

소 수정란의 Vitrification 동결 보존시 동결보호제의 종류 및 배 발달 단계가 생존성에 미치는 영향에 관한 연구

김상근[†] · 박상훈 · 석호봉¹

충남대학교 수의과대학

Studies on the Effects of Cryoprotectant Kinds and Cell Stages on the Viability of Bovine Embryos Cryopreserved by Vitrification

Kim, S. K.[†], S. H. Park and H. B. Suk¹

College of Vet. Med., Chungnam National University

ABSTRACT

This study was designed to investigate effect of cryoprotectant kinds and cell stages on the viability of bovine embryos cryopreserved by vitrification. The oocytes were collected from ovarian follicles of Korean native cows. The follicular oocytes were cultured in TCM-199 medium containing hormone and 10%(v/v) FCS for 24~48hrs in a incubator with 5% CO₂ in air at 38.5°C and then matured oocytes were again cultured for 7~10 hrs with spermatozoa capacitated by preincubation. The vitrification solutions of EFS and EDS were consisted of 40%(v/v) ethylene glycol, 18%(v/v) Ficoll and 0.3M sucrose, and 20%(v/v) ethylene glycol, 16.5%(v/v) DMSO and 0.5M sucrose in TCM-199 medium supplemented with 10% FCS, respectively. The embryos were exposed to EFS or EDS at 25°C and loaded into OPP straw for 30 sec. The plug end of each straws was heat-sealed and straws was slowly immersed into liquid nitrogen(LN₂). The results obtained were summarized as follows :

1. The rates of cleavage and hatching of embryos frozen with vitrification, rapid and slow freezing methods were 67.5%, 27.5% and 42.5%, 20.0% and 52.5%, 25.0%, respectively. And rates of cleavage and hatching of embryos frozen with vitrification method were significantly(p<0.05) higher than those in other methods, and the rates were lower than those in control group(82.5% and 37.5%).
2. The rates of cleavage and hatching of embryos were significantly(p<0.05) different between EFS(47.5% and 22.5%) and EPS(52.5% and 27.5%), and the rates were lower than those in control group(82.5% and 37.5%).
3. After vitrification freezing of bovine embryos at zygote, 2 cell, 8 cell, morulae and blastocyst stage, the rate of cleavage and hatching were 25.0% and 15.0%, 32.5% and 20.0%, 37.5% and 20.0%, 52.5%, 27.5%, 47.5% and 25.0%, respectively. And developmental rates to the expanded blastocyst stage of embryos frozen at zygote stage was significantly(p<0.05) lower rather than those in 2, 8-cell and morulae stage.

(Key words : Bovine embryos, Vitrification, Survival and hatching rate)

¹ 단국대학교 농과대학 (Coll. of Agriculture, Dankook University)

[†] Corresponding Author : College of Vet. Med., Chungnam National University,
Tel : (042) 821-6754, E-mail : kskkim@cuvic.cnu.ac.kr

I. 서론

수정란의 동결은 주로 마우스를 대상으로 Cell Freezer를 이용하여 내동제 처리에 따른 세포내의 탈수에 의해 빙결정 형성을 감소시킬 수 있는 완만동결법으로 동결보존하였으나 절차상의 번거로움이 있어 근래에는 내동제에 의해 수정란내의 수분을 탈수시킨 상태에서 초급속으로 동결하는 급속 동결법은 절차는 간편하지만 동결보존 후 생존율이 낮은 단점이 있다. 이러한 점을 개선하기 위해서 동결액내에 고농도의 내동제를 첨가하여 수분을 빙정화시키지 않고 과냉각상태로 유지하는 vitrification 동결보존법에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다(Rall과 Fahy, 1985; Kasai 등, 1990; Vajta 등, 1998ab).

수정란의 급속동결시 수정란 및 세포사멸의 주원인은 동결보호제의 화학적 독성, 평형시간 및 세포의 삼투적 위축, 세포내부의 빙결정 형성에 있으며, 세포내, 외부에서 생성되는 빙점은 세포에 물리적 압력을 가함으로써 세포질의 파괴를 일으키고 수정란의 평형시 동결보호제와 세포내 수분이 동에 필요한 시간과 용해 후 세포내 동결보호제의 이동이 세포의 발달에 큰 영향을 미치게 되므로 동결, 용해 후의 생존율에 큰 영향을 미친다(Rall, 1987; Rall, 1987; Trounson 등, 1987; Wilton 등, 1989). 또한, 수정란을 동결보존 후 배양하면 할구가 손상되어 생존 세포수가 감소하게 되므로 생존율에 영향을 미친다고 하였다(Tekeli 등, 1987; 김 등, 1991; 김과 이, 1991).

Rall과 Fahy(1985)는 mouse 배(8-cell stage)의 vitrification 동결이 가장 효과적이라고 보고하였고 이는 완만동결의 개선에 가장 가능성이 있다고 하였다. 또한, 미성숙난의 동결은 발달단계가 성숙 G-V stage가 적절하다고 보고하였다(van der Elst 등, 1993; Candy 등, 1994; Toth 등, 1994). Vitrification 동결에 성공한 보고는 VS3a method (Rall과 Wood, 1994; Dinnyes 등, 1995), EFS법 (Kasai 등, 1990; Tachikawa 등, 1993), ethylene glycol/PVP(Leibo와 Oda, 1993), EDS법(Vajta 등,

1998a; Lane 등, 1999)법 등이 있으며, 이들은 수정란의 vitrification동결시 고농도의 내동제 처리는 빙결정 형성(ice crystal formation)을 막을 수 있으며 높은 생존율을 얻을 수 있다고 하였다. 그러나 한우 수정란을 대상으로 완만 및 급속동결 후의 생존성에 대한 보고는 접할 수 있었으나 vitrification 동결보존 후의 생존성에 관한 연구는 찾아볼 수 없었다.

이에, 본 연구는 소 수정란의 동결에 있어서 완만 및 급속동결과 vitrification동결 후 발생율에 미치는 영향을 비교하고 이올리, 내동제의 종류 및 배 발달단계가 vitrification동결 보존후 발생율을 조사하고자 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 수정란의 준비

도살한우의 정상 난소 난포로부터 난포액을 흡입하여 실체현미경(40 ×) 하에서 형태적으로 우수한 난포란을 선별 회수하여 TCM-199(Sigma, USA) 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 배양액 50 μl drop내에서 24~48시간 배양기(38.5°C, 5% CO₂)에서 성숙배양하고 수정용 배양액으로 3회 세척한 다음 50 μl의 배양액 소적에 5개의 난포란을 주입한 후, 동결정액을 용해한 정자부유액 0.01 ml와 BO액 2ml을 잘 혼합하여 배양기에서 1시간 swim up 시킨 다음 약 0.5ml의 상층액을 1,000 rpm으로 10분간 원심분리 한 후 침전된 정자 pellets을 동량의 heparin 용액(100 μg/ml, Sigma Co., USA)과 함께 혼합하여 CO₂ 배양기에서 수정능 획득을 유지시킨 정자부유액 2 μl (1~5 × 10⁶/ml)을 주입한 다음 7~10시간 동안의 공배양으로 수정시켰다. 배양을 통해 발생상태를 관찰하면서 정성적으로 분할하는 수정란을 선별하여 시험에 이용하였다.

2. 수정란의 동결

수정란의 vitrification 동결시 내동제는 EFS(ethylene glycol 40%+Ficoll 18%+sucrose 0.3M+10% FCS)와 EDS(20% ethylene glycol+DMSO 16.5%+0.5M sucrose+10% FCS) solution을 이용하였으며, EFS vitrification은 수정란을 EFS용액으로 2회 세척 후 EFS용액에 부유시킨 후, EDS vitrification은 수정란을 VS1 용액에서 1분간 배양후 VS2 용액 20 μ l drop내에 옮겨 수정란을 pipetting에 의해 신속히 EDS용액으로 혼합한 후 각각 노출 1분 후 직경이 1.0mm OPP straw(Vajta 등, 1998a)에 충전 봉인한 다음 액체질소에 침지하여 vitrification을 실시하였다.

급속동결은 수정란을 각 농도의 내동제 + sucrose 0.3M+FCS 10%+TCM-199 배양액의 조성으로 제조한 동결액으로 각각 5분간 평형시킨 후 0.25ml straw내에 충전하고 봉인하여 labelling 한 후 1cm 높이의 액체질소 부표위에 straw를 놓아 5분간 예냉시킨 다음 액체질소에 즉시 침지함으로써 급속동결을 실시하였으며, 완만동결은 Cell Freezer (Forma Co., USA)의 sensor에 3.0M DMSO + 0.3M sucrose + 10% FCS+PBS의 내동제와 평형시킨후 장진한 straw를 끼워 동결하면서 autorecorder로 확인하였다. 동결온도는 precooling(0.5 $^{\circ}$ C/min)후 실온에서 4 $^{\circ}$ C까지는 1 $^{\circ}$ C/min, 4 $^{\circ}$ C에서 -7 $^{\circ}$ C까지는 -0.5 $^{\circ}$ C/min, -7 $^{\circ}$ C에서 -45 $^{\circ}$ C까지는 0.2 $^{\circ}$ C/min으로 동결후 LN₂ container에 침지하였다.

3. 동결수정란의 융해 및 발생을 판정

동결 난포란의 융해는 straw를 20 $^{\circ}$ C 온수조에서 서서히 흔들면서 10초간 융해한 후 거꾸로 흔들어 2분간 방치한 후 내용물 전체를 petri dish에 옮겨 신선한 기본 배양액으로 2~3회 세척후 배양하였다.

동결수정란의 생존 및 발생을 판정은 FDA(fluorescence diacetate)-test에 의해 생존여부를 판정하거나, CO₂ 배양기에서 배양을 통해 발생상태를 관찰하면서 판정하였다(Schilling 등, 1982).

4. 시험결과와 통계학적 분석

시험결과와 통계학적 분석은 SAS package를 이용하여 실시하였으며, GLM (general Linear Model) procedure를 적용하여 각 요인의 Least square means를 구하여 요인간의 유의차를 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. Vitrification 동결보존 후의 생존성

소 수정란의 동결에 있어서 vitrification 동결보존 후의 발생을 및 부화율과 급속동결 및 Cell freezer에 의한 완만동결 융해 후의 발생율과 부화율을 비교한 시험결과는 Table 1과 같다.

소 수정란의 급속동결 및 완만동결 보존 후의 발생율과 부화율은 42.5%와 20.0% 및 52.5%와 25.0%로서 대조군의 82.5%와 37.5%에 비해 낮게 나타났다. 또한, 소 수정란의 vitrification 동결 보존후의 발생율과 부화율은 67.5%와 27.5%로서 대조군의 82.5%와 37.5%에 비해서 낮은 발생율과 부화율을 나타냈다.

이러한 결과는 대상동물은 다르지만 마우스를

Table 1. Survival rate after vitrification freezing of bovine embryos *in vitro* fertilized

Treatment	No. of embryos			
	Frozen	Survived*	Cleaved	Hatching
Control	40	37(92.5) ^a	33(82.5) ^b	15(37.5) ^a
Rapid freezing	40	22(55.0) ^b	17(42.5) ^a	8(20.0) ^b
Slow freezing	40	27(67.5)	21(52.5) ^a	10(25.0) ^b
Vitrification	40	30(75.0)	27(67.5) ^b	11(27.5) ^b

* Values with different subscripts in same column were denoted significantly different(p<0.05)

이용한 vitrification 동결 보존후의 발생율 90~95%(공 등, 1999)와, 80~85%(Kasai 등, 1990) 및 토끼의 blastocyst로의 발생율 63.9~96.9%(박 등, 1996)에 비해 현저히 낮은 발생율은 나타냈지만 소수정란의 급속동결시 발생율 15~23%(김 등, 1991; 김과 이, 1991)에 비하면 향상된 수준이었다.

2. 내동제의 종류에 따른 생존성

소 수정란의 vitrification 동결에 있어서 내동제의 종류에 따른 동결 보존 후의 발생율과 부화율은 Table 2와 같다.

소 수정란의 vitrification 동결시 EFS와 EDS 내동제의 처리에 따른 발생율과 부화율은 각각 47.5%와 22.5% 및 52.5%와 27.5%로서 대조군의 82.5%와 37.5%에 비해 낮게 나타났다. 이러한 결과는 시험동물은 다르지만 Vajta 등(1998a), Kasai 등(1990) 및 공 등(1999)이 마우스를 대상으로 내동제 EFS와 EPS를 처리하여 vitrification 동결 용해했을 때의 발생율과 부화율은 각각 85.0~95.0%, 80~90% 및 90.0~95.0%라고 보고한 결과와 비교할 때 약간 낮은 성적이었다. 또한 본 시험에서는 vitrification 동결시 내동제처리에 있어서 EDS 처리(35.0%와 25.0%)가 EFS 처리(30.0%와 22.5%)에 비해 다소 높은 발생율과 부화율을 나타냈는데 이는 상기 연구자들의 결과와 유사한 성적이었다.

3. 수정란 발달단계에 따른 생존성

소 수정란의 cell stage에 따른 vitrification 동결 보존 후의 발생율과 부화율은 Table 3과 같다.

Table 2. Effect of cryoprotectant kinds on survival of bovine embryos following vitrification freezing

Kinds of cryoprotectants	No. of embryos(%)		
	Vitrified	Cleavaged	Hatching
Control	40	33(82.5) ^b	15(37.5) ^a
EFS	40	19(47.5) ^a	9(22.5) ^b
EDS	40	21(52.5) ^a	11(27.5) ^b

* Values with different subscripts in same column were denoted significantl different(p<0.05)

Table 3. Effect of cell stage on survival of bovine embryos following vitrification freezing

Cell stage	No. of embryos(%)		
	Vitrified	Cleavaged	Hatching
Control*	40	33(82.5) ^b	15(37.5) ^b
Zygote	40	10(25.0) ^b	6(15.0)
2-cell	40	13(32.5)	8(20.0)
8-cell	40	15(37.5) ^a	8(20.0)
Morulae	40	21(52.5) ^a	11(27.5) ^a
Blastocyst	40	19(47.5) ^a	10(25.0) ^a

* Control group was expended blastocyst stage of bovine embryos

* Values with different subscripts in same column were denoted significantly different(p<0.05)

소 수정란의 cell stage에 따른 vitrification 동결시 zygote, 2 cell, 8 cell, morulae, blastocyst stage의 발생율과 부화율은 25.0%와 15.0%, 32.5%와 20.0%, 37.5%와 20.0%, 52.5%와 27.5% 및 47.5%와 25.0%로서 대조군의 발생율과 부화율 82.5%와 32.5%에 비해 낮게 나타났다.

이러한 결과는 시험동물은 다르지만 Kasai(1990)와 공 등(1999)의 마우스 수정란을 대상으로 vitrification 동결보존했을 때의 발생율 89.7~97.5%에 비해 큰 차이가 있었으나, cell stage별 vitrification 동결보존 후의 발생율은 배 발달이 진행될수록 점차 증가한다고 보고한 결과와는 유사하였다.

IV. 요약

본 연구는 소 수정란의 동결에 있어서 완만 및 급속동결과 vitrification 동결 후의 생존성을 비교하고 아울러, 내동제의 종류 및 배 발달단계가 vitrification 동결 보존 후의 발생율을 조사하고자 수행하였다.

1. 소 수정란의 vitrification 동결보존 후의 발생율과 부화율은 67.5%와 27.5%로서 급속동결 및 완만동결 용해 후의 발생율과 부화율 42.5%

와 20.0% 및 52.5%와 25.0%에 비해 높게 나타났으나 대조군(82.5%, 37.5%)에 비해서 낮게 나타났다.

2. EFS와 EDS 내동제의 처리에 따른 소 수정란의 vitrification 동결보존 후의 발생율과 부화율은 47.5%와 22.5% 및 52.5%와 27.5%로서 대조군의 82.5%와 37.5%에 비해 낮게 나타났다.
3. 소 수정란의 2 cell, 8 cell, morulae, blastocyst stage별 vitrification 동결보존 후의 발생율과 부화율은 25.0%와 15.0%, 32.5%와 20.0%, 37.5%와 20.0%, 52.5%와 27.5% 및 47.5%와 25.0%로서 대조군(82.5%와 37.5%)에 비해 낮게 나타났다.

V. 인용문헌

1. Candy, C.J., Wood, M., Whittingham, D.G., Merriman, J.A. and Choudhury, N. 1994. Cryopreservation of immature mouse oocytes. *Hum. Reprod.* 9:1738-1742.
2. Dinnyes, A., Wallace, G.A. and Rall, W.F. 1995. Effect of genotype on the efficiency of mouse embryo cryopreservation by vitrification of slow freezing methods. *Mol. Reprod. Dev.* 40:429-435.
3. Kasai, M., Komi, J.H., Takakamo, A., Tssnoda, H., Sakurai, T. and Machida, T. 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J. Reprod. Fertil.*, 89:91-97.
4. Lane, M., Forest, K.T., Lyons, E.A. and Bavister, B.D. 1999. Live births following vitrification of hamster embryos using a novel containerless techniques. *Theriogenology*, 51: 167(abstract).
5. Leibo, S.P. and Oda, K. 1993. High survival of mouse zygote and embryos cooled rapidly or slowly in ethylene glycol plus polyvinylpyrrolidone. *Cryo-Letters*, 14:133-144.
6. Rall, W.F. 1987. Factor affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiol.*, 24:387-402.
7. Rall, W.F. 1992. Cryopreservation of oocytes and embryos : methods and applications. *Anim. Reprod.*, 28:237-245.
8. Rall, W.F. and Fahy, G.M. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 313:573-575.
9. Rall, W.F. and Wood, M.J. 1994. High *in vitro* and *in vivo* survival of day 3 mouse embryos vitrified or frozen in a non-toxic solution of glycerol and albumin. *J. Reprod. Fertil.*, 101: 681-688.
10. Riha, J., Landa, V., Kneissl, J., Matus, J., Jindra, J. and Kloucek, Z. 1991. Vitrification of cattle embryos by direct dropping into liquid nitrogen and embryo survival after non-surgical transfer. *Ziivoc. Vir.*, 36:113-120.
11. Schilling, E., Niemann, H. and Smidt, D. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. *Cryobio.*, 15:245-248.
12. Tachikawa, S., Otoi, T., Kondo, S., Machida, T. and Kasai, M. 1993. Successful vitrification of bovine blastocyst, derived by *in vitro* maturation and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.*, 34: 266-271.
13. Takeli, T., Kweon, O.K. and Kanagawa, H. 1987. The viability of deep-frozen aggregated mouse embryos. *Japen J. Vet. Res.*, 35:283.
14. Toth, T.L., Jones, H.W., Baka, S.C., Muasher, S., Veeck, L.L. and Lanzendorf, S.E. 1994. Fertilization and *in vitro* development of cryopreserved human prophase I oocytes. *Fertil. Steril.*, 61: 891-894.
15. Trounson, A.O., Peura, A. and Kirby, C. 1987. Ultrarapidly freezing : A new low-cost and effective method of embryo cryopreservation.

- Fertil. Steril., 38:843-850.
16. Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P.J., Jacobsen, A., Greve, T. and Callesen, H. 1998a. Open pulled straw(OPS) vitrification : a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 51:53-58.
 17. Vajta, G., Lewis, I.M., Kuwayama, M., Greve, T. and Callesen, H. 1998b. Sterile application of the open pulled straw(OPS) vitrification method. *Cryo-Letters*, 19:389-392.
 18. van der Elst, J.C., Nerinckx, S.S. and van Steirteghem, A.C. 1993. Slow and ultrarapid freezing of fully grown germinal vesicle-stage mouse oocytes: optimization of survival rate outweighed by defective blastocyst formation. *J. Assist. Reprod. Gene*, 10: 202-212.
 19. Wilton, L.T., Shaw, J.M. and Trounson, A.O. 1989. Successful single-cell biopsy and cryopreservation of preimplantation mouse embryos. *Fertil. Steril.*, 51:513-517.
 20. 김상근, 이봉구, 이규승. 1991. 소 수정란의 초급속동결에 관한 연구. I. 소수정란의 완만 및 초급속동결후의 생존성에 관한 연구. *한국가축번식학회지*, 15(2):133-139.
 21. 김상근, 이만휘. 1991. 소 수정란의 초급속동결에 관한 연구. II. 소수정란의 초급속 동결후의 생존성에 관한 연구. *한국가축번식학회지*, 15(2):141-147.
 22. 공일근, 조성근, 조성근. 1999. 동결보호제의 종류 및 배발달단계가 OPP vitrification 동결보존시 생쥐수정란의 생존성에 미치는 영향. *한국가축번식학회지*, 23(1):85-92.
 23. 박충생, 전병균, 강태영, 이효종, 최상용. 1996. Vitrification 동결보존이 토끼 핵이식 수정란의 생존성에 미치는 영향. *한국가축번식학회지*, 20(2):155-161.
- (접수일자: 2000. 3. 4. / 채택일자: 2000. 7. 1.)