

한우 체외수정란의 체외배양, 동결보존 및 이식에 관한 연구  
II. 한우 체외수정란의 동결 및 융해 후 생존율에 영향을  
미치는 요인

김일화 · 손동수 · 이호준 · 최선호 · 양병철 · 이광원 · 장인호\*  
축산기술연구소

**Studies on *In Vitro* Culture, Freezing and Transfer of  
Korean Native Cattle Embryos Fertilized *In Vitro***  
II. **Factors Affecting on Survival Rate of Frozen-Thawed  
Korean Native Cattle Embryos Fertilized *In Vitro***

I. H. Kim, D. S. Son, H. J. Lee, S. H. Choi, B. C. Yang,  
K. W. Lee and I. H. Chang\*

*National Livestock Research Institute*

**SUMMARY**

The present study was carried out to investigate the effects of cryoprotectants, equilibration step, freezing rate, culture condition following *in vitro* fertilization, and age and development stage of embryo by freezing with conventional slow freezing and vitrification on survival of frozen-thawed Korean native cattle(KNC) blastocysts produced *in vitro*.

The KNC blastocysts produced *in vitro* were equilibrated in 1.8M ethylene glycol or 1.4M glycerol and cooled from  $-6^{\circ}\text{C}$  to  $-35^{\circ}\text{C}$  at  $-0.3^{\circ}\text{C}$  or  $-0.6^{\circ}\text{C}$  /minute. When equilibrated in 1.8M ethylene glycol, survival rate of frozen-thawed blastocysts was same in both  $-0.3^{\circ}\text{C}$  /min and  $-0.6^{\circ}\text{C}$  /min cooling rate(71.4%). With the equilibration in 1.4M glycerol, survival rate was higher in  $-0.3^{\circ}\text{C}$  /min(63.6%) than in  $-0.6^{\circ}\text{C}$  /min cooling rate(53.8%). For vitrification of the KNC blastocysts produced *in vitro*, they were equilibrated in 2-step or 3-step exposure to vitrification solution(25% ethylene glycol + 25% glycerol). Survival rate was similar in both 2-step(45.0%) and 3-step exposure(47.4%). According to culture condition following *in vitro* fertilization, higher survival rate was obtained for blastocysts co-cultured with bovine oviductal epithelial cell(BOEC, 77.3%) than for those cultured with epidermal growth factor(EGF, 65.7%) or for those co-cultured with BOEC + EGF (54.8%). According to embryo age and development stage, higher survival rate was obtained for 7-day embryos(70.0%) than 8-day(56.8%) or 9-day(20.0%) for blastocyst stage and obtained for 8-day embryos(74.3%) than 7-day(62.5%) or 9-day(42.9%) for expanded blastocyst.

In summary, higher survival rate of frozen-thawed KNC blastocysts produced *in vitro*

\* 경북대학교 수의과대학(College of Veterinary Medicine, Kyungpuk National University)

were obtained by using ethylene glycol for cryoprotectant and  $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  for cooling rate. And higher survival rate were obtained with co-culture with BOEC for culture condition following *in vitro* fertilization and with 7-day blastocyst or 8-day expanded blastocyst for embryo age and development stage.

(Key words : slow freezing, vitrification, survival rate, factors)

## 서 론

체외수정란을 효과적으로 이용하기 위해서는 여러 다른 지역에서 언제든지 이식될 수 있도록 반드시 동결보존되어야 한다. 그러나 체외수정란의 동결보존은 체내수정란에 비해 동결에 대한 감수성이 매우 민감함이 밝혀졌으며 체외수정란을 완만동결법을 이용하여 식빙하기 위하여  $-6^{\circ}\text{C}$ 까지 완만 냉각시키면 다수가 손상받거나 죽게 된다(Pollard와 Leibo, 1994). 소 체외수정란의 동결보존 방법은 수정란을 1.5M glycerol로 평형 후 즉시  $-7^{\circ}\text{C}$ 에서 식빙하고 10분간 정제 후  $-40^{\circ}\text{C}$ 까지  $-0.4^{\circ}\text{C}/\text{min}$  속도로 냉각하는 완만동결법 또는 수정란을 6M 이상의 고농도의 동해방지제로 평형시킴으로써 냉각, 동결보존 및 융해시 빙결정을 형성하지 않게 하는 유리화 동결법이 있다(Rall, 1992). 완만동결법은 소 체내수정란의 동결을 위해 개발된 방법과 유사한 방법으로서 소 체외수정란에도 적용된 보고가 있다(Massip 등, 1993). 유리화 동결은 glycerol과 1,2-propanediol 혼합물(Kuwayama 등, 1994) 또는 ethylene glycol, ficoll 및 sucrose로 구성되는 유리화 용액(Mahmoudzadeh 등, 1995)을 포함하여 여러 종류의 동해방지제의 사용으로 이루어졌으며 최근 Mahmoudzadeh 등(1995)은 소 체외수정 배반포의 유리화 동결 융해 후 51~89%가 생존하였음을 보고하였다.

체외수정란의 냉각에 대한 감수성에 대해서는 여러 가지 요인이 작용하는데(Mahmoudzadeh 등, 1994) Pollard와 Leibo(1994)는 체외수정란의 냉각에 대한 감수성이 수정란의 발육단계와 수정란이 배양된 조건에 관계된다고 하였으며 Leibo와 Loskutoff(1993)는 체외수정란의 냉각에 대한 감수성의 원인을 규명하기 위하여 체외수정란과 체내수정란에 대해 몇가지 기본적인 특성을 비교한 결과 체

외수정란의 부력밀도가 낮았으며 또한 투명대 소화 시간이 체내수정란에 비해 짧았다고 하였는데 이러한 수정란의 물리, 화학적 특성의 차이가 냉각에 대한 감수성에 영향을 미치는 것으로 보고하였다. 따라서 체외수정란의 동결-융해 후 생존율을 증가시키기 위해서는 체외수정란의 특성에 적합한 동결법의 개발이 요구된다.

동결-융해 소 수정란에 있어서 동해방지제는 자궁내로 이식하거나 배양하기 전에 회석 또는 제거되어야 하는데 지금까지 glycerol을 동해방지제로 이용한 수정란은 동결-융해 후 다단계회석법(Zhang 등, 1993)으로 glycerol을 제거 하였으나 근래에는 propylene glycol 또는 ethylene glycol과 같이 분자량이 매우 작은 동해방지제를 이용하여 수정란의 동결-융해 후 회석이나 제거없이 직접 이식하는 직접이식법이 이용되고 있다(McIntosh와 Hazeleger, 1994; Suzuki 등, 1993; Voelkel과 Hu, 1992; Suzuki 등, 1990).

동결-융해 소 체외수정란의 생존율은 수정란의 발육단계(Han 등, 1994) 또는 일령(Takagi 등, 1994), 체외수정 후 배양조건(Rorie 등, 1990), 동해방지제의 종류(Suzuki, 1993), 냉각속도(Liu 등, 1996) 및 동해방지제의 평형방법 혹은 제거방법(Voelkel과 Hu, 1992)에 의해 영향을 받는다고 보고되어 있으나 현재까지도 체외수정란의 동결-융해 후 생존율의 저하에 대한 요인에 대해 명확히 밝혀져 있지 않다. 따라서 본 연구는 한우 체외수정 배반포의 동결-융해 후 생존성에 영향을 미칠 수 있는 요인을 구명코자 완만동결법과 유리화동결법을 이용하여 수정란을 동결-융해 후 동해방지제의 종류, 동해방지제의 평형단계, 냉각속도, 체외수정 후 배양조건 및 수정란의 일령과 발육단계의 영향에 대하여 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 난포란의 체외성숙

도축직후 한우의 난소를 항생제(penicillin G 100 units/ml, streptomycin 100 $\mu$ g/ml)가 첨가된 25 $^{\circ}$ C의 0.9% 생리식염수에 침적하여 4시간 이내에 실험실로 운반하여 항생제가 첨가된 생리식염수로 난소를 3~4회 세척하고 면도칼로 난소의 표면을 세절하여 TCM 199 기본배양액(TCM 199 + gentamicin 50 $\mu$ g/ml)으로 씻어내어 상층액을 제거한 후 40배의 실체현미경(Olympus, Japan)하에서 난포란을 회수하였으며 2~3층 이상의 난구세포층을 가진 난자를 선별하여 5 $\mu$ g/ml FSH(Sigma), 10IU/ml hCG(Chorulon, Intervet, Holland), 1 $\mu$ g/ml estradiol-17 $\beta$ (Sigma), 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco, U.S.A.) 및 50 $\mu$ g/ml gentamicin(동신제약, 한국)이 첨가된 TCM 199 성숙배양액에서 3~4회 세척 후 TCM 199 성숙배양액을 4-well dish(Nunc, Denmark)에 0.5ml씩 분주하고 선별된 난자를 각각 10~15개씩 넣었으며 이때 직경 10~20mm의 대난포로부터 회수하여 원심, 세척한 과립막세포를 1 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/ml의 농도로 첨가하여 39 $^{\circ}$ C, CO<sub>2</sub>배양기에서 약 24시간 동안 공배양을 실시하여 체외성숙을 유도하였다.

### 2. 정자의 처리 및 체외수정

축협중앙회 개량사업본부 한우개량부에서 생산된 한우 동결정액을 38 $^{\circ}$ C의 온수에서 30초간 용해시킨 후 10mM caffeine(Sigma)이 첨가된 정자 세척용 BO배양액과 혼합하여 희석한 다음 200 $\times$ g으로 5분간 2회 원심세척 후 5mM caffeine, 10 $\mu$ g/ml heparin(Sigma) 및 0.5% bovine serum albumin(BSA, Sigma)이 첨가된 수정능획득용 BO배양액으로 재부유하였으며 최종적으로 정자농도가 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 정자/ml가 되게 조정하여 성숙난자의 체외수정에 사용하였으며 수정능획득 정자를 함유한 200 $\mu$ l의 소적을 60 $\times$ 15mm 조직배양접시(Nunc, Denmark)에 적하한 후 멸균 mineral oil(Sigma)로 피복하고 성숙된 난자를 체외수정용 BO배양액으로 3~4회 세척한 후 정자 소적당 10~15개씩 옮겨 10

시간 동안 CO<sub>2</sub>배양기에서 체외수정을 유도하였다.

### 3. 수정란의 체외배양

#### 1) 난관상피세포의 준비

도축장에서 채취한 소의 난관을 5 $^{\circ}$ C로 유지하여 실험실로 옮겨 멸균된 수술기구로 결합조직과 지방조직을 철저하게 제거하고 70% 알코올로 소독한 후 난관 전체를 가볍게 문지른 다음 난관 깔때기에서 난관-자궁연결부쪽으로 TCM 199 기본배양액 2ml를 관류시켜 난관상피세포를 회수한 후 200 $\times$ g으로 5분간 2회 원심 분리하여 세척하고 TCM 199 성숙배양액으로 재부유하여 난관상피세포의 최종 농도가 1 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/ml가 되도록 조정한 후 4-well dish에 0.5ml씩 분주하여 CO<sub>2</sub>배양기에서 72시간 배양시켜 단층세포의 형성을 유도하였다.

#### 2) 성장인자를 이용한 배양액의 준비

##### (1) Epidermal growth factor(EGF)

EGF(Sigma)를 TCM 199 성숙배양액에 10ng/ml 첨가하였다.

##### (2) EGF + 난관상피세포

난관상피세포의 단층세포가 형성된 4-well dish에서 성숙배양액을 제거하고 EGF 10ng/ml이 첨가된 성숙배양액을 첨가하였다.

##### (3) 체외배양

체외수정된 난자를 TCM 199 성숙배양액으로 3~4회 세척하여 난구세포와 정자를 제거하고 미리 준비한 난관상피 단층세포에서 공배양시키거나 EGF가 첨가된 배양액에 그리고 난관상피세포에 EGF가 첨가된 배양액에서 9일간 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하여 체외수정 후의 배양조건이 동결-용해 후의 생존율에 미치는 영향을 비교하였다. 배양중에 48시간마다 배양액을 신선한 배양액으로 교환하였다.

### 4. 동결배지 및 동해방지제 희석배지의 준비

#### 1) Ethylene glycol 동결배지

FBS가 20% 첨가된 Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS, Gibco, U.S.A.) 보존액에 ethylene glycol(Sigma)을 1.8M 첨가하여 동결배지를 제조하였다.

### 2) Glycerol 동결배지 및 희석배지

FBS가 20% 첨가된 D-PBS 보존액에 glycerol(Sigma)을 각각 0.4, 0.8, 1.4M씩 첨가하여 동결배지 및 희석배지를 제조하였다.

### 3) 유리화 동결 배지 및 희석배지

FBS가 20% 첨가된 D-PBS 보존액에 25% v/v ethylene glycol과 25% v/v glycerol을 혼합하여 유리화 용액을 제조하였으며 D-PBS 보존액으로 2배 희석(50% 유리화 용액) 또는 4배 희석(25% 유

리화 용액)하여 유리화 용액 전평형액을 제조하였다. 유리화 용액 희석배지는 FBS가 20% 첨가된 D-PBS 보존액에 sucrose(Sigma)를 0.6M 첨가하여 제조하였다.

### 5. 체외수정 배반포의 동결 및 융해

#### 1) 완만동결(Conventional slow freezing) 및 융해

체외수정 및 난관상피세포에서 체외배양 후 배반포로 발육시킨 수정란을 배지에서 꺼내 FBS가 20%첨가된 D-PBS 보존액으로 옮겨 10분간 평형시킨 후 계속해서 1.8M ethylene glycol 동결배지(Fig. 1A~C) 또는 1.4M glycerol 동결배지에서 20분간 평형시킨 후 0.25ml 스트로에 수정란을 1개

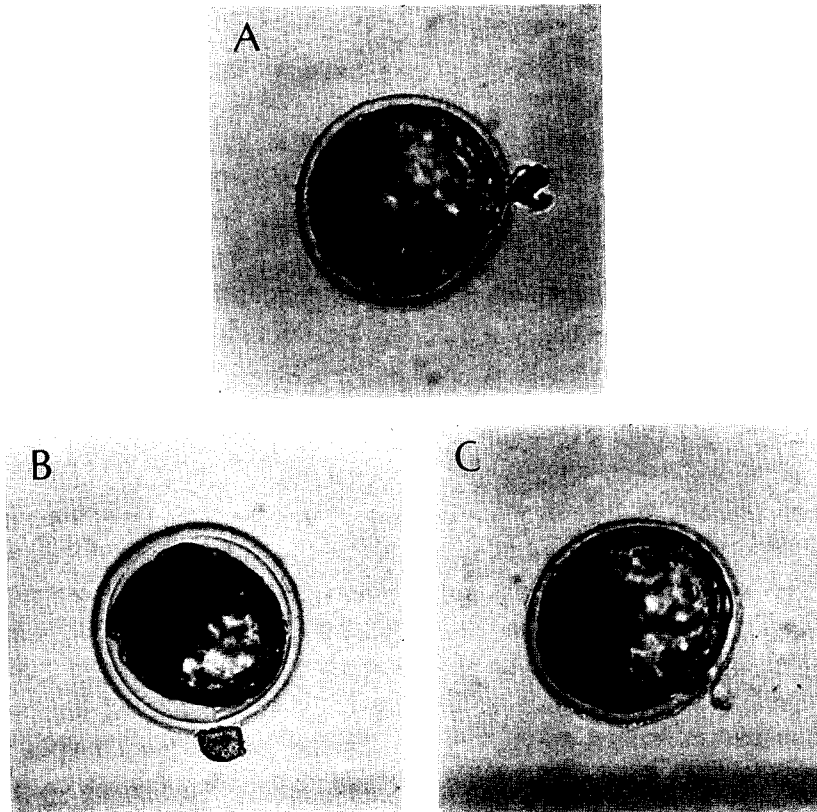


Fig. 1. Equilibration of blastocyst with 1.8M ethylene glycerol.

A : intact blastocyst before equilibration( $\times 200$ ).

B : dehydrated blastocyst after exposure to 1.8M ethylene glycerol for 5 min( $\times 200$ ).

C : rehydrated blastocyst after exposure to 1.8M ethylene glycerol for 20 min( $\times 200$ ).

씩 주입하여  $-6^{\circ}\text{C}$ 로 냉각된 수정란 동결기(Cryogenic, Australia)의 cryo chamber에 넣고 2분 뒤 식빙(seeding)하였으며 식빙 8분 후  $-30^{\circ}\text{C}$ 까지  $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  또는  $-0.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$  속도로 냉각시킨 뒤 액체질소에 침지하여 동결보존하였다. 동결수정란의 용해는 액체질소에서 수정란이 들어있는 스트로를 꺼내어 실온의 공기중에서 5초간 용해 후  $20^{\circ}\text{C}$ 의 온수에서 15초간 급속용해하였다. Ethylene glycol을 동해방지제로 이용하여 동결시킨 수정란은 용해직후 바로 D-PBS보존액에 침지하여 10분간 정체시킴으로써 ethylene glycol을 제거하였으며, glycerol 동결배지를 이용하여 동결시킨 수정란은 용해직후 0.8, 0.4M glycerol 동결배지 및 D-PBS 보존액에서 각각 10분씩 정체시킴으로써 glycerol을 제거하였다.

## 2) 유리화 동결(Vitrification) 및 용해

체외수정 후 난관상피세포에서 배양된 배반포의 유리화 용액 평형은 50% 유리화 용액(12.5% v/v ethylene glycol + 12.5% v/v glycerol)에서 전평형하거나 또는 25% 유리화 용액을 거쳐 50% 유리화 용액에서 각각 1분간씩 전평형 후  $15\mu\text{l}$ 의 유리화 용액에 옮겨 0.25ml 스트로에 장진하여 30초간 평형하므로써 2단계 또는 3단계 평형을 하였으며 (Fig. 2A~D) 2분간 액체질소 증기에서 냉각시킨 후 액체질소에 침지하였다. 동결보존된 수정란을 실온에서 5초간 용해시킨 후,  $20^{\circ}\text{C}$  온수에서 15초간 용해시키고 0.6M sucrose(Sigma)가 첨가된 D-PBS 보존액에 5분간 정체시킴으로써 유리화 용액을 제거하였다.

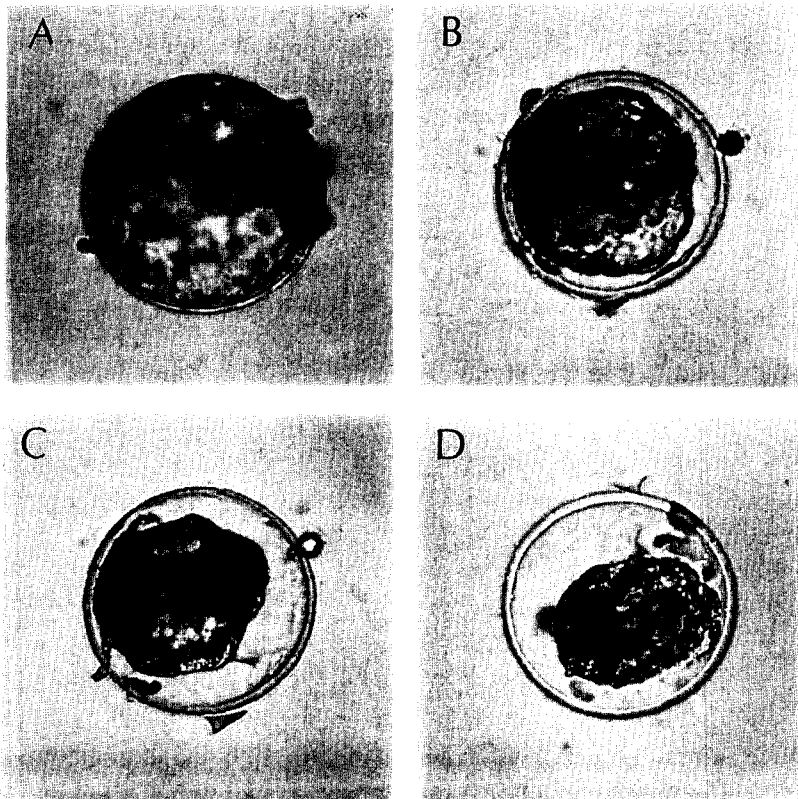


Fig. 2. Three step equilibration of expanded blastocyst with vitrification solution(VS).

- A : Intact expanded blastocyst before equilibration ( $\times 200$ ).
- B : Expanded blastocyst after exposure to 25% VS for 1 min ( $\times 200$ ).
- C : Expanded blastocyst after exposure to 50% VS for 1 min ( $\times 200$ ).
- D : Expanded blastocyst after exposure to VS for 30 secs ( $\times 200$ ).

## 6. 동결-융해 수정란의 배양

동결-융해한 체외수정란은 TCM 199 성숙배양액으로 3~4회 세척한 후 단층을 형성하고 있는 난관상피세포에서 72시간 배양하였으며 확장배반포 또는 탈출배반포로 발달된 것을 생존한 것으로 판단하였다.

## 7. 통계학적 분석

실험결과의 통계학적 분석은 SAS 통계 package의 CATMOD procedure를 이용하여  $\chi^2$ -test를 실시하여 처리군간의 유의차를 검정하였다.

# 결과 및 고찰

## 1. 완만동결시 동해방지제의 종류 및 냉각속도의 영향

체외수정 후 난관상피세포에서 배양된 배반포를 1.8M ethylene glycol로 평형시킨 후  $-30^{\circ}\text{C}$ 까지  $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  혹은  $-0.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 속도로 냉각시킨 다음 동결-융해 후 배양한 결과 확장배반포 또는 탈출배반포로 발달한 수정란(Fig. 3)의 생존율이 71.4%로 같았으나, 탈출배반포의 발달율은  $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  속도로 냉각시킨 경우가 50.0%를 나타내어

$-0.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 로 냉각시킨 경우의 42.9%보다 약간 높았다. glycerol로 평형시킨 후 냉각시킨 경우에는 생존율 및 탈출배반포의 발달율 모두가  $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  속도로 냉각시(63.6%, 59.1%)가  $-0.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$  속도로 냉각시(53.8%, 23.1%)보다 높았다(Table 1). 완만동결법에 주로 이용되는 소수정란의 동해방지제는 glycerol과 ethylene glycol이다. glycerol은 상업적인 동결을 위해 가장 흔히 이용되는 동해방지제이나 3단계 융해 절차에 따라 시간이 많이 소요되는 단점이 있다(Rall, 1992). 근래에는 glycerol과 달리 동해방지제에 대한 수정란의 침투성이 큰 장점 때문에 다단계 희석법을 사용하지 않고 보존액에 일단계로 희석하거나 또는 융해 후 직접 수란우에 이식할 수 있는 ethylene glycol을 포함한 glycols에 대하여 많은 연구가 이루어지고 있다(Wagtendonk 등, 1995; Massip 등, 1987). 본 연구의 결과는 Takagi 등(1994)의 ethylene glycol, glycerol로 평형 후  $-30^{\circ}\text{C}$ 까지  $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  속도로 냉각, 동결-융해 후의 생존율 각각 76.2%, 67.2%에 비해 다소 낮았고, Voelkel과 Hu(1992)의 1.5M ethylene glycol, 1.4M glycerol로 평형 후  $-35^{\circ}\text{C}$ 까지  $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  속도로 냉각, 동결-융해 후의 생존율 70%, 30%에 비하여 ethylene glycol로 평형한 경우는 비슷하였으나 glycerol의 경우는

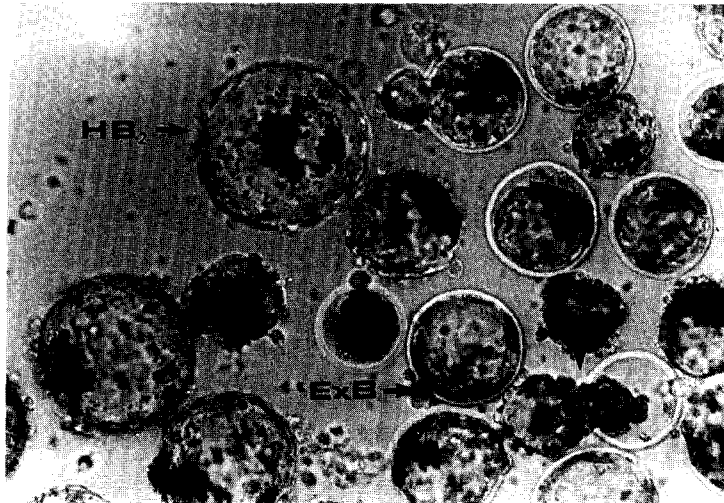


Fig. 3. Embryos frozen-thawed and co-cultured with BOEC for 72 hrs. ExB, HB<sub>1</sub> HB<sub>2</sub> indicate expanded blastocyst, hatching blastocyst and hatched blastocyst, respectively( $\times 100$ ).

Table 1. Effects of cryoprotectant and cooling rate during slow freezing on survival of frozen-thawed KNC blastocysts produced *in vitro*

Cryoprotectant	Cooling rate	No. of embryos frozen thawed	No. of embryos survived (%)		
			ExB	HB	ExB + HB
Ethylene glycol	-0.3°C /min	28	8(21.4)	14(50.0)	20(71.4)
	-0.6°C /min	14	4(28.6)	6(42.9)	10(71.4)
Glycerol	-0.3°C /min	22	1(4.5)	13(59.1)	14(63.6)
	-0.6°C /min	26	8(30.8)	6(23.1)	14(53.8)

ExB : expanded blastocyst ; HB : hatching or hatched blastocyst

높았다. Suzuki 등(1993)은 ethylene glycol 평형 후 -30°C까지 -0.3°C/min와 -0.5°C/min 속도로 냉각, 동결-융해 후 72시간 체외배양시킨 결과 생존율은 유의적인 차이가 없었으나 탈출배반포 발달율은 -0.3°C/min 속도로 냉각시켰을 때(64.6%)가 -0.5°C/min 속도로 냉각시켰을 때(22.6%)보다 높았다고 하여 본 연구에서 ethylene glycol로 평형 후에 -0.3°C/min의 냉각속도가 -0.6°C/min 냉각속도에 비해 높은 탈출배반포 발달율을 보였다는 점과 일치하였다. 따라서 소 체외수정란의 완만동결시는 ethylene glycol의 평형과 최종 냉각 온도까지 -0.3°C/min 속도로 냉각시키는 것이 동결-융해 후 생존율을 높이는 데 유리할 것으로 사료된다.

## 2. 유리화 동결시 유리화 용액 평형단계의 영향

한우 체외수정 배반포의 유리화 동결을 위한 유리화 용액의 평형을 50% 유리화 용액에서 1분간 평형시킨 후 30초간 유리화 용액(25% v/v ethylene glycol + 25% v/v glycerol)에 옮기는 2단계 평형과 25% 유리화 용액, 50% 유리화 용액에서 각각 1분간 평형 후 30초간 유리화 용액에 옮기는 3단계 평형이 동결-융해 배반포의 생존에 미치는 영향을 비교한 결과 2단계 평형과 3단계 평형에 따른 생존율은 각각 45.0, 47.4%로 비슷하였으며 탈출배반포의 발달율은 3단계 평형이 15.8%로 2단계 평형의 5.0%보다 높았다(Table 2). 소 수정란의 유리화 동결에 이용되는 유리화 용액의 조성과 농도는 Wagtendonk 등(1995)의 6.5M glycerol + 6% BSA 또는 25% glycerol + 25% propanediol 용액, Ishimori 등(1992)의 25% ethylene glycol + dimethyl sulfoxide, Mahmoudzadeh 등(1995)의 40% eth-

Table 2. Effect of equilibration step of vitrification solution during vitrification on survival of frozen-thawed KNC blastocysts produced *in vitro*

Equilibration step	No. of embryos frozen thawed	No. of embryos survived (%)		
		ExB	HB	ExB + HB
2	20	8(40.0)	1(5.0)	9(45.0)
3	19	6(31.6)	3(15.8)	9(47.4)

ExB : expanded blastocyst ; HB : hatching or hatched blastocyst

ylene glycol, 18% Ficoll 및 10.26% sucrose (EFS) 등과 같이 연구자에 따라 다양하다. 유리화 용액에 평형시 용액에 의한 손상을 감소시키는 한 가지 방법은 수정란을 유리화 용액에 노출하는 시간을 줄임과 동시에 연속적으로 높은 유리화 용액에 다단계로 노출시키는 방법이다(Kuwayama 등, 1992). Kuwayama 등(1992)은 소 체외수정 배반포를 glycerol과 1,2-propanediol 유리화 용액으로 1, 2, 4, 8, 16단계로 평형 후 동결보존하였다가 용해 후 생존율을 조사한 결과 각각 0, 10, 79, 82, 87%로서 4단계 이상으로 평형시가 생존율이 높았다고 하였다. 본 연구의 성적은 Wagtendonk 등(1995)의 6.5M glycerol + 6% BSA 유리화 용액과 25% glycerol + 25% propanediol 유리화 용액에 평형시키고 동결-용해 후 체외배양한 결과 각각 확장배반포배 발달율 44, 51% 및 Rodrigues(1996)의 소 체외수정 배반포를 EFS 유리화 용액(40% ethylene glycol + 18% Ficoll + 0.3M sucrose in PBS)을 이용하여 2단계로 평형시키고 동결-용해 후 체외배양한 생존율 44%와 비슷하였으며 Liu 등(1996)의 초기배반포 또는 후기상실배를 4.7M ethylene glycol + propylene glycol 용액에 평형하여 동결-용해 후 체외배양하였을 때의 생존율 34.9% 및 Zwalmen 등(1989)의 glycerol과 1,2 propanediol을 이용 3단계 평형 후 유리화 동결-용해 후 체외배양시 생존율 40.8%에 비해서는 다소 높았다. Mahmoudzadeh 등(1995)은 EFS용액을 이용 1단계 또는 2단계 평형으로 유리화 동결 후 배반포를 용해한 후 확장배반포로의 발달율이 각각 58, 75%로 2단계의 경우가 높았다고 하였다. 본 연구의 결과로 보아 2단계 또는 3단계의 유리화 용액의 평형

단계가 동결-용해 후 생존율에 큰 차이가 없어 4단계 이상으로 평형시가 생존율이 높다고 한 Kuwayama 등(1992)의 결과와는 차이를 보였으며, 이러한 결과는 유리화 용액의 종류와 농도에 따른 차이라고 생각된다.

### 3. 체외수정 후의 배양조건에의 영향

한우 체외수정 배반포의 동결-용해 후 생존율에 영향을 미치는 체외수정 후의 배양조건을 비교하기 위하여 난관상피세포, EGF 그리고 EGF + 난관상피세포에서 배양된 배반포를 1.8M ethylene glycol로 평형시킨 후  $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  속도로 냉각, 동결보존한 후 용해하여 미리 준비된 난관상피세포에서 72시간 배양시킨 결과 생존율 및 탈출배반포의 발달율이 체외수정후 난관상피세포에 공배양시킨 수정란의 경우 각각 77.3, 63.6%로 EGF 첨가배양시의 65.7, 45.7%나 EGF + 난관상피세포 공배양시의 54.8, 32.3%에 비해 높았다(Table 3). 이러한 결과는 Larson 등(1992)이 성장인자를 이용하여 배양한 초기배반포를 수란우에 이식하였을 때의 수태율이 33.3%로 Eyestone과 First(1989)가 난관상피세포와 공배양 또는 세포조절배지에서 배양 후 이식시의 수태율 55%에 비해 낮아서 성장인자를 이용하여 배양된 수정란은 공배양된 수정란에 비하여 수정란의 질(quality) 또는 생존성이 떨어졌다고 보고한 것과 같은 결과를 보였다. 또한 본 연구에서 EGF + 난관상피세포에서 배양된 수정란의 동결-용해 후 생존율의 저하에 대해서는 정확한 원인은 알 수 없으나 EGF가 난관상피세포를 통해 간접적으로 수정란의 질 또는 생존성에 불리한 영향을 미칠 수 있었던 것으로 추측된다. Voelkel과 Hu

Table 3. Effect of culture condition following *in vitro* fertilization on survival of frozen-thawed KNC blastocysts produced *in vitro*

Culture condition	No. of embryos frozen thawed	No. of embryos survived (%)		
		ExB	HB	ExB + HB
BOEC	22	3(13.6)	14(63.6)	17(77.3)
EGF	35	7(20.0)	16(45.7)	23(65.7)
EGF + BOEC	31	7(22.6)	10(32.3)	17(54.8)

BOEC : bovine oviductal epithelial cell ; EGF : epidermal growth factor

ExB : expanded blastocyst ; HB : hatching or hatched blastocyst



(1992)는 난관상피세포와 buffalo rat liver(BRL) cells을 이용 공배양하여 수정란의 동결-융해 후 생존율에 대한 산소분압(20% O<sub>2</sub> 또는 5% O<sub>2</sub>)의 영향을 비교한 결과 난관상피세포를 이용한 경우는 생존율이 각각 10 및 34%로서 산소분압의 영향을 받았으나 BRL cells에서는 생존율이 각각 53 및 67%로서 산소분압에 큰 영향을 받지 않았으며 또한 난관상피세포에 비해 전반적으로 생존율이 높아 수정란의 동결 및 융해에 있어서는 BRL cells이 난관상피세포에 비해 우수한 결과를 보였다고 하였다. 또 Rorie 등(1990)도 수정란을 난관상피세포, 자궁상피세포를 이용 체외배양하거나 발정 동기화된 자궁에서 체내배양 후 회수된 수정란을 glycerol로 평형 후 완만동결법으로 냉각하여 동결한 수정란을 융해하여 체외배양시킨 결과 각각 27, 31 및 100%의 생존율을 보여 배양조건의 차이가 동결-융해 후의 생존율에 영향을 준다고 하였다.

#### 4. 수정란의 일령 및 발육단계의 영향

한우 체외수정 배반포(배반포, 확장배반포)의 동결-융해 후 생존에 대한 수정란 일령 및 발육단계의 영향을 비교하기 위하여 난관상피세포에서 배양된 배반포를 1.8M ethylene glycol로 평형시킨 후 -0.3°C/min 속도로 냉각, 동결보존 후 융해하여 미리 준비된 난관상피세포에서 72시간 배양시킨 결과, 배반포의 경우에는 생존율 및 탈출배반포 발달을 모두 체외수정 후 7일령(70.0, 60.0%)이 8일령(56.8, 37.8%) 또는 9일령(20.0, 20.0%)에 비해 높았다. 확장배반포의 경우에는 생존율 및 탈출배반

포의 발달을 모두 체외수정 후 8일령(74.3, 45.7%)이 7일령(62.5, 31.3%) 또는 9일령(42.9, 32.2%)에 비해 높게 나타났다(Table 4). 체외수정란의 배반포의 발육 지연은 동결-융해 후 생존율에 중요한 영향을 미친다(Hasler 등, 1995; Han 등, 1994). Takagi 등(1994)은 4종류의 glycols에 7~9일령의 체외배반포를 평형하여 완만동결 후 동결된 수정란을 융해시켜 체외배양한 결과 9일령의 배반포가 7일령 또는 8일령의 배반포에 비해 생존율이 유의성 있게 낮았다고 하였으며 Myers 등(1996)도 7일령과 6일령의 상실배가 동결-융해 후 생존율이 각각 59.3, 72.5%로 7일령이 6일령에 비해 현저히 저하되는 것으로 보아 체외배양시 발육지연이 동결-융해 후 생존율에 영향을 미친 본 연구의 결과와 일치하였다.

## 적 요

한우 체외수정 배반포의 동결-융해 후 생존성에 영향을 미칠 수 있는 요인을 구명코자 완만동결법과 유리화 동결법을 이용하여 수정란을 동결-융해 후 생존성에 대한 동해방지제의 종류, 동해방지제의 평형단계, 냉각속도, 체외수정 후 배양조건 및 수정란의 일령과 발육단계의 영향에 대하여 조사한 바 결과는 다음과 같다.

한우 체외수정 배반포를 ethylene glycol과 glycerol로 평형시킨 후 완만동결법으로 냉각, 동결보존하였다가 융해시킨 후 체외배양한 결과 ethylene glycol로 평형 후는 -0.3°C/min 및 -0.6°C/min

Table 4. Effects of embryo age and development stage on survival of frozen-thawed KNC blastocysts produced *in vitro*

Embryo age (day)	Development stage	No. of embryos frozenthawed	No. of embryos survived (%)		
			ExB	HB	ExB + HB
7	B	10	1(10.0)	60(60.0)	7(70.0)
	ExB	16	5(31.3)	5(31.3)	10(62.5)
8	B	37	7(18.9)	14(37.8)	21(56.8)
	ExB	35	10(28.6)	16(45.7)	26(74.3)
9	B	5	—	1(20.0)	1(20.0)
	ExB	28	3(10.7)	9(32.2)	12(42.9)

B : blastocyst ; ExB : expanded blastocyst

HB : hatching or hatched blastocyst

냉각속도에서 생존율이 같았으며(71.4%), glycerol로 평형 후는 생존율이  $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 로 냉각시 63.6%로  $-0.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 로 냉각시의 53.8%보다 높았다. 유리화용액(25% ethylene glycol + 25% glycerol)에 2단계 또는 3단계 평형 후 유리화 동결시켰다가 용해 후 체외배양한 결과 생존율은 각각 45.0, 47.4%로 비슷하였다. 체외수정 후 배양조건에 따른 동결-용해 배반포의 생존율은 난관상피세포 공배양시가 77.3%로 EGF 첨가배양시 65.7% 또는 EGF + 난관상피세포 공배양시의 54.8%에 비해 높았다. 체외수정 후 7, 8, 9일령의 배반포 또는 확장배반포의 동결-용해 후 생존율을 비교한 결과 배반포의 경우에는 7일령이 70.0%로 8일령의 56.8% 및 9일령의 20.0%에 비해 높았으며, 확장배반포의 경우에는 8일령이 74.3%로 7일령의 62.5% 및 9일령의 42.9%에 비해 높은 생존율을 보였다.

이상의 결과로 보아 한우 체외수정 배반포의 동결-용해 후 생존율은 완만동결시 동해방지제 및 냉각속도에 있어서는 ethylene glycol의 이용과  $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  냉각속도에서 높았으며, 체외수정 후의 배양조건으로서는 난관상피세포로 공배양시가 높았고, 수정란의 일령별 발육단계는 배반포의 경우는 7일령, 확장배반포는 8일령에서 높았다.

## 참고문헌

- Eyestone WH and First NL. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. J. Reprod. Fert., 85:715-720.
- Han YM, Yamashina H, Koyama N, Lee KK and Fukui Y. 1994. Effects of quality and developmental stage on the survival of IVF-derived bovine blastocysts cultured *in vitro* after freezing and thawing. Theriogenology, 42:645-654.
- Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE and Trimmer SA. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. Theriogenology, 43:141-152.
- Ishimori H, Miki Y, Kishi M and Saeki K. 1992. Vitrification of bovine embryos. Theriogenology, 37:228.
- Kuwayama M, Hamano S and Nagai T. 1992. Vitrification of bovine blastocysts obtained by *in vitro* culture of oocytes matured and fertilized *in vitro*. J. Reprod. Fert., 96:187-193.
- Kuwayama M, Fujikawa S and Nagai T. 1994. Ultrastructure of IVM-IVF bovine blastocysts vitrified after equilibration in glycerol 1,2-propanediol using 2-step and 16-step procedures. Cryobiology, 31:415-422.
- Larson RC, Ignatz GG and Currie WB. 1992. Transforming growth factor  $\beta$  and basic fibroblast growth factor synergistically promote early bovine embryo development during the fourth cell cycle. Mol. Reprod. Dev., 33:432-435.
- Leibo SP and Loskutoff NM. 1993. Cryobiology of *in vitro*-derived bovine embryos. Theriogenology, 39:81-94.
- Liu Y, Wang S, Holyoak GR and Bunch TD. 1996. Survival rates of *in vitro* produced bovine embryos cryopreserved by controlled slow-freezing, fast-freezing and vitrification. Theriogenology, 45:177.
- Mahmoudzadeh AR, Soom A, Ysebaert MT and Kruif A. 1994. Comparison of two-step vitrification versus controlled freezing on survival of *in vitro* produced cattle embryos. Theriogenology, 42:1389-1397.
- Mahmoudzadeh AR, Soom A, Bols P, Ysebaert MT and 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. Fert., 103:33-39.
- Massip A, Zwalmen P and Ectors F. 1987. Re-

- cent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology*, 27:69-79.
- Massip A, Mermillod P, Wils C and Dessy F. 1993. Effects of dilution procedure and culture conditions after thawing on survival of frozen bovine blastocysts produced *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 97:65-69.
- McIntosh A and Hazeleger NL. 1994. The use of ethylene glycol for freezing bovine embryos. *Theriogenology*, 41:253.
- Myers MW, Rocha A, Denniston RS, Broussard JR and Thibodeaux JK. 1996. Post-thaw survival of bovine embryos following *in vitro* maturation, fertilization and culture. *Theriogenology*, 45:176.
- Pollard JW and Leibo SP. 1994. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology*, 41:101-106.
- Rall WF. 1992. Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. *Anim. Reprod. Sci.*, 28:237-245.
- Rodrigues JL. 1996. Effect of pre-equilibration in 1.5 or 3.6 ethylene glycol on the survival of day 7 IVMFC bovine blastocysts vitrified in EFS solution. *Theriogenology*, 45:168.
- Rorie RW, Xu KP and Betteridge KJ. 1990. Effect of culture on the post-thaw viability of cryopreserved, *in vitro* fertilized bovine embryos. *Theriogenology*, 33:311.
- 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.
- Suzuki T, Takagi M, Yamamoto M, Boediono A, Saha S, Sakakibara H and Oe M. 1993. Pregnancy rate and survival in culture of *in vitro* fertilized bovine embryos frozen in various cryoprotectants and thawed using a one-step system. *Theriogenology*, 40:651-659.
- Takagi M, Otoi T, Boediono A, Saha S and Suzuki T. 1994. Viability of frozen-thawed bovine IVM/IVF embryos in relation to aging using various cryoprotectants. *Theriogenology*, 41:915-921.
- Takagi M, Sakonju I, Otoi T, Hamana K and Suzuki T. 1994. Postthaw viability of the inner cell mass of *in vitro*-matured/*in vitro*-fertilized bovine embryos frozen in various cryoprotectants. *Cryobiology*, 31:398-405.
- Voelkel SA and Hu YX. 1992. Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogenology*, 37:687-697.
- Voelkel SA and Hu YX. 1992. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 37:23-37.
- Voelkel SA and Hu YX. 1992. Effect of gas atmosphere on the development of one-cell bovine embryos in two culture systems. *Theriogenology*, 37:1117-1131.
- Wagtendonk-De Leeuw AM, Den Daas JHG, Krup AM and Rall WF. 1995. Comparison of the efficacy of conventional slow freezing and rapid cryopreservation methods for bovine embryos. *Cryobiology*, 32:157-167.
- Zhang L, Barry DM, Denniston RS, Bunch TD and Godke RA. 1993. Birth of live calves after transfer of frozen-thawed bovine embryos fertilised *in vitro*. *Vet. Rec.*, 132:247-249.
- Zwalmen P, Touati K, Ectors FJ, Massip A, Beckers JF and Ectors F. 1989. Vitrification of bovine blastocysts. *Theriogenology*, 31:270.