

동결속도와 평형시간이 소 미성숙 난자의 동결 용해후 생존율에 미치는 영향

양병철[†] · 양보석 · 성환후 · 임기순 · 최선호 · 장원경 · 진동일¹ · 임경순²

축산기술연구소 유전공학과

Effects of Cooling Rate and Equilibration Time on the Survival and Development of Frozen-thawed Bovine Immature Oocytes

Yang, B. C.[†], B. S. Yang, G. S. Im, H. H. Seong, S. H. Choi,
W. K. Chang, D. I. Jin¹ and K. S. Im²

National Livestock Research Institute, Animal Biotechnology Division

ABSTRACT

The present study was undertaken to investigate the effects of cooling rate and equilibration time on the survival, *in vitro* maturation and development to embryos of frozen-thawed bovine immature oocytes(Germinal Vesicle Stage). The cryoprotectants are used 10% ethylene glycol(EG) as permeating cryoprotectant and 0.05M sucrose(S) or trehalose(T) as low molecular weight nonpermeating cryoprotectants and 5% ficoll(F) or polyvinylpyrrolidone(PVP) as high molecular weight nonpermeating cryoprotectants. Four freezing solution were used in this experiment(EFT: 10% EG + 5% F + 0.05M T, EFS: 10% EG + 5% F + 0.05M S, EPT: 10% EG + 5% P + 0.05M T, EPS: 10% EG + 5% P + 0.05M S).

The best equilibration time and freezing solution was 15 min in EPT(83% survival rate of frozen-thawed bovine immature oocytes). When frozen-thawed bovine oocytes were cultured following IVM and IVF, there was no significant difference in cleavage and development rates among the EFT, EFS, EPT and EPS solutions. When 9 blastocysts derived from frozen bovine oocytes were transferred to 6 recipients, two recipients were pregnant. And one was aborted at 45 days of pregnancy and the other had a stillbirth.

I. 서 론

성숙된 생쥐 난자로 1.5M DMSO를 이용하여 완만 동결이 처음으로 성공한 이후 (Whittingham, 1977; Kola 등 1988; Rayos 등 1994) 랫트 (Parkening과 Chang 1977; Kiehm 등 1987), 토끼 (Al-Hasani 등), 소 (Schellander 등, 1988; Glass와

Voelkel, 1990; Lim 등 1991, Im 등 1997), 사람 (Chen, 1986)에서 동결용해 난자로 수정에 성공하였다. 그 이후 이들 방법은 조금씩 발전을 거듭하여왔다. 그럼에도 불구하고 난자의 동결은 수정란의 동결에 비하여 매우 어려운 것으로 알려져 있다. 그 이유는 난자내 meiotic spindles, microtubules 그리고 microfilaments 등이 낮은 온도나 동결액의 첨가시 삼투압 등에 의하여 쉽게 손상을

[†] Corresponding Author : Animal Biotechnology Division, National Livestock Research Institute

¹ 선문대학교 응용생물과학부(Division of Applied Biological Science, Sun Moon University)

² 서울대학교 동물자원과학과(College of Agriculture and Life Science, Seoul National University)

받기 때문이다 (Parks and Ruffing, 1992). 이러한 손상을 피하기 위하여 여러 가지 방법과 동결액을 이용하여 왔다. 그 중 미성숙 난자를 동결함으로써 유리한 것은 성숙 난자 (mataphase II)보다 미성숙 난자 (GV stage)에서 난자내 microtubule이 적게 발달되어 있으므로 이 단계에서 동결 용해한다면 미세소관의 손상으로 인한 염색체의 손상을 막을 수 있다는 이론이다 (Aman 등, 1994. Suzuki 등, 1996). 동결액의 종류로 본다면 크게 세가지로 구분하여 볼 수 있는데 저분자 물질인 칩투성 동결 보호제로서 ethylene glycol(Mw 62.07), 1,2-propanediol (Mw 76.1), DMSO (Mw 78.13) 그리고 glycerol (Mw 92.1) 등이 대표적이다. 이들은 완만 동결시 세포 volume의 변화를 감소시키고 세포내 빙정 형성을 감소시키는 작용을 한다. 두 번째로 저분자량을 가지고 있는 물질로서 glucose (Mw 181.1), sucrose (Mw 342.3), trehalose (Mw 378.3) 그리고 기타 sugars들이며 모두 비칩투성 동결 보호제로 이용하고 있다. 이 저분자 물질들은 동결전 세포내 dehydration을 용이하게 하여 동결시 빙정 형성을 줄여주는 역할을 한다. 또한 비칩투성 동결 보호제이며 높은 분자량을 가지고 있는 것으로는 polyvinylpyrrolidone, polyvinyl alcohol, hydroxyethyl starch 등으로서 이들은 모두 분자량이 40000에서 50000 또는 70000 이상의 것도 있다. 이들의 역할은 동결 용해시 발생하는 빙정을 무해한 크기로 작게 형성시키므로서 세포막의 손상을 최소화시켜주는 작용을 한다 (Andre와 Reuben, 1996).

그리고 또한 동결액의 조합과 더불어 세포 내 외부의 평형을 위하여 동결전 일정시간 동결액에 난자를 침지하게 되는데 이것은 동결 속도와 밀접한 관련이 있다. 동결전 평형시간이 너무 많으면 과도한 동결액의 침투로 삼투압 등에 의한 손상을 입게 되고, 너무 빠르면 세포내 많은 수분이 동결시 빙정을 형성하여 세포사의 원인이 된다. 이것은 동결속도가 너무 빨랐을 때도 비슷한 현상이 일어나며, 마찬가지로 동결 속도가 너무 느리면 삼투압과 저온에 의한 손상으로 인해 세포사의 원인이 될 수 있다. 이러한 문제들을 극복하고 난자의 동결 용해가 일부 성공적으로 이루어지고 있으나, 수

정란에 비하여 매우 낮은 생존율과 미성숙 난자의 발달율 그리고 수정율과 배발달율이 또한 매우 낮다.

Otoi 등 (1992)은 성숙 소 난자를 PROH로 동결 용해후 수정, 배양, 이식하여 정상 산자를 보았다. 그러나 미성숙 난자 (GV oocytes)의 동결은 성숙 난자에 비하여 성공률이 매우 낮으므로 이로 인한 산자 생산은 비교적 최근에 보고되었다. 소에서 난자의 동결을 통하여 착상이후로의 발달을 나타냈다는 보고는 1992년에 일본에서 소의 성숙난자를 이용한 완만 동결·용해로 송아지를 임신하였거나 (Otoi 등) 또는 생산하였고 (Fuku 등, Hamano 등, 1992), 1996년에는 GV stage의 미성숙 난포란으로 완만 동결·용해하여 송아지 생산하였다 (Suzuki 등). 또한 Booth 등 (1999)은 핵이식을 위한 수핵란으로서 난자를 동결 용해하여 핵이식 후 송아지를 분만하였다.

미성숙 난자의 보존은 학문적으로의 가치와 함께 산업적인 가치와 유전자원의 보존에 중요하다 할 수 있다. 난자 동결이 성공적으로 이루어진다면 우수한 암가축의 생식세포를 반영구 보존 이용할 수 있으며, 체외수정과 수정란의 발생 연구에 많은 기여를 할 것이다. 또한 체세포 또는 정자 주입법 또는 핵이식을 이용한 발생 연구에서 수핵란으로서 이용 가능성이 증대되고 있으며, 다양한 능력과 결합할 수 있는 능력을 잠재적으로 갖고 있으므로 난자를 성공적으로 저장할 수 있게 되면 여러 가지 종과 계통에서 유전적 자원을 더 유용하게 이용할 수 있으므로 효과적이다.

따라서 본 실험의 목적은 소 미성숙 난자 (GV stage)의 동결에 중요한 영향을 미치는 평형시간과 동결속도가 용해후 생존율 및 배발달율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 미성숙 난자의 동결 용해 후 체외성숙, 체외수정 및 배반포 발달 능력을 알아보았다.

II. 재료 및 방법

1. 난포란의 채취

도축 한우 암소로부터 난소를 채취하여 30~35℃ 멸균생리식염수에 보존하여 2시간 이내에 실험

실로 운반하였다. 난소는 38°C 생리식염수로 2~3회 세척한 후 면도날로 1 mm 이하로 세절하였다. 세절된 난소를 10% fetal bovine serum (Gibco BRL, U.S.A.; FBS)을 첨가한 38°C의 TCM199 (tissue culture medium, Sigma Chemical Co., U.S.A.)가 들어있는 50 ml tube에 넣어 15분간 정치한 후 상층액을 제거하였다. 이후 90×20 mm tissue culture dish (Corning Glass Works, U.S.A.)에 침전물을 부어 실체 현미경 아래서 micro pipette으로 난자를 회수하였다.

회수된 난자는 TCM199액으로 3회 washing하여 난자주위에 난구세포층이 치밀하게 부착되어 있고 세포질이 균일한 미성숙 난자 (Cumulus oocyte complexes, COCs)만을 선별하였다.

2. 동결액의 준비

본 실험에 사용한 동결액은 TCM199 + 5% FBS를 기본액으로 하였다. 침투성 동결 보호제로서 10% ethylene glycol (EG, Sigma chem. co.)을 사용하였고, 비침투성 동결보호제로서 5% ficoll (F, Mw. 70,000, Sigma), 5% polyvinylpyrrolidone (PVP, Mw. 40,000, Sigma), 0.05M sucrose (S, Sigma) 및 0.05 M trehalose (T, Sigma)를 사용하였다. 동결액의 조성은 EFT : 10% EG + 5% F + 0.05M T, EFS : 10% EG + 5% F + 0.05M S, EPT : 10% EG + 5% P + 0.05M T, EPS : 10% EG + 5% P + 0.05M S로서 네가지 조성을 준비하였다.

3. 미성숙 난자의 동결 용해

미성숙 난자는 동결전 평형시간(dehydration)을 실온에서 10, 15, 20분 동안 실시하였다. 그리고 20~30개 COCs를 0.25ml straw에 loading 하였으며 각각의 straw는 초기설정 온도로 유지된 program freezer (CL863, CryoLogic PL, Australia)에 넣어 다음과 같은 속도로 동결하였다.

1) 실험 1

평형시간에 따라 동결 용해후 생존율을 알아보기 위하여 실시하였다. 각각의 동결액 (EFT, EFS, EPT, EPS)에 넣은 COCs는 동결전 10, 15, 20분의

평형시간후 straw에 loading하여 0°C로 초기 설정된 동결기에 넣어 2분동안 정치하였다. 이후 -6°C까지 -1°C/min의 속도로 냉각하였고 -6°C에서 2분이 지나 seeding을 하였으며, 8분 더 정치한 후 0.3°C/min의 속도로 -35°C까지 동결한 후 액체질소에 넣어 보존하였다.

2) 실험 2

Cooling rate에 따라 동결 용해후 생존율을 알아보기 위하여 실시하였다. 각각의 동결액에 넣은 COCs는 17°C, 0°C -6°C로 냉각된 동결기에 넣어 동결을 실시하였다.

17°C 처리구는 실온(25°C)에서 평형시킨 straw를 17°C로 유지시킨 동결기에 넣어 -6°C까지 -1°C/min의 속도로 냉각하였으며, -6°C에서 2분이 지나 seeding을 하고, 8분 더 정치한 후 0.3°C/min의 속도로 -35°C까지 동결한 후 액체질소에 넣어 보존하였다 (130분). 0°C 처리구는 실온에서 0°C로 초기화된 동결기에 넣어 2분후 -6°C까지 -1°C/min의 속도로 냉각하였고, 이후는 위와 동일하게 하였다 (115분). -6°C 처리구는 -6°C로 초기화된 동결기에 넣어 2분동안 유지한 후 seeding을 하였으며 이후의 동결속도는 위와 같이 하였다 (107분). 최소 1일이 지난후 straw를 꺼내어 공기중에 10초 노출후, 35°C 온수에 10초 동안 용해하였다. 용해된 straw내의 COCs는 직접 25mM HEPES buffer (Gibco BRL)와 10% FBS (Gibco BRL)가 첨가된 TCM199 (Gibco BRL)에 넣어 수분 재흡수를 유도하였다.

4. 생존율 판정

본 실험에서는 적절한 동결액과 동결 조건을 빠르게 찾기 위한 방법으로 형광염색 판정법인 fluorescein diacetate (FDA test)를 trypan blue 방법과 병행하여 실시하였다. 동결 용해한 oocytes의 생존율을 검사하기 위하여 난자는 용해후 약 2 시간 동안 4-well dish (Nunc, Denmark)에서 1 ml의 TCM 199 (with 10 % FBS)로 39°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 배양 후 COCs는 0.5 % hyaluronidase (Sigma Chemical Co., U.S.A.)에 넣어 2분동안 vor-

texting을 하여 난구세포를 제거하였다. 난구세포를 제거한 oocytes는 FDA가 첨가된 TCM199에 넣어 2분 동안 배양한 후 trypan blue 염색액에 5분 동안 넣어 염색하였으며, FDA, trypan blue-free TCM199 배양액에 옮겨 형광 현미경으로 관찰하였다. 형광 현미경은 VFM Epi-fluorescence가 부착된 Nikon Eclipse E800을 사용하였고, filter block은 450~490 nm의 excitation filters와 520 nm의 barrier filter가 장착된 UV light에서 관찰하였다.

형광 현미경에서 밝은 녹색 형광을 나타내며 외관상 세포막이 정상 모양을 나타내는 것을 살아있는 것으로 판정하였으며, trypan blue로 염색이 되고 형광이 없는 oocytes는 죽은 것으로 판정하였다. 일부 oocytes는 아주 미세한 형광을 나타내었지만 원형질막이 일부 변형된 모양을 나타내거나 trypan blue에 염색이 된 것은 죽은 것으로 판정하였다.

5. 체외성숙

동결 용해 oocytes의 체외성숙을 위한 배양액 조성은 10% FBS, 5 µg/ml FSH (Sigma), 10IU hCG (Chorulon, Intervet, Holland), 1 µl/ml estradiol - 17 β(Sigma)가 첨가된 TCM199 (with Earles salts and 25 mM HEPES buffer, Gibco BRL)를 사용하였다.

동결 용해 COCs는 4회 washing 후 1 ml의 배양액이 들어있는 4-well dish에서 24시간 동안 39°C, 5% CO₂ 조건으로 성숙 배양하였다. 동결 용해 COCs의 핵 성숙율을 알아보기 위하여 배양 24시간 후 일부의 난자를 고정하였다. 고정 방법은 난구세포를 제거한 15개의 난자를 slide glass위에 놓아 cover glass로 가볍게 눌러 고정시킨 후 acetic acid 1: methyl alcohol 3의 혼합액에 24시간 탈지 고정하고 1% aceto-orcein으로 5분간 염색하여 acto-glycerol (acetic acid : glycerol : distilled water = 1 : 1 : 3)혼합액을 주입하여 남은 염색액을 씻어냈다. 그리고 cover glass 주위를 manicure로 봉하여 1000배의 현미경하에서 난자의 염색체 및 핵분열상의 변화를 관찰하였다.

6. 체외수정 및 체외배양

동결 한우 정액(축협 중앙회) 2 straws를 37°C

온수에 용해하여 10 mM caffeine이 첨가된 BO액 (Brackett and Oliphant, 1975)에 넣어 700g로 5분 동안 2회 원심분리 하였다. 정자 부유액은 0.5% BSA과 5 mM caffeine이 첨가된 BO 수정액으로 80 g에서 1분 동안 원심분리 하였다. 최종 정자 농도를 1×10^6 sperm/ml로 조정하여 35 mm plastic dish에 100 µl drop을 만들고 mineral oil로 피복하였다. 22~24시간 동안 체외성숙된 난자는 정자 소적당 30개씩 넣어 20시간 동안 39°C, 5 % CO₂ 조건에서 수정하였다.

체외수정후 30개의 난자는 1 ml의 배양액이 들어있는 4-well dish (Nunclon, Denmark)에 넣어 배양하였다. 이 때 소 난관상피세포 (Bovine oviduct epithelial cells, BOEC) monolayer와 같이 공배양하였다. 배지 교환은 48시간마다 1/2씩 신선한 배양액으로 교환하였다. 배양액은 10% FBS, 5 µg/ml FSH (Sigma), 10 IU hCG (Chorulon, Intervet, Holland), 1 µl/ml estradiol-17 (Sigma)가 첨가된 TCM199 (with Earles salts and 25mM HEPES buffer, Gibco BRL)를 사용하였다.

실험 3은 동결 용해 COCs의 적절한 배양 조건을 알아보기 위하여 동결하지 않은 신선 난자를 대조구로 하여 동결 용해 COCs와 체외수정후 배양 조건을 달리 하여 체외발달을 유도하였다. 배양액은 TCM199와 CR1aa와의 비교 배양을 실시하였으며 이때 소 난관상피세포의 monolayer와 공배양을 실시하였다. 수정란 이식은 자연발정 젖소 수란우에 발정 7일째 비외과적으로 이식하였으며, 임신 진단은 이식 60일 후 직장검사에 의해 실시하였다.

7. 통계분석

각각의 동결 용해 난자의 생존율 및 수정란 발달율은 PC-SAS를 이용하여 Duncan's Multiple Range Test를 실시하였고, 유의수준은 0.05%에서 검정하였다.

III. 결 과

1. 평형시간이 미성숙 난자의 동결 용해후 생존율에 미치는 영향 (실험 1)

Table 1. Effects of equilibration time on survival rate of frozen-thawed bovine immature oocytes

Cryoprotectants	Equilibration time	No. of COCs	No. (%) of COCs invsted	
			Survived	Degenerated
EFT	10	61	27 (44.26) ^{edf}	34 (55.74)
	15	64	50 (78.13) ^{ab}	14 (21.88)
	20	78	42 (53.85) ^{cde}	36 (46.16)
EFS	10	56	19 (33.93) ^f	37 (66.07)
	15	64	41 (64.06) ^{bc}	23 (35.94)
	20	58	22 (37.93) ^{ef}	36 (62.07)
EPT	10	61	38 (62.30) ^{cd}	23 (37.70)
	15	59	49 (83.05) ^a	10 (16.95)
	20	73	38 (52.05) ^{cde}	35 (47.95)
EPS	10	60	39 (65.00) ^{bc}	21 (35.00)
	15	75	51 (68.00) ^{abc}	24 (32.00)
	20	75	44 (58.67) ^{cd}	31 (41.33)

^{a,b,c,d,e,f} Values with different superscripts within each column are significantly different (P<0.05).

네가지 동결액 (EFT, EFS, EPT, EPS)을 이용하여 미성숙 소 난자 (GV stage)의 최적 평형 시간을 알아보기 위하여 각각 10, 15, 20분의 평형시간 처리후 동결 용해하였다 (Table 1). 이들의 생존율을 측정하기 위하여 FDA test와 trypan blue 염색하여 형광 현미경으로 판정한 결과 EPT액에서 15분의

평형시간이 가장 좋은 생존율을 나타내었으며 (83.05%), 네가지 동결액 처리 모두에서 15분의 평형 시간이 10분 또는 20분의 평형시간 보다 좋은 것으로 나타났다 (EFT:78.13, EFS:64.06, EPT:83.05, EPS: 68.00%, P<0.05).

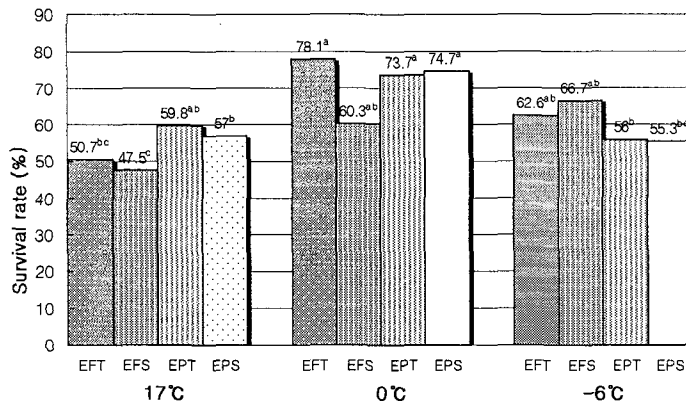


Fig. 1. Effect of different cooling rate of bovine immature oocytes.

^{a,b,c} Values with different superscripts within each column are significantly different (P<0.05).

2. Cooling rate가 미성숙 난자의 동결 융해후 생존율에 미치는 영향 (실험 2)

동결 속도가 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 각각 17°C, 0°C 및 -6°C로 동결 속도를 달리 설정하여 동결 융해를 실시하였다 (Fig. 1). 모두 3반복을 하였으며 처리당 난자수는 각각 95.5 (±20.5)개였다. 융해후 생존율은 대부분 0°C로 시작하는 동결속도에서 가장 좋은 성적을 나타내었다. 즉 EFT, EPT, EPS에서 각각 78.1, 73.7, 74.7%의 생존율을 나타내었으나, EFS 액에서는 20분의 평형시간에서 다소 높은 생존율을 나타내었다 (66.7%). 또한 17°C 처리구와 -6°C 처리구는 차이를 보이지 않았다.

3. 미성숙란 (GV stage)의 동결 융해후 핵 성숙을

동결 융해 난자의 핵 성숙율을 알아보기 위해 EFT액으로 0°C cooling rate를 이용하여 동결 융해한 COCs를 24시간 체외성숙 배양하였다 (Table 2). 융해한 COCs는 난구세포를 제거하고 염색하여 핵 성숙율을 판정하였다. 동결융해 하지 않은 대조구와 동결 융해한 COCs에서 각각 87.2%와 62.3%가 metaphase II로 발달이 이루어졌다.

4. 동결 융해 미성숙란 (GV stage)의 체외수정과 발달

Table 3. The developmental rate of frozen-thawed bovine immature oocytes

Cryoprotectants	No. of COCs	No.(%) of development to	
		2-cell embryos	Blastocysts
EFT	175	57 (32.57) ^{ab}	5 (2.86)
EFS	224	52 (23.21) ^b	8 (3.57)
EPT	224	86 (38.39) ^a	10 (4.46)
EPS	211	45 (21.33) ^b	1 (0.47)

^{a,b} Values with different superscripts within each column are significantly different (P<0.05).

각각의 동결액으로 동결 융해한 미성숙 난자는 24시간 체외성숙후 체외수정을 하여 난분할을 및 배반포 발달율을 알아보았다 (Table 3). 이때의 동결 속도는 0°C cooling rate를 적용 하였다. 난분할율은 EFT, EFS, EPT 그리고 EPS에서 각각 32.57, 23.21, 38.39 그리고 21.33%로 EPT에서 가장 높았으나 유의차는 없었으며, 배반포 발달율에서도 각각 2.86, 3.57, 4.46 그리고 0.47%로서 유의적인 차이를 보이지 않았다.

5. 배양액의 종류에 따른 동결 융해 미성숙란 (GV stage)의 발달율

Table 2. Nuclear development stage after frozen-thawed immature oocytes(GV stage) to metaphase II

Treatment	No. of oocytes assessed	No. of oocytes developed to						Maturation rate(%)
		GV (%)	GVBD (%)	M I (%)	A I (%)	T I (%)	M II (%)	
Control (non-frozen)	86	-	-	10 (11.6)	-	1 (1.2)	75 (87.2)	87.2
Frozen-thawed*	61	-	5 (8.2)	18 (29.5)	-	-	38 (62.3)	62.3

* EFT : 10% EG + 5% F + 0.05M T.

Nuclear status ; GV : germinal vesicle, GVBD : germinal vesicle break down, M I : metaphase- I, A I : anaphase- I, T I : telophase- I, M II : metaphase- II.

Table 4. Effect of culture medium on development of fresh and frozen-thawed immature oocytes

Treatment	Culture medium*	No. of COCs	No(%) of development to	
			2-cell embryos	Blastocysts
Control	TCM199	110	87(79.1)	11(10.0)
	CR _{1aa}	112	86(76.8)	19(17.0)
Frozen-thawed**	TCM199	163	12(7.3)	2(1.2)
	CR _{1aa}	151	8(5.3)	1(0.7)

* Co-culture with BOEC,

** EPT : 10% EG + 5% PVP + 0.05M T.

이상의 결과에서 가장 성적이 좋은 동결액인 EPT액을 이용하여 체외수정후 배양액의 종류가 수정란의 발달에 영향이 있는지를 알아보기 위해 TCM199와 CR_{1aa}의 배양액으로 각각 배양하였으며 소 난관상피세포(BOEC)를 공배양하였다 (Table 4). 동결 용해하지 않은 난자는 CR_{1aa}에서 조금 높은 배반포 발달율을 나타내었으나 유의적인 차이는 없었으며, 동결 용해 난자와 신선란의 체외수정후 배발달율은 차이를 보였으나 배양액의 종류에 따라 난분할율과 배반포 발달율에서는 차이를 보이지 않았다. 미성숙 소 난자의 동결 용해후 얻은 배반포 수정란을 자연발정 Holstein 수란우에 7일째 비외과적으로 이식하였다. 6두에 9개의 수정란을 이식하여 2두가 임신이 확인되었으나 1두는 45일경 유산되었고, 나머지 1두는 장기체태로 분만을 유도하였으나 사산되었다.

IV. 고 찰

최근 Booth 등 (1999)은 성숙 난자를 open pulled straw 방법으로 동결 용해하여 핵이식 후 송아지를 분만하였다고 보고하였다. 난자의 성공적인 동결을 위해서 필요한 동결조건은 여러 가지가 있을 수 있다. 그 중에 몇 가지는 동결액의 조성, 평형시간, 동결속도, 용해 방법과 수분 재흡수 등이다. 특히 동결 속도에서 최근 두드러지게 나타나고 있는

것은 vitrification이다. 그러나 이 방법은 온도 조절이 매우 민감하고 빠르게 이루어져야 하므로 안정적인 성적을 나타내기가 어렵다 (Vajta, 1999). 본 실험에 사용한 동결액은 비교적 농도가 낮으며, 따라서 일정하게 cooling rate를 조절하는 방법으로 동결을 하여야 한다. 또한 본 실험에서는 난구세포층이 많이 둘러싸여 있는 난자를 선택하였기 때문에 평형시간을 선택하는데 있어서 어려움이 있었다. 즉 동결액의 침투가 용이하지 않을 것으로 생각되었기 때문이다. 그러나 본 실험에서 처리한 10, 15, 20분의 평형시간중 15분은 비교적 적절한 평형 시간으로 나타났다 (83.05%). Fuku 등 (1992)은 GV stage의 소 미성숙 난자를 slow freezing 방법과 vitrification 방법으로 동결 용해하였으나 morulae 또는 blastocysts로 발달한 수정란은 없었다고 보고하였다. Mogas 등(1999)은 GV stage의 bovine oocytes를 EGTA로 전처리한 후 완만 동결 용해하여 2.9%의 배반포 발달 성적을 얻어서 본 실험의 결과와 배반포 발달율이 유사하였다. Suzuki 등 (1996)은 또한 GV stage의 소 미성숙 난자의 동결 용해후 20%까지 높은 배반포 발달율을 얻었으며, 이식후 송아지를 생산하였다.

본 실험에서 동결 용해 난자의 62.3%가 metaphase II 성숙율을 보였다. 그러나 IVF후 난분할율은 38.39% (EPT) 이하로 나타났으며 이들의 배반포 발달율은 4.46%를 나타냈다. Lim 등(1992)은 미성숙 소 난자의 완만 동결 용해후 난할율과 8-cell 이상 발달율이 각각 12.5, 2.1%로 나타났다고 보고하여 미성숙 난자는 동결 용해후 수정란으로 발달이 어려움을 나타내 주고 있다.

본 실험에서는 적절한 동결액과 동결 조건을 빠르게 찾기 위한 방법으로 형광염색 판정법인 fluorescein diacetate (FDA) 방법과 trypan blue 방법을 병행하여 실시하였다. 난자의 FDA 방법을 이용하였을 때 객관적인 판단의 오류를 줄이기 위하여 trypan blue 방법을 병행하여 실시하였는데, 형광염색이 된 난자는 trypan blue에 염색이 되지 않음을 뚜렷이 구분할 수 있었다. 그리고 또한 trypan blue에 염색이 된 난자는 형광을 나타내지 않음을 알 수 있었다.

일반적으로 포유동물의 oocytes는 저온저장 조건에서 meiotic spindle depolymerization을 일으켜 염색체의 소실이나 aneuploidy를 일으키는 것으로 알려져 있다. 이것은 mouse (Parkering, and Johnson 1987), human (Parkering 등 1990) 그리고 bovine (Parks and Ruffing, 1992)에서 일반적으로 나타나는 현상이다. 이러한 포유동물 난자의 저온 민감성에도 불구하고 대부분의 연구자들은 빠른 동결방법보다는 slow freezing 방법을 택하고 있다 (Carroll 등, 1990; Vincent 등 1990; Wood 등, 1992). 비록 상업적으로 중요한 가축이나 멸종위기의 동물에서 난자의 동결 보존은 매우 중요한 부분이라고 할 수 있으나 현재까지 이렇다 할 동결 기술이 확립되어 있지 않으므로 이 부분에 대한 연구는 더 많이 필요하다.

V. 요약

소 미성숙 난자 (GV stage)의 동결에 중요한 영향을 미치는 평형시간과 동결속도가 융해후 생존율 및 배발달율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 미성숙 난자의 동결 융해후 체외성숙, 체외수정 및 배반포 발달 능력을 알아보았다.

본 실험에 사용한 동결액의 조성은 침투성 보호제(Ethylene glycol, EG)와 비침투성 보호제(Ficoll ; F, polyvinylpyrrolidone; PVP, Sucrose; S, Trehalose ; T)를 혼합하여 네가지 조성의 동결액을 준비하였다. 즉 EFT : 10% EG + 5% F + 0.05M T, EFS : 10% EG + 5% F + 0.05M S, EPT : 10% EG + 5% P + 0.05M T, EPS : 10% EG + 5% P + 0.05M S이다. 네가지 동결액 (EFT, EFS, EPT, EPS)을 이용하여 미성숙 소 난자 (GV stage)의 최적 평형 시간을 알아보기 위하여 각각 10, 15, 20분의 평형후 동결 융해하였다 (실험 1). EPT액에서 15분의 평형시간이 가장 좋은 생존율을 나타내었다 (83.05%). 동결 속도가 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 각각 17°C, 0°C 및 -6°C로 동결 속도를 달리 설정하여 동결 융해를 실시하였다 (실험 2). 융해 후 생존율은 대부분 0°C로 시작하는 동결속도에서 가장 좋은 성적을 나타내었다. 즉 EFT, EPT, EPS

에서 각각 78.1, 73.7, 74.7%의 생존율을 나타내었다. 동결융해 하지 않은 신선란과 동결 융해한 미성숙 난자의 핵 성숙율은 각각 87.2%와 62.3%가 metaphase II로 발달하였다. 동결 융해 미성숙 난자의 IVM, IVF후 난분할율은 EFT, EFS, EPT 그리고 EPS에서 각각 32.57, 23.21, 38.39 그리고 21.33%로 EPT에서 가장 높았으나 유의차는 없었다. 배반포 발달율도 각각 2.86, 3.57, 4.46 그리고 0.47%로서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 동결 융해 미성숙 난자의 IVM, IVF후 TCM199와 CR-1aa 배양액을 이용하여 소 난관상피세포(BOEC)와 공배양 한 결과 배양액의 종류에 따라 난분할율과 배반포 발달율에서는 차이를 보이지 않았다. 또한 미성숙 소 난자의 동결 융해후 얻은 배반포 수정란을 자연발정 Holstein 수란우에 7일째 비외과적으로 이식하였다. 6두에 9개의 수정란을 이식하여 2두가 임신이 확인되었으나 1두는 45일경 유산되었고, 나머지 1두는 장기재태로 분만을 유도하였으나 사산되었다.

VI. 인용문헌

1. Andre, T. P. and Reuben, J. M. 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes : recent advances. *Biotechnology Advances*, Vol. 14, 2:127-149.
2. Al-Hasani, S., Tolksdorf, A., Diedrich, K., van der Van and Krebs, D. 1986. Successful *in vitro* fertilization of frozen-thawed rabbit oocytes. *Human Reprod.*, 1:309-312.
3. Booth, P. J., Vajta, G., Hoj. A., Holm. P., Jacobsen. H., Greve, T. and Callesen, H. 1999. Full-term development of nuclear transfer calves produced from open-pulled straw (OPS) vitrified cytoplasts: work in progress. *Theriogenology*, 51:999-1006.
4. Carroll, J., Wood, M. J. and Whittingham, D. G. 1990. Normal fertilization and development of frozen-thawed mouse oocytes. Protective action of certain macromolecules. *J. Reprod.*

- Fertil., 90:547-553.
5. Chen, C. 1986. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet*, 19:884-886.
 6. Fuku, E., Kojima, T., Shioya, Y., Marcus, G. J. and Downey, B. R. 1992. *In vitro* fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. *Cryobiology*, 29:485-492.
 7. Glass, K. W. and Voelkel, S. A. 1990. Loss in viability of frozen bovine oocytes associated with specific steps in the cryopreservation process. *Biol. Reprod.*, 42:52.
 8. Hamano, S., Koikeda, A., Kuwayama, M. and Nagai, T. 1992. Full-term development of *in vitro* matured, vitrified and fertilized bovine oocytes. *Theriogenology*, 38:1085-1090.
 9. Im, K. S., Kang, J. K. and Kim, H. S. 1997. Effects of cumulus cells, different cryoprotectants, various maturation stages and preincubation before insemination on developmental capacity of frozen-thawed bovine oocytes. *Theriogenology*, 47:881-891.
 10. Kola, I., Kirby, C., Shaw, A. and Trounson, A. 1988. Vitrification of mouse oocytes results in aneuploid zygotes and malformed fetuses. *Teratology*, 38:467-474.
 11. Lim, J. M., Fukui, Y. and Ono, H. 1991. The post-thaw developmental potential of frozen thawed bovine oocytes following *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology*, 35:1225-1235.
 12. Lim, J. M., Fukui, Y. and Ono, H. 1992. Development competence of bovine oocytes frozen at various maturation stages followed by *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology*, 37:351-361.
 13. Mogas, T., Keskinetepe, L., Younis, A. I. and Brackett, B. G. 1999. Effects of EGTA and slow freezing of bovine oocytes on post-thaw development *in vitro*. *Mol. Reprod. & Dev.*, 52:86-98.
 14. Otoi, T., Tachikawa, 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.
 15. Parkering, S. J. and Johnson, M. H. 1987. The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum. Reprod.*, 2:207-216.
 16. Parkering, S. J., Braude, P. R., Johnson, M. H., Cant, A. and Currie, J. 1990. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fert. Steril.*, 1990. 54:102-108
 17. Parkening, T. A. and Chang, M. C. 1977. Effects of cooling rates and maturity of the animal on the recovery and fertilization of frozen-thawed rodent eggs. *Biol. Reprod.*, 17:527-531.
 18. Parks, J. E. and Ruffing, N. A. 1992. Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes. *Theriogenology*, 37, 59-73.
 19. Rayos, A. A., Takahashi, Y., Hishinuma, M. and Kanagawa, H. 1994. Quick freezing of unfertilized mouse oocytes using ethylene glycol with sucrose or trehalose. *J. of Reprod. Fert.*, 100:123-129.
 20. Schellander, K., Brackett, B. G., Fuhrer, F. and Schleger, W. 1988. *In vitro* fertilization of frozen thawed cattle oocytes. *Proc. 11th Int. Congr. Anim Reprod.*, A.I. 3:349.
 21. Suzuki, T., Boediono, A., Takagi, M., Saha, S. and Sumantri, C. 1996. Fertilization and development of frozen-thawed germinal vesicle bovine oocytes by a one-step dilution methods *in vitro*. *Cryobiology*, 33:515-524.
 22. Vajta, G., Kuwayama, M., Booth, P. J., Holm P., Greve, T. and Callesen, H. 1999. OPen pulled straw (OPS) vitrification of cattle oocytes,

- Theriogenology, 51(1):176 (abstr.)
23. Vincent, C., Pickering, S. J. and Johnson, M. H. 1990. The hardening effect DMSO on the mouse zona pellucida requires the presence of an oocyte and is associated with a reduction in the number of cortical granules. J. Reprod. Fert., 89:253-259.
24. Wood, M. J., Whittingham, D. G. and Lee, H. O. 1992. Fertilization failure of frozen mouse oocytes is not due to premature cortical granule release. Biol. Reprod., 46:1187-1195.
25. Whittingham, D. G. 1977. Fertilization *in vitro* and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196°C . J. Reprod. Fert., 49:89-94.
- (접수일자 : 2001. 1. 26. / 채택일자 : 2001. 2. 23.)