

한우 미성숙 난자의 체외성숙 단계가 Vitrification 동결시 체외발생 및 생존성에 미치는 영향에 관한 연구

김 상 근[†] · 신 현 주
충남대학교 수의과대학

Influence of Stage of Maturation of Bovine Oocytes at Time of Vitrification on *In Vitro* Development and Viability

S. K. Kim[†] and H. J. Shin

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University

SUMMARY

This study was carried out to study the viability of oocytes when vitrified at various maturation stages. Bovine cumulus-oocyte complexes were recovered from ovaries at a slaughter and then divided into five groups : control group(unvitrified oocytes), 0 hr. group(composed of oocytes vitrified before the onset of maturation) and 10, 14, and 20 hrs groups(vitrified at 10, 14 and 20 hrs after the onset of maturation, respectively). The oocytes remained vitrified for 24 hrs, and then were thawed in 30°C. Survival and cleavage rates were investigated by results of *in vitro* culture and aceto-orcein staining or FDA test.

No difference in the incidence of diploid oocytes was observed among the control, non-vitrified group(3.6%) and oocytes vitrified at 14 hrs(6.7%) or 20 hrs(1.7%). However, more diploid oocytes were detected after vitrification at 0 hr.(26.7%) and 10 hrs(21.7%) post maturation.

The survival rate of all vitrified immature oocytes(12.0~38.0%) was low, 48.0% of unvitrified oocytes and oocytes vitrified before maturation or 0~10 hrs after the onset of maturation were higher than that of other groups.

The overall fertilization and cleavage rates of vitrified immature oocytes (32.3~64.6% and 4.6~32.3%) were low, and 55.0% of unvitrified oocytes and the rate of immature oocytes were very higher than that of mature oocytes.

(Key words : embryos, vitrification, fertilization and cleavage rate)

서 론

현재까지 수정란의 동결에 관한 실험은 꾸준히 수행되어 왔으나, 미성숙 난자의 동결에 관한 연구는 거의 이루어지지 않았으며, 대부분이 완만 또는

급속동결방법을 사용하였으며 보고자간에 연구결과에도 차이가 많았다(Suzuki와 Nishikata, 1992; Rubinski 등, 1991; van Blerkom, 1989).

Rall과 Fahy(1985)는 8-cell stage의 mouse embryo가 vitrification 동결에 가장 효과적이라고 보고하였고 이는 완만동결의 개선에 가장 가능성

[†]Correspondence : kskkim@hanbat.cnu.ac.kr

이 있다고 하였다. 또한, 미성숙 난자의 동결은 난자의 발달단계에 있어서 GV stage가 적절하다고 보고하였다(van der Elst 등, 1993; Candy 등, 1994; Toth 등, 1994). 동물별 vitrification은 mouse(Rall과 Wood, 1994; Dinnyes 등, 1995; Kasai 등, 1990; Leibo와 Oda, 1993)와 소(Tachikawa 등, 1993) 등에서 보고되었으나 주로 mouse를 대상으로 한 연구가 대부분을 이루고 있다. 이들은 수정란의 vitrification 동결시 농도의 내동제를 처리하여 빙결정 형성(ice crystal formation)을 막을 수 있으며 높은 생존율을 얻을 수 있다고 하였다. 그러나, 대부분의 연구는 수정란을 대상으로 완만 또는 급속동결후의 생존성에 관한 보고였으며 미성숙 난자의 성숙단계별 vitrification 동결을 통해 난자은행으로서의 이용 가능성에 대한 연구보고는 거의 이루어지지 않았다.

본 연구는 한우 미성숙 난자의 성숙 단계별 vitrification 동결 용해후 체외발생과 생존성을 조사하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 난자의 회수

도살직후의 한우로부터 난소를 적출하여 100IU/ml의 penicillin G와 100 µg/ml의 streptomycin sulfate를 첨가한 38°C의 생리식염수에 침지한 후 실험실로 옮겨 주사기로 2~5 mm 크기의 정상난포로부터 난포액을 흡입하여 채취한 후 실체현미경(40×) 하에서 형태적으로 우수한 난자를 선별하여 회수하였다.

2. 난포란의 배양

회수한 난포란은 10%(v/v)의 FCS(Sigma, U.S.A.)와 1 µg/ml의 FSH(Sigma, U.S.A.), 2IU/ml의 hCG(Sigma, U.S.A.), 1 µg/ml의 β-estradiol (Sigma, U.S.A.), 100IU/ml의 penicillin G 및 100 µg/ml의 streptomycin sulfate가 첨가된 TCM-199 배양액을 사용하였다.

3. 난포란의 동결 및 용해

미성숙 난자를 회수하여 0, 10, 14, 20시간 성숙

배양 후 vitrification 동결을 실시하였다. Vitrification 동결시 내동제는 EDS(20% ethylene glycol + DMSO 16.5% + 0.5 M sucrose + 10% FCS) solution을 이용하였으며, EDS vitrification은 수정란을 VS₁ 용액에서 1분간 배양후 VS₂ 용액 20 µl drop내에 옮겨 수정란을 pipetting에 의해 신속히 EDS용액으로 혼합한 다음 각각 노출 1분 후 직경이 1.0 mm인 OPP straw(Vajta 등, 1998a)에 충전 봉인한 다음 LN₂에 침지하여 동결하였다.

Vitrification 동결한 난자의 용해는 30~35°C의 항온수조에서 급속용해 후 0.5 M sucrose, 0.5 M galactose 및 0.5 M trehalose에 각각 5분간 정지한 후 신선한 배양액으로 2~3회 세척 후 10% FAC+TCM-199 배양액에서 배양하였다.

4. 동결 난포란의 성숙배양과 수정

Vitrification 동결 용해한 난자는 각각 4~24시간 성숙배양한 다음 50 µl의 배양액 소적에 5개의 난포란을 주입한 후 heparin(Sigma, U.S.A.)법으로 수정능획득을 유지시킨 정자부유액 2 µl(1~5 × 10⁶ ml)을 주입한 다음 7~10 시간의 매정으로 수정시킨후 배양하였다.

5. 동결 난포란의 체외성숙 및 생존율의 판정

0.2% hyaluronidase(Sigma, U.S.A.) 액에서 2분간 처리에 의해 나화된 난자는 actic acid : ethanol (1 : 3) 액에 24시간 고정 후 1% aceto-orcein (Sigma, U.S.A.) 또는 10 µg/ml bisbenzimid (Hoechst 33342, Sigma, U.S.A.)로 염색하여 세포 및 핵분열상을 관찰하여 체외성숙 정도를 조사하였고, 수정란의 발생상태를 육안적으로 관찰하였으며, fluorescence diacetate(FDA)-test에 의해 생존율과 체외발생율을 판정하였다(Schilling등, 1982).

6. 시험결과의 통계학적 분석

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

결과 및 고찰

Table 1. Effect of bovine oocytes at various stages of *in vitro* maturation on survival and completion of maturation

Period(h)	No. of oocytes		M I(%)	M II(%)	Diploid(%)
	Freezed	Survived			
Cont.	55	50 (90.9)	6 (10.9)	43 (78.2)	2 (3.6)
0*	60	43 (71.7)	1 (1.7)	20 (33.3)	16 (26.7) ^a
10	60	37 (61.7)	4 (6.7)	33 (55.0)	13 (21.7) ^a
14	60	44 (73.3)	7 (11.7)	41 (68.3)	4 (6.7) ^b
20	60	39 (65.0)	11 (18.3)	44 (73.3)	1 (1.7) ^b

* Culturing period was hours after thawing to complete *in vitro* maturation.

^a Values with different superscripts within column were significantly different(p<0.05).

1. 동결 미성숙 난자의 체외성숙

미성숙 난자를 0, 10, 14 및 20시간 성숙배양시킨 후 vitrification 동결 후의 M II ~ diploid로의 발생율은 Table 1과 같다.

0, 10, 14 및 20시간 성숙배양시킨 난자를 vitirfication 동결보존 후의 M II로의 발생율은 3.3%, 55.0%, 68.3%, 73.3%였으며, diploid로의 발생율은 26.7%, 21.7%, 6.7%, 1.7%로서 대조군의 M II 단계의 78.2%에 비해 낮게 나타났으며 diploid 단계의 3.6%에 비해서는 높은 체외성숙율을 나타냈다. 체외발생율은 초기의 미숙 난포란일수록 높은 체외성숙율을 나타냈다. 이러한 결과는 소 난포란의 동결 용해 후 diploid로의 체외성숙율은 2.0~35.4%로서 체외성숙 배양시간이 8시간 이전일 때 가장 높게 나타났다고 한 Luna 등(2001)등의 결과와 유사하였다. 마우스 수정란을 동결 보존하였을 때 생존율이 80~85%라고 한 Kasai 등(1990)의 결과에 비해 현저히 낮은 발생율을 나타냈다. 한편,

미성숙 난자의 발생단계별 동결은 성숙 G-V stage가 적절하다고 한 van der Elst 등(1993), Candy 등(1994) 및 Toth 등(1994)의 결과와 일치하였다.

2. 동결 용해한 미성숙 난자의 생존율

미성숙 난포란을 회수후 0, 10, 14 및 20시간 성숙배양시킨 난포란을 vitrification 동결 용해한 다음 배양하였을 때 생존율은 Table 3과 같다. 미성숙 난포란을 회수 후 4, 10, 14 및 20시간 성숙배양시킨 난포란을 vitirfication 동결후 용해하였을 때 생존율은 각각 38.0%, 30.0%, 20.0% 및 12.0%로서 비동결 난포란의 48.0%에 비해 낮게 나타났다.

3. 동결 난포란의 체외수정율과 발생율

0, 10, 14 및 20시간 성숙배양시킨 미성숙 난포란을 vitrification 동결 용해 후 수정시켰을 때 체외수정율은 64.6%, 61.6%, 54.8%, 32.3%였으며, 배반포로의 체외발생율은 각각 32.3%, 21.7%, 14.5

Table 2. Survival rate of immature bovine oocytes following vitrification freezing

Time of culture(h)	No. of oocytes examined	Degree of FDA test						Survival rate(%)
		A	B	C	D	E	F	
Control	50	1	9	9	7	11	13	24 (48.0)
0*	50	2	8	10	10	11	9	19 (38.0) ^a
10	50	4	10	12	9	8	7	15 (30.0) ^a
14	50	5	13	11	11	5	5	10 (20.0) ^b
20	50	7	15	13	10	3	2	6 (12.0) ^b

* Culturing period was hours after thawing to complete *in vitro* maturation.

^a Values with different superscripts within column were significantly different(p<0.05).

Table 3. Survival rate of bovine IVF embryos following vitrified at various maturation status

Maturation period(h)	Time of maturation(h)	No. of oocytes		
		Freezed	Fertilized(%)	Cleavaged(%)
Oocytes	24	40	32 (80.0)	22 (55.0)
0*	24	65	42 (64.6)	21 (32.3) ^a
10	14	60	37 (61.6)	13 (21.7)
14	10	62	34 (54.8)	9 (14.5) ^b
20	4	65	21 (32.3)	3 (4.6) ^b

* Culturing period was hours after thawing to complete *in vitro* maturation.

^a Values with different superscripts within column were significantly different(p<0.05).

%, 4.6%로서 비동결 대조군의 80.0%와 55.0%에 비해 낮은 체외수정율과 체외발생율을 나타냈다 (Table 3). 이러한 결과들은 대상동물과 동결방법은 다르지만 Caroll 등(1989), Kon 등(1991) 및 Shaw 등(1992)의 결과와 비교할 때 상이하였다.

적 요

한우 미성숙 난자의 vitrification 동결시 발생단계별 생존성과 체외발생율을 알아보고자 난자를 0, 10, 14 및 20시간 성숙배양시킨 후 vitrification 동결 용해 후의 체외발생율을 조사하였다. 본 연구에서 나타난 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 0, 10, 14 및 20시간 성숙배양시킨 난자를 vitrification 동결보존 후 MII 단계로의 발생율은 각각 33.3%, 55.0%, 68.3% 73.3%였으며, diploid로의 발생율은 26.7%, 21.7%, 6.7%, 1.7%로서 대조군의 MII 단계의 78.2%에 비해 낮게 나타났으나 diploid단계의 3.6%에 비해서는 높게 나타났다.
2. 미성숙 난자를 0, 10, 14 및 20시간 성숙배양시킨 후 vitrification 동결 용해 후의 생존율은 각각 38.0%, 30.0%, 20.0% 및 12.0%로서 비동결 대조군의 48.0%에 비해 낮은 생존율을 나타냈다.
3. 미성숙 난자를 0, 10, 14 및 20시간 성숙배양시킨 다음 vitrification 동결 용해 후 수정하였 때 체외수정율은 64.6%, 61.6%, 54.8%, 32.3%였으며, 배반포로의 체외발생율은 각각 32.3%,

21.7%, 14.5%, 4.6%로서 대조군의 80.0%와 55.0%에 비해 낮은 체외수정율과 체외발생율을 나타냈다.

참고문헌

- Caroll 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.
- Candy CJ, Wood M, Whittingham DG, Merriman JA and Choudhury N. 1994. Cryopreservation of immatur mouse oocytes. *Hum. Reprod.*, 9:1738-1742.
- Dinnyes A, Wallace GA and Rall WF. 1995. Effect of genotype on the efficiency of mouse embryo cryopreservation by vitrification of slow freezing methods. *Mol. Reprod. Dev.*, 40:429-435.
- Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsnoda 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. Fert.*, 89:91-97.
- Kon T, Kwon OY and Nakahara T. 1991. Development of vitirfied mouse oocytes after *in vitro* fertilization. *Cryobiology*, 28:50-54.
- Leibo SP 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.
- Luna HS, Ferrari I and Rumpf R. 2001. influence of stage of maturation of bovine oocytes at time of vitrification on the incidence of diploid metaphase II at completion of maturation. *Anim. Reprod. Sci.*, 68:23-28.
- Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 313:573-575.
- Rall WF and Wood MJ. 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.
- Rubinski B, Arav A and Devires AL. 1991. Cryopreservation of oocytes using directional cooling and antifreeze glycoproteins. *Cryo-Letters*, 12:93-106.
- Schilling E, Niemann H and Smidt D. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. *Cryobio.*, 15:245-248.
- 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. Develop.*, 33:210-214.
- Suzuki T and Nishikata Y. 1992. Fertilization and cleavage of frozen thawed bovine oocytes by one step dilution method *in vitro*. *Theriogenology*, 37:306.
- 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.
- Toth TL, Jones HW, Baka SC, Muasher S, Veeck LL and Lanzendorf SE. 1994. Fertilization and *in vitro* development of cryopreserved human prophase I oocytes. *Fertil. Steril.*, 61: 891-894.
- Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen A, Greve T and Callesen H. 1998. Open pulled straw(OPS) vitrification : a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 51:53-58.
- van Blerkom J. 1989. Maturation of high frequency of germinal vesicle-stage mouse oocytes in mice. *Theriogenology*, 33; 365.
- van der Elst JC, Nerinckx SS and van Steirteghem AC. 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.

(접수일: 2002. 2. 3/ 채택일: 2002. 4. 3)