

돼지 未成熟 卵자의 急速凍結 融解후 體外受精率과 生存率에 관한 研究

吳元鎮 · 丁永浩* · 金相根** · 李揆丞***

忠南大學校 大學院

Studies on the *In-Vitro* Fertilization and Survival Rate of Rapidly Frozen Porcine Immature Embryos

Oh W. J., Y. H. Chung*, S. K. Kim** and K. S. Lee***

Graduate School, Chungnam Natl. Univ.

SUMMARY

This study was carried out to investigate the *in-vitro* fertilization rate survival rate of rapidly frozen porcine immature embryos. The porcine embryos following dehydration by cryoprotectants containing sucrose were directly plunged into liquid nitrogen and thawed in 30°C water bath. Survival rate was defined as development rate on vitro culture or FDA test.

The results are summarized as follows :

1. The *in vitro* fertilization rate of all frozen immature oocytes(6.7~26.7%) was very low, 35.0% of unfrozen oocytes and the rate of immature oocytes was very higher than that of mature oocytes.
2. The survival rate of all frozen immature oocytes(10.3~25.0%, 13.3~30.0%) was very low, 45% of unfrozen oocytes and the rate of immature oocytes was slightly higher than that of mature oocytes.

I. 緒 論

未受精 卵胞卵의 凍結保存에 관한 연구는 成熟卵 (Schmidt등, 1993; Leibo, 1987) 또는 未成熟卵 (Suzuki와 Nishikata, 1992; Rubinski등, 1991; van Blerkom, 1989)의 동결 용해후 生存性에 대해 보고되었으나 보고자간에 연구결과의 차이가 많았다. Rall (1992)과 Hamlett 등(1989)은 耐凍劑에 노출되어 냉각중 metaphase I 또는 II 단계에서 紡錘絲와 被層顆粒의 파괴에 따른 손상을 보고하였고, Mazur

(1970)는 동결과정중 세포내 氷形成과 溶媒의 영향이 세포 사멸의 주된 원인이 되기 때문에 適正 平衡時間이 필요함을 보고하였고, Renard 등(1984)은 非透透性 凍結保護劑인 sucrose 첨가에 의해 단시간 평형에 의한 동결이 가능한 2단계 凍結法을 보고하였다. 未成熟 또는 成熟卵자의 凍結에 있어서 Taha와 Schell-ander (1992)는 소의 未成熟 卵胞卵과 體外成熟 卵胞卵이 20~60초간 평형시 卵割率과 胚盤胞 형성율에는 차이가 없었으나 5~10분 평형시 未成熟 卵胞卵은 전혀 卵割이 일어나지 않는 결과를 미루어 볼 때 適正 平

* : 中部大學 動物資源學科(Dept. of Anim. Sci., Joongbu Univ.)

** : 忠南大學校 獸醫科大學(Coll. of Vet. Med., Chungnam Natl. Univ.)

*** : 忠南大學校 農科大學(Coll. of Agri., Chungnam Natl. Univ.)

衡時間은 짧아야 한다고 보고하였다. 그러나 受精卵의 동결에 있어서 急速凍結法은 생존성이 극히 낮아 實用化에 많은 어려움이 있으며, 특히 돼지 受精卵은 實驗動物이나 다른 家畜 受精卵에 비하여 凍結保存에 많은 문제점들을 내포하고 있어 生存성이 저조하여 이의 改善과 凍結保存 技術의 確立이 시급한 과제라고 생각된다.

이에, 본 研究는 돼지 未成熟 卵胞卵의 急速凍結 融解에 따른 生存성에 미치는 影響을 究明하고자 실시하였다.

II. 材料 및 方法

1. 材 料

1) 卵胞卵의 回收

屠殺直後의 成熟 雌豚으로부터 卵巢를 적출하여, 100 IU/ml의 penicillin G와, 100 µg/ml의 streptomycin sulfate를 첨가한 38°C의 生理食鹽水에 침지하여 실험실로 옮겨 19-guage 주사기로 2~5 mm 크기의 정상 난포로부터 卵胞液을 흡입하여 시계접시에 채취한 후 實體顯微鏡(40×) 하에서 형태적으로 우수한 卵胞卵을 선별하여 回收하였다.

2) 培養液

TCM-199(Whittaker, M. A. Bioproducts Co., USA)를 기본 배양액으로 하여 배양액에 10%(v/v)의 FCS(Sigma Co., USA)와 1 µg/ml의 FSH(Sigma Co., USA), 2 IU/ml의 hCG(Sigma Co., USA), 1 µg/ml의 β-estradiol(Sigma Co., USA), 100 IU/ml의 penicillin G 및 100 µg/ml의 streptomycin sulfate가 첨가된 TCM-199 배양액을 이용하여 사용하기전 멸균 여과시킨 후 사용하였다.

2. 方 法

1) 未成熟 卵胞卵의 凍結 및 融解

卵胞卵을 回收하여 1시간, 12시간, 24시간 및 48시간동안 體外成熟시킨 未受精 卵胞卵을 각 농도의 耐凍劑 + 0.25M sucrose + 20% FCS + TCM-199 배양액의 조성으로 제조한 凍結液으로 각각 5분간 평형

시킨 후 0.25 ml straw내에 充填하고 봉인하여 labeling 한 후 1cm 높이의 액체질소 부표위에 straw를 놓아 5분간 豫冷시킨 다음 液體窒素에 즉시 浸漬함으로써 急速凍結를 실시하였다. 凍結 卵胞卵의 融解는 straw를 실온에 30초간 방치한 다음 30°C 溫水槽의 溫水에서 融解後 거꾸로 흔들어 10분간 방치한 후 내용물 전체를 petri dish에 옮겨 신선한 기본 배양액으로 2~3회 세척하였다.

2) 凍結 卵胞卵의 體外成熟과 體外受精

凍結 卵胞卵의 體外成熟은 회수한 卵胞卵을 배양액으로 3회 세척한 후 50µl의 배양액 小滴당 5개의 卵胞卵을 주입하여 mineral oil로 피복하여 40~48시간 배양한 다음 수정용 배양액으로 3회 세척한 후, 45 µl의 배양액 小滴에 5개의 卵胞卵과 精巢上體로 부터 채취한 精子浮游液 0.01 ml와 BO액 2 ml을 잘 혼합하여 배양기에서 1시간 swim up 시킨 다음 약 0.5 ml의 上層液을 2,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 침전된 精子 pellets을 동량의 heparin 용액(100 µg/ml, Sigma Co., USA)과 함께 혼합하여 CO₂ 배양기에서 受精能獲得을 유기시킨 精子浮游液 2 µl(1~5 × 10⁶ ml)을 주입하고 mineral oil로 피복한 다음 6~7시간 동안의 媒精으로 수정시켰다.

3) 凍結 卵胞卵의 體外受精率과 生存率의 判定

凍結 卵胞卵은 체외수정후 24~32시간재에 수정 여부를 Shea등(1976)과 Ball등(1983)의 방법에 따라 수정 여부를 판정하였으며, 생존율의 판정은 FDA (fluorescence diacetate)-test에 의해 生存與否를 판정하거나, 배양을 통해 發生狀態를 관찰하면서 판정하였다(Schilling등, 1982).

III. 結果 및 考察

1. 未成熟 卵胞卵의 急速凍結 融解후의 生存性

1) 未成熟 卵胞卵의 體外受精率

卵胞卵을 回收하여 1시간, 12시간, 24시간 및 48시간동안 體外成熟시킨 未受精 卵胞卵을 동결 응해후 각각 배양을 통해 성숙시킨 卵胞卵과 受精能獲得 精子와 체외 수정시켰을 때 體外受精率은 Table 1과 같다.

채란된 卵胞卵을 각각 1시간, 12시간, 24시간 및 48 시간동안 성숙 배양후 1.5M DMSO + 2.0M glycerol + 0.25M sucrose의 耐凍劑로 동결 용해후 체외배양시의 체외 成熟率은 각각 46.7, 40.0, 33.3, 23.3%였으며, 체외성숙 卵胞卵과 受精能獲得 精子和 수정시켰을 때 體外受精率은 각각 26.7, 20.0, 13.3 및 6.7%로서 대체로 回收후 시간이 경과되지 않은 未成熟 卵胞卵을 동결 용해후 수정하였을 때 높은 受精率을 나타냈다. 그러나 대조군의 非凍結 卵胞卵의 체외수정율인 35.0%에 비해서는 낮은 生存率을 나타냈다.

이러한 결과들은, 생쥐 배란 卵子 또는 未成熟 卵子를 체외에서 성숙시킨 후 동결 용해하여 얻은 Friedler 등(1988), Carroll 등(1989), Kono 등(1991), Shaw 등(1992) 등의 결과와는 상이한 성적이었다. 한편, Rall(1992)과 Hamlett 등(1989)은 내동제에 노출되어 냉각중 metaphase I 또는 II단계에서 紡錘絲와 被層顆粒의 파괴에 대한 손상을 보고하였으며 Mazur(1970)는 동결과정중 세포내 氷形成과 溶媒의 영향이 세포사멸의 주된 원인이 되기 때문에 적정한 平衡時間이 필요한 것으로 사료된다.

2) 未成熟 卵子의 生存率

卵胞卵을 회수후 1, 12, 24 및 48시간 동안 體外成熟시킨 卵胞卵을 동결시킨 후 각각 용해하여 체외에서 수정시킨 후 FDA-test에 의해 生存율을 판정하였을

때 生存率은 Tabel 2와 같다.

凍結 未成熟 卵胞卵을 1.5M DMSO + 2.0M glycerol + 0.25M sucrose와 2.0M DMSO + 1.5M glycerol + 0.25M sucrose의 내동제로 급속동결 용해후 수정시켰을 때 生存率은 각각 25.0와 30.0%, 21.7와 16.7%, 16.7와 13.3%, 10.3와 13.3%로서 非凍結 卵胞卵의 生存率 45.0%보다 낮은 生存율을 나타냈다.

이러한 결과는 돼지 未成熟 卵胞卵을 동결 용해하였을 때 生存率은 細胞質과 卵丘細胞가 모두 생존한 卵胞卵은 없었고, 卵丘細胞 生存率은 53%, 細胞質 및 卵丘細胞 사멸률은 47%로 생존성이 거의 없다고 한 Didin 등(1990)과 Schroeder 등(1990)의 결과에 비해서는 높은 성적이었으나, 소 未成熟 卵胞卵을 동결 용해하였을 때 生存率은 88.9%라고 한 Schellander 등(1988)의 결과에 비해서는 아주 저조한 결과였다. 한편, Kono등(1991)은 생쥐 卵胞卵을 고농도 凍結液으로 동결 용해하였을 때 83%가 정상형태의 유지가 가능하였다고 하였으며, Schroeder등(1990)은 생쥐 배란 난자와 卵核胞期의 난포란을 동결 용해하였을 때 정상적 형태를 가진 排卵 成熟卵子에서 生存율이 훨씬 높았다고 보고하였다.

未成熟 卵胞卵을 동결 용해에 따른 生存성에 관해서는 대상 試驗動物과 研究者에 따라서 연구결과에 현저한 차이가 있는것은 卵子의 狀態, 耐凍劑의 種類와 濃

Table 1. Effects of cryoprotectants on *in vitro* maturation and fertilization rate of rapidly frozen immature porcine oocytes

Culture of oocytes	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured(%)	No. of oocytes fertilized(%)
Control	20	13(65.0)	7(35.0)
Frozen-immature oocytes(1 hr.)	30	14(46.7)	8(26.7)
Frozen-immature oocytes(12 hr.)	30	12(40.0)	6(20.0)
Frozen-immature oocytes(24 hr.)	30	10(33.3)	4(13.3)
Frozen-mature oocytes(48 hr.)	30	7(23.3)	2(6.7)

Table 2. Effects of cryoprotectants in the freezing medium on the survival rate of rapidly frozen immature porcine oocytes

Freezing medium	Culture of oocytes	No. of oocytes examined	Degree of FDA test						Survival rate(%)
			A	B	C	D	E	F	
	Control	20	0	7	3	1	4	5	9(45.0)
1.5 M D +	1 hr.	20	1	8	4	2	3	2	5(25.0)
2.0 M G	12 hr.	23	2	8	5	3	3	2	5(21.7)
0.25M S	24 hr.	30	2	10	8	5	3	2	5(16.7)
	48 hr.	29	3	10	9	4	2	1	3(10.3)
2.0 M D +	1 hr.	20	1	5	4	4	4	2	6(30.0)
1.5 M G +	12 hr.	30	1	10	7	7	3	2	5(16.7)
0.25M S	24 hr.	30	2	11	8	5	3	1	4(13.3)
	48 hr.	30	2	9	9	6	2	2	4(13.3)

도, 培養技術, 平衡時間 및 融解溫度에 따른 차이로 판단되어 앞으로 究明되어야 할 연구과제로 사료된다.

IV. 摘要

본 연구는 돼지 未成熟 卵胞卵의 急速凍結 融解후 凍수정시켰을 때 體外受精率 生存率에 미치는 影響을 究明하고자 실시하였다.

1. 未成熟 卵胞卵을 회수후 각각 1시간, 12시간, 24시간 및 48시간동안 體外배양하면서 耐凍劑로 동결 용해후 수정시켰을 때 體外受精率은 각각 6.7~26.7%로서 비동결 미성숙 난포란의 體外수정을 35.0%에 비해 저조하였으며, 또한 회수후 시간이 경과되지 않은 卵胞卵을 동결 용해후 수정하였을 때 높은 體外受精率을 나타냈다.
2. 未成熟 卵胞卵을 각각 1시간, 12시간, 24시간 및 48시간동안 體外배양하면서 耐凍劑로 동결 용해후 수정시켰을 때 生存率은 각각 10.3~25.0%, 13.3~30.0%로서 非凍結 난포란의 생존율인 45.0%보다 낮은 생존율을 나타냈다.

V. 引用文獻

1. Ball, G.D., M.L. Leibfried, R.W. Lenz, R.L. Ax, B.D. Bavister and N.L. First. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization

of bovine follicular oocytes. Biol. Reprod., 28:717-725.

2. Carroll, J., G.M. Warnes and C.D. Matthews. 1989. Increase in digyny explains polyploidy after *in-vitro* fertilization of frozen-thawed mouse oocytes. J. Reprod. Fert., 85:489-494.
3. Didin, B.A., D. Pomb, N.J. Martin, G.E. Homanics and C.L. Markert. 1990. Observation on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. J. Anim. Sci., 68:2803-2810.
4. Friedler, S., L.C. Giudice and E.J. Lamb. 1988. Cryopreservation of embryos and ova. Fertil. and Steril., 49:743-764.
5. Hamlett, D.K., D.R. Franken, H.S. Cronje and H. Luus. 1989. Murine oocyte cryopreservation : Comparison between fertilization success rates of fresh and frozen metaphase I and II oocytes. Arch. Andol., 23:27.
6. Kono, T., O.Y. Kwon and T. Nakahara. 1991. Development of vitrified mouse oocytes after *in vitro* fertilization. Cryobiology, 28: 50-54.
7. Leibo, S.P. 1987. Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos. I. The freezing of

- mammalian embryos. Siba Foundation Symposium 52, K. Elliott and J. Whelan, eds. Excerpta Medica, Amsterdam, 69-92.
8. Mazur, P. 1970. Cryobiology : The freezing of biological system. Sci, Washington D.C., 168: 939-949.
 9. Rall, W.F. 1992. Cryopreservation of oocytes and embryos ; Methods and applications. Anim. Reprod. Sci., 28:237-245.
 10. Renard, J.P., B.X. Nguyen and V. Garnier. 1984. Two-step freezing of two-cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. J. Reprod. Fert., 71:573-580.
 11. Rubinski, B., A. Arav and A.L. Devires. 1991. Cryopreservation of oocytes using directional cooling and antifreeze glycoproteins. Cryo-Letters, 12:93-106.
 12. Schellander, K., B.K. Brackett, F. Fuher and W. Schleger. 1988. *In vitro* fertilization of frozen-thawed cattle oocytes. Proc. 11th Congr. on Anim. Reprod. and A.I., June, Dublin Ireland, 26-30.
 13. Schilling, E., H. Niemann and D. Smidt. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. Cryobiology, 15:245-248.
 14. Schmidt, M., P. Hyttle, T. Greve and B. Avery. 1993. Ultrastructure of frozen thawed bovine *in vitro* matured oocytes. Theriogenology, 39:304.
 15. Schroeder, A.C., A.K. Champlin, L.E. Mobraaten and J. J. Eppig. 1990. Developmental capacity of mouse oocytes cryopreserved before and after maturation *in vitro*. J. Reprod. Fert., 89:43-50.
 16. Shaw, P.W., A.G. Benarde, B.J. Fuller., J. H. Hunter and R.W. Shaw. 1992. Vitrification of oocytes using short cryoprotectant exposure : Effects of varying exposure times on survival. Mol. Reprod. Devlop., 33:210-214.
 17. Shea, B.F., J.P.A. Latour, K.N. Berdin and R.D. Baker. 1976. Maturation *in vitro* and the subsequent fertilizability of extra follicular bovine oocytes. J. Anim. Sci., 43:809-815.
 18. Suzuki, T. and Y. Nishikata. 1992. Fertilization and cleavage of frozen thawed bovine oocytes by one step dilution method *in vitro*. Theriogenology, 37:306
 19. Taha, T.A. and K. Schellander. 1992. Developmental capacity of immature and *in vitro* matured bovine oocytes after exposure to vitrification solution. Theriogenology, 37: 307.
 20. van Blerkom, J. 1989. Maturation of high frequency of germinal vesicle-stage mouse oocytes in mice. Theriogenology, 33:365.