

소 수정란 동결보존의 기본

S. P. Leibo

Department of Biomedical Sciences
University of Guelph, Canada

서 론

소 수정란의 동결보존은 확립된 과정이다. Wilmut와 Rowson이 1973년에 소 수정란의 동결보존에 대한 최초의 성공보고가 있는 뒤 좀 더 개선되고 발전된 방법을 사용한 동결보존에 대해 많이 보고되고 있다. 의심할 바 없이 실제로는 이보다 더 많이 행해지고 있다. 수정란의 동결방법들은 자세히 설명되어 있으며, 짧은 시간에 배울 수도 있다. 최근에는 발표된 방법들을 비교하고 있으며, 사실 상업적으로 판매되는 생산물의 “결과”는 획기적으로 검증할 기회나 시간이 거의 없다. 아마도 수정란 동결보존의 “기초” 시험은 실험동물 수정란에서 사용했던 새로운 방법의 어떤 주의 깊은 시도로써 시작될 것이다. 여기서 짧게 제안한다면, 더 나아가서 혁신적인 소 수정란 생산의 방법은 난포란의 체외성숙과 성숙 난자의 체외수정(IVF) 같이 범위가 더 넓혀질 것이다. 예전의 동결보존 방법은 부적절하다. 단지 기본 원칙을 이해하는 것만이 성공으로 이끌 것이다

수정란의 동결보존은 실제로 신중히 검토하여 기본원칙의 적용을 고려해야 할 것이다. 여기서는 특히 소 수정란에 대해 이야기 하겠지만 어떤 부분은 다른 동물종의 난자와 수정란에서 나온 결과를 이야기 할 수도 있다. 그러므로 이해를 돕기 위해서 또한 그런 결과들에 대해 이야기 할 것이다. 현재, 수정란은 완만 평형 동결방법, 또는 급속 비평형 동결방법에 의해 동결되어진다. 수정란은 완만 또는 급속 동결에 의해 동결보존 되어짐에도 불구하고 수정란 동결의 기본 형태는 같은 요인들이 작용한다. 이것으로는:

1. 수정란의 발달단계와 등급
2. 동결보존액(CPA)의 농도와 종류
3. 동결 속도
4. 액체질소(LN₂)에 저장
5. 융해속도
6. 동결액의 제거와 희석

수정란이식(ET)은 물론 수정란 동결의 모든 방법에는 일반적으로 주변의 여러 요소들이 실제로 고려되어야 한다. 이것으로는:

1. 동결보존액의 멸균
2. 수정란 보관용기
3. 동결에 필요한 시간
4. 동결 “기계” 또는 기구
5. 수정란의 판정
6. 이식하기 전 수정란 융해의 조작

기본원리

1. 수정란 : 소 수정란 동결보존에서 주의해야할 우선적인 변수는 수정란 그 자체다. 일반적으로 수정란의 동결은 육우나 젖소에서 같은 방법이 이용된다. 비록 동결 용해 수정란의 이식으로 임신이 되었을지라도 교잡우 수정란은 물론 소의 종에 따라 이 의문의 포괄적인 분석은 지금까지 없었다. 불행하게도 소에서 수정란의 이식으로 임신에 영향을 미치는 대부분의 변수들은 동결보존의 의문은 차치하고라도 해결하기가 어렵다. 이들 변수들은 (1) 이식하는 수정란의 질; (2) 수란우와 공란우의 생식 생산능력; (3) ET "technician"의 솜씨; (4) 공란우의 과배란처리에 사용되는 hormone의 지배; (5) 공란우와 수란우간의 발정주기 동기화; (6) hormone 유기나 자연발정주기 수란우의 선택. 이들로부터 생산된 수정란의 동결보존에 대한 감수성은 차이가 없다. 그러나 생쥐의 실험에서 다른 계통으로부터 생산된 수정란은 그런 차이를 나타냈다고 보고되었다. 여러가지 계통의 소에서 나온 수정란들간에는 막 변이 또는 지질 함유량 같은 본래의 생리적 차이가 동결에 대한 감수성에 어떤 다른 차이를 가져올 가능성이 있다. 예를 들어 사람에서 각각 남성의 정자는 동결에 대해 감수성이 다른 것으로 알려져 있다. 그러므로 계통이 다른 것들간의 수정란은 유의적인 차이가 있을 수 있다.

그렇지만, 각각 다른 공란우로부터 생산된 수정란은 동결에 대한 감수성도 각각 차이가 있을 것이라는 추정을 할 수 있다. 예를 들어, Table 1에서는 공란우로부터 여러 번 채란하여 동결된 수정란의 임신율을 나타냈다. 비록 각각의 채란에서의 임신율이 낮게는 0~20%에서 높게는 64~80%까지 나타났지만, 각각 공란우들의 sample size가 충분히 비교할 수 있을 만큼 충분하며, 공란우 모두 약 45%의 임신율을 나타냈다.

수정란의 발달 단계 또는 "질"에 따라 동결에 대한 감수성은 차이가 있다는 것이 일반적으로 알려져 있다. 실제로 이것은 아주 양질의 수정란만이 동결에 이용되는 것으로 알 수 있다. 질이 안 좋은 수정란은 낮은 임신율 때문에 동결에 이용하지 않고 버릴 수 있다. 신선란에서 임신 가능한 란은 수정란의 형태적 질과 관련이 깊은 것으로 잘 알려져 있다. 비슷한 결과가 사람의 수정란에서 보고되고 있다. 그러나 신선란과 동결된 수정란간의 임신결과의 비교는 동결전 이들의 등급에 기반을 두고 있기 때문에 이것은 옳지 않을 수도 있다. 실제로 동결수정란의 임신율은 신선란보다 낮다; 그러나 수정란의 질에 대한 임신율은 신선란과 동결란에서 비례적으로 같은 것으로 나타났다. 수정란의 발달단계도 역시 동결에 대해 매우 중요한 변이 요인이다. 현재 대부분의 상업적인 ET농장에서 인공수정 6~8일에 비외과적으로 소 수정란을 채란하고 있다. 그래서 동결의 발달단계는 초기 상실배(~32에서 64 blastomeres)에서 확장 배반포 (>100에서 175 blastomeres with enlarged blastocoel cavities) 사이의 범위에 있다. Table 2는 각각 다른 발달단계(동결전 수정란의 질이 좋은 것에서부터 나쁜 것까지)의 수정란을 glycerol로 동결 용해후 직접이식에 의한 임신의 결과로서 다른 단계의 수정란은 동결 감수성에 대해 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

수정란의 초기발달이 IVF를 통하여 가능하게 됨으로서 발달단계에 따른 동결의 감수성에 대해 명확한 차이가 나타나게 되었다. 이것은 수정란의 여러 발달단계마다 침투성에 대해 차이가 나타나는 것에 원인이 있을 것이다.

Table 1. Pregnancies by Transfer of Frozen-Thawed Bovine Embryos

| Donor | Collection | #Preg/#Thaw by Collection | #Preg/#Thaw by Donor | Pregnancy(%) |
|-------|------------|------------------------------|-------------------------|--------------|
| A | 1 | 7/12 | 8/19 | 42 |
| | 2 | 1/5 | | |
| | 3 | 0/2 | | |
| B | 1 | 7/20 | 12/32 | 38 |
| | 2 | 2/3 | | |
| | 3 | 4/10 | | |
| C | 1 | 0/2 | 8/17 | 47 |
| | 2 | 4/5 | | |
| | 3 | 3/9 | | |
| D | 1 | 7/11 | 11/26 | 42 |
| | 2 | 3/10 | | |
| | 3 | 1/5 | | |
| E | 1 | 2/3 | 6/11 | 55 |
| | 2 | 2/4 | | |
| | 3 | 2/4 | | |
| F | 1 | 4/14 | 14/40 | 35 |
| | 2 | 3/8 | | |
| | 3 | 5/8 | | |
| | 4 | 2/10 | | |
| Total | | | 59/145 | 40.7 |

Table 2. Pregnancies from Frozen-thawed Bovine Embryos with Respect to Embryo Stage when Frozen. All Grades of a Given Stage were Pooled.

| Embryo Stage | Pregnant/Thawed | Pregnant(%) |
|------------------|-----------------|-------------|
| Late Morula | 168 / 398 | 42.2 |
| Early Blastocyst | 103 / 272 | 37.9 |
| Late Blastocyst | 43 / 112 | 36.8 |

2. 동해방지제의 첨가(CPAs) : Dimethyl sulfoxide(DMSO), glycerol, propylene glycol을 비롯한 여러 가지 용액들이 수정란의 동결액에 대한 손상을 방지하는데 사용되었다. 이들 동해방지제들은 여러 가지 일반적인 특징들을 가지고 있다. 낮은 분자량이나 물에 대한 높은 용해성, 수정란에 대해 독성이 없으며, 빨리 수정란에 침투할 수 있는 등이 그것이다. 이들의 낮은 분자량과 높은 용해성은 $-40 \sim -50^{\circ}\text{C}$ 같이 낮은 온도에서 용액의 동결점을 감소시키는 것을 의미한다. 그러므로, 완만동결동안 이들 낮은 온도에서도 액체의 상태로 존재하여, 수정란이 탈수되는 시간을 갖는 것이다. 낮은 독성은 수정란이 이 액의 molar 농도에 노출됨으로 인한 손상이 없게 하는 것을 의미한다. 그러나 실제로 20°C 또는 그 이상의 온도에 수정란의 노출이 계속되면 높은 동해방지제에 수정란이 노출되기 때문에 비-생리학적 농도에서 수정란의 대사가 시작될 것이다. 이것은 액 자체가 독성이 있는 것이 아니라 오히려 수정란이 이러한 CPAs에서 발달을 유지하므로 인해 손상을 받을 수 있는 것을 뜻한다. 그러나 이들 동해방지제가 수정란에 침투함으로써 삼투압 충격에 민감한 반응을 보일 것이다.

약 5년전까지 대부분의 소 수정란은 약 1.5M의 glycerol 용액에 동결되었다. PAs의 다단계 또는 일단계 첨가가 동결된 소 수정란의 생존에 미치는 영향에 대한 비교는 아주 약간의 차이가 있거나 또는 없다. 그러나 수정란이 동결후 glycerol 같이 높은 농도의 액에서 낮은 액으로 급속히 희석되었을 때 삼투압 충격에 의한 손상을 받을 수 있다. 이 현상은 모든 포유동물의 세포에서 세포외액보다 세포내액의 농도가 더 높음으로 해서 나타나는 현상이다. 물은 세포내의 glycerol이 남아있는 상태에서 더 빨리 세포내로 침투한다. 수정란에 대한 물과 용액의 침투성은 상대적이므로, 세포의 부피가 증가됨으로 인해 수정란의 내성이 없어져 수정란은 파열된다. 소 수정란은 glycerol에 대해 상대적으로 덜 침투적이므로 glycerol액에서 등장액의 식염수에 바로 직접 희석되었을 때 삼투압 충격에 더 민감한 반응을 나타낸다. 그러나 glycerol 보다 DMSO에서 희석되었을 때 삼투압 충격에 더 민감하다. glycerol과 DMSO에 대한 소 수정란의 침투성 차이는 동해방지제의 하나의 중요한 현상이다. 이들은 동결동안 보호제로서는 동등한 효과가 있다. 그러나 수정란이 다른 동결액보다 어떤 한 동결액에 더 침투성이 높다면 이전의 희석시 삼투압 충격보다 훨씬 덜 민감하게 될 것이다. 1992년 이래로 소 수정란은 ethylene glycol 또는 propylene glycol을 동해방지제로 더 많이 이용하게 되었다. 이들 두가지의 glycols은 낮은 분자량을 가지고 있으며 PBS에 용해성이 좋으며, -40°C 또는 그 이하의 온도에서 용액의 동결점을 낮추어주며 수정란에 독성이 없다. 이것은 수정란이 이 glycols의 1~2M용액에서 효과적으로 동결할 수 있는 것을 의미한다. 더 중요한 것은, 포유동물 수정란은 glycols에 매우 높은 침투성을 갖고 있다는 것이다. 이것은 수정란이 이 용액으로 동결 용해후 삼투압 충격의 손상 없이 수란우에 직접 이식할 수 있다는 것이다. 소 수정란의 동해방지제로서 ethylene glycol의 사용은 지난 몇 년동안 매우 일반화 되었다. 실제로, 이것은 소 수정란을 인공수정하는 방법과 매우 흡사하게 이식할 수 있게 되는 것을 의미한다.

3. 식 빙 : 수정란 동결에서 seeding에 대한 이론과 실체는 최근에 잘 설명되어있는 것들이 많다. 이것은 중요지만 아직 수정란의 동결단계에서 잘못이해하고 있는 경우가 많다. 간단히 이것은 액이 동결점 이하로 냉각되었을 때 인위적 조절에 의해 결정화를 유도시키는 방법이다.

0°C 이하에서 액체는 자연적으로 동결된다. 그러나 자연적인 결정이 발생하는 온도는 매우 넓어 높게는 -3°C에서 낮게는 -20°C까지이다. 식빙과정은 액의 농도가 증가함으로 인해 액체의 상태가 변화되는 과정이다. 수정란은 세포액의 소실에 의한 삼투압반응을 나타낸다. 만일 식빙후 수정란의 삼투압 평형에 충분한 시간이 주어진다면, -4°C에서 -10°C의 식빙온도간의 근소한 차이들은 수정란의 생존에 영향이 거의 없다. 더 나아가서 식빙에 의한 결정화의 결과로 잔존열의 방출로 인해 수정란의 손상에 영향을 주는 주장은 아직 증거가 충분치 않다. 수정란의 식빙은 수정란의 동결에서 스트로 내부에 어떤 화학적 또는 결정을 포괄함으로 인해 수동으로 또는 동결기구에서 자동으로 이루어진다. 자연적인 결정화는 또한 sample의 양에 따라 달라진다. 그러므로, 수정란 동결에서 straw내의 양은 <0.1 ml 또는 그보다 작은 양이 과냉각 되기가 쉽다 즉 계획적인 식빙이 가능하다. 수정란 동결에서 양이 >0.5 ml 또는 그보다 많으면 과냉각이 안될 것이므로 오히려 높은 영하의 온도에서 자연적으로 발생하기 때문에 의도적인 결정화는 필요하지 않게 된다. 어떤 방법이든지 식빙은 완만동결 수정란의 생존율을 높이는데 필요한 것으로 보인다.

4. 영하온도에서의 동결속도 : 최초의 확실한 소 수정란 동결 방법은 1978년 Willadsen의 -6°C에서 -35°C사이에서 0.3°C/min 속도로 사용한 것이다. 그 이후로 대부분의 보고들은 그의 방법을 따르고 있다. 단지 몇몇 연구자들만이 빠른 동결 속도가 소 수정란의 생존에 미치는 영향을 연구하고 있다. 최근의 연구들은 소 수정란의 최대 생존율이 매우 낮은 동결속도에서 나오고 있다. 한가지 중요한 실제 결과들은 -7°C에서 -35°C사이의 동결속도를 2°C 와 0.3°C/min로 사용해서 이전에는 14분이 필요했던 것에 반하여 최근에는 약 95분이 필요하다는 것이다. 유리한 이점에도 불구하고 소 수정란의 동결에는 매우 낮은 동결속도가 사용되고 있다.

5. "침적온도" : 완만동결된 수정란을 액체질소에 담글 때 온도의 영향을 직접 검사하는 것은 주의를 기울여야 한다. 예전에, Willadsen의 최초의 방법은 소 수정란을 동결시킬 때 -35°C이하에서 0.1°C/min 속도로 냉각시키는 힘든 과정을 거쳤다는 것이다. 사실, 그의 의도는 -35°C에서 30분 동안 온도를 고정시키려는 의도에서 시작되었다. 그러므로서 수정란이 삼투압 평형을 유지하도록 하는 것이다. 그러나 그가 사용한 동결기는 0°C/min에서 동결을 할 수 없었던 것이었다. 즉 냉각유지가 안되었다. 0.1°C/min의 속도가 사용 가능한 최저의 속도였다. 그럼에도 불구하고 많은 연구자들은 약 35°C부터 더 낮은 온도로의 동결 속도의 비교를 해오고 있었다. 일반적으로 이 실험의 결과가 확립되어진 것은 아니다. 세포외액의 농도가 최대인 경우, 그리고 그러므로서 훨씬 높은 영하의 온도에서 발생할 수 있는 수정란의 최대 삼투압 수축이 발생할 수 있다는 것은 놀라운 것이 아니다. 간단히 말해서, 기본원리에 충실한다면 완만동결이 약 -25°C에서 -40°C의 넓은 영하 온도범위에서 끝내도 모두 같은 결과를 얻을 수 있다는 것을 알게 될 것이다. 실험결과들은 이것들을 예상할 수 있을 것이다. 결국, 실제로 소 수정란 동결의 성공에 필요한 시간을 단축할 수 있다는 것을 함축하는 것이다.

6. 동결 수정란의 저장 : 만일 동결 수정란이 -80°C에 5일 까지의 저장에는 높은 생존율을 갖고 있지만, 오랜 기간 저장하려면 유리화의 변화온도인 약 -130°C이하의 온도가 필요하다.

실제로 쉽고 안전한 방법은 동결된 수정란을 -196°C 의 액체질소에 저장하는 것이다. 생쥐 수정란은 이 온도에서 저장하면 24시간이상 높은 생존율을 나타내고 15년 이상 저장할 수 있다. 실제로 13년 이상 액체질소에 저장된 생쥐 수정란으로부터 새끼가 생산되었다. 동결된 수정란의 평가는 중요하다. 특히 플라스틱 스트로에 동결된 것은 실온에 매우 약간만이라도 노출된다면 많은 영향을 받을 것이다. 예를 들어 1/4ml의 -196°C 의 플라스틱 스트로는 최소 5초 동안 -100°C 이상에 노출되면 용해된다. 만일 동결된 수정란이 짧은 시간에 녹는다면 그리고 이것을 다시 액체질소에 넣는다면 되돌릴 수 없는 손상을 받을 것이다. 그러므로 수정란 동결보존에 절대적으로 중요한 것은 동결된 수정란이 용해하여 사용할 때까지 항상 액체질소에 담겨진 채로 유지하는 것이다.

7. Warning Rates : 최적의 생존을 위해서 적정 냉각속도가 요구되는 것과 같이 적정 용해속도 역시 중요하다. 일반적으로 -196°C 에서 급속냉각 하기전의 $-30^{\circ}\text{C} \sim -40^{\circ}\text{C}$ 까지 완만한 속도로 냉각된 수정란에 있어서는 최적의 생존성을 위해서 최소 $200 \sim 350^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 정도의 급속용해가 요구된다. -60°C 또는 그 이하로 완만 냉각된 수정란은 약 $25^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 이하로 보다 완만 용해속도가 요구된다. 샘플의 양, 수정란 용기 그리고 소 수정란의 용해 속도에 반응하는 동해방지제의 영향을 인식하는 것이 중요하다. 유리 앰플에서 약 0.5ml 용액으로 동결된 수정란은 온수내로 바로 침지하여 $350^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 정도의 속도로 용해되나, 비슷하게 처리하여 플라스틱 스트로에 0.05ml 의 용액으로 동결된 수정란은 $2,500^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 속도로 용해된다. 이와 같이 다른 용해속도는 중요한 생물학적인 영향을 미친다. 더 나아가 온수내로 침지하기전 약 10~15초동안 공기중에 노출시킨 동결수정란은 액체질소로부터 꺼내어 직접 온수 내로 침지하는 수정란에 비해 사실상 다른 용해속도를 나타낸다는 것을 인지해야 한다. 만일 수정란이 글리세롤액에서 동결되었을 때, 수정란은 이러한 용해속도로 용해시 생존할 수 없다. 반대로 ethylene glycol액에서 동결된 수정란은 glycerol액에서 동결된 수정란보다 빠른 속도로 용해시 높은 생존율을 나타낸다.

8. 동해방지제의 희석 : 이 단계는 수정란 동결보존에 관한 최종단계이나 흔히 소홀히 하기 쉽다. 수정란은 1~8Molar농도 범위의 동해방지제에서 동결 보존된다. 궁극적으로 모든 동해방지제는 그들이 냉각되기 전에 수정란을 침투한다. 일반적으로 만일 수정란이 동해방지제로부터 급속하게 희석될 때, 수정란은 삼투성 쇼크를 받게되며 그 결과 손상을 받거나 죽게 된다. 흔히 동결 보존된 수정란을 동해방지제로부터 희석시키기 위하여 원만 단계 희석법이 이용되었다. 비록 이 방법이 실제적으로 이용이 되나 매우 시간이 많이 소요되며 힘든 과정을 거치게 된다. 보다 효과적이며 간편한 방법은 삼투성 쇼크를 감소시키기 위하여 삼투성 완충제로서 sucrose와 같은 비침투성 용액을 이용하는 것이다. 이러한 일단계 희석법이 수정란이 원래 동결된 스트로 내에서 이루어질 수 있음이 확인되었다. 이러한 것의 응용이 삼투성 쇼크를 감소시키기 위해서 동해방지제에 sucrose를 첨가시켜 동해방지제를 2단계 또는 3단계 희석을 하는 것이다. 동결수정란으로부터 동해방지제를 보다 효과적으로 제거하는 방법이 앞으로 소개될 것은 의심할 바가 없다. 요컨대 확실한 기초적인 원리의 적용이 소 동결수정란의 생존율을 향상시킬 수 있을 것이다.

실제적으로 고려할 사항

1. 멸균 : 수정란이식의 모든 절차에 있어 무균적인 기술이 요구되는 것은 상식적인 일이다. 확실하게 수정란을 부유시키는 동해방지제액을 포함하는 모든 배지는 멸균되어야 한다. 그러나 대부분의 동해방지제는 미생물이 급속하게 자랄 가능성이 없는 고농도로 사용 된다는 점은 역시 인식해야 한다. 더구나 수정란은 정상적으로 0℃ 이하로 냉각되기 전에 매우 짧은 시간동안 동해방지제에 노출된다. 이것은 동해방지제에 존재하는 감염원이 실제 이러한 용액에서 성장 및 분화할 수 있는 시간이 매우 짧다는 것을 의미한다. 수정란을 회수하거나 또는 세척하는데 흔히 이용되는 혈청이나 다른 단백질을 함유한 등장용액에 훨씬 더 위험성이 존재한다. 이러한 용액의 멸균성을 유지하는 것에 매우 주의해야 한다. 비록 냉장고에서 4℃로 보관되었을 때도 이러한 용액들은 쉽게 오염될 수 있으며 매우 다양한 종류의 미생물의 성장을 야기시킬 수 있다. 일단 오염이 의심되면 즉 혼탁하게 되면 모든 용액은 폐기되어야 한다.

2. 수정란 용기 : 초기에는 수정란이 보통 작은 유리 앰플에서 동결 보존되었으나 이후에 플라스틱 동결용기로 대체되었다. 약 15년전에, 소 정액을 동결시키기 위하여 사용된 플라스틱 스트로가 마찬가지로 수정란의 동결보존을 위하여 도입되었다. 각 타입의 용기는 뚜렷한 장점과 결점을 가진다. 유리앰플은 쉽게 멸균되며 열전도성이 좋으나 완전하게 봉하는 것이 어려우며, 용해 중 파손될 수 있다. 플라스틱, 스트로는 안전하게 봉하는 것이 쉬운 반면 열전도성이 불량하여 이것을 온수에 침지할 때조차 급속하게 용해될 수 없다. 플라스틱 스트로는 또한 저장용적이 보다 적다. 그러나 매우 얇은 벽이 그들이 매우 쉽게 손상 받을 수 있으며 샘플의 동결 후 취급도중 부적절한 용해에 의해 손상을 받을 수 있다. 주어진 절차에 이용되는 용기의 종류에 대한 지침이 반드시 주어져야 한다. 동결된 샘플이 액체질소로부터 온수에 직접 침지할때의 용해속도는 매우 변화된다는 점은 위에서 언급되었다. 이러한 차이가 수정란의 매우 다른 생존율을 나타낼 수 있다.

3. 동결시간 : 위에서 언급하였듯이 냉각속도의 작은 차이가 수정란 동결을 위하여 요구되는 시간에 많은 차이를 초래할 수 있다. 상업적인 측면에서 시간은 돈이다. 그러나 다시 여기서는 만일 전반적인 수태율이 저조할 경우 짧은시간의 절약이 매우 값비싼 손실을 초래할 수 있다. 그러므로 만약 수정란의 생존성에 위험성을 줄 수 있는 가능성이 있다면 동결을 위한 시간의 단축은 바람직하지 않다는데 주의해야 한다. 이것은 특히 비평형에 의한 수정란을 동결시키는 새로운 동결법에 해당될 수 있다. 급속 동결법은 동결에 소요되는 시간이 단지 몇분만 소요된다. 그러나 이러한 방법은 관례적인 완만동결법에 비해서 사소한 실수에 보다 손상을 받기 쉽다. 더군다나 2℃/분의 지속적인 완만동결은 단지 15분 정도가 소요되며 이 시간은 급속동결시의 수정란 처리과정에 소요되는 시간에 비해 그렇게 많이 소요되는 시간은 아니다.

4. 동결기 : 포유동물의 동결을 위해서 믿음만하고 성능이 우수한 기구들이 다양하게 생산되었다. 어떤 종류에서는 샘플구획이 조절된 가스로서 냉각되며, 다른 종류에서는 샘플이 들어있는 챔버가 액체질소에 의한 냉각효과를 히터로 조절시킴으로서 냉각되며, 또한 어떤 것은 챔버가 전기온도조절장치에 의해 냉각된다. 이 모든 것이 수정란의 동결을 위해서 성공적으로

이용되었다. 모든 종류의 동결기는 장점 및 결점을 동시에 가지고 있다. 기계적인 또는 전기적인 파손에 가장 민감하지 않는 가장 값싸고 믿을 수 있는 기구가 선택되는 것으로 여겨진다. 또한 동결기를 구입시 전원, 중량 및 이동성, 전기 및 기계적 신뢰성 그리고 1회 동결할 수 있는 샘플의 수 등의 유용성에 대하여 고려해야 한다는 사실을 명심해야 한다. 동결기가 수정란을 동결에 이용될 때 동결기 자체보다도 더 중요한 것은 세포동결학의 기초원리에 대한 이해이다.

5. 기타의 실제적인 고려 사항 : 수정란동결에 있어 성공여부는 보통 동결수정란의 이식에 의한 수태율의 관점으로 평가된다. 그러나 다른 요인도 역시 고려되어야 하는데 예를들면 각 수정란을 정확하게 확인하는데 주의를 기울여야 한다. 우수한 순종 우군의 축주가 만일 그의 수란우에서 수정란이식 9개월 후에 잡종의 송아지가 태어난다면 동결수정란을 이용한 높은 수태율에 감동을 받지 않을 것이다. 신중한 기록유지와 결과의 정확한 통계학적인 분석이 마찬가지로 중요하다. 수정란 동결보존의 효능성은 항상 만일 그 수정란이 동결되지 않았을 경우의 해당 공란우의 가능성 있는 송아지의 생산에 대비하여 측정되어야 한다. 일반적으로 수정란이식의 주된 목적은 특정 공란 종빈우와 종모우의 교배에 의한 유전능력을 향상시키는 것이다. 그러므로 수정란동결의 궁극적인 목표는 그 채란 당시의 동결수정란으로부터 생산되는 생존 송아지수의 견지에서 계산되어야 한다.

결 론

소 수정란의 동결보존에 상당한 진보가 이루어졌다. 완전한 축군이 동결-융해 수정란의 이식으로 형성되었으며 수정란의 동결 및 융해에 이용되는 방법은 보다 간편하고 믿을 수 있게 되었다. 소 번식과 관련되어 새롭고 극적인 진보가 야외적용에 도입되었듯이 수정란 동결보존이 점점 중요하게 될 것이다. 예를들면 난포란의 체외성숙 및 수정 유래 복제 및 형질전환 수정란으로부터 생산된 유전공학 소의 대규모 생산도 이와 같은 매우 유용한 수정란이 그들의 기능적인 생존성의 소실없이 동결 보존될 수 있을 때 비로소 상업적으로 이용될 것이다. 수정란의 동결보존의 기초적이고 실제적인 두 가지 측면의 올바른 이해가 소에 있어 이러한 새로운 기술의 적용이 성공하는데 기여할 것이다.