

유리화 및 완만동결법에 의한 토끼 前核胚의 동결보존 후 배발달율

박충생 · 강다원 · 하란조 · 공일근* · 최상용** · 이효종**

경상대학교 축산학과

Post-thaw Development of Rabbit Zygotes Following Vitrification or Slow Freezing

C. S. Park, D. W. Kang, R. J. Ha, I. K. Kong*, S. Y. Choe** and H. J. Lee**

Department of Animal Science, Gyeongsang National University

SUMMARY

This study was carried out to investigate the effect of vitrification and slow freezing methods on the post-thaw developmental rate of rabbit zygotes. After exposing rabbit zygotes in EFS solution for 0.5, 1, 2, 3 and 5 min at room temperature, they were washed with 0.5 M sucrose solution, D-PBS and TCM-199 and then cultured in TCM-199 plus 10% FBS with bovine oviduct epithelial cells(BOEC) to examine whether the cryoprotectant induced injury during the various exposure periods. The embryo development rates to hatched blastocyst after exposing in EFS solution for 3 and 5 min(40.0 and 16.7%) were significantly lower than in 0.5, 1 and 2 min(63.0, 72.0 and 54.5%), respectively. The post-thaw development rates to hatched blastocyst were significantly($P < 0.05$) higher in *in vivo* morula with intact mucin coat(85.2%) and mucin separated morula(77.8%) than those of *in vitro* morula(58.5%) and zygote(5.9%), but no difference was shown between *in vitro* morulae and mucin separated morula. The cryoprotectant dilution procedures showed no effects on the post-thaw development rates to hatched blastocyst under the present culture conditions. The post-thaw development to hatched blastocyst in the rabbit zygotes was not significantly different between the slow freezing(12.8%) and vitrification(5.9%).

These results indicated that the rabbit frozen zygotes could be successfully developed *in vitro* to hatched blastocysts, though their developmental rate was very low, compared with morula stage embryos, in either vitrification or slow freezing procedure under the present conditions.

(Key words : rabbit zygotes, vitrification, mucin coat, cryopreservation)

서론

핵이식에 의한 복제수정란이 각종 동물에서 널리 생산 이용되고 있다. 그러나 복제 수정란의 생산에

† 본 연구는 1992~1995년도 한국과학재단에서 지원한 특정기초연구 사업비로 연구되었음(KOSEF:92-24-00-10).

* 경상대학교 축산진흥연구소(Inst. Dev. Livestock Prod., Gyeongsang National University)

** 경상대학교 수의학과(Dept. of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University)

관련되는 각 단계의 성공률이 아직 만족할만큼 높지 못하기 때문에 종합적인 생산효율이 매우 낮아서 이 기법의 실용화가 이루어지지 못하고 있다. 토끼에서 박 등(1995)은 체외성숙된 난자를 수정란으로, 그리고 동결란을 공핵란으로 사용하여 생산한 복제수정란을 이식하여 산자를 생산한 바 있다. 토끼의 경우는 자궁에 수정란을 이식하여 높은 착상율을 얻으려면 난관에서 배양된 수정란이어야만 한다. 그 이유는 자궁에 도착되는 수정란에는 난관에서 분비된 mucin으로 coating이 되어 있어야만 하는데(Murakami와 Imai, 1996), 핵이식한 수정란을 체외배양해서는 이 mucin coat가 없기 때문에 자궁내 이식 후의 착상율이 매우 낮기 때문이다. 그래서 핵이식한 토끼 전핵배 단계의 수정란을 성공적으로 동결보존할 수 있다면 이들을 난관내에 이식함으로써 높은 착상율을 얻을 수 있을 것이므로 본 연구에서는 이를 위한 전단계 실험으로써 토끼 정상 전핵배의 동결보존 후 체외발달율을 조사해 보고자 하였다.

포유동물 수정란의 동결보존 연구는 Whittingham 등 (1972)과 Wilmut(1972)이 동결보존된 생쥐 수정란을 이식하여 첫 산자를 생산한 이래 활발히 수행되어 왔다. 포유동물 수정란의 동결방법은 세포내의 자유수를 서서히 탈수시키는 완만동결방법(Miyamoto와 Ishibashi, 1977)과 고농도의 동결액을 사용하여 실온에서 직접 액체질소에 침지하는 초급속 동결방법으로 구분할 수 있다(Nakagata, 1989; Szell과 Shelton, 1986a, b, 1987). 초급속동결 방법에는 각종 동결보호제를 혼합하여 세포내외에 빙정형성을 방지하는 유리화동결방법(Nakagata, 1989; Rall과 Fahy, 1985)과 세포내외를 각각 보호하는 두 가지 동결보호제를 이용하여 동결전 세포내부의 수분을 탈수시키는 방법(Wilton 등, 1989)으로 구분할 수 있다. 이러한 급속동결방법은 완만동결시에 필요한 고가의 장비가 불필요하고, 또한 많은 시간과 다량의 액체질소 등을 최대한 절약함은 물론 완만동결시보다 훨씬 간편하게 액체질소 container내에서 동결을 실시할 수 있다. 그러나 완만동결방법은 급속동결에 비하여 동결시 세포내 자유수의 충분한 탈수로부터 빙정형성을 감소시킬 수 있는 장점이 있다. 완만동결시 사용한 PROH는

0.2 M sucrose보다 낮은 농도를 사용할 경우 삼투압 영향으로 세포와 다른 소 기관에 심각한 변형을 유발하여 생존율과 발달율을 감소시킨다고 하였다(Suzuki 등, 1990).

일반적으로 수정란 동결보존은 상실배 내지 배반포단계의 수정란에서 주로 실시하고 있는데 그 이유는 이 단계의 수정란의 세포질이 적고 세포질 내 유리수분이 적어서 동결 상해가 적기 때문에 동결 융해 후의 생존 및 발달율이 높은 것으로 알려져 있으며, 전핵배나 초기배의 경우는 대개 생존 및 발달율이 매우 낮은 것으로 보고되고 있다. 다만 생쥐와 사람의 전핵배에서는 동결 후 높은 생존율과 발달율을 얻고 있으나(Shaw 등, 1995; Van der Auwera 등, 1990), 소의 전핵배는 동결·융해 후 배반포로의 발달율이 저조하다고 하였고(Pangestu, 1996), 토끼의 전핵배도 동결·융해 후 배반포까지 발달하기가 어려웠다고 한다(Gajada와 Smorag, 1993; Smorag 등, 1989).

이러한 견지에서 본 연구에서는 토끼의 전핵배를 여러 가지 방법으로 동결 보존하여 융해 후 배반포로의 체외배양 가능성을 조사하여 이를 기초로 하여 핵이식 전핵배를 동결 보존한 후 융해하여 난관 이식으로 복제생산자의 생산이 가능할지를 규명하고자 하였으며, 아울러 토끼 체외수정란에 부착되어 있는 mucin coat가 동결 보존에 미치는 효과와 체내 및 체외수정란의 동결능의 차이도 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물 및 사양관리

본 실험에 사용한 토끼는 New-Zealand White종으로 암컷은 생후 3~6개월령의 체중이 2.5~3.5 kg, 수컷은 생후 8개월령 이상의 체중 3.0~4.0 kg 인 것을 공시하였고, 실험 전에 각 cage에 분리하여 경상대학교 실험동물 사육장에서 사육하였으며 사료와 물은 자유로이 급여하였다. Dark-light cycle 조절은 14시간은 light, 10시간은 dark로 조절하였다.

2. 과배란 유기 및 수정란의 채란

토끼의 과배란 유기는 성숙한 암토끼를 40 mg의

FSH(FOLTROPIN-V[®], Australia)를 3일 동안 하루에 2회 12시간 간격으로 분할하여 근육주사하였고, 마지막 투여 12시간 후 hCG(Yuhan Co., Korea) 100 IU를 정맥주사하였다. hCG 주사 후 20시간에 암토끼를 chlorpromazine HCl(Sepamine[®], Samsung Co., Korea)로 진정시킨 후 ketamine HCl(Yuhan Co., Korea)로 전신마취한 다음 수술하¹ 관으로부터 배란된 전핵배를 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco Co., U.S.A)이 함유된 Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS, Sigma Co., U.S.A)으로 회수하였다. 실험에 사용한 수정란은 도립현미경하에서 관찰하여 세포질이 투명하고 정상 형태의 전핵 2개가 명확히 보이는 전핵배만을 사용하였다.

3. 동결 보존액의 제조

유리화 동결보존액(EFS 40)의 제조는 Kasai 등(1990)의 방법에 준하여 10% FBS가 포함된 D-PBS에 40%(v/v) ethylene glycol, 18%(w/v) Ficoll(MW 70,000; Sigma Co., U.S.A) 및 0.3 M sucrose가 최종 농도로 되도록 혼합·제조하였다. 동결·융해 후 동결보호제의 제거를 위하여 사용한 회석액은 기본액에 0.5, 0.25 M sucrose를 첨가하여 제조하였다. 또한 완만동결 보존액의 제조는 20% FBS를 포함한 D-PBS에 1.5 M propanediol(PROH) 및 1.5 M PROH와 0.2 M sucrose가 혼합된 동결보존액을 제조한 후 모든 용액은 0.2 µm filter로 여과하여 4℃ 냉장고에 사용할 때까지 보관하였다.

4. 수정란의 동결 및 융해

유리화 동결은 실온에서 EFS용액에 1분간 평형을 실시한 후 0.25 ml plastic straw내에 5~10개의 수정란을 주입하여 즉시 -196℃의 액체질소에 침지하였다. 동결수정란의 융해방법은 straw를 액체질소에서 꺼낸 즉시 30~37℃의 물에 침지시켜서 10초간 흔들면서 융해를 실시하였고, 융해한 straw는 sealing powder와 cotton plug의 양쪽 부분을 절단한 후 ethylene glycol의 독성을 방지하기 위하여 0.5 M sucrose 용액으로 옮겼다. 1단계 회석은 0.5 M sucrose 용액에 5분간, 2단계 회석은 0.5 M

sucrose에 4분간, 0.25 M sucrose에 3분간 평형시킨 후 기본액으로 3~4회 세척한 다음 5분간 정치시켜 EFS액을 완전히 제거 후에 TCM-199액으로 3~4회 세척한 다음 수정란을 배양하였다.

완만동결법은 배양액내 삼투압의 변화를 고려하여 100 µl 1.5 M PROH에 10분간 평형한 후 1.5 M PROH+0.2 M sucrose에 옮겨 10~15분간 평형하여 동결을 실시하였다. 동결보존액으로 처리된 배아는 0.25 ml straw에 동결보존액 50 µl와 함께 넣은 후 전기 집착기를 이용하여 봉합하였다. 동결은 세포동결기(Model CL 863, Biogenics Co., U.S.A.)를 이용하여 -2℃/min 속도로 -7℃까지 냉각하였고 -7℃에서 미리 액체질소에 담가두었던 forcep을 straw내 동결액의 표면에 접촉하여 식빙을 시행한 후 10분간 정치시켰다. -7℃에서부터 -35℃까지 -0.3℃/min 속도로 동결한 후 straw를 액체질소에 침지하고 융해할 때까지 -196℃ 액체 질소통에서 보관하였다. 융해는 1~10일 후 30~37℃의 증류수를 이용하여 급속 융해(>1,000℃/min)방법으로 시행하였다.

회석액의 처리과정은 배양액내 삼투압의 변화를 고려하여 0.1 M PROH+0.2 M sucrose, 0.5 M PROH+0.2 M sucrose, 0.2 M sucrose 및 PBS+20% FBS를 각각 100 µl drop 만들어 증발로 인한 삼투압의 변화를 막아주기 위하여 oil을 덮고, 순서대로 회석, 세척하였다. 융해 후 배아의 형태학적 판정은 모양이 둥글고 세포질이 맑고 온전한 투명대를 가진 배아를 정상적인 것으로 판정하였다.

5. 동결수정란의 생존성 발달율 판정

동결·융해된 전핵배 및 상실배를 소 난관상피세포가 monolayer를 형성하고 있는 TCM-199액으로 체외배양을 실시하였다. 39℃의 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하여 전핵배아는 2-세포기로 발달한 것을 상실배는 배반포기로 발달한 것을 생존한 것으로 판정하였다. 발달율에 있어서 전핵배아는 5일간 배양하여 부화배반포를 확인하였으며, 상실배는 72시간 동안 배양하여 부화배반포로 발달하였다.

6. 실험설계

적합한 동결방법을 찾고자 하였다.

1) 실험 1 : EFS용액의 평형시간에 따른 토끼전핵배의 독성검사

EFS 용액의 적절한 평형시간과 독성 여부를 판단하기 위해 0, 0.5, 1, 2, 3 및 5분간 노출시켜 동결은 실시하지 않고 세척하여 배양 후 EFS 용액의 독성여부를 알아보고자 하였다.

2) 실험 2 : 발달단계별 유리화동결에 의한 동결·융해 후 배발달율

전핵배 및 상실배를 이용하여 동결에 있어서 mucin coat의 영향을 알아보고자 mucin coat가 거의 없는 전핵배, 전핵배아를 48시간 배양한 상실배, 동결직전 mucin coat를 제거한 체내 상실배 및 mucin coat가 40 μ m 이상 부착되어 있는 체내 상실배를 동결·융해시켜 배양한 후 생존성과 부화 배반포의 발달율을 비교하였다.

3) 실험 3 : 희석방법에 따른 토끼수정란의 생존성 및 발달율

융해과정에서 삼투압의 변화와 기계적인 상해에 의한 생존성을 알아보고자 1, 2단계 희석방법을 비교하였는데, 1단계 방법에서는 세척한 배아를 실온의 0.5 M sucrose에 5분 동안, 2단계 방법에서는 0.5, 0.25 M sucrose에서 각각 4 및 3분씩 처리한 후 기본 용액으로 세척하여 배양하였다.

4) 실험 4 : 동결방법에 따른 생존성 및 발달율

유리화 및 완만동결법을 비교하여 토끼 전핵배에

7. 통계학적 분석

실험결과와 통계학적 분석을 위하여 SAS package를 이용하였으며, 요인별 반복수가 같지 않아 GLM(General Linear Model) procedure를 적용하여 각 요인의 least square means를 구하여 요인간의 유의차를 검정하였다.

결 과

1. EFS액의 평형시간에 따른 토끼 전핵배의 생존성 및 발달율

EFS용액의 온도를 20°C로 고정하고 각 평형시간에 따른 토끼 전핵배의 생존성 및 발달율을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 유리화 용액에 있어서 노출시간의 영향을 구명하기 위해서 전핵배를 EFS용액에 각각 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 및 5.0분간 노출시켰다. Table 1에 나타난 바와 같이 최적 평형시간은 1분 이내인 것으로 나타났다. 0.5, 1.0분 동안 전핵배를 평형시킨 결과 각각 63.0, 72.0%의 부화배반포 발달율을 보였으며 2.0, 3.0 및 5.0분간 평형시킨 것은 각각 54.5, 40.0 및 16.7%의 발달율을 나타내었다. 이와 같은 결과로 보아 EFS 용액의 평형시간이 길어짐에 따라 발달율이 감소함을 알 수 있었다.

2. 발달단계 별 유리화 동결 및 융해 후 토끼 수정란의 생존성 및 발달율

토끼 전핵배를 1분간 평형시킨 경우의 배발달율

Table 1. Survival of rabbit zygotes following exposure for various periods in EFS 40*

Exposure time(min)	No. of zygotes exposed	No. (%) of embryos developed to			
		8-cell	Morula	Blastocyst	Hatched blastocyst
0	29	26(89.7) ^a	25(86.2) ^a	21(72.4) ^a	21(72.4) ^a
0.5	27	23(85.2) ^{ab}	21(77.8) ^{ab}	17(63.0) ^a	17(63.0) ^a
1.0	25	22(88.0) ^{ab}	20(80.0) ^{ab}	18(72.0) ^a	18(72.0) ^a
2.0	22	19(86.4) ^{ab}	13(59.1) ^{bc}	13(59.1) ^a	12(54.5) ^a
3.0	10	7(70.0) ^{ab}	6(60.0) ^{abc}	4(40.0) ^{ab}	4(40.0) ^{ab}
5.0	18	12(66.7) ^b	9(50.0) ^c	3(16.7) ^b	3(16.7) ^b

* Values with different superscripts in the same column were significantly different (P<0.05).

* All of the zygotes were cultured *in vitro* for 120 h.

Table 2. Effect of developmental stage or mucin coat of *in vivo* and *in vitro* developed rabbit embryos on post-thaw survival following vitrification*

Type of embryos	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. (%) of morphologically intact embryos	No. (%) of embryos survived	No. (%) of embryos developed to	
					Blastocyst	Hatched blastocyst
Zygote, <i>in vivo</i>	34	34	27(79.4) ^b	22(64.7) ^a	2(5.9) ^b	2(5.9) ^c
Morula, <i>in vivo</i> intact mucin coat	31	27	26(96.3) ^a	23(85.2) ^a	23(85.2) ^a	23(85.2) ^a
Morula, <i>in vivo</i> mucin coat removed	20	18	17(94.4) ^{ab}	14(77.8) ^a	14(77.8) ^a	14(77.8) ^{ab}
Morula, <i>in vitro</i>	42	41	37(90.2) ^{ab}	28(68.3) ^a	28(68.3) ^a	24(58.5) ^b

* Values with different superscripts in the same column were significantly different (P<0.05).

가장 양호한 결과를 얻었으므로 평형시간을 1분으로 고정시키고 배발달 단계에 따른 동결·융해 후 생존율 및 발달율을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 부화배반포로 발달된 비율을 보면 전핵배는 5.9%로 매우 낮았고, mucin coat를 가진 체내상실배는 85.2%, mucin coat를 제거한 체내상실배는 77.8%로 비슷하게 높았으나, 체외상실배는 58.5%로서 유의적(P<0.05)으로 낮은 발달율을 보였다.

3. 융해 후 희석방법에 따른 토끼 수정란의 생존 및 발달율

유리화 동결법으로 보존한 토끼 수정란의 융해 후 희석방법에 따른 생존성 및 체외발달율을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 동결·융해 후 형태적으로 정상인 수정란의 비율은 1단계 희석에서 전핵배는 상실배보다 유의적(P<0.05)으로 낮은 87.8%였으나 2단계 희석에서는 유의적인 차이가 없었다. 동

결·융해 후 수정란 생존율은 1단계 희석에서는 전핵배가 상실배에 비하여 현저하게 낮아 39.0%에 불과하였으나 2단계 희석에서는 전핵배의 생존율이 상실배와 비슷한 64.7%에 달하였다. 그러나 부화배반포로의 발달율에 있어서는 희석방법 간에는 유의적인 차이가 없었고, 2단계 희석에서 전핵배는 상실배(58.5%)보다 현저히 낮은 5.9%에 불과한 발달율을 보였다.

4. 동결방법에 따른 토끼 전핵배의 생존성 및 발달율

전핵배의 동결보존 방법에 따른 융해 후 발달율을 비교한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같다. EF-S 40을 사용한 유리화동결에서 융해 후 2-step으로 희석한 경우와 PROH를 사용한 완만동결에서 3-step으로 희석한 경우를 비교한 것으로서 양 군간에

Table 3. Effect of post-thaw dilution method on survival of rabbit zygote and morula embryos cryopreserved by vitrification*

Stage of embryos	Dilution step	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. (%) of intact embryos	No. (%) of embryos survived	No. (%) of embryos developed to	
						Blastocyst	Hatched blastocyst
Zygote	1-step*	41	41	36(87.8) ^b	16(39.0) ^b	1(2.4) ^b	1(2.4) ^b
	2-step	34	34	27(79.4) ^b	22(64.7) ^a	2(5.9) ^b	2(5.9) ^b
Morula	1-step	53	50	50(100.0) ^a	35(70.0) ^a	35(70.0) ^a	23(46.0) ^a
	2-step	42	41	37(90.2) ^{ab}	28(68.3) ^a	28(68.3) ^a	24(58.5) ^a

* Values with different superscripts in the same column were significantly different (P<0.05).

Table 4. Comparison of post-thaw development of rabbit zygotes by freezing method*

Freezing method	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No.(%)of morphologically intact zygotes	No.(%)of embryos survived	No.(%) of embryos developed to			
					8-cell	Morula	Blasto-cyst	Hatched blastocyst
Vitrification	34	34	27(79.4) ^a	22(64.7) ^a	7(20.6) ^a	5(14.7) ^a	2(5.9) ^a	2(5.9) ^a
Slow freezing	47	47	36(76.6) ^a	27(55.3) ^a	14(29.8) ^a	6(12.8) ^a	6(12.8) ^a	6(12.8) ^a

* There were no significant ($P < 0.05$) differences between freezing methods.

형태적 손상, 생존을 및 각 발달단계별 체외발달율에 있어서 다같이 유의적인($P < 0.05$) 차이가 없었으며, 유리화 동결과 완만동결에서 생존율은 각각 64.7과 55.3%로 상당히 높았으나 대부분 2-cell 이후에 사멸하고, 부화배반포로의 발달율은 각각 5.9와 12.8%로 현저히 저하되게 나타났다.

고 찰

보존시 생존성에 관여하는 중요한 요인 중 보호제의 종류, 농도와 평형시간에 따른 배발율을 조사하여 최적조건을 찾고자 실험한 결과 최적 평형시간은 1분 이내인 것으로 나타났다(Table 1). 고농도의 동결보존액에 지나친 노출은 삼투압과 화학적 독성 등의 영향을 받을 수 있기 때문에 동결보존액의 선택과 최적 평형시간은 신중해야 한다(Chupin, 1986). Szell과 Schelton(1986a)도 탈수가 부족하면 세포의 생존성에 치명적인 영향을 미치는 세포내 결빙 형성도를 증가시킨다고 하였다. 본 실험에서 전핵배를 EFS 용액에 1분간 평형을 실시하였을 때 72.0%의 부화배반포로 발달율을 보였으나, 평형시간이 보다 길어짐에 따라 배발달율이 다소 감소하는 경향을 보였다. 이것은 EFS 용액에 노출시간이 길어짐에 따라 체외, 체내수정란에 독성효과를 나타낸다는 보고들과 일치한다(Mahmoudzadeh 등, 1995; Zhu 등, 1993; Kasai 등, 1990, 1992). EFS가 아닌 PHOH를 동결보호제로 이용하여 생쥐 전핵배를 동결한 경우는 3~5분의 평형시간이 필요하였다고 한다(Van der Elst 등, 1995). Kasai 등(1992)도 토끼 상실배를 동결보존시 비교적 독성이 적은 동결보호제 EFS용액(40% ethylene glycol, 18% Ficoll, 0.3 M sucrose)을 이

용하여 성공적으로 유리화 동결을 실시하였다.

배발달 단계에 따른 급속동결·용해 후 부화배반포로의 발달율을 살펴보면 전핵배에서는 5.9%로서 mucin coat를 가진 체내상실배에서의 85.2%보다는 현저하게 낮았다(Table 2). 또한 이러한 경향은 동결·용해 후 희석단계를 1-step으로 하나 2-step으로 하나 별 차이가 없이 전핵배는 상실배에 비하여 현저히 용해 후 발달율이 낮았다(Table 3). 뿐만 아니라 동결방법을 유리화 동결로 한 경우나 완만동결로 한 경우나 다같이 전핵배의 용해 후 배발달율이 비슷하게 낮았다(Table 4). Al-Hasani 등(1992)이 토끼 전핵배를 완만동결하여 10%의 배반포를 얻은데 비해 본 실험에서의 12.8%의 배반포를 얻어 비슷한 결과를 나타내었다.

Mouse나 human의 전핵배는 동결·용해 후 생존율과 발달율이 상당히 높았다고 보고하고 있다(Shaw 등, 1995; Van der Auwera 등, 1990). 이에 반하여 Niemann 등(1982)은 초기수정란에서는 할구내의 소포체와 세포소기관 중의 용적이 크기 때문에 동결·용해시 세포내 빙정형성의 원인제공이 많았으므로 초기 수정란에서 생존율이 저하된다고 하였고, Massip 등(1986)도 수정란의 발육단계가 많이 진행된 것일수록 동결시 생존율이 높다고 하였으며, Pollard와 Leibo(1994)도 체외수정란의 발달단계별 동결보존성 비교에서 초기 발달단계가 동결상해에 더 큰 감수성을 나타낸다고 하였다. 소 전핵배는 동결 후 배반포로의 발달율이 매우 낮다고 하며(Pangestu, 1996), 토끼의 전핵배도 동결·용해 후 배반포까지 발달하기가 어려웠다고 보고한 바 있다(Gajada와 Smorag, 1993; Smorag 등, 1989). Leibo 등(1996)은 이와 같은 현상은 특정 발달단계의 배가 특징적으로 저온상해에 대한 감수성

이 높은 것이 아니라, 저온상해에 대한 감수성이 종에 따라 다르다고 제시하고 있다.

본 연구에서 상실배의 동결보존에 대한 mucin coat의 영향을 조사하고자 체내 상실배에서 mucin coat가 온전한 경우와 제거한 경우의 동결·융해 후 배발달율을 비교한 바 유의적인 차이가 없었다 (Table 2). 그러나 Kasai 등(1992)은 토끼 체내 상실배에서 mucin coat를 제거하여 유리화 동결·융해한 경우 대조군에 비하여 blastocyst 발달율은 비슷하였으나 expanded blastocyst로의 발달율은 유의적으로 낮았다. 이들의 결과를 본 연구에서의 mucin coat가 있는 상실배의 성적과 비교하면 비슷한 경향이었으나, mucin coat 제거군의 경우 본 연구의 성적에 더 우수한 것은 그들의 평형시간이 2분간으로 본 연구에 비하여 길었으며 이에 따른 상해를 mucin 제거군에서 더 많이 입었을 가능성이 있다고 사료된다. 본 연구에서 mucin coat가 온전한 체내 상실배와 mucin coat가 없는 체외 상실배의 동결·융해 후 부화배반포 발달율을 비교한 바 Table 2에서 보듯이 체외 수정란은 유의적으로 낮은 58.5%에 불과하였다. 이들 결과로부터 mucin coat의 존재 여부보다는 체외 배양에 인한 배아의 부실이 동결보존에 더 큰 영향을 미친다는 사실을 알 수 있었다.

동결보존제 제거에 있어서는 삼투압 충격 방지와 유리수의 완만탈수를 목적으로 많은 학자들이 3~6단계 처리를 하여 왔으나, 세포내로 투과되지 않고 세포막을 보호한다는 sucrose를 첨가시킴으로써 Kobayashi 등 (1990)은 동결·융해된 1/2 토끼 상실배를 1, 2단계로 처리하였을 때 2단계 희석이 1단계 희석법에 비하여 생존율이 유의적으로 높은 결과를 얻었다. 다단계 희석이 2단계 희석보다, 2단계 희석이 1단계 희석보다 좋았다는 보고가 있다(Guyader-Joly 등, 1996; Thonon 등, 1995). 그러나 본 실험에서는 희석방법에 따른 유의적인 효과는 없었다.

Li 등(1997)은 RD medium(DMEM:RPMI=1:1)에 토끼 전핵배를 48시간 배양한 후 초기배반포를 난관내 이식하여 산자를 얻었다. 이러한 연구 결과들을 종합해 보면 전핵배의 동결방법에 대한 연구를 계속하거나 아니면 상실배를 동결하여 난관내 이식을 하여도 착상율이 높다면 앞으로 토끼 핵이식

복제수정란을 상실배로 배양하여 동결 보존 후 난관내 이식 방향으로 연구해 나갈 수 있으리라고 생각된다.

적 요

본 연구는 핵이식 수정란의 동결보존에 응용하고자 토끼 전핵배를 유리화 동결 및 완만동결법으로 동결·융해 후 체외 배양하여 생존율 및 발달율을 조사하였다. 토끼 수정란의 동결보존을 위하여 동결보존제에 적절한 평형시간과 독성 여부를 판단하기 위하여 전핵배를 EFS 용액에 0~5분간 평형시킨 후 0.5 M sucrose 용액에 희석시킨 결과 부화배반포로의 발달율이 1분 군에서 72.0%로 무해한 결과를 얻었으며 그 이상에서는 유해한 결과를 보여주었다. 토끼수정란의 배발달단계 및 mucin coat가 유리화 동결시 미치는 영향을 조사하기 위하여 전핵배와 상실배를 1분간 평형시간으로 동결을 실시한 결과 부화배반포로의 발달율이 전핵배에서 5.9%, 체내 상실배에서 85.2%, 체외 상실배 58.5% 및 동결 전 mucin coat를 제거한 배가 77.8%를 나타내어 전핵배는 현저히 낮았고, 체외 배양 상실배도 유의적으로 낮았으나, mucin coat 제거는 유의적인 영향을 미치지 않았다. 토끼 전핵배 및 상실배의 유리화에서 1, 2단계 희석방법에 따른 부화배반포로의 발달율은 토끼 전핵배(2.4, 5.9%)나 상실배(46.0, 58.5%)에서 다같이 희석방법 간에는 차이가 없었으나, 발달단계간에는 유의적($P < 0.05$)인 차이를 보였다. 토끼 전핵배에서 유리화 및 완만동결 간에는 융해 후 부화배반포로의 발달율이 유리화(5.9%) 및 완만동결(12.8%)로서 유의적 차이를 나타내지는 않았다.

이상의 결과로부터 토끼 전핵배의 동결보존은 가능하다고 사료되나 그 발달율이 극히 낮았으며, 후기 수정란이 초기 수정란보다 동결·융해시 높은 내성을 지니고 있는 것으로 판단되므로 토끼 수정란의 동결은 상실배에서 실시하는 것이 높은 생존율과 발달율을 얻을 수 있을 것으로 사료된다. 동결에 있어서는 mucin coat의 영향을 많이 받지 않으므로 핵이식배의 동결보존은 상실배를 동결·융해 후 배양하여 난관내 이식할 수 있는 방법을 검토해

불 필요가 있다고 생각된다.

참고문헌

- Al-Hasani S, Hepnar C, Dedrich K, Van der Ven H and Krebs D. 1992. Cryopreservation of rabbit zygotes. Hum. Reprod. (Suppl. 1) 7:81-83.
- Chupin D. 1986. Quick freezing of bovine blastocysts. Theriogenol., 26:147.
- Gajada B and Smorag Z. 1993. Factors affecting the survival of one- and two-cell rabbit embryos cryopreserved by vitrification. Theriogenol., 39:499-506.
- Guyader-Joly C, Ponchon S, Durand M, Diez C, Heyman Y and Renard JP. 1996. Effect of different dilution procedures on *in vitro* survival of frozen bovine IVF embryos. Congr. 13th Int. Congr. Anim. Reprod. (SYDNEY). p. 15-3.
- Kasai M, Hamaguchi Y, Zhu SE, Sakura T and Machida T. 1992. High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method. Biol. Reprod., 46:1042-1046.
- Kasai M, Komi JH, Takakano A, Tsydera H, Sakuai 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.
- Kobayashi K, Nagashima H, Yamakawa H, Kato Y and Ogawa S. 1990. The survival of whole and bisected rabbit morulae after cryopreservation by the vitrification method. Theriogenol., 33:777-788.
- Leibo SP and Oda K. 1993. High survival of mouse zygotes and embryos cooled rapidly or slowly in ethylene glycol plus polyvinylpyrrolidone. Cryo-Letters, 14:133-144.
- Leibo SP, Martino A, Kobayashi S and Pollard JW. 1996. Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. Anim. Reprod. Sci., 42:45-53.
- Li J, Foote RH, Liu Z and Giles JR. 1997. Development of rabbit zygotes into blastocysts in defined protein-free medium and offspring born following culture and embryo transfer. Theriogenol., 47:1103-1113.
- Mahmoudzadeh AR, Van Soom A, Bols P, Ysebaert MT and de Kruif A. 1995. Optimization of a simple vitrification procedure for bovine embryos produced *in vitro*: effect of developmental stage, two-step addition of cryoprotectant and sucrose dilution of embryonic survival. J. Reprod. Fert., 103: 33-39.
- Massip A, Van der Zwalmen P, Scheffen B and Ectors F. 1986. Pregnancies follow transfer of cattle embryos preserved by vitrification. Cryo-Letters 7:270-273.
- Miyamoto H and Ishibashi T. 1977. Survival of frozen-thawed mouse and rat embryos in the presence of ethylene glycol. J. Reprod. Fert., 50:373-375.
- Murakami H and Imai H. 1996. Successful implantation of *in vitro* cultured rabbit embryos after transfer : A role for mucin. Mol. Reprod. Dev., 43:167-170.
- Nakagata N. 1989. Survival of 2-cell mouse embryos derived from fertilization *in vitro* after ultrarapid freezing and thawing. Jpn. J. Fertil. Steril., 34:470-473.
- Niemann H, Sacher B, Schilling E and Smidt D. 1982. Improvement of survival rates of bovine blastocysts with sucrose for glycerol dilution after a fast freezing and method. Theriogenol., 17:102.
- Pangestu M. 1996. Alpha tocopherol micro-injection protects *in vitro*-produced bovine pronuclear-stage embryos from chill- and cryo-injury. Congr. 13th Int. Congr. Anim

- Reprod. (SYDNEY) p.1 5-7.
- Pollard JW and Leibo SP. 1994. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenol.*, 41:101-106.
- Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 313:573-575.
- Shaw JM, Ward C and Trounson AO. 1995. Evaluation of propanediol, ethylene glycol, sucrose and antifreeze proteins on the survival of slow-cooled mouse pronuclear and 4-cell embryos, *Hum. Reprod.*, 10:396-402.
- Smorag Z, Gajta B, Wieczorek and Jura J. 1989. Stage-dependent viability of vitrified rabbit embryos. *Theriogenol.*, 31:1227-1231.
- Suzuki T, Yamaoto M, Ooe M, Sakata A, Matsuoka M, Nishikata Y and Okamoto K. 1990. Effect of sucrose concentration used for one-step dilution upon *in vitro* and *in vivo* survival of bovine embryos refrigerated in glycerol and 1,2-propanediol. *Theriogenol.*, 34:1051-1057.
- Szell A and Schelton JN. 1986a. Sucrose dilution of glycerol from embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. *J. Reprod. Fert.*, 76:401-408.
- Szell A and Schelton JN. 1986b. Role of equilibrium before rapid freezing of mouse embryo. *J. Reprod. Fert.*, 78:699-703.
- Szell A and Schelton JN. 1987. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solution on Day-3 mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 80:309-316.
- Thonon F, Lens H, Touati K, Ectors FJ, Delval A, Beckers JF and Ectors F. 1995. A step-wise procedure for cryoprotectant equilibration improves the survival rate after thawing of *in vitro* produced embryos. *Theriogenol.*, 43:338.
- Van der Auwera I, Cornillie F, Ongkowidjojo R, Pijnenborg R and Koninckx PR. 1990. Cryopreservation of pronuclear mouse ova: slow versus ultrarapid freezing. *Hum. Reprod.*, 5:619-621.
- Van der Elst J, Van den Abbeel and Van Steirteghem AC. 1995. The effect of equilibration temperature and time on the outcome of ultrarapid freezing of 1-cell mouse embryos. *Hum. Reprod.*, 10:379-383.
- Whittingham DG, Leibo SP and Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . *Science*, 178:411-414.
- Wilmut I. 1972. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sci.*, 11:1071-1079.
- Wilton LJ, Shaw JM and Trounson AO. 1989. Successful single-cell biopsy and cryopreservation of preimplantation mouse embryos. *Fertil. Steril.*, 51:513-517.
- Zhu SE, Kasai M, Otoge H, Sakurat T and Machida T. 1993. Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solutions. *J. Reprod. Fert.*, 98:139-145.
- 박충생, 전병균, 이경미, 윤희준, 이효종, 최상용. 1995. 토끼의 체외배양 난자를 이용한 핵이식으로 복제수정란 및 복제산자의 생산. *한국수정란이식학회지*, 10:65-72.

(접수일자: 1997. 8. 2 / 채택일자: 1997. 8. 21)