

소 수정란의 난구세포, 난관 상피세포, 호르몬과의 공배양 및 동결이 체외발생에 미치는 영향에 관한 연구

이종진 · 이명헌 · 김상근
충남대학교 수의과대학

Studies on the Effects of Co-culture of Cumulus Cell, Oviduct Epithelial Cell and Hormones and Freezing on *In Vitro* Developmental Rates of Bovine Embryos

J. J. Lee, M. H. Lee and S. K. Kim
Coll. of Vet. Med., Chungnam Natl. Univ

SUMMARY

The studies were carried out to investigate the effects of co-culture with cumulus cells and oviduct epithelial cells on the *in vitro* fertilization and cleavage rate of bovine follicular oocytes and to determine the optimum thawing temperature and equilibration time on *in vitro* developmental rate of frozen bovine embryos.

The ovaries were obtained from slaughtered Korean native cows. The follicular oocytes were cultured in TCM-199 medium containing 10 IU/ml의 PMSG, 10 IU/ml의 hCG, 1 μ g/ml의 β -estradiol and 10% FCS for 24~48 hrs in incubator with 5% CO₂ in air at 38.5 $^{\circ}$ C. The bovine embryos following dehydration by cryoprotective agents and a various concentration of sucrose were directly plunged into liquid nitrogen and thawed in 30 $^{\circ}$ C water. Survival rate was defined as developmental rate on *in vitro* culture or FDA-test.

The results are summarized as follows :

1. The *in vitro* fertilization and *in vitro* developmental rates of bovine oocytes co-cultured with cumulus cells in TCM-199 medium were 75.0~76.8% and 17.3~27.6%, respectively. And *in-vitro* fertilization rates of cumulus-enclosed oocytes(55.4%) were significantly($p<0.05$) higher than cumulus-denuded oocytes (23.1%).
2. The *in vitro* fertilization and *in vitro* developmental rates of bovine oocytes co-cultured with 1×10^4 cells/ml, 1×10^6 cells/ml, 1×10^8 cells/ml and 1×10^{15} cells/ml oviduct epithelial cells in TCM-199 medium were 74.5~77.8% and 15.7~21.2%, respectively.
3. The *in-vitro* fertilization and *in vitro* developmental rates of bovine oocytes co-cultured in TCM-199 media containing PMSG, hCG, PMSG+hCG, PMSG+ β -estradiol, hCG+ β -estradiol 0 to 40 hrs after insemination were 74.0~77.4% and 18.9~23.1%, respectively.
4. The survival rates of bovine embryos thawed after rapid freezing in the freezing medium containing a various concentration of sucrose added 1.5M and 2.0M glycerol, DMSO and propanediol were 23.5~31.4% and 20.6~34.1%, respectively.

5. The temperature thawed at 30°C after rapid freezing of bovine embryos resulted in a significantly higher embryos survival rate than did at 20°C and 35°C.
6. The equilibration time on the survival 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 (10~20min.).

(Key words : bovine embryos, co-culture, freezing, *in vitro* development)

서 론

초기배와 난구세포 및 난관 상피세포의 공배양으로 8~16 세포의 block stage 현상의 극복과 체외수정률의 개선 및 배반포로의 발생율도 향상시킬 수 있다(Crister 등, 1986; Eyestone과 First, 1989). 난구세포는 progesterone과 estradiol-17 β 의 2종류와 steroid hormone(Hamberger 등, 1978; Henderson 등, 1987)과 pyruvic acid(Donahue와 Stern, 1968)나 특이적 단백(Landefeld 등, 1978)을 분비하며, 난구세포의 대사에 의해 배양액 중에 포함된 배의 발육억제물질이 제거된다. 난포란과 난구세포와의 공배양은 수정률의 향상과 배발생을 증진에 기여한다는 보고(Crister 등, 1986; Lu 등, 1987)와, Motlik과 Fulka(1981)는 난구세포의 첨가가 핵 성숙을 3시간 정도 지연시킨다는 보고가 있다.

수정란의 동결은 실험동물을 대상으로 동결 보존하였으나, 최근에는 vitrification solution을 제조하여 액체질소 container의 증기로 직접 동결하거나, 고농도의 내동제를 이용하여 동결된 수정란내의 수분을 탈수시킨 상태에서 직접 액체질소 중에 침지하는 간편한 급속동결법에 관한 연구가 이루어지고 있다. 그러나, 수정란의 동결시 sucrose의 적정농도 (Mapletoft 등, 1989a; Trounson 등, 1987; Szell과 Shelton, 1987; Wilton 등, 1989; Hernandez-Ledezma 등, 1988a, b; Mapletoft 등, 1987; Andrede와 Rodrigues, 1987), 내동제의 평형시간 (Mapletoft, 1989a, b; Robertson 등, 1989; Trounson 등, 1987; Boon 등, 1988) 용해온도(Mapletoft, 1989a, b; Szell과 Shelton, 1986a, b; Smorag 등, 1990; Bielanski, 1987; 김과 이, 1991)등에 따라 생존률과 체외발생률에 큰 영향을 미칠 뿐만 아니라, 보고자간에 결과에도 큰 차이가 있다. 최근의

수정란의 동결은 programing된 자동동결기에 의해 이루어지고 있으나 이 방법은 고가의 기자재가 요구되며 용해된 수정란으로부터 동결보호제를 제거하는데 상당시간이 소요되는 불편이 있어 어느 정도 생존률이 높으면서도 간편하게 동결할 수 있는 방법이 요청되고 있다.

이에, 본 연구는 소 난포란의 난구세포, 난관 상피세포 및 호르몬과의 공배양이 체외수정 및 체외발생률에 미치는 영향과 초기배의 동결시 내동제의 농도, 평형시간, sucrose농도 및 용해온도가 체외발생률에 미치는 영향을 규명하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 회수

도살한우의 난소를 적출하여, 100 μ IU/ml의 penicillin G와 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate를 첨가한 38°C의 생리식염수에 침지하여 실험실로 운반한 다음, 난포액을 흡입하여 petri dish에 채취한 후 실험현미경(20~40 \times)하에서 난포란을 회수하여 배양액으로 3회 세척 후 CO₂ 배양기내(5% CO₂, 95% air, 38.5°C)에서 배양하였다. 배양액은 10% (v/v)의 FCS와 100 IU/ml의 penicillin G 및 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate가 첨가된 TCM-199(Bioproducts Co., USA) 배양액을 이용하였다.

2. 호르몬, 난구세포, 난관 상피세포의 첨가

배양액에 10 IU/ml의 PMSG(Sigma, USA), 10 IU/ml의 hCG(Sigma, USA), 1 μ g/ml의 β -estradiol(Sigma, USA)을, 난구세포는 직경 5~10 mm의 난포를 적출하고 난포 주변의 간질조직을 제거한 후 난구세포를 시험관에 회수하여 500 rpm으로 5분간 원심분리한 다음 상층액을 제거한 후 배양액을 첨가하여 2회에 걸쳐 1,500 rpm으로 원심분

리하여 상층액을 버리고 1×10^5 cells/ml의 생존 세포를, 난관 상피세포는 발정후 4~5일 이내의 난관 팽대부로부터 채취한 난관 상피세포를 3~4회 계대한 후 배양 1~3일전에 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 streptomycin sulfate로 약 3시간 처리하여 trypsin-EDTA로 세포를 부유시킨 50×10^4 cells/ml 생존세포를 첨가하여 공배양하였다.

3. 난포란의 체외성숙 및 체외수정

난포란의 체외성숙은 배양액 $50 \mu\text{l}$ 의 drop을 mineral oil(Squibb Co., USA)로 피복하여 drop당 5개의 난포란을 침지하여 24시간 성숙배양하였다. 체외수정은 성숙 난포란을 mineral oil로 피복한 $45 \mu\text{l}$ 의 drop에 5개 주입한 후, 수정용 TCF액 1ml에 정액 0.2ml를 혼합하여 CO_2 배양기에서 swim-up 처리 후, 상층액을 2,000 rpm으로 10분간 2회 원심분리한 다음 침전된 정자 pellets을 동량의 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 heparin(Sigma, USA)이 첨가된 BO액으로 희석하여 15분간 CO_2 배양기에서 수정능 획득을 유지시킨 정자부유액 $2 \mu\text{l}$ (1.5×10^6 cells/ml)로 매정하였다.

4. 수정란의 동결

수정란의 동결은 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.

5. 체외수정, 체외발생 및 생존성의 판정

체외발생의 판정은 수정란을 배양하면서 상실배 후기 및 배반포기로의 체외발생을 관찰하거나, 동결수정란은 straw를 실온에 30초간 방치한 다음 38°C 의 온수에서 용해 후 신선한 PBS로 3회 세척한 후 FDA-test의 생존지수에 의해 생존 여부를 판정하였다(Schilling 등, 1982).

결과 및 고찰

1. 난포란의 공배양시 체외수정율 및 체외발생률

1) 난구세포의 첨가

소 난포란과 10%의 FSH와 난구세포를 첨가한 배양액에서 공배양했을 때 체외수정률과 체외발생률은 Table 1에 나타난 바와 같다.

10%의 FSH와 1×10^4 cells/ml의 난구세포를 배양액에 첨가하여 공배양했을 때 체외수정률과 체외발생률은 각각 76.8%와 25.0%였으며, 1×10^6 cells/ml의 난구세포를 첨가했을 때 체외수정률과 체외발생률은 각각 75.9%와 27.6%였다. 또한, 1×10^8 cells/ml 및 1×10^{15} cells/ml의 난구세포를 첨가하여 공배양했을 때 체외수정률과 체외발생률은 각각 75.9%와 22.2%, 75.0%와 17.3%로서 난구세포를 1×10^{15} cells/ml로 많이 첨가했을 때 체외수정률과 체외발생률은 감소하였다. 한편, 24시간 배양 후 매정한 난자의 형태에 따른 체외수정률은 Table 2에서 보는 바와 같이, 난구세포 부착난자와 나화난

Table 1. Effects of a various concentration of cumulus cells added to culture media on *in-vitro* fertilization and developmental rates of bovine oocytes

No. of cumulus cells	No. of oocytes examined	No. of oocytes fertilized(%)*	No. of oocytes developed(%)**
Control	50	35(70.0)	8(16.0) ^a
1×10^4 /ml	56	43(76.8)	14(25.0)
1×10^6 /ml	58	44(75.9)	16(27.6) ^b
1×10^8 /ml	54	41(75.9)	12(22.2)
1×10^{15} /ml	52	39(75.0)	9(17.3)

* : The number of oocytes fertilized

** : The number of embryos developed

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

Table 2. Effects of cumulus-enclosed and denuded oocytes co-cultured with cumulus cells added to culture media on *in-vitro* fertilization rates of bovine oocytes

Oocytes	Cumulus cells ($\times 10^6$ /ml)	No. of examined oocytes	No. of ova fertilized(%)		
			Total	Normal	Abnormal
Cumulus- enclosed	0.0	21	19(90.5)	8(38.1)	11(52.4)
	1.0	24	21(87.5)	17(70.8)	4(16.7)
	5.0	20	19(95.0)	11(55.0)	8(40.0)
	Total	65	59(90.8)	36(55.4) ^a	23(35.4)
Cumulus- denuded	0.0	22	19(86.4)	4(18.2)	15(68.2)
	1.0	20	16(80.0)	5(25.0)	11(55.0)
	5.0	23	18(78.3)	6(26.1)	12(52.2)
	Total	65	53(81.5)	15(23.1) ^b	38(58.5)

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

자의 체외수정률은 각각 55.4%와 23.1%로서 난구세포 부착난자의 체외수정률이 유의한 증가($p < 0.05$)를 나타냈다. 난구세포 부착난자에 대해 난구세포의 첨가는 무첨가구인 대조군에 비해 비교적 높은 체외수정률과 체외발생률을 나타냈다.

이러한 결과는 배양액에 난구세포를 첨가했을 때 체외성숙률 및 체외수정률이 향상된다고 한 Ball 등(1983) 및 Crister 등(1986)과 난구세포 부착난자는 나화난자에 비해 성숙률과 수정률이 높다는 Leibfried와 First(1979), Sirard 등(1988)의 보고와 일치하였다. 그러나, Tsafiriri 등(1976)과 Hillensjo 등(1981)은 난포액내에는 난포란의 성숙억제물질이 있어 난포란의 성숙을 억제한다고 보고하였으나, Nekola와 Smith(1974) 및 Jagiello 등(1977)은 난구세포와 공배양했을 때 난포란의 성숙을 억제하지 않는다고 보고하였다. 난구세포 부착난자에 난구세포를 첨가한 배양액으로 공배양했을 때 체외수정률과 체외발생률이 향상됨이 인정되었다.

2) 난관 상피세포의 첨가

소 난포란과 10%의 FSH와 난관 상피세포를 첨가한 배양액에서 공배양했을 때 체외수정률과 체외발생률은 Table 3에 나타난 바와 같다.

10%의 FSH와 1×10^4 cells /ml의 난관 상피세포를 첨가하여 공배양했을 때 체외수정률과 체외발생률은 각각 77.8%와 20.7%였으며, 1×10^6 cells /ml의 난관 상피세포를 첨가하여 공배양했을 때 체외수정률과 체외발생률은 각각 76.9%와 21.2%였다. 또한, 1×10^8 cells /ml 및 1×10^{15} cells /ml의 난관 상피세포를 첨가하여 공배양했을 때 체외수정률과 체외발생률은 각각 77.6%와 18.4% 및 74.5%와 15.7%로서 난관 상피세포를 첨가한 배양액에서 배양했을 때 대조군보다 높은 체외수정률과 체외발생률을 나타냈다. 이러한 결과는 난포란과 난관 상피세포를 공배양했을 때 대조군에 비해 체외수정률과 체외발생률이 다소 증가하였다는 Eyestone과 Fir-

Table 3. Effects of a various concentration of oviduct epithelial cells added to culture media on *in-vitro* fertilization and developmental rates of bovine oocytes

No. of epithelial cells	No. of oocytes examined	No. of oocytes fertilized(%)	No. of embryos developed(%)
Control	50	35(70.0)	8(16.0)
1×10^4 /ml	54	42(77.8)	11(20.7)
1×10^6 /ml	52	40(76.9)	11(21.2)
1×10^8 /ml	49	38(77.6)	9(18.4)
1×10^{15} /ml	51	38(74.5)	8(15.7)

Table 4. Effects of co-culture with hormone supplementation between 0~40hrs on the *in vitro* developmental rates of bovine oocytes

Supplementation of hormones	No. of oocytes examined	No. of oocytes fertilized(%)	No. of embryos developed(%)
Control	50	35(70.0)	8(16.0)
PMSG	53	41(77.4)	10(18.9)
hCG	51	39(76.5)	10(19.6)
PMSG + hCG	52	40(76.9)	11(21.2)
PMSG + Estradiol	54	40(74.0)	12(22.2)
hCG + Estradiol	52	39(75.0)	12(23.1)

st(1989)의 보고와 일치하였다. 난관 단층세포가 초기배의 체외발생에 작용하는 기전은 명확하게 알려져 있지 않으나 배양액내로 난관 단층세포에 의한 발생자극인자가 분비되거나 또는 배양액내의 발생억제물질을 제거함으로써 그 효과를 나타내는 것으로 고찰된다.

3) 호르몬의 첨가

소 난포란과 10%의 FSH와 호르몬을 첨가한 배양액에서 공배양했을 때 체외수정률과 체외발생률은 Table 4에 나타난 바와 같다.

수정후 0~40시간에 TCM-199 배양액에 PMSG,

hCG, PMSG + hCG, PMSG + β -estradiol, hCG + β -estradiol 호르몬을 첨가하여 공배양했을 때 소 난포란의 체외수정률과 체외발생률은 각각 77.4%와 18.9%, 76.5%와 19.6%, 76.9%와 21.2%, 74.0%와 22.2%, 75.0%와 23.1%로서 무첨가 대조군의 70.0%와 16.0%에 비해 대체적으로 높은 성적을 나타냈으며 이러한 결과는 난포란의 체외성숙률에 있어서 FSH와 hCG를 첨가했을 때 체외성숙률과 체외수정률의 증가를 가져왔다는 Ball 등(1983)과 Hensleigh와 Hunter(1985) 등의 보고와 일치하였다.

Table 5. Effects of various cryoprotectants concentration added to freezing media on the survival rates of rapidly frozen bovine embryos

Freezing medium(M)	Sucrose concentration(M)					
	0.25			0.50		
	Frozen	Recovery(%)	Survival(%)	Frozen	Recovery(%)	Survival(%)
Control	40	39(97.5)	16(40.0)	40	38(95.0)	15(37.5)
1.5 G	42	40(95.2)	12(28.6)	36	33(91.7)	9(25.0)
2.0 G	37	35(94.6)	13(35.1)	38	35(92.1)	12(31.6)
1.5 D	35	33(94.3)	11(32.4)	41	39(95.1)	10(24.4)
2.0 D	38	35(92.1)	13(34.2)	39	35(89.7)	11(28.2)
1.5 P	37	34(91.9)	7(18.9)	34	31(91.2)	6(17.6)
2.0 P	34	32(94.1)	5(14.7)	37	35(94.6)	8(21.6)
1.5 G+1.5 D	37	35(94.6)	11(29.7)	37	34(91.9)	10(27.0)
2.0 G+2.0 D	35	32(91.4)	11(31.4)	41	39(95.1)	14(34.1)
1.5 D+1.5 P	41	39(95.1)	10(24.4)	36	33(91.7)	8(22.2)
2.0 D+2.0 P	39	36(92.3)	10(25.6)	34	31(91.2)	7(20.6)
1.5 P+1.5 G	34	31(91.2)	8(23.5)	37	35(94.6)	8(21.6)
2.0 P+2.0 G	36	33(91.7)	9(25.0)	35	32(91.4)	8(22.9)

G : glycerol, D : DMSO, P : propanediol

2. 수정란의 동결융해 후의 생존률

1) 내동제의 농도

소 수정란의 급속동결에 있어서 배양액에 첨가된 내동제와 sucrose의 농도에 따른 생존률은 Table 5와 같다.

0.25M sucrose에 glycerol, DMSO 및 propanediol을 각각 1.5M 및 2.0M농도의 첨가에 따른 수정란의 급속동결 융해 후의 생존률은 각각 18.9~35.1%였으며 0.5M sucrose농도의 첨가에 따른 생존률은 17.6~31.6%로서 0.25M sucrose 첨가가 0.50M sucrose농도보다 높은 생존률을 나타냈다. 한편, 1.5M glycerol + 1.5M DMSO, 2.0M glycerol + 2.0M DMSO, 1.5M DMSO + 1.5M propanediol, 2.0M DMSO + 2.0M propanediol, 1.5M propanediol + 1.5M glycerol 및 2.0M propanediol + 2.0M glycerol의 내동제에 0.25M 및 0.50M sucrose의 첨가에 따른 생존률은 각각 23.5~31.4% 및 21.6~34.1%의 생존률을 나타냈다. 이러한 결과는 동결방법에 차이가 있으나, mouse 배를 이용한 Chupin과 Reviers(1986), Williams와 Johnson(1985) 등의 79.6%와 84.0%의 생존률과 Trounson 등(1987)의 76.0%에 비해서는 낮은 성적이었으나 Kasai 등(1980)의 20~39%에 비해서는 다소 높은 성적이었다. Tsunoda 등(1982) 및 Niemann(1985) 등은 명확한 분할구 상태를 나타내는 것이 생존률이 높다고 보고하였다.

2) Sucrose의 농도

소 수정란의 급속동결에 있어서 각 내동제에 첨가된 sucrose의 농도에 따른 동결 융해 후의 생존률은 Table 6과 같다.

1.5M, 2.0M glycerol, 1.5M, 2.0M DMSO 및 1.5M, 2.0M propanediol에 0.25M, 0.50M, 0.75M 1.00M sucrose농도의 첨가에 따른 급속동결 융해후의 생존률은 각각 22.9~35.1%, 20.7~31.3%, 19.2~30.0% 및 17.2~25.0%로서 0.25M sucrose의 농도에서 비교적 높은 생존률을 나타냈으나 0.75M 및 1.00M sucrose에서는 비교적 낮은 생존률을 나타냈다. 내동제에 첨가된 sucrose의 적정농도에 대해 Mapletaft 등(1989a,b) 및 Trounson 등(1987)은 0.5M이, Szell과 Shelton(1987) 및 Wilton 등(1989)은 0.25M이, Mapletaft 등(1987)은 1.0M과 1.5M이, Andrede와 Rodrigues(1987)는 1.0M이라고 보고하였다. Wood와 Farrant(1980) 및 Szell과 Shelton(1986b)은 sucrose를 내동제에 첨가할 경우 세포내의 자유수를 탈수시킴으로서 외부 세포막을 보호하여 초급속동결이 가능하다고 하였으며, Renard 등(1983) 및 Leibo 등(1984) 등은 sucrose를 내동제 제거에 이용하면 삼투압 차에 의해 순간적 제거가 가능하므로 1단계 straw법이 가능하다고 하였다.

3) 융해온도

소 수정란의 급속동결 융해에 있어서 융해온도에 따른 생존률은 Table 7에 나타난 바와 같이 1.5M,

Table 6. Effects of sucrose concentration added to freezing media on the survival rates of rapidly frozen bovine embryos

Freezing medium(M)	Sucrose dilution(M)							
	0.25		0.50		0.75		1.00	
	Frozen	Survival(%)	Frozen	Survival(%)	Frozen	Survival(%)	Frozen	Survival(%)
Control	30	16(53.3) ^a	30	15(50.0) ^a	30	13(43.3)	30	12(40.0)
1.5 G	37	13(35.1) ^b	32	10(31.3) ^b	32	8(25.0)	35	9(25.0)
2.0 G	35	12(34.3) ^b	30	8(26.7)	30	9(30.0)	37	8(21.6)
1.5 D	36	9(25.0)	32	8(25.0)	26	5(19.2)	30	5(16.7)
2.0 D	41	12(29.3)	29	7(24.1)	29	7(24.1)	32	7(21.9)
1.5 P	39	10(25.6)	30	9(30.0)	32	8(25.0)	29	5(17.2)
2.0 P	35	8(22.9)	29	6(20.7)	33	8(24.2)	35	7(20.0)

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

Table 7. Effects of thawing temperature in the freezing media on the survival rates of rapidly frozen bovine embryos

Freezing medium(M)	Thawing temperature(℃)					
	20		30		35	
	Frozen	Survival(%)	Frozen	Survival(%)	Frozen	Survival(%)
Control	35	17(48.6)	35	15(42.9)	35	14(40.0)
1.5G+0.25S	35	11(31.4)	32	11(34.4)	30	8(26.7)
2.0G+0.50S	32	10(31.3)	29	10(34.5)	32	8(25.0)
1.5D+0.25S	34	9(26.5)	30	9(30.0)	28	9(32.1)
2.0D+0.50S	30	8(26.7)	29	8(27.6)	29	7(24.1)

Table 8. Effects of equilibration time in the freezing media on the survival rates of rapidly frozen bovine embryos

Freezing medium(M)	Equilibration time in the freezing media(min)							
	2.5		5.0		10.0		20.0	
	Frozen	Survival(%)	Frozen	Survival(%)	Frozen	Survival(%)	Frozen	Survival(%)
Control	35	15(42.9)	35	15(42.9) ^a	35	17(48.0)	35	16(45.7)
1.5G+0.25S	32	12(37.5)	34	11(32.4)	34	10(29.4)	29	6(20.7)
2.0G+0.50S	28	10(35.7)	30	9(30.0)	30	8(26.7)	28	7(25.0)
1.5D+0.25S	35	15(34.9)	33	11(33.3) ^b	29	7(24.1)	25	4(16.0)
2.0D+0.50S	33	10(30.3)	27	8(29.6)	31	8(25.8)	32	16(18.8)

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

2.0M glycerol 및 1.5M, 2.0M DMSO에 0.25M, 0.50M sucrose를 처리한 동결 수정란을 20℃, 30℃ 및 35℃에서 융해했을 때 생존률은 각각 26.5~31.4%, 27.6~34.5% 및 24.1~32.1%로서 30℃에서 융해했을 때 비교적 높은 생존률을 나타냈다. 이러한 결과는, mouse배를 이용하여 20℃에 1분간의 융해 시간이 다른 융해온도에 비해 생존률이 높았다는 Szell과 Shelton(1986a, b), Mapletoft(1989a,b), Smorag 등(1990) 및 이 등(1991)의 결과와 유사하였으나, 37℃에 10~30초간 융해했을 때 높다는 Robertson 등(1989) 및 Hernandez-Ledezma 등(1988a,b)의 결과와 30℃ 및 35℃에서 융해한 것이 높다는 Bielanski 등(1984)과 Takeda(1984)의 결과와는 차이가 있었다.

4) 내동제의 평형시간

소 수정란의 급속동결에 있어서 내동제의 평형시간에 따른 동결 융해 후의 생존률은 Table 8에서 보는 바와 같이, 1.5M, 2.0M glycerol 및 DMSO에 0.

25M, 0.50M sucrose가 첨가된 배양액에서 내동제의 평형시간을 2.5분, 5분, 10분, 20분으로 처리했을 때 동결 융해 후의 생존률은 각각 30.3~37.5%, 29.6~33.3%, 24.1~29.4% 및 16.0~25.0%로서 2.5분 및 5.0분의 평형시간이 10분 및 20분의 평형시간보다 높은 생존률을 나타냈다. 이러한 결과는 2.0M DMSO와 0.25M sucrose를 이용하였을 때 2분 이하의 평형시간이 생존률에 있어 가장 우수하며 5분과 10분간에는 차이가 없었으나 20분에서는 현저하게 저조하였다고 보고한 Trounson 등(1987) 및 Boon 등(1988)의 결과와 거의 일치하였다.

적 요

본 연구는 소 난포란과 난구세포, 난관 상피세포 및 호르몬을 첨가한 배양액에서 공배양시 체외수정률 및 체외발생률에 미치는 영향과 수정란의 동결에 있어서 내동제 종류 및 sucrose의 농도, 융해온도 및 평형시간이 동결 융해 후의 생존성과 체외발

생물을 조사하였다.

1. 소 난포란과 난구세포를 공배양했을 때 체외수정률과 체외발생률은 각각 75.0~76.8%와 17.3~27.6%였으며, 나화난자에 비해 난구세포 부착난자가 유의하게 높게 나타났다 ($p < 0.05$).
2. 소 난포란을 배양액에 1×10^4 cells/ml, 1×10^6 cells/ml, 1×10^8 cells/ml 및 1×10^{15} cells/ml의 난관 상피세포를 첨가하여 공배양했을 때 체외수정률과 체외발생률은 각각 74.5~77.8%와 15.7~21.2%였다.
3. 소 난포란을 수정 후 0~40시간에 배양액에 PMSG, hCG, PMSG + hCG, PMSG + β -estradiol, hCG + β -estradiol을 첨가하여 공배양했을 때 체외수정률과 체외발생률은 각각 74.0~77.4% 및 18.9~23.1%로서 대조군(16.0%)에 비해 높은 체외발생률을 나타냈다.
4. 1.5M glycerol + 1.5M DMSO, 2.0M glycerol + 2.0M DMSO, 1.5M DMSO + 1.5M propanediol, 2.0M DMSO + 2.0M propanediol, 1.5M propanediol + 1.5M glycerol, 2.0M propanediol + 2.0M glycerol 농도에 0.25M 및 0.50M sucrose를 첨가하여 급속동결 후 융해했을 때 생존률은 각각 23.5~31.4% 및 20.6~34.1%였다.
5. 소 수정란의 급속동결 융해에 있어서 융해온도별 처리효과는 30℃에서 융해한 것이 20℃ 및 35℃에서 융해한 것 보다 생존률이 유의하게 높았다.
6. 소 수정란의 급속동결에 있어서 동결액에서의 평형시간에 따른 생존률은 2.5분 및 5분의 평형시간이 10분, 20분보다 높게 나타났다.

참고문헌

- Andrede TP and Rodrigues JL. 1987. Rapid freezing of mouse embryos; In glycerol-sucrose medium. *Theriogenology*, 31:225.
- Ball GD, Leibfried ML, Lenz RW, Ax RL, Bavister BD and First NL. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. *Biol. Reprod.*, 28:717-725.
- Bielanski A, Johnson W, Schneider U and Mapletoft RJ. 1984. Plunge temperature and embryos survival. *Theriogenology*, 21:221(Abstract).
- Boon WR, Brown CA, Vasquez JM and Shapiro SS. 1988. Freezing of mammalian embryos without the aid of a programable freezer. *Fertil. Steril.*, 50:348-354.
- Chupin D and De Reviere MM. 1986. Quick freezing of rat embryos. *Theriogenology*, 26:157-166.
- Crister ES, Leibfried-Rutledge ML, Eyestone WE, Northey DL and First NL. 1986. Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro*. *Theriogenology*, 25:150 (Abstract).
- Donahue RP and Stern S. 1968. Follicular cell support of oocyte maturation : Production of pyruvate *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 17:395-398.
- 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.
- Hamberger L, Hillensjo T and Ahren K. 1978. Steroidogenesis in isolated cells of preovulatory rat follicles. *Endocrinol.*, 103:771-777.
- Henderson KM, McNatty KP, Smith P, Gibb M, O'Keeffe LE, Lun S, Heath DA and Prisk MD. 1987. Influence of follicular health on the steroidogenic and morphological characteristics of bovine granulosa cells *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 79:185-193.
- Hensleigh HC and Hunter AG. 1985. *In vitro* maturation of bovine cumulus enclosed primary oocytes and their subsequent *in vitro* fertilization and cleavage. *J. Dairy Sci.*, 68:1456-1462.
- Hernandez-Ledzma JJ, Gaskins CT and Wright RW. 1988a. Freezing of mouse embryos with cryoprotectant mixture(CPM) of glycerol

- and 1, 2-propanediol. *Therio.*, 29:285.
- Hernandez-Ledzma JJ, Selgrath JP and Wright RW. 1988b. One step sucrose dilution of a cryoprotectant mixture (CPM) of glycerol and 1,2-propanediol. *Theriogenology*, 29: 259.
- Hillensjo T, Chari S, Magnusson C, Duame D and Sterm G. 1981. Inhibitory effects of low molecular weight fractions of human follicular fluid upon rat granulosa cells and oocytes *in vitro*. *Excerpta Medica* :1-24.
- Jagiello G, Graffeo J, Ducayen M and Prosser R. 1977. Further studies of inhibitors of *in vitro* mammalian oocyte maturation. *Fert. Steril.*, 28:476-481.
- Kasai M, Niwa K and Iritani A. 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J. Reprod. Fert.*, 59:51-56.
- Landefeld TD, Campbell KL and Midgley AR Jr. 1978. Rapid changes in the synthesis of specific ovarian granulosa cell proteins induced by human choriogonadotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:5133-5157.
- Leibo SP, Mazur P and Jackowski SC. 1984. Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Exp. Cell. Res.*, 98:79-88.
- Leibfried L and First NL. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 48:76-86.
- Lu KH, Gordon I, Gallagher M and McGovern H. 1987. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. *Vet. Res.*, 121:259-260.
- Lu KH, Gordon I, Chen H.B, Gallagher M and McGovern H. 1988. Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by *in vitro* techniques. *Vet. Res.*, 122:539-540.
- Mapletoft RJ, Moker JS and Hagele WC. 1987. Comparison of two methods of removing glycerol from frozen-thawed mouse embryos with sucrose. *Theriogenology*, 27:255.
- Mapletoft RJ, Moker J and Palasz A. 1989a. Effect of thawing temperature and time to sucrose dilution on survival of mouse embryos in culture. *Theriogenology*, 31:225.
- Mapletoft RJ, Moker J and Palasz A. 1989b. The effect of sucrose concentration, temperature and time on survival of fresh mouse embryos in culture. *Theriogenology*, 31: 225.
- Motlik J and Fulka J. 1981. Fertilization of rabbit oocytes co-cultured with granulosa cells. *J. Reprod. Fert.*, 63:425-429.
- Nekola MV and Smith DM. 1974. Oocyte maturation and follicle cell viability *in vitro*. *Eur. J. Obstet. Gynec. Reprod. Biol.*, 4:125-131.
- Niemann H. 1985. Freezing of bovine embryos; Effects of a one-step dilution or 1.4M glycerol. *Theriogenology*, 23:369-379.
- Renard JP, Heyman Y, Leymonie P and Plat JC. 1983. Sucrose dilution; A technique for field transfer of bovine embryos frozen in the straw. *Theriogenology*, 19:145.
- Robertson JL, Minhas BS, Randall GW, Dodson M.G, Palmer TV and Ricker DD. 1989. Ultrarapid freezing of mouse embryos with DMSO and trehalose. *Theriogenology*, 31:250 (Abstract).
- Schilling E, Niemann H and Smidt D. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. *Cryobiology*, 15: 245-248.
- Sirard MA, Parrish JJ, Ware CB, Leibfried-Rutledge ML and First NL. 1988. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol. Reprod.*, 39: 546-552.
- Smorag Z, Heyman Y, Garnier V and Shapiro SS. 1990. Freezing of mammalian embryos without the aid of a programmable freezer.

- Fertil. Steril., 50:348-354.
- Szell A and Shelton JN. 1986a. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. J. Reprod. Fert., 78:699-703.
- Szell A and Shelton JN. 1986b. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. J. Reprod. Fert., 80:401-408.
- Szell A and Shelton JN. 1987. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solution on day-3 mouse embryos. J. Reprod. Fert., 78:699-703.
- Takeda T, Elsdon RP and Seider GE Jr. 1984. Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen. Theriogenology, 21:266(Abstract).
- Trounson A, Peura A and Kirby C. 1987. Ultrarapid freezing : A new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. Fertil. Steril., 48:843-850.
- Tsafiriri A, Pomerantz SH and Channing CP. 1976. Inhibition of oocyte maturation by porcine follicular fluidipartical characterization of the inhibitor. Biol. Reprod., 14:511-516.
- Tsunoda Y, Soma T and Sugie T. 1982. Effects of postovulatory age of recipient on survival of frozen-thawed rabbit morula. J. Reprod. Fert., 65:483-487.
- Williams TG and Johnson SE. 1985. Quick freezing of day four mouse embryos. Theriogenology, 23:235(Abstract).
- Wilton LT, Shaw JM and Trounson AO. 1989. Successful single-cell biopsy and cryopreservation of preimplantation mouse embryos. Fertil. Steril., 51:513-517.
- Wood Mand Farrant J. 1980. Preservation of mouse embryos by two-step freezing. Cryobiology, 17:178-180.
- 이봉구, 김상근, 이규승. 1991. 소 체외수정란의 초급속동결에 관한 연구. I. 소 체외수정란의 완만 및 초급속동결 용해후의 생존성에 관한 연구. 한국가축번식학회지, 16(2):133-140.
- 김상근, 이만휘. 1991. 소 체외수정란의 초급속동결에 관한 연구. II. 소 체외수정란의 초급속 동결 용해후의 생존성에 관한 연구. 한국가축번식학회지, 16(2):141-148.