

소 체외수정란의 Slow Freezing을 위해서 Ethylene Glycol 동결보호제에 Sucrose 첨가농도에 의한 동결효율

조상래 · 김현종 · 최창용 · 진현주 · 손동수 · 최선호

농촌진흥청 축산연구소

Effect of Sucrose Concentration on Survival After Frozen-thawed of Bovine IVF Blastocysts in Ethylene Glycol Based Freezing Medium for Slow-Cooling

S. R. Cho, H. J. Kim, C. Y. Choe, H. J. Jin, D. S. Son and S. H. Choi
National Livestock Reserch Institute, RDA

ABSTRACT

The present study was undertaken to investigate the post-thawed survivability of bovine embryo depending on different dose of ethylene glycol and sucrose. Ovaries were collected at local slaughterhouse and the cumulus-oocyte-complexes aspirated from ovaries were *in vitro* matured, fertilized and cultured at 39°C in an atmosphere of 5% CO₂ incubator. For conventional slow-freezing, d 7 or 8 expanded blastocysts were collected. Embryos were equilibrated in 1.5 M and 1.8 M ethylene glycol(EG) with 0.1 M and 0.3 M sucrose in Dulbecco's phosphate-buffered saline(D-PBS) supplemented with 0.5% bovine serum albumin. Embryos were then loaded individually into 0.25 ml-straw and placed directly into cooling chamber of programmable freezer precooled to -7°C, after 2 min, the straw was seeded, maintained at -7°C for 8 min, and then cooled to -35°C at 0.3°C/min, plunged and stored in liquid nitrogen for at least 3 days. For thawing, the straw containing embryos were warmed in air for 10 sec and exposed to 37°C water for 20 sec. Straws were then removed from 37°C water. Rates of blastocyst survive and hatching were evaluated at 24 to 72 h post-warming. No difference of the survivability was shown between 1.5 M and 1.8 M EG (71 and 70%, respectively). Addition of 0.1 M sucrose to 1.5 M and 1.8 M ethylene glycol in the freezing solution did not differ significantly embryo survival (74 and 77%, respectively), whereas survival rates was higher(89%) in freezing solution contained 0.3M sucrose to 1.8M EG compared with 0.3M sucrose to 1.5 M EG group(71%). However, there was no difference in the overall total cell number between the two groups (122 ± 1.8 vs 131 ± 1.4, respectively). In conclusion, the results suggest that 0.3 M sucrose in 1.8 M EG may be optimal condition for freezing and thawing methods with *in vitro* produced embryos and may be applied to on-farm conditions for embryo transfer.

(Key words : Bovine, *In vitro*, Slow-freezing, Ethylene glycol, Sucrose)

I. 서 론

정란을 이용한 동결보존 방법은 실험실내에서 뿐만 아니라 직접현장에서도 다양한 연구들이 소 수정란이식기술의 다양한 영역 중에서 수

지속적으로 수행되어오고 있으며 또한 상업적

Corresponding author : S. H Choi, Animal Genetic Resources Station, National Livestock Research Institute, R.D.A. Jeonbuk, 590-832, Korea.
Tel : 036-620-3520, Fax : 063-620-3593, E-mail : sunho@rda.go.kr

이용이 기본적인 연구도대위에서 지속적으로 수행되어 오고 있다(Hasler, 2002). 이러한 수정란의 저장은 수정란의 활력을 정지시켜 짧은 기간 또는 장기간 지속적으로 보관 후에 수정란이 정상적인 발달로 회복하는데 중요한 목적이 있다.

소 수정란을 동결보존한 후 융해 하였을 때 수정란의 생존성에 영향을 미치는 요인으로서 많은 연구자들에 의해서 보고되어 왔다. 즉, 수정란의 생산 일령과 발달단계 그리고 소 수정란 동결을 위한 동결보호동결보호제의 종류 등과 관련이 있다. 그리고 수정란 동결을 위한 동결 보호제로는 종류로서는 세포내·외 침투성 및 비침투성의 보호제를 사용하게 되는데 소에 있어서는 주로 침투성 동결 보호제를 사용하게 된다 [(Hasler 등, 1995; Carvalho 등, 1995)]. 세포내에 침투하는 동결보호제로서는 분자량과 독성이 적고 세포내에 침투성이 강한 ethylene glycol의 동결보호제를 가장 많이 소 수정란 동결에 사용되고 있다 [(Rall 등, 1992; Wurth 등, 1994; Sommerfield 등, 1999; Massip, 2001)]. ethylene glycol를 비롯한 침투성 동결 보호제들의 특성으로서는 소 수정란내로 침투하는 성질이 동물 종간의 차이가 있는 것으로 알려져 있으나, 이와 비슷한 동결보호제로 사용되고 있는 DMSO와 glycerol 보다는 현재 많이 사용되고 있다. 한편 동결 보호제 glycerol은 수정란의 발달 단계에 따라서 즉, compact morulae 와 blastocysts 단계의 수정란 동결에서 우수한 생존율을 나타내고 있다고 보고 하였다(Niemann, 1991). Yokohama 등(1994)의 보고에 의하면 EG는 DMSO 보다는 수정란의 세포막을 천천히 침투하는 특성을 지니기 때문에 이 두 종류의 동결 보호제 간에는 침투계수가 다르기 때문에 동결보호제의 침투정도도 각각의 요인에 따라서 즉, 세포의 침투계수, 세포내·외의 동결보호제, 농도변화, 온도 그리고 세포의 표면적에 따라서 수정란의 생존성이 좌우되기도 한다고 보고하였다. 그러나 일반적으로 Ethylene Glycol은 수정란이식 시 별도의 동결 보호제의 희석에 따른 융해 과정을 반복적으로 거치지 않고

수정란이 장착된 스트로우를 융해 후 직접이식하는 방법으로 주로 사용되는 동결 보호제이다. 이러한 직접이식의 장점으로서 융해과정이 별도의 과정이 필요치 않아 간단하며 그리고 기술적인 실수를 줄일 수 있는 점을 가지고 있다는 것이다(Suzuki 등, 1990). 이러한 직접이식 방법에서 성공적인 수정란이식을 위해서는 수정란의 삼투압의 영향으로 인한 세포의 손상을 막는 것이 중요한 사항이다.

일반적으로 삼투압의 손상을 줄이기 위해서는 세포막의 투과성이 높은 물질들은 대체로 분자량이 적기 때문에 단시간 내에 세포내로 침투하여 세포내·외의 농도 차이를 줄임으로서 수정란에 미치는 삼투압의 손상을 최소화하게 된다. 그래서 이러한 삼투압의 손상을 최대한 줄이는 방법으로서 glycerol 또는 propylene glycol 보다는 침투성이 더 높은 ethylene glycol을 사용하여 소의 자궁에다 직접이식하게 된다 (Szell 등, 1989). 그리고 이외에 동결 보호제로서 사용되는 것은 당류인 sucrose 와 단백질류, 그리고 PVP(polyvinyl pyrrolidone) 등이 사용된다. 이러한 물질들은 고분자화합물이면서 비침투성의 특성을 지니기 때문에 단독 또는 다른 동결 보호제와 병행하여 소 수정란의 동결 보존에 사용하고 있다. 그리고 고분자 화합물들은 주로 수정란의 발달단계에 따른 동결보존에 이용되고 있다. 그리고 Leibo 와 Mapletoft(1998)는 ethylene glycol에 당류들을 병행하여 수정란의 생존성을 보고하기도 하였다. Sucrose는 주로 동결시 동결 보호제에 노출되는 순간 삼투압의 영향을 많이 받기 때문에 이러한 삼투압의 손상을 줄이기 위한 완충제로서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 소의 체내·외 수정란에 주로 사용되는 동결보호제 Ethylene Glycol 과 sucrose 농도를 병행 사용하였을 때 소 체외 수정란의 동결·융해 후 생존성을 조사하여 소 수정란의 동결 보존 후 직접이식 및 우수한 형질을 지닌 개체의 수정란 보존을 위한 기초 조사를 얻기 위해서 본 실험을 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 체외성숙

한우 도축 암소로부터 적출된 난소를 회수하여 실험실로 운반하여 실험에 공시하였다. 본 실험의 조건에 맞춘 난소 수송온도는 0.9% 생리식염수의 온도를 25°C 이상의 조건으로 맞추어 보온병에 담아 실험실로 2시간 이내로 운반하였다. 직경이 2~6 mm의 난포로부터 난포란을 난포액과 함께 19 gauge 주사침이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 흡입방법으로 난모세포를 채취하였으며, 체외성숙을 위한 난모세포는 1.2 등급(IETS 기준)만을 사용하였다. 체외성숙은 TCM199(Sigma, U.S.A)를 기본배양액으로 5% FBS(Gibco, U.S.A), 10 µg/ml LH(Sigma, U.S.A) 및 35 µg/ml FSH(Sigma, U.S.A)를 첨가하여 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 22시간 동안 실시하였다.

2. 체외수정

체외수정에 사용된 정액은 한우동결정액을 (KPN) 이용하였으며, 정자분리는 BO medium을 이용하여 1,800 rpm에서 5분 동안 2회 원심분리 후 체외수정용 배양액에서 1회 원심 분리하여 체외수정에 사용하였다. 사용된 정액의 최종농도는 2 × 10⁶/ml 이었다. 체외성숙된 난포란의 난구세포 일부를 제거하기 위해서 0.1% PVA (Polyvinyl Alcohol)가 첨가된 D-PBS (Sigma) 배양액에서 약 10초간 vortexing 후 수정 배양액인 50 µl IVF 100 (IFP, Japan) 미소적에 약 20개의 체외성숙된 난포란과 정자를 공동 배양하여 수정을 유도하였다.

3. 체외배양 및 세포수 조사

체외배양에 사용된 수정란은 체외수정 후 무혈청 배양액인 IVMD(IFP, Japan) 와 TCM 199 배양액에 5% FBS를 첨가하여 난구세포와 공배양을 실시하였다. 체외수정 후 48 시간에 분할

율을 확인하였으며, 72(3일)시간과 120(5일)시간에 신선한 배양액으로 배양액 교환을 하였으며 배반포기배의 확인은 수정 후 7일과 8일째 실시하였다. 그리고 세포수 확인은 Hoechst 33342 용액으로 염색하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

4. 수정란의 동결보존

수정란 동결을 위한 동결 보호제로서는 1.8 M 및 1.5 M ethylene glycol(EG), 그리고 평형 배양액은 D-PBS(Sigma, U.S.A) 배양액에 0.5% bovine serum albumin (BSA, Sigma, U.S.A))을 첨가하여 사용하였다. 그리고 수정란의 장착을 위해서 1.8 M 과 1.5 M EG에 0.1 M과 0.3 M sucrose가 혼합된 동결보호제에 수정란을 침지시켜 실온에서 약 15 분간 평형을 시킨다. 그리고 0.25 ml 수정란이식용 플라스틱 스트로우 내에 수정란을 장착하였다. 수정란의 동결은 autocomputer programmable 동결기(CL 863, U.S.A)를 사용하여 실시하였다. 스트로우를 동결기의 chamber에 넣고 3분간 정지(-7°C, 10분)한 후 seeding을 실시하고, 최종 동결 온도인 -35°C까지 도달하기 위해서 1 분에 0.3°C 속도로 온도를 하강시킨 후 액체질소에 침지를 한다. 그리고 스트로우를 canister에 담아 액체질소에 보관한다. 동결된 수정란의 생존성을 확인하기 위하여 스트로우를 보관고에서 꺼내어 공기 중에 약 10초간 노출 시킨 후 37°C로 가온된 온수에서 약 20초간 용해 하여 체외배양액으로 옮겨 48시간과 72시간 동안 배양을 실시하여 수정란의 재확장 및 부화여부로 생존성을 판단하였다.

5. 통계처리

실험결과의 통계분석은 SAS package (version 6,12)를 이용하여 실시하였으며, GLM (General Linear Model) procedure를 사용하여 각 요인의 Least square means를 구하여 요인간의 유의성을 검정하였다. $P < 0.05$ 일 때 각 군간의 유의성을

인정하였다.

III. 결과 및 고찰

동결·융해된 소 수정란에 대한 민감성은 동결보호제의 희석 사용의 방법에 따라서 많은 영향을 받는 것으로 잘 알려져 있다(Schneider and Mazur, 1984). Sucrose는 세포내에 침투하는 동결보호제와 희석하였을 때 삼투압 충격을 막음과 동시에 삼투압 충격으로부터 오는 손상을 감소시켜주는 역할을 한다고 보고하였다(Suzuki 등, 1990). 따라서 본 연구에서는 1.5 M과 1.8 M EG의 동결보호제에 sucrose의 첨가 농도에 따라서 동결·융해 후의 생존성의 결과를 조사하였다. 결과를 살펴보면 다음과 같다. Table 1은 동결보호제 1.5 M EG(Group 1)와 1.8 M EG(Group 2)에서 체외에서 생산된 소 수정란(수정후 7, 8일째)을 실험에 공시하였다. Table 1의 결과평가는 배반포기배의 수정란을 동결·융해 후 24시간 이상 배양하였을 때 수정란을 형태적으로 재확장과 그리고 72시간 까지 배양하여 부화되는 수정란을 생존한 것으로 판단하였다. Group 1은 45개의 동결수정란의 생존율을 평가하였을 때 재확장과 부화된 비율은 71.1%, 그리고 Group 2에서는 70.2%의 결과를 보였다. Group 1에서 상대적으로 높은 결과를 나타내었으나 두 처리 그룹간의 유의성은 나타나지 않았다. 마찬가지로 총 세포수 조사에서도 두 그룹에서 평균 126개 수준의 세포수를 나타내었

으나 유의성 있는 결과를 보이지 않았다. 그러나 본 연구의 결과에는 표시하지 않았으나 수정란의 형태적인 변화에 있어서는 1.8 M의 동결보호제 그룹에서 동결·융해 후 정상적으로 수정란의 형태를 가진 것이 훨씬 높게 나타난 것을 볼 수 있었다. Hasler 등(1997)은 1.5 M EG에서 동결된 수정란을 융해 하였을 때 24시간째 생존율을 74.8%를 보고하였는데 이러한 결과는 본 실험의 Group 1의 71.1%와 비슷한 결과를 나타내었다. 그리고 Voelkel과 Hu (1992, A)는 1.5 M EG를 이용하여 체외수정란의 동결·융해 후 생존성을 조사하였다. 융해 후 48시간째 생존율에서는 1.5 M의 EG는 약 69%의 생존율을, 그리고 2.0 M의 EG에서는 48%의 결과를 보고하였다. 2.0 M의 EG에서 동결·융해 후의 생존율이 낮게 나타난 원인을 융해된 수정란이 직접 재수화 되었을 때 수정란에 삼투압의 영향이 더 크게 나타난 것으로 보고하였으며, Dochi 등(1995)은 1.8 M EG로 동결·융해 했을 때 생존율은 78.6%로서 본 연구의 결과와 비슷한 결과를 보고하였다. 그리고 1.8 M EG에서 동결된 수정란을 이식하여 19 마리의 산자 생산을 보고하여 1.8 M EG 동결 보호제가 우수하였다고 보고하였다. 따라서 본 실험의 연구 결과에서도 1.5 M EG 보다 1.8 M EG에서 동결·융해 하였을 때가 총 세포수에서 다소 높은 경향을 보여 임신율에도 영향을 미칠 수 있을 것으로 보인다. 따라서 체외수정란을 직접이식을 위해서 1.8 M EG를 이용하는 것이

Table 1. Survivability of frozen-thawed blastocysts produced *in vitro* according to concentration of ethylene glycol

Treatment*	No. of blastocysts	No. (%) of	
		Re-expanded and hatched blastocysts	Total cell number (Mean ± S.D)
Group 1	45	32(71.1)	127 ± 1.3
Group 2	47	33(70.2)	124 ± 1.6

*Group1 : 1.5 M EG + 0.5% BSA, Group 2 : 1.8 M EG + 0.5% BSA
Replicates 4

보다 효과적일 것으로 사료된다.

Table 2는 1.5 M과 1.8 M ethylene glycol 동결보호제에 0.1 M의 sucrose를 첨가하여 소체의 수정란을 동결 보존 후 융해 하였을 때의 결과를 나타낸 것이다. Group 1에서는 53개, Group 2에서는 52개의 배반포기배를 사용하여 동결 융해 하였을 때 수정란의 재확장 및 부화되기까지의 결과는 73.6%를 나타냈으며 Group 2에 있어서는 76.9%의 결과를 나타내었다 하지만 두 그룹 간에는 유의적인 차이를 보이지 않았으며 총세포수 조사에 있어서도 Group 1에서 118개, Group 2에서는 112개 수준으로 생존율의 결과와 마찬가지로 유의적인 차이를 나타내지 못했다. 그러나 Table 1의 결과와 비교하면 sucrose 첨가를 하였을 때가 다소 높은 수정란의 생존율을 확인할 수 있었으며 EG의 농도에서도 1.8 M의 농도에 0.1 M sucrose 첨가 그룹에서 다소 높은 생존율을 보여 동결보호제에 sucrose를 첨가 하였을 때가 더 효과적인 것으로 보여진다. 그러나 이와는 상반되게 총세포수에 있어서는 sucrose 첨가 그룹에서 다소 낮은 결과를 나타내기도 했으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

일반적으로 sucrose는 비침투성 동결보호제로 사용되며 삼투압의 활성물질로서 수정란으로부터 동결 보호제를 제거하기 위하여 동결 보호제내에 첨가하여 사용한다(Leibo 등, 1978). 수정란을 융해 한 후 다른 희석 과정 없이 직접 수란우에 이식할 경우에 주로 EG 동결 보호제를 사용하게 되는데 sucrose는 동결 스트로우

내에 column을 만든 후 동결을 실시한 다음 융해 후에 동결 보호제와 혼합되게 만드는 방법과 EG와 sucrose를 함께 혼합하여 사용하는 방법이 주로 이용되는데 동결보호제와 혼합하여 사용하는 방법을 실시 할 경우는 수정란이 동결보호제내에서 부유 하는 특성이 있기 때문에 수란우에 직접 이식하는 것이 가능하다는 보고를 하였다(Massip 등, 1984). 그리고 Voelkel 와 Hu (1992B)에 의하면 sucrose를 동결보호제와 희석했을 때 삼투압 완충제로서의 역할과 낮은 침투성의 특성으로 인하여 수정란을 보정하는 역할을 하므로 수정란 동결에 효과적이라고 보고 하였다.

Table 3의 결과는 1.5 M과 1.8 M EG 동결보호제에 0.3 M sucrose를 첨가하여 동결·융해했을 때 수정란의 생존율의 결과를 나타낸 것이다. Table 3에서 사용된 수정란의 수는 총 101개의 소의 배반포기배 수정란을 동결실험에 공시하였다. Group 1에서는 1.5 M EG에 0.3 M sucrose를 첨가하여 동결·융해 후 생존성의 결과는 70.8%, 그리고 Group 2에서는 1.8 M EG에 0.3 M sucrose를 첨가한 후 동결융해 후 생존성의 결과는 88.7%의 결과를 보여 Group 1보다 Group 2에서 유의적으로(P<0.05) 높은 생존성을 보였다. 총세포수에 있어서는 각각 122개와 131개 수준으로서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나 Group 2에서 보다 높은 세포 수를 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 볼 때 0.3 M sucrose 첨가를 하는 것이 수정란의 생존성과 발달율에도 효과적인 것으로 보인다.

Table 2. Effect of 0.1 M sucrose addition in 1.5 M and 1.8 M ethylene glycol medium for embryo freezing

Treatment*	No. of blastocysts	No. (%) of	
		Re-expanded and hatched blastocysts	Total cell number (Mean ± S.D)
Group 1	53	39(73.6)	118 ± 1.2
Group 2	52	40(76.9)	112 ± 1.2

*Group 1: 1.5 M EG + 0.5% BSA + 0.1M sucrose; Group 2 : 1.8 M EG + 0.5% BSA+0.1M sucrose
Replicates 5

Table 3. Effect of 0.3 M sucrose addition in 1.5 M and 1.8 M ethylene glycol medium for embryo freezing

Treatment*	No. of blastocysts	No. (%) of	Total cell number (Mean ± S.D)
		Re-expanded and hatched blastocysts	
Group 1	48	34(70.8) ^a	122 ± 1.8
Group 2	53	47(88.7) ^b	131 ± 1.4

*Group1 : 1.5 M EG + 0.5% BSA + 0.3 M sucrose ; Group 2 : 1.8 M EG + 0.5% BSA + 0.3 M sucrose,

^{a,b} Values with different superscripts in the same column are significantly different (p<0.05).

Replicates 5

Hasler 등(1997)은 본 실험과 비슷한 1.5 M EG 에 0.25 M sucrose를 첨가하여 동결 용해 하였을 때 생존율은 65.1% 그리고 EG 단독 처리구에서는 62.9%의 결과를 보고하였다. 본 연구 결과에서는 1.5 M EG에 0.3 M sucrose를 첨가 하였을 때 70.3% 결과를 얻었는데 사용된 sucrose 농도 차이는 있으나, 0.3 M sucrose 첨가가 생존율 향상에 기여한 것으로 추측할 수 있었다. Martinez와 Matkovic (1997)은 1.5 M EG에 Ficoll과 0.3 M sucrose를 혼합하여 양 (Sheep)의 수정란을 동결 보존 후 생존성의 결과를 60% 로 보고하였으나, 소와는 다른 측면 이 있다. 그리고, Dochi 등(1995)은 1.8 M EG에 0.25 M sucrose를 첨가하여 소 수정란을 동결 후 용해 하였을 때 42.9%의 생존율의 결과를 얻었으며, 여기서 12마리의 산자를 생산하였다고 보고하였다. 이러한 결과를 얻을 수 있었던 것은 0.25 M sucrose를 EG에 첨가하여 사용한 방법의 장점을 동결·용해 후 동결 보호제와 희석 과정 없이 수란우에 직접 이식하는데 효과적이라는 것을 보고하였다. 그러나 이와는 상반되게 임신율에 있어서는 Nibart와 Humblot (1997)는 EG와 sucrose 그리고 glycerol을 혼합하여 동결 후 이식하였을 때 임신율이 48.5% 이었으나, EG 단독으로 사용했을 때는 50.5%의 결과를 보고하여 EG 단독 처리구가 sucrose와 glycerol 혼합 처리구 보다는 EG 만을 사용하였을 때 동결에 더 효과적이라고 보고하였다.

이와 비슷하게 Ponsart 등(2000)도 EG 단독 처리구에서 55.4% 그리고 glycerol 과 sucrose 혼합처리구는 47.2%의 임신율을 보여 EG 단독 처리구가 높은 임신율의 결과를 보고하였다. 그러나 본 실험의 결과에서의 수정란의 생존율의 경우에 있어서는 Table 2와 Table 3의 결과를 살펴볼 때 EG 동결 보호제에 0.1 M 과 0.3 M의 sucrose 첨가 효과를 조사한 결과 1.5 M EG 처리구 보다는 1.8 M EG에 0.3 M sucrose 첨가군에서 유의적으로(P<0.05) 높은 생존성의 결과를 보여 동결에 의한 수정란의 손상을 줄일 수 있었던 것으로 보여진다. 따라서 이상의 결과를 미루어 볼 때 1.8 M EG에 0.3 M sucrose를 첨가하여 수정란을 동결하는 방법이 동결로부터 오는 손상을 막을 수 있어 생존성 향상에 기여할 것으로 보여지나 더 많은 조사가 필요할 것으로 보이며, 또한 수정란이식을 할 경우에도 수태율 향상에도 더 효과적으로 작용할 것으로 사료된다.

IV. 요 약

본 연구에서는 동결 보호제 EG 1에 sucrose 첨가 농도에 따른 생존성의 실험의 결과를 요약하면 다음과 같다. 1.5 M EG와 1.8 M EG 만을 이용하여 동결·용해 후 생존성의 조사한 결과 71.1%와 70.2%로 각각 나타났다. 총세포수에 있어서도 127 ± 1.3개와 124 ± 1.6개로 생존

율과 총세포수에 있어서도 두 그룹간에는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 1.5 M EG와 1.8 M EG에 0.1 M sucrose를 각각 첨가한 후 동결 보존하여 용해 하였을 때 생존율과 총세포수 조사 결과는 1.5 M EG에 0.1 M sucrose 처리구가 73.6% 그리고 1.8 M EG 에 0.1 M sucrose 첨가군은 76.9%의 결과를 보였으며 총세포수에 있어서도 118 ± 1.2 와 112 ± 1.2 개의 결과를 보여 생존성과 총세포수에 있어서도 두 처리군 모두 유의적인 차이를 나타내지 않았으나 1.5 M EG 처리구에서 총세포수는 다소 높은 경향을 보였다. 1.5 M EG 와 1.8 M EG에 0.3 M sucrose를 첨가하여 각각 생존성과 총세포수 조사 결과는 70.8%와 88.7%의 생존율을 나타내어 1.8 M EG 에 0.3 M sucrose 처리구가 유의적으로($P < 0.05$) 높은 결과를 보였다. 따라서 소 체외 수정란을 conventional slow-freezing 방법으로 동결 보존할 경우는 1.8 M EG 동결보호제에 0.3 M sucrose를 병행하여 사용하는 방법이 수정란을 최상의 상태로 유지할 수가 있어 수정란이식에 적용할 경우 효과적일 것으로 사료된다.

V. 인 용 문 헌

- Carvalho, R. V., Del Campo, M. R., Plante, Y and Mapletoft, R. J. 1995. Effects of stage of development on sex ratio and survival after freezing of day 7 bovine IVF embryos. *Theriogenology* 43:875.
- Dochi, O., Imai, K. and Takakura, H. 1995. Birth of calves after direct transfer of thawed bovine embryos stored in ethylene glycol. *Anim Reprod Sci.* 38:179-185.
- Hasler, J. F., Henderson, W. B., Hurtgen, P. J., Jin, Z.Q., McCauley, A. D., Mower, S. A., Neely, B., Shuey, L.S., Stokes, J. E. and Trimmer, S. A. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryo and subsequent calving results. *Theriogenology* 43:141-152.
- Hasler, J. F., Hurtge, P. J., Jin, Z. Q. and Stokes, J. E. 1997. Survival of IVF-derived bovine embryos frozen in glycerol or ethylene glycol. *Theriogenology.* 48:563-579.
- Hasler, J. F. 2002. The freezing, thawing and transfer of cattle embryo. In: *Factors Affecting Calf Crop: Biotechnology of Reproduction*, CRC Press, Boca Ration, 119-130.
- Leibo, S. P. and Mazur, P. 1978. Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. In: Daniel, J.C.(ed) *Methods in mammalian Reproduction*. Academic Press, Inc., New York, 179-201.
- Leibo, S. P. and Mapletoft, R. J. 1998. Direct transfer of cryopreserved cattle embryo in North America. In: *Proceedings 17th annual Convention of the American Embryo Transfer Association*, San Antonio, Texas, 9.
- Martinez, A. G. and Matkovic. 1997. Cryopreservation of ovine embryos: slow freezing and vitrification. *Theriogenology.* 49:1039-1049.
- Massip, A., Van Der Zwalmen, P. and Ectors. 1984. Direct transfer of frozen cow embryos in glycerol-sucrose. *Vet. Rec.* 115:327-328.
- Massip, A. 2001. Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod. Dom. Anim.* 36:49-55.
- Nibart, M. and Humblot, P. 1997. Pregnancy rates following direct transfer of glycerol sucrose or ethylene glycol cryopreserved bovine embryos. *Theriogenology.*47:371.
- Niemann, H. 1991. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: Current status and reserch needs. *Theriogenology.* 35:109-124.
- Ponsart, C., Delcroix, P., Rohou, A., Jupin, L and Humblot, P. 2000. Sucrose of variation of pregnancy rates after transfer of bovine frozen embryos. In: *Proceedings 16 th Meeting European Embryo Transfer Association*, Rolduc, P. 216.
- Rall, W. G. 1992. Cryopreservation of oocytes and embryos methods and Application. *Anim. Reprod. Sci.* 28:237-245.

15. Schneider, V. and Mazur, P. 1984. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology*. 21:68-79.
16. Sommerfield, V. and Niemann, H. 1999 Cryopreservation of bovine *in vitro* produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing of vitrification. *Cryobiology*. 38:95-105.
17. Suzuki, T., Yamamoto, M., Ooe, M., Sakata, A., Matsuoka, M., Nishikata, Y. and Okamoto, K. 1990. Effect of sucrose concentration used for one-step dilution upon *in vitro* and *in vivo* survival of bovine embryos refrigerated in glycerol and 1,2-propanediol. *Theriogenology*. 34:1051-1057.
18. Szell, A., Shelton, J. N. and Szell, K. 1989. Osmotic characteristics of sheep and cattle embryos. *Cryobiology*, 26:297-301.
19. Yokohama, E., Yoshida, N. and Edashige, K. 1994. Permeabilities of mouse oocytes to various cryoprotectants. *J. mamm. Ova. Res.*, 11:114-115.
20. Voelkel, S. A. and Hu, Y. X. 1992A. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*. 37:23-37.
21. Voelkel, S. A. and Hu, Y. X. 1992B. Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogenology*. 37: 687-697.
22. Wurth, Y. A., Reinders, J. M. C., Rall, W. F. and Kruip Th, A. M. 1994. Development potential of *in vitro* produced bovine embryos following cryopreservation and single embryo transfer. *Theriogenology*. 42:1275-1284.

(접수일자 : 2006. 9. 25. / 채택일자 : 2006. 12. 8.)