

토끼의 정상 및 핵이식배의 유리화 및 완만동결에 따른 융해 후 발달률

강다원 · 최창용* · 하란조 · 강태영* · 심보웅 · 최상용* · 이효종* · 박충생

경상대학교 축산학과, 축산진흥연구소

Post-thaw Embryo Development following Vitrification or Slow Freezing of Rabbit Normal and Nuclear Transplant Embryos

D. W. Kang, C. Y. Choe*, R. J. Ha, T. Y. Kang*, B. W. Sim, S. Y. Choe*,
H. J. Lee* and C. S. Park

Department of Animal Science, Institute for Development of Livestock Production,
Gyeongsang National University

SUMMARY

In order to improve the cryopreservation by vitrification or slow freezing of nuclear transplant rabbit embryos, the effects of factors affecting embryo cryopreservation such as cryoprotectants, equilibration, cooling rate and post-thaw dilution on post-thaw survival and development were determined using intact embryos of morular stage. And the post-thaw development of nuclear transplanted embryos cryopreserved under the optimal conditions examined was compared between vitrification and slow freezing. The cryoprotectant solution used was ethyleneglycol-ficoll-sucrose (EFS) or ethyleneglycol-poly-vinylpyrrolidone-galactose- I (EPG- I) for vitrification, and EPG- II for slow freezing. To examine the viability of frozen-thawed embryos, the nuclear transplanted embryos were co-cultured in TCM-199 plus 10% FBS with bovine oviduct epithelial cells(BOEC) for 24 hrs and the intact morulae were co-cultured with BOEC for 5 days and 3 days to hatching blastocyst stage in 39 °C 5% CO₂ incubator. The results obtained were as follows:

Following vitrification with EFS, the post-thaw development of rabbit morulae to hatching blastocyst was significantly($P<0.05$) higher in compacted stage(82.4%) than in early morular stage(60.0%). The post-thaw development of compacted morulae to hatching blastocyst was similarly high in vitrification with EFS(82.4%), EPG- I (85.0%) and in slow freezing with EPG- II (83.3%). Following vitrification with EPG- I, the post-thaw development of intact rabbit morulae to hatching blastocyst was similar as 78.0% and 85.0% in 1-step and 2-step post-thaw dilution, respectively. The post-thaw development of nuclear transplanted rabbit embryos of compacted morulae stage to hatching blastocyst was similarly 43.6% and 40.0% in vitrification with EPG- I and slow freezing with EPG- II, respectively.

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

These results indicated that the rabbit nuclear transplant and intact embryos of morulae stage could be well cryopreserved with either vitrification or slow freezing procedure.

(Key words : EFS, EPG, vitrification, slow freezing, nuclear transplantation)

서 론

핵이식기법은 하나의 수정란으로부터 유래한 동일한 성과 유전 형질을 가진 복제배를 만들어, 이를 수정란 이식 기법으로 대리모에 이식하여 복제 동물(cloned animals)을 생산할 수 있는 산업적 용용으로 발전하였다. 복제 동물은 경제적으로 유익한 동물이나 우량 유전자를 가진 동물을 선발하는데 유리하며, 동물의 성을 인위적으로 지배할 수 있게 하고, 실험 동물로써 개체간의 차이를 줄임으로써 정확한 실험 결과를 얻는데 매우 유익하게 사용될 수 있다. 또한 의학 및 생화학적인 실험에서 장기 이식, 면역학적인 연구에도 널리 사용될 수가 있고, 유전자 주입 등의 분자생물학적인 분야 즉, 형질 전환 동물을 생산하거나 정자를 난자에 직접 미세 주입하여 수정시키는 불임의 연구 등에도 응용될 수 있으며 그 활용은 복제배를 동결보존함으로서 더욱 증대되어질 것이다.

그러나 핵이식에 의한 복제동물의 대량 생산이 실용화되려면 난자 혹은 수정란의 동결보존법이 개발되어야만 하는데, 그 첫째 방법으로는 핵이식에 공용할 수핵란 혹은 공핵란을 동결보존하여 두고 수란축이 준비될 때에 맞추어서 핵이식배를 생산하는 방안이다. 그런데 세포질이 많은 수핵란은 동결 후 생존율이 매우 낮은 것으로 보고되고 있다. 둘째 방법으로는 핵이식으로 생산된 복제배를 동결이 용이한 단계까지 체외배양하여 이들을 동결보존해 두었다가 수란축이 준비되면 수정란이식을 실시하여 복제동물을 생산하는 방안이다. 이 경우에도 핵이식배의 동결보존 후 체내의 발달률을 높일 수 있도록 동결기법의 개발이 선행되어야만 할 것이다.

포유동물 수정란의 동결보존 연구는 1972년 Whittingham 등이 동결보존된 생쥐 수정란을 이식하여 첫 산자를 생산한 이래 활발히 수행되어 왔다. 포유동물 수정란의 동결방법은 세포내의 자유수를 서서히 탈수시키는 완만동결법과 고농도의 동결액을 사용하여 실온에서 직접 액체질소에 침지하는 급속동

결방법으로 구분할 수 있다. 급속동결방법은 완만동결시에 필요한 고가의 장비가 불필요하고, 또한 많은 시간과 다량의 액체질소 등을 최대한 절약함은 물론 완만동결시보다 훨씬 간편하게 액체질소통내에서 동결을 실시할 수 있다. 그러나 완만동결법은 급속동결에 비하여 동결시 세포내 자유수의 충분한 탈수로부터 빙정 형성을 감소시킬 수 있는 장점과 급속동결에서 요구되는 정확성이 불필요하기 때문에 아직까지 체내수정란의 대부분은 완만동결법에 의해 동결보존되고 있다.

동결에 앞서 고농도의 동결보존액에 지나친 노출은 삼투압과 화학적 독성 등의 영향을 받을 수 있기 때문에 동결보존액의 선택과 최적 평행시간은 선결되어야 하며 수정란의 동결보존은 수정란의 발육단계가 많이 진행된 것일수록 동결·융해 후 높은 생존율을 보고하여 일반적으로 상실배 내지 배반포단계의 수정란에서 동결을 실시하고 있다.

핵이식배의 동결보존은 지금까지 생쥐에 있어 핵이식배를 2-세포기 까지 배양하여 동결·융해 후 체외에서 발달한 배반포기를 이식하여 산자생산을 보고하였으며, 그외 여러 동물종에서 핵이식배의 동결보존에 관한 연구를 하고 있으나 아직 뚜렷한 결과를 얻지 못하고 있다. 토끼에 있어서도 핵이식배의 동결보존에 의한 산자 생산은 아직 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 핵이식배의 동결조건에 따른 동결·융해 후 발달률을 규명하여 토끼 복제배의 대량 생산 기법 개발을 위한 기초자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

1. 공시 동물

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 kg인 것을 공시하였고, 실험 전에 각 cage에 분리 수용하여 경상대학교 실험동물 사육장에서 사육하였으며, 사료와 물은 자유로이 급여하였다. Dark-lig-

ht cycle 조절은 14시간 “light”, 10시간 “dark”로 조절하였다.

2. 과배란 유기, 난자 및 수정란의 채취

토끼의 과배란 유기는 성숙한 암토끼에 40 mg의 FSH(Folltropin-V®, Australia)를 3일 동안 1일 2회 12시간 간격으로 분할하여 근육주사하였고, 마지막 투여 12시간 후 성숙된 암토끼와 교미시킨 다음 hCG(Yuhan Co., Korea) 100 IU를 정맥주사하였다. hCG 주사 후 20시간에 암토끼를 chloropromazine HCl(Sepamine®, Samsung Co., Korea)로 진정시킨 후 ketamine HCl(Yuhan Co., Korea)로 전신마취한 다음 수술하여 난관으로부터 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 전핵배는 도립현미경 하에서 관찰하여 세포질이 투명하고 정상 형태의 전핵 2개가 명확히 보이는 것만을 선택 사용하였고, 이를 전핵배의 일부는 체외에서 8-세포기까지 배양하여 공핵란으로 이용하였으며, 나머지 전핵배는 상실배까지 배양하여 정상 수정란의 동결보존 실험에 공시하였다. 수핵란은 hCG 주사 후 13~15 시간에 상기와 같은 방법으로 난관으로부터 회수하였다.

3. 핵이식배의 생산

1) 공핵란의 준비 및 할구 분리

공핵란의 준비를 위하여는 토끼에 hCG 주사 후 20시간째에 채란한 전핵배를 체외배양하여 8-세포기에서 0.5%의 pronase(Sigma Co., U.S.A.)에 잠깐 노출시킨 후, 150 μm 정도의 pipette으로 pipetting하여 투명대를 제거하였다. 이를 다시 50 μm 정도의 pipette으로 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 이 결여된 D-PBS에서 할구를 분리하여 사용하였다.

2) 수핵란의 준비, 탈핵 및 할구 주입

수핵란으로 회수된 난자는 300 IU/ml의 hyaluronidase /D-PBS(Sigma Co., U.S.A.)에서 39°C, 5% CO_2 incubator에서 7분간 정치한 다음, 150 μm fire-polished pipette으로 반복 pipetting하여 난구

세포를 제거하고, 제 1극체가 명확하고 세포질이 균일하고 충실히 것만을 선택하여 사용하였다. 수핵란의 탈핵을 위한 미세조작은 Stice와 Robl(1988)과 Collas와 Robl(1990)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 난구세포가 제거된 수핵란과 공핵란으로부터 분리된 할구를 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 cytochalasin B (Sigma Co., U.S.A.), 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 aphidicolin 그리고 10% FCS가 함유된 Earl's balanced salt solution(EBSS, Sigma Co., U.S.A.)에 15분간 유지하는 전처리를 한 후 탈핵 및 할구 주입을 하였다. 이를 위하여 micromanipulator(Narishige Co., Japan)를 DIC 도립현미경(Nikon Co., Japan)위에 장치하여 사용하였으며, 미세조작 중 할구나 수핵란은 계속 상기한 cytochalasin B - aphidicolin - FBS가 함유된 EBSS에서 보존하였다. 탈핵은 McGrath와 Solter(1983)의 non-disruptive 조작법에 의하여 실시하였는데 즉 성숙된 M II 난자를 150 μm 정도의 holding pipette으로 고정시키고 핵을 제거하기 위하여 30 μm 의 연마된 미세 pipette를 투명대 내로 진입시켜 제 1극체와 그 주위에 위치하는 제 2감수분열 중기의 염색체를 원형질막에 싸여진 채로 흡입하여 제거하였다. 공핵란으로부터 분리된 할구 하나를 수핵란의 탈핵에서 사용한 미세 pipette에 흡입하고 이를 미세조작으로 탈핵된 수핵란의 위란강에 주입하였다.

3) 세포융합 및 난자 활성화

핵이 주입된 난자는 Robl 등(1987)의 방법에 따라 수핵란의 세포질과 공핵란 할구의 세포융합 및 난자 활성화를 전기자극으로 동시에 실시하였다. 전기자극은 이 등(1993)의 방법에 따라 1.25 kV /cm의 전압으로 60 sec의 3회 통전으로 실시하였다. 세포융합과 난자 활성화를 위해 사용한 용액은 100 μM CaCl_2 및 MgCl_2 가 함유된 비전해질의 0.3 M mannitol 용액으로서 사용하기 2시간 전에 만들어 25°C의 실온에서 평형시킨 후 사용하였다. 할구가 주입된 난자를 이 용합용액과 D-PBS를 1:1로 혼합한 용액으로 세척한 다음에 용합용액이 들어있는 chamber에 옮겨, pipette으로 정렬시키고 난 다음 Electro Cell Manipulator 200(ECM® 200, BTX Co., San Diego)에 장치되어 있는 두 전극 사이에

서 수핵란의 세포질과 공핵란 할구의 세포융합을 유도하였다. 전기자극 후 수핵난자의 활성화를 증진시키기 위하여 Tatham과 Trounson(1996)의 방법에 따라 5 μ M ionomycin(Sigma Co., U.S.A)에서 5분간 처리하고 2 mM 농도의 6-dimethylaminopurine(6-DMAP; Sigma Co., U.S.A)에서 2시간 동안 정치시킨 후 세척하여 배양하였다.

4) 핵이식배의 체외 배양

핵이식 후 세포융합이 확인된 수정란은 4-well dish에 10% FBS가 포함된 TCM-199 배양액으로 옮겨 monolayer가 형성된 소 난관 상피세포와 같이 39°C의 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양액은 48시간마다 신선한 배양액으로 교환하였다.

4. 수정란의 동결보존 및 융해

1) 동결보존액 및 융해 후 희석액의 제조

동결보존액 중 EFS와 EPG- I 용액을 유리화동결 보존액으로 사용하였고 EPG- II 용액을 완만동결용으로 사용하였다. EFS 용액은 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 되게 혼합 제조하였고, EPG- I 용액은 8 M ethylene glycol, 7.5% (w/v) polyvinylpyrrolidone(PVP)(MW 40,000; Sigma Co., U.S.A.) 및 0.25 M galactose를 혼합하여 제조하였다. EPG- II 용액은 10% FBS를 포함한 D-PBS에 1.8 M ethylene glycol, 5.0%(w/v) PVP 및 0.05 M galactose를 혼합하여 제조하였다. 융해 후 동결보호제의 제거를 위하여 사용한 희석액은 D-PBS에 0.5 M, 0.25 M sucrose 또는 0.5 M, 0.25 M galactose를 첨가하여 제조하였다. 제조된 모든 용액은 0.2 μ m filter로 여과하여 4°C 냉장고에 넣어 사용할 때까지 보관하였다.

2) 수정란의 동결 및 융해

유리화동결의 경우는 5~10개의 상실기의 정상 혹은 핵이식배를 실온에서 EFS 혹은 EPG- I 용액에 1분간 평형을 실시한 후 Fig. 1. (A)와 같이 0.25 ml plastic straw 내에 주입하여 즉시 -196°C의 액

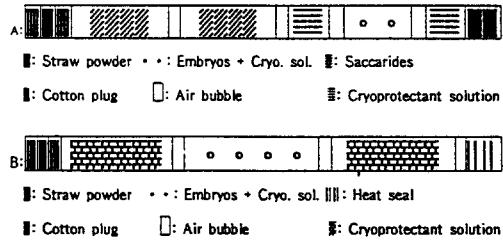


Fig. 1. Diagram of loading of embryos and cryoprotectant using 0.25 ml plastic straws for cryopreservation by vitrification(A) or slow freezing(B).

체질소에 침지하였다. 동결수정란의 융해방법은 straw를 액체질소에서 꺼내어 공기중에서 10초간 노출시킨 후 30~37°C의 물에 침지시켜서 혼들면서 융해하였다. 융해된 straw는 sealing powder와 cotton plug의 양쪽 부분을 절단한 후 EFS의 경우에는 0.5 M sucrose 용액으로, 그리고 EPG- I의 경우에는 0.5 M galactose로 희석하여 ethylene glycol의 독성을 제거하였다. 희석단계의 효과를 규명하기 위하여 1단계와 2단계 희석법을 실시하였는데, 1단계 희석법은 0.5 M의 sucrose나 galactose용액에 5분간 평형시킨 후, 그리고 2단계 희석법은 0.5 M의 sucrose나 galactose에 4분간 평형시킨 다음 0.25 M의 sucrose나 galactose에 3분간 평형시킨 후, 각각 D-PBS로 3~4회 세척한 다음 5분간 정치시킨 후 TCM-199액으로 3~4회 세척하여 융해과정을 완료하였다.

완만동결의 경우는 5~10 개의 상실기의 정상 혹은 핵이식배를 실온에서 EPG- II 용액에 30분간 평형시킨 후 Fig. 1. (B)와 같이 0.25 ml straw에 동결보존액 50 μ l와 함께 주입한 후 전기접착기를 이용하여 straw의 양단을 봉합하였다. 동결방법은 세포동결기(Model CL 863, Biogenics Co., U.S.A.)를 이용하여 Fig. 2와 같은 동결속도로 동결시켰다. 즉 -2°C/min 속도로 -7°C까지 냉각한 후, 미리 액체질소에 담가 두었던 forcep을 straw내 동결액의 표면에 접촉하여 식빙을 시행한 후, -7°C에서 10분간 정치시켰다. 그 후 -7°C에서부터 -35°C까지는 -0.3°C/min 속도로, -35°C에서 -85°C까지는 -1°C/min 속도로 냉각한 후, -196°C 액체질소

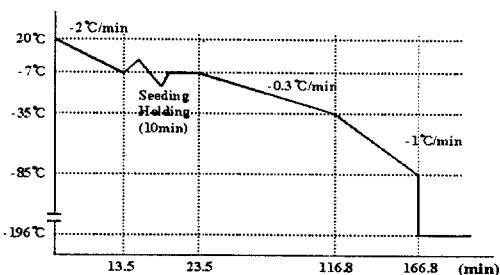


Fig. 2. Diagram of cooling rate of embryos in slow freezing.

통에 침지 보관하였다. 동결 수정란의 융해는 1~10일 후 30~37°C의 온수를 이용하여 급속 융해(>1,000°C/min) 하였다. 융해 후 희석과정은 100 μl의 drop의 0.5 M galactose에 4분간, 0.25 M galactose에 3분간 그리고 D-PBS+10% FBS에 5분간씩 동결·융해한 수정란을 끊겨 넣어 동결보존액을 희석 세척시켰는데 이 과정에서 증발로 인한 삼투압의 변화를 막아주기 위하여 oil로 drop을 피복하였다. 상실기의 핵이식배의 경우에는 동결·융해 후 형태학적 검사를 실시하여 동결에 따른 상해를 평가하였는데, 모양이 둥글고 세포질이 맑고 온전한 투명대를 가진 배를 “정상적 형태”로 판정하였다.

5. 동결·융해 후 수정란의 배양

동결·융해된 상실기의 정상 및 핵이식배를 39°C의 5% CO₂ incubator에서 소 난관 상피세포로 monolayer를 형성하고 있는 10% FBS가 포함된 TCM-199액으로 체외배양을 실시하였다. 정상 상실배는 48시간 배양 후 배반포기로 발달한 것을 생존한 것으로 판정하였고, 3일간 배양하여 부화배반포 발달률을 조사하였다. 상실기의 핵이식배는 24시간 배양 후 초기배반포로의 발달률을 조사하였다.

6. 통계학적 분석

실험 결과의 통계학적 분석을 위하여 SAS(Statistical Analysis System) package를 이용하였으며, 요인별 반복수가 같지 않아 GLM(General Linear Models) procedure를 적용하여 각 요인의 least square means를 구하여 처리구간의 유의성을 검

정하였다.

결과 및 고찰

1. 체외배양 상실배의 동결·융해 후 발달률

1) 상실배의 발달단계에 따른 동결·융해 후 발달률

토끼 전핵배를 체외배양한 후 48시간의 초기 상실배와 62시간의 compact 상실배를 유리화동결·융해한 후 3일간 배양한 경우의 배 발달률을 조사한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다.

즉 compact 상실배(82.4%)가 초기 상실배(60.0%)보다 유의적($P<0.05$)으로 높은 부화배반포 발달률을 보였다. 그 이유는 할구의 크기가 작을수록 동결에 대한 내성이 높기 때문인 것으로 생각된다. 일반적으로 수정란의 동결보존은 상실배 내지 배반포단계의 수정란에서 주로 실시하고 있는데 그 이유는 이 단계의 수정란이 세포질이 적고 세포질 내 유리수분이 적어서 동결 상해가 적기 때문에 동결·융해 후의 생존율 및 발달률이 높기 때문이다.

Massip 등(1986)도 소 초기 수정란에서 발달단계가 진행될수록 동결시 생존율이 높다고 하였으며, Pollard와 Leibo(1994)도 포유동물 체외수정란의 발달단계별 동결보존성 비교에서 초기 발달단계의 수정란이 동결상해에 더 큰 감수성을 나타낸다고 하였다. 상실배의 동결보존은 토끼에서 Smorag 등(1989)에 의하여 유리화 보존액로부터 산자를 얻었으며, Kasai 등(1992)은 EFS 용액으로 토끼 체내 상실배를 20°C에서 2분간 평형시킨 후 -196°C의 액체질소에 침지하여 동결·융해를 실시하여 화장배반포로의 높은 발달률(87%)을 보고하였다. 이는 본 연구의 부화배반포로의 발달률 82.4%와 비슷한 경향이었다. 이와같이 토끼의 경우는 동결에 적합한 배의 발달단계가 타 동물종과 상이한 것은 mucin coat의 존재가 동결보존에 영향을 미치는 때문일 것으로 사료된다.

2) 동결방법에 따른 동결·융해 후 배 발달률

토끼의 전핵배를 체외배양하여 얻은 compact 상실배를 유리화 동결과 완만동결법으로 동결·융해

Table 1. Effect of cell stage of morulae on post-thaw development of rabbit embryos following vitrification*

Embryo cell stage	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. (%) of embryos developed to	
			Blastocyst	Hatching blastocyst
Early morula	52	50	33(66.0) ^b	30(60.0) ^b
Compact morula	56	51	43(84.3) ^a	42(82.4) ^a

* There was significant ($P < 0.05$) difference between the different superscripts in the column.

Table 2. Post-thaw development of rabbit morulae cryopreserved by vitrification or slow freezing*

Freezing method	Cryoprotectant	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. (%) of hatching blastocysts
Vitrification	EFS	56	51	42(82.4) ^a
Vitrification	EPG-I	64	60	51(85.0) ^a
Slow freezing	EPG-II	30	30	25(83.3) ^a

* There was no significant ($P < 0.05$) difference between the same superscripts in the column.

후 배 발달률을 비교한 결과는 Table 2와 같다.

유리화 동결과 완만동결로 나누어 살펴보면 유리화 동결시는 동결보호제로 EFS, EPG-I 을 사용하였고, 완만동결시는 EPG-II를 사용하였는데 동결·융해 후의 부화배반포로의 발달률은 유리화 동결의 EFS(82.4%), EPG-I (85.0%) 및 완만동결의 EPG-II (83.3%) 간에 다같이 매우 높게 나타났으며, 처리구간에 유의적인 차이를 보이지 않았다.

Kasai 등(1992)도 토끼 상실배를 동결보존시 비교적 독성이 적은 동결보호제인 EFS용액을 이용하여 성공적으로 유리화 동결을 실시하였다. Vicente 와 Garcia-Ximenez(1994)도 동결보호제로서 ethylene glycol의 단독 사용은 동결·융해 후 배의 발달이 낮았으며, 다른 비첨투성 동결보호제와 혼합하거나 짧은 시간동안 노출을 함으로써 생쥐나 토끼 수정란의 동결보존에 우수한 결과를 얻었다고 한다.

3) 융해 후 희석법에 따른 동결·융해 후 배 발달률

토끼 상실배의 유리화 동결 보존 후 융해 과정에서 동결보호제의 희석에 의한 세척을 실시하게 되는데 이를 1단계로 0.5 M galactose에 배를 옮겨서 5분간 둔 후 D-PBS용액으로 옮기는 방법과, 2단계로 0.5 M galactose에 옮겨서 4분간 및 0.25 M ga-

lactose에 배를 옮겨 3분간 둔 후 D-PBS 용액으로 옮기는 방법으로 세척한 후 3일간 배양한 결과 부화 배반포로의 발달률은 Fig. 3에서 보는 바와 같다. 즉 1단계 희석의 경우는 78.0%(39/50) 그리고 2단계의 경우는 85.0%(51/60)의 부화배반포 발달률을 보여 희석방법간에 유의적인 차이($P < 0.05$)를 보이지 않았다.

동결보호제 제거에 있어서는 삼투압충격 방지와 유리수의 완만탈수를 목적으로 3~6단계의 처리를

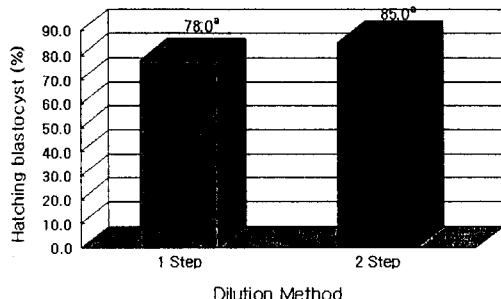


Fig. 3. Post-thaw development of rabbit morulae cryopreserved by vitrification followed by different dilution steps.
1-step: 0.5 M galactose, 2-step: 0.5 M galactose and 0.25 M galactose

There was no significant ($P < 0.05$) difference between the same superscripts in the column.

하여 왔으나, 세포내로 투과되지 않으면서 세포막을 보호하는 sucrose를 첨가시킴으로써 Kobayashi 등(1990)은 동결·융해된 토끼 분할 상실배에서 2단계 회석이 1단계 회석법에 비하여 생존율이 유의적으로 높았다고 한다. 그리고 McWilliams 등(1995)은 단당류와 이당류의 삼투압과 생리학적 반응을 비교·검토해 본 결과 단당류가 이당류에 비해 수정란에 더 안정적인 반응을 보였다고 보고하였다. 본 실험에서는 이와 같이 보다 안정적인 galactose를 사용한 경우로서 1단계와 2단계의 회석방법 간에 유의적인 ($P < 0.05$) 차이는 볼 수 없었다.

2. 핵이식배의 동결방법에 따른 동결·융해 후 발달률

앞에서 실시한 실험들에서 보다 효과적인 결과를 얻은 조건들을 선택하여 유리화 및 완만동결로 핵이식배를 동결·융해한 후 배반포로의 발달률을 비교 조사하였다. 그래서 62시간 배양한 compact 상실배를 실험에 사용하였으며, 유리화 동결에서는 동결보호제 EPG-I에 1분간, 그리고 완만동결에서는 EPG-II에 20분간 평형시켰고, 평형 후 straw에 loading하여 유리화 동결은 즉시 액체질소로 침지하고, 완만동결은 세포동결기를 이용하여 -85°C 까지 이러한 속도로 냉각시킨 후 액체질소에 침지하였으며, 5~10일간 동결보존 후 융해하여 2단계 회석법으로 회석 및 세척한 후 24시간 동안 공배양 하였을 때 형태학적으로 정상인 배의 비율과 초기 배반포로 발달률을 보면 Table 3과 같다.

동결·융해후 형태학적으로 정상인 핵이식배의 비율에 있어서는 유리화 동결(69.2%)보다 완만동결(83.3%)에 있어 다소 높은 결과를 보여주었지만 유의적인 ($P < 0.05$) 차이는 없었다. 초기 배반포로의 발달률에 있어서도 유리화 동결(43.6%)과 완만

동결(40.0%)간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 동결·융해 후 핵이식배는 체외에서의 배양시간을 가급적 단축하기 위하여 24시간 동안만 배양하여 초기배반포로의 발달을 확인하였다.

토끼 핵이식배의 동결 보존에 관한 기준의 연구 결과는 볼 수 없어 본 연구의 결과와 비교할 수는 없으나, 이상의 완만동결과 유리화 동결 후 핵이식 배의 배발달률은 Table 2의 정상 상실배에 비하여는 절반 수준으로 낮게 나타났는데, 이는 핵이식을 위한 미세조작에 따른 손상에 인한 것으로 생각되나, 핵이식배의 동결 보존 성적으로는 상당히 높은 발달률이라고 생각되며 이를 항상시키기 위한 연구를 계속해야 할 것으로 본다.

토끼의 수정란에서는 다른 동물과는 달리 특이하게 난관에서 분비되는 당단백질 성분인 mucin coat가 존재한다. Murakami와 Imai(1996)에 의하면 mucin coat는 2-세포기 및 상실배 단계에서 특히 많이 난관의 분비물로 생성되는데 토끼의 수정란에서 mucin coat의 유무와 그 두께는 산자의 생산에 지대한 영향을 준다고 하며, 이것의 역할은 수정란이 부화하기 전부터 착상 때까지 부적당한 자궁의 환경에 수정란의 노출을 방지하고, 또한 더 많은 할구수를 가지게 됨으로써 산자의 생산에 영향을 미친다고 보고하였다. 그래서 토끼의 경우는 복제산자 생산을 위한 핵이식배나 체외수정란을 자궁내에 이식할 경우 착상을 매우 낫다. 그런데 Li 등(1997)은 RD medium에 토끼 전핵배를 48시간 배양하여 얻은 상실배 및 초기배반포를 난관내에 이식하여 산자를 생산한 바 있으므로, 토끼 핵이식배를 상실배까지 배양하여 동결보존한 후 난관이식을 하는 방법을 개발한다면 실용성이 높을 것으로 생각된다.

Table 3. Post-thaw development for 24 hrs of nuclear transplant rabbit embryos cryopreserved by vitrification or slow freezing*

Freezing method	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. (%) of normal embryos	No. (%) of early blastocysts
Vitrification	40	39	27(69.2) ^a	17(43.6) ^a
Slow freezing	30	30	25(83.3) ^a	12(40.0) ^a

* There were no significant differences between vitrification and slow freezing ($P < 0.05$).

적 요

토끼 복제동물의 효율적인 생산을 위한 동결방법을 규명하고자 토끼의 정상 및 핵이식배를 이용하여 유리화 동결 및 완만동결법으로 동결·융해 후 체외배양하여 생존율 및 발달률을 조사하였고, 정상 상실배의 동결보존 실험에서 얻은 최적 조건을 핵이식배에 적용하였다. 과배란시킨 토끼의 난관으로부터 채란한 전핵배를 체외배양시킨 정상 상실배와 핵이식 상실배를 동결에 공시하였다. 유리화 동결은 동결보호제로 EFS와 EPG-I을 사용하고 완만동결시는 EPG-II를 사용하였다. 동결·융해 후 5%, 39 °C CO₂ incubator에서 소 난관 상피세포와 공배양하였다. 본 실험의 결과를 요약하면 다음과 같다.

정상 상실배의 발달단계에 따른 동결·융해 후 부화배반포로의 발달률은 48 hrs(60.0%) 배양했던 초기 상실배보다는 62 hrs(82.4%)동안 배양했던 compact 상실배에서 유의적인($P<0.05$) 차이를 보였으며 compact 상실배를 유리화 동결시 EFS(82.4%), EPG-I(85.0%)을 사용했을때와 완만동결시 EPG-II(83.3%)를 사용한 처리군 사이에는 동결·융해 후 부화배반포로의 발달률에 있어서 유의적인($P<0.05$) 차이를 나타내지 않았다. 유리화 동결·융해 후 1, 2단계 희석방법에 따른 부화배반포로의 발달률은 희석단계(1-step:78.0%, 2-step:85.0%)간에는 유의적인($P<0.05$) 차이를 보이지 않았다. 핵이식배의 유리화 동결(43.6%) 및 완만동결(40.0%)간에도 초기 배반포로의 발달률은 유의적인($P<0.05$) 차이를 나타내지 않았다.

이상의 결과로부터 정상수정란뿐만 아니라 핵이식배도 유리화 동결 및 완만동결에 의하여 동결보존이 가능하다고 사료되며, 초기 상실배보다는 초기의 compact 상실배가 높은 발달률을 보였다. 유리화 동결 및 완만동결에 의한 핵이식배는 정상 상실배보다 물리적, 화학적 손상에 더욱 민감하여 생존율 및 발달률에 영향을 받는다고 사료된다. 그리고 복제산자의 효율을 높이기 위해서는 핵이식배를 상실배까지 배양하여 동결보존한 후 난관에 이식하는 방법이 실용성이 높을 것으로 생각된다.

참고문헌

- Collas P and Robl JM. 1990. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. *Biol. Reprod.* 43:877-884.
- 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.
- 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.
- 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.
- Massip A, Van der Zwalm P, Scheffen B and Ectors F. 1986. Pregnancies follow transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-Letters.* 7:270-273.
- McGrath J and Solter D. 1983(a). Nuclear transplantation in mouse embryos by microsurgery and cell fusion. *Science.* 220:1300-1302.
- McWilliams RB, Gibbons WE and Leibo SP. 1995. Osmotic and physiological responses of mouse zygotes and human oocytes to mono- and disaccharides. *Hum. Reprod.* 10 (5):1163-1171.
- Murakami H and Imai H. 1996. Successful implantation of *in vitro* cultured rabbit embryos after transfer : A role for mucin. *Mol. Reprod. Develop.* 43:167-170.
- Pollard JW and Leibo SP. 1994. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology.* 41:101-106.
- Robl J, Prather MR, Barnes FL, Eyestone WH,

- Northey D, Gilligan B and First NL. 1987. Nuclear transplantation in bovine embryos. *J. Anim. Sci.* 64:642-647.
- Smorag Z, Gajda B, Wieczorek and Jura J. 1989. Stage-dependent viability of vitrified rabbit embryos. *Theriogenol.* 31:1227-1231.
- Stice SL and Robl JM. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 39:657-664.
- Tatham BG and Trounson AO. 1996. Effect of activation treatment on the cleavage of nuclear transfer embryos produced after enucleation by centrifugation. *Proc. 13th Int. Cong. Ani. Reprod. Art. Insem.* p21-22.
- Vicente JS and Garcia-Ximenez F. 1994. Osmotic and cryoprotective effects of a mixture of DMSO and ethylene glycol on rabbit morulae. *Theriogenol.* 42:1205-1215.
- Whittingham DG, Leibo SP and Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C. *Science.* 178:411-414.
- 이효종, 최민철, 최상용, 박충생, 윤창현, 강대진. 1993. 반복핵이식에 의한 복제동물 생산에 관한 연구. I. 토끼 수핵난자의 전기자극에 의한 활성화. *한국수정란이식학회지* 8:151-154.

(접수일자 : 1997. 11. 17 / 채택일자 : 1998. 1. 7)