

소 수정란의 간이 동결기법 개발에 관한 연구  
II. 내동제의 평형시간, 융해온도, 융해시간 및 1단계 Straw법이  
체외발생에 미치는 영향<sup>†</sup>

김상근 · 남윤이 · 현병화\*  
충남대학교 수의과대학

Studies on the Development of Easy Cryopreservation  
Technique of Bovine Embryos  
II. Effects of Equilibration of Cryoprotectants, Temperature  
and Time of Thawing and 1 Step Straw Method on  
*In Vitro* Developmental Rates of Embryos

Kim, S. K., Y. Y. Nam and B. H. Hyun\*  
Coll. of Vet. Med., Chungnam Natl. Univ.

SUMMARY

The studies on the carried out to investigate to determine the optimum thawing temperature and equilibration time and 1 step straw method of frozen bovine embryos. The follicular oocytes were cultured in TCM-199 medium containing 10 IU/ml PMSG(Sigma, USA), 10 IU/ml hCG (Sigma, USA), 1  $\mu$ g/ml  $\beta$ -estradiol(Sigma, USA) and 10% FCS for 24~48 hrs in incubator with 5% CO<sub>2</sub> in air at 38.5°C and then matured oocytes were again cultured for 12~18 hrs with motile capacitated sperm by preincubation of heparin. The bovine embryos following dehydration by cryoprotective agents and a various concentration of sucrose were directly plunged into liquid nitrogen and thawed in 30°C water. Survival and *in vitro* developmental rate was defined as developmental rate on *in vitro* culture or FDA-test.

The results are summarized as follows :

1. The equilibration time on *in vitro* developmental rates of bovine embryos was attained after short period of time(2.5~5 min.) in the freezing medium higher than long period of time (10~20 min.).
2. The temperature thawed at 30°C after rapid freezing of bovine embryos resulted in a significantly higher *in vitro* developmental rate than did at 20°C and 35°C.
3. The thawing time on *in vitro* developmental rates of bovine embryos was attained after short period of time(1~5 min.) in the freezing medium higher than long period of time(10min.).
4. The *in vitro* developmental rates of bovine embryos after rapid frozen-thawing by 1 step

<sup>†</sup> 이 논문은 교육부지원 연구비(1996)에 의하여 수행되었음.

\* 한국과학기술원부설 생명공학연구소(Korea Research Institute of Biosci. & Biotech.)

straw method in the freezing medium added 1.5M, 2.0M glycerol, DMSO, propanediol and 0.25M, 0.50M 0.75M, 1.00M sucrose were 12.5~19.4%, 10.0~15.6%, 9.1~13.8% and 6.7~12.9%, respectively.

(Key words : Bovine embryos, Equilibraion, Rapid freezing, Thawing, 1 step straw method)

## I. 서 론

최초로 Whittingham 등(1972)에 의해 생쥐 수정란의 체외수정에 성공한 이후 수정란을 대상으로 동결보존에 관한 연구결과들이 보고되었으며, 최근에는 glycerol, dimethyl sulfoxide (DMSO) 및 sucrose 등과 같은 내동제를 첨가하여 수정란을 급속동결하는 초자화 동결기법이 보고되고 있다.

내동제의 평형시간별 생존율은 Mapletoft(1989a, b)는 1분간이, Robertson 등(1989)은 10초간이, Trounson 등(1987)은 5분과 10분의 평형시간에는 차이가 없다고 하였으며, Boon 등(1988)은 20분에서 현저하게 저조하다고 보고하였다. 수정란의 융해온도별 생존율은 Mapletoft(1989a, b), Szell과 Shelton(1986a, b), Smorag 등(1990)은 20℃, Palasz 등(1990)은 22℃, Bielanski(1987)는 30℃가 우수하다고 보고하였다. 내동제에 첨가된 sucrose의 적정농도에 대해 Mapletoft 등(1989a, b) 및 Trounson 등(1987)은 0.5M이, Szell과 Shelton(1987) 및 Wilton 등(1989)은 0.25M이, Mapletoft 등(1987)은 1.0M과 1.5M이 Andrede와 Rodrigues(1987)는 1.0M이라고 보고하였다. 한편, Wood와 Farrant(1980) 및 Szell과 Shelton(1986a, b)은 sucrose를 내동제에 첨가할 경우 세포내의 자유수를 탈수시키므로써 외부세포막을 보호하여 초급속동결이 가능하다고 하였으며, Renard 등(1983) 및 Leibo(1984) 등은 sucrose를 내동제 제거에 이용하면 삼투압 차에 의해 순간적 제거가 가능하므로 1 step straw법이 가능하다고 하였다. 그러나, 수정란의 동결에는 내동제의 평형시간, 식빙방법, 융해온도와 융해방법 등 수정란의 생존성에 영향을 미치는 요인이 대단히 많으나 이에 관한 연구보고는 드물며, 보고된 연구결과도 보고자들 간에 큰 차이가 있었다. 또한, 수정란의 동결의 대부분이 cell freezer에 의한 완만동결법에 의해 이루고 있으나 고가의 기자재로서 현장에서 응용하는데는 많은

문제점을 가지고 있어 이 방법에 비해 생존성은 다소 떨어지지만 현장에서 간편하면서도 저렴하게 이용할 수 있는 실용적인 동결기법의 개발이 절실히 요청되고 있는 실정이다.

이에, 본 연구는 소 수정란의 간이동결 기법을 개발하고자 동결시 내동제의 평형시간, 융해시간, 융해온도 및 1 단계 straw법 등이 체외발생율에 미치는 영향을 구명하고자 수행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재 료

#### 1) 난포란의 회수

도살한우의 난소를 적출하여, 100 IU/ml의 penicillin G와 100 µg/ml의 streptomycin sulfate를 첨가한 38℃의 생리식염수에 침지하여 실험실로 운반한 다음, 난포액을 흡입하여 petri dish에 채취한 후 실험현미경(20~40 ×)하에서 난포란을 회수하여 배양액으로 3회 세척 후 CO<sub>2</sub> 배양기내(5% CO<sub>2</sub>, 95% air, 38.5℃)에서 배양하였다.

#### 2) 배양액

체외배양을 위한 기본배양액은 10%(v/v)의 FCS와 100 IU/ml의 penicillin G 및 100 µg/ml의 streptomycin sulfate가 첨가된 TCM-199(Whittaker, M.A., USA) 배양액을 이용하였으며, 사용전 0.2 µm millipore filter로 여과 멸균 후 사용하였다. 기본배양액에 10 IU/ml의 PMSG (Sigma, USA), 10 IU/ml의 hCG(Sigma, USA), 1 µg/ml의 β-estradiol(Sigma, USA)을 첨가하여 배양하였다.

### 2. 방 법

#### 1) 난포란의 체외성숙 및 체외수정

난포란의 체외성숙은 배양액 50 µl의 drop을 min-

eral oil(Squibb Co., USA)로 피복하여 배양 2~3시간 전에 CO<sub>2</sub> 배양기내에서 5~6시간 평형시킨 후 drop당 5개의 난포란을 침지하여 24시간 성숙배양하였다. 체외수정은 주위의 난구세포를 pipetting에 의하여 일부 제거한 다음 mineral oil로 피복한 45  $\mu$ l의 drop에 5개의 난포란을 주입한 후, 수정용 TCF액 1 ml에 정액 0.2 ml를 혼합하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 swim-up 처리 후, 상층액을 1,000 rpm으로 10분간 2회 원심분리하여 세척하고 정자 pellets를 동량의 100  $\mu$ g/ml의 heparin(Sigma, USA)이 첨가된 BO액으로 희석하여 15분간 CO<sub>2</sub> 배양기에서 수정능획득을 유기시킨 정자부유액 2  $\mu$ l( $1.5 \times 10^6$  cells/ml)로 매정하였다.

### 2) 수정란의 동결

수정란의 동결은 1~18cell의 초기배를 이용하여 glycerol, DMSO 및 propanediol 등의 내동제를 각각 1.5M, 2.0M + 0.25M sucrose + 10% FCS + PBS의 조성으로 제조한 동결액으로 각각 5분간 평형시킨 후 1 cm 높이의 부표위에 straw를 놓아 5분간 예냉시킨 다음 액체질소에 곧바로 침지함으로써 급속동결을 실시하였다.

### 3) 체외발생 및 생존성의 판정

체외발생 및 생존성의 판정은 동결한 수정란을 실온에 1분간 방치후 38 $^{\circ}$ C의 온수에서 용해한 다음 신선한 PBS로 3회 세척하고 배양액에서 배양하면서 상실배 후기 및 배반포기로의 발생상태를 관찰하여 판정하거

나, FDA-test에 의해 판정하였다(Schilling 등, 1982).

## III. 결과 및 고찰

### 1. 내동제의 평형시간에 따른 체외발생율

소 수정란의 급속동결 용해에 있어서 내동제의 평형시간에 따른 급속동결 용해 후의 체외발생율은 Table 1에서 보는 바와 같다.

1.5M, 2.0M glycerol 및 DMSO에 0.25M, 0.50M sucrose가 첨가된 배양액에서 내동제의 평형시간을 2.5분, 5분, 10분, 20분으로 처리한 후 동결 용해하였을 때 체외발생율은 각각 12.1~15.6%, 11.1~14.7%, 9.7~11.4% 및 6.3~10.3%로서 2.5분 및 5.0분의 평형시간이 10분 및 20분의 평형시간보다 높은 체외발생율을 나타냈다. 이러한 결과는 2.0M DMSO와 0.25M sucrose를 이용하였을 때 2분 이하의 평형시간이 생존율에 있어 가장 우수하며 5분과 10분간에는 차이가 없었으나 20분에서는 현저하게 저조하였다고 보고한 Trounson 등(1987) 및 Boon 등(1988)의 결과와 거의 일치하였다.

### 2. 용해온도에 따른 체외발생율

소 수정란의 급속동결 용해에 있어서 용해온도에 따른 체외발생율은 Table 2에 나타난 바와 같다.

1.5M, 2.0M glycerol 및 1.5M, 2.0M DMSO에 0.25M, 0.50M sucrose를 처리후 동결한 수정란을 20 $^{\circ}$ C, 30 $^{\circ}$ C 및 35 $^{\circ}$ C에서 용해하였을 때 체외발생율은

**Table 1. Effects of equilibration time in the freezing media on *in vitro* developmental rates of rapidly frozen bovine embryos**

Freezing medium(M)	Equilibration time(min)											
	2.5		5.0		10.0		20.0					
	Froz.	Sur.	No. of m. & b.(%)	Froz.	Sur.	No. of m. & b.(%)	Froz.	Sur.	No. of m. & b.(%)			
Control			35 / 8(22.9)			33 / 8(24.2) <sup>a</sup>			33 / 8(24.2)			31 / 7(22.6)
1.5G+0.25S	31	15	5(16.1)	34	15	5(14.7)	34	16	4(11.4)	29	14	3(10.3)
2.0G+0.50S	28	14	5(17.9)	30	14	4(13.3)	30	13	3(10.0)	28	12	3(10.7)
1.5D+0.25S	35	15	6(17.1)	33	11	4(12.1) <sup>b</sup>	29	14	3(10.3)	25	11	4(16.0)
2.0D+0.50S	33	14	4(12.1)	27	15	3(11.1)	31	16	3( 9.7)	32	14	2( 6.3)

<sup>a, b</sup> : Percentage followed by different letters within the same column differ significantly (p<0.05).

**Table 2. Effects of thawing temperature in the freezing media on *in vitro* developmental rates of rapidly frozen bovine embryos**

Freezing medium(M)	Thawing temperature(°C)								
	20 <sup>b</sup>			30 <sup>a</sup>			35 <sup>b</sup>		
	Froz.	Sur.	No. of morula & blast.(%)	Froz.	Sur.	No. of morula & blast.(%)	Froz.	Sur.	No. of morula & blast.(%)
Control			35 / 8(22.8)			30 / 7(23.3)			32 / 7(21.9)
1.5G+0.25S	35	11	6(17.1)	32	11	5(15.4)	30	11	4(13.3)
2.0G+0.50S	32	10	5(15.6)	29	10	4(13.8)	32	11	3( 9.4)
1.5D+0.25S	34	9	6(17.7)	30	10	5(16.7)	28	10	3(10.7)
2.0D+0.50S	30	8	4(13.3)	29	8	3(10.3)	29	9	2( 6.9)

<sup>a, b</sup> : Percentage followed by different letters within the same column differ significantly ( $p < 0.05$ ).

**Table 3. Effects of thawing time in the freezing media on *in vitro* developmental rates of rapidly frozen bovine embryos**

Freezing medium(M)	Thawing time(min)								
	1			5			10		
	Froz.	Sur.	No. of morula & blast.(%)	Froz.	Sur.	No. of morula & blast.(%)	Froz.	Sur.	No. of morula & blast.(%)
Control			30 / 7(23.3)			34 / 8(23.5)			30 / 6(20.0)
1.5G+0.25S	30	11	5(16.7)	32	11	5(15.6)	31	13	4(12.9)
2.0G+0.50S	35	10	6(17.1)	29	12	4(13.8)	32	11	3( 9.4)
1.5D+0.25S	33	12	5(15.2)	30	12	5(16.7)	28	10	3(10.7)
2.0D+0.50S	32	13	4(12.5)	29	11	4(13.8)	29	10	2( 6.9)

각각 13.3~17.1%, 10.3~16.7% 및 6.9~13.3%로서 30°C에서 융해하였을 때 비교적 높은 체외발생율을 나타냈다. 이러한 결과는, mouse배를 이용하여 20°C에 1분간의 융해시간이 다른 융해온도에 비해 생존율이 높았다는 Szell과 Shelton(1986a, b), Mapletoft(1989a, b) 및 Smorag 등(1990)의 결과와 유사하였으나, 37°C에 10~30초간 융해한 Robertson 등(1989) 및 Hernandez-Ledezma 등(1988a, b)의 결과와 30°C 및 35°C에서 융해한 Bielanski 등(1984)과 Takeda(1984)의 결과와는 차이가 있었다.

### 3. 융해시간에 따른 체외발생율

소 수정란의 급속동결에 있어서 동결한 수정란의 융해시간에 따른 체외발생율은 Table 3에서 보는 바와 같다.

1.5M, 2.0M의 glycerol 및 DMSO + 0.25M, 0.50M의 sucrose 동결액에서 처리후 동결한 수정란을

각각 1, 5, 10분간 융해하였을 때 체외발생율은 12.5~17.1, 13.8~16.7, 6.9~12.9%로서 1분 및 5분의 융해시간이 10분보다 높은 체외발생율을 나타냈다. 이러한 결과는, 2.0M DMSO와 0.25M sucrose를 이용하였을 때 2분 이하의 평형시간이 생존율에 있어 가장 우수하며 5분과 10분간에는 차이가 없었으나 20분에서는 현저하게 저조하였다고 보고한 Trounson 등(1987) 및 Boon 등(1988)의 결과와 거의 일치하였다.

### 4. 1 step straw법에 따른 체외발생율

소 수정란의 급속 동결에 있어서 각 내동제에 첨가된 sucrose를 내동제 제거에 이용하여 삼투압차에 의해 1단계 straw법에 의해 동결 융해하였을 때 체외발생율은 Table 4와 같다.

1.5M, 2.0M의 glycerol과 DMSO 및 propanediol에 0.25, 0.50, 0.75, 1.00M sucrose농도를 첨가하여

**Table 4. Effects of sucrose concentration added to freezing media on *in vitro* developmental rates of rapidly frozen bovine embryos by 1 step straw method**

Freezing medium(M)	Sucrose dilution(M)							
	0.25		0.50		0.75		1.00	
	Froz. Sur.	No. of m. & b.(%)	Froz. Sur.	No. of m. & b.(%)	Froz. Sur.	No. of m. & b.(%)	Froz. Sur.	No. of m. & b.(%)
Control		30 / 8(26.7) <sup>a</sup>		30 / 7(23.3) <sup>a</sup>		30 / 6(20.0)		30 / 7(23.3)
1.5 G	31 11	31 / 6(19.4)	32 10	5(15.6) <sup>b</sup>	32 8	4(12.5)	32 9	3( 9.4)
2.0 G	33 12	5(15.2)	30 8	4(13.3)	30 9	4(13.3)	31 8	4(12.9)
1.5 D	30 9	4(13.3)	32 8	5(15.6)	26 5	3(11.5)	30 5	3(10.0)
2.0 D	31 12	5(16.1)	29 7	4(12.9)	29 7	4(13.8)	32 7	3( 9.4)
1.5 P	30 10	5(16.7)	30 9	3(10.0)	32 8	3( 9.4)	29 5	2( 6.9)
2.0 P	32 8	4(12.5)	29 6	3(10.3)	33 8	3( 9.1)	30 7	2( 6.7)

<sup>a, b</sup> : Percentage followed by different letters within the same column differ significantly ( $p < 0.05$ ).

1 step straw법으로 융해하였을 때 체외발생율은 각각 12.5~19.4, 10.0~15.6, 9.1~13.8 및 6.7~12.9%로서 0.25M sucrose의 농도에서 비교적 높은 체외발생율을 나타냈으나 0.75M 및 1.00M sucrose에서는 비교적 낮은 체외발생율을 나타냈다. 내동제에 첨가된 sucrose의 적정농도에 대해 Mapletoft 등(1989a,b) 및 Trounson 등(1987)은 0.5M이, Szell과 Shelton(1987) 및 Wilton 등(1989)은 0.25M이, Mapletoft 등(1987)은 1.0M과 1.5M이, Andrede와 Rodrigues(1987)은 1.0M이라고 보고하였다. 한편, Wood와 Farrant(1980) 및 Szell과 Shelton(1986a, b)은 sucrose를 내동제에 첨가할 경우 세포내의 자유수를 탈수시키므로써 외부세포막을 보호하여 초급속동결이 가능하다고 하였으며, Renard 등(1983) 및 Leibo(1984) 등은 sucrose를 내동제 제거에 이용하면 삼투압 차에 의해 순간적 제거가 가능하므로 1 step straw법이 가능하다고 하였다.

#### IV. 적 요

본 연구는 소 수정란의 급속동결에 있어서 융해온도와 시간, 내동제의 평형시간 및 1 단계 straw법이 체외발생율에 미치는 영향을 조사하였다.

1. 수정란의 급속동결에 있어서 내동제의 평형시간에 따른 동결 융해 후의 체외발생율은 내동제의 평형시간을 2.5, 5, 10, 20분으로 처리하였을 때 2.5분 및 5.0분이 10분 및 20분보다 높은 체외

발생율을 나타냈다.

2. 수정란의 급속동결에 있어서 융해온도에 따른 체외발생율은 30℃에서 융해한 것이 20℃ 및 35℃에서 융해한 것보다 유의하게 높았다.
3. 수정란의 급속동결 융해에 있어서 동결수정란을 1, 5, 10분간 융해하였을 때 체외발생율은 12.5~17.1, 13.8~16.7, 6.9~12.9%로서 1분 및 5분의 융해시간이 10분보다 높은 체외발생율을 나타냈다.
4. 수정란의 급속 동결시 1.5, 2.0M의 glycerol과 DMSO 및 propanediol에 0.25, 0.50, 0.75, 1.00M sucrose농도를 첨가하여 1 step straw법으로 급속동결 융해하였을 때 체외발생율은 각각 12.5~19.4, 10.0~15.6, 9.1~13.8 및 6.7~12.9%로 나타났다.

#### V. 인용문헌

1. Andrede, T. P. and J. L. Rodrigues. 1987. Rapid freezing of mouse embryos; In glycerol-sucrose medium. *Theriogenology*, 31:225.
2. Bielanski, A. 1987. Survival *in vitro* of zona pellucidae-free mouse embryos after cooling conventional two step or vitrification methods. *Cryo-Letters*, 8:294-301.
3. Bielanski, A., W. Johnson, U. Schneider and R. J. Mapletoft. 1984. Plunge temperature

- and embryos survival. *Theriogenology*, 21:221(Abstract).
4. Boon, W. R., C. A. Brown, J. M. Vasquez and S. S. Shapiro. 1988. Freezing of mammalian embryos without the aid of a programmable freezer. *Fertil. Steril.*, 50:348-354.
  5. Hernandez-Ledzma, J. J., C. T. Gaskins and R. W. Wright. 1988a. Freezing of mouse embryos with cryoprotectant mixture(CPM) of glycerol and 1, 2-propanediol. *Theriogenology*, 29:285.
  6. Hernandez-Ledzma, J. J., J. P. Selgrath and R. W. Wright. 1988b. One step sucrose dilution of a cryoprotectant mixture(CPM) of glycerol and 1,2-propanediol. *Theriogenology*, 29:259.
  7. Leibo, S. P., P. Mazur and S. C. Jackowski. 1984. Factors affection survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Exp. Cell. Res.*, 98:79-88.
  8. Mapletoft, R. J., J. S. Moker and W. C. Hag-ele. 1987. Comparison of two methods of removing glycerol from frozen-thawed mouse embryos with sucrose. *Theriogenology*, 27:255.
  9. Mapletoft, R. J., J. Moker and A. Palasz. 1989a. Effect of thawing temperature and time to sucrose dilution on survival of mouse embryos in culture. *Theriogenology*, 31:225.
  10. Mapletoft, R. J., J. Moker and A. Palasz. 1989b. The effect of sucrose concentration, temperature and time on survival of fresh mouse embryos in culture. *Theriogenology*, 31:225.
  11. Palasz, A., Del. M. R. Campo and R. J. Mapletoft. 1990. The effect of methods of thawing and glycerol removal on survival of frozen mouse and bovine embryos. *Theriogenology*, 33:294.
  12. Renard, J. P., Y. Heyman, P. Leymonie and J. C. Plat. 1983. Sucrose dilution: A technique for field transfer of bovine embryos frozen in the straw. *Theriogenology*, 19:145.
  13. Robertson, J. L., B. S. Minhas, G. W. Randall, M. G. Dodson, T. V. Palmer and D. D. Ricker. 1989. Ultrarapid freezing of mouse embryos with DMSO and trehalose. *Theriogenology*, 31:250(Abstract).
  14. Schilling, E., H. Niemann and D. Smidt. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. *Cryobiology*, 15:245-248.
  15. Smorag, Z., Y. Heyman, V. Garnier and S. S. Shapiro. 1990. Freezing of mammalian embryos without the aid of a programmable freezer. *Fertil. Steril.*, 50:348-354.
  16. Szell, A. and J. N. Shelton. 1986a. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 78:699-703.
  17. Szell, A. and J. N. Shelton. 1986b. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. *J. Reprod. Fert.*, 80:401-408.
  18. Szell, A. and J. N. Shelton. 1987. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solution on day-3 mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 78:699-703.
  19. Takeda, T., R. P. Elsdén and G. E. Jr. Seider. 1984. Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen. *Theriogenology*, 21:266(Abstract).
  20. Trounson, A., A. Peura and C. Kirby. 1987. Ultrarapid freezing ; A new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil. Steril.*, 48:843-850.
  21. Whittingham, D. G., S. P. Leibo and P. Mazur. 1972. Survival of mouse embryos frozen to  $-196^{\circ}$  and  $-269^{\circ}$ C. *Science*, 178:411-414.
  22. Wilton, L. T., J. M. Shaw and A. O. Trounson. 1989. Successful single-cell biopsy and cryopreservation of preimplantation mouse

- embryos. Fertil. Steril., 51:513-517.
23. Wood, M. and J. Farrant. 1980. Preservation of mouse embryos by two-step freezing. Cryobiology, 17:178-180.
- 24 김상근, 이만휘. 1991. 소 수정란의 초급속 동결 용해후의 생존성에 관한 연구. 한국 가축번식학회지, 16(2):141-148.  
(접수일자 : 1997. 3. 15. / 채택일자 : 1997. 4. 28)