

碩士學位論文

Mouse 受精卵의 急速凍結에서 諸要因이  
生存率에 미치는 影響

濟州大學校 大學院

畜 產 學 科



1988年 12月

---

EFFECTS OF VARIOUS FACTORS ON SURVIVAL  
RATE OF MOUSE EMBRYOS DURING  
RAPID FREEZING

Man-Jong, Kang

(Supervised by Professor Jung-Kye, Kim)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF AGRICULTURE

DEPARTMENT OF ANIMAL SCIENCE

GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1988. 12.

# Mouse 受精卵의 急速凍結에서 諸要因이 生存率에 미치는 影響

指導教授 金 重 桂

姜 萬 鍾

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함.

1988年 12月 日

姜萬鍾의 農學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 鄭 昌 朝

委 員 康 珉 杏

委 員 金 重 桂



濟州大學校 大學院

1988年 12月 日

# 目 次

Summary .....	1
I. 緒 論 .....	3
II. 研究史 .....	5
1. 耐凍劑 .....	5
2. 凍結方法 .....	7
3. 植氷 (Seeding) .....	8
4. 受精卵의 發育段階 .....	9
III. 材料 및 方法 .....	11
1. 試驗期間 및 場所 .....	11
2. 供試動物 및 飼養管理 .....	11
3. 試驗方法 .....	11
4. 統計處理 .....	16
IV. 結果 및 考察 .....	17
1. 受精卵 急速 凍結時 耐凍劑 濃度가 受精卵 生存에 미치는 影響 .....	17
2. 凍結方法이 受精卵 生存에 미치는 影響 .....	23
3. 急速 凍結에서 受精卵의 發育段階가 生存에 미치는 影響 .....	26
4. 耐凍劑 添加 및 除去時 受精卵의 收縮과 膨脹 .....	28
V. 摘 要 .....	33
參考文獻 .....	35
謝 辭 .....	42

---

## SUMMARY

Studies were conducted to seek reasonable methods of rapid freezing of mouse embryos using liquid nitrogen. The effects of cryoprotectant concentration in both freezing and dilution mediums, seeding methods and optimum time for freezing embryos according to the developmental stages on the survival rate of the embryos were also noted. The effects of the substitution of raffinose to sucrose in freezing and dilution medium were also evaluated on embryo survival. The summarized results are as follows :

1. When 0.3M of sucrose was added into the freezing and dilution medium, FDA scores of embryos were 1.48(1.5M), 3.81(3.0M) and 4.10(4.5M). Higher FDA scores of embryos were obtained in 3.0M and 4.5M glycerol concentrations ( $P < 0.05$ ).
2. With the addition of 0.3M raffinose to the freezing and dilution medium, FDA scores of embryos did not significantly differ between glycerol levels; 3.97(1.5M), 4.11(3.0M) and 3.54(4.5M). Higher scores of embryos existed in 3.0M glycerol concentration.
3. Reverse treatment - raffinose to freezing medium and sucrose to dilution medium showed FDA scores of 3.56(1.5M), 4.28(3.0M) and 3.82(4.5M). However, reverse treatment did not change FDA scores of embryos; 2.93(1.5M), 4.11(3.0M) and 4.28 in 4.5M glycerol concentrations.
4. Concentration of sucrose or raffinose in freezing and dilution medium affected FDA scores of embryos. When sucrose concentrations of 0.3, 0.5 and 1.0M were added to the freezing medium, FDA scores of embryos were 3.12, 2.38 and 0, respectively. However, when the same concentrations of raffinose

- were added to freezing medium, the FDA scores were 4.21, 2.91 and 0. In both cases, better FDA scores of embryos were attained in 0.3M of sucrose or raffinose ( $P < 0.01$ ).
5. In the slow freezing of embryos, there were significant differences ( $P < 0.05$ ) in FDA scores of embryos between the sucrose (3.97) and raffinose (2.41) added mediums. However, seeding or non-seeding during freezing did not affect FDA scores of embryos.
  6. In the rapid freezing of embryos, the sucrose added medium together with Co-seeding or non-seeding showed the FDA scores of 4.67 and 4.20, respectively; but, raffinose additions obtained FDA scores of 4.27 and 3.97.
  7. The developmental stage of embryos at freezing was most critical on the survival of embryos after thawing. Higher FDA scores were obtained in the order of blastocyst stage (4.94), morula stage (3.82) and early stage (2.65) in sucrose added medium. The same trend was observed in the raffinose added medium with an order of 4.91, 4.47 and 2.32.
  8. Microscopic study of embryo before freezing and post-thawing indicated that the embryo showed shrinkage within 5 minutes after the embryo was transfer to the freezing medium. When thawed embryo was transferred to the dilution medium, swelling of the embryo was observed and there after it reshrank indicating the removal of cryoprotectant from the embryo. The size of the embryo recovered to the original state when it was moved into a PBS-solution.

## I. 緒 論

哺乳動物의 受精卵 移植은 1890年 Heape에 의하여 家兔에서 成功한 後 別 關心을 끌지 못하였으나 1950年代에 이르러 受精卵 移植은 牛, 綿羊, 山羊, 豚 등에서 폭넓게 實施되어 오고 있다.

牛 受精卵移植은 1970年代 後半부터 美國과 유럽에서 이미 産業化되어 家畜改良과 增殖에 寄與하고 있으며 受精卵의 性鑑別, 分割, 核移植 및 凍結 등 多方面으로 그 技術은 發展되고 있다. 우리나라의 受精卵 移植에 관한 研究는 1970년대부터 시작되어 mouse, rabbit에 대한 初步的인 實驗이 試圖되었고, 1980年代에 이르러 大家畜에 대한 本格的인 研究가 進行되어 다수의 研究 結果가 報告되고 있다. 그러나 効率的인 家畜 受精卵移植 事業의 定着을 위해서는 採卵率, 凍結後 生存率, 妊娠率의 向上과 受精卵 移植 技術의 改善 등 解決하여야 할 問題點이 있으며 이들 중 凍結後 受胎率을 높이는 것이 最優先 課題이다.

受精卵은 他 細胞보다 크며 特殊한 膜構造인 透明帶을 가지고 있어 凍結方法은 複雜하고 特殊한 施設이 必要하게 된다. 受精卵 凍結의 初期方法은 主로 緩慢凍結에 의하여 遂行되었으며, 最近에는 低溫 生物學의 發達에 따라 凍結前 受精卵으로 부터 脫水를 시킴으로서 凍結時 害를 적게하고, 迅速히 동결 할 수 있는 急速凍結에 대한 研究가 進行되고 있으나 아직까지 効率的인 凍結方法은 提示되지 못하고 있는 實情이다.

外國의 受精卵 凍結에 대한 研究는 凍結速度 및 方法, 耐凍劑의 種類와 濃度, 受精卵의 發育段階別 凍結 影響, 植氷方法 등에 대하여 다수의 研究가 報告되고 있다 (Whittingham et al, 1972; Mazur, 1977; Leibo, 1983; Bouyssou과 Chupin, 1982; Hsu et al, 1986; Széll과 Shelton, 1986 ab, 1987). 그러나 現在 우리나라의 境遇 初步的인 段階에 머물러 있으며, 凍結速度, 耐凍劑의 種類와 濃度 등에 대하여 몇편의 研究結果가 報告되고 있을 뿐이다 (柳와 李, 1984; 曹, 1987; 崔 등, 1987; 尹 등, 1987; 金 등, 1988). 한편, 外部細胞膜을 保護하는 耐凍劑로 sucrose 이외의 他 耐凍劑에 관해

서는 細部的인 研究가 進行되고 있지 않으며, 急速凍結時 凍結液에 添加하는 耐凍劑 濃度의 決定과 植氷與否에 대하여 明確하게 定立되지 못하고 있다.

本 研究는 mouse 受精卵의 急速凍結에 있어 耐凍劑 濃度와 植氷與否가 受精卵의 生存率에 미치는 影響을 糾明하고, 耐凍劑로서 sucrose의 代用으로 raffinose의 利用 可能性을 檢討하며, 凍結前後 受精卵의 脫水에 미치는 耐凍劑의 影響을 調査하여 受精卵 急速凍結의 效率的인 方法을 提示하는데 그 目的이 있다.



## II. 研究 史

受精卵의 凍結은 Whittingham(1972)에 의하여 最初로 mouse 受精卵을 凍結保存한 다음 移植하여 65%의 受胎率을 報告하였다. 그 後, 現在에 이르기까지 受精卵 凍結은 耐凍劑를 使用하여 凍結時 細胞內 自由水의 脫水에 依한 氷形成을 減少시키는 理論을 基礎로 많은 研究가 實施되어 왔고 (Whittingham, 1972; Willmut, 1972; Leibo와 Mazur, 1978; Mazur, 1977; Kasai et al, 1980), 最近에는 分割卵의 凍結保存 등이 試圖되고 있다 (長嶋 등 1982; 黃 등, 1986).

### 1. 耐 凍 劑

凍結液에 添加하는 耐凍劑에는 內部細胞를 保護하는 透過性 溶質과 外部細胞膜을 保護하는 不透過性 溶質로 區別할 수 있다.

內部細胞를 保護하는 耐凍劑는 주로 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 利用하여 왔으나 (Willmut, 1972; Leibo et al, 1974; Whittingham et al, 1975, 1979; Kasai et al, 1980), 1976年 Bilton과 Moore에 의해 山羊 受精卵凍結에서 glycerol의 耐凍效果가 確認된 바 있다. 그 後 牛受精卵 凍結에 있어서도 glycerol이 DMSO보다 優秀한 生存率을 보여 glycerol은 受精卵 凍結에서 重要한 耐凍劑로 알려지게 되었다. Glycerol과 DMSO의 效果에 대해서는 相反된 報告가 있으며, Schmidt et al(1985), 浦野 등 (1986)은 mouse 受精卵에서, 金 (1987)은 家兔 受精卵에서 glycerol이 DMSO보다 높은 生存率을 얻었다고 하였으나, Kasai et al(1982), 陳 등 (1986)은 glycerol과 DMSO 間에 差異가 없다고 報告하였다. 그러나 Miyamoto와 Ishibashi(1978), Leibo와 Mazur(1978), 南直 등 (1984)은 mouse 受精卵 凍結에 있어서 glycerol보다는 DMSO에서 受精卵 生存率이 높다고 報告하였다. 이 밖에 內部細胞를 保護하는 耐凍劑로서 ethylen glycol(Miyamoto와 Ishibashi, 1977, 1978; Miyamoto et al, 1986; 浦野 등, 1986), propanediol(Renard et al, 1981, 1984), erythritol(Miyamoto

et al, 1986; 浦野 등, 1986) 등에 대하여 實驗되었으나 受精卵 凍結에 있어서 耐凍劑로는 glycerol을 많이 利用하고 있는 實情이다(Kasai et al, 1982; Merry et al, 1983; Miyamoto et al, 1983, 1986).

外部細胞膜을 保護하는 耐凍劑인 sucrose는 kasai et al(1980)에 의해 처음으로 使用되어 높은 生存率을 얻었고, Renard et al(1984), Williams와 Johnson(1985), Chupin과 Reviere(1986) 등에 의하여 sucrose의 濃度, 添加 時期에 대한 계속적인 研究가 이루어지고 있다. 그 밖에 protein, lipoprotein, raffinose, serum 등이 使用되고 있으나 具體적인 影響에 대해서는 報告되어 있지 않다. Sucrose의 機能에 대하여 Wood와 Farrant(1980), Leibo(1984) 등은 凍結液에 sucrose를 添加했을 때는 凍結前 細胞内の 自由水를 脫水시켜 急速凍結을 可能케 하며 外部細胞膜을 保護한다고 하였다. 凍結 以前에 sucrose를 添加한 境遇에 있어서 Miyamoto et al(1986)은 mouse 受精卵에서 72%의 生存率을, Chupin과 Reviere(1986)도 rat 受精卵에서 87~96%의 높은 生存率을 얻을수 있었다고 發表하였다. 한편, 融解後 耐凍劑 除去液에 sucrose를 添加하는 境遇에는 Kasai et al(1980)이 mouse 受精卵에서 82~89%의 生存率을 報告하였으며, Williams와 Johnson(1986)은 67%의 生存率을, Miyamoto et al(1986)은 74%의 生存率을 報告하였다. 또한, 耐凍劑 除去에 sucrose를 利用하면 滲透壓의 差異에 의해 受精卵内の glycerol를 瞬間적으로 外部變化없이 除去시킬 수 있어 直接 one-step 除去가 가능한 것으로 알려졌다(Leibo, 1983, 1984; Renard et al, 1983; Merry et al, 1983). Kasai et al(1980), Leibo(1983), 鈴木(1983) 등은 凍結前後 凍結液과 除去液에 sucrose를 添加, one-step straw를 製造하였으며, 이 方法은 이미 實用化 段階에 이르러 있다. Williams와 Johnson(1986)은 one-step straw를 利用하여 mouse 受精卵에서 86%의 生存率을, Széll과 Shelton(1986 a, b)도 80~92%의 生存率을 얻었다고 報告하였다. 소의 凍結 受精卵의 境遇에 있어서도 Chupin과 Procureor(1984), Renard et al(1983), 鈴木 등(1983)은 40~60% 生存率을 얻었고, 鈴木와 下平(1985)은 Holstein 4頭に 凍結 受精卵를 移植하여 모두 妊娠되었음을 發表하였다.

## 2. 凍結方法

Mouse 受精卵의 凍結方法은 緩慢凍結(0.3~1°C/min), two-step 凍結(3~15°C/min) 및 急速凍結(liquid nitrogen 上面에서 直接 凍結)로 區分할 수 있다.

緩慢凍結은 Whittingham et al(1972)이 mouse 受精卵 凍結에서 成功한 方法이며, Whittingham(1975)은 rat 受精卵에서 0.3~1°C/min로 -80°C까지 下降시켜 凍結했을 때 73~84% 生存率을 얻었다고 하였고, Miyamoto와 Ishibashi(1979)는 mouse 受精卵을 0.5°C/min로 -79°C까지 凍結시켰을 때 43~88%의 生存率을 얻었다고 報告하였다. 그리고 Mazur(1977)는 細胞內 氷晶形成에 의한 傷害를 防止하기 위하여 水分의 脫水가 充分히 일어날 수 있는 低速 冷却速度(1°C 이하/min)를 行하지 않으면 안된다고 指摘하였다. Mouse 受精卵의 凍結速度에 관해서 陳 등(1986)은 1.5M DMSO와 glycerol을 使用, -50°C까지 1°C/min로 凍結시켰을 때 43~49%의 生存率을 보였으나 3°C/min에서는 13.2~16.9%로 生存率은 急激히 低下되었고 7°C/min 以上에서는 生存率이 0%였다고 報告하였다. 家兔 受精卵 凍結에서 金(1987)은 glycerol을 利用하여 -35°C까지 0.3°C/min로 凍結시켰을 때 生存率은 78%로 높았으나, 3~5°C/min로 -80°C까지 凍結시켰을 때는 71%, 15°C/min인 境遇에는 62%로 凍結速度가 빨라짐에 따라 生存率은 低下됐다고 하였다. 凍結液에 sucrose의 添加 效果를 實驗한 金 등(1988)은 10% glycerol과 sucrose를 使用하여 mouse 受精卵을 0.3°C/min으로 -35°C까지 下降시켜 凍結했을 때 FDA-score 5點 滿點에 3.8, 3~5°C/min로 -80°C까지 下降시킬 境遇는 3.2, 15°C/min로 -80°C까지 下降 凍結했을 때는 3.6으로 sucrose 添加時에는 凍結速度가 빨라져도 受精卵 生存率에 큰 影響을 주지 않았다고 報告하였다.

Two-step 凍結方法은 Bouyssou와 Chupin(1982)에 의해서 試圖되었으며, bovine 受精卵을 利用하여 -30°C의 冷凍室에서 30分間 受精卵을 放置한 後 -196°C에 浸漬시켜 凍結한 方法으로 緩慢凍結의 生存率과 큰 差異가 없다고 報告하여 two-step 凍結의 可能性을 提示하였다. Two-step 凍結을 利用한 Renard et al(1984)은 2.2M propane-diol을 凍結液에 利用하여 家兔 受精卵을 -30°C에 30~240分間 放置後 受精卵을 液體窒素로 옮겨 凍結融解 한 다음 77~88%의 높은 生存率을 얻었다고 報告하였다.

Miyamoto와 Ishibashi(1983)은 mouse 受精卵을 利用하여 62%의 生存率을 얻어 two-step 凍結이 簡便하고 빠르며, 經濟的으로 利用價値가 높다고 하였다. Williams와 Johnson(1986)은 2.0M glycerol과 0.5M sucrose가 添加된 凍結液을 使用 two-step 凍結方法으로 mouse 受精卵을 凍結시켰을 때 72~86%의 生存率을 얻었다고 報告하였으며, Chupin과 Reviere(1986)도 rat 受精卵을 2.8M glycerol과 0.25 또는 0.5M sucrose을 添加한 凍結液을 利用 two-step 凍結時 70.8~84.4%의 生存率을 보여, 急速凍結에서 47.6~50.0%의 生存率보다 優秀하였다고 報告하였다.

急速凍結은 各種 耐凍劑를 混合한 vitrification solution을 利用한 것과 두가지 耐凍劑만을 高濃度로 하여 使用하는 方法으로 區分될 수 있다. Vitrification solution을 利用할 境遇는 細胞內外 氷晶形成이 防止되며, 受精卵을 脫水 收縮된 狀態로 凍結시키는 것이 必須條件이라고 Fahy et al(1984)은 指摘하였다. Hsu et al(1986)은 vitrification solution을 使用하여 mouse 受精卵에서 53~93%의 生存率을 얻었으며, Kono와 Tsunoda(1987)은 77~86%, Rall et al(1978)은 最高 88% 生存率과 30~37%의 分娩率을 얻었다고 報告하였다. 또한, 두가지 耐凍劑를 高濃度로 利用한 Széll과 Shelton(1986 a, b)은 3.0M glycerol과 0.5M sucrose가 添加된 凍結液을 使用하여 急速凍結時 80%의 生存率을, 4.0M glycerol과 0.25M sucrose를 添加한 凍結液에서는 93%의 높은 生存率을 얻었다고 報告하였다. 그리고 Széll과 Shelton(1987)은 5.0M glycerol과 0.5M sucrose을 添加한 凍結液에서 95%의 生存率을 얻었다고 하였으며, glycerol 濃度가 2.0M에서 5.0M로 增加할수록 生存率이 높아지는 傾向이 있었다고 하였다.

### 3. 植氷 (seeding)

受精卵 凍結에서 發生하는 受精卵의 過冷却을 防止하기 위하여 行해진 植氷은 Whittingham et al(1972)에 의해 mouse 受精卵 凍結에서 最初로 使用되었다. 受精卵은 精子和 달리 水分含量이 많고 特殊한 膜構造를 갖고 있어 植氷을 하지 않으면 過冷却으로부터 急速한 細胞內 溫度上昇이 생겨 細胞質에 物理的 衝激을 주게 되므로 受精卵

凍結에 있어 植氷은 必須的으로 行해야 된다고 Leibo와 Mazur(1978)는 強調하였다.

植氷方法으로는 cooled forcep(Bielanski et al, 1986; 金 등, 1985; 金, 1987; 金 등, 1988), ice crystal(Miyamoto와 Ishibashi, 1978; 宮本 등, 1986; Miyamoto, 1986), copper-wire(金, 1987; 金 등, 1988)등이 있으나 cooled forcep 方法이 주로 使用되어 왔다. Cooled forcep을 使用한 植氷에서 金 등(1985)은 bovine 受精卵을 緩慢凍結했을 때 66.7~78.6%의 生存率을, Bielanski et al(1986)은 最高 79%의 生存率을 報告하였다. 金(1987)도 家兔 受精卵에서 69%의 生存率을, 金 등(1988)은 mouse 受精卵에서 FDA-score 5點 滿點에서 3.6의 score를 얻었다고 發表하였다. Ice crystal를 使用했을 때 Miyamoto와 Ishibashi(1978)는 mouse 受精卵에서 最高 88%의 生存率을, 宮本 등(1986)은 73%의 生存率을 얻어 植氷하지 않았을 때 68%의 生存率보다 다소 優秀하다고 報告하였다. Copper-wired 植氷에서는 金(1978)이 家兔 受精卵을 緩慢凍結하였을 때 FDA-score 5點 滿點에서 3.0의 score를 얻었고 cooled forcep 植氷과 植氷하지 않은 것과는 큰 差異가 없었다고 하였다. 金 등(1988)은 mouse 受精卵에서 3.6의 score를 얻어 植氷하지 않은 것과 같았고, cooled forcep 植氷보다 다소 優秀하다고 하였다.

凍結液에 따른 植氷의 影響도 報告되고 있으며 Bui-Xuan-Nguyen et al(1984)은 凍結液에 sucrose를 添加하면 受精卵이 凍結前 脫水되기 때문에 植氷하지 않아도 受精卵은 生存할 수 있다고 하였다. 金 등(1988)도 sucrose를 凍結液에 添加하지 않았을 때 FDA-score 5點 滿點에서 cooled forcep 植氷은 3.3, 植氷하지 않은 것은 3.0으로 약간의 差異를 보였으나 sucrose를 凍結液에 添加하여 植氷하지 않았을 때는 3.8의 score를 얻어 sucrose를 凍結液에 添加하면 植氷하지 않았어도 높은 生存率을 얻었다고 報告하였다.

#### 4. 受精卵의 發育段階

受精卵 發育段階別 凍結時 生存率은 다소 다르게 發表되고 있으며 現在까지 early stage, morula stage, blastocyst stage로 區分 凍結되고 있다.

Renard et al(1984)은 家兔 受精卵 2-cell를 two-step 凍結했을 때 77~88%의 生存率을, Critser et al(1988)은 mouse 受精卵을 緩慢凍結하여 36.8~63.9%의 生存率을 얻었다고 報告하였다. Morula stage와 blastocyst stage의 mouse 受精卵을 two-step 凍結시켰을 때 Williams와 Johnson(1986)은 morula stage에서 生存率이 優秀하다고 하였고, 金 등(1988)도 0.3℃/min로 -35℃까지, 3~5℃/min, 15℃/min로 -80℃까지 凍結하였을 때 morula stage에서 각각 높은 生存率을 얻었다고 報告하였다. Bovine 受精卵 凍結에서도 Kennedy et al(1983)은 morula stage가 blastocyst stage보다 生存率이 良好하다고 하였으나, Miyamoto와 Ishibashi(1986)는 mouse 受精卵을 two-step 凍結하였을 때 morula stage와 blastocyst stage 間에 生存率의 差異가 없다고 하였다. 또한, 浦野 등(1986)은 mouse 受精卵을 緩慢凍結했을 때 morula stage보다 blastocyst stage가, 金 등(1985), 盧 등(1988)도 blastocyst stage에서 生存率과 受胎率이 높았다고 하였다. 受精卵의 形態에 따른 凍結의 影響에 대해 Nieman(1985)은 正常的인 球形의 外貌와 뚜렷한 分宮球의 狀態를 나타내어야 凍結後 受精卵의 生存率과 受胎率이 높았다고 報告하였다.



### Ⅲ. 材料 및 方法

#### 1. 試驗期間 및 場所

本 試驗은 1988年 4月부터 同年 9月까지 濟州大學校 農科大學 畜産學科 家畜繁殖學 實驗室에서 實施하였다.

#### 2. 供試動物 및 飼養管理

供試動物은 5週齡 (體重 20~30g)의 雌性 ICR系 mouse를 使用하였고, 配合飼料와 물을 自由採食시켰으며, 飼育室 溫度는 18~22℃로 維持, 日照時間은 14h/day로 調節하였다.

#### 3. 試驗方法

##### 1) 過排卵 誘起

過排卵 誘起를 위하여 13:00~14:00時 사이에 PMSG (pregnant mare's serum gonadotropin, 三共社, 日本) 5~7 IU를 腹腔內에 注射하고, 48時間 後 同量의 HCG (human chorionic gonadotropin, 三共社, 日本)를 注射하여 同一系의 雄性 mouse를 1:1로 合舍, 自然交尾를 誘導하였다. 翌日 아침 陰栓 (coital plug)을 確認하였으며, 確認되지 않은 個體는 試驗에서 除外시켰다.

##### 2) 受精卵의 採卵 및 鑑別

受精卵의 採卵은 HCG 注射後 30~90時間 사이에 mouse를 開腹手術하여 卵管과 子宮을 切取하였다. 切取한 子宮과 卵管은 結締組織, 血液 등을 除去한 다음 1ml의 灌流液을 利用 1ml 注射器로 子宮 및 卵管을 洗滌, 受精卵을 watching glass 에 回收하였다.

卵子回收用灌流液(flushing medium)은 Table 1에 提示된 組成에 따라 m-PBS(modified Dulbecco's phosphate buffered saline)을 調劑하여 使用하였으며, 使用前에 0.22 $\mu$ m의 membrane filter로 濾過시켰다.

採卵된 受精卵은 無菌床에서 40倍의 實體顯微鏡을 使用하여 形態的으로 優秀한 受精卵 만을 選別 凍結에 利用하였고, 未受精卵 및 形態的 異常卵은 實驗에서 除外하였다.

Table 1. Composition of modified Dulbecco's phosphate buffered saline (m-PBS)

Component	Concentration
NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
CaCl <sub>2</sub>	0.1 g
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.1 g
Glucose	1.0 g
Na pyruvate	0.036 g
Bovine serum albumin	3.0 g
Streptomycin	0.05 g
Penicillin	0.075 g
Triple-distilled water	1.000 ml



### 3) 凍結液의 製造

凍結液은 glycerol과 sucrose, raffinose을 耐凍劑로 하여 다음과 같이 製造하였다.

- (1) 1.5, 3.0, 4.5M glycerol + 0.3M sucrose + 20% serum + m-PBS
- (2) 1.5, 3.0, 4.5M glycerol + 0.3M raffinose + 20% serum + m-PBS
- (3) 3.0M glycerol + 0.3, 0.5, 1.0M sucrose + 20% serum + m-PBS
- (4) 3.0M glycerol + 0.3, 0.5, 1.0M raffinose + 20% serum + m-PBS

凍結液에 添加된 血清은 本 大學校 牧場에서 飼育中인 7個月齡 Holstein 犏牛(♀)의 血液을 採取 利用하였다. 採取한 血液은 3,000 r. p. m. 으로 10分間 遠心分離(2回)하여 血清을 分離하였으며, 56℃ 恆溫器에서 30分間 非働化 시킨 後 -20℃에 保存, 凍結液

製造에 使用하였고, 凍結液과 血清은 使用前 0.22 $\mu$ m membrane filter로 濾過하였다.

#### 4) 凍結液 添加 및 straw 內 受精卵 注入

凍結液의 添加는 採卵된 受精卵을 新鮮한 m-PBS로 2回 洗滌한 後 直接 凍結液으로 옮겨서 實施하는 one-step 方法(Leibo, 1983)에 의하여 15分間 行하였다. 凍結液 添加가 끝난 受精卵은 0.25ml straw 內에 5~12個씩 1ml 注射器로 吸入하여 Fig 1과 같은 one-step straw를 製造하였다.

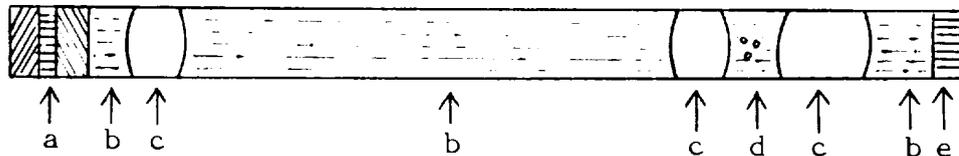


Figure 1. Diagrammatic representation of 0.25ml straw loaded with freezing and dilution medium for the one-step dilution procedure.

- a) Cotton plug
- b) Dilution medium
- c) Air bubble
- d) Freezing medium + embryos
- e) Straw powder plug

#### 5) 凍結方法

受精卵의 凍結은 liquid nitrogen을 이용하였으며, 緩慢과 急速凍結方法으로 區分하여 liquid nitrogen container(Union Carbide, U. S. A.) 內에서 實施하였다. 凍結時 straw의 位置는 cotton plug가 밑으로 향한 垂直狀態에서 行하였다.

##### (1) 緩慢凍結

常溫에서 -7 $^{\circ}$ C까지 1 $^{\circ}$ C/min씩 下降시킨 後 5分間 停滯한 다음 -35 $^{\circ}$ C까지는 0.3 $^{\circ}$ C/min씩 下降시켜 곧바로 -196 $^{\circ}$ C 液體窒素에 straw를 浸漬 凍結後 1~2週間 保管하였다.

(2) 急速凍結

Straw를 常溫에서 1分 이내에 液體窒素表面 2~3mm까지 下降시킨 다음 ( $-36 \pm 7.5^{\circ}\text{C}$ ) 5分間 停滯後 ( $-188.8 \pm 3.3^{\circ}\text{C}$ ) 液體窒素에 浸漬 1~2週間 保管하였다.

凍結溫도와 速度的 比較는 Figure 2에 나타난 바와 같으며, 凍結溫度的 確認은 凍結液을 채운 straw에 cell-freezer (R 204, Planner Product, England)의 sensor를 끼워서 固定한 後 auto-recorder의 記錄에 依하였다.

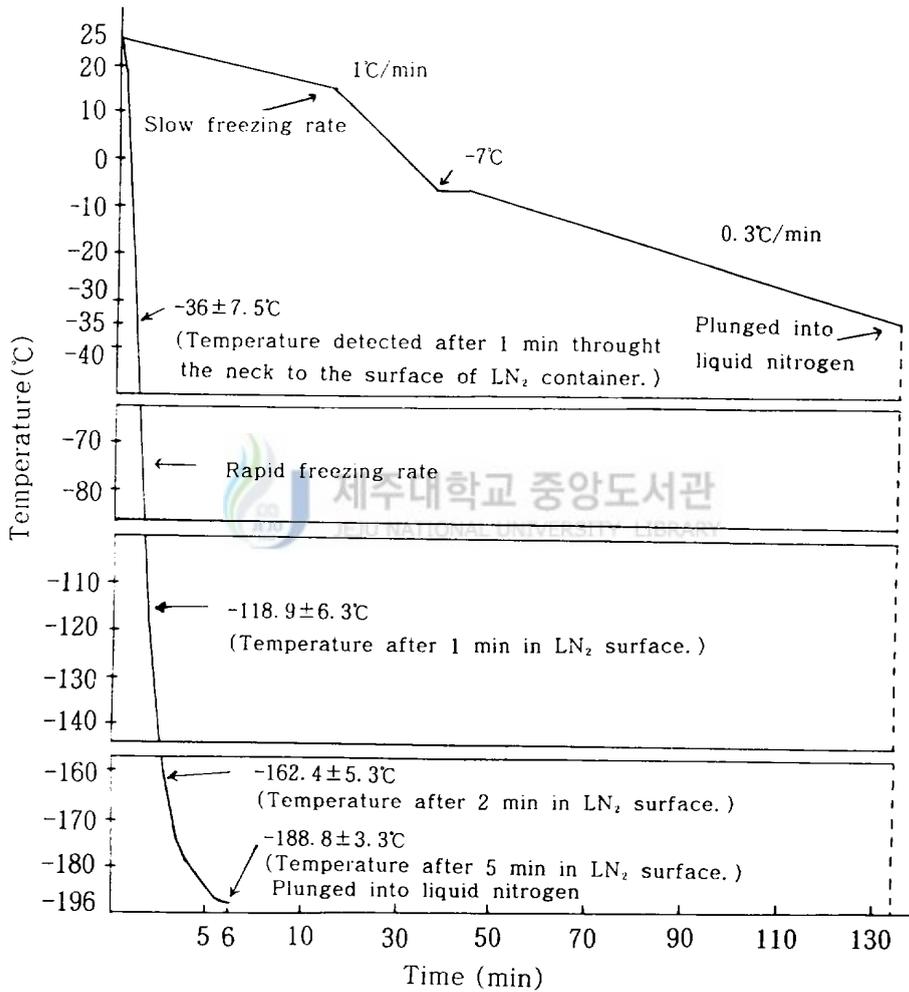


Figure 2. Rates of temperature change for slow and rapid freezing rates.

#### 6) 植氷方法

植氷은 1mm 銅線을 straw 밑에서 부터 3mm의 間隔으로 上部分까지 감아 liquid nitrogen gas로 凍結時에 自然植氷 되도록 하였다.

#### 7) 融 解

受精卵의 融解는 38℃ 溫水에서 straw를 輕輕히 흔들어 氷結晶이 사라질 때까지 하였고, 所要時間은 約 10 秒 程度였다.

#### 8) 耐凍劑의 除去

融解後 耐凍劑의 除去는 straw 內의 除去液과 受精卵이 들어있는 凍結液 사이의 air bubble을 中指로 가볍게 擲겨 除去液과 凍結液을 混合하는 方法으로 耐凍劑를 除去하였고, 除去時間은 10分 程度 所要되었다(Figure 1 참조).

耐凍劑 除去液은 m-PBS에 0.3, 0.5, 1.0M의 sucrose 또는 raffinose를 添加하여 製造하였으며 0.22 $\mu$ m membrane filter로 濾過시켜 使用하였다.

#### 9) 生死判定

受精卵의 生死判定에 쓰인 FDA液은 3',6'-diacetyl fluorescence(FDA) 1mg을 acetone 1ml에 融解시킨 後 m-PBS液에 600,000 : 1로 稀釋 製造하였다.

受精卵의 生死判定은 FDA液에 耐凍劑가 除去된 受精卵을 넣고 常溫에서 3分 동안 培養한 後 FDA가 없는 m-PBS液에 옮겨 位相差螢光顯微鏡(Nicon, TMD-diaphat, Japan) 100倍下에서 觀察, score을 決定하였다. Score는 6段階로 區分하여 正했고 이를 處理別 平均 score로 換算하였다.

Positive-5 : 受精卵의 分割球 全體가 綠色螢光을 強하게 發散하는것 (5點;100%).

Positive-4 : 受精卵 分割球中 80%以上 綠色螢光을 띠거나 positive-5보다 全體가 弱하게 螢光을 發散하는것 (4點;80%).

Partial-3 : 受精卵 分割球中 60%以上 綠色螢光을 띠는것 또는 positive-4보다 全體가 弱하게 螢光을 發散하는것 (3點;60%).

Partial-2 : 受精卵 分割球의 40%以上이 螢光을 發散하거나 또는 partial-3보다 全體가 弱하게 螢光을 發散하는것 (2點;40%).

Partial-1 : 受精卵 分割球의 20%以下가 綠色螢光을 發散하는것 (1點;20%).

Negative-0 : 綠色螢光이 전혀 되지 않는 受精卵 (0點;0%).

平均 score 算出方法:

$$\text{Score} = \frac{(a \times 5) + (b \times 4) + (c \times 3) + (d \times 2) + (e \times 1) + (f \times 0)}{N}$$

a : Positive-5의 生存 受精卵數

b : Positive-4의 生存 受精卵數

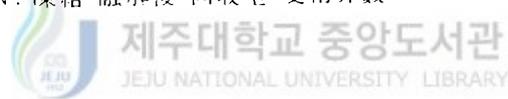
c : Partial-3의 生存 受精卵數

d : Partial-2의 生存 受精卵數

e : Partial-1의 生存 受精卵數

f : Negative-0의 受精卵數

N : 凍結 融解後 回收된 受精卵數



#### 4. 統計處理

統計處理는 分散分析과 t-檢定에 의하였고, 分散分析 後 有意性이 認定된 境遇에는 最少有意差(L. S. D.)에 의하여 各處理間의 有意差을 檢定하였다.

## IV. 結果 및 考察

### 1. 受精卵 急速凍結時 耐凍劑 濃度가 受精卵 生存에 미치는 影響

急速凍結時 凍結液과 除去液에 sucrose을 添加한 境遇(S-S) glycerol 濃度가 mouse 受精卵의 FDA-score에 미치는 影響을 比較 調査한 結果는 Table 2와 같다.

Table 2. Effects of glycerol concentration and 0.3M sucrose addition on embryo survival of rapid freezing

Glycerol concentration (M)	No. of embryos frozen	No. of recovery embryos post-thaw	No. of survival embryos evaluated by FDA-test						FDA score
			P <sub>5</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	N	
1.5	35	25(71.4)	3 (12.0)	4 (16.0)	2 (8.0)	0 (0)	0 (0)	16 (64.0)	1.48 <sup>a</sup>
3.0	45	36(80.0)	19 (52.8)	8 (22.2)	2 (5.6)	1 (2.8)	2 (5.6)	4 (11.1)	3.81 <sup>b</sup>
4.5	49	40(81.6)	23 (57.5)	10 (25.0)	3 (7.5)	0 (0)	0 (0)	4 (10.0)	4.10 <sup>b</sup>

Freezing medium: 1.5, 3.0, 4.5M glycerol+0.3M sucrose+20% serum+m-PBS

Dilution medium: 0.3M sucrose+m-PBS

percentage of embryos in parentheses

P<sub>5</sub>:Positive-5 P<sub>4</sub>:Positive-4 P<sub>3</sub>:Partial-3

P<sub>2</sub>:Partial-2 P<sub>1</sub>:Partial-1 N:Negative-0

Different superscripts denote significant differences within columns(P<0.05).

Mouse 受精卵의 凍結融解後 FDA-score는 glycerol 濃度에 따라 差異를 나타내고 있었으며, 3.0M, 4.5M 區가 1.5M 區에 비해 有意的으로 높은 FDA-score을 나타내고 있었다(P<0.05). P<sub>5</sub>와 P<sub>4</sub>의 分布는 1.5M의 境遇 28.0%, 3.0M : 75.0%, 4.5M : 82.5%로서 glycerol 濃度가 增加됨에 따라 受精卵의 比率이 높아지는 傾向을 나타내었다.

Schilling et al(1982)은 FDA-test에서 3等級(positive, partial, negative)으로 分類하여 培養했을 때 positive에서 86.4%, partial : 13.8%, negative : 0%가 發育하였다고 報告하였으며, 本 實驗의 P<sub>1</sub>~P<sub>3</sub>(partial)에 있어서도 培養하면 發育할 可能性

이 있을 것으로 생각된다.

Sucrose를 凍結液에 添加하지 않고 mouse 受精卵을 two-step으로 凍結했을 때 glycerol 濃度 1.5~4.0M에서는 受精卵의 生存率이 不良하였으나, sucrose를 함께 添加했을 때는 높은 受精卵의 生存率을 얻을수 있었다고 Miyamoto와 Ishibashi(1983, 1986)는 報告하였다. 또한, 受精卵 生存率은 2.0~3.0M glycerol보다 4.5M 일때 低下되는 傾向을 나타낸다고 하여 本 實驗 結果와 다소 差異를 나타내고 있었다. Williams와 Johnson(1986)은 mouse 受精卵을 凍結했을 때 0.25M sucrose와 2.0M glycerol을 凍結液에 添加하였을 경우 受精卵 生存率이 가장 높다고 하였으며(67%), 4.0M에서는 역시 生存率이 떨어진다는 Miyamoto와 Ishibashi(1986)와 같은 結果를 報告한 바 있다. 그러나 0.5M sucrose를 凍結液에 添加하여 glycerol 濃度에 따라 急速凍結을 試驗한 Széll과 Shelton(1986, a)은 4.0M보다 3.0M glycerol의 生存率이 優秀하였다고 報告하였다.

이상의 報告을 綜合하여 볼때 mouse 受精卵 凍結에서 sucrose의 添加는 대부분이 優秀한 生存率을 나타내는 한편, glycerol은 1.5M보다 2.0~3.0M에서 受精卵 生存率이 良好하였는데 本 實驗에서는 3.0~4.5M에서 높은 生存率을 나타내었다.

凍結液에 sucrose 代用으로 0.3M raffinose을 利用하여(R-R) mouse 受精卵을 急速凍結할 때 glycerol 濃度에 따른 受精卵의 FDA-score는 Table 3에 보여준 바와 같다.

Raffinose을 凍結液에 添加했을 때 FDA-score는 3.0M glycerol에서 가장 높은 score(4.11)를 나타낸 반면, 4.5M에서는 3.54로 가장 낮은 score을 나타내었으나 各 濃度間에 統計的인 有意差는 없었다. Raffinose 添加 效果를 sucrose(Table 2 참조)와 比較할 때 相異한 結果를 나타내어 sucrose는 4.5M glycerol에서 score가 높았으나 raffinose의 境遇는 도리어 4.5M보다는 3.0M에서 높은 score를 보였다. P<sub>2</sub>와 P<sub>1</sub>의 受精卵 比率은 glycerol 1.5, 3.0, 4.5M 에서 各各 83.3%, 82.2%, 67.9%를 나타내어 1.5M과 3.0M이 높았으나 P<sub>2</sub>의 比率만을 볼때 3.0M에서 67.9%로 他濃度보다 優秀하게 나타나고 있었다.

Table 3. Effects of glycerol concentration and 0.3M raffinose addition on embryo survival of rapid freezing

Glycerol concentration (M)	No. of embryos frozen	No. of recovery embryos post-thaw	No. of survival embryos evaluated by FDA-test						FDA score
			P <sub>5</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	N	
1.5	32	30(93.8)	13 (43.3)	12 (40.0)	1 (3.3)	1 (3.3)	1 (3.3)	2 (6.6)	3.97
3.0	32	28(87.5)	19 (67.9)	4 (14.3)	1 (3.6)	0 (0)	1 (3.6)	3 (10.7)	4.11
4.5	29	28(96.6)	11 (39.3)	8 (28.6)	3 (10.7)	1 (3.6)	1 (3.6)	4 (14.3)	3.54

Freezing medium: 1.5, 3.0, 4.5M glycerol+0.3M raffinose+20% serum+m-PBS

Dilution medium: 0.3M raffinose+m-PBS

percentage of embryos in parentheses

P<sub>5</sub>: Positive-5 P<sub>4</sub>: Positive-4 P<sub>3</sub>: Partial-3

P<sub>2</sub>: Partial-2 P<sub>1</sub>: Partial-1 N: Negative-0

이러한 결과로 볼때 凍結液에 添加되는 sucrose와 raffinose는 glycerol 濃度에 따라 受精卵의 生存率에 미치는 影響이 다른 것으로 思料된다.

急速凍結에 있어 raffinose를 凍結液에, sucrose를 除去液에 (R-S) 添加했을 때 glycerol 濃度에 따른 受精卵의 FDA-score는 Table 4와 같다.

Table 4. Effects of an inverse addition of sucrose and raffinose to freezing (raffinose) and dilution (sucrose) medium on embryo survival of rapid freezing

Glycerol concentration (M)	No. of embryos frozen	No. of recovery embryos post-thaw	No. of survival embryos evaluated by FDA-test						FDA score
			P <sub>5</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	N	
1.5	30	25(83.3)	15 (60.0)	2 (8.0)	1 (4.0)	1 (4.0)	1 (4.0)	5 (20.0)	3.56
3.0	36	32(88.9)	16 (50.0)	12 (37.5)	3 (9.0)	0 (0)	0 (0)	1 (3.1)	4.28
4.5	55	33(60.0)	14 (42.4)	11 (33.3)	4 (12.1)	0 (0)	0 (0)	4 (12.1)	3.82

Freezing medium: 1.5, 3.0, 4.5M glycerol+0.3M raffinose+20% serum+m-PBS

Dilution medium: 0.3M sucrose+m-PBS

percentage of embryos in parentheses

P<sub>5</sub>: Positive-5 P<sub>4</sub>: Positive-4 P<sub>3</sub>: Partial-3

P<sub>2</sub>: Partial-2 P<sub>1</sub>: Partial-1 N: Negative-0

P<sub>5</sub>와 P<sub>4</sub>의 比率은 3.0M glycerol에서 87.5%로 가장 높은 반면, 1.5M에서 68.0%로 낮았다. 그리고 FDA-score도 P<sub>5</sub>와 P<sub>4</sub>의 傾向과 一致하였으며, 各 濃度間에 有意差는 없었다(1.5M : 3.56, 3.0M : 4.28, 4.5M : 3.82).

Raffinose를 凍結液과 除去液에 添加한 處理 (Table 3 참조)와 本 結果를 比較하였을 때 3.0M glycerol에서는 FDA-score가 거의 一致되고 있었으나, 1.5M과 4.5M glycerol에서는 서로 相反되는 傾向을 보이고 있어 glycerol 濃度는 3.0M이 優秀한 것으로 생각된다. 또한, Williams와 Johnson(1985,1986)은 mouse 受精卵를 two-step 으로 凍結할 때 0.5M sucrose를 凍結液과 除去液에 添加하여 얻은 70~86%의 生存率과, Chupin과 Reviers(1986)가 sucrose(0.25M 또는 0.5M)를 凍結液과 除去液에 添加하였을 때 rat 受精卵에서 70.8~84.4% 生存率을 얻은 것과 比較하면 本 實驗에서 耐凍劑 濃度와 凍結方法에 差異가 있었으나 대체로 生存率은 一致하거나 優秀하였다.

急速凍結에 있어 sucrose를 凍結液에, raffinose를 除去液에 (S-R) 添加하였을 때 glycerol 濃度에 따른 受精卵의 FDA-score는 Table 5에 나타낸 바와 같다.

Table 5. Effects of an inverse addition of sucrose and raffinose to freezing (sucrose) and dilution (raffinose) medium on embryo survival of rapid freezing

Glycerol concentration (M)	No. of embryos frozen	No. of recovery embryos post-thaw	No. of survival embryos evaluated by FDA-test						N	FDA score
			P <sub>5</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	N		
1.5	33	28(84.5)	4 (14.3)	12 (42.9)	3 (10.7)	1 (3.6)	3 (10.7)	5 (17.9)	2.93	
3.0	31	28(90.3)	20 (71.4)	3 (10.7)	1 (3.6)	0 (0)	0 (0)	4 (14.3)	4.11	
4.5	29	25(86.2)	16 (64.0)	5 (20.0)	2 (8.0)	0 (0)	1 (4.0)	1 (4.0)	4.28	

Freezing medium: 1.5, 3.0, 4.5M glycerol + 0.3M sucrose + m-PBS + 20% serum

Dilution medium: 0.3M raffinose + m-PBS

percentage of embryos in parentheses

P<sub>5</sub>: Positive-5 P<sub>4</sub>: Positive-4 P<sub>3</sub>: Partial-3

P<sub>2</sub>: Partial-2 P<sub>1</sub>: Partial-1 N: Negative-0

受精卵의 FDA-score는 4.5M glycerol에서 優秀하였으나 各 濃度間 有意差는 없었  
다. 그러나 P<sub>5</sub>와 P<sub>4</sub>의 比率은 1.5M glycerol(57.2%)에서 가장 낮았으며 3.0M(82.1%)  
과 4.5M(84.0%)에서는 類似한 比率을 보여주고 있었다.

本 實驗 結果를 S-S處理와 比較하여 보면 4.5M glycerol에서는 兩處理의 FDA-score  
가 類似하였으나, 그 밖의 glycerol 濃度에서는 S-R處理가 다소 높은 FDA-score를  
보이고 있었다.

急速凍結에 있어서 凍結液과 除去液에 添加된 sucrose 濃度에 따른 mouse 受精卵의  
FDA-score는 Table 6에 提示한 것과 같다.

Table 6. Effects of sucrose concentration in the freezing and dilution medium  
on embryo survival of rapid freezing

Glycerol concentration (M)	No. of embryos frozen	No. of recovery embryos post-thaw	No. of survival embryos evaluated by FDA-test						FDA score
			P <sub>5</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	N	
0.3	22	17(77.3)	2 (11.8)	9 (52.9)	2 (11.8)	0 (0)	1 (5.9)	3 (17.6)	3.12 <sup>b</sup>
0.5	19	16(84.2)	4 (25.0)	0 (0)	2 (12.5)	3 (18.8)	6 (37.5)	1 (6.3)	2.38 <sup>b</sup>
1.0	23	22(95.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	22 (100)	0.00 <sup>a</sup>

Freezing medium: 3.0M glycerol+0.3, 0.5, 1.0M sucrose+20% serum+m-PBS

Dilution medium: 0.3, 0.5, 1.0M sucrose+m-PBS

percentage of embryos in parentheses

P<sub>5</sub>:Positive-5 P<sub>4</sub>:Positive-4 P<sub>3</sub>:Partial-3

P<sub>2</sub>:Partial-2 P<sub>1</sub>:Partial-1 N:Negative-0

Different superscripts denote significant differences within columns(P<0.01).

受精卵의 FDA-score는 sucrose 濃度가 增加됨에 따라 점차 떨어졌고(0.3M : 3.12,  
0.5M : 2.38, 1.0M : 0), P<sub>5</sub>와 P<sub>4</sub>의 比率은 0.3, 0.5 및 1.0M sucrose에서 各各  
64.7%, 25.0% 및 0%의 比率을 나타내고 있었으나 全般적으로 FDA-score는 S-S,  
S-R, R-R, R-S處理에 비해 현저히 떨어지고 있었다.

이러한 結果로 볼때 sucrose의 濃度는 受精卵의 生存率을 增加시키는데 중요한 役割  
을 하며, Williams와 Johnson(1986), Chupin과 Reviere(1986)는 0.5M sucrose를

添加했을 때 生存率이 가장 높았다고 報告하였고, 1.0M 일때에는 도리어 受精卵의 生存率은 低下된다는 것이 Chupin과 Reviere(1986)에 의하여 알려 졌다. 또한, sucrose의 效果는 glycerol 濃度에 따라 生存率에 差이를 보이고 있어 Széll과 Shelton(1987)은 5.0M glycerol 일때에는 0.5M sucrose를, 3.0M glycerol 일때에는 0.25M sucrose의 添加가 가장 높은 生存率을 얻을 수 있다고 指摘하였다. 本 實驗에서도 이와 類似한 結果를 나타내어 3.0M glycerol에서 0.3M sucrose 添加는 受精卵 生存率을 向上시켰다.

急速凍結에 있어 凍結液과 除去液에 添加된 raffinose의 濃度에 따른 mouse 受精卵의 FDA-score을 比較한 것은 Table 7과 같다.

Table 7. Effects of raffinose concentration in the freezing and dilution medium on embryo survival of rapid freezing

Glycerol concentration (M)	No. of embryos frozen	No. of recovery embryos post-thaw	No. of survival embryos evaluated by FDA-test						FDA score
			P <sub>5</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	N	
0.3	29	19(65.5)	14 (73.7)	2 (10.5)	1 (5.3)	0 (0)	0 (0)	1 (5.3)	4.26 <sup>b</sup>
0.5	28	23(82.1)	3 (13.0)	7 (30.4)	5 (21.7)	2 (8.7)	5 (21.7)	1 (4.3)	2.91 <sup>b</sup>
1.0	25	10(40.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	10 (100)	0.00 <sup>a</sup>

Freezing medium: 3.0M glycerol+0.3, 0.5, 1.0M raffinose+20% serum+m-PBS

Dilution medium: 0.3, 0.5, 1.0M raffinose+m-PBS

percentage of embryos in parentheses

P<sub>5</sub>:Positive-5 P<sub>4</sub>:Positive-4 P<sub>3</sub>:Partial-3

P<sub>2</sub>:Partial-2 P<sub>1</sub>:Partial-1 N:Negative-0

Different superscripts denote significant differences within columns(P<0.01).

Raffinose 濃度가 增加 할수록 낮은 FDA-score를 보였으며 (0.3M : 4.26, 0.5M : 2.91, 1.0M : 0), P<sub>5</sub>와 P<sub>4</sub>의 分布도 0.3M : 84.2%, 0.5M : 43.4%, 1.0M : 0% 順으로 나타나고 있었다.

이와 같은 結果를 sucrose 處理(Table 6 참조)와 比較하여 보면, 濃度가 增加 할수록 FDA-score가 떨어지는 傾向은 一致하였으나, 全般的으로 raffinose 處理에서 높은

FDA-score를 보여 주었다. 또한, 1.0M sucrose와 raffinose에서 生存 受精卵이 없었던 것은 凍結前 受精卵 内部에 있던 水分의 지나친 脫水(Wood와 Farrant, 1980)와 凍結 融解後 glycerol를 除去할 때 受精卵 内部와 除去液間의 滲透壓差에 의한 影響인 것으로 思料된다.

## 2. 凍結方法이 受精卵 生存에 미치는 影響

Glycerol(3.0M)과 sucrose 또는 raffinose(0.3M)를 凍結液에 添加하여 緩慢凍結時 植氷에 따른 受精卵의 FDA-score는 Table 8에 提示한 것과 같다.

Table 8. Effects of seeding procedures on the embryo survival of slow freezing with 3.0M glycerol plus 0.3M sucrose or raffinose

Freezing medium	Seeding procedure	No. of embryos frozen	No. of recovery embryos post-thaw	No. of survival embryos evaluated by FDA-test						FDA score
				P <sub>5</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	N	
PGS	Co-S	24	15(62.5)	2 (13.3)	5 (33.3)	5 (33.3)	1 (6.7)	1 (6.7)	1 (6.7)	3.20 <sup>ab</sup>
	N-S	22	15(68.2)	12 (80.0)	2 (13.3)	1 (6.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4.73 <sup>bd</sup>
	Total or mean	46	30(65.2)	14 (46.7)	7 (23.3)	6 (20.0)	1 (3.3)	1 (3.3)	1 (3.3)	3.97 <sup>A</sup>
PGR	Co-S	23	17(73.9)	6 (35.3)	3 (17.7)	4 (23.5)	0 (0)	0 (0)	3 (17.7)	3.18 <sup>ab</sup>
	N-S	22	17(77.3)	1 (5.9)	5 (29.4)	1 (5.9)	1 (5.9)	1 (5.9)	8 (47.1)	1.82 <sup>ac</sup>
	Total or mean	45	34(75.6)	7 (20.6)	8 (23.5)	5 (14.7)	1 (2.9)	1 (2.9)	11 (32.4)	2.41 <sup>B</sup>

PGS:3.0M glycerol+0.3M sucrose+20% serum+m-PBS

PGR:3.0M glycerol+0.3M raffinose+20% serum+m-PBS

Co-S:Copper wired seeding N-S:Non seeding

P<sub>5</sub>:Positive-5 P<sub>4</sub>:Positive-4 P<sub>3</sub>:Partial-3

P<sub>2</sub>:Partial-2 P<sub>1</sub>:Partial-1 N:Negative-0

percentage of embryos in parentheses

Values with different superscripts are significantly different with each treatment(P<0.01:cd, P<0.05:AB).

PGS 凍結液(PBS+3.0M glycerol+0.3M sucrose+20% serum)의 P<sub>5</sub>와 P<sub>4</sub>의 比率은 N-seeding(구리선을 감지 않은 straw)의 境遇 93.3%, Co-seeding(구리선 감은 straw)에서는 46.6%로 植氷을 하지 않았을 때 生存 比率은 높아지고 있었으며, 分割球의 60% 以上 生存한 P<sub>4</sub>까지를 包含할 때 生存 比率은 100%에 달하고 있었다. 그러나 平均 FDA-score는 Co-seeding과 N-seeding에서 各各 3.20, 4.73으로 處理間에 有意差는 없었다. PGR 凍結液(PBS+3.0M glycerol+0.3M raffinose+20% serum)의 P<sub>5</sub>와 P<sub>4</sub>의 比率은 Co-seeding : 53.0%, N-seeding : 35.3%로 Co-seeding이 N-seeding에 比하여 높은 生存 比率을 나타내어 PGS의 成績과 相反된 結果를 보였다. 또한, FDA-score에서도 Co-seeding이 높은 score를 나타내었으나 處理間에 有意差는 認定되지 않았다. PGS(3.97)와 PGR(2.41)의 FDA-score는 PGS 處理가 PGR에 比해 優秀하여 處理間에 有意的인 差를 보였다(P<0.05).

Miyamoto와 Ishibashi(1978), Miyamoto(1986)은 凍結液에 sucrose를 添加하지 않고 mouse 受精卵 凍結에서 植氷 할 境遇 生存率이 높았다고 하였으나, Bui-Xuan-Nguyen et al(1984)은 凍結液에 sucrose를 添加하면 受精卵이 凍結前에 脫水되어 植氷하지 않아도 높은 生存率을 얻을수 있다고 하였다. 金 등(1988)도 mouse 受精卵 凍結에서 sucrose를 凍結液에 添加하였을 때는 植氷하지 않는 것이 오히려 植氷한 것보다 生存率이 優秀하다고 報告하였다.

本 實驗에서 FDA-score는 植氷間에 有意差가 없었으나 P<sub>5</sub>와 P<sub>4</sub>의 比率은 PGS의 N-seeding이 優秀하여, 金 등(1988)의 報告와 一致하고 있으며, PGR의 境遇는 도리어 Co-seeding이 優秀한 結果를 나타내고 있었다.

Mouse 受精卵을 急速凍結했을 때 凍結液과 植氷與否에 따른 FDA-score는 Table 9에 나타낸 바와 같다.

急速凍結에 있어 FDA-score는 統計的 有意差는 없었으나 PGS와 PGR에서 Co-seeding이 다소 높은 傾向을 보이고 있었으며 N-seeding은 PGS, PGR에서 모두 떨어지고 있었다. P<sub>5</sub>와 P<sub>4</sub>의 比率은 PGS와 PGR에서 모두 Co-seeding(92.3%, 86.9%)이 N-seeding(76.0%, 73.4%)보다 良好한 生存 比率을 나타내고 있었던 것은 急速凍

Table 9. Effects of seeding procedures on the embryo survival of rapid freezing with 3.0M glycerol plus 0.3M sucrose or raffinose

Freezing medium	Seeding procedure	No. of embryos frozen	No. of recovery embryos post-thaw	No. of survival embryos evaluated by FDA-test						FDA score
				P <sub>5</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	N	
PGS	Co-S	33	26(78.8)	24 (92.3)	0 (0)	0 (0)	1 (3.9)	0 (0)	1 (3.9)	4.67
	N-S	25	25(100)	15 (60.0)	4 (16.0)	3 (12.0)	2 (8.0)	1 (4.0)	0 (0)	4.20
	Total or mean	58	51(87.9)	39 (76.5)	4 (7.8)	3 (5.9)	3 (5.9)	1 (2.0)	1 (2.0)	4.45
PGR	Co-S	24	22(91.7)	11 (50.5)	8 (36.4)	2 (9.1)	0 (0)	1 (4.6)	0 (0)	4.27
	N-S	31	30(96.8)	14 (46.7)	8 (26.7)	4 (13.3)	2 (2.7)	1 (3.3)	1 (3.3)	3.97
	Total or mean	55	52(94.5)	25 (48.1)	16 (30.8)	6 (11.5)	2 (3.9)	2 (3.9)	1 (1.9)	4.10

PGS:3.0M glycerol+0.3M sucrose+20% serum+m-PBS

PGR:3.0M glycerol+0.3M raffinose+20% serum+m-PBS

Co-S:Copper wired seeding N-S:Non seeding

percentage of embryos in parentheses

P<sub>5</sub>:Positive-5 P<sub>4</sub>:Positive-4 P<sub>3</sub>:Partial-3

P<sub>2</sub>:Partial-2 P<sub>1</sub>:Partial-1 N:Negative-0

결에서도 植氷의 影響이 있는 것으로 생각되었다. PGS와 PGR의 FDA-score를 綜合的으로 比較하여 보면 PGS(4.45)가 PGR(4.10)에 비해 높았으나 統計的 有意差는 없었다.

Vitrification solution을 利用하여 mouse 受精卵을 急速凍結한 Hsu et al(1986)은 生存率을 53~93%로, 다른 vitrification solution을 使用한 Kono와 Tsunoda(1987)는 77%의 生存率을 報告하고 있으나 本成績의 FDA-score를 生存率로 換算할 때 本實驗에서 얻어진 結果는 이들 結果보다 높은 生存率을 얻고 있었다. Glycerol과 sucrose를 凍結液에 添加하여 急速凍結을 研究한(Széll과 Shelton, 1986 a, 1987; Williams와 Johnson, 1986) 成績은 生存率 80~95%로 報告하고 있으며, 本實驗의 結果는 79.4~93.4%로 sucrose와 raffinose에서 거의 同一하게 生存率을 높일수 있음을 示唆하고

있다.

緩慢凍結(Table 8 참조)과急速凍結의影響을相互比較하면,緩慢凍結에서는PGS가優秀한FDA-score를보였고急速凍結에서는PGS와PGR이거의같은score를나타내었으나수般的으로急速凍結이緩慢凍結보다優秀하였다.

本實驗에서緩慢凍結이낮은FDA-score를나타낸것은Mazur(1977)가報告한緩慢凍結에서凍結에 의한細胞內自由水の脫水, sucrose添加에 의한凍結前細胞內自由水の脫水(Wood와Farrant, 1980) 등의原因으로推測된다. 그러나緩慢凍結에서glycerol濃도를낮춘다면滲透壓의低下로脫水を減少시켜 좋은成績을얻을수있을것으로생각된다.

### 3. 急速凍結에서受精卵의發育段階가生存에 미치는影響

急速凍結에 있어受精卵發育段階가FDA-score에 미치는影響은Table 10과 같다.

Table 10. Effects of various embryo stage on embryo survival of rapid freezing with 3.0M glycerol plus 0.3M sucrose

Embryo stage	No. of embryos frozen	No. of recovery embryos post-thaw	No. of survival embryos evaluated by FDA-test						FDA score
			P <sub>5</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	N	
Early stage	30	26(86.7)	9 (34.6)	4 (15.4)	1 (3.9)	2 (7.7)	1 (3.9)	9 (34.6)	2.65 <sup>a</sup>
Morula stage	31	27(87.1)	15 (55.5)	5 (18.5)	2 (7.4)	1 (3.7)	0 (0)	4 (14.8)	3.82 <sup>ab</sup>
Blastocyst stage	31	31(100)	29 (93.6)	2 (6.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4.94 <sup>b</sup>

Freezing medium:3.0M glycerol+0.3M sucrose+20% serum+m-PBS

Dilution medium:0.3M sucrose+m-PBS

percentage of embryos in parentheses

P<sub>5</sub>:Positive-5 P<sub>4</sub>:Positive-4 P<sub>3</sub>:Partial-3

P<sub>2</sub>:Partial-2 P<sub>1</sub>:Partial-1 N:Negative-0

Different superscripts denote significant differences within columns(P<0.05).

Glycerol과 sucrose를凍結液에添加하였을 때 受精卵의 FDA-score는 blastocyst stage(4.94), morula stage(3.82), early stage(2.65)의 順이었으며 blastocyst stage와 early stage 間에는 有意差가 있었다( $P < 0.05$ ).  $P_5$ 와  $P_4$ 의 比率은 blastocyst stage, morula stage, early stage에서 各各 100%, 74.0%, 50.0%로 FDA-score와 같은 傾向을 보이고 있었다.

家兔 受精卵 early stage의 凍結에서 Renard et al(1984)는 77~83% 生存率을 얻었으나, Critser et al(1988)은 mouse 受精卵 early stage에서 36.8~63.9%의 낮은 生存率을 報告하였다. 또한, 그는 受精卵 發育段階別 生存率의 差異가 있는 것은 水分의 浸透力과 이에 따르는 活性化 energy가 다르기 때문이라고 指摘하여, 本 實驗에서 early stage의 低調한 FDA-score도 이와 같은 原因에 基因된 것으로 사료된다.

Mouse 受精卵의 blastocyst stage와 morula stage의 凍結 比較試驗에서 Williams와 Johnson(1986), 金 등(1988)은 blastocyst stage보다 morula stage의 生存率이 優秀하다고 하였으며, Milyamoto와 Ishibashi(1986)는 morula stage와 blastocyst stage 사이에는 生存率에 큰 差異가 없다고 하였다. 그러나 浦野 등(1986)과 金 등(1988)은 mouse와 bovine 受精卵의 凍結에서는 blastocyst stage가 높은 生存率을 얻었다고 報告하여 本 實驗 結果와 一致하고 있다.

急速凍結에 있어 raffinose를凍結液과 除去液에添加하여 受精卵 發育段階別 FDA-score를 比較한 結果는 Table 11과 같다.

受精卵의 FDA-score는 blastocyst stage와 morula stage에서 early stage에 비하여 높았으며, blastocyst stage에서 優秀하였다.  $P_5$ 와  $P_4$ 의 受精卵 比率은 blastocyst stage, morula stage, early stage의 順으로 各各 96.9%, 93.3%, 37.5%를 보여 early stage에서 낮은 比率을 보였다.

Raffinose 處理區를 sucrose 處理(Table 10 참조)와 比較할 때 FDA-score는 類似한 成績을 나타내고 있으며, 各處理 모두 blastocyst stage에서 가장 높은 score를 나타내고 있어 受精卵 發育段階別 凍結에 있어서는 early stage와 morula stage에 비하여 blastocyst stage에서 높은 生存率을 얻을수 있었다.

Table 11. Effects of various embryo stage on survival of rapid freezing with 3.0M glycerol plus 0.3M raffinose

Embryo stage	No. of embryos frozen	No. of recovery embryos post-thaw	No. of survival embryos evaluated by FDA-test						FDA score
			P <sub>5</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	N	
Early stage	29	24(82.8)	8 (33.3)	1 (4.2)	1 (4.2)	3 (12.5)	5 (20.8)	7 (29.2)	2.32 <sup>a</sup>
Morula stage	31	30(96.8)	22 (73.3)	6 (20.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (6.7)	4.47 <sup>b</sup>
Blastocyst stage	33	32(97.0)	30 (93.8)	1 (3.1)	1 (3.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4.91 <sup>b</sup>

Freezing medium:3.0M glycerol+0.3M raffinose+20% serum+m-PBS

Dilution medium:0.3M raffinose+m-PBS

percentage of embryos in parentheses

P<sub>5</sub>:Positive-5 P<sub>4</sub>:Positive-4 P<sub>3</sub>:Partial-3

P<sub>2</sub>:Partial-2 P<sub>1</sub>:Partial-1 N:Negative-0

Different superscripts denote significant differences within columns(P<0.05).

이상의 결과를 토대로 볼때 raffinose를 sucrose 代用으로 利用하여도 生存率은 오히려 sucrose에 비해 raffinose가 類似하거나 優秀하였음을 알수 있었다.

#### 4. 耐凍劑 添加 및 除去에 따른 受精卵의 收縮과 膨脹

顯微鏡下에서 凍結液(PBS+3.0M glycerol+0.3M sucrose 또는 raffinose+20% serum) 内の 受精卵 分割球 變化를 觀察한 것은 Plate 1와 같다.

正常的인 受精卵(A)을 凍結液에 옮겨 5分(B), 10分(C), 15分(D) 後의 變化를 나타낸 것으로 5分 以內에 sucrose와 raffinose 添加區에서 分割球 收縮이 일어났다. 凍結液에 옮겨 5分後에는 分割球의 量的 變化가 거의 없어 sucrose와 raffinose가 添加된 高滲透壓의 凍結液에서는 5分 以內에 受精卵 内部의 自由水 대부분이 脫水되는 것으로 생각되었다.

이러한 現象은 glycerol를 凍結液에 添加하였을 때 受精卵 分割球가 收縮되어 自由水 脫水가 일어나며, 脫水 以後 glycerol이 分割球 内部로 浸透되면서 分割球는 凍結液 添加前과 같은 크기로 된다는 Schneider와 Mazur(1984), Niemann(1985)의 報告와는

相異하였다.

그러나 sucrose와 glycerol를 같이凍結液에添加하면 glycerol單獨으로添加하였을 때와 비슷한收縮과膨脹이 일어나며 受精卵 内外의 滲透壓 狀態가 等張일 때는 收縮과 膨脹이 멈춘다고 Széll과 Shelton(1986 ab, 1987)은 指摘하였다.

本 觀察에서 5分 以後 分割球가 膨脹되지 않고 收縮된 狀態로 維持된 것은 受精卵 内外의 滲透壓이 等張이기 때문이라고 思料된다.

Glycerol 除去液内에서 受精卵 分割球의 變化는 Plate 2에 提示한 것과 같다.

凍結 融解後 glycerol를 除去하기 위하여 受精卵을 除去液으로 옮겼을 때 10分後 (F)의 分割球가 5分後 (E)의 分割球보다 收縮된 狀態를 보여 glycerol이 除去된 것으로 생각된다. 除去液内에서 10分後(F)에 PBS内로 옮겼을 때(G)는 水分이 分割球 内部로 浸透되어 凍結前과 같은 分割球 크기로 膨脹되는 것이 確認되었다.

除去液内에서 5分後(E)의 分割球 形態가 凍結前 凍結液内에서 15分後(Plate 1, D)의 形態보다 膨脹된 것은 凍結前 分割球의 高滲透壓 狀態에서 低滲透壓인 除去液으로 옮기므로서 水分이 分割球 内部로 浸透된 現象 때문이라고 생각된다.

本 觀察의 結果는 glycerol 除去液에 sucrose를 添加하면 受精卵 内部에 浸透되어 있는 glycerol를 除去하면서 分割球의 變化를 調節하고, glycerol이 除去된 受精卵을 生理的 溶液으로 옮기면, 最初의 分割球 形態로 되돌아 간다는 Széll과 Shelton(1986 ab, 1987)의 報告와 一致되는 傾向을 보였다.

이상의 觀察에서 sucrose와 raffinose 添加區의 分割球 變化가 거의 같은 것으로 보아 raffinose와 sucrose가 耐凍劑로서의 效果가 類似한 것으로 생각된다.

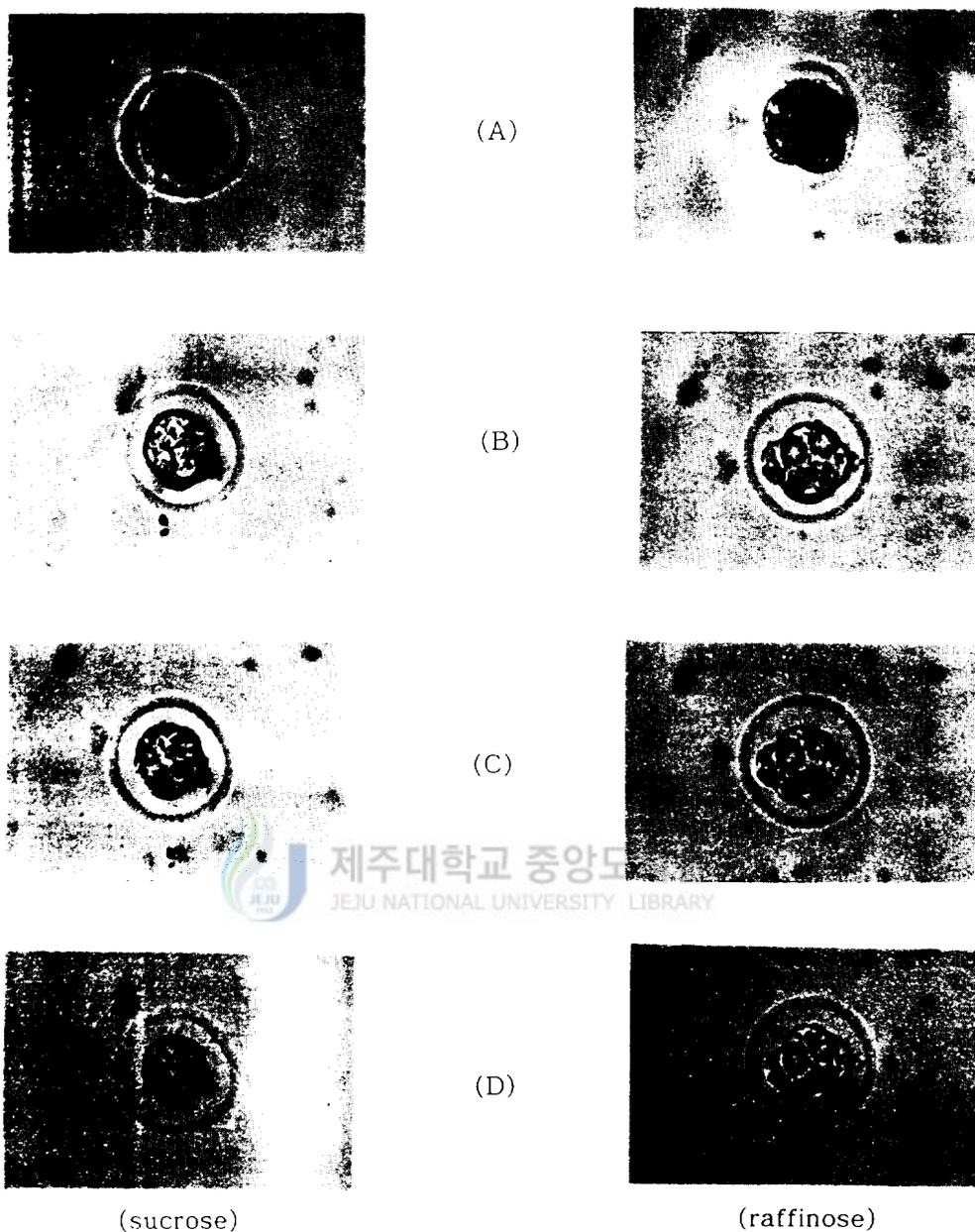
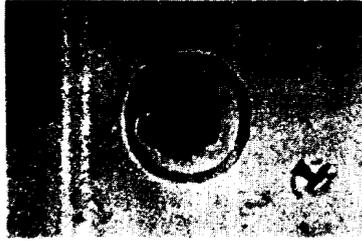


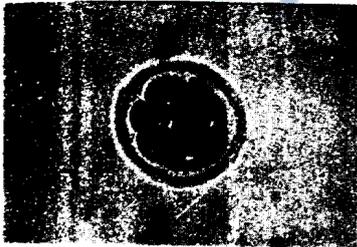
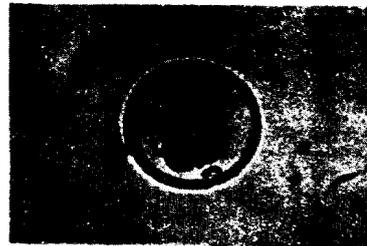
Plate 1. Volume changes of a day-3 fresh mouse embryos in freezing medium with 3.0M glycerol plus 0.3M sucrose: prior to freezing medium addition(A), after 5min(B), 10min(C) and 15min(D) in freezing medium (X150).



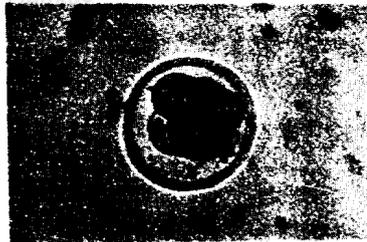
(E)



(F)



(G)



(sucrose)

(raffinose)

Plate 2. Volume changes of post-thaw day-3 mouse embryos in dilution medium with 0.3M sucrose or raffinose and PBS-solution: after 5min(E) and 10min(F) in dilution medium and after 5min(G) in PBS-solution (X150).

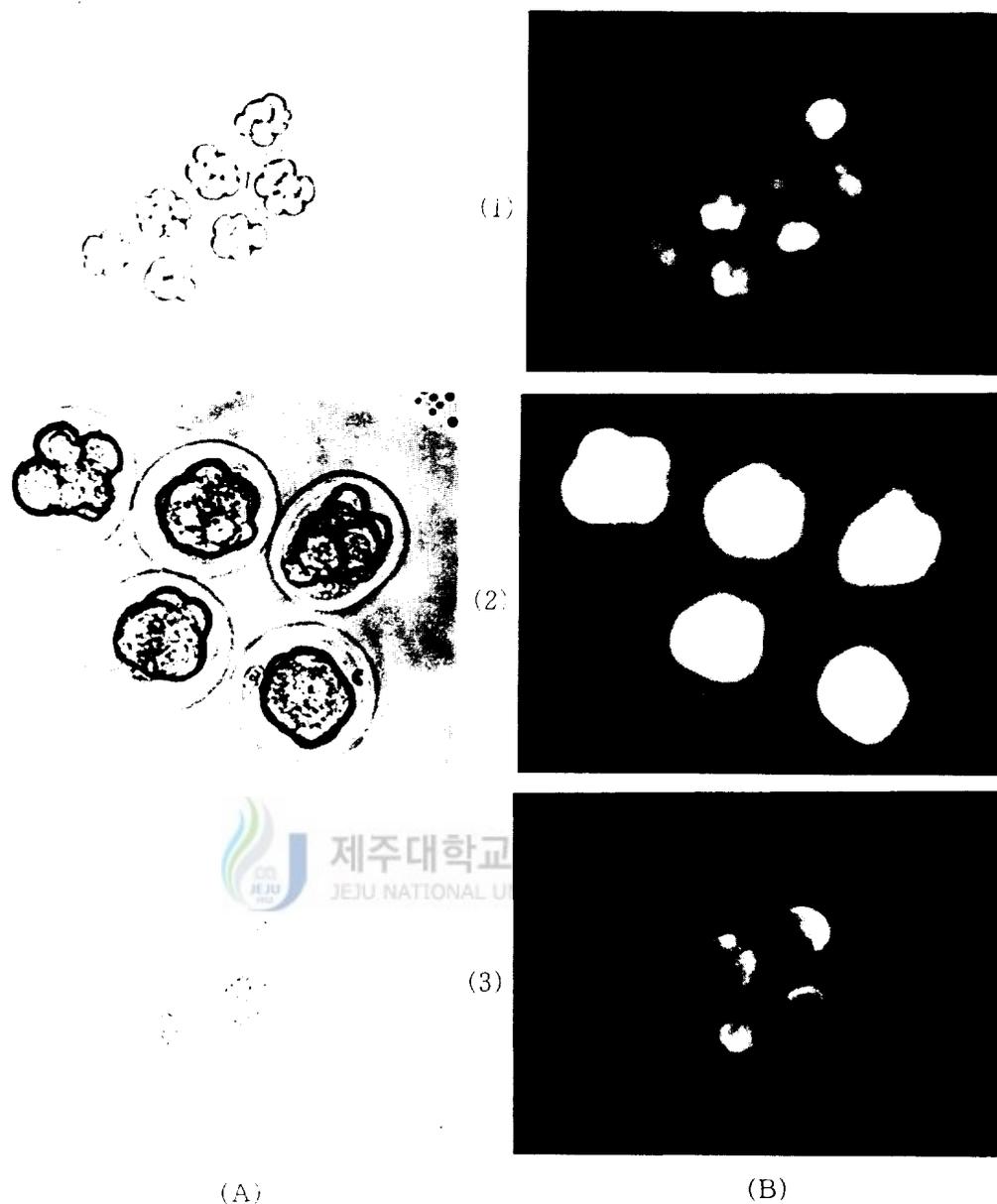


Plate 3. A phase-contrast(A) with observing fluorescence microscope(B) photograph of early morula(1, X100), morula(2, X200) and blastocysts(3, X100) stage mouse embryos exposed for 3 min to FDA and washed with PBS. The blastocoele of embryos did not fluoresce as brightly as the surrounding cells after exposure to FDA.

## V. 摘 要

本 試 驗 은 mouse 受 精 卵 을 利 用 하 여 液 體 窒 素 (container 內) 에 서 效 率 的 인 急 速 凍 結 方 法 을 提 示 하 기 위 하 여 耐 凍 劑 濃 度, 植 水 與 否, 受 精 卵 의 發 育 段 階 別 生 存 率, sucrose 代 用 으 로 서 raffinose 의 利 用 可 能 性 을 檢 討 하 고, 凍 結 前 後 受 精 卵 의 收 縮 과 膨 脹 을 顯 微 鏡 下 에 서 觀 察 하 여 얻 은 結 果 를 要 約 하 면 다 음 과 같 다.

1. 凍 結 液 과 耐 凍 劑 除 去 液 에 sucrose 0.3M 를 添 加 할 境 遇 glycerol 濃 度 에 따 른 FDA-score 는 1.5, 3.0, 4.0M 에 서 各 各 1.48, 3.81, 4.10 으 로 서 1.5M 과 4.5M 간 에 는 有 意 差 가 有 了 다 ( $P < 0.05$ ).
2. Raffinose 0.3M 를 凍 結 液 과 耐 凍 劑 除 去 液 에 添 加 할 때 glycerol 濃 度 에 따 른 FDA-score 는 1.5M 에 서 3.97, 3.0M : 4.11, 4.5M : 3.54 로 서 各 處 理 間 有 意 差 는 無 了 다.
3. Raffinose 를 凍 結 液 에, sucrose 를 除 去 液 에 添 加 하 였 을 때 glycerol 濃 度 에 따 른 FDA-score 는 1.5M, 3.0M, 4.5M 에 서 各 各 3.56, 4.28, 3.82 로 3.0M 에 서 優 秀 하 였 으 나 有 意 差 는 無 了 다. 또 한, sucrose 를 凍 結 液 에, raffinose 를 除 去 液 에 添 加 하 였 을 때 glycerol 濃 度 에 따 른 FDA-score 는 1.5M : 2.93, 3.0M : 4.11, 4.5M : 4.28 로 서 各 處 理 間 差 異 는 有 了 으 나 統 計 的 有 意 性 은 無 了 다.
4. 凍 結 液 과 除 去 液 에 添 加 한 sucrose 또 는 raffinose 의 濃 度 에 따 른 FDA-score 는 sucrose 處 理 에 서 0.3M : 3.12, 0.5M : 2.38, 1.0M : 0 를 나 타 내 였 고, raffinose 處 理 에 서 는 各 各 4.21, 2.91, 0 를 보 여, sucrose 와 raffinose 에 서 0.3M 이 優 秀 하 였 으 며, 1.0M 과 他 處 理 間 에 는 有 意 差 가 認 定 되 었 다 ( $P < 0.01$ ).
5. 緩 慢 凍 結 에 있 어 서 sucrose 또 는 raffinose 가 添 加 된 凍 結 液 을 利 用 할 때 FDA-score 는 sucrose 處 理 에 서 3.97, raffinose 處 理 가 2.41 로 有 意 差 를 보 였 으 나 ( $P < 0.05$ ), Co-seeding 과 N-seedin 간 에 는 有 意 差 가 無 了 다.
6. Sucrose 또 는 raffinose 가 添 加 된 凍 結 液 을 利 用 하 여 急 速 凍 結 할 때 는 sucrose 處 理 에 서 Co-seeding : 4.67, N-seeding : 4.20 이 였 고, raffinose 處 理 에 서 는

Co-seeding : 4. 27, N-seeding : 3. 97로서 處理間에는 有意差가 없었다.

7. 受精卵 發育段階別 生存率에 있어서는 sucrose 處理에서 early stage, morula stage, blastocyst stage가 各各 2. 65, 3. 82, 4. 94의 score를 보였고, raffinose 處理에서는 2. 32, 4. 47, 4. 91으로서 blastocyst stage가 優秀하였다( $P < 0. 05$ ).

8. 受精卵를 凍結液에 옮긴 後 5分 以內에 脫水 收縮되었으며, 15分 까지는 큰 變化가 없었다. 凍結融解後 受精卵를 耐凍劑 除去液으로 옮겼을 때는 分割球가 膨脹하였다가 收縮되면서 耐凍劑가 除去되는 것을 確認하였다. 耐凍劑 除去後 受精卵를 PBS液으로 옮겼을 때는 凍結前과 같은 크기로 分割球가 回復되었다.



## 參 考 文 獻

1. Bouyssou, B. and D. Chupin, 1982. Two-step freezing of cattle blastocysts with dimethyl sulfoxide(DMSO) or glycerol. *Theriogenology*, 17 : 159~166.
2. Bui-Xuan-Nguyen, N., Y. Heyman and J. P. Renard, 1984. Direct freezing of cattle embryos after partial dehydration at room temperature. *Theriogenology*, 22 : 389~400.
3. Bilton, B. J. and N. W. Moor, 1976. Effect of ice seeding and of freezing and thawing rate on the development of sheep embryos stored at  $-196^{\circ}\text{C}$ . *Theriogenology*, 6 : 635(abstr).
4. Bilton, R. J. and N. W. Moor, 1977. Successful transfer of frozen cattle embryos from New Zealand to Auatralia. *J. Reprod. Fert.*, 50 : 363~364.
5. Bielanski, A., V. Schneider, V. P. Pawlyshyn and R. J. Mapletoft, 1986. Factors affecting survival of deep frozen bovine embryos in vitro: The effect of freezing container and method of removing cryoprotectant. *Theriogenology*, 25 : 429~437.
6. 曹南基, 1987. 생쥐에 있어서 glycerol 平衡段階 및 凍結前 受精卵 狀態가 融解後 狀態에 미치는 영향. *韓國家畜繁殖學會報*, 11 : 122~126.
7. Critser, J. K., B. W. Arneson, D. V. Aaker, A. R. Huse-Benda and G. D. Ball, 1988. Factors affecting the cryosurvival of mouse two-cell embryos. *J. Reprod. Fert.*, 82 : 27~33.
8. 崔善昊, 李揆丞, 朴昌植, 徐吉雄, 1987. 생쥐 8細胞期 受精卵의 凍結保存에 關한 研究. *韓國家畜繁殖學會報*, 11 : 155~160.
9. Chupin, D. and R. Procureor, 1984. Glycerol equilibration for deep freezing of cattle blastocysts : Effect of number of steps and of total duration. *Theriogenology*, 21 : 230(abstr).

10. Chupin, D. and M. M. De Reviere, 1986. Quick freezing of rat embryos. *Theriogenology*, 26 : 157~166.
11. Elsdon, R. P., Seidel, G. E. Jr., T. Taketa and G. D. Farrand, 1982. Field experiments with frozen thawed bovine embryos transferred non-surgically. *Theriogenology*, 17 : 1~10.
12. Fahy, G. H., D. R. MacFarlane, C. A. Angell, H. T. Meryman, 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21 : 407~426.
13. 黃禹錫, 中川 明, 菱沼 貢, 高橋芳幸, 金川弘司, 1986. 마우스 切斷 2分離胚의 凍結 保存後의 生存性 について. *日本家畜繁殖誌*, 32 : 153~155.
14. Hsu, T. T., H. Yamakawa, J. Yamanoi and S. Ogawa, 1986. Survival and transfer test of mouse early embryos frozen by vitrification method. *Japan. J. Anim. Reprod.*, 32 : 29~32.
15. 陳東日, 任京淳, 吳鳳國, 李用斌, 1986. 凍害防止劑, 植氷, 凍結速度 및 保存期間 이 생쥐 初期胚의 生存性에 미치는 影響. *韓畜誌*, 28 : 474~479.
16. 金哲均, 1987. 家兔 受精卵의 凍結 및 融解方法 改善에 關한 研究. 濟州大學校 碩士學位論文.
17. Kennedy, L. G., M. P. Boland and I. Gordon, 1983. The effect of embryo quality at freezing on subsequent development of thawed cow embryos. *Theriogenology*, 19 : 823~832.
18. Krag, K. T., I. M. Koehler and R. W. Wright, Jr, 1985. A method for freezing early murine embryos by plunging directly into liquid nitrogen. *Theriogenology*, 23 : 199.
19. 金重桂, 李揆勳, 姜萬鍾, 金瑩勳, 吳雲龍, 康珉秀, 1988. 肉牛 受精卵 簡易 凍結 및 融解方法에 關한 研究. 第5報 : glycerol 耐凍劑에 sucrose 添加與否가 FDA-test에 依한 mouse 受精卵의 生存率에 미치는 影響. *韓國家畜繁殖學會報*, 12 : 65~71.

20. 金重桂, 李揆勳, 姜萬鍾, 金瑩勳, 文星浩, 金承浩, 1988. 肉牛 受精卵 簡易 凍結 및 融解 方法에 關한 研究. 第 6 報 : 耐凍劑에 sucrose 添加에 따른 液體室素 container에서 諸 凍結 方法이 mouse 受精卵 生存率에 미치는 影響. 韓國家畜繁殖學會報, 12 : 72~78.
21. 金重桂, 姜萬鍾, 金瑩勳, 張德支, 康珉秀, 金承浩, 1988. 肉牛 受精卵 簡易 凍結 및 融解 方法에 關한 研究. 第 七 報 : 液體室素 container에서 凍結時 諸 植氷 方法이 mouse 受精卵의 生存率에 미치는 影響. 韓國家畜繁殖學會報, 12 : 79~85
22. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani, 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. J. Reprod. Fert., 59 : 51~56.
23. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani, 1982. Survival of rat embryos after freezing. J. Reprod. Fert., 66 : 367~370.
24. Kono, T. and Y. Tsunoda, 1987. Frozen storage of mouse embryos by vitrification. Japan. J. Anim. Reprod., 33 : 77~81.
25. Kojima, T., Y. Tsunoda, N. Oquri, T. Soma and T. Sugie, 1984. Survival of frozen-thawed rabbit morula in the presence of ethylene glycol. Japan. J. Anim. Reprod., 30 : 50~53.
26. 金正翊, 梁富根, 南相榮, 任石基, 1985. 牛 受精卵의 凍結保存에 關한 研究 : II. 凍結保存 후 融解卵子的 生存性. 韓國家畜繁殖學會報, 9 : 36~39.
27. Leibo, S. P., 1983. A one-step in situ dilution method for frozen-thawed bovine embryos. Cryo-Letters., 4 : 387~400.
28. Leibo, S. P., 1984. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. Theriogenology, 21 : 767~790.
29. Leibo, S. P. and P. Mazur, 1978. Preservation of mammalian embryos by freezing. Academic Press, New York : 179~197.
30. Leibo, S. P., P. Mazur and S. C. Jackowski, 1974. Factors affection survival of mouse embryos during freezing and thawing. Exptl. Cell. Res.,

- 89 : 79~88.
31. Mazur, P., 1977. Slow freezing injury in mammalian cells. in : The freezing of mammalian embryos. Ciba Foun Symp. No. 52 : 19~45, Elsevier North-Holland, Amsterdam.
  32. Merry, D. A., R. L. Allen, K. Krag and R. W. Wright, Jr, 1983. Sucrose dilution of frozen mouse embryos : interaction of glycerol and sucrose concentration. Theriogenology, 20 : 325~332.
  33. 南直治郎, 細井美彦, 葛西孫三郎, 丹羽皓二, 八谷明, 1984. 耐凍剤および凍結融解法が -196℃に保存された家兎桑實胚の生存性に及ぼす影響. 日本家畜繁殖誌, 30 : 46~49.
  34. Miyamoto, H. and T. Ishibashi, 1977. Survival of frozen-thawed mouse and rat embryos in the presence of ethylene glycol. J. Reprod. Fert., 50 : 373~375.
  35. Miyamoto, H. and T. Ishibashi, 1978. The protective action of glycerol against freezing damage of mouse and rat embryos. J. Reprod. Fert., 54 : 427~432.
  36. Miyamoto, H. and T. Ishibashi, 1979. Effects of low temperatures on survival of frozen-thawed mouse embryos. Experientia 35 : Birkhauser Verlag, Basel(Schweiz). 1505~1506.
  37. Miyamoto, H. and T. Ishibashi, 1983. Solid Co<sub>2</sub> freezing of mouse embryos. J. Reprod. Fert., 67 : 107~111.
  38. Miyamoto, M. and T. Ishibashi, 1986. Liquid nitrogen vapour freezing of mouse embryos. J. Reprod. Fert., 78 : 471~478.
  39. 宮本 元, 宮本庸平, 石橋武彦, 1986. 液體窒素カス急速凍結法で凍結したマウス胚の生存性に影響をおよぼすいくつかの要因. 日本家畜繁殖誌, 32 : 36~41.
  40. 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.
41. Niemann, H. . 1985. Freezing of bovine embryos : Effects of a one-step dilution of 1.4M glycerol. *Theriogenology*, 23 : 369~379.
  42. 長嶋北昂志, 藤倉 朗, 尾川昭三, 1982. マウスと家兎の2細胞期胚より分離した単一割球の發達能および凍結生存性に關する研究. *日本家畜繁殖誌*. 28 : 20~23.
  43. 盧煥喆, 鄭廣業, 申圭容, 鄭柄鉉, 白雲和, 鄭吉生, 1988. 牛凍結受精卵의 産業的利用에 關한 研究. *韓畜誌*, 30 : 151~159.
  44. 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.
  45. Renard, J. P. , Y. Heyman and J. P. Ozil, 1981. Freezing bovine blastocysts with 1,2 propanediol as cryoprotectant. *Theriogenology*, 15 : 113.
  46. Renard, J. P. , B. X. Nguyent and V. Garnier, 1984. Two-step freezing of two-cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. *J. Reprod. Fert.*, 71 : 573~580.
  47. Rall, W. F. , M. J. Wood, C. Kirby and D. C. Whittingham, 1987. Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *J. Reprod. Fert.* , 80 : 499~504.
  48. Schneider, H. and P. Mazur, 1984. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thaw embryos. *Theriogenology*, 21 : 68~79.
  49. 鈴木達行, 下平乙夫, 1985. ウシ凍結受精卵用の1段階ストロー法の改良. *日本家畜繁殖誌*, 3 : 28~29.
  50. Széll, A. and J. N. Shelton, 1986 a. Sucrose dilution of glycerol from mouse

- embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. *J. Reprod. Fert.*, 76 : 401~408.
51. Széll, A. and J.N. Shelton, 1986 b. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 78 : 699~703.
  52. Széll, A. and J.N. Shelton, 1987. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solutions on Day-3 mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 80 : 309~316.
  53. 鈴木達行, 下平乙夫, 藤山雅照, 1983. ウシ凍結 受精卵の1段階 ストロー法による移植. *日本家畜繁殖誌*, 29 : 162~163.
  54. 鈴木達行, 下平乙夫, 酒井 豊, 松田修一, 三浦秀夫, 伊藤一伸, 1986. 改良したウシ凍結受精卵の1段階 ストロー法による野外での非手術的移植. *日本家畜繁殖誌*, 32 : 74~79.
  55. Schmidt, P.M., C. Schiewe and D.E. Wildt. 1985. Variables influencing post-thaw embryo survival rates in mice. *Theriogenology*, 23 : 229.
  56. 浦野造司, 高橋芳幸, 金川弘司, 1986. 凍結融解後のマウス胚生存性に及ぼす各種凍結保護剤の効果. *日本家畜繁殖誌*, 32 : 130~132.
  57. Wilmut, U., 1972. The effects 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.
  58. Whittingham, D.G., 1975. Survival of rat embryos after freezing and thawing. *J. Reprod. Fert.*, 43 : 575~578.
  59. Whittingham, D.G. and C.E. Adams. 1976. Low temperature preservation of rabbit embryos. *J. Reprod. Fert.*, 47 : 269~274.
  60. Wood, M. and J. Farrant, 1980. Preservation of mouse embryos by two-step freezing. *Cryobiology*, 17 : 178~180.
  61. Williams, T.J. and S.E. Johnson, 1985. Quick-freezing of day four mouse

- embryos. Theriogenology, 23 : 235.
62. Williams, T. J. and S. E. Johnson, 1986. A method for one-step freezing of mouse embryos. Theriogenology, 26 : 125~133.
63. Whittingham, D. G., S. P. Leibo and P. Mazur, 1972. Survival of mouse embryos frozen to  $-196^{\circ}\text{C}$  and  $-296^{\circ}\text{C}$ . Science, 178 : 411~414.
64. Whittingham, D. G., M. Wood, J. Farrant, H. Lee. and J. A. Ealsey, 1979. Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from  $-196^{\circ}\text{C}$ . J. Repord. Fert., 56 : 11~21.
65. 柳俊熙, 李在根, 1984. Rat 受精卵의 凍結保存에 있어 凍結速度 및 凍結防止劑에 관한 研究. 韓國家畜繁殖研究會報. 8 : 22~28.
66. 尹道重, 李揆丞, 朴昌植, 徐吉雄, 1987. 凍結速度와 浸漬溫度가 hamster 受精卵의 生存性에 미치는 影響. 韓國家畜繁殖學會報, 11 : 161~167.



## 謝 辭

本 試 驗 的 遂 行 과 論 文 을 提 出 하 기 까 지 부 족 함 이 많 았 던 저 를 끝 까 지 자 상 하 게 指 導 鞭 撻 을 해 주 신 指 導 教 授 金 重 桂 博 士 님 께 眞 心 으 로 感 謝 를 드 립 니 다. 또 한, 未 洽 한 本 論 文 을 校 閱 하 여 주 신 鄭 昌 朝 博 士 님, 康 珉 秀 博 士 님 을 비 롯 한 畜 産 學 科 여 러 教 授 님 께 깊 은 感 謝 를 드 립 니 다.

그 리 고 試 驗 遂 行 에 많 은 도 움 을 주 신 放 射 能 利 用 研 究 所 柳 長 杰 博 士 님, 宋 成 俊 先 生 님 께 感 謝 드 립 니 다. 바 쁠 일 과 중 에 서 도 本 試 驗 的 進 行 을 도 와 준 繁 殖 學 研 究 室 學 兄 들 과 畜 産 學 科 大 學 院 學 兄 그 리 고 親 友 들 께 感 謝 한 마 음 을 전 합 니 다.

끝 으 로 오 늘 이 있 기 까 지 따 뜻 한 사 랑 으 로 지 켜 봐 주 신 할 머 님, 父 母 님, 형 님 내 외 분 과 동 생 그 리 고 사 랑 하 는 아 내 에 게 이 작 은 기 뻔 을 드 립 니 다.

