

Rat 卵胞卵과 受精卵의 發育段階別 琉璃化 凍結 融解後 生存性(FDA-test)에 미치는 影響

高赫辰·金重桂
濟州大學校 農科大學

Effects of the Oocyte and Developmental Stages of the Rat Embryos after the Vitrified Freezing on the Survival Rate(FDA-test)

H. J. Ko and J. K. Kim

College of Agriculture, Che Ju National University

SUMMARY

This experiment was carried out to investigate the ovarian responses of the ovulation point, ovarian weight and size, the number of ovarian follicles and collected embryos, and to study the effects of the developmental stages (oocytes, 2~4 cell, 8~16 cell and morulae), additional levels of Ficoll (0, 15, 30%) on the survival rate (FDA-test) of rat embryos frozen in vitrification solution (20% glycerol + 10% ethylene glycol + 10% sucrose). Summarized results was as follows:

1. The mean ovulation point per head was 7, and the weight of ovaries was 0.03g.
The size of ovary was 5.9 mm(L) and 4.6 mm(W), and the number of ovarian follicles over and below 2 mm was 4.7 and 8.7, respectively. The number of the collected embryos per head was 5.5 (79%).
2. The FDA score of embryos frozen in 20 G 10 E 10 S without Ficoll was 2.8 (oocyte), 2.6 (2~4 cell), 3.9 (8~16 cell) and 3.6 (morula), respectively. However, there were no significant differences among treatments.
3. The FDA score of embryos frozen in 20 G 10 E 10 S with 15% Ficoll was 3.4 (oocyte), 4.0 (2~4 cell), 4.7 (8~16 cell) and 4.8 (morulae), respectively ($P>0.05$).
4. The FDA score of embryos frozen in 20 G 10 E 10 S with 30 % Ficoll was 3.7 (oocyte), 3.2 (2~4 cell), 4.4 (8~16 cell) and 4.4 (morulae), respectively ($P>0.05$).
5. As shown in the above results, the higher survival rate was obtained in the treatment of 15% Ficoll than that of 30%. And the survival rate (FDA-test) of the oocytes and 2~4 cell stages of the rat embryos was lower than that of 8~16 cell and morulae stages. It was considered that 8~16 cell and morulae could be available for the successful freezing by vitrification of rat embryos with 15% Ficoll except for oocytes.

(Key words: Ficoll, vitrification, ovulation point, oocyte, FDA score)

緒 論

全世界的으로 受精卵의 移植, 凍結 혹은 여기에 관련된 研究가 활발히 進行되고 있는 가운데 우리나라의 受精卵 移植의 實用化를 위한 기술 보급이 아직 미진한 상태에 머물러 있다. 그 원인은 여러가지가 있겠으나 受精卵 凍結, 融解, 移植 후 성적이 低調한데 있어 이 분야와 관련된 學問들이 활발한 研究가 이루어져야 된다고 料想된다.

1972년 Whittingham 등에 의해 생쥐 受精卵을 -196°C 에서 凍結·融解한 후 移植하여 산자를 얻은 획기적인 결과로 현재 많은 研究들이 進行되고 있다. 初期에는 cell freezer에 의한 緩慢凍結方法으로서 DMSO, glycerol과 같은 透過性 내동제에 의한 凍結이 이루어졌으나 많은 시간과 장비 그리고 液體窒素의 소비가 많아 近來에는 受精卵을 container에 직접, 그리고 内部細胞의 水分을 脫水시키는 sucrose를 凍結液이나 稀釋液에 添加하였을 때 간단한 方法으로 凍結할 수 있는 簡易 또는 急速凍結方法이 開發되어 受精卵의 生存率을 向上시켰다 (Kasai 등, 1980; Nguyen 등, 1984; Takeda, Leib-o, 1984; 김 등, 1988). 그러나 急速凍結 또한 凍結과 融解시 細胞內·外部에 生成되는 氷晶 形成 때문에 높은 生存率을 얻지 못하였다.

受精卵의 凍結에 있어 내동제에는 細胞膜을 透過하여 内部細胞를 保護하는 物質과(DMSO, glycerol, ethylene glycol)과, 外部細胞膜을 保護하는 不透過性 物質(sucrose, raffinose, albumin)로 區別할 수 있다(Szell과 Shelton, 1986b). 그러나 現在 많은 내동제중 glycerol를 많이 사용하고 있다. 한편 最近에는 glycerol를 凍結溶液으로 사용할 때 卵子內에 透過되지 않고 外部 細胞膜을 保護하는 sucrose를 添加하여 受精卵의 높은 生存率이 Kasai 등(1980)에 의하여 보고된 후 활발한 研究가 이루어지고 있으며(Miyamoto 등, 1986; William과 Johnson, 1986; Chupin과 Reviers, 1986), 受精卵 發育段階別에 따른 凍結·融解 後 生存率은 다소 다르게 發表되고 있으며, 주로 桑實胚(Morulae stage)가 生存率이 높은 것으로 보고되고 있다 (Renard 등, 1984; Williams와 Johnson, 1986; 김

등, 1988; Miyamoto와 Ishibashi, 1986).

最近 Rall과 Fahy(1985)는 -196°C 에서 氷晶이 形成되지 않는 vitrification方法으로 생쥐 8-cell을 凍結融解한 後 良好한 成績을 보였다고 보고한 바 있으며, 하지만 점성이 높은 溶液(VS1)을 使用하고 있기 때문에 保存前의 平衡과 內동제의 稀釋을 低溫($0\sim 4^{\circ}\text{C}$)下에서 실시해야 하는 短點이 있다. Vitrification은 高濃度의 凍結液이 低溫에서 강한 점성을 띠게 되어 氷晶이 形成되지 않는 종전의 凍結法과는 다른 琉璃化 법으로서 앞으로 이에 대한 檢討가 이루어져야 된다고 사료된다.

本 實驗은 濟州大學校에서 最近 mouse 受精卵의 琉璃化 凍結液으로 가장 適合한 것으로 判定된 Vitrification Solution(20 glycerol + 10 E.G. + Ficoll 30%)으로 다른 家畜(소, 돼지)에 應用하기 위한 試圖로서 rat 受精卵에 Ficoll을 달라하여 卵胞卵을 비롯하여 受精卵 發育段階에 따른 琉璃化 凍結·融解後 生存率(FDA-test)을 檢討하기 위해 實施하였다.

材料 및 方法

1. 供試動物

本 實驗에 사용된 rat은 14/10 light cycle과 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 를 유지하는 實驗動物 사육실내 플라스틱 케이지에서 飼育하였으며, 펠렛사료와 신선한 물을 自由採食시키면서 外形上 건강한 個體를 選拔하여 實驗에 使用하였다.

2. 過排卵 誘起 및 受精卵 回收

過排卵 誘起를 위하여 PMSG 20I.U.를 근육주사 후 56시간째 HCG 20I.U.를 근육주사한 다음 同一系統의 雄性쥐와 1:1로 합사하여 自然交尾를 유도하였으며, 다음날 아침 vaginal smear로 검사하여 交尾가 확인된 個體만을 選拔하여 實驗에 使用하였다.

受精卵은 HCG 주사 後 50~51(2~4 cell), 88~89(8~16 cell), 100~104(morulae)시간째 供試動物을 도살하여 관류액 (flushing media)으로 卵管과 子宮을 관류하여 新鮮한 PBS에서 세번 洗滌하였으며, 현미경하에서 形態적으로 정상인 것만

實驗에 사용하였다.

3. 琉璃化 溶液(vitrification solution)

本 實驗에 사용된 凍結液은 mouse에서 가장 生存 率이 높았던 20 glycerol 10E.G.(20% glycerol + 10% ethylene glycol)로 정하였고 凍結 保存液에 添加한 Ficoll은 高分子 物質(분자량 70,000)로 琉璃化를 促進시키는 非透過性 物質로서 Ficoll의 添加效果를 檢討하기 위하여 각각 다른 濃度로 VS에 稀釋하였으며, vitrification solution의 組成은 다음과 같다.

1) 새 vitrification solution(20G10E)에 대한 Ficoll 첨가 수준

- (1) 20 glycerol 10 E.G. + 10% sucrose + 0% Ficoll + m-PBS
- (2) 20 glycerol 10 E.G. + 10% sucrose + 15% Ficoll + m-PBS
- (3) 20 glycerol 10 E.G. + 10% sucrose + 30% Ficoll + m-PBS

각 용액은 0.2 m membrane filter로 濾過한 후 4℃에서 保管하였다.

4. 초급속 동결과정(vitrification procedure)

Vitrification solution은 1ml주사기가 연결된 0.25ml 플라스틱 straw에 PS(PBS + sucrose), air bubble, PS, air bubble를 注入하여 준비하였다(Fig. 1). 本 實驗에 사용된 受精卵의 發達段階는 2-cell, 8~16cell, morula(상실기)이며 petri dish에 50μl의 VS drop에 부유한 후 air bubble, PS순으로 注入하여 straw powder로 봉입하였다. 室溫에서 10분

동안 平衡 후 즉시 液體窒素 container에 침적하여 7~15일 동안 貯藏하였다.

5. 融解

1~2주동안 液體窒素에 貯藏하였던 straw를 38℃ 恒溫水槽에서 천천히 흔들면서 融解시켰으며, straw 內容物을 watching glass에 부은 후 室溫의 신선한 PS로 옮겼다. 5분후에 受精卵을 PBS로 세 번 洗滌하였으며, 融解된 受精卵의 生存率은 FDA test와 培養으로 判定하였다.

6. 생사판정방법(FDA-test)

5mg FDA/ml acetone의 Stock solution을 1:400,000의 比率로 PBS에 稀釋하였다. 融解된 受精卵을 3~5분동안 FDA 溶液의 drop에서 培養한 후 FDA-free PBS를 이용하여 螢光현미경으로 生死를 判定하였다.

FDA score는 다음과 같은 基準에 의하여 判定하였다.

- P5: 受精卵의 分割球(分割球) 전체가 녹색螢光(螢光)을 강하게 發散하는 것(5점;100%)
- P4: 受精卵의 分割球중 80% 이상 螢光을 띠거나 positive-5보다 전체가 弱하게 螢光을 發散하는 것(4점;80%)
- P3: 受精卵의 分割球중 60% 이상 螢光을 띠는 것, 또는 positive-4보다 弱하게 螢光을 發散하는 것(3점;60%)
- P2: 受精卵의 分割球중 40% 이상 螢光을 띠는 것, 또는 positive-3보다 弱하게 螢光을 發散하는 것(2점;40%)
- P1: 受精卵의 分割球중 20% 이하가 螢光을 띠는 것, 또는 positive-2보다 弱하게 螢光을 發散

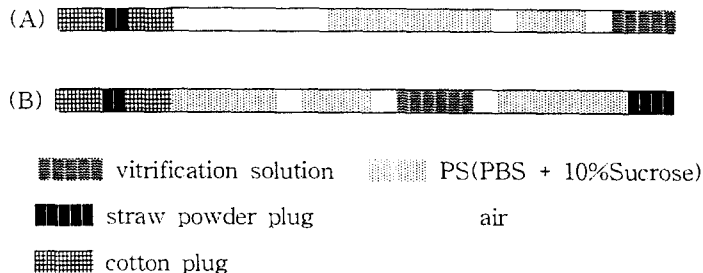


Fig. 1. Configuration of vitrification solution, dilution medium and air in 0.25 ml straw, just before loading embryos(A) and after sealing with straw powder(B).

하는 것(1점;20%)

P0: 螢光을 전혀 發散하지 않는 것(0점:0%, negative) 平均 FDA 成績은 다음 식에 의하여 計算되었다.

$$FDA \text{ 평균 } = [(A \times 5) + (B \times 4) + (C \times 3) + (D \times 2) + (E \times 1)] / N$$

A : No. of P5, B : No. of P4

C : No. of P3, D : No. of P2

E : No. of P1, N : Total of P0-P5

7. 培養

融解한 受精卵을 PBS로 3번 洗滌한 後, 12시간 前培養시킨 Ham's F10培養液(+20% FCS) drop 에 옮긴 후 24, 48시간 동안 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 培養시켰다.

8. 統計分析

統計處理는 分散分析과 t-檢定에 의하였고, 分散分析 후 有意성이 인정된 경우에는 最小유의차(L.S.D)에 의하여 각 처리간의 有意차를 檢定하였다.

結果 및 考察

過排卵 誘起를 위해 호르몬(PMSG, HCG)을 處

理한 후 卵巢의 반응을 조사하기 위하여 50~51 h, 88~89 h, 100~104 h 에 난소를 摘出하여 난소의 배란점, 무게, 난소의 크기, 난포의 수 그리고 난자의 회수율을 조사한 성적은 Table 1 과 같다.

HCG 를 처리한 후 50~51 시간에 屠殺하여 난소의 평균 배란점을 조사한 결과 좌우 각각 4.3 개였고, 무게는 0.03(L), 0.04(R) g 이었다. 왼쪽 난소의 크기는 세로 5.7 mm, 가로 4.8 mm, 오른쪽의 것은 각각 세로 6.0, 가로 4.7 mm 였으며, 왼쪽 난소의 卵胞는 2 mm 이상이 5 개, 2 mm 이하의 것이 6 개였으며 오른쪽의 것은 각각 5.5 개였다. 이러한 개체들의 수정란 採取率은 평균적으로 61(4.3) % 를 보여 주었다. 그리고 HCG 처리 후 88~89 시간 즉, 8~16 cell 단계의 난자를 채취했을 때 난소의 排卵點, 난소무게와 크기는 50~51 시간에 도살한 rat 의 난소 반응과 별 차이가 없었으나 2 mm 이하의 난포수가 좌우 각각 12, 14 개로 증가한 것이 특징적이었으며, 이때의 수정란 채취율은 95 % 로 높았다. 한편 100~104 시간에서도 난소의 반응은 비슷한 반응을 보여 주었으나, 2 mm 이하의 난포수가 좌우 각각 6.9 개로 감소하였으며 수정란 回收率은 평균적으로 4.7 개의 회수율을 보여주었다. 이와 같이 과배란 처리한 rat 의 경우에도 다른 가축에서와 마찬가지로 호르몬 처리에 대한 반응이 개체에 따라 차이를 보이는 경향을 보였다.

Table 1. Number of ovulation point, weight and size of ovary, the number of follicles and embryos recovered in the rats slaughtered after hormone treatment

Slaughtered time	No. of rats	Mean ovulation point	Wt. of ovary(g)	Size of ovary(mm)		No. of follicles		No. of embryos recovered(%)
				Length	Width	>2mm	<2mm	
50~51 ^a (2~4cell)	10	L: 4	0.03	5.7	4.8	5	6	4.3(61)
		R: 3	0.04	6.0	4.7	5	5	
88~89 ^b (8~16cell)	12	L: 5	0.03	5.5	4.2	5	12	7.6(95)
		R: 3	0.04	6.0	4.7	4	14	
100~104 ^c (Morula)	16	L: 3	0.03	6.0	4.6	4	6	4.7(78)
		R: 3	0.03	6.0	4.5	5	9	
Mean		7.0	0.03	5.9	4.6	4.7	8.7	5.5(79)

* After HCG treatment. L: left, R: right.

Table 2. Effects of the developmental stage on the survival rate of rat embryos frozen in VS (20G 10E 10S) without Ficoll

Embryo stage	No. of embryos recovered	No. of survival embryos evaluated by FDA-test (%)						Mean FDA score (%)
		P5	P4	P3	P2	P1	P0	
Oocyte	26	13 (50)	1 (4)	0 (0)	1 (4)	1 (4)	10 (38)	2.8 (56)
2~4cell	14	6 (43)	0 (0)	2 (14)	0 (0)	0 (0)	6 (43)	2.6 (52)
8~16cell	23	12 (52)	4 (17)	3 (13)	2 (9)	0 (0)	2 (9)	3.9 (78)
Morula	20	8 (40)	5 (25)	3 (15)	1 (5)	0 (0)	3 (15)	3.6 (72)

VS(20 G 10 E 10 S): 20 % glycerol + 10 % ethylene glycol + 10 % sucrose Table 2 는 20G 10E 10S 에 Ficoll이 첨가되지 않은 琉璃化 凍結液을 이용하여 受精卵 發育 段階別로 凍結·融解 후 FDA test 에 의한 生存率을 조사한 결과이다. Table 2 에서 보여 주듯이 rat 受精卵의 發育 段階에 따른 凍結·融解 후 生存率은 FDA test에 의한 P5(100 % 생존)의 비율이 8~16 cell 에서 52 %로 다른 發育 段階의 受精卵의 P5 비율(50, 43, 40 %) 보다 높게 나타나고 있으며 평균 FDA score 는 oocytes, 2~4 cell, 8~16 cell 그리고 morula 에서 각각 2.8(56 %), 2.6(51 %), 3.9(78 %), 3.6(72 %)의 성적을 얻었다. 그러나 이들 受精卵의 發育 段階간에는 유의성이 없었다.

김 등(1992)은 20 G 10 E 로 구성된 琉璃化 凍結液을 이용하여 mouse 受精卵의 凍結·融解 후 morula 에서 90 %의 높은 生存率을 얻었다고 보고하였다. Table 3 은 15 % Ficoll 을 첨가한 琉璃化 凍結液에 rat 受精卵의 發育 段階別로 凍結·融解 후 生存率을 나타낸 것으로서 FDA test 에 의한 P5의 비율은 發育 段階別로 각각 55 %(oocyte), 95 %(2~4 cell), 80 %(8-16 cell), 85 %(morulae) 로 나타나고 있으며, P0(죽은 난자)의 비율도 초기배(oocyte, 2~4 cell)에서는 각각 26, 17 % 이었으나 후기배(8~16 cell, morulae)에서는 모두 0 % 였다. 受

精卵의 發育 段階別 凍結·融解 후 평균 FDA score 는 oocyte 가 3.4(68 %), 2~4 cell: 4.0(80 %), 8~16 cell: 4.7(94 %), morulae: 4.8(96%)로서 oocyte가 제일 나았으며, 受精卵의 發育 段階가 진행됨에 따라 morulae에서 더 높은 生存率을 보여주고 있다($p < 0.05$). 그러므로 卵胞卵(oocyte)을 琉璃化 凍結하기 위해서는 耐凍劑를 달리하는 실험이 수행되어야 할 것으로 사료된다.

Renard 등(1984)은 토끼의 2 cell 단계의 卵자를 凍結하였을 때 77~83%의 生存率을 얻었으나, Critser 등(1988)은 mouse 2 cell 을 동결한 후 36.8~63.9%의 낮은 성적을 보고한 바 있다. 강 (1988)은 mouse 初期胚를 凍結시켰을 때 融解 후 生存率은 52.1%였으며, morulae에서는 76.4%, blastocyst 에서는 98.8%의 높은 生存率을 얻었다고 보고하였으며, Smorag 등(1989)은 토끼 受精卵에서 發育 段階에 따른 凍結·融解 후 生存率에서 初期 卵자(1, 2 cell)보다 後期 發育 段階(8, 16 cell)의 난자에서 높은 생존율을 얻었다고 보고함으로써 본 실험의 결과와 유사한 경향을 보여주고 있다.

Mauzur 등(1970)은 DMSO 나 glycerol 과 같은 동결시 세포의 内部를 보호하는 耐凍劑의 첨가는 생존율을 어느 정도 높일 수 있으나 急速凍結시 세포내 빙정형성은 여전히 존재하여 난자의 생존율에 효과적이지는 못하였다고 하였다. 또한 Ishimori 등

Table 3. Effects of the developmental stage on the survival rate of rat embryos frozen in VS(20 G 10 E) with Ficoll 15%

Embryo stage	No. of embryos recovered	No. of survival embryos evaluated by FDA-test(%)						Meanl FDA score (%)
		P5	P4	P3	P2	P1	P0	
Oocyte	27	15 (55)	3 (11)	1 (4)	0 (0)	1 (4)	7 (26)	3.4 ^a (68)
2~4cell	12	9 (75)	1 (8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (17)	4.0 ^a (80)
8~16cell	35	28 (80)	5 (14)	2 (6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4.7 ^b (94)
Morula	13	11 (85)	2 (15)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4.8 ^b (96)

Values with different superscripts are significantly differnt(a-b: p<0.002)

Table 4. Effects of the developmental stage on the survival rate of rat embryos froze in VS(20 G 10 E) with Ficoll 30%

Embryo stage	No. of embryos recovered	No. of survival embryos evaluated by FDA-test(%)						Meanl FDA score (%)
		P5	P4	P3	P2	P1	P0	
Oocyte	34	21 (62)	2 (6)	0 (0)	6 (17)	0 (0)	5 (15)	3.7 ^a (74)
2~4cell	13	6 (46)	1 (8)	1 (8)	1 (8)	2 (15)	2 (15)	3.2 ^a (64)
8~16cell	18	12 (67)	3 (17)	2 (11)	1 (6)	0 (0)	0 (0)	4.4 ^b (88)
Morula	29	23 (79)	1 (3)	1 (3)	3 (10)	0 (0)	1 (3)	4.4 ^b (88)

Values with different superscripts are significantly differnt(a-b: p<0.05)

(1993)은 透過性 耐凍劑(25 % v/v ethylene glycol + 25 % v/v dimethyl sulphoxide)로 이루어진 동결액을 사용하여 소 수정란의 동결·융해 후 85 % 의 생존율을 보고함으로써, 外部 세포를 보호하는 非浸透性 耐凍劑를 첨가할 경우 대가축에서도 효과적인 琉璃化 凍結이 가능할 것으로 사료된다.

Table 4 는 30 %의 Ficoll 를 첨가한 琉璃化 凍

結液에서 發育段階別로 受精卵을 凍結·融解한 후 生存率을 조사한 것이다.

수정란의 발육 단계별 FDA test 에 의한 P5의 비율은 각각 62 %(oocytes), 46 %(2~4 cell), 67 %(8~16 cell), 79 %(morulae) 순으로 나타나고 있으며, 대체적으로 모든 발육단계에서 P4~P0 로 판정된 난자들이 조금씩 나타나고 있다. 각 발육단계

별로 평균 FDA score 는 각각 oocyte: 3.7(74%), 2-4 cell: 3.2(64%), 8~16 cell: 4.4(88%), morulae: 4.4(88%) 를 보여주고 있으며, 8~16 cell 과 morulae에서 유의성(p<0.05)있게 높은 성적을 얻었다.

1989년 Nakagata 는 Rall과 Fahy의 VS 1 에 mouse oocyte 를 동결하여 81.6%의 높은 생존율을 보고하였으며, Kasai 등(1990)은 ethylene glycol, Ficoll, sucrose로 조성된 琉璃化凍結液에 mouse morulae를 동결시켰을 때 97%의 높은 생존율을 보고하였다. Miyake 등(1993)은 Kasai (1990)의 琉璃化凍結液(GFS)에 mouse oocyte 를 동결·용해 후 36~39%의 생존율을, morulae에서는 90~95%의 생존율을 얻었다고 보고하였으며 卵子の發育段階가 進行됨에 따라凍結·融解 후生存率이增加하는 경향이 있었다고 보고하여 본 실험의 성적과 유사한 경향을 보이는 것으로 사료된다. 琉璃化 동결액에 Ficoll 의 첨가 효과를 알아보기 위한 수정란의發育段階別 동결에서 Ficoll 의 첨가 수준(0.15, 30%)에 따른 oocytes 의 동결·용해 후 평균 FDA score 는 각각 2.8(56%), 3.4(68%), 3.7(74%) 로서 30%의 Ficoll 에서 가장 양호한 생존율을 보여주고 있다.

Rat oocyte 의 동결·용해 후 보다 높은 생존율을 얻기 위해서는 琉璃化 용액을 이용한 다양한 연구 즉, 卵丘細胞의 부착 여부, 發育段階別 비교 실험이 앞으로 실시되어야 할 것으로 사료되며, oocyte 의 동결에 효과적인 琉璃化 동결액의 조성과 이밖에 平衡時間, 融解時間, 溫度 등에 대한 더 많은 연구가 시행되어야 할 것으로 사료된다.

2~4 cell 단계의 동결·용해 후 Ficoll 첨가 수준(0.15, 30%)에 따른 FDA score 는 2.6(52%), 4.0(80%), 3.2(64%) 로 15% Ficoll 을 첨가한 琉璃化 동결액에서 가장 좋은 생존율을 보이고 있으며, 8~16 cell 의 동결·용해 후 평균 FDA score는 Ficoll 의 첨가 수준에 따라 3.9(78%), 4.7(94%), 4.4(88%)이고, morula 의 평균 FDA score 는 Ficoll 의 첨가 수준(0, 15, 30%)별로 3.6(71%), 4.8(96%), 4.4(88%) 로서 8~16 cell 과 morula 단계의 동결에서 15%의 Ficoll 첨가구에서 가장 좋은 생존율을 보여주었다.

그러므로 15%의 Ficoll 을 첨가한 琉璃化 동결액을 이용한 rat 수정란의 동결에서 8~16 cell과 morula 를 선택하는 것이 높은 생존율을 얻는데 효과적이라고 사료된다.

摘 要

本實驗은 過排卵 處理後 卵巢反應을 관찰하기 위하여 排卵點, 卵巢무게, 크기, 卵胞의 數 그리고 수정란의 回收率 등을 조사하였으며, 發育段階(oocyte, 2~4 cell, 8~16 cell, morulae)와 Ficoll 添加水準이 20 glycerol 10 EG 10 sucrose 액으로 琉璃化凍結法에 의해 동결된 rat 수정란의 生存率에 미치는 영향을 조사하였다.

본 실험에서 얻어진 결과는 요약하면 다음과 같다.

1. 過排卵 處理에 의한 rat 난소 호르몬 반응에 있어서 排卵點은 마리당 평균 7 개, 난소의 무게는 0.03 g(좌+우), 난소의 크기는 길이가 5.9 mm, 폭이 4.6 mm 이었다. 난포의 수는 2 mm 이상이 4.7 개, 2 mm 이하가 8.7 개였다. 그리고 마리당 수정란의 평균 回收率은 5.5(79%) 개였다.
2. Ficoll 을 첨가하지 않은 琉璃化 동결액(GES)에 동결·용해 된 수정란의 發育段階別 FDA score는 oocyte 와 2~4 cell 이 각각 2.8(56%)과 2.6(52%)을 나타내었고, 8~16 cell과 morulae가 각각 3.9(78%)와 3.6(72%)을 나타내어 8~16 cell이 가장 양호한 생존율을 보여 주었다(P>0.05)
3. 15%의 Ficoll을 첨가한 琉璃化 동결액에서 동결·용해된 난자의 發育段階別 FDA score는 oocytes와 2~4 cell, 8~16 cell 과 morulae가 각각 3.4(60%)와 4.0(80%), 4.7(94%)과 4.8(96%)을 나타내었으며 發育段階가 進行됨에 따라 8~16 cell과 morulae에서 유의성 있게 높은 生存率을 보여 주었다(P<0.05).
4. 30%의 Ficoll을 첨가한 琉璃化 동결액에 수정란의 發育段階別 FDA score는 oocyte와 2~4 cell, 8~16 cell과 morulae에서 각각 3.7(77%)과 3.2(64%), 4.4(88%)와 4.4(88%)를 나

타내어 8~16 cell과 morulae에서 높은 생존율을 보여 주었다.

5. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 琉璃化 동결액을 이용한 rat 수정란의 동결에서 15 %의 Ficoll이 30 %보다 양호한 생존율을 보여 주었으며, 發育 段階別로는 oocyte와 2~4 cell이 morulae보다 생존율이 떨어졌다.

參考文獻

- Bank H and Maurer RR. 1974. Survival of frozen rabbit embryos. Exptl. C. Res., 89.
- Chupin D and De Reviers MM. 1986. Quick freezing of rat embryos. Theriogenology, 26: 157-166.
- Critser JK, Arneson BW, Asker DV, Huse-Benda AR and Ball GD. 1988. Factors affecting the cryosurvival of mouse two-cell embryos. J. reprod. Fert., 82:27-33.
- Heraandez-Ledexma JJ and Wright Wright Jr, RW. 1989. Deep. freezing of mouse one cell embryos and oocytes using different cryoprotectants. Theriogenology, 32:735-743.
- Ishimori H, Saeki K, Inai M, Nagao Y, Itasaka J, Miki Y, Selie N and Kainuma H. 1993. Vitrification of bovine embryos in a mixture of ethylene glycol and dimethylene sulfoxide. Theriogenology, 40:427-433.
- Kasai M, Niwa K and Iritani A. 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. J. Reprod. Fert., 59:51-58.
- Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera 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.
- Lee BK, Kim SK and Lee KS. 1992. Studies on the survival rates after slow and ultrarapid frozen-thawed of porcine embryos. Korean J. Anim. Reprod., 16(2):117-123.
- Leibo SP, Mazur P and Jackowski SC. 1974. Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. Exptl. Cell. Res., 89:79-88.
- Leibo SP and Mazur P. 1978. Preservation of mammalian embryos by freezing. Academic Press, New York:179-197.
- Linda R Mohr and Trounson AO. 1980. The use of fluorescein diacetate to assess embryos viability in the mouse. J. Reprod. Fert., 58:189-196.
- Mahmoudzadeh AR, Van Soon V, Van Vlaenderen I and De Kruif A. 1993. A comparative study of the effect of one-step addition of different vitrification solutions on *in vitro* survival of vitrified bovine embryos. Theriogenology, 39:1291-1302.
- Miyake T, Kasai M, Zhu SE, Sakurai T and Machida T. 1993. Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycol-based solution by a simple method. Theriogenology, 40:121-134.
- Miyamoto HY and Ishibahi T. 1985. The importance of equilibration time to glycerol prior to freezing in the cryopreservation of mouse embryos. J. Zootech. Sci., 7(3):250-256.
- Miyamoto HY and Ishibahi T. 1986. Liquid nitrogen vapour freezing of mouse embryos. J. Reprod. Fert., 78:471-478.
- Nakagata N. 1989. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. J. Reprod. Fert., 87:479-483.
- Niemann H. 1991. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: Current status and reserch needs. Theriogenology, 35:N01.
- Rall WF and Polge C. 1984. Effects of warming rate on mouse embryos frozen the thawed in glycerol. J. reprod. Fert., 70:285-292.
- Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by

- vitrification. *Nature*, 313:573-575.
- Renard JP, Nauyent BX and Garnier V. 1984. Two-step of freezing of 2-cell rabbit embryos after dehydration at room temperature. *J. reprod. Fert.*, 71:573-589.
- Shaw JM, Kola I, Macfarlane DR and Trounson AO. 1991. An association between chromosomal abnormalities in rapidly frozen 2-cell mouse embryos and the ice-forming properties of the cryoprotective solution. *J. Reprod. Fert.*, 91:9-18.
- Smorag Z, Gajda B, Wieczorek B and Jura J. 1989. Stage-dependent vivability of vitrified rabbit embryos. *Theriogenology*, 31:6.
- Szell A and Shilton JN. 1986b. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 78:699-703.
- Tada N, Sato M, Amann E and Ogawa S. 1993. A simple and rapid method for cryopreservation of mouse 2-cell embryos by vitrification: Beneficial effects of sucrose and raffinose on their cryosurvival rate. *Theriogenology*, 40:333-344.
- Trounson A, Peura A and Kirby C. 1987. Ultrarapid freezing : a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Ferti. Sterti.*, 48:843-850.
- Whittingham DG, Leibo SP and Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -296°C . *Science*, 178:411-414.
- Williams TJ and Johnson SE. 1985. Quick-freezing of day four mouse embryos. *Theriogenology*, 23:235.
- Wood M and Farrant J. 1980. Preservation of mouse embryos by two-step freezing. *Cryobiology*, 17:178-180.
- 角田幸信, 相馬正, 1978. 가토 수정란의 장기보존. *일본가축번식지* 24(4):157-160.
- 강만중, 김영훈, 문성호, 김중계, 1988. Mouse 수정란의 급속 동결에 관한 연구 I. 급속 동결에 있어서 glycerol과 sucrose, raffinose의 첨가 농도 결정. *한국가축번식학회. 학술발표 논문 초록* p.17.
- 강만중, 김영훈, 문성호, 김중계, 1989. Mouse 수정란의 급속 동결에 관한 연구 II. mouse 수정란 급속동결에 있어서 수정란의 발육단계와 식빙 (seeding)이 생존율에 미치는 영향. *한국가축번식학회지*, 13(3):141-148.
- 강만중, 이철상, 한용만, 유대열, 이경광. 1990. 생쥐 2-세포기 수정란의 초급속 동결. *한국번식학회지*, 14(1):9-16.
- 김정익, 양부근, 남상현, 고광두, 1983. 가토의 수정란이식에 관한 연구. II. 동결용해난자의 발육단계별 생존성에 관한 연구. *한국가축번식학회지*, 7(1):19-23.
- 김중계, 임경순, 신원집, 1990. 가축번식학, 한국방송통신대학, 1992, pp. 142-163, 307-322.
- 김중계, 이규훈, 강만중, 김영훈, 오운용, 강민수. 1988b. 육우수정란 간이동결 및 용해방법에 관한 연구. 제5보. Glycerol 내동제에 sucrose 첨가여부가 FDA test에 의한 mouse 수정란의 생존율에 미치는 영향. *한국번식학회지*, 12:70-76.
- 김중계, 강민수, 장덕지, 고경래, 양병철, 1992 a. 급속동결에있어서 vitrification solution 개발과 FDA 생사판정이 수정란의 배양과 발육에 미치는 영향. I. Vitrification solution 내의 내동제 조합이 급속동결시 용해 후 mouse morulae의 생존율에 미치는 영향. *한국가축번식학회지*, 16(4):317-323.
- 김중계, 강민수, 장덕지, 고경래, 양병철, 1992 b. 급속동결에있어서 vitrification solution 개발과 FDA 생사판정이 수정란의 배양과 발육에 미치는 영향. II. Vitrification solution 내의 비투과성 물질(ficoll, sucrose)과 평형시간이 급속동결시 용해 후 mouse morulae의 생존율에 미치는 영향. *한국가축번식학회지*, 16(4):317-323.
- 김희석, 양보석, 오성종, 이금상, 1990. Vitrification에 의한 동결보존이 토끼 수정란의 생존성에 미치는 영향. *한국가축번식학회지*, 14(1):43-49.

박항균, 김영직, 가축 번식학, 향문사, 1989. pp. 88-106.
석호봉, 1989. 가축 수정란 동결보존의 최근 이용방법. 한국가축수정란이식학회지. 제 4권, 1-13.
이은봉, 공일근, 강대진, 박충생, 1992. Vitrification 방법에 의한 생쥐의 정상배 및 분할배의 생

존성에 관한 연구. 한축지, 34(2):69-75.
이현정, 1992. 2 단계 동결과 초자화 동결이 토끼 상
실배와 절단배의 생존과 수태에 미치는 영향에
관한 연구. 서울대학원 농학석사학위논문.
이효종, 1987. 수정란의 대사. 한국수정란이식학회
지 제 2 권, 9-21.