

토끼 전핵배의 동결보존 후 배발달률

강다원 · 조성근 · 한재희* · 광대오** · 이효종*** · 최상용*** · 박충생

경상대학교 축산학과

Post-thaw Development of Rabbits Pronuclear Embryos by Cryopreservation

Kang, D. W., S. K. Cho, J. H. Han*, D. O. Kwack**, H. J. Lee***, S. Y. Choe***,
and C. S. Park

Department of Animal Science, Gyeongsang National University

SUMMARY

This study assessed development *in vitro* of pronuclear(PN) stage embryos cryopreserved by the method of either vitrification or slow freezing, by using of different cryoprotectants, and equilibration and cooling rate, in rabbit.

Ethyleneglycol-ficoll-sucrose(EFS) or ethyleneglycol-polyvinylpyrrolidone-galactose-(EPG-I) for vitrification, and EPG-II for slow freezing as cryoprotectant were used. The pronuclear embryos were exposed to EFS for 0 to 5 min and diluted with D-PBS and /or pre-dilution with 0.5 M sucrose. To examine the viability of frozen-thawed embryos, PN embryos were co-cultured with bovine oviductal epithelial cell(BOEC) for 5 days to hatching blastocyst stage in 39 °C 5% CO₂ incubator. The results obtained were as follows:

The dilution with 0.5 M sucrose and D-PBS after the exposure to EFS for 1.0 min resulted in no significant($P < 0.05$) decrease in the development of PN embryos to hatching blastocyst(72.0%), compared with controls.

The development of PN embryos cryopreserved to hatching blastocyst was not significantly ($P < 0.05$) different between EFS for 1.0 min(72.0%), EPG-I for 1.0 min(72.0%) and EPG-II for 30 min(66.7%).

The post-thaw development of PN embryos to hatching blastocyst was similarly very low as 6.1% and 11.5% in vitrification with EFS and slow freezing with EPG-II, respectively. The incidence of post-thaw zona-crack in PN embryos cryopreserved by slow freezing with plunging to liquid nitrogen at -35°C was significantly($P < 0.05$) higher(25.0%), compared with -85°C (1.9%).

These results indicated that the rabbit PN embryos could be cryopreserved with either vitrification or slow freezing procedure, and frozen PN embryos could be successfully developed *in vitro*

* 경상대학교 생물교육학과(Dept. of Biology Education, Gyeongsang National University)

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

*** 경상대학교 의과대학(Dept. of Physiology, Gyeongsang National University)

to hatching blastocyst, but the post-thaw development of cryopreserved PN embryos was still very low under the present conditions.

(Key words : Pronuclear embryos, Vitrification, Slow freezing, Cryoprotectant)

I. 서 론

Whittingham 등(1972)이 동결보존된 생쥐 수정란을 이식하여 첫 산자를 생산한 이래 동결 및 융해에 관한 연구를 속행하여 동결과정의 간편화와 동결·융해 후 생존율의 향상 등이 이루어져 지금까지 15여종의 포유동물에서 동결 수정란을 이식하여 많은 산자를 얻고 있다. 수정란의 동결보존 기법의 기본 원리는 수정란을 동결보존액에 평형시켜서 액체질소에 침지할 때 세포내의 유리수분의 결빙이 최소화되도록 하여 동결하고, 동결 수정란의 정상적인 기능이 재개되도록 생리적 온도에서 융해하며, 융해 후 회색에 의하여 동결보호제를 제거하는 과정을 거친다. 그 동안 이러한 동결 및 융해조건을 충족시키기 위하여 동결보호제의 성분, 농도, 평형 시간과 온도 및 동결·융해속도 등의 조건을 최적화시키려는 연구를 수행해왔다.

동결에 앞서 고농도의 동결보존액에 지나친 노출은 삼투압과 화학적 독성 등의 영향을 받을 수 있기 때문에 동결보존액의 선택과 최적 평형시간은 선결되어야 하며 수정란의 동결보존은 수정란의 발육단계가 많이 진행된 것일수록 동결·융해 후 높은 생존율을 보고하여 일반적으로 상실배 내지 배반포단계의 수정란에서 동결을 실시하고 있다. 그러나 mouse, human 등은 타 동물과 달리 전핵배를 동결보존하여 높은 생존율 및 발달률을 보였다.

과배란 처리후 여분의 수정란을 동결보존해 둔다면 적기에 수정란 이식의 편리성을 도모할 수 있게 되는데 포유동물의 이식방법으로는 cell-stage에 비추어 볼 때 크게 두가지로 나눌 수 있다. 초기수정란을 이식하는 경우와 배반포 단계까지 체외배양한 후 자궁내 이식하는 경우로 나눌 수 있다. 그러나 토끼의 경우는 다른 종과 달리 체외배양 수정란은 착상에 어려운 점이 있으므로 전핵배에서 동결보존이 가능하다면 이식 후 산자 생산과 그에 따르는 여러가지 수정란의 대사 작용의 정상화가 빠른 시기에 체내에서 행하여지게 될 것이다.

본 연구에서는 토끼에서 전핵배의 동결 및 융해 조건에 따른 동결·융해 후의 생존율 및 발달률을 알아 보고자 하였다.

II. 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 실험동물사육장에서 사육하였으며, 사료와 물은 자유로이 급여하였다. Dark-light 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 chlorpromazine 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 도립현미경하에서 관찰하여 세포질이 투명하고 정상 형태의 전핵 2개가 명확히 보이는 것만을 선택 사용하였다. 이들 전핵배의 일부는 독성검사에 사용하고, 나머지 전핵배는 동결보존 실험에 공시하였다.

3. 수정란의 동결보존 및 융해

1) 동결보존액 및 융해 후 회색액의 제조

동결보존액 중 EFS와 EPG-I 용액을 유리화동결보존액으로 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. 용해 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 µm filter로 여과하여 4℃ 냉장고에 넣어 사용할 때까지 보관하였다.

2) 수정란의 동결 및 용해

유리화동결의 경우는 5~10개의 전핵배를 실온에서 EFS 혹은 EPG-I 용액에 1분간 평형을 실시한 후 0.25 ml plastic straw 내에 주입하여 즉시 -196℃의 액체질소에 침지하였다. 동결수정란의 용해방법은 straw를 액체질소에서 꺼내어 공기중에서 10초간 노출시킨 후 30~37℃의 물에 침지시켜서 흔들면서 용해하였다. 용해된 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. 희석법은 2단계 희석법을 사용하였으며, 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 용해과정을 완료하였다.

완만동결의 경우는 5~10개의 전핵배를 실온에서 EPG-II 용액에 30분간 평형시킨 후 0.25 ml straw에 동결보존액 50 µl와 함께 주입한 후 전기접착기를 이용하여 straw의 양단을 봉합하였다. 동결방법은 세포동결기(Model CL 863, Biogenics Co., U.S.A.)를 이용하였다. 동결속도에 따른 배 발달률을 비교하기

위해서 B 처리구는 -2℃/min 속도로 -7℃까지 냉각한 후, 미리 액체질소에 담가두었던 forcep을 straw내 동결액의 표면에 접촉하여 식빙을 시행한 후, -7℃에서 10분간 정치시켰다. 그 후 -7℃에서부터 -35℃까지는 -0.3℃/min 속도로, -35℃에서 -85℃까지는 -1℃/min 속도로 냉각한 후, -196℃ 액체질소통에 침지 보관하고, A 처리구는 동일한 속도로 -35℃까지 냉각시킨 후 바로 액체질소통으로 침지하였다. 동결 수정란의 용해는 1~10일 후 30~37℃의 온수를 이용하여 급속 용해(>1,000℃/min) 하였다. 용해 후 희석과정은 100 µl의 drop의 0.5 M galactose에 4분간, 0.25 M galactose에 3분간 그리고 D-PBS + 10% FBS에 5분간씩 동결·용해한 수정란을 옮겨 넣어 동결보존액을 희석 세척시켰는데 이 과정에서 증발로 인한 삼투압의 변화를 막아주기 위하여 oil로 drop을 피복하였다.

4. 동결·용해 후 수정란의 배양

동결·용해된 전핵배를 39℃의 5% CO₂ incubator에서 소 난관상피세포로 monolayer를 형성하고 있는 10% FBS가 포함된 TCM-199액으로 체외배양을 실시하였다. 전핵배는 24시간 배양한 후 2-세포기로 발달한 것을 생존한 것으로 간주하였고, 그리고 5일간 배양하여 부화배반포 발달률을 조사하였다.

5. 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 검정하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 전핵배의 평형시간별 발달률 및 형태적 변화

토끼 전핵배의 유리화동결시 동결보호제로 사용할 EFS 용액의 최적 평형시간과 독성 정도를 규명하기 위하여 20℃에서 0(control), 0.5, 1.0, 2.0 및 5.0분간 노출시킨 후 이들을 배양하여 부화배반포로의 발달률을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 즉 0.5, 1.0, 2.0

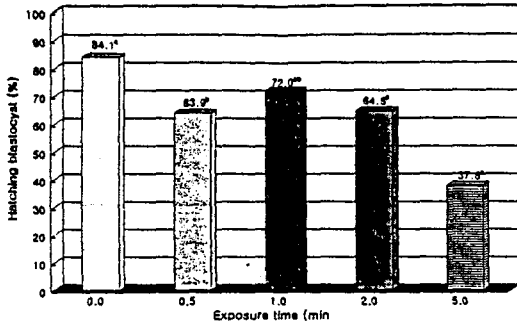


Fig. 1. Development of rabbit pronuclear stage embryos exposed to EFS solution for different periods at 120 h of culture.
^{a,b,c} There was significant ($P < 0.05$) difference between the bars.

및 5.0분간 평형시킨 경우에 각각 63.9%(23/36), 72.0%(18/25), 64.5%(20/31) 및 37.8%(17/45)의 부화배반포 발달률을 보였다. EFS에 전혀 노출시키지 않은 대조군 84.1%(58/69)에 비해 1.0분구에서는 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 여타의 구에서는 유의적($P < 0.05$)으로 감소되었다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 1.0분까지는 전핵배의 자유수 탈수로 수축되는 현상을 보였으나, 2.0분부터는 동결보호제의

침투로 오히려 팽창해 나가는 경향을 보였다.

Chupin(1986)은 고농도의 동결보존액에 지나친 노출은 삼투압과 화학적 독성 등의 영향을 받을 수 있기 때문에 동결보존액의 선택과 최적 평형시간을 선결해야 한다고 하였으며, Szell과 Schelton(1986)도 탈수가 부족하면 세포의 생존성에 치명적인 영향을 미치는 세포내 결빙 형성도를 증가시킨다고 하였다. EFS 용액에서의 최적 평형시간에 관하여 생쥐의 상실배(Kasai 등, 1990 및 Zhu 등, 1993)와 토끼의 상실배(Kasai 등, 1992)에서는 다같이 2분 이내인 것으로 보고하였고, 소의 상실배 및 배반포기배(Mahmoudzadeh 등, 1995)에서 1분 이내인 것으로 보고한 바 있어 본 연구의 결과와 비슷한 경향이였다.

이상의 결과로 보아 토끼 전핵배의 경우 EFS 용액에서의 최적 평형시간은 탈수가 최대로 일어난 1.0분 일 것으로 사료된다.

2. 전핵배의 동결보호제 및 희석법에 따른 발달률

토끼 전핵배의 동결·용해 후 생존율 및 발달률에 동결보호제의 종류와 용해 후 처리하는 희석법이 미치는 영향을 조사한 바 그 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같다.

전핵배를 20℃에서 노출시킨 동결보호제의 종류에 따른 효과 비교 실험에서, 유리화동결에 사용되는

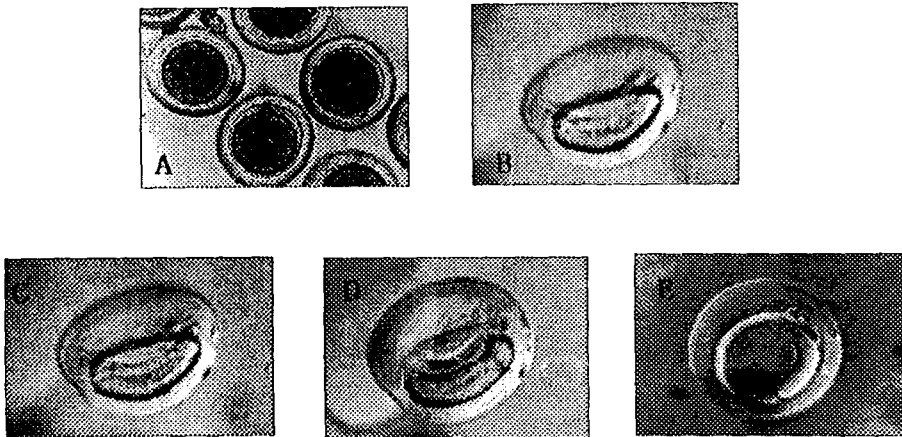


Fig. 2. Morphological change of rabbit pronuclear stage embryos treated EFS solution. Embryos were exposed to isotonic D-PBS(A), and EFS solution for 0.5 min(B), 1.0 min(C), 2.0 min(D) and 5.0 min(E) at 20℃ ($\times 10$).

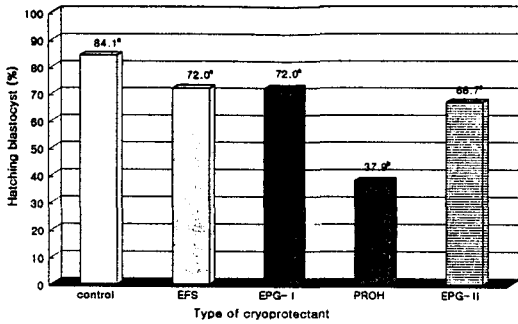


Fig. 3. Development of rabbit pronuclear embryos cryopreserved with various cryoprotectant at 120 h post-thawing.

a,b) There was significant ($P < 0.05$) difference between the bars.

EFS: 40% ethylene glycol + 18% Ficoll + 0.3 M sucrose for 1.0 min.

EPG-I: 8 M ethylene glycol + 7.5% PVP + 0.25 M galactose for 1.0 min.

EPG-II: 1.8 M ethylene glycol + 5.0% PVP + 0.05 M galactose for 30 min.

PROH: 1.5 M PROH for 15 min and 1.5 M PROH + 0.2 M sucrose for 15 min.

EFS 및 EPG-I에 1분간 노출한 경우와 완만동결에 사용되는 EPG-II 및 PROH에 30분간 노출시킨 후, 이 전핵배를 5일 동안 배양하였을 때 부화배반포로의 발달률을 비교한 바, 동결보호제에 노출시키지 않은 대조구(84.1%:58/69), EFS구(72.0%:18/25), EPG-I구(72.0%:18/25) 및 EPG-II구(66.7%:11/29) 간에는 유의적인 차이를 볼 수 없었으나, PROH구(37.9%:18/27)는 유의적($P < 0.05$)으로 낮았다. 다만 본 연구에서 PROH와 EPG-II의 경우는 다같이 30분간 평형시켰으므로 각각의 경우에 대한 최적 평형시간에서 조사한 결과는 아니었기 때문에 발달률이 낮았을 수 있다고 생각된다.

각종 동물의 배발달단계에 따라 적절한 동결보호제와 용해 및 회석법을 연구하여 사용하고 있다. Human과 토끼에서 초기 4세포기 이내의 배 특히 전핵배의 동결에는 동결보호제로 DMSO보다 PROH가 적합하였다고 보고된 바 있다(Siebzehnuebl 등,

1989). 그러나 본 실험에서 PROH가 다른 동결보호제에 비하여 낮은 발달률을 보인 것은 종 특이성이 있을 수 있으며 최적 평형시간을 선정하지 못한 때문일 수도 있을 것이다. 본 연구 결과에서 토끼 전핵배의 유리화 동결에는 EFS나 EPG-I을, 그리고 완만동결에는 EPG-II를 동결보호제로 사용하여도 적절한 평형 시간에서는 독성 피해가 거의 없을 것으로 사료된다.

EFS용액은 독성이 적어서 수정란 평형시 전냉각이 필요하지 않아 용이하게 사용할 수 있다고 하며, Tachikawa 등(1993)은 소 체외수정란의 배반포기 배를 EFS 용액으로 동결보존한 후 용해하여 약 80%의 생존율을 얻었다. Leibo와 Oda(1993)도 8M ethylene glycol + 7.5% polyvinylpyrrolidone(PVP) + 0.25 M galactose로 조성한 동결보호제가 생쥐 전핵배와 수정란에 매우 효과적인 역할을 한다고 보고한 바 있는데 여기서 단당류인 galactose는 등삼압의 sucrose보다 점성이 낮아 다른 동결보호제와의 혼합이 용이하다고 한다(McWilliams 등, 1995). 그리고 비침투성 동결보호제로 사용한 PVP는 유리화 동결 중에 투명대의 파열을 적게해 주는 특성을 가진다고 하였다(Titterington 등, 1995).

토끼의 전핵배를 동결·용해한 뒤 동결보호제를 희석시켜서 배양액으로 보존해야 하므로, 동결보호제에 노출된 전핵배를 희석하는 방법에 따른 배의 발달률을 조사한 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같다. 즉 EFS에 1.0분간 노출시킨 후 전핵배를 0.5 M sucrose 용액에 옮겨 5분간 둔 후 D-PBS로 다시 옮겨 10분간 둔 경우가 D-PBS로 직접 옮겨 10분간 둔 경우보다 희석 후 5일간 배양시 부화배반포로의 발달률이 다소 높은 경향이었으나 양척리구의 배 발달률 간에 유의차는 인정되지 않았다(72.0%:18/25 및 59.1%:13/22).

이러한 결과로 보아 고삼압인 동결보호제에 있던 전핵배를 급속히 등삼압인 D-PBS용액으로 직접 옮겨 주게 되면 위축된 배가 너무 빨리 팽윤되기 때문에 다소 유해한 영향을 줄지도 모르나 이에 대한 확실한 결론을 위하여는 연구를 보완할 필요가 있다고 생각된다. Vajta 등(1995)은 유리화동결·용해 후 소의 체외배반포기를 희석할 때 sucrose와 D-PBS를 함께 처리했을 때보다 D-PBS로 5분간 직접 처리하였을 때가 더 높은 성적을 보여주었다(53%, 71%). 본 연구의 전핵배의 경우와는 배의 발달단계와 mucin coat 유무

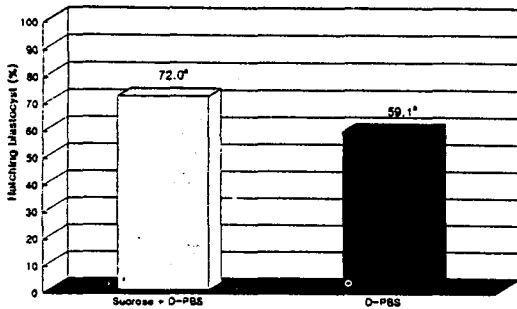


Fig. 4. Development of rabbit pronuclear stage embryos exposed to EFS solution followed by D-PBS dilution with or without prior to sucrose dilution.

There was not significant ($P < 0.05$) difference between the bars with same superscripts.

가 상이한 조건이지만 Vicente와 Garcia-Ximenez(1996)는 토끼 체내 상실배를 EFS로 동결보존한 후 D-PBS에 직접 옮겨 회석한 방법으로도 높은 배 발달률을 얻었으며 184개의 동결·융해한 배를 자궁에 이식하여 73마리의 산자를 생산하였다.

3. 전핵배의 동결·융해 후 발달률

1) 동결방법에 따른 동결·융해 후 배 발달률

전핵배의 동결보존 방법에 따른 동결·융해 후 발달률을 비교한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다.

EFS를 사용한 유리화 동결에서 융해 후 2-step으로 회석한 경우와 EPG-II를 사용한 완만동결에서 2-step으로 회석한 경우를 비교한 것으로서 양군간에 생존율 및 부화배반포의 체외발달률에 있어서 다 같이 유의적인 ($P < 0.05$) 차이가 없었으며, 유리화 동결과

완만동결에서 생존율은 각각 63.3%와 57.7%로 높았으나 대부분 2-cell 이후에 사멸하여, 부화배반포의 발달률은 각각 6.1%와 11.5%로 현저히 낮게 나타났다. Niemann 등(1982)은 초기수정란에서는 할구내의 소포체와 세포소기관의 용적이 크기 때문에 동결·융해시 세포내 빙정 형성이 많아지므로 동결·융해 후 생존율이 저하된다고 하였고, 소 전핵배는 동결 후 배반포로의 발달률이 매우 낮다고 하였으며(Pangestu, 1996), 토끼의 전핵배도 동결·융해 후 배반포까지 발달하기가 어렵다고 보고한 바 있다(Gajda와 Smorag, 1993; Smorag 등, 1989). 그러나 생쥐나 사람의 전핵배는 동결·융해 후 생존율과 발달률이 상당히 높았다고 보고하고 있다(Shaw 등, 1995; Van der Auwera 등, 1990). Leibo 등(1996)은 이와 같은 현상은 특정 발달단계의 배가 특징적으로 동결상해에 대한 감수성이 높은 게 아니라 오히려 동결상해에 대한 감수성이 동물종에 따라 다르기 때문이라고 하였다. Al-Hasani 등(1992)도 토끼 전핵배를 완만동결하여 10%의 배반포를 얻어 본 실험에서의 11.5%와 비슷한 성적이었다. PROH를 동결보호제로 사용한 Van der Auwera 등(1990)은 생쥐의 전핵배를 동결한 경우 급속동결 방법보다는 완만동결법이 초기 배의 생존율을 보다 높일 수 있다고 하였다

2) 동결속도가 전핵배의 투명대 파열에 미치는 영향

토끼 전핵배의 완만동결시 동결속도가 전핵배의 투명대 파열에 미치는 영향을 규명하기 위하여 -35°C 에서 액체질소에 직접 침지하는 경우와 -35°C 에서 $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 로 -85°C 까지 냉각시킨 후 액체질소에 침지하는 방법간에 투명대 파열률을 비교 조사한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 즉 -35°C 에서 액체질소에 침지한 경우는 파열된 전핵배의 비율이 25.0%로서 -85°C 에서 침지한 경우의 1.9%보다 유의적 ($P < 0.$

Table 1. Post-thaw development of rabbit pronuclear stage embryos cryopreserved by vitrification or slow freezing*

Treatment	Replicates	No. of embryos frozen	No(%) of embryos survived	No(%) of hatching blastocyst
Vitrification	10	49	31(63.3) ^a	3(6.1) ^a
Slow freezing	11	52	30(57.7) ^a	6(11.5) ^a

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

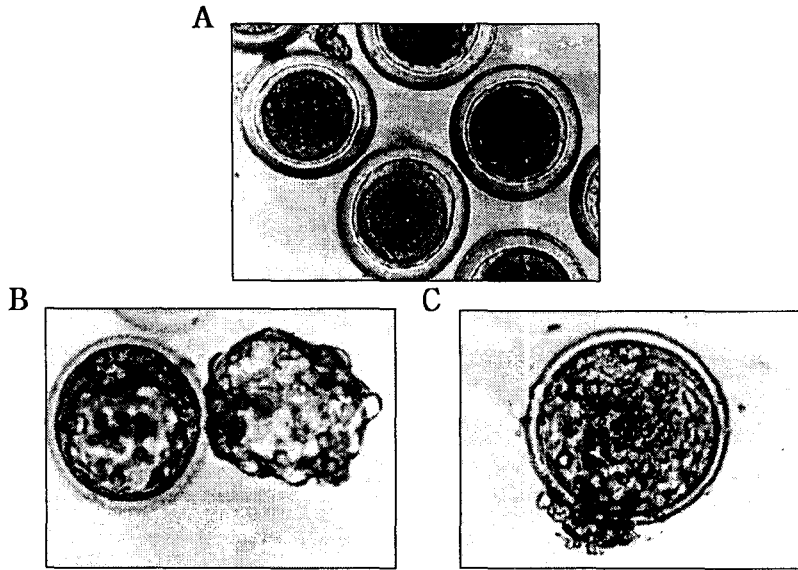


Fig. 5. Rabbit hatching blastocysts developed *in vitro* from pronuclear stage embryos cryopreserved. Pronuclear embryos before freezing(A), hatching blastocyst cryopreserved by vitrification (B) and slow freezing(C) ($\times 10$).

Table 2. Effect of cooling rate on post-thaw survival of rabbit pronuclear stage embryos cryopreserved by slow freezing*

Cooling rate	Replicates	No. of embryos frozen	No.(%) of embryos with zona crack	No.(%) of hatching blastocyst
A	11	52	13(25.0) ^a	6(11.5) ^a
B	11	53	1(1.9) ^b	2(3.8) ^a

A: $-35^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{LN}_2$; B: $-35^{\circ}\text{C} \rightarrow -85^{\circ}\text{C} (-1^{\circ}\text{C}/\text{min}) \rightarrow \text{LN}_2$

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

05)으로 높았다. 그러나 부화배반포 발달률에 있어서는 유의적인 차이를 보이지 않았다($P < 0.05$). 부화배반포로 발달한 전핵배 중에는 투명대의 파열이 일어났던 전핵배도 있었다.

Vitale 등(1997)은 생쥐의 8-16세포기에서 투명대 파열에 대해 알아보려 재동결을 실시하였다. 재동결에 있어서 한번 동결·융해 후 배양한 다음 재동결한 처리구보다 융해 후 배양하지 않고 직접 액체질소로 침지하였을 때가 짧은 시간내에 온도변화로 투명대 파열률이 높았다고 하였다. 소의 경우 투명대의 파열이나 손상이 반드시 발달률을 저하시키는 것은 아니며, 투명대가 compact 상실패 단계 이상의 발달에 있어서

는 꼭 필요한 것은 아니라고 하였다(Hoppe 등, 1983; Farrand 등, 1985). 그러나 투명대는 착상전 수정란을 적합하지 않은 환경으로부터 보호하며 더욱이 동결·융해 후 파열된 투명대는 수정란에 다소 손상을 입은 것으로 해석될 수 있다고 한 바 있다(Farrand 등, 1985). 이러한 사실로 미루어 동결속도에 따른 투명대의 손상도 동물종과 배의 발달단계 등에 따라 다를 것으로 생각된다.

토끼의 수정란에서는 다른 동물과는 달리 특이하게 난관에서 분비되는 당단백질 성분인 mucin coat가 존재한다. Murakami와 Imai(1996)에 의하면 mucin coat는 2-세포기 및 상실패 단계에서 특히 많이 난관

의 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 되므로 산자의 생산에 영향을 미친다고 보고하였다. 그래서 토끼의 경우는 복제산자 생산을 위한 핵이식배나 체외수정란을 자궁내에 이식할 경우 착상율이 매우 낮다. 그리하여 난관이식을 위한 전핵배의 동결에 관한 실험을 하였으나, 전핵배의 동결·융해 후 발달 또한 현재로서는 매우 낮아 실용성이 적은 것으로 사료된다.

IV. 적 요

본 연구는 토끼 전핵배의 효율적인 생산을 위한 동결방법과 조건 등을 찾고자 유리화 동결 및 완만동결법으로 동결·융해 후 체외배양하여 생존율 및 발달률을 조사하였다. 과배란시킨 토끼의 난관으로부터 채란된 전핵배를 동결에 공시하였다. 유리화 동결은 동결보호제로 EFS와 EPG-I을 완만동결시는 EPG-II를 사용하였다. 동결·융해 후 5%, 39 °C CO₂ incubator에서 소 난관상피세포와 공배양하였다. 본 실험의 결과는 다음과 같다.

동결보존을 위하여 동결보호제에 적절한 평형시간과 독성 여부를 판단하기 위하여 전핵배를 EFS 용액에 0 ~ 5분간 평형시킨 후 부화배반포로의 발달률은 1분 군에서 72.0%로 동결보호제에 노출시키지 않은 대조군(84.1%)에 비하여 무해한 결과를 얻었으나, 그 이상에서는 유해한 결과를 보여 주었다. EFS 노출 후 희석제로 sucrose와 D-PBS를, sucrose 사용없이 D-PBS만으로 희석하였을 때 유의적인($P < 0.05$) 차이를 보이지 않았다. 동결보호제에 있어서는 독성검사 및 동결·융해 후 발달률을 보아 EFS, EPG-I, EPG-II는 동결보존에 있어서 동결보호제로서의 가능성을 보여주었으며 서로간의 유의적인($P < 0.05$) 차이는 찾아볼 수 없었다.

유리화동결에 의한 전핵배의 부화배반포로 발달률은 6.1%를 나타내었고, 완만동결에 의한 부화배반포 발달률은 11.5%로서 동결방법간에는 유의적인($P < 0.05$) 차이가 없었다.

완만동결시 동결속도가 전핵배의 투명대 파열에 미

치는 영향을 규명하기 위하여 동결속도 및 침지온도를 달리하여 조사하였을 때 -35°C (25%)보다는 -85°C (1.9%)에서 액체질소에 침지하였을 때가 투명대 파열률에 있어 유의적인($P < 0.05$) 차이를 보였다.

이상의 결과로부터 전핵배는 현 배양상태에서 유리화동결 및 완만동결에 의하여 동결보존이 가능하다고 사료되나 전핵배의 배반포로의 발달률은 다소 저조하였다. 유리화동결 및 완만동결에 의한 전핵배는 후기 단계의 수정란보다 물리적, 화학적 손상에 더욱 민감하여 생존율 및 발달률에 영향을 미친다고 사료된다.

V. 인용문헌

1. Al-Hasani, S., C. Hepnar, K. Diedrich, H. Van der Ven and D. Krebs. 1992. Cryopreservation of rabbit zygotes. Hum. Reprod., (Suppl. 1) 7:81-83.
2. Chupin, D. 1986. Quick freezing of bovine blastocysts. Theriogenology, 26:147(abstr.)
3. Farrand, G.D., R.P. Elsdon and G.E. Seidel. 1985. Effect of slow cooling end point temperature on survival of frozen bovine embryos. J. Anim. Sci., 61:460-465.
4. Gajda, B. and Z. Smorag. 1993. Factors affecting the survival of one- and two-cell rabbit embryos cryopreserved by vitrification. Theriogenology, 39:499-506.
5. Hoppe, R.W. and B.D. Bavister. 1983. Effect of removing the zona pellucida on development of hamster and bovine embryos *in vitro* and *in vivo*. Theriogenology, 19:391-404.
6. Kasai, M., Y. Hamaguchi, S.E. Zhu, T. Sakura and T. Machida. 1992. High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method. Biol. Reprod., 46:1042-1046.
7. Kasai, M., J.H. Komi, A. Takakano, H. Tsydera, T. Sakuai and T. Machida. 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.
8. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani, 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. J. Reprod. Fertil., 59:51-56.
 9. Leibo, S.P., A. Martino, S. Kobayashi and J.W. Pollard. 1996. Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. Anim. Reprod. Sci., 42:45-53.
 10. Leibo, S.P. and K. Oda. 1993. High survival of mouse zygotes and embryos cooled rapidly or slowly in ethylene glycol plus polyvinylpyrrolidone. Cryo-Letters, 14:133-144.
 11. Mahmoudzadeh, A.R., A. Van Soom, P. Bols, M.T. Ysebaert and A. De Kruif. 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. Fertil., 103:33-39.
 12. McWilliams, R.B., W.E. Gibbons and S.P. Leibo. 1995. Osmotic and physiological responses of mouse zygotes and human oocytes to mono- and disaccharides. Hum. Reprod., 10(5):1163-1171.
 13. Murakami, H. and H. Imai. 1996. Successful implantation of *in vitro* cultured rabbit embryos after transfer : A role for mucin. Mol. Reprod. Develop., 43:167-170.
 14. Niemann, H., B. Sacher, E. Schilling and D. Smidt. 1982. Improvement of survival rates of bovine blastocysts with sucrose for glycerol dilution after a fast freezing and method. Theriogenology, 17:102(abstr.).
 15. Pangestu, M. 1996. Alpha tocopherol micro injection protects *in vitro* produced bovine pronuclear stage embryos from chill- and cryo-injury. Congr. 13th Int. Anim. Reprod., (SYDNEY) p.15-17.
 16. Shaw, J.M., C. Ward and A.D. Trounson. 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.
 17. Siebzehruebl, E.R., S. Todorow, J. Van Uem, R. Koch, L. Wildt and N. Lang. 1989b. Cryopreservation of human and rabbit oocytes and one-cell embryos: a comparison of DMSO and propanediol. Hum. Reprod., 4:312-317.
 18. Smorag, Z., B. Gajda, Wieczorek and J. Jura. 1989. Stage-dependent viability of vitrified rabbit embryos. Theriogenology, 31: 1227-1231.
 19. Szell, A. and J.N. Schelton. 1986. Sucrose dilution of glycerol from embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. J. Reprod. Fertil., 76:401-408.
 20. Tachikawa, S., T. Otoi, S. Kondo, T. Machida and M. Kasai. 1993. Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by *in vitro* maturation and fertilization. Mol. Reprod. Dev., 34:266-271.
 21. Titterington, J.L., J. Robinson, S., R. Killick. 1995. Synthetic and biological macromolecules; protection of mouse embryos during cryopreservation by vitrification. Hum. Reprod., 10:649-653.
 22. Vajta, G., P. Holm, T. Greve and H. Callesen. 1995. Direct in straw rehydration after thawing of vitrified *in vitro* produced bovine blastocysts. Vet. Rec., 137:672(abstr.)
 23. Van der Auwera, I., F. Cornillie, R. Ongkwidjojo, R. Pijnenborg and P.R. Koninckx. 1990. Cryopreservation of pronuclear mouse ova: slow versus ultrarapid freezing. Hum. Reprod., 5:619-621.
 24. Vicente, J.S. and F. Garcia-Ximenez. 1996. Direct transfer of vitrified rabbit embryos. Theriogenology, 45:811-815.
 25. Vitale, N.J., M.W. Myers, R.S. Denniston,

- S.P. Leibo and R.A. Godke. 1997. *In-vitro* development of refrozen mouse embryos. Hum. Reprod., 12(2):310-316.
26. Whittingham, D.G. S.P. Leibo and P. Mazur. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . Science, 178:411-414.
27. Zhu, S.E., M. Kasai, H. Otoge, T. Sakurai and T. Machida. 1993. Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solutions. J. Reprod. Fertil., 98:139-145.
(접수일자 : 1999. 2. 10. /채택일자 : 1999. 3. 3.)