

## 돼지 受精卵의 急速凍結시 耐凍劑의 種類와 濃度, 平衡時間 및 融解溫度에 따른 生存性에 관한 研究

吳元鎮 · 吳建奉 · 朴炳權 · 金相根\* · 李揆丞\*\*

忠南大學校 大學院

### Studies on Effects of Kinds and Concentration of Cryoprotectants, Equilibration Time and Thawing Temperature on the Survival Rate of Rapidly Frozen Porcine Embryos

Oh, W. J., G. B. Oh, B. K. Park, S. K. Kim and K. S. Lee

Graduate School, Chungnam Natl. Univ.

#### SUMMARY

This study was carried out to investigate the effects of concentration, kinds of cryoprotectants, equilibration time, optimum thawing temperature on the survival rate of rapidly frozen porcine embryos. The porcine embryos following dehydration by cryoprotectants containing sucrose were directly plunged into liquid nitrogen and thawed in 30, 35 or 37°C water bath. Survival rate was defined as development rate on *in vitro* culture or FDA-test.

The results are summarized as follows :

1. The high survival rate of porcine frozen embryos after rapidly thawed in freezing medium was attained 2.0M DMSO, 2.0M glycerol, 2.0M propanediol, 1.5M ethyleneglycol.
2. The high survival rate of porcine frozen embryos after rapidly thawed in freezing medium was obtained using single cryoprotectant(16.6~40.0%) than mixed cryoprotectants(12.5~33.3%).
3. The equilibration time on the survival rate of rapidly thawed porcine frozen embryos was attained after short period of time(15.0~33.3%) in the freezing medium higher than long period of time(9.10~30.0%).
4. The thawing temperature on the survival rate of rapidly thawed porcine frozen embryos was attained at 30 °C of thawing temperature(33.3~40.6%) in the freezing medium higher than 25 or 37°C of thawing temperature.

\* : 忠南大學校 獸醫科大學(Coll. of Vet. Med. , Chungnam Natl. Univ. )

\*\* : 忠南大學校 農科大學(Coll. of Agri. , Chungnam Natl. Univ.)

## I. 緒 論

최근 受精卵 移植分野의 연구에 遺傳工學的 技法이 도입됨에 따라 體外受精, 雙胎誘起, 性 鑑別, 受精卵의 凍結 및 遺傳子와 核 移植, 그리고 複製動物의 生産 등 여러 분야에서 활발한 研究가 수행되어 괄목할 만한 研究結果들을 보고하고 있다. 이러한 尖端 技術들을 활용하여 受精卵 移植기술의 利用分野를 넓히고 産業化된 기술로 발전시키기 위해서는 가축 受精卵의 大量 生産體系의 確立과 生存性이 높은 保存技術의 확립이 시급히 要請된다.

遺傳形質이 우수한 소의 卵胞卵을 이용하여 體外受精에 의해 受精卵의 대량생산과 生存性이 높은 凍結保存 技術을 확립할 수 있다면, 이를 이용한 受精卵의 分割과 分離胚의 移植에 의한 급속한 家畜의 增殖 및 改良은 물론 尖端技法의 연구와 技術開發에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 卵胞卵과 分割卵의 이용에는 아직까지 기술적으로 해결해야 할 과제들이 많이 남아 있어서 이의 實用化에는 더욱 더 많은 연구가 필요한 실정이다.

哺乳動物 수정란의 凍結保存에 관한 연구는 Whittingham등(1972)에 의해 생쥐 受精卵을 이용한 실험에서 최초로 성공한 이래 토끼(Bank와 Mauer, 1974), 양(Willadsen 등, 1967), 돼지(Nagashima 등, 1989; 정 등, 1990; 金 등, 1990a), 소(Bilton과 Moore, 1976; Leibo, 1985; Chupin과 Reviere, 1986; Niemann 등, 1986; 김등, 1991b) 등 많은 동물의 受精卵을 대상으로 한 결과들이 보고되고 있으며, 최근에는 glycerol과 dimethyl sulfoxide (DMSO) 및 sucrose등의 내동제를 첨가하여 受精卵을 急速凍結하는 硝子化 凍結方法이 보고되고 있다. 그러나 受精卵의 동결에는 耐凍劑의 添加濃도와 添加方法, 平衡時間, 植氷方法, 凍結速度, 融解溫도와 方法 등 受精卵의 生存性에 영향을 미치는 要因이 매우 많아서 報告者들간에 結果에 있어 큰 차이가 있을 뿐만 아니라 短篇의인 연구가 대부분을 이루고 있는 실정으로 아직까지도 生存率이 높은 凍結技術 체계가 확립되지 않은 실정이다. 또한 受精卵의 동결에 있어서 緩慢凍結法에 비하여 간편하고 실용적인 急速凍結法은 생존성이 극히 낮아 實用化에 많은 어려움이 있으며, 특

히 돼지 受精卵은 實驗動物이나 다른 家畜 受精卵에 비하여 凍結保存에 많은 문제점들을 내포하고 있어 生存性이 저조하여 이의 改善과 凍結保存 技術의 確立이 시급한 과제라고 생각된다.

이에, 본 研究는 돼지 受精卵의 急速凍結에 따른 生存性을 구명하기 위하여 耐凍劑의 種類 및 濃度, sucrose의 添加濃度, 平衡時間 및 融解溫度 등이 急速凍結 融解후 生存性에 미치는 影響을 調査하고자 실시하였다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 材 料

#### 1) 卵胞卵의 回收

屠殺直後の 成熟 雌豚으로부터 卵巢를 적출하여, 100 IU/ml의 penicillin G와, 100 µg/ml의 streptomycin sulfate를 첨가한 38°C의 生理食鹽水에 침지하여 실험실로 옮겨 2~5 mm 크기의 정상 난포로부터 19-guage 주사기로 卵胞液을 흡입하여 시계접시에 채취한 후 實體顯微鏡(40×) 하에서 형태적으로 우수한 卵胞卵을 선별하여 回收하였다.

#### 2) 培養液

TCM-199(Whittaker, M.A.Bioproducts Co., USA)를 기본 배양액으로 하여 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 TCM-199 배양액을 이용하여 사용하기전 멸균 여과시킨 후 사용하였다.

### 2. 方 法

#### 1) 卵胞卵의 體外成熟

卵胞卵의 배양은 5~6시간 평형시킨 50 µl의 배양액 小滴을 petri dish내에 10개씩 만들어 소적당 卵胞卵 5개를 주입하여 38°C, 100% 습도, 95% air, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 卵胞卵의 體外成熟은 최수한 卵胞卵을 배양액으로 3회 세척한 후 卵丘細胞가

충실하게 부착된 卵胞卵을 5~6시간 평형시킨 50  $\mu$ l의 배양액 小滴당 5개의 卵胞卵을 주입하여 mineral oil로 피복하여 40~48시간 배양하였다

## 2) 卵胞卵의 體外受精

卵胞卵의 體外受精은 체외성숙이 끝난 卵胞卵을 수정용 배양액으로 3회 세척한 후, 45 $\mu$ l의 배양액 小滴에 5개의 卵胞卵과 屠殺 雄豚으로부터 적출한 精巢로부터 精巢上體液를 적출하여 피부를 절개하고 세척하여 精巢上體液와 精子混合液을 회수하여 얻은 精子浮游液 0.01 ml와 BO액 2 ml을 시험관에서 잘 혼합하여 배양기에서 1시간 swim up 시킨 다음 약 0.5 ml의 上層液을 2,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 침전된 精子 pellets을 동량의 heparin 용액(100  $\mu$ g/ml, Sigma Co., USA)과 함께 혼합하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 受精能獲得을 유지시킨 精子浮游液 2  $\mu$ l(1~5  $\times$  10<sup>6</sup> ml)을 주입하고 mineral oil로 피복한 다음 6~7시간 동안의 媒精으로 수정시켰다.

## 3) 體外成熟 및 受精의 判定

體外成熟의 판정은 48시간 배양하여 체외성숙 분열을 유기한 卵胞卵의 체외성숙율을 검사하기 위해 고정하여 核成熟을 판정하였으며, 體外受精의 판정은 체외 수정후 24시간제에 수정 여부를 검사하기 위해 0.3% hyaluronidase(Sigma Co, USA) 용액에서 pipetting에 의해 卵丘細胞層을 제거하고 slide glass 위에 옮겨 cover glass를 덮어 정치시킨 후 고정액(ethanol : acetic acid = 1 : 3)에 침지하여 48시간 고정한 다음 1% aceto orcein으로 염색하여 Shea 등(1976)과 Ball 등(1983)의 방법에 따라 수정을 판정하였다.

## 4) 受精卵의 急速凍結 및 融解

受精卵의 急速凍結은 각 농도의 耐凍劑 + 0.25 M sucrose + 20% FCS + TCM-199 배양액의 조성으로 제조한 凍結液으로 각각 2, 5, 10, 15, 20분간 평형시킨 후 0.25ml straw의 가장 자리로부터 공기, 동결보존액, 공기, 수정란 + 동결보존액, 공기, 동결보존액, 공기순으로 充填하고 알콜램프에 가열한 forceps으로 봉인하여 labelling 한 후 1cm 높이의 액체질소 부표위에 straw를 놓아 5분간 豫冷시킨 다음 液體窒

素에 즉시 浸漬함으로써 急速凍結을 실시하였다. 凍結受精卵의 融解는 straw를 실온에 30초간 방치한 다음 30°C 溫水槽의 溫水에서 融解후 거꾸로 흔들어 10분간 방치한후 내용물 전체를 petri dish에 옮겨 신선한 기본 배양액으로 2~3회 세척하였다.

## 5) 凍結 受精卵의 生存性 判定

용해한 受精卵은 PBS로 3회 세척한 다음, fluorescence diacetate(FDA) 1mg을 acetone 1ml에 용해한 다음 TCM-199액(600,000 : 1, pH 7.0~7.4)으로 희석한 액에 옮겨 位相差 顯微鏡하에서( $\times$ 100) 생존 여부를 판정하거나, 배양을 통해 發生狀態를 관찰하면서 판정하였다(Schilling 등, 1982).

# III. 結果 및 考察

## 1. 受精卵의 急速凍結 融解후의 生存性

### 1) 耐凍劑의 종류에 따른 生存率

#### ① 單一 耐凍劑

돼지 受精卵의 急速凍結에 있어서 각 耐凍劑의 농도별 동결 용해후의 生存率은 Table 1~4와 같다.

각 耐凍劑의 濃度에 따른 동결 용해후의 生存率은 1.0M 농도의 각 耐凍劑를 처리하였을 때 1.0M DMSO 및 glycerol 처리군에서 각각 21.2%로서 가장 높게 나타났다. 또한, 1.5M 농도의 각 耐凍劑를 처리하였을 때 1.5M glycerol처리군에서 35.7%로 가장 높게 나타났으며, 2.0M 농도의 각 耐凍劑를 처리하였을 때 2.0M DMSO 처리군에서 40.0%로 가장 높게 나타났다. 또한, 2.5M 농도의 각 耐凍劑를 처리하였을 때 2.5M DMSO군에서 27.6%로서 가장 높게 나타났으며 3.0M 농도의 각 耐凍劑를 처리하였을 때 3.0M DMSO 처리군에서 20.0%로 가장 높게 나타났다. 또한, 4.0M 농도의 耐凍劑를 처리하였을 때 4.0M ethyleneglycol을 처리하였을 때 20.8%의 생존율로서 가장 높게 나타났다. 한편, 각 耐凍劑의 生存率이 가장 높은 適正濃度는 2.0M DMSO, 2.0M glycerol, 2.0M propanediol 및 1.5M ethyleneglycol로 나타났다.

이러한 결과는 試驗動物이나 凍結方法에 따른 차이가 인정되나, 생쥐 受精卵을 이용하여 Williams와

**Table 1. Effects of various DMSO concentration in the freezing medium on the survival rate of rapidly frozen porcine embryos**

| Freezing medium (DMSO) | No. of embryos frozen | No. (%) of embryos recovered | No. (%) of embryos survived |
|------------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 1.0M                   | 33                    | 30(90.9)                     | 7(21.2)                     |
| 1.5M                   | 33                    | 31(93.9)                     | 8(24.2)                     |
| 2.0M                   | 25                    | 24(96.0)                     | 10(40.0)                    |
| 2.5M                   | 29                    | 26(89.7)                     | 8(27.6)                     |
| 3.0M                   | 35                    | 30(85.7)                     | 7(20.0)                     |
| 4.0M                   | 24                    | 20(83.3)                     | 4(16.7)                     |

**Table 2. Effects of various glycerol concentration in the freezing medium on the survival rate of rapidly frozen porcine embryos**

| Freezing medium (glycerol) | No. of embryos frozen | No. (%) of embryos recovered | No. (%) of embryos survived |
|----------------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 1.0M                       | 33                    | 30(90.9)                     | 7(21.2)                     |
| 1.5M                       | 28                    | 25(89.3)                     | 10(35.7)                    |
| 2.0M                       | 26                    | 24(92.3)                     | 9(34.6)                     |
| 2.5M                       | 35                    | 32(91.4)                     | 8(22.9)                     |
| 3.0M                       | 28                    | 24(85.7)                     | 5(17.9)                     |
| 4.0M                       | 29                    | 26(89.7)                     | 5(17.2)                     |

**Table 3. Effects of various ethyleneglycol concentration in the freezing medium on the survival rate of rapidly frozen porcine embryos**

| Freezing medium (ethyleneglycol) | No. of embryos frozen | No. (%) of embryos recovered | No. (%) of embryos survived |
|----------------------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 1.0M                             | 31                    | 29(93.5)                     | 6(19.4)                     |
| 1.5M                             | 36                    | 34(94.4)                     | 11(30.6)                    |
| 2.0M                             | 38                    | 35(92.1)                     | 9(23.7)                     |
| 2.5M                             | 26                    | 22(84.6)                     | 7(26.9)                     |
| 3.0M                             | 30                    | 27(90.0)                     | 5(16.7)                     |
| 4.0M                             | 24                    | 22(91.7)                     | 5(20.8)                     |

**Table 4. Effects of various propanediol concentration in the freezing medium on the survival rate of rapidly frozen porcine embryos**

| Freezing medium (propanediol) | No. of embryos frozen | No. (%) of embryos recovered | No. (%) of embryos survived |
|-------------------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 1.0M                          | 30                    | 27(90.0)                     | 6(20.0)                     |
| 1.5M                          | 28                    | 26(92.9)                     | 8(28.6)                     |
| 2.0M                          | 33                    | 33(100.0)                    | 11(33.3)                    |
| 2.5M                          | 34                    | 30(88.2)                     | 7(20.6)                     |
| 3.0M                          | 34                    | 28(82.4)                     | 6(17.6)                     |
| 4.0M                          | 33                    | 29(87.9)                     | 6(18.2)                     |

Johnson(1985), Chupin과 Reviere(1986) 및 Szell과 Shelton (1987) 등의 급속동결시 각각 79.6%, 84.0%, 95.0%의 생존률에 비해 저조한 성적이었으나 1.5M glycerol과 2.0M DMSO에서 가장 높은 생존률을 나타냈다는 결과와는 유사한 성적이었다. 각 내동제의 適正濃度에 대해 glycerol은 Miyamoto 등(1986)과 Kasai 등(1981)은 2.0M, Williams와 Johnson(1985), Takeda등(1984) 및 Biery등(1986)은 2.0~2.5M, Szell과 Shelton(1986a)은 3.0M 농도에서, DMSO의 適正濃度는 Trounson등(1987)은 3.0M, Wilton등(1989)은 4.5M DMSO농도에서, ethyleneglycol의 適正濃度는 Miyamoto와 Ishibashi(1978)는 1.2M, Kojima 등(1984)은 1.2M, propanediol의 適正濃度는 Miyamoto와 Ishibashi(1977, 1978), Renard 등(1983, 1984), Rall과 Polge(1984), Massip과 van der Zwalmen(1984), Ko와 Threlfall(1988), Suzuki 등(1990) 및 Hernandez-Ledezma와 Wright(1990) 등은 2.0~3.0M 농도가 적당하다고 하였다. 본 試驗結果로 미루어 볼 때 돼지 受精卵의 급속동결시 單一 耐凍劑의 適正濃度는 1.5M glycerol, 2.0M DMSO, 2.5M ethyleneglycol 및 2.0M propanediol 농도로 사료되었다.

## ② 複合 耐凍劑

돼지 受精卵의 急速凍結에 있어서 複合 耐凍劑의 농도별 凍結 融解후의 生存率은 Table 5, 6과 같다.

受精卵의 凍結에 있어 2種의 耐凍劑 處理에 따른 동결 融해후의 生存率은 1.5M DMSO + 1.5M propanediol, 2.0M DMSO + 2.0M propanediol, 1.5M glycerol + 1.5M ethyleneglycol, 2.0M glycerol + 2.0M ethyleneglycol의 凍結液으로 처리 하였을 때 生存率은 각각 26.0%, 33.3%, 24.0% 및 21.4%로서 2.0M DMSO + 2.0M propanediol 처리군에서 33.3%로서 가장 높게 나타났다. 2種의 複合 耐凍劑를 처리하였을 때 生存率 21.4~33.3%는 단일내동제 처리시의 16.7~40.0%의 생존율에 비해 약간 낮은 생존율을 나타냈다. 3種의 複合耐凍劑의 처리에 따른 동결 融해후의 생존율은 1.0M DMSO + glycerol + propanediol, 1.5M DMSO + glycerol + propanediol, 2.0M DMSO + glycerol + propanediol, 2.5M DMSO + glycerol + propanediol 및 3.0M DMSO + glycerol + propanediol을 처리하였을 때 생존율은 각각 19.4, 22.6, 23.1, 17.2 및 12.5%였다. 특히, 2.0M DMSO + glycerol + propanediol을 처리하였을 때 23.1%로서 가장 높은 생존율을 나타냈다. 이리

**Table 5. Effects of cryoprotectants in the freezing medium on the survival rate of rapidly frozen porcine embryos**

| Freezing medium<br>(0.25 S) | No. of embryos<br>frozen | No. (%) of embryos<br>recovered | No. (%) of embryos<br>survived |
|-----------------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| 1.5M D + 1.5M P             | 50                       | 46(92.0)                        | 13(26.0)                       |
| 2.0M D + 2.0M P             | 48                       | 46(95.8)                        | 16(33.3)                       |
| 1.5M G + 1.5M E             | 50                       | 46(92.0)                        | 12(24.0)                       |
| 2.0M G + 2.0M E             | 42                       | 40(95.2)                        | 9(21.4)                        |

**Table 6. Effects of cryoprotectants in the freezing medium on the survival rate of rapidly frozen porcine embryos**

| Freezing medium<br>(0.50MS) | No. of embryos<br>frozen | No. (%) of embryos<br>recovered | No. (%) of embryos<br>survived |
|-----------------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| 1.0M D + G + P              | 31                       | 27(87. 1)                       | 6(19. 4)                       |
| 1.5M D + G + P              | 31                       | 29(93. 5)                       | 7(22. 6)                       |
| 2.0M D + G + P              | 26                       | 25(96. 2)                       | 6(23. 1)                       |
| 2.5M D + G + P              | 29                       | 27(93. 1)                       | 5(17. 2)                       |
| 3.0M D + G + P              | 32                       | 30(93. 8)                       | 4(12. 5)                       |

한 결과는 돼지 受精卵을 이용하여 급속 동결시 單一耐凍劑를 처리하여 동결 용해하였을 때 16.7~40.0%의 生存率과 2種의 複合耐凍劑를 처리했을때의 生存率을 21.4~33.3%에 비해 다소 저조한 결과였다

이러한 結果는 金 등(1991a)이 보고한 1.5M DMSO + 1.5M propanediol + 0.25M sucrose 농도와 2.0M glycerol + 2.0M DMSO + 0.25M sucrose 농도의 耐凍劑로 동결 용해하였을 때 生存率 42.5~60.5%에 비해 낮은 결과였다. 한편, 對象動物과 凍結方法에 차이가 있으나 생쥐 受精卵을 이용한 Williams와 Johnson(1985), Chupin과 Reviere (1986), Szell과 Shelton(1987) 및 Trounson 등(1987) 등이 각각 84.0, 79.6, 95.0 및 76.0%의 生存率을 나타냈다는 보고와 비교할 때 生存率이 아주 저조하며 또한 상이한 결과였다. 본 試驗結果로 미루어 볼 때, 돼지 受精卵의 급속동결에 따른 生存率은 2種 또는 3種의 複合耐凍劑를 처리하여 동결 용해하는 것보다 單一耐凍劑를 처리하는 것이 더 높은 生存率을 얻을 수 있는 것

으로 사료되었다.

## 2) 耐凍劑의 平衡時間에 따른 生存率

돼지 受精卵의 急速凍結에 있어서 각 耐凍劑의 농도별 平衡時間에 따른 동결 용해 후의 生存率은 Table 7과 같다.

受精卵의 急速凍結에 있어서 1.5M glycerol + 0.25M sucrose와 2.0M glycerol + 0.25M sucrose액과 각각 20% FCS + TCM-199 培養液의 組成으로 제조한 凍結液으로 2, 5, 10, 15 및 20분간 平衡시킨 후 급속동결 용해하였을 때 生存率은 각각 33.3 및 25.0%, 23.8 및 30.0%, 25.0 및 17.4%, 23.8 및 20.0%, 15.0 및 9.1%로서 1.5M glycerol + 0.25M sucrose 군에서 2.5분의 平衡時間이 가장 높게 나타났으며 대체로 짧은 平衡時間(2.5~5분)이 긴 平衡時間(10~15분)보다 높은 生存率을 나타냈다.

이러한 結果는 생쥐 受精卵을 이용하여 동결 용해시 耐凍劑의 適正 平衡時間에 대해 2.0M DMSO와 0.

**Table 7. Effects of equilibration time in the freezing medium on the survival rate of rapidly frozen porcine embryos**

| Equilibration time(min) | Freezing medium  |             |             |                  |             |             |
|-------------------------|------------------|-------------|-------------|------------------|-------------|-------------|
|                         | 1.5M G + 0.25M S |             |             | 2.0M G + 0.25M S |             |             |
|                         | Frozen           | Recovery(%) | Survival(%) | Frozen           | Recovery(%) | Survival(%) |
| 2.5                     | 21               | 20(95.2)    | 7(33.3)     | 20               | 8(90.0)     | 5(25.0)     |
| 5.0                     | 21               | 18(85.7)    | 5(23.8)     | 20               | 19(95.0)    | 6(30.0)     |
| 10.0                    | 20               | 18(90.0)    | 5(25.0)     | 23               | 21(95.5)    | 4(17.4)     |
| 15.0                    | 21               | 20(95.2)    | 5(23.8)     | 20               | 19(95.0)    | 4(20.0)     |
| 20.0                    | 20               | 18(90.0)    | 3(15.0)     | 22               | 21(95.5)    | 2( 9.1)     |

**Table 8. Effects of thawing temperature in the freezing medium on the survival rate of rapidly frozen porcine embryos**

| Freezing medium (+ 0.25M S) | Thawing temperature(°C) and embryo numbers |             |        |             |        |             |
|-----------------------------|--|-------------|--------|-------------|--------|-------------|
|                             | 25   |             | 30     |             | 37     |             |
|                             | Frozen                                     | Survived(%) | Frozen | Survived(%) | Frozen | Survived(%) |
| 1.0M D + G + P              | 30   | 9(30.0)     | 29     | 11(37.9)    | 27     | 10(37.0)    |
| 1.5M D + G + P              | 27   | 11(40.7)    | 30     | 11(36.7)    | 32     | 11(34.4)    |
| 2.0M D + G + P              | 30   | 10(33.3)    | 30     | 10(33.3)    | 30     | 9(30.0)     |
| 2.5M D + G + P              | 29   | 9(31.0)     | 32     | 13(40.6)    | 30     | 10(33.3)    |
| 3.0M D + G + P              | 30   | 8(26.7)     | 30     | 12(40.0)    | 31     | 12(38.7)    |

25M sucrose를 처리할 때 2분이하의 平衡時間이 적절하다고 한 Trounson등(1987)과 1분간이 적당하다고 한 Mapletoft(1989) 및 생쥐 受精卵에 대해 2~5분간의 平衡時間이 적절하며 生存率 역시 85.0%로 높게 나타났다고 보고한 강 등(1990), Kasai등(1990) 및 Takahashi와 Kanagawa(1990)의 결과와는 일치하였으나 5분과 10분간의 平衡時間에서 생존율에 차이가 없었다는 Trounson등(1987)과 20분의 平衡時間에서 현저하게 저조하였다는 Boon등(1988)의 결과와는 약간의 차이가 있었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 돼지 受精卵의 급속동결시 耐凍劑의 適正 平衡時間은 2.5~5분의 짧은 平衡時間으로 처리하는 것이 높은 生存率을 나타내는 것으로 사료되었다.

### 3) 融解溫度에 따른 生存率

돼지 受精卵의 凍結 融解에 있어서 동결수정란의 融解溫度에 따른 生存率은 Table 8에서 보는 바와 같이, 1.0M DMSO + glycerol + propanediol, 1.5M DMSO + glycerol + propanediol, 2.0M DMSO + glycerol + propanediol, 2.5M DMSO + glycerol + propanediol, 3.0M DMSO + glycerol + propanediol과 0.25M sucrose + 20% FCS + TCM-199 배양액의 조성으로 제조한 동결액으로 동결한 受精卵을 25, 30 및 37°C로 용해하였을 때 生存率은 각각 30.0, 37.9 및 37.0%, 40.7, 36.7 및 34.4%, 33.3, 33.3 및 30.0%, 31.0, 40.6 및 33.3%, 26.7, 40.0 및 38.7%로서 30°C에서 용해하였을 때 33.3~40.6%로서 비교적 높은 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는 생쥐 受精卵의 동결에 있어서 適正 融解溫度는 30°C에서 수초 또는 1분간이라고 한 Mapletoft 등(1989), Massip과 van der Zwalmen(1984)의 결과와 30°C에서 수초 또는 1분간이라고 한 Mapletoft 등(1989), Massip과 van der Zwalmen(1984)의 결과와 30°C에서 용해하였을 때 높은 生存率을 나타냈다는 Bielanski 등(1984)의 결과와는 일치하였으나 37°C에서 30초간이 적절한 融解溫度라고 한 Robertson등(1989)과, 공기와 35°C의 溫水槽에서 가장 높은 생존율을 나타냈다는 Takeda(1987)의 결과와, 室溫(23°C±3°C)에서 높은 생존율을 나타냈다고 한 Andrede와 Rodrigues(1987) 등의 결과와는 차이가 있었다. 또한 金 등(1991b)은 融解速度는 동

결속도와 연관이 있으며, 급속동결한 受精卵은 급속히 용해하는 것이 생존율면에서 유효하다고 하였으며, 한편 가장 적절한 용해법은 용해시킨 straw의 綿栓部를 아래로 향하게 하여 1~2회 흔들어 내리면 glycerol 액층과 sucrose액층이 접촉하게 되며 이런 상태에서 10분간 정치하게 되면 수정란이 glycerol액층으로부터 탈출하여 sucrose액층으로 이행하게 되므로 이를 이용하여 one-step straw법 이식이 가능한 것으로 사료된다.

## IV. 摘要

본 연구는 돼지 受精卵의 急速凍結에 따른 耐凍劑의 種類 및 濃度, 平衡時間 및 融解溫度 등이 急速凍結 融解 후 生存성에 미치는 影響을 調査하고자 실시하였다.

1. 受精卵의 급속동결에 따른 각 耐凍劑의 適正 濃度는 2.0M DMSO, 2.0M glycerol, 2.0M propanediol 및 1.5M ethyleneglycol로 처리하였을 때 가장 높은 생존율을 나타냈다.
2. 單一 耐凍劑에 의한 급속동결 용해후의 生存率은 16.7~40.0%로서 複合耐凍劑에 처리에 의한 생존율인 12.5~33.3%에 비해 높은 생존율을 나타냈다.
3. 受精卵의 급속동결에 있어서 1.5M 및 2.0M glycerol에 0.25M sucrose를 첨가한 동결액에서 2.5분, 5, 10, 15 및 20분간 평형시킨 후 급속동결 용해하였을 때 生存率은 각각 15.0~33.3 및 9.1~30.0%로서 비교적 짧은 平衡時間(2.5~5분)이 긴 平衡時間(10~20분)보다 높은 생존율을 나타냈다.
4. 受精卵의 급속동결 용해에 있어서 凍結受精卵의 融解溫度에 따른 생존율은 30°C에서 용해하였을 때 33.3~40.6%로서 25°C 및 37°C에 비해 비교적 높은 생존율을 나타냈다.

## V. 引用文獻

1. Andrede, T. P and J. L. Rodrigues. 1987. Rapid freezing of mouse embryos : In glycerol-sucrose medium. Theriogenology, 27:206.
2. Ball, G. D., M. L. Leibfried, R. W. Lenz, R.

- L. Ax, B. D. Bavister and N. L. First. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. *Biol. Reprod.*, 28 : 717-725.
3. Bank, H. and R. P. Maurer. 1974. Survival of frozen rabbit embryos. *Expl. Cell. Res.*, 89 : 188-196.
  4. Bielanski, A., W. Johnson, U. Schneider and R. J. Mapletoft. 1984. Plunge temperature and embryos survival. *Theriogenology*, 21 : 221.
  5. Biery, K. A., G. E. Jr. Seidel and R. P. Elsdon. 1986. Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen. *Theriogenology*, 25 : 140(Abstract).
  6. Bilton, R. J. and N. W. Moore. 1976. *In vitro* culture, storage and transfer of goat embryos. *Aust. J. Biol. Sci.*, 2 : 125-129.
  7. 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.
  8. Chupin, D. and M. M. De Reviere. 1986. Quick freezing of rat embryos. *Theriogenology*, 26 : 157-166.
  9. Hernandez-Ledezma, J. J. and R. W. Wright. 1990. Deep freezing of murine 1-cell embryos and oocytes. *Theriogenology*, 33 : 242.
  10. Kasai, M., J. H. Komi, A. Takakamo, H. Isuclene, T. Sakurai and T. Machida. 1990. A simple method for embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J. Reprod. Fert.*, 89 : 91-97.
  11. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1981. Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 63 : 175-180.
  12. Ko, Y., and W. R. Threlfall. 1988. The effects of 1,2-propanediol as a cryoprotectant on the freezing of mouse embryos. *Theriogenology*, 29 : 987-995.
  13. Kojima, T., Y. Tsunoda, N. Oguri, T. Soma and T. Sugie. 1984. Survival of frozen-thawed rabbit morulae in the presence of ethylene glycol. *Jap. J. Anim. Reprod.*, 30 : 150-53.
  14. Leibo, S. P. 1985. Field trial of one-step diluted frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 21 : 797-790.
  15. Mapletoft, R. J., J. S. Moker and A. Palasz. 1989. Effect of thawing temperature and time to sucrose dilution on survival of mouse embryos in culture. *Theriogenology*, 31 : 225.
  16. Massip, A., P. van der Zwalmen. 1984. Direct transfer of frozen cow embryos in glycerol sucrose. *Vet. Record*, 115 : 327-328.
  17. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1977. Survival of frozen-thawed mouse embryos in the presence of ethylene glycol. *J. Reprod. Fert.*, 50 : 373-375(1977)
  18. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1978. The protective action of glycols against freezing damage of mouse and rat embryos. *J. Reprod. Fert.*, 54:427-432.
  19. Miyamoto, H. Y. Miyamoto and T. Ishibashi. 1986. The importance of equilibration time to glycerol prior to freezing in the cryopreservation of mouse embryos. *Japan. J. Zootech.*, 57:250-256.
  20. Nagashima, H., Y. Kato, Yamakawa and S. Ogawa. 1989. Low temperature sensitivity of blastocyst and blastocyst-derived cells pugs. *Theriogenology*, 31(3):525-530.
  21. Niemann, H., G. Brem, B. Sacher, D. Smit and H. Krausslich. 1986. An approach to successful freezing of demi-embryos derived from day-7 bovine embryos *Theriogenology*, 25: 519.
  22. Rall, W. F. and C. Polge. 1984. Effect of warm rate on mouse embryos frozen thawed



- in glycerol. J. Reprod. Fert., 70:185-192.
23. 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.
  24. Renard, J. P., B. X. Nguyen and V. Garnier. 1984. Two-step freezing of two-cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. J. Reprod. Fert., 71:573-580.
  25. 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.
  26. Schilling, E., H. Niemann and D. Smidt. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. Cryobiology, 15:245-248.
  27. Shea, B. F., J. P. A. Latour, K. N. Berdin and R. D. Baker. 1976. Maturation *in vitro* and the subsequent fertilizability of extra follicular bovine oocytes. J. Anim. Sci., 43:809-815.
  28. Suzuki, T., M. Yamamoto, M. Ooe, A. Sakata and K. Matsuoka. 1990. Comparison of one step sucrose dilution and direct transfer of frozen bovine embryos in glycerol and 1, 2-prpanediol. Theriogenology, 3:334.
  29. Szell, A. and J. N. Shelton. 1986. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. J. Reprod. Fert., 80:401-408.
  30. 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.
  31. Takahashi, Y. and H. Kanagawa. 1990. Effect of equilibration period on the viability of frozen-thawed mouse morulae after rapid freezing. Mol. Repro. and Develop., 26:105-110.
  32. Takeda, T. 1987. Cryopreservation of mouse morulae in propylenglycerol or glycerol. Theriogenology, 27:282.
  33. Takeda, T., R. P. Elsdon and G. E. Jr. Seid-al. 1984. Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen. Theriogenology, 21:226(Abstract).
  34. 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.
  35. Willadsen, S. M., C. Polge, L. E. A. Rawson and R. M. Moore. 1967. Deep freezing of sheep embryos. J. Reprod. Fert., 46:151-154.
  36. Williams, T. G. and S. E. Johnson. 1985. Quick freezing of day four mouse embryos. Theriogenology, 23:235.
  37. Wilton, L. T., J. M. Shaw and A. O. Trounson. 1989. Successful single-cell biopsy and cryopreservation of preimplantation mouse embryos. Fert. Steril., 51:513-517.
  38. 강만중, 이철상, 한용만, 유대열, 이경광. 1990. 생쥐 2-세포기 수정란의 초급속 동결. 한국가축번식학회지 14(1):9-16.
  39. 金相根, 李鳳求, 李揆丞. 1991a. 돼지 受精卵의 超急速凍結 融解후의 生存性에 관한 研究. 韓國 家畜繁殖學會誌, 16(2):125-131.
  40. 金相根, 李晚徽. 1991b. 소 受精卵의 超急速凍結 融解후의 生存性에 관한 研究. 韓國 家畜繁殖學會誌, 15(2):141-147.
  41. 정진관, 장원경, 유승환. 1990. 돼지 수정란 동결에 관한 연구. 한국축산학회지 32(8):445-449.