mouse embryos. *Reprod Fertil Dev* 1991, 3, 621-626.
- Szell A, Shelton JN: Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 1986, 76, 401-408.
- Takahashi Y, Kanagawa H: The effect of equilibration with cryoprotectants at 0℃ prior to freezing on the survival of mouse embryos frozen by the two-step method. *Experimentia* 1986, 42, 815-816.

- tion period on the viability of frozen-thawed mouse morula after rapid freezing. *Mol Reprod Dev* 1990, 26, 105-110.
- Trounson A, Peura A, Kirby C: Ultrarapid freezing; a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil Steril* 1987, 48, 843-850.
- Trounson A, Peura A, Freemna L, Kirby C: Ultrarapid freezing of early cleavage stage human embryos and 8-cell mouse embryos. *Fertil Steril* 1988, 49, 822-826.
- Van der Auwera I, Cornillie F, Ongkowitzjojo R, Pijnenborg R, Koninckx PR: Cryopreservation of pronucleate mouse ova; slow versus ultrarapid freezing. *Hum Reprod* 1992, 5, 619-621.
- Van der Elst J, Van den Abbeel E, Nerickx S, Van Steirteghem AC: Parthenogenetic activation pattern and microtubular organization of the mouse oocyte after exposure to 1,2-propanediol. *Cryobiology* 1992, 29, 549-562.
- Van der Elst J, Nerickx S, Van Steirteghem AC: Slow and ultrarapid freezing of fully grown germinal vesicle-stage mouse oocytes; optimization of survival rate outweighed by defective blastocyst formation. *J Assist Reprod Genet* 1993, 10, 202-212.
- Van der Elst J, Van den Abbeel E, Van Steirteghem AC: The effect of equilibration temperature and time on the outcome of ultrarapid freezing of 1-cell mouse embryos. *Hum Reprod* 1995, 10, 379-383.
- Veek LL, Amundson CH, Brothman LJ, DeScisciolo C, Maloney MK, Muasher SJ: Significantly enhanced pregnancy rates per cycle through cryopreservation and thaw of pronuclear stage oocytes. *Fertil Steril* 1993, 59, 1202-1207.
- Whittingham DG: Principles of embryo cryopreservation. In low temperature preservation in medicine and biology. *MJ Ashwood-Smith, J Farrant (eds). Kent, Pitman Medical* 1980, chap 4.
- Wilson L, Quinn P: Development of mouse embryos cryopreserved by an ultra-rapid method of freezing. *Hum Reprod* 1989, 4, 86-90.