

## 소 미성숙 난포란의 급속동결 용해후 생존성에 관한 연구

김상근 · 이봉구\*  
충남대학교 수의학과

### Studies on the Survival Rate of Rapidly Frozen Bovine Immature Oocytes

S. K. Kim and B. K. Lee\*

College of Vet. Med., Chungnam National University

#### SUMMARY

This study was carried out to investigate on *in vitro* fertilization, survival rate and developmental rate of rapidly frozen bovine immature oocytes. Immature oocytes cultured for 1, 12, 24, 48 hours in 20% FCS + TCM-199 medium and thereafter rapidly freezing-thawed oocytes inseminated with capacitated sperm. The immature oocytes following dehydration by 1.5M DMSO + 2.0M glycerol + 0.25M sucrose + TCM 199 media + 20% FCS were directly plunged into liquid nitrogen and thaws in 30°C water. Rapid freezing embryos co-cultured in 20% FCS + TCM-199 media containing hormones(2IU/mL PMSG, 2IU/mL hCG and 1 µg/mL 17β-estradiol) and cumulus cells(1×10<sup>5-6</sup> cells). Survival rate was defined as development rate on *in vitro* culture or FDA-test.

The results are summarized as follows :

1. The *in vitro* maturation and fertilization rate of immature bovine oocytes on *in vitro* maturation period(1, 12, 24, 48 hrs) before rapid freezing-thawed were 57.1%, 45.7%, 37.1%, 25.7% and 40.0%, 31.4%, 20.0%, 11.4%, respectively.
2. The survival rate of immature bovine oocytes on *in vitro* maturation period(1, 12, 24, 48 hrs) before rapid freezing-thawed were 33.3%, 26.7%, 20.0%, and 10.0%, respectively. The survival rate of rapid freezing-thawed immature oocytes was significantly lower than that of non-freezing oocytes.
3. The survival rate of rapid freezing-thawed excellent and good bovine embryos co-cultured in 20% FCS + TCM-199 media containing hormones(PMSG, hCG, 17β-estradiol) and cumulus cells 4 to 5 hrs and 20 to 24 hrs were 35.0%, 15.0% and 25.0%, 15.0% and 40.0%, 20.0% and 30.0%, 15.0%, respectively. The survival rate of embryos co-cultured in TCM-199 media containing hormones and cumulus cells was significantly higher than that of non co-culture.

#### 서론

최근 수정란 이식분야의 산업적 이용이 가능해짐에 따라 체외수정, 쌍태유기, 성 감별, 수정란의 동결, 유전자와 핵 이식 및 복제동물 생산 등의 분야

\* 중부대학 동물자원학과(Dept. of Anim. Sci., Joongbu University)

에서 유전공학적 기법의 연구가 활발하게 수행되고 있다. 이러한 첨단기술들을 활용하여 수정란이식 기술의 이용분야를 산업화된 기술로 발전시키기 위해서는 난포란 또는 수정란의 대량 생산체계의 확립기술이 시급히 요청된다 하겠다.

난포란의 급속동결 융해에 따른 생존성에 관한 연구는 성숙란과 미성숙란의 급속동결 융해후의 체외수정율과 생존성에 대한 연구는 주로 실험동물을 대상으로 성숙란(Schmidt 등, 1993; Leibo, 1987)과 미성숙란(Suzuki와 Nishigada, 1992; Rubinski 등, 1991; van Blerkom, 1989)에 대한 연구보고가 있다.

Rall과 Hamlett등(1989)은 동결 냉각중 meta-phase I 또는 II단계에서 방추사와 표층과립의 파괴에 따른 손상을 보고하였고, Mazur(1970)는 동결과정중 세포내 빙 형성과 용매의 영향이 세포사멸의 주원인이 되므로 적정 평형시간이 요청된다고 보고하였으며, Taha와 Schellander (1992)는 미성숙 난포란과 체외성숙 소 난포란이 동결에 있어 20~60초간 평형시 난할율과 배반포 형성율에는 차이가 없었으나, 5~10분 평형시 미성숙 난포란은 전혀 난할이 일어나지 않는다고 보고하였다. Didin등(1990)은 난핵포기의 난자를 1.5M glycerol과 0.5M sucrose로 완만동결후 융해하여 24시간 배양했을 때 60%의 생존율을 나타냈다고 하였으며, 이(1993)는 동결융해된 돼지난포란의 수정후 난할율은 동결 성숙난포란이 9.3%였으며, 동결미성숙 난포란은 11.3%로서 8세포기까지의 발생은 동결 미성숙난포란이 동결 성숙난포란보다 높았다고 보고하였다. 그러나 소 미성숙난포란의 여러 단계별 동결 융해후의 수정율과 생존율에 대한 연구보고는 찾아 볼 수 없었다

이에, 본 연구는 소 미숙난포란의 급속동결 보존에 따른 생존성을 구명할 목적으로 미숙 난포란의 급속동결 융해후의 체외수정율과 생존율 및 체외발생율을 조사하고자 본 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

#### 1) 난포란의 회수

정상생식기를 가진 도살 직후의 자우로부터 난소를 적출하여 100 IU/mL의 penicillin G와, 100  $\mu$ g/mL의 streptomycin sulfate를 첨가한 38°C의 생리식염수에 침지하여 실험실로 옮겨 19-guage 주사기로 난포액을 흡입하여 petri dish에 채취한 후 실험현미경(20~40  $\times$ ) 하에서 형태적으로 우수한 난포란을 선별하여 회수하였다.

#### 2) 배양액

배양액은 TCM-199(Whittaker, M. A. Bioproducts Co., USA)액에 20%(v/v)의 FCS(Sigma Co., USA)와 2IU/mL의 PMSG(Sigma Co., USA), 2 IU/mL의 hCG(Sigma Co., USA), 1  $\mu$ g/mL의 17 $\beta$ -estradiol(Sigma Co., USA), 100 IU/mL의 penicillin G 및 100  $\mu$ g/mL의 streptomycin sulfate(Sigma Co, USA)를 첨가하여 이용하였다.

## 2. 방 법

#### 1) 난포란의 체외수정

난포란의 체외수정은 각각 1시간, 12시간, 24시간 및 48시간동안 체외성숙시킨 난포란을 급속동결 융해후 일정시간 체외성숙시킨 난포란을 45  $\mu$ L의 배양액 소적에 5개씩 주입하고, 다시 동결정액을 38°C의 항온수조에서 약 1분간 침지에 의해 융해한 정액 0.2 mL와 BO액 1 mL을 시험관에서 잘 혼합하여 배양기에서 1시간 swim up 시킨 다음 약 0.5 mL의 상층액을 2,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 침전된 정자 pellets을 같은 양의 heparin 용액(100  $\mu$ g/mL, Sigma Co., USA)과 함께 혼합하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 수정능획득을 유기시킨 정자부유액 2  $\mu$ L (1~5  $\times$  10<sup>6</sup> mL)를 주입하고 mineral oil로 피복한 다음 6~7시간 동안의 매정에 의해 수정시켰다.

#### 2) 난포란의 급속동결과 융해

미성숙 난포란의 동결은 TCM-199 배양액에 1.5M DMSO + 2.0M glycerol + 0.25M, 0.25M sucrose의 내동제 및 FCS 20%를 첨가하여 제조한 동결액으로 10분간 평형시킨 다음 0.25 mL straw(I. M.F., France)의 끝으로부터 공기, 동결보존액, 공

기, 미숙난포란 + 동결보존액, 공기, 동결보존액, 공기 순서로 충전하고 봉인하여 labelling한 후 1 cm 높이의 액체질소 부표위에 5분간 straw를 놓아 예냉시킨 다음 곧바로 액체질소에 침지하는 방법에 의하여 동결하였다.

동결 미성숙 난포란의 용해는 straw를 실온에 30 초간 방치한 다음 30℃의 온수조에서 용해후 거꾸로 흔들어 10분간 방치한 다음 내용물 전체를 petri dish에 옮겨 신선한 배양액으로 2~3회 세척하여 수정시켰다.

### 3) 수정 및 생존율의 판정

수정율의 판정은 동결 용해한 미성숙 난포란을 일정시간 체외성숙시킨 후 수정능획득 정자와 수정시켜 Shea 등(1976)과 Ball 등(1984)의 방법에 의해 수정 여부를 판정하였으며, 생존성의 판정은 용해한 난포란을 배양액으로 2~3회 세척한 다음 FDA(fluorescence diacetate) test에 의해 위상차 현미경하에서 생존 score를 산정하거나 배양을 통해 발생상태를 관찰하면서 excellent, good, fair, poor 및 degeneration으로 구분하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 미성숙 난포란의 동결 용해후의 수정율

난포란을 회수하여 각각 1시간, 12시간, 24시간 및 48시간동안 체외성숙시킨 미수정 난포란을 동결 용해했을 때의 체외성숙율과 성숙배양을 통해 성숙시킨 난포란을 수정능획득 정자와 수정시켰을 때의 체외수정율은 Table 1과 같다.

회수한 난포란을 각각 1시간, 12시간, 24시간 및 48시간동안 배양한 후 1.5M DMSO + 2.0M glycerol + 0.25M sucrose의 내동제로 급속동결 용해 후 체외배양시의 체외성숙율은 각각 57.1%, 45.7%, 37.1%, 25.7%였으며, 동결용해한 체외성숙 난포란을 수정능획득 정자와 수정시켰을 때 체외수정율은 각각 40.0%, 31.4%, 20.0% 및 11.4%로서 대체로 회수후 시간이 경과되지 않은 미성숙 난포란을 동결 용해후 수정하였을 때 높은 체외수정율을 나타냈다. 그러나 대조군인 비동결 난포란의 체외수정율인 70.0%에 비해서는 낮은 생존율을 나타냈다.

이러한 결과들은, 대상동물은 다르지만 미성숙 난자를 체외에서 성숙시킨 후 동결 용해하여 얻은 Friedler등(1988), Carroll등(1989), Kono등(1991), Shaw등(1992) 등의 결과와는 상이한 저조한 성적이었다. 한편, Rall(1992)과 Hamlett등(1989)은 내동제에 노출되어 냉각중 metaphase I 또는 II 단계에서 방추사와 피층과립의 파괴에 대한 손상을 보고하였으며 Mazur(1970)는 동결과정중 세포내빙 형성과 용매의 영향이 세포사멸의 주된 원인이 되기 때문에 적절한 평형시간이 필요하다고 하였다.

### 2. 동결 용해 난포란의 생존율

난포란을 회수한 직후 1시간, 12시간, 24시간 및 48시간동안 체외성숙시킨 난포란을 동결시킨 후 각각 용해하여 일정기간 체외성숙시킨 후 수정능획득 정자와 체외수정시킨 다음 FDA-test 또는 배양을 통해 발생상태의 관찰에 의하여 생존율을 판정한

Table 1. Effects of *in-vitro* maturation period before rapid freezing on the fertilization rate of immature bovine oocytes

| Treatment             | Culture period before freezing(hr.) | No. of oocytes examined | No. of oocytes matured(%) | No. of oocytes fertilized(%) |
|-----------------------|-------------------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------------------|
| Non-freezing          | Control <sup>a</sup>                | 20                      | 18(90.0)                  | 14(70.0)                     |
|                       | 1                                   | 35                      | 20(57.1)                  | 14(40.0)                     |
| Freezing <sup>b</sup> | 12                                  | 35                      | 16(45.7)                  | 11(31.4)                     |
|                       | 24                                  | 35                      | 13(37.1)                  | 7(20.0)                      |
|                       | 48                                  | 35                      | 9(25.7)                   | 4(11.4)                      |

<sup>a</sup> Oocytes were fertilized without freezing after *in vitro* culture for 48 hours.

<sup>b</sup> Oocytes were frozen in TCM-199 media containing 1.5M DMSO + 2.0M Glycerol + 0.25M Sucrose + 20% FCS.

Table 2. Effects of *in-vitro* maturation period on survival rate of rapidly frozen immature bovine oocytes

| Cryoprotectant <sup>a</sup> | Culture period<br>before freezing (hr.) | No. of oocytes<br>examined | Degree of FDA test |    |   |   |   |   | Survival<br>rate(%) |
|-----------------------------|---|----------------------------|--------------------|----|---|---|---|---|---------------------|
|                             |   |                            | A                  | B  | C | D | E | F |                     |
| Non-freezing                | Control <sup>b</sup>                    | 20                         | 0                  | 6  | 2 | 1 | 4 | 7 | 11(50.0)            |
|                             | 1                                       | 30                         | 2                  | 8  | 6 | 4 | 4 | 6 | 10(33.3)            |
| Freezing <sup>a</sup>       | 12                                      | 30                         | 3                  | 8  | 6 | 5 | 5 | 3 | 8(26.7)             |
|                             | 24                                      | 30                         | 2                  | 8  | 8 | 6 | 4 | 2 | 6(20.0)             |
|                             | 48                                      | 30                         | 3                  | 10 | 8 | 6 | 2 | 1 | 3(10.0)             |

<sup>a</sup> Oocytes were frozen in TCM-199 media containing 1.5M DMSO + 2.0M Glycerol + 0.25M Sucrose + 20% FCS.

<sup>b</sup> Oocytes were fertilized without freezing after *in-vitro* culture for 48 hours.

결과는 Table 2와 같다.

동결 미성숙 난포란을 1.5M DMSO + 2.0M glycerol + 0.25M sucrose로 급속동결 용해후 수정했을 때 체외성숙 시간별 생존율은 각각 33.3%와 26.7%, 20.0%, 10.0%로서 비동결 난포란의 생존율 50.0%보다 낮은 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는, 소 미성숙 난포란을 동결 용해했을 때 생존율이 88.9%라고 한 Schellander 등(1988)의 결과에 비해서는 아주 저조한 결과였다. 대상 동물은 다르지만 돼지 미성숙 난포란을 동결 용해했을 때 생존율은 세포질과 난구세포가 모두 생존한 난포란은 없었고, 난구세포 생존율은 53%, 세포질 및 난구세포 사멸율은 47%로 생존성이 거의 없다고 한 Didin 등(1990)과 Schroeder 등(1990)의 결과와는 상이한 성적이었다. 한편, Kono 등(1991)은 생쥐 난포란을 고농도 동결액으로 동결 용해했을 때 83%가 정상형태의 유지가 가능하다고 하였으며, Schroeder 등(1990)은 생쥐 배란 난자와 난핵포기의 난포란을 동결 용해했을 때 정상적 형태를

가진 배란 성숙난자에서 생존율이 훨씬 높았다고 보고하였다.

미성숙 난포란의 동결 용해에 따른 생존성에 관해서는 대상 시험동물과 연구자에 따라서 연구결과에 현저한 차이가 있는 것은 난자의 상태, 내동제의 종류와 농도, 배양기술, 평형시간 및 용해온도에 따른 동결방법의 차이로 판단되어 앞으로 구명되어야 할 연구과제로 사료된다.

### 3. 동결용해 체외수정란의 공배양

동결 용해후 체외성숙시킨 난포란과 수정능획득 정자와 수정시킨 체외수정란을 배양액에 호르몬과 난구세포를 첨가하여 각각 공배양했을 때 체외발생율은 Table 3, 4와 같다.

동결 용해한 난포란과 수정능획득 정자와 수정시킨 체외수정란을 20% FCS + TCM-199 배양액에 PMSG, hCG, 17 $\beta$ -estradiol의 호르몬을 첨가하여 4~5시간 및 20~24시간동안 공배양했을 때 excellent 및 good 배의 체외발생율은 각각 35.0%, 15.

Table 3. Effects of co-culture with hormonal supplements on the survival rate of rapidly frozen-thawed bovine embryos

| Co-culture<br>period(hr.) | No. of embryos<br>examined | Quality of frozen-thawed embryos after co-culture <sup>a</sup> |         |      |      |              |
|---------------------------|----------------------------|--|---------|------|------|--------------|
|                           |                            | Excellent  | Good    | Fair | Poor | Degeneration |
| Control <sup>b</sup>      | 14                         | 3(21.4)  | 2(14.3) | 2    | 4    | 3            |
| 4~ 5 hrs                  | 20                         | 7(35.0)  | 3(15.0) | 3    | 2    | 5            |
| 20~ 24 hrs                | 20                         | 5(25.0)  | 3(15.0) | 3    | 5    | 4            |

<sup>a</sup> Embryos were co-cultured in 20% FCS + TCM-199 media containing hormones(2IU/mL PMSG, 2 IU/mL hCG, 1  $\mu$ g/mL 17 $\beta$ -estradiol)

<sup>b</sup> Oocytes were fertilized without freezing after *in-vitro* culture for 48 hours.

Table 4. Effects of co-culture with cumulus cells supplements on the survival rate of rapidly frozen-thawed bovine embryos

| Co-culture period(hr.) | No. of embryos examined | Quality of frozen-thawed embryos after co-culture <sup>a</sup> |         |      |      |              |
|------------------------|-------------------------|--|---------|------|------|--------------|
|                        |                         | Excellent  | Good    | Fair | Poor | Degeneration |
| Control <sup>b</sup>   | 14                      | 3(21.4)  | 2(14.3) | 2    | 4    | 3            |
| 4~5 hrs                | 20                      | 8(40.0)  | 4(20.0) | 2    | 3    | 3            |
| 20~24 hrs              | 20                      | 6(30.0)  | 3(15.0) | 3    | 3    | 5            |

<sup>a</sup> Embryos were co-cultured in 20% FCS + TCM-199 media containing cumulus cells( $1 \times 10^6$  cells)

<sup>b</sup> Oocytes were fertilized without freezing after *in-vitro* culture for 48 hours.

0%와 25.0%, 15.0%였으며, 한편 난구세포를 첨가하여 공배양했을 때 체외발생율은 40.0%, 20.0% 및 30.0%, 15.0%로서 무첨가 대조군의 21.4%와 14.3%에 비해 대체적으로 높은 성적을 나타냈다.

Voelkel 등(1985)은 소 수정란은 동결후에 생존율이 떨어지므로 생존율의 저하를 억제하기 위해서는 자궁섬유아세포와의 공배양이 필요하다고 하였으며, Baker(1985)는 동결배의 배양시 혈청을 첨가한 수정 인산완충액만으로 배양 또는 황체세포와 공배양을 실시했을 때 4시간 이상의 배양에서는 이식후의 수태율이 저하된다고 하였다.

## 적 요

본 연구는 소 난포란의 동결 용해후 체외수정 및 생존성을 구명하기 위하여 미성숙 난포란을 급속동결 용해후 수정능획득 정자와 수정시켰을 때 체외수정율과 배양에 따른 생존율 및 체외발생율을 조사하고자 수행하였다.

1. 회수한 난포란을 각각 1시간, 12시간, 24시간 및 48시간동안 배양한 후 1.5M DMSO + 2.0M glycerol + 0.25M sucrose의 내용제로 동결 용해후 체외배양시의 체외성숙율은 각각 57.1%, 45.7%, 37.1%, 25.7%였으며, 동결 용해한 체외성숙 난포란을 수정능획득 정자와 수정시켰을 때 체외수정율은 각각 40.0%, 31.4%, 20.0%, 11.4%였다.
2. 동결 미성숙 난포란을 1.5M DMSO + 2.0M glycerol + 0.25M sucrose로 급속동결 용해후 수정하였을 때 체외성숙 시간별 생존율은 각각 33.3%, 26.7%, 20.0%, 10.0%로서 비동결 난포란의 생존율 50.0%보다 낮은 생존율을 나타

냈다.

3. 동결 용해한 난포란과 수정능획득 정자와 수정시킨 체외수정란을 20% FCS + TCM-199 배양액에 호르몬(PMSG, hCG,  $17\beta$ -estradiol)의 호르몬을 첨가하여 4~5시간 및 20~24시간 동안 공배양하였을 때 excellent 및 good 배는 각각 35.0%, 15.0% 및 25.0%, 15.0%였으며, 난구세포를 첨가하여 공배양했을 때의 excellent 및 good 배는 40.0%, 20.0% 및 30.0%, 15.0%로서 무첨가 대조군의 21.4%와 14.3%에 비해 대체적으로 높은 성적을 나타냈다.

## 참고문헌

- Baker RD. 1985. Commercial splitting of bovine embryos. *Theriogenology*, 233-12.
- Ball GD, Leibfried ML and Lenz W. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. *Biol. Reprod.*, 28:717-725.
- Carroll J, Warnes GM and Matthews CD. 1989. Increase in digyny explains polyploidy after *in vitro* fertilization of frozen-thawed mouse oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 85:489-494.
- Didin BA, Pomb D, Martin NJ, Homanics GE and Market CL. 1990. Observation on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. *J. Anim. Sci.*, 68:2803-2810.
- Friedler S, Giudice LC and Lamb EJ. 1988. Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil. Steril.*, 49:743-764.

- Hamlett DK, Franken DR, Cronje HS and Luus H. 1989. Murine oocyte cryopreservation : Comparison between fertilization success rates of fresh and frozen metaphase I and II oocytes. Arch. Andol., 23:27(Abstr.).
- Kono T, Threlfall OY. 1988. The effects of 1, 2-propanediol as a cryoprotectant on the freezing of mouse embryos. Theriogenology, 29:987-995.
- Leibo SP. 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, pp. 69-92.
- Mazur P. 1970. Cryobiology : The freezing of biological system. Sci. Washington D. C. 168:939-949.
- Rall WF. 1992. Cryopreservation of oocytes and embryos : Methods and applications. Anim. Reprod. Sci., 28:237-245.
- Rubinski B, Arav A and Devires AL. 1991. Cryopreservation of oocytes using directional cooling and antifreeze glycoproteins. Cryo-Letters, 12:93-106.
- Schellander K, Brackett BK, Fuher F and Schleger W. 1988. *In vitro* fertilization of frozen-thawed cattle oocytes. Proc. 11th Congr. on Anim. Reprod. and AI, June, Dublin Ireland, 26-30.
- Schilling E, Niemann H and Smidt D. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. Cryobiology, 15:245-248.
- Schmidt M, Hyttle P, Greve T and Avery B. 1993. Ultrastructure of frozen-thawed bovine *in vitro* matured oocytes. Theriogenology, 39:304(Abstr.)
- Schroeder AC, Champlin AK, Mobraaten LE and Eppig JJ. 1990. Developmental capacity of mouse oocytes cryopreserved before and after maturation *in vitro*. J. Reprod. Dev., 33:210-214.
- Shaw PW, Benarde AG, Fuller BJ, Hunter JH and Shaw RW. 1992. Vitrification of oocytes using short cryoprotectant exposure : Effects of varying exposure times on survival. Mol. Reprod. Dev., 33:210-214.
- Shea BF, Latour JPA, Berdin KN and Baker RD. 1976. Maturation *in vitro* and the subsequent fertilizability of extra follicular bovine oocytes. J. Anim. Sci., 43:809-815.
- Suzuki T and Nishigada Y. 1992. Fertilization and cleavage of frozen thawed bovine oocytes by one step dilution method *in vitro*. Theriogenology, 37:306(Abstr.).
- Taha TA and Schellander K. 1992. Developmental capacity of immature and *in vitro* matured bovine oocytes after exposure to vitrification solution. Therio., 37:307(Abstr.).
- van Blerkom, J. 1989. Maturation of high frequency of germinal vesicle-stage mouse oocytes in mice. Theriogenology, 33:365(Abstr.).
- Voelkel SA, Amkorski GF, Hill KG and Godke RA. 1985. Use of a uteral-cell monolayer culture system for micromanipulated bovine embryos. Theriogenology, 24: 271-281.
- 오원진, 김상근. 1994. 돼지 분할 수정란의 급속동결 용해후 생존율에 관한 연구. 한국가축번식학회지, 18: 31-37.
- 이장희. 1993. 돼지 난포란의 동결보존과 체외수정에 관한 연구. 박사학위논문, 중앙대학교.