pISSN 1225-4991, eISSN 2288-0178
J. Emb. Trans. (2014) Vol. 29, No. 1, pp. 13～19
http://dx.doi.org/10.12750/JET.2014.29.1.13

한우 수정란의 간이 동결을 위한 유리화 동결법에 관한 연구

이해이[1] · 김상훈[2] · 김용준[2,†]

[1]전라북도축산위생연구소 축산시험장, [2]전북대학교 수의과대학

Studies on Cryotop Vitrification Method for Simple Freezing of Hanwoo Embryos

Hae-Lee Lee[1], Sang-Hun Kim[2] and Yong-Jun Kim[2,†]

[1]Livestock Breeding Station, Jeollabuk-do Institute of Livestock and Veterinary Research, Gimje 576-882, Korea
[2]College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

ABSTRACT

This study was carried out to study the survival rate of thawed Hanwoo embryos frozen by the slow-rate freezing or the cryotop vitrification method. Hanwoo cumulus-oocyte complexes were recovered from ovaries at a slaughter house, matured for 20~22 hours, fertilized with Hanwoo semen for 5~6 hours, and cultured for 7~9 days in 38.5℃, 5% CO_2 incubator. For freezing, Day 7～9 blastocysts were collected. Embryos for the slow-rate freezing were equilibrated in 1.8 M ethylene glycol (EG) with Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS). Programmable cell freezer was precooled down to －7℃, and the straw was seeded during 8 minutes-holding time, and was cooled to －35℃ at the cooling rate of 0.3℃/min, and then was plunged and stored in liquid nitrogen. Embryos for the cryotop vitrification were treated in TCM199 with 0.5 M sucrose, 16% EG, 16% dimethylsulfoxide (DMSO). Embryos were then loaded individually onto cryotop and plunged directly into liquid nitrogen. The survival rates of embryos frozen by these two freezing methods were evaluated at 12 to 24h post-thawing. The survival rates of frozen/thawed Hanwoo embryos by the cryotop vitrification method (56.86 ± 26.53%) were slightly higher than those by the slow-rate freezing method (55.07 ± 26.43%) with no significant difference. Using the cryotop vitrification and the slow-rate freezing of Hanwoo blastocysts on Day 7 following *in-vitro* fertilization (IVF) treatment, the survival rates of frozen/thawed Hanwoo embryos were 72.65 ± 18.3% and 79.06 ± 17.8%, respectively. The survival rates by the cryotop vitrification were higher than those by the slow-rate freezing on both Day 8 and 9 with significantly higher survival rate on Day 9 ($p<0.05$). Using the cryotop vitrification and the slow-rate freezing of Hanwoo embryos to compare between three different blastocyst stages, the survival rates of the blastocyst stage embryos were 66.22 ± 18.8% and 45.76 ± 12.8%, respectively with higher survival rate by the vitrification method ($p<0.05$). And the survival rate of expanded blastocysts was higher than those of early blastocysts and blastocysts in two freezing methods with significantly higher survival rate by the slow-rate freezing method ($p<0.05$).

(Key words : slow-rate freezing, cryotop vitrification, Hanwoo embryos, survival rate)

서 론

가축에 있어서 수정란의 동결 보존은 생명공학 분야뿐만 아니라, 가축의 개량과 증식 그리고 유전자원 보호 차원에서 그 중요성이 증가되고 있어 현재까지 수정란의 동결에 관한 연구는 꾸준히 수행되어 왔다. 수정란을 동결 보존하는 방법으로써 현재까지 동결 온도를 점진적으로 일정한 온도까지 도달시켜 동결하는 완만 동결(slow-rate freezing) 방법을 주로 이용하고 있으며, 최근에는 완만 동결법보다 간편한 유리화 동결(vitrification) 방법이 이용되고 있다.

완만 동결법 중 ethylene glycol을 동결 보호제로 사용하는 직접 이식 동결법은 융해 후, 직접 수란동물에 이식할 수 있는 동결 방법으로 알려져 있다. 그러나 직접 이식법도 기본적으로 완만 동결법을 이용하여 수정란을 동결하기 때문에 세포내 빙정 형성에 의한 손상이 일어날 수 있고, 동결 처리 시간이 2～3시간으로 길게 소요되며, 동결 처리 방식이 복잡하고, 고가의 자동화 동결기가 필요하여(Gardner 등, 2004), 농가 현장에서 직접 동결하는데 한계가 있다.

† Correspondence : E-mail : yjk@jbnu.ac.kr

이러한 단점을 보완하여 완만 동결법을 대체할 수 있는 방법으로 유리화 동결법이 개발되었는데, 이 방법은 Roll과 Fahy (1985)가 생쥐 수정란을 이용하여 유리화 동결을 보고한 후 토끼(Kobayashi 등, 1990), 면양(Ali와 Shelton, 1993), 돼지 (Dobrinsky와 Johnson, 1993; 김 등, 2004), 소(Massip 등. 1995), 그리고 인간(Cohen, 1988)등에서도 수정란의 유리화 동결에 성공하였다.

유리화 동결법은 동결기가 없이 적절하게 조성된 동결 배지를 이용하여, 빠르고 간편하게 동결할 수 있으며, 또한 동결시 빙정 형성이 이루어지지 않아 수정란의 손상을 줄이면서 동결/융해 후 생존성이 높다고 보고되고 있다. 유리화 동결법과 관련하여 김 등(2004)과 Isachenko 등(2005), Vajta 등 (1998)은 open pulled straw(OPS) 법, Martino 등 (1996)은 electron microscopic grid(EMG)법, Lane 등(2001)은 nylon loop system(NLS) 법, Kelly 등(2006)과 Laowtammathron 등(2005)은 cryotop을 이용하여 유리화 동결 연구를 보고하였다.

OPS 법은 1/4 cc straw를 열을 가하여 길게 뽑아 내벽을 얇게 함으로써, filling된 난자나 수정란이 액체 질소와 접촉했을 때 유리화가 신속하게 이루어지게 하는 방법이며, EMG 법은 열전도가 예민한 전자 현미경용 copper grid를 이용하는 방법이고, NLS 법은 0.5 mm 직경의 nylon loop를 이용하여 동결하는 방법이다.

Cryotop은 넓이 0.4 mm, 길이 20 mm, 두께 0.1 mm의 polypropylene 재질의 strip으로써, 난자 또는 수정란을 포함한 소량의 동결액을 cryotop 위에 장착하여 신속하게 액체 질소에 침지함으로써 급속 동결하는 방법이다(Kuwayama, 2007). 인간에서 cryotop을 이용한 유리화 동결 수정란을 이식하여 임신과 출산에 성공한 예를 Kuwayama 등(2005)이 보고하였으며, Bogliolo 등(2006)은 말에서, Kelly 등(2006)은 소와 양에서, Hochi 등(2004)은 토끼에서, Esaki 등(2004)은 돼지에서 각각 성공 예를 보고하였다.

그러나 국내에서는 cryotop을 이용한 유리화 동결법에 관한 연구 보고는 거의 없어, 본 연구에서는 현재 가장 일반적으로 사용하는 동결법인 완만 동결법 중 직접 이식 동결법과 cryotop을 이용한 유리화 동결법을 사용하여 동결/융해 후의 한우 수정란의 생존율을 비교하고, 수정란의 발달 상태에 따른 동결 성적 분석을 통해 농가 현장에서 한우 수정란의 간이 동결을 위한 동결법으로써 cryotop 유리화 동결법이 사용 가능성이 있는지를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 난포란 채취 및 체외 성숙

도축 한우의 난소로부터 난포란을 회수하기 위하여 18G needle이 부착된 5 ml syringe를 이용, 7 mm 이하의 가시 난포로부터 난포액을 흡입하여 100 mm petri dish 내에 천천히 분주하였다. 난포란 흡입배지는 3% fetal bovine serum(FBS, Gibco)이 첨가된 Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS, Gibco)을 사용하였다.

실체 현미경(Leica)하에서 난포란을 회수하여 난포란 흡입배지로 세척한 후, 25 mM hepes와 10% FBS가 첨가된 tissue culture medium(TCM)199으로 2～3회 세척하여 난포란 20개를 체외 성숙 배지 100 μl droplet 내로 옮겨, 38.5℃, 5% CO_2 incubator 내에서 20～22시간 동안 배양하였다. 체외 성숙 배지는 TCM199에 10% FBS, 0.5 μg/ml follicle stimulating hormone(FSH, Sigma), 0.5 μg/ml luteinizing hormone(LH, Sigma), 1 μg/ml β-estradiol(Sigma), 0.07 μg/ml epidermal growth factor(EGF, Sigma)를 첨가하여 조성하였다.

2. 정자 처리 및 체외 수정

체외 수정용 배지는 일본 기능성 펩티드 연구소(Inst. of functional peptide)에서 개발한 IVF 100으로 B · O액의 성분을 일부 변경한 배지로써, 25 mM sodium pyruvate, 0.5 mM cysteine, 5 mg/ml bovine serum albumin(BSA), 5 mM caffeine, 7.5 mg/ml heparin으로 구성되어 있다.

한우 동결 정액을 37℃에서 20초간 융해하여 IVF100 6 ml에 혼합한 후 1,500 rpm에서 5분간 2회 원심분리 하였다. 최종 정자 농도를 5～6 × 10^6/ml가 되도록 조정하였으며, 60 mm petri-dish에 100 μl의 정액 droplet을 만들어 mineral oil로 도포한 후 38.5℃, 5% CO_2 incubator에 보관하였다. 난포란 흡입 후 20～22시간 배양한 난자들을 IVF100으로 2～3회 세정한 후 정액 droplet에 20개의 난자를 넣어 38.5℃, 5% CO_2 incubator에서 5～6시간 동안 수정시켰다.

3. 체외 배양 및 수정란 생산

체외 수정 후 난자는 10% FBS 첨가 TCM199으로 3～4회 세척하여, 7～9일간 38.5℃, 5% CO_2 incubator 내에서 난구세포와 공배양하였으며, 48시간마다 체외 배양액을 교환하였다. 그리고 수정 후 2일째 분할율과 7～9일째 배반포 발달율을 조사하였다.

4. 수정란의 동결

난포란을 체외 성숙시키고 나서 한우 동결 정액과 체외 수정한 후 7～9일에 배반포 단계로 발달된 수정란을 동결하였다.

완만 동결법으로써 직접 이식 동결법은 동결 방지제로써 1.8 M ethylene glycol이 첨가된 동결 배지(IFP, Japan)에서 15～20분간 평형을 실시한 후, 수정란 동결기(FHK)를 사용하여 동결하였다. 수정란이 장착된 스트로를 동결기의 챔버에 넣고

－7℃에서 10분간 식빙(seeding)하였으며, －35℃까지 분당 －0.3℃의 속도로 온도를 하강시켜 동결하였고, 액체 질소에 10분 이상 침지한 후 액체 질소 탱크에 넣어 보관하였다.

Cryotop을 이용한 유리화 동결법은 수정란의 동결과 융해를 위한 세정액(washing solution)으로써 TCM199에 FBS가 20%가 되도록 첨가하고, 동결을 위한 평형액(equilibration sol)은 세정액에 7.5% ethylene glycol(Sigma), 7.5% dimethylsulfoxide(DMSO, Sigma)가 되도록 조성하였으며, 유리화 동결액(vitrification solution)은 세정액에 0.5M sucrose(Sigma), 16% ethylene glycol, 16% DMSO를 첨가하여 제조하였다. 수정란의 동결은 수정란을 세정액으로 2～3회 세정하여, 평형액에서 3분 동안 평형시킨 후 유리화 동결액에서 30초간 정치하여 동결 용기인 cryotop (Kitazato, Japan)의 polypropylene strip에 5개 정도의 수정란을 일정 간격으로 로딩한 후, 파스퇴르 피펫을 이용하여 동결액을 흡입, 제거하고, 신속하게 액체 질소에 침지하였다. 액체 질소 내에서 플라스틱 커버를 끼운 후, 수정란이 장착된 cryotop을 액체 질소 탱크에 넣어 보관하였다.

5. 동결 수정란의 융해

직접 이식 동결법의 융해는 동결 수정란이 들어있는 스트로를 액체 질소 탱크로부터 꺼내어 실온에서 약 10초간 노출시킨 후, 37℃의 온수에서 20초간 융해하여 수정란을 체외 배양액으로 수회 세정하였다.

유리화 동결법으로 동결한 수정란을 융해한 후, 희석 처리와 세정을 위하여 희석 처리를 위한 희석액(dilution solution)은 세정액에 0.5 M sucrose를 첨가하였으며, 융해액(thawing solution)은 세정액에 1M sucrose를 첨가하여 제조하였다. 유리화 동결법에 의한 수정란의 융해는 액체 질소에서 cryotop의 플라스틱 커버를 벗긴 후 수정란이 장착된 polypropylene strip을 37℃의 융해액에 넣어서 1분 동안 정치한 후 희석액에서 3분간 정치하였고, 세정액에서 5분씩 2회 세정하였다.

6. 생존 수정란의 판정

한우 체외 수정란을 동결한 후 융해하여 체외 배양액(10% FBS 첨가 TCM199)으로 세정한 수정란을 체외 배양액에 넣어 12～24시간동안 5% CO_2 인큐베이터에서 배양하여 재확장(re-expanded) 또는 부화(hatching) 배반포로 발달한 수정란을 생존 수정란으로 판정하였다.

7. 시험 조사 내용

동결 방법에 따른 동결/융해 후 생존율 조사를 위하여 한우 체외 수정란을 1.8 M ethylene glycol을 이용한 직접 이식 동결법(완만동결법)과 cryotop을 이용한 유리화 동결법으로 동결한 한우 수정란을 각각 융해하여 12～24시간 동안 38.5℃, 5% CO_2 incubator 내에서 배양한 후 발달 상태를 나타낸 생존 수정란을 조사하였다.

수정란의 배반포 발달 시기에 따른 생존율 조사를 위하여 체외 성숙시킨 한우 난포란을 한우 동결 정액과 체외 수정 후 각각 7, 8, 9 일에 배반포 단계로 발달한 수정란을 직접 이식 동결법과 유리화 동결법으로 동결한 후 융해하여 발달 상태를 나타낸 생존 수정란을 조사하였다.

수정란의 배반포 발생 단계에 따른 생존율 조사를 위하여, 체외 성숙시킨 한우 난포란을 한우 동결 정액과 체외 수정 후 7～9일 동안 배반포 단계로 발달한 수정란을 초기배반포, 배반포, 확장 배반포 군으로 나누어, 직접 이식 동결법과 유리화 동결법으로 동결한 후 융해하여 발달 상태를 나타낸 생존 수정란을 조사하였다.

8. 통계학적 분석

시험 결과의 통계학적 분석은 *t*-test, one-way ANOVA로 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 한우 체외 수정란의 배반포 발달율

한우 도축암소의 난소로부터 난포란을 회수하여, 체외에서 22시간 성숙시킨 후, 한우 동결 정액과 체외 수정을 실시하였다. 체외 수정 후 2일째 분할율과 수정 후 7～9일간 체외 배양액(TCM199 +10% FBS)에서 난구 세포와 공배양하여 분할율과 배반포로 발달율을 조사한 결과는 Table 1과 같다.

난포란 3,571개를 공시하여 체외 성숙 및 체외 수정시키고, 2일 후에 분할된 난자의 수는 2,312개로써 64.83 ± 9.18%의 분할율을 나타내었으며, 체외 수정 후 7～9일간 38.5℃, 5% CO_2 조건하에서 난구 세포와 공배양하여 분할 난자 중 547개가 배반포로 발달되어 24.59 ± 9.90%의 배반포율을 나타내었다.

2. 직접 이식 동결법(완만 동결법)과 Cryotop 유리화 동결법에 따른 동결/융해 후 생존율

한우 체외 수정란을 완만 동결법으로써 ethylene glycol을 동결 방지제로 사용한 직접 이식 동결법과 sucrose, ethylene

Table 1. Cleaved rate and blastocyst rate of Hanwoo IVM/IVF oocytes cultured in TCM199 (10% FBS) medium (Mean ± SD)

No. of oocytes	No.(%) of cleaved oocytes	No.(%) of blastocysts
3,571	2,312(64.83 ± 9.18)	547(24.59 ± 9.90)

glycol, DMSO를 혼합하여 동결액으로 사용하고, 동결 용기로써 cryotop을 이용한 유리화 동결법으로 동결한 후 융해하여 수정란의 생존율을 조사한 결과는 Table 2와 같다.

직접 이식 동결법의 동결/융해 후 생존율은 55.07 ± 26.43%이었으며, cryotop을 이용한 유리화 동결법의 생존율은 56.86 ± 26.53%로써 직접 이식 동결법과 거의 비슷한 성적을 나타내었다.

Vajta 등(1998)과 Martino 등(1996)은 소에서 유리화 동결 방법은 기존의 straw를 이용한 완만 동결법보다 배반포 생존율이 우수하다고 하였으며, Mahmoudzadeh 등(1995)도 2단계 평형에 의한 유리화 동결과 완만 동결에 의한 소 체외 수정란의 생존율을 검토한 결과, 유리화 동결에 의한 수정란의 생존율이 높았다고 보고하였다. 김 등(2000)은 소 수정란의 동결에 있어서 OPS 법으로 유리화 동결 보존 후의 생존율과 세포동결기에 의한 완만 동결 후의 생존율을 비교하였는데, 유리화 동결법이 67.5%로써 완만 동결법의 52.5%보다 높은 성적을 나타내었다고 하였다. 이들의 보고는 cryotop을 이용한 유리화 동결의 연구는 아니었지만, 유리화 동결법이 완만 동결법보다 통계적인 유의성은 없었으나, 수치상으로 더 좋은 성적을 보인 본 연구와 같은 경향을 나타낸 것으로 사료된다.

한편, 석(2006)은 과배란 처리 후 회수한 2-세포기 마우스 수정란을 1.5M ethylene glycol을 동결 방지제로 사용한 기존 straw를 이용한 완만 동결법과 유리화 동결법인 closed pulled straw(CPS) 법, 그리고 OPS 법으로 수정란을 각각 동결/융해 한 후, blastocyst로의 발달율을 상호 비교한 바 straw를 이용한 완만 동결법이 43.4%로써 유리화 동결법 중 액체 질소에 직접 노출되는 OPS 법의 37.7%보다 높은 성적을 나타내었다고 보고한 바 있다.

Table 2. Survival rate following thawing of Hanwoo embryos frozen by two different freezing methods (Mean ± SD)

Freezing method	No. of embryos(%)	
	Frozen	Survived
Slow-rate freezing (1.8M ethylene glycol)	171	99(55.07 ± 26.43)
Vitrification(cryotop)	137	75(56.86 ± 26.53)

3. 체외 배양 후 배반포 발생 시기와 배반포 발생 단계에 따른 동결/융해 후 생존율

한우 체외 수정란의 배반포 발생 시기 즉, 배양 후 각각 7, 8, 9일에 생산된 배반포를 1.8 M ethylene glycol을 이용한 완만 동결법과 cryotop을 이용한 유리화 동결법으로 동결한 후 융해하여 수정란의 생존율을 조사한 결과는 Table 3과 같다.

한우 난포란을 체외에서 22시간 배양하고, 한우 동결 정액을 이용한 체외 수정 후 배양하여 7일에 생산된 배반포기 수정란을 완만 동결법으로 동결, 융해한 후 생존율은 79.06 ± 17.8%이었으며, cryotop을 이용한 유리화 동결법에 의한 동결/융해 후 생존율은 72.65 ± 18.3%로써 완만 동결법보다 낮은 수치를 나타내었으나, 유의성 있는 차이는 없었다. 체외 배양 후 8일에 생산된 배반포의 생존율은 완만 동결법과 유리화 동결법에서 각각 49.20 ± 23.4%와 56.04 ± 20.5%로써 유리화 동결법에서 더 높은 생존율이 나타났으나, 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다. 한편, 배양 후 9일에 생산된 배반포의 생존율은 각각 44.62 ± 16.1%와 68.69 ± 23.5%로써 유리화 동결법을 사용한 경우, 더 높은 수정란의 생존율을 나타내었다($p<0.05$). 7일에 생산된 배반포와 달리 8일과 9일에 생산된 배반포의 동결/융해 후 생존율에서는 유리화 동결법의 성적이 완만 동결법보다 높은 수치의 생존율을 나타내었고, 9일에 생산된 배반포에서는 유리화 동결법 사용 시 유의적으로 더 높은 생존율을 나타내었다($p<0.05$).

또한 완만 동결법에서는 배양 후 7일, 8일, 9일에 생산된 배반포 순으로, 그리고 유리화 동결법에서는 7일, 9일, 8일에 생산된 배반포 순으로 융해 후 수정란의 생존율의 수치가 높았으며, 완만 동결법에서 유의적인 차이를 나타내어 배양 후 7일의 배반포 생존율이 8, 9일에 생산된 배반포보다 각각 높

Table 3. Comparison of survival rate of Hanwoo embryos between two freezing methods according to different culture day after *in-vitro* fertilization (Mean ± SD)

Survival rate	Culture following IVF treatment		
	Day 7	Day 8	Day 9
Slow-rate freezing	79.06 ± 17.8^{A}	49.20 ± 23.4^{B}	44.62 ± 16.1^{a,B}
Vitrification	72.65 ± 18.3	56.04 ± 20.5	68.69 ± 23.5^{b}

IVF : *in-vitro* fertilization

^{A,B} Different superscripts within rows indicate significant differences($p<0.05$).

^{a,b} Different superscripts within columns indicate significant differences($p<0.05$).

았다($p<0.05$). 두 가지 동결 방법 모두에서 7일에 생산된 배반포 수정란이 8, 9일에 생산된 배반포에 비해 가장 높은 생존율을 나타내었다.

한우의 체외 성숙 난자를 체외 수정한 후 7~9일간 체외 배양하여 생산된 초기 배반포, 배반포, 확장 배반포의 발생 단계별로 분류하여 완만 동결법과 cryotop을 이용한 유리화 동결법으로 동결하여 융해한 후 수정란의 생존율을 조사한 결과는 Table 4와 같다.

초기 배반포 단계의 수정란을 완만 동결법의 하나인 직접 이식 동결법과 유리화 동결법으로 동결/융해한 후 생존율을 조사한 바, 각각 60.89 ± 18.3%와 61.98 ± 15.3%로써 서로 비슷한 성적을 나타내었으며, 배반포 단계의 수정란은 각각 45.76 ± 12.8%와 66.22 ± 18.8%로써 유리화 동결법의 성적이 높았으며, 유의성 있는 차이가 인정되었다($p<0.05$). 확장 배반포 단계의 수정란은 각각 80.32 ± 21.8%와 70.58 ± 17.2%를 나타내어 유리화 동결법보다 직접 이식 동결법이 높은 수치를 나타내었으나, 유의성 있는 차이는 아니었다. 또한 두 가지 동결 방법 모두에서 확장 배반포 단계의 수정란이 초기 배반포 및 배반포 단계보다 더 높은 수치의 생존율을 나타내었으나, 유의성 있는 차이는 완만 동결법에서만 인정되었다($p<0.05$).

수정란을 유리화 동결한 후 융해하였을 때, 수정란의 생존성에 영향을 미치는 요인으로 수정란의 발달 단계, 생산 일령, 동결 보호제 등 많은 요인 등이 관련이 있다고 보고되고 있으며, 특히 동결 보호제의 구성뿐 아니라, 동결 평형 방법과 융해 후 희석 방법도 수정란의 생존율에 영향을 미치는 것으로 보고하였다(Kuwayama 등, 1994).

김 등(1998)은 유리화 동결 시 동결 방지제의 평형 방법에 따른 소 수정란의 발달 단계별 동결/융해 후 재확장 배반포로 발달된 생존율에 있어서 확장 배반포 단계가 37.0%로써 배반포 단계 22.8%에 비하여 높은 성적을 나타내었다. Saito 등(1994)도 확장 배반포의 경우가 배반포의 경우보다 생존율과 부화율에 있어서 더 높은 성적을 나타내었다. 김 등(2000)은 소 수정란의 cell stage에 따른 유리화 동결 시 zygote, 2 cell, 8 cell, morulae, blastocyst stage 순으로 동결 보존 후의 발생율은 점차 증가한다고 보고하였다.

조 등(2008)은 체외에서 수정 후 7~9일에 배양된 수정란을 1.8 M ethylene glycol과 0.1 M sucrose를 이용하여 완만 동결하였을 때, 수정란의 발달 단계에 따른 내동성을 확인하기 위하여 수정란의 생존성을 평가하였다. 상실배 수정란의 생존율은 31.6%로써 배반포와 확장 배반포 수정란보다 유의적으로 낮은 결과를 나타내었으며, 확장배반포의 수정란은 73.7%로써 가장 높은 성적을 나타내었다. 또한 체외 수정란이 체내 수정란보다 낮은 생존율을 나타내었다고 보고하여 체내 수정란이 더 양호한 생존성을 나타내었고, 이러한 결과는 수정란의 배양 체계에 따른 수정란의 질적인 차이로 인하여 생존율에 영향을 미칠 수 있다고 보고하였다.

이들의 연구에서 동결/융해 후 수정란의 생존율은 본 연구보다 낮은 수치를 나타내었지만, 유리화 동결법에서 배반포 단계가 진행될수록 더 높은 성적을 보인 결과와 유사한 경향을 나타내었으며, 이러한 결과는 체외에서의 발달이 더 진행될수록 동결에 대한 손상을 줄일 수가 있어 확장 배반포기에 동결하는 것이 유리한 것으로 나타났다.

현재는 수정란 이식의 대부분이 실험실에서 생산된 체외수정란을 대부분 신선란 상태로 농가에 이식되어지고 있으나, 향후 수정란 이식의 발전을 위해서는 수정란의 동결과 동결 수정란의 이식은 필수적인 요건이라 할 수 있다.

일반적으로 ethylene glycol을 동결 방지제로 사용하는 직접 이식 동결법은 수정란의 동결과 융해 시 별도의 단계를 거치지 않는 장점이 있으나, 농가에서 채란 시 많은 수정란이 회수된 경우, 이식 후 여분의 수정란을 동결하기 위해서 동결기가 필요하고, 시간도 많이 걸리는 번거로움이 따른다. 동결 수정란 이식의 실용화를 위해서는 동결법과 융해법이 간단하여 현장에서도 직접, 간편하게 동결 또는 융해할 수 있어야 하며, 동결/융해 후 생존율이 높아 수정란이식 후 수태율이 좋아야만 할 것이다

이와 같은 상황에서 유리화 동결법은 농가 현장에서 사용 가능한 동결법으로써 그 용이한 방법과 시간이 적게 소요된다는 점에서 추천할만하며, 유리화 동결법으로 동결된 수정란

Table 4. Comparison of survival rate of Hanwoo embryos between two freezing methods according to different blastocyst stage after *in-vitro* fertilization (Mean ± SD)

Survival rate	Embryo stage		
	Early blastocyst	Blastocyst	Expanded blastocyst
Slow-rate freezing	60.89 ± 18.3^{A,B}	45.76 ± 12.8^{a,A}	80.32 ± 21.8^{B}
Vitrification	61.98 ± 15.3	66.22 ± 18.8^{b}	70.58 ± 17.2

^{A,B} Different superscripts within rows indicate significant differences($p<0.01$).
^{a,b} Different superscripts within columns indicate significant differences($p<0.05$).

의 융해법에 있어서 본 연구에서는 다단계 희석을 하였으나, 일 단계 희석으로도 높은 생존율을 보인 김 등(1998)과 Vajta 등(1997)의 보고로 추정해 볼 때 융해법도 간단히 조작할 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구에서 ethylene glycol을 동결 방지제로 사용한 직접 이식 동결법과 sucrose, ethylene glycol, DMSO를 혼합하여 동결액으로 사용하고, cryotop을 이용한 유리화 동결법을 비교하여 동결/융해 후 수정란의 생존율이 서로 비슷한 성적을 나타내었으나, 체외 수정 후 배반포가 생산된 날짜와 배반포 발달 단계에 따라 두 가지 동결법에 의한 수정란 생존율 비교에서는 체외 배양 9일에 생산된 배반포와 배반포 단계의 수정란의 경우, 직접 이식 동결법보다 유리화 동결법 사용 시 유의성 있게 더 높은 생존율을 나타내었다.

본 연구에서의 상기의 결과를 고려하여, 동결 보호제의 종류, 노출 시간, 동결 및 융해 방법 등 유리화 동결 후 생존성에 영향을 미칠 수 있는 여러 요인들을 추가로 조사, 분석하여 동결/융해 후 생존율을 더 높일 수 있다면, cryotop을 이용한 유리화 동결법이 농가 현장에서 이용할 수 있는 양호한 동결법으로 제시될 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

본 연구는 수정란의 동결법 중 ethylene glycol을 동결 방지제로 사용한 직접 이식 동결법(완만 동결법)과 동결 용기로써 cryotop을 이용한 유리화 동결법으로 한우 수정란을 동결하여 융해 후 생존율을 비교하였고, 체외 수정 후 배반포 발생 날짜와 배반포의 발생 단계에 따른 동결/융해 후 생존율도 조사하였다.

한우 도축 난소의 난포란 3,571개를 체외 성숙 및 체외 수정한 후 2일째 분할율은 64.83 ± 9.18%이었으며, 체외 수정 후 7~9일째 배반포로의 발달율은 24.59 ± 9.90%이었다. 한우 체외 수정란을 직접 이식 동결법과 cryotop을 이용한 유리화 동결법으로 동결하여 융해한 후, 수정란의 생존율은 각각 55.07 ± 26.43%와 56.86 ± 26.53%로써 거의 비슷한 성적을 나타내었다. 한우 체외 수정란의 배반포 발달 날짜에 따른 수정란의 생존율은 체외 배양 후 7일에 생산된 배반포는 직접이식 동결법과 유리화 동결법에서 각각 79.06 ± 17.8%와 72.65 ± 18.3%를 나타내었고, 8일에 생산된 배반포는 각각 49.20 ± 23.4%와 56.04 ± 20.5%이었으며, 배양 후 9일에 생산된 배반포는 각각 44.62 ± 16.1%와 68.69 ± 23.5%의 생존율을 나타내어, 7일에 생산된 배반포와 달리 8일과 9일에 생산된 배반포는 직접이식 동결법보다 유리화 동결법 사용 시 더 높은 생존율을 나타내었고, 9일에 생산된 배반포의 경우, 유의적인 차이를 나타내었다($p<0.05$). 또한 체외 수정 후 7일에 생산된 배반포는 8, 9일에 생산된 배반포와 비교하여 완만 동결법에서는 유의성있게($p<0.05$) 유리화 동결법에서는 비 유의적으로 더 높은 융해 후 생존율을 나타내었다.

한우 체외 수정란의 배반포 발생 단계에 따른 동결/융해 후 수정란의 생존율 비교에서 초기 배반포 단계의 수정란은 직접 이식 동결법과 유리화 동결법에서 각각 60.89 ± 18.3%와 61.98 ± 15.3%로써 서로 비슷한 성적을 나타내었고, 배반포 단계의 수정란은 각각 45.76 ± 12.8%와 66.22 ± 18.8%로써 유리화 동결법 사용 시 더 높은 생존율을 나타내었으며($p<0.05$), 확장 배반포 단계의 수정란은 각각 80.32 ± 21.8%와 70.58 ± 17.2%를 나타내었다. 그리고 확장 배반포 단계의 수정란이 두 가지 동결 방법 모두에서 다른 시험군에 비해 높은 생존율을 보였는데, 완만 동결법에서는 유의성 있게($p<0.05$), 유리화 동결법에서는 비유의적으로 높은 생존율을 나타내었다.

결론적으로 유리화 동결법 사용 시 더 좋은 수정란의 융해 후 생존율은 체외배양 후 9일에 생산된 배반포 간의 비교에서, 그리고 배반포 발생 단계 중 배반포 단계의 수정란의 경우에서 완만 동결법보다 유리화 동결법에서 더 높은 융해 후 수정란의 생존율이 확인되었다($p<0.05$).

참 고 문 헌

Ali J and Shelton JN. 1993. Succesful vitrification of Day-6 sheep embryos. J. Reprod. Fertil. 99: 65-70.

Bogliolo L, Ariu F, Rosati I, Zedda MT, Pau S, Naitana S, Leoni G, Kuwayama M. and Ledda S. 2006. Vitrification of immature and *in vitro* matured horse oocytes. Reprod Fertil. Dev. 18: 149-150(Abstr).

Cohen C. 1988. Pregnancies after Human Oocyte Cryopreservation. Ann. NY Acad. Sci. 541-549.

Dobrinsky JR and Johnson LA. 1993. Effect of vitrification media on the *in vitro* development of porcine embryos. Theriogenology 39: 209(Abstr).

Esaki R, Ueda H, Kurome M, Hirakawa K, Tomii R, Yoshioka H, Ushijima H, Kuwayama M and Nagashima H. 2004. Cryopreservation of porcine embryos derived from *in vitro*-matured oocytes. Biol. Reprod. 71: 432-437.

Gardner DK, Weissman A, Howles CM and Shoham Zeev. 2004. Textbook of Assisted Reproductive Techniques. 2nd ed. Taylor & Francies. United Kingdom, pp. 257-289.

Hochi S, Terao T, Kamei M, Kato M, Hirabayashi M and Hirao M. 2004. Successful vitrification of pronuclear stage rabbit zygotes by minimum volume cooling procedure. Theriogenology 61: 267-275.

Isachenko V, Monlag M, Isachenko E, Zaeva V, Krivokharchenko I, Shafei R and van der Ven H. 2005. Aseptic technology of vitrification of human pronuclear oocytes using open-pulled straws. Hum. Reprod. 20: 492-496.

Kelly J, Kleemann D, Kuwayama M and Walker S. 2006. Effect of cysteinamine on survival of bovine and ovine oocytes vitrified using the minimum volume cooling (MVC) cryotop method. Reprod. Fertil. Dev. 18: 158 (Abstr).

Kobayashi K, Nagashima H, Yamakawa H, Kato Y and Ogawa S. 1990. The survival of whole and bisected rabbit morulae after cryopreservation by the vitrification method. Cryobiology 31: 415-422.

Kuwayama M. 2007. Highly efficient vitrification cryopreservation of human oocytes and embryos : The cryotop method. Theriogenology 67: 73-80.

Kuwayama M, Fujikawa S and Nagai T. 1994. Ultrastructure of IVM-IVF bovine blastocysts vitrified after equlibration in glycerol 1,2-propanediol using 2-step and 16-step procedures. Cryobiology 31: 415-422.

Kuwayama M, Vajta G, Ieda S and Kato O. 2005. Vitrification of human embryos using the Cryo Tip™ method. Reprod. Biomed. 11: 608-614.

Lane M and Gardner DK. 2001. Vitrification of mouse oocytes using a nylon loop. Mol. Reprod. Dev. 58: 342-347.

Laowtammathron C, Lorthongpanich C, Ketudat-Cairns M, Hochi S and Parnpai R. 2005. Factors affecting cryosurvival of nucleartransferred bovine and swamp buffalo blastocysts: effects of hatching stage, linoleic acid-albumin in IVC medium and Ficoll supplementation to vitrification solution. Theriogenology 64: 1185-96.

Mahmoudzadeh AR, Van Soom A, Bols P, Ysebaert MT and de Kruif A. 1995. Optimization of a simple vitrification procedure for bovine embryos produced *in vitro*: effect of developmental stage, two-step addition of cryoprotectant and sucrose dilution on embryonic survival. J. Reprod. Fertil. 103: 33-9.

Martino A, Songsasen N and Leibo SP. 1996. Development-into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. Biol. Reprod. 54: 1059-1069.

Massip A, Mermillod P and Dhmyes A. 1995. Morphology and biochemistry of *in-vitro* produced bovine : implications for their cryopreservation. Hum. Reprod. 10: 3004-3011.

Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at −196℃ by vitrification. Nature 313: 573-575.

Saito N, Imai K and Tomizawa M. 1994. Effect of sugars-addition on the survival of vitrified bovine blasocysts produced *in vitro*. Theriogenology 41: 1053-1060.

Vajta G, Holm P, Greve T and Callesen H. 1997. Survival and development of bovine blastocysts produced *in vitro* after assisted hatching, vitrification and in-straw direct rehydration. J. Reprod. Fertil. 111: 65-70.

Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T and Callesen H. 1998. Open pulled straw(OPS) vitrification: a new way toreduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. Mol. Reprod. Dev. 51: 53-58.

김상근, 박상훈, 석호봉. 2000. 소 수정란의 vitrification 동결보존시 동결보호제의 종류 및 배 발달 단계가 생존성에 미치는 영향에 관한 연구. 한국수정란이식학회지 24: 225-230.

김인덕, 안미현, 석호봉. 2004. 미성숙돼지 난자의 유리화동결에 관한 연구 ; OPS, EMG, NLS의 비교. 한국수정란이식학회지 19:27-34.

김정익, 유재원, 박춘근, 양부근, 정희태. 1998. 동결액의 평형방법과 희석방법이 초자화 동결된 소 체외수정란의 생존성에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지 13: 313-321.

석호봉. 2006. CPS, 기존 Straws, OPS 방법을 이용한 마우스 성숙난자 및 수정란의 유리화 동결 비교. 한국수정란이식학회지 21: 53-58.

조상래, 최창용, 김현종, 최선호, 손동수. 2008. 한우 수정란의 동결보존 후 발달 효율 비교. 한국수정란이식학회지 23: 223-227.

(접수: 2013. 11. 21/ 심사: 2013. 11. 21/ 채택: 2014. 3. 25)