
碩士學位論文

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 大學院

畜産學科



1987年 月 日

家兔 受精卵의 凍結 및 融解方法
改善에 關한 研究

指導教授 金 重 桂

金 哲 均

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함

1987年 12月

金哲均의 農學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____

委 員 _____

委 員 _____

濟州大學校 大學院

1987年 12月

IMPROVEMENT OF FREEZING AND THAWING
PROCEDURES FOR RABBIT EMBRYOS.

Cheol-Gyoun Kim
(Supervised by Professor Jung-Kye Kim)

 제주대학교 중앙도서관
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY
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

1987

目 次

Summary	1
I. 緒 論	3
II. 研 究 史	4
1. 過排卵誘起	4
2. 耐凍劑, 添加 및 除去方法	4
3. 凍結方法	6
4. 植永 (seeding)	8
5. 融解方法	8
6. 受精卵의 生死判定	9
III. 材 料 및 方 法	10
1. 供試材料	10
2. 試驗方法	10
IV. 結 果 및 考 察	16
1. 過排卵誘起	16
2. 耐凍劑의 添加 및 除去	20
3. 凍結過程	21
V. 要 約	29
VI. References	30

List of Tables

Table 1. Composition of flushing media	12
Table 2. Effects of dose levels of PMSG treatment on ovarian size	16
Table 3. Effects of dose levels of PMSG treatment on number of follicles	17
Table 4. Effects of dose levels of PMSG treatment on blood follicles of ovary	18
Table 5. Effects of dose levels of PMSG treatment on ovulation point and recovery rate	19
Table 6. Effects of the cryoprotectant dilutions frozen by LN ₂ container development of rabbit embryos after culture	20
Table 7. Effects of the procedures of glycerol dilution with sucrose on survival of rabbit embryos after culture	21
Table 8. Effects of various freezing rate and cryoprotectants on survival of rabbit embryos after culture	22
Table 9. Effects of various freezing methods using LN ₂ container on the survival of rabbit embryos after culture in glycerol cryoprotectant	23
Table 10. Effects of various freezing procedures with 10% sucrose by liquid nitrogen vapour(container) on embryo survival evaluated by FDA test in rabbit	24
Table 11. Effects of various seeding procedures on the survival of rabbit embryos containing 10% glycerol after culture	25

Table 12. Effects of seeding procedures with 10 % sucrose on embryo viability evaluated by FDA test in rabbit	26
Table 13. Effects of thawing temperature with 10 % glycerol on the of rabbit embryos after culture	27
Table 14. Effects of the thawing temperature with cryoprotectant contained 5 % sucrose on the survival of rabbit embryos after culture	28



Summary

Studies were conducted using rabbit embryos to improve the embryo-transferring technique by simplifying the conventional freezing and thawing procedures. The effects of PMSG levels on superovulation, and of freezing and thawing methods on the embryo survival rate were determined. The summarized results are the following.

1. Ovulation points(recoveries) per rabbit injected with 200 IU, 100 IU and 100IU (divided into two injections 50 IU/day for two days) were 13.1 (81%), 21.7 (94%) and 19.1 (86%), respectively.
2. Survival rates of embryos frozen in a cryoprotectant containing 1.4M, DMSO or 10% glycerol were 53 or 59%, respectively. Survival rates of embryos frozen in a single-step addition and a 3-step addition of the cryoprotectant were 60 and 54%, respectively.
3. Survival rates of embryos frozen in the cryoprotectant containing 10% glycerol in a liquid nitrogen container to -70°C at $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and then at 0.3, 3, $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and directly into -196°C were 78, 71, 62 and 63%, respectively.
4. Survival rates of embryos frozen in various methods and thawed in water at 38° or 5°C were 62 or 55%, respectively.
5. Survival rates of embryos from which the cryoprotectant was removed with a single-step or 3-treatment of PBS solution containing 5% sucrose were 75 or 70%, respectively.
6. 3',6'-diacetyl fluorescence (FDA) test scores on embryos treated with a single step of the cryoprotectant containing 10% sucrose and frozen at the rate of $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ frozen at the rate of 3, $15^{\circ}/\text{min}$ and directly into -196°C in a liquid N_2 container were 3.1, or 3.2, 3.3 and 3.0, respectively.
7. FDA test scores on embryos treated with a single step of the cryoprotectant containing 10% sucrose and frozen with the methods of non-seeding, pincette-seeding or Co-seeding, and thawed were 3.2, 2.8 or 3.0, respectively.

8. The results of the above studies indicated that: 1) the optimum PMSG level for superovulation was a single injection of 100 IU. 2) the addition of 10% glycerol to the cryoprotectant was better than that of 1.4M, DMSO, and the single-step addition of 10% glycerol was better than the 3-step addition. 3) a lower rate of freezing (0.3°C/min) was better than the higher rates ($p < 0.05$), but the higher rates were also acceptable in contrast to the previous reports, 4) thawing at 38°C was better than that at 5°C, and 5) Among the seeding methods used, use of the pincette-seeding resulted in the lowest FDA test score on embryos.



I. 緒 論

最近 優秀한 家畜의 能力 增進을 爲하여 受精卵移植에 대한 研究가 活發하게 進行되고 있으나, 供卵畜과 受卵畜의 發情 同期化, 遠距離 輸送 등 많은 問題點이 提起되고 있다. 受精卵의 凍結 成功은 受精卵 移植에 劃期的인 發展을 가져오게 되었다.

그러나 受精卵 凍結에 있어서 耐凍劑의 選定 添加 및 除去, 凍結速度 및 方法, 融解 溫度, 受精卵의 生死 判定 등에 對하여 많은 研究者들에 의한 研究가 進行되고 있으나, 아직도 뚜렷한 方法을 提示하여 주지 못하고 있다.

따라서 本 研究는 受精卵의 凍結 및 融解 등 複雜한 造作過程을 簡便하고 容易한 方法으로 實用化하기 爲해 家兎를 利用해서 過排卵 誘起를 위한 hormone 水準을 確立하고, 液體窒素 container만을 使用하여 凍結 融解 및 受精卵 生死 判定 등에 對한 試驗을 實施하였다.



II. 研究 史

家畜의 凍結 受精卵에서는 1972年 whittingham이 mouse의 受精卵을 -196°C 까지 凍結한 다음 融解하여 移植한 結果 65%의 受胎率을 얻은 後부터 많은 學者들의 關心을 불러 일으키게 되었다.

凍結 受精卵의 移植 技術에서 現在 問題가 되고 있는 것은 過排卵 誘起時 hormone의 投與量 및 方法, 凍結保存液, 耐凍劑添加 및 除去方法 그리고 融解溫度 등이며, 특히 融解後 卵子の 生死判定과 移植後 受胎率 向上 등, 여러가지 課題에 대한 研究가 進行되어 왔다.

1. 過排卵 誘起

過排卵 誘起를 위한 PMSG의 處理水準에 對해서 金 등(1974)은 家兔에서 50IU씩 1日 1回 4日間 總 200IU를 筋肉內 注射함과 同時에 交尾를 시키고 48時間 後에 開腹手術하여 卵胞數 30.9個, 血胞 22.6個, 排卵點 22.8個, 卵子回收率 83.3%였으며, 韓(1984)도 40IU를 1日 1回 5日間 200IU를 處理하여 卵胞數 27.3個, 血胞 10, 2個, 排卵點 19.4個, 回收率 77%의 結果를 얻었다고 하였다.

그리고 金(1970)에 의하면 PMSG 200IU를 單一處理하였을 때 血胞 13.6個, 排卵點 9.2個, 卞 등(1984)은 排卵點 26~28.6個였다고 하였다.

그러나 梁 등(1983)은 PMSG 100IU를 1回 皮下 注射하여 卵胞數 33.3個, 排卵點 25.4個, 回收率 81.9%로서 150IU 處理區의 回收率 64.9%보다는 높았다고 報告하였다.

2. 耐凍劑 添加 및 除去

1) 1.5M. DMSO를 添加劑로 했을때 家兔受精卵의 凍結 및 融解後 48時間 培養한 結果 受精卵의 生存率은 Bank와 Maurer(1974)가 47~67%, Whittingham과 Adams(1976) 54%, Kojima et al (1984)은 88%의 成績을 보였다고 하였다.

그리고 金 등(1983)은 220個의 卵子를 凍結 融解한 結果 165個(85.5%)가 正常卵

子였고, 移植한 後 45~54%의 産仔數를 얻었으며, Tsunoda와 Sugie(1977)도 融解後 培養하여 76%의 生存率과 移植後 64%의 分娩率을 發表하였다.

2.0M. DMSO 添加時에는 Maurer와 Haseman(1976)에 의해서 培養後 73%의 生存率을 報告한 바 있다.

그런데 Renard(1984)는 家兎受精卵을 DMSO에 sucrose를 添加하여 凍結 融解한 結果 95.4%, Kasai et al(1980)도 mouse에서 82%의 높은 生存率을 提示하여 주었다.

2) 10% glycerol 添加時 embryos의 凍結 融解後 生存率은 mouse에 있어서 Mer-ry et al(1983)이 培養後 48.8%인데 比하여, Miyamoto et al(1986)은 84%의 높은 生存率을 報告하고 있다.

더우기 Massip et al(1984)에 의하면 glycerol에 sucrose를 添加하여 mouse 受精卵을 凍結 融解後 培養하여 85.7%, William과 Johnson(1985) 84%였으나, Krag et al(1985)은 65%의 生存率을 提示하므로써 glycerol에서도 sucrose를 添加한 것이 受精卵의 生存率을 향상시켰다고 發表하고 있다(Marry et al. 1983).

Parkening et al(1976)에 의하면 glycerol보다 DMSO를 處理한 것이 受精卵 生存率이 좋다고 하였고, Miyamoto와 Ishibashi(1979)는 DMSO와 glycerol이 비슷한 結果를 報告하였다.

이에 反하여 Bilton과 Moore(1977), Schmidt et al(1985), 陳 등(1986)은 glycerol이 DMSO보다 mouse 受精卵 生存率이 良好하다고 報告하였다.

3) 耐凍劑 添加 方法은 1段階, 3段階, 5段階, 6段階로 많은 學者들이 報告하는 등 研究者에 따라서 差異가 있다.

DMSO의 3段階 添加 方法에 對해서 Bank와 Maurer(1974)는 家兎受精卵을 凍結 融解後 培養하여 47~67%의 生存率을 發表하였으며, 金 등(1983)은 凍結 融解하여 移植한 結果 45~55%의 分娩率을 提示하였고, Maurer와 Haseman(1976)은 73%의 生存率과 Kojima et al(1984)에 의하면 50%의 家兎 血清을 添加시켜 88%의 生存率 向上을 報告한 바 있다.

그런데 Renard et al(1984)과 Kasai et al(1980)은 DMSO에 sucrose를 添加하여 1段階 方法으로 凍結 融解後 培養시켜 各各 88%와 82%의 生存率을 報告했으며, Frank et al(1986)에 의하면 glycerol과 DMSO液으로 bovine 受精卵을 3段階와 1段階로 24時間 培養 結果 3段階는 10.7%의 生存率과 1段階에서는 11.2%의 낮은 生存率을 보여, 3段階와 1段階로 添加하는 것이 受精卵의 生存率에 差異가 없다고

하였다.

glycerol의 3段階 添加 方法에 依해서 Parkening et al(1976)이 mouse 受精卵을 凍結 融解 培養後 79%의 生存率을, 移植한 結果는 38%의 分娩率을 報告하였고, Schmidt et al(1985)은 65%의 生存率을 發表하였다.

한편 Niemann(1982)에 依하면 glycerol에 sucrose를 添加했을 때 1段階 方法으로서는 牛의 受精卵인 경우 凍結 融解하여 培養한 結果 83.3%의 生存率을, Nieman(1983)은 mouse 受精卵에서 84~86%, rat 受精卵에서 96.4%(Chupin과 De Reviere, 1986)의 높은 成績을 發表한 바 있다.

3. 凍結 方法

受精卵의 凍結 速度에 있어서는 緩慢 凍結(0.3~1°C/min), 級緩慢 凍結(1~3°C/min), 急速 凍結(3~15°C/min), 超急速 凍結(液體窒素 上面에서 直接 凍結) 등으로 區分할 수 있다.

1) 緩慢 凍結

Bank와 Maurer(1974), Whittingham과 Adams(1976) 등은 家兔 受精卵을 分當 1°C 下降시켜 凍結 融解後 47~67%의 生存率을, Tsunoda와 Sugie(1976)도 76%의 生存率과 移植後 64%의 分娩率을 發表하고 있다.

sucrose 添加에 關해서 Massip et al(1984)은 mouse 受精卵에 1.36M. glycerol에 0.25M. sucrose를 添加하여 分當 0.3°C씩 凍結 融解시켜서 85.7%의 높은 生存率을 얻었는데 比하여 Lehn-Jensen(1983), Leib(1985) 등은 牛 受精卵에서 44% 前後의 낮은 生存率을 報告하였다.

2) 急緩慢 凍結

Bank와 Maurer(1974), Tsunoda와 Sugie(1977)에 依하면 家兔 受精卵을 1~3°C/min 速度로 凍結 融解後 47~67%의 生存率을, whittingham(1975)은 rat 受精卵에서 22~51%의 生存率을, 柳와 李(1984), wilmot(1972), Forgrave et al(1980)은 mouse 受精卵에서 61%의 生存率을 發表하였다.

3) 急速 凍結

Whittingham(1975)은 rat 受精卵에서 6°C/min로 凍結 融解하여 20%의 生存率을 報告하였으나, sucrose를 添加하므로써 Kasai et al(1980)은 mouse 受精卵을 17°C/min로 凍結 融解하여 82%의 生存率을 提示하여 주었으며, Renard(1984)도 家兔 embryos에서 12°C/min로 凍結 融解後 88%의 높은 生存率을 發表하므로써 急速 凍結에서도 sucrose 添加에 依한 生存性 向上을 示唆하였다.

4) 超急速 凍結

最近에 와서 Chupin과 De Reviers(1986), Williams와 Johnson(1985) 등은 glycerol에 sucrose를 添加後 液體窒素에 直接 넣어서 凍結한 다음 融解하여 各各 79.6%와 84%의 生存率을 發表하였다.

5) 凍結 方法

凍結 方法에서는 dry ice 凍結, Cell-freezer 凍結, LN₂ container에서 凍結하는 方法 등으로 分類할 수 있다.

dry ice 凍結 方法에 있어서 Maurer와 Haseman(1976), 金 등(1983)은 家兔 受精卵을 分當 1.6°C씩 -75°C까지 下降시켜 各各 73%와 76%의 生存率을, mouse 受精卵에서 Whittingham(1971), Niwa et al(1979) 등도 1°C/min로 -79°C까지 凍結 融解後 67~69.1%의 生存率을 發表하였다.

Cell freezer의 凍結 方法에 關해서 Nakagata와 Toyoda(1980), Miyamoto와 Ishibashi(1978)에 의하면 82~86%의 높은 生存率을 報告한데 반하여 Bank와 Maurer(1974)는 47~67%의 生存率 밖에 안되었다고 發表하고 있다.

그런데 Renard et al(1984)에 依해서 耐凍劑에 sucrose를 添加한 後 急速 凍結시킨 結果 88%의 높은 生存率을 發表한데 反하여, 陳 (1986)은 1°C/min로 凍結 融解하여 36.4~49%(Massip et al; 1979)와 3°C/min로 凍結한 것은 13.2~16.9%의 낮은 生存率을 報告하고 있다.

또한 rat 受精卵에서 Kasai et al(1979)에 의하면 1.5M. DMSO에서는 38%의 生存率을 얻었으나, DMSO에 sucrose를 添加한 것은 58%로 sucrose를 添加하는 것이 受精卵의 凍結後 生存率에 有利하다고 하였다(Kasai et al 1980, 1983, Marry et al 1983).

Miyamoto et al(1986)도 耐凍劑에 sucrose를 添加하여 緩慢 凍結에서는 93%, dry ice 凍結은 88%, 液體窒素 container에서 凍結도 65%의 生存率을 報告하여 container에서 生存率은 減少하였으나, 卵자의 LN₂ container에서 直接 凍結可能性을 보여주었고, Chupin과 De Reviers(1986)는 sucrose를 添加하여 液體窒素에 直接 凍結時 48.8%의 生存率 그리고 container의 入口(5~6cm)에서 5分間 停滯後 液體窒素에 沈漬해서 76.9%의 生存率을 發表하였다.

4. 植氷(Seeding)

植氷은 自動植氷, 핀셋 植氷 그리고 植氷을 하지 않는 것 등으로 分類할 수 있다.

植氷을 하는 理由로서는 細胞에 해로운 過冷却을 짧게 하며 人爲적으로 straw上部層에 氷結晶을 만들게 하여 氷結晶時 潛在熱이 發散하여 sample의 溫度를 上昇시키게 하는 plateau 現象을 일어나지 않게 하는 것이다 (Leibo와 Mazur, 1978; Schneider와 Mazur, 1984).

Mauer와 Haseman(1976), 金 등(1983), Kojima et al(1984)은 -5°C에서 핀셋으로 植氷을 하여 37%의 낮은 生存率을, 尹과 鄭(1984), 陳 등(1986)에 의하면 -5~-7°C에서 植氷한 結果 46~60%의 生存率을 얻었다고 하였으며, Nakagata와 Toyoda(1980), Miyamoto와 Ishibashi(1979) 등은 82~88%의 높은 生存率을, Masip et al(1984)에 의하면 凍結液에 sucrose를 添加하여 植氷한 結果 85.7%의 生存率을 報告하였다.

또한 Miyamoto et al(1986)에 의하면 植氷한 것은 生存率 73~82%였으며, 植氷하지 않는 것은 57~61%의 生存率을 얻음으로써 植氷한 것이 좋다고 하였다. 그런데 Bui-Xuan-Nguyen et al(1984)은 凍結液에 sucrose를 添加하면 sucrose에 의해서 受精卵은 凍結하기 前에 脫水되기 때문에 植氷하지 않고 急速 凍結하더라도 受精卵은 死滅하지 않는다고 하였다.

5. 融解 方法

融解 方法에는 多様な 方法을 實施하고 있으나 一般的으로 急速(38°C)과 緩慢(5°C) 融解方法을 現在 많이 利用되고 있다. Bank와 Maurer(1974)는 10°C/min의

외로 融解하여 培養後 낮은 生存率을 發表하였고, Schmidt(1985)에 의하면 35°C에서 急速 融解한 結果 65~75%의 生存率을(Whittingham, 1971; 1979; Krag, 1985), Renard et al(1984)은 38°C에서 急速 融解하여 84~88%의 높은 生存率을 報告하였다(Williams와 Jehnsen, 1985; Massip et al, 1984).

한편 Kasai et al(1979)은 0°C에서 보다 37°C에서 融解하는 것이 embryos의 生存率이 向上되었다고 하였다.

6. 受精卵의 生死判定

融解後 卵자의 生死 判定은 5% CO₂ incubator(37°C)에서 48時間 培養後 受精卵의 分割狀態를 調査하여 生存을 認定하거나, 螢光顯微鏡을 利用한 FDA-test로 判定할 수 있다.

Schmidt et al(1985)은 10% glycerol로 mouse 受精卵를 凍結 融解하여 FDA-test를 實施하여 65%의 生存率을, Bielanski et al(1986)은 소의 受精卵에 sucrose를 添加하여 緩慢 凍結 融解後 FDA-test를 施行한 結果 90%의 生存率을 發表하였다. 그리고 Shiling et al(1982)은 FDA-test가 顯微鏡보다 受精卵 生死 判定에 있어서 正確하고 빠르다고 報告하였다.



Ⅲ. 材料 및 方法

本 試驗은 1986年 4月부터 1987年 8月까지 濟州大學校 畜産學科 繁殖學 試驗室과 濟州大學校 附說 放射能 利用 研究所에서 實施하였다.

1. 供試材料

1) 供試動物

供試動物은 日本白色種 100頭와 Chinchilla 50頭 計 150頭를 放射能 利用 研究所 家兔 飼養室에서 飼育하면서 本 試驗에 利用하였다.

2) Hormones

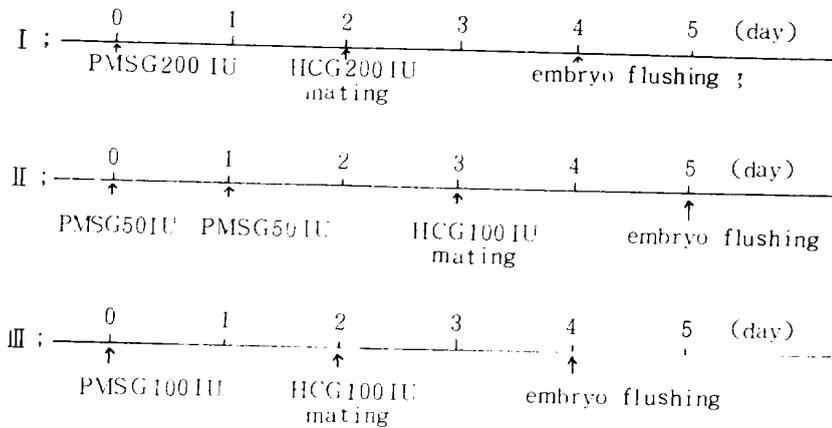
過排卵誘起에 使用된 hormone劑는 Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG, 三共社, 日本)과 Human Chorionic Gonadotropin(HCG, 三共社, 日本)을 使用하였다.

4) 主要 器具

- 
- (1) 實體顯微鏡 2臺(Olympus, Japan)
 - (2) 位相差螢光顯微鏡 1臺(Nicon, TMD-diaphat)
 - (3) Cell-Freezer 1臺(R204, Planner Product, Englaul)
 - (4) 30ℓ LN₂ Container(Union Carbide, U.S.A)
 - (5) 5% CO₂ incubator(Lee, Limited, private Rd, Colwick, Nottingham)
 - (6) 無菌相 1臺
 - (7) 手術세트 1組

2. 試驗方法

- 1 過排卵誘起는 다음과 같이 三段階로 處理하였다.



I. PMSG 200IU를 皮下注射하고 48時間後 HCG 200IU를 注射하면서 自然交尾 시킨 다음, 48~52時間 사이에 採卵 하였음.

II. PMSG 50IU(2日間)를 皮下注射를 實施하고 HCG 100IU 注射後 自然交尾 시켜 48~52時間 사이에 採卵을 施行하였음.

III. PMSG 100IU를 皮下 注射하고 48時間 後에 HCG 100IU를 皮下注射하면서 自然交尾 시킨 다음 48~52時間 사이에 採卵하였음.

2) 採卵

Hormone 處理後 自然交尾 시켜 48~52時間 사이에 試驗室內 手術臺에서 開腹 手術하여 2~3ml의 PBS液으로 受卵管과 子宮을 洗滌하여 採卵하였다. 이 때에 使用한 卵子回收用 灌流液(flushing medium)은 modified Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)을 造劑하여 使用하였는데 그 造成은 Table 1과 같다.

3) 受精卵의 鑑別

採卵된 受精卵은 無菌上에서 40~80倍의 實體顯微鏡 下에서 形態的으로 좋은 卵子만을 凍結에 利用하였고, 未受精卵 및 形態的 異常卵은 使用하지 않았다.

4) 培養液 製造

培養液은 PBS에 20%의 家兎 血清을 添加하고 0.22 μ m의 millipore filter로 濾過하여 利用하였다.

Table 1. Composition of flushing media.

Component	Concentration
CaCl ₂	0.1 g
MgCl ₂	0.1 g
NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Sodium pyruvate	0.036 g
Glucose	1.0 g
Bovine serum albumin	1.0 g
Streptomycin sulfate	50 μg/ml
Penicillin G	100 IU/ml
Distilled water	1,000 ml

本 試驗에 使用한 家兔 血清은 心臟에서 採血(30~50cc)하여 2500r.p.m으로 15分 間 遠心 分離한 血清을 56°C 恒溫器에 30分間 非働化시킨 다음 -20°C에 保存하였 다가 使用하였다.

5) 凍結液의 添加 및 除去

凍結液은 10% glycerol과 1.5M. DMSO을 0.22 μm 濾過池로 濾過한 다음, 다음 과 같은 段階로 凍結液을 添加 및 除去하였다.

(1) 1段階 添加 및 除去(1-S)

1段階는 受精卵이 있는 培養液 1ml에 凍結液을 0.2ml, 0.4ml, 0.4ml, 1ml, 2ml 을 5分 間隔으로 徐徐히 添加하였고, 除去는 培養液을 添加할 때와 같은 方法으로 實施하였음.

(2) 3段階 添加 및 除去(3-S)

3段階는 3%, 6%, 10%의 glycerol 凍結液을 5~10分 間隔으로, DMSO 凍結液의 경우도 0.5M, 1.0M, 1.5M.를 5~10分 間隔으로 卵子を 옮겨서 平衡되도록 하였 고, 除去는 添加의 逆順으로 하였다.

(3) sucrose 添加

glycerol 凍結液에 10% sucrose을 添加한 凍結液에 受精卵을 直接 平衡하였다.

6) 受精卵 注入

凍結液에 平衡이 된 受精卵을 0.5ml plastic straw 內에 Fig.1처럼 注入하였다.



Fig 1. Freezing apparatus with straw loaded as indicated;

- a) cotton plug
- b) freezing solution(10% glycerol + 10% sucrose + PBS + 20% serum)
- c) air bubble
- d) freezing solution + embryos
- e) straw powder plug

7) 凍結

卵子的 凍結은 Cell-freezer와 30ℓ LN₂ container를 利用하였고, 다음과 같이 區分하여 凍結 시켰다.

(1) I-F

常溫에서 -7°C까지는 1°C/min씩 下降시킨 後 植氷(seeding)하고 5分 동안 停滯한 다음 -35°C까지는 0.3°C/min씩 凍結하여 液體 窒素 container에 直接 沈漬 貯藏 시켰음.

(2) II-F

-7°C까지는 "I-F"와 같고 -35°C까지는 3°C/min씩 下降시킨 다음 -80°C까지는 5°C/min씩 凍結하여 液體 窒素 container에 直接 沈漬 保管 하였음.

(3) III-F

-7°C까지는 "I-F"와 같고 -80°C까지는 15°C/min씩 凍結하여 液體 窒素에 貯藏 시켰음.

(4) IV-F

-7°C까지는 "I-F"와 같고 液體 窒素 表面에 5分 동안 停滯後 液體 窒素에 保管 하였음.

8) 植氷(seeding)

(1) Pincette seeding: -7°C 에서 液體窒素에 沈漬했던 핀셋으로 受精卵이 들어있는 straw의 上位部를 接觸시켜 植氷을 實施 하였음.

(2) Copper wire seeding: 1mm의 銅線을 straw에 감아서 LN_2 gas로 自動植氷되게 하였음.

(3) non seeding: 植氷을 하지 않았음.

9) 融解

LN_2 container內 貯藏(約 1個月 以上) 시켰던 straw의 融解方法은 5°C ($240^{\circ}\text{C}/\text{min}$) 冷水와 38°C ($500^{\circ}\text{C}/\text{min}$) 溫水에서 氷片이 완전히 녹았을 때 꺼내어 徐徐히 室溫과 同一하게 되도록 하였음.

10) CO_2 incubator 培養

融解後 受精卵의 培養은 直徑 5cm의 plastic petri dish에 paraffin oil(10ml)을 넣은 다음 0.02ml 培養液 小滴 5~6個를 低面에 附着시키고 그 內部에 1個의 受精卵을 집어 넣고 5% CO_2 incubator(37°C)에서 培養시켰다.

11) 受精卵의 生死 判定

(1) 培養한 受精卵은 80倍의 實體顯微鏡下에서 24時間 및 48時間에 受精卵의 分割 狀態의 發達如否를 觀察하여 生死를 判定 하였음.

(2) FDA-test

가. 受精卵이 外形的 判斷을 하기 위하여 200~300倍의 螢光位相差顯微鏡으로 卵子 外貌와 分割 狀態를 判斷 하였음.

나. 3', 6'-diacetyl fluorescence(FDA) 1mg을 acetone 1ml에 녹인 다음 이것을 PBS液에 600,000배 1로 稀釋(pH 7~7.4)하여 受精卵을 넣고 常溫에서 3~5分 동안 培養하고, FDA가 없는 PBS液에 옮긴 後 200倍 位相差螢光顯微鏡에서 다음과 같은 score를 주어 平均點數를 求하였음.

다. 生死 判定(score)

P-5: 受精卵의 分割球 全體가 綠色 螢光을 發散하는것(5點).

P-3: 受精卵 分割球 中 50~90%가 綠色 螢光을 띠고 있는것(3點).

- P-1: 50% 以下の 分割球가 綠色螢光을 發散하고 있는것(1點).
- N: 綠色 螢光이 전혀 띠지 않고 어둡게 보이는것(0點).



IV. 結果 및 考察

1. 過排卵 誘起

家兔의 過排卵을 目的으로 PMSG의 注入量과 投與方法을 달리하였을 때 卵巢의 크기, 卵胞數, 血胞數, 排卵點 및 卵子 回收率을 調査한 結果는 Table 2, 3, 4, 5 와 같다.

Table 2. Effects of dose levels of PMSG treatment on ovarian size.
(unit : mm)

Treatment	No. of rabbits treated	Left ovary		Right ovary	
		Length	Width	Length	Width
PMSG 200 ^{IU}	10	19.6 ± 0.9*	7.9 ± 0.4	20.5 ± 1.3	8.3 ± 0.6
PMSG 50 ^{IU} + 50 ^{IU}	40	18.7 ± 0.5	7.1 ± 0.3	18.8 ± 0.5	6.8 ± 0.2
PMSG 100 ^{IU}	30	18.3 ± 0.4	7.3 ± 0.2	18.2 ± 0.5	7.7 ± 0.2

* Mean ± S.E.

上記表는 hormone 水準에 따른 卵巢의 크기를 調査한 것으로서 PMSG 200 IU 單一處理區에서는 左側 卵巢의 길이와 폭은 各各 平均 19.6 ± 0.9mm, 7.9 ± 0.4mm였으며, 右側은 各各 平均 20.5 ± 1.3mm, 8.3 ± 0.6mm로 右側 卵巢가 左側에 比하여 各各 約 0.9, 0.4mm가 컸으나 有意性은 없었다(P < 0.05).

2日間 PMSG 150IU 處理區는 左側이 各各 18.7 ± 0.5, 7.1 ± 0.3mm이며, 右側은 18.8 ± 0.5, 6.8 ± 0.2mm로, 100IU 單一處理區도 左側이 各各 18.3 ± 0.4, 7.3 ± 0.2mm, 右側은 18.2 ± 0.5, 7.7 ± 0.2mm로 共히 差異가 없었다.

그러나 PMSG 100IU와 200IU 處理區間에는 200IU 處理區가 左側이 各各 1.3, 0.6mm, 右側 2.3, 0.6mm 程度 큰 傾向이 보였으나 有意差는 없었다(P > 0.05).

Hormone 處理別 卵胞數를 調査한 成績은 Table 3에서 보여준 바와 같이 PMSG

Table 3. Effects of dose levels of PMSG treatment on number of follicles.

Treatment	No of rabbits treated	Left ovary		Right ovary	
		Over 2mm	Less 2mm	Over 2mm	Less 2mm
PMSG 200IU	10	7.5±2.1*	2.4±0.8	8.0±0.7	3.6±0.8
PMSG 50IU+50IU	40	4.9±0.8	5.5±1.0	4.5±0.7	7.8±0.5
PMSG 100IU	30	5.6±0.6	5.4±1.0	5.0±0.7	4.9±1.3

* Mean ± S.E.

200IU 單一處理區에서는 左側 卵巢에서 2mm以上 卵胞數가 平均 7.5±2.1個, 2mm以下 2.4±0.8個, 右側이 平均 8.0±0.7, 3.6±0.8個로서 右側이 約 1.7個의 卵胞數가 많았으며, 全體數는 平均 21.5個였다.

50IU씩 2日間 2回處理 試驗區는 左側 卵巢에서 2mm以上이 平均 4.9±0.8個, 2mm以下는 平均 5.5±1.0個, 右側이 各各 4.5±0.7, 7.8±0.5個로서 全體의 卵胞數는 2mm以上이 9.4個, 2mm以下가 13.3個로서 約 3.9個가 더 많았으나 역시 有意差가 없었다.

그리고 100IU 單一處理區에도 左側 卵巢에서 2mm以上이 平均 5.6±0.6個, 2mm以下가 5.4±1.0, 右側이 各各 5.0±0.7, 7.8±0.5이며 全體의 卵胞數는 20.9個中 2mm以下가 11.5個로 2mm以上 9.4個에 比하여 約 2.1個가 많았다.

處理區別 綜合成績을 比較하여 보면 50IU씩 2日間 2回 處理區가 22.7個, 200IU 處理區 21.5個, 100IU 單一處理區 20.9個의 順位로 差異가 거의 없었다(P>0.05).

上述한 結果는 梁 등(1983)이 發表한 PMSG 150IU 處理區 37.8個, 100IU 處理區 33.3, 韓(1984)에 의한 200IU 處理區 27.3個, 金 등(1974)의 30.9個보다는 若干 적은 數值를 보여주었다.

Hormone 處理에 따른 左右 卵巢의 血胞數는 Table 4에서 보여준 바와 같이

PMSG 200IU 單一處理區는 左側 卵巢에서 2mm 以上이 平均 11.9±4.9個; 2mm以下 8.9±2.4個였으며, 右側 卵巢는 各各 平均 9.3±2.0, 12.1±3.3個로서 全體의 左右 卵巢 血胞數는 42.2個였고, 50IU 2日間 2回 處理區에서는 左側 卵巢에

Table 4. Effects of dose levels of PMSG treatment on blood follicles of ovary.

Treatment	No. of rabbits treated	Left ovary		Right ovary	
		Over 2mm	Less 2mm	Over 2mm	Less 2mm
PMSG 200IU	10	11.9±4.9*	8.9±2.4	9.3±2.0	12.1±3.3
PMSG 50IU+50IU	40	1.3±0.3	3.9±0.4	1.5±0.3	4.1±0.5
PMSG 100IU	30	2.1±0.3	6.5±0.6	1.4±0.3	6.2±0.7

* Mean±S.E.

서 2mm 以上이 平均 1.3±0.3個, 2mm 以下 3.9±0.4個였고, 右側 卵巢은 各各 1.5±0.3, 4.1±0.5個로 全體의 血胞數는 10.8個로 가장 적은 數值를 보여 주었다.

그리고 100IU 單一處理區에서는 左側 卵巢에서 2mm 以上이 平均 2.1±0.3個, 2mm 以下 6.5±0.6個였으며, 右側 卵巢은 2mm 以上이 1.4±0.3個, 2mm 以下 6.2±0.7個로 全體의 血胞數는 16.2個로서 2mm 以下가 9.2個 많았다.

各 處理區別 全體 血胞數를 比較하여 보면 200IU 單一處理區가 42.2個로서 100IU 單一處理區나 50IU씩 2日 處理區에 比하여 3~4倍가 더 많이 나타나므로서 200IU 處理는 合當하지 않은 것으로 推測할 수 있었다(P<0.05).

이러한 結果는 金 등(1974)이 50IU를 1日 1回 4日間 200IU를 投與하여 血胞 22.6個보다는 200IU 單一處理區에서 더 많았고, 100IU 處理區보다는 적었으며, 50IU씩 2日間 2回 處理區의 10.8個는 韓(1984)이 報告한 40IU씩 5日間 處理한 경우 數値와 全(1970)의 200IU 單一處理의 成績과 비슷하였다.

過排卵誘起에서 重要視되고 있는 hormone 處理에 따른 卵巢의 排卵點과 卵子 回收率은 Table 5에 提示된 바와 같이

PMSG 200IU 單一處理區의 排卵點은 左側 卵巢가 平均 7.9±1.6個였고, 右側 卵巢에서 平均 8.3±1.8個로 左右 卵巢間에는 큰 差異가 없었으며 全體의 排卵點은 約 16個로서 卵子 回收率은 81%로 가장 낮았다.

50IU씩 2日間 PMSG(100IU) 處理區에서는 排卵點이 左側에서 11.9±1.5個, 右側 10.2±1.3個로 總 排卵點은 約 22個로서 卵子 回收率은 86%로 200IU 單一處理 보다 높았다.

Table 5. Effects of dose levels of PMSG treatment on ovulation point and recovery rate.

Treatment	No. of rabbits treated	No. of ovulation point		Recovered embryos	
		Left ovary	Right ovary	No. of embryos recovered	Recovery rate (%)
PMSG 200 ^{IU}	10	7.9 ± 1.6* (2-17)	8.3 ± 1.8 (3-20)	13.1 ± 1.4 (2-15)	81 ^a
PMSG 50 ^{IU} +50 ^{IU}	40	11.9 ± 1.5 (1-38)	10.2 ± 1.3 (1-35)	19.1 ± 1.6 (0-37)	86 ^b
PMSG 100 ^{IU}	30	11.6 ± 1.6 (2-40)	11.6 ± 1.5 (3-33)	21.7 ± 1.5 (0-33)	94 ^c

abc: Percentages with superscripts not in common are different (P<0.05)

* Mean ± S.E.

또한 100IU 單一處理區에서 排卵點은 左側이 11.6 ± 1.6, 右側 11.6 ± 1.5個로서 合計는 約 23個였고, 卵子 回收率은 94%로 3個 處理區中 가장 良好한 成績을 보여 주었다(P<0.05).

이러한 結論은 金 등(1974), 韓 등(1984)의 200IU 處理의 數値보다 本試驗의 200 IU 處理가 떨어졌으나, 100IU 處理區는 오히려 높은 成績을 보였으며 또한 梁 등(1983)의 100IU 處理의 成績에서 2回 處理보다 높은 結果였으며 單一處理의 排卵點이 25.4個로서 높았으나 回收率이 81.9%로 本成績보다 떨어짐으로서 一致하지 않는 傾向을 보여 주었다.

그러므로 Table 2,3,4,5의 成績을 綜合하여 比較하여 보면 PMSG 200IU 同一 處理에서 卵巢의 크기, 卵胞數는 各處理別 差異가 없었으나 血胞數는 어느정도 높은 反面, 排卵點數는 낮았고 受精卵 回收率에 있어서도 第一 떨어지는 傾向을 보이는 反面, PMSG 100IU 處理中 2回 分離注入한 것과 單一 處理에서 200IU 處理區와 比較할 때 全般的으로 共히 差異없이 卵巢크기, 卵胞數는 비슷하였으나 血胞數는 낮은 數値였고 排卵點數와 回收率은 良好한 成績을 얻었으며 特別 PMSG 100IU 單一處理가 第一 좋은 結果를 보임으로서 本試驗에서 家兔의 過排卵 誘起 時에는 簡便하고 處理方法이 容易한 PMSG 100IU 單一處理가 合理的이라고 생각 된다.

2. 耐凍劑의 添加 및 除去

耐凍劑中 1.5M DMSO와 10% glycerol에 따라 液體窒素 container에서 緩慢凍結하여 1個月以上 保管하였다가 38°C 溫水에서 急速融解後 5%의 CO₂ incubator에서 48時間 培養하여 生存率을 比較한 것은 Table 6과 같다.

Table 6. Effects of the cryoprotectant dilutions frozen by LN₂ container development of rabbit embryo after culture.

Cryoprotectant	No. of embryos frozen	No. of embryos damaged	No. of embryos morphological normal after dilution	No. of embryos developed after culture	Survival rate (%)
1.5M DMSO	213	30	183	112	53
10% Glycerol	268	28	240	157	59

1.5M DMSO를 添加하여 213個의 受精卵을 凍結 融解한 結果 30個(14%)의 卵子가 破損되었고, 183個(86%)는 正常卵子였으며 이를 5%의 CO₂ incubator(37°C)에서 培養하여 112個의 卵子가 發育되어 全體凍結卵의 53% 生存率을 보였다.

그리고 10% glycerol 添加區에서는 268個의 受精卵을 凍結 融解한 結果 破損卵子가 28個(10.4%), 正常卵子는 240個(89.6%)였으며, 培養後 157個의 受精卵子가 發育되어 全體凍結卵의 59%의 生存率을 獲得하여 DMSO 處理區보다 良好한 成績을 보여 주었다.

DMSO 處理區의 成績은 Whittingham과 Adams(1976), Bank와 Maurer(1974) 등이 發表한 報告와 비슷하였고, Kojima et al (1984)의 發表한 것보다는 낮았다 (Tsunoda와 Sugie, 1977).

glycerol는 處理區의 結果에 의하면 Merry et al(1983)의 48.8%보다는 높았으며, Miyamoto et al(1986), Williams와 Pettit(1985)등의 報告와 거의 類似한 結果를 보여 주고 있다.

또한 耐凍劑別로 比較한 때 Schmidt et al(1985), Bilton와 Moore (1977) 등이 依해서 發表한 DMSO 處理區보다 glycerol 處理區가 優秀하다고 報告한 것과 一致

하였다. sucrose를追加한 glycerol을 1段階 3段階로 添加하여 LN₂ container에서 凍結, 融解한 時間 1段階 및 3段階로 glycerol을 除去하여서 培養後 卵子 生存率을 比較한 것은 Table 7과 같다.

Table 7. Effects of the procedures of glycerol dilution with sucrose on survival of rabbit embryos after culture.

Direct or stepwise dilution	No of embryos frozen	No of embryos damaged	No of embryos normal after dilution	No of embryos developing in culture	Survival rate (%)
1-S*	166	9	157	125	75.0 ^a
3-S**	149	1	148	104	70.0 ^b
Total or mean	315	10	305	229	72.5

*: One step addition and dilution ** : 3-step addition and dilution

ab: Percentages with superscripts not in common are different (P<0.05)

glycerol 1段階 添加 및 除去 1-S 에서는 166個의 受精卵을 凍結 融解後 157個의 正常卵子를 培養하여 75%의 生存率을 얻었고, 3段階 處理(3-S)는 149個의 受精卵을 凍結 融解後 培養하여 70%의 生存率을 獲得하므로써 1段階 處理 方法이 優秀하였다(P<0.05).

이러한 結果는 1段階處理에서 Renard et al(1984), Massip et al(1984)의 生存率보다는 낮은 成績이었으며, Kasai et al(1979), Lehn-Jensen(1983), Niemann(1985) 등에 의해서 報告된 成績보다는 높은 結果를 보였다.

3段階에서는 Parkening et al(1976), Miamoto et al(1986), 金 등(1985)의 生存率보다는 낮았고, Schmidt et al(1985), Wright(1985), William과 Pettit(1985) 등에 의해 報告된 生存率보다는 약간 높은 成績을 나타냈다.

또한 Kasai et al(1980)이 耐凍劑에 sucrose 添加했을 때 3段階보다 1段階로 處理한 것이 受精卵의 生存率이 높다고 發表한 것과 一致하였다.

3. 凍結過程

耐凍劑인 glycerol과 DMSO 處理別 凍結速度를 달리하여 LN₂ container에서 簡易 凍結하여 培養後 卵子 生存率을 比較한 成績은 Table 8에 提示하여준 바와같이

Table 8. Effects of various freezing rate and cryoprotectants on survival of rabbit embryos afterculture.

Freezing rate	Cryoprotectant	No of embryos frozen	No of embryos damaged	No of embryos normal after dilution	No of embryos developed after culture	Survival rate (%)
Slow ^a	Glycerol	141	8	133	91	65
	DMSO	97	12	85	56	58
Total or mean		238	20	218	147	62
Rapid ^b	Glycerol	127	21	106	66	52
	DMSO	115	14	101	57	50
Total or mean		242	35	207	123	51

* a: Room temp → -7°C (1°C/min) → -80°C (3°C/min) → -196°C

b: Room temp → -7°C (1°C/min) → -35°C (3°C/min) → -80°C (5°C/min) → -196°C

緩慢凍結에 있어서 glycerol 處理區는 141個의 受精卵을 凍結 融解하여 133個 (94%)의 正常卵子를 얻었으며, 48時間 培養後 全體 受精卵中 65%의 生存率을 獲得하였다. DMSO 處理區에서는 97個의 受精卵을 凍結 融解하여 85個 (87.6%)의 正常卵子를 얻었고 培養後 生存率 58%의 成績으로 glycerol 處理區가 良好하였다.

急速凍結에 있어서도 glycerol 處理區는 127個의 受精卵을 凍結 融解해서 106個 (83.5%)의 正常卵자와 培養後 全體 受精卵子의 52% 生存率을 얻은것은 DMSO 處理區의 受精卵 115個를 凍結 融解後 101個 (87.8%)의 正常卵자와 培養後 50%의 生存率을 보여줌으로서 역시 glycerol 處理區가 약간 좋았다.

그러나 凍結速度別로 比較할 때는 緩慢 凍結 方法이 平均 生存率 62%에 比하여 急速方法 52%로서 떨어지는 傾向을 보여 주고 있다 (P<0.05).

上記表에서 DMSO 添加 경우 50~58%의 生存率은 Whittingham (1975)와 柳와 李 (1984) 등이 報告한 22~51%보다 높은 成績이었으며, Bank와 Maurer (1974)의 成績과는 類似하였으나, Tsunoda와 Sugie (1977)가 發表한 79%보다는 낮은 數值였다.

glycerol 添加의 경우 52~65% 生存率은 Lehn-Jensen (1983)의 44% 보다는 높은 成績이었으나, Miyamoto et al (1986)에 依해서 發表한 71% 보다는 낮은 成績이었다.

그러나 耐凍劑別로는 Bilton과 Moore(1977)가 發表한 glycerol 受精卵 生存率이 높다는 것과, whittingham(1975)에 依한 緩慢凍結에서 生存率이 높다고 報告한 것 등과는 一致하였다.

Table 9는 10% glycerol을 耐凍劑로서 液體 窒素 container에서 凍結速度를 달리 한 凍結 融解 培養後 受精卵 生存率을 比較한 成績으로

Table 9. Effects of various freezing methods using LN₂ container on the survival of rabbit embryos after culture in glycerol cryoprotectant.

Freezing procedure	No of embryos frozen	No of embryos damaged	No of embryos developing in culture	Survival rate (%)
I - F ^a	69	0	54	78
II - F ^b	108	4	77	71
III - F ^c	73	5	45	62
IV - F ^d	72	1	45	63

* a: Room temp. → -7 C (1 C/min) $\frac{5 \text{ min}}{\text{seeding}}$ 35 C (0.3 C/min) → -196 C
 b: Room temp. → -7 C (1 C/min) $\frac{5 \text{ min}}{\text{seeding}}$ -35 C (3 C/min) → -80 C (5 C/min) → -196 C
 c: Room temp. → -7 C (1 C/min) $\frac{5 \text{ min}}{\text{seeding}}$ -80 C (15 C/min) → -196 C
 d: Room temp. → -7 C (1 C/min) $\frac{5 \text{ min}}{\text{seeding}}$ Rapid freezing by LN₂ vapour for 5 min

“I-F”(0.3°C/min)에서는 69個의 受精卵을 凍結 融解하여 培養後 78%의 生存率을 獲得하여 가장 優秀한 成績이었으며 II-F(3-5°C/min)에서도 108個의 受精卵을 凍結, 融解 培養後 71%의 生存率로 다음 順位였고, “III-F”(15°C/min)는 62%, IV-F(34°C/min)의 超急速 凍結에서도 63%의 生存率을 얻음으로서 凍結速度가 急速일 수록 受精卵의 培養後 生存率이 떨어지는 傾向을 提示하여 수었다(P<0.05).

이러한 結論은 Nakagata와 Toyoda(1980), Miyamoto와 Ishibashi(1979) 등의 緩慢凍結의 生存率 보다는 낮았고, Bank와 Maurer(1974), Whittingham과 Adams(1976), Forgrave et al(1977) 등이 緩慢 凍結에서 發表한 成績보다는 높았으며, Tsunoda와 Sugie(1976), Parkening et al(1976)의 受胎率과 비슷한 結果를 보여 주고 있다.

그런데 急緩慢 凍結(II-F)에서도 Bank와 Maurer(1974), Tsunoda와 Suige(1977), Lehn-Jensen(1983) 등의 生存率 47-67% 보다는 높고, Miyamoto et al

1986)이 發表한 71%와는 類似한 結果였다.

急速 凍結(Ⅲ-F)은 Whittingham(1975) 보다는 높은 結果였으며, 超急速 凍結(Ⅳ-F)에서도 63%의 生存率을 보여 주어 急速 凍結의 可能性을 提示하여 주었고, 特別히 glycerol 添加에서 液體 窒素 container內에서 凍結하더라도 Cell-freezer에 依해서 凍結시킨 成績에 比하여 떨어지지 아니하며 利用 可能性을 確信시켜 주었다.

10% glycerol에다 10% sucrose을 添加하여 1段階로 耐凍劑를 處理한 後 LN₂ container에서 凍結 速度를 달리하여 簡易 凍結해서 1個月 以上 貯藏하였다가 38°C 溫水에 急速 融解하고 耐凍劑 除去는 10% sucrose를 添加한 PBS液에서 1段階로 除去한 後, FDA-test를 實施하여 生存性을 比較 檢査한 結果는 table 10과 같다.

Table 10. Effect of various freezing procedures with 10% sucrose by liquid nitrogen vapour(container) on embryo survival evaluated by FDA test in rabbit.

Freezing procedure	No of embryos frozen	No of survival embryos evaluated by FDA *				Score
		P-5 (%)	P-3 (%)	P-1 (%)	N (%)	
I-F ^a	106	41 (39)	36 (34)	18 (17)	11 (10)	3.1
II-F ^b	72	32 (44)	19 (27)	15 (21)	6 (8)	3.2
III-F ^c	46	24 (52)	8 (18)	7 (15)	7 (15)	3.3
IV-F ^d	82	33 (41)	24 (29)	10 (12)	15 (18)	3.0

*P: Positive(score: 5) P-3: Partial(score: 3) P-1: Partial(score: 1) N: Negative (score: 0)

- a: Room temp. → -7°C (1°C/min) $\frac{5 \text{ min}}{\text{seeding}}$ -35°C (0.3°C/min) → -196°C
- b: Room temp. → -7°C (1°C/min) $\frac{5 \text{ min}}{\text{seeding}}$ -35°C (3°C/min) → -80°C (5°C/min) → -196°C
- c: Room temp. → -7°C (1°C/min) $\frac{5 \text{ min}}{\text{seeding}}$ -80°C (15°C/min) → -196°C
- d: Room temp. → -7°C (1°C/min) $\frac{5 \text{ min}}{\text{seeding}}$ Rapid freezing by LN₂ vapour for 5 min

I-F(0.3°C/min)에서는 106個의 受精卵을 凍結 融解하여 FDA-test을 한 結果 P-5는 39%, P-3 34%, P-0 10%로서 平均 score 3.1였고, II-F(3~5°C/min)는 72個의 受精卵을 凍結 融解한 結果 P-5는 44%, P-3 27%, P-0 8%, 平均 score 3.2였으며, III-F(15°C/min)에서는 46個의 受精卵을 凍結 融解한 結果 P-5는 52%, P-3 18%, P-0 15%로 平均 score 3.3으로서 第一 높은 成績을 나타냈고, IV-F(34°C/min)도 82個의 受精卵을 凍結 融解하여 P-5는 41%, P-3 29%, P-0 18% 平均 score 3.0으로서 第一 成績이 낮았으나 處理間 有意성이 없었다 (P>0.05).

各 處理區 別 P-5(100% 生存)의 成績은 III-F가 52%로 第一 좋았고, I-F가 39%로 第一 떨어진 成績을 보여 주었다.

또한 P-0(죽은 卵子)는 II-F에서 8%로 가장 나빴고, IV-F가 18%로 第一 높았다. 그러므로 Schilling et al(1982)이 發表한 positive 86.4% 보다는 낮은 成績이었으나, P-3에서도 約 50% 以上 生存을 假定한다면 平均 60% 以上 生存성을 얻은 것으로 看做할 수 있다.

그리고 Schilling et al(1982)은 FDA-test가 正確하고 빠르게 受精卵 生存 判定이 될 수 있다고 報告하였으며(Schmidt, 1985; Franks, 1986), 特別 Table 10에서의 特徵은 耐凍劑에 sucrose를 添加하였을 때는 Table 9와는 달리 緩慢 凍結에 比하여 急速 凍結도 生存 成績이 떨어지지 않았다는 것을 立證하여 주었다 (Renard 등 1984; Chupin과 De Reviere, 1986).

이를 綜合적으로 考察하여 보면 耐凍劑로서 glycerol만을 添加하였을 때는 急速 凍結은 緩慢 凍結보다 生存率이 떨어졌으나 sucrose를 添加하면 急速 凍結과 緩慢 凍結에는 差異가 없었음을 再確認 시켰다.

glycerol 耐凍劑의 凍結 過程에서 植氷한 處理區와 植氷을 하지 않는 處理區를 比較한 成績은 Table 11에 나타내어 준 것과 같이

Table 11. Effects of various seeding procedures on the survival of rabbit embryos containing 10% glycerol after culture.

Seeding Procedure	No. of embryos frozen	no. of embryos damaged	No. of embryos developing in culture	Survival rate (%)
N-seeding ^a	210	6	140	67
P-seeding ^b	105	4	72	69

a: No-seeded b: Pincette-seeded

N-seeding(植氷하지 않은) 處理區는 210個의 受精卵를 凍結 融解, 培養後 67%의 生存率을 얻었고, P-seeding(핀셋트 植氷)은 105個의 受精卵를 凍結 融解하여 培養後 69%의 生存率을 보여 주어서 P-seeding과 N-seeding 사이에는 거의 差異가 없었다($P>0.05$).

이와같은 結果는 Leibo와 Mazur(1978)가 植氷을 施行한 것이 하지 않은 것보다 좋았으나 有意差가 없었다는 것과 一致하였다.

그리고, Mauer와 Haseman(1976)에 依해서 핀셋트 植氷을 하여서 37%의 生存率보다는 높은 結果였고, Nakagata와 Toyoda(1980)의 82%보다는 낮은 成績이었다.

耐凍劑에 sucrose를 添加하고 1段階로 耐凍劑를 處理後 여러가지 植氷方法을 달리하여 FDA-test를 實施한 結果는 Table 12와 같이

Table 12. Effects of seeding procedures with 10% sucrose on embryo viability evaluated by FDA test in rabbit.

Method of seeding	No of embryos frozen	No of survival embryos evaluated by FDA *				Score
		P-5 (%)	P-3 (%)	P-1 (%)	N (%)	
N-seeding ^a	158	66 (42)	52 (33)	26 (16)	14 (9)	3.2
P-seeding ^b	135	47 (35)	38 (28)	28 (21)	22 (16)	2.8
Co-seeding ^c	95	35 (37)	28 (30)	23 (24)	9 (9)	3.0

*P-5: Positive(score: 5) P-3: Partial(score: 3) P-1: Partial(score: 1) N: Negative (score: 0)

a: No-seeded b: Pincette-seeded c: Copper wire seeded

N-seeding에서는 158個의 受精卵를 凍結 融解하여 FDA-test를 實施한 結果 P-5가 42%, P-3 33%, N-0 9%, score는 平均 3.2로 第一 좋았고, P-seeding은 135個의 受精卵를 핀셋트로 植氷한 것으로 凍結 融解後 P-5가 35%, P-3 28%, P-0은 16%, score는 平均 2.8로서 第一 낮았다. 또한 Co-seeding(구리줄로 삼은 것은) P-5가 37%, P-3 30%, N-0은 9%, score는 平均 3.0으로 各 處理區別 有意性이 없었다 ($P>0.05$).

그러므로 耐凍劑에 sucrose를 添加했을 때는 植氷을 하지 아니 하더라도 受精卵

凍結 可能性을 보여주고 있다.

그러나 本 試驗에서 핀셋 植水處理가 特히 낮은 生存率을 보여준 것은 植水을 實施할 때 straw가 空氣中에 露出時 溫度上昇에 起因되는 것으로 思料된다.

이 結果는 Massip et al (1984)의 耐凍劑에 sucrose를 添加하여 植水한 結果 85.7%의 生存率과 植水을 하지 않아도 높은 生存率을 報告한 것과 一致하였다.

10% glycerol 耐凍劑로 融解溫度를 달리한 培養後 卵子生存率은 Table 13에서 보여 주듯이

Table 13. Effects of thawing temperature with 10% glycerol on the survival of rabbit embryos after culture.

Temp. of thawing	No of embryos frozen	No of embryos damaged	No of embryos morphological normal after dilution	No of embryos developed after culture	Survival rate (%)
38°C	252	27	225	143	57
5°C	229	31	198	127	55

38°C에서 融解한 것은 252個의 受精卵中 27個(11%)가 破損되어 225個(89%)의 正常卵子를 凍結, 融解, 培養後 143個가 發育하여 57%의 生存率을 얻었으며, 5°C에서 融解한 것은 229個의 受精卵中 正常卵子は 198個(86%)로 培養後 127個가 發育하여 55%의 生存率을 나타내어 5°C보다 38°C 融解가 若干 좋은 結果였으나 有意性은 없었다($P < 0.05$).

이 結果는 Schmidt(1985)의 成績보다는 낮은 數值였으나 Wilmut(1972), Krag (1985) 등이 37°C에서 融解하는 것이 다른 方法에 比하여 良好하다는 것과는 一致하였다.

10% glycerol에 5% sucrose을 添加하여 凍結한 다음 38°C와 5°C에서 融解 培養後 比較한 成績은 Table 14와 같이

38°C에서 167個 受精卵을 急速 融解하여 培養한 結果 126個의 受精卵이 發育해서 75%의 生存率을 보였고, 148個의 受精卵을 凍結하여 5°C에서 融解 培養後 103個의 受精卵이 發育되어 70%의 生存率을 나타내어 38°C에서 融解 處理區가 5°C 融解보다 좋았다($P < 0.05$).

本 結果는 Kasai et al(1979)의 0°C, 常溫 37°C 別로 融解하였을 때 受精卵 生存

Table 14. Effects of the thawing temperature with cryoprotectant contained 5% sucrose on the survival of rabbit embryos after culture.

Temperature of thawing	No of embryos frozen	No of embryos damaged	No of embryos developing in culture	Survival rate (%)
38 C	167	6	126	75.0
5 C	148	4	103	70.0
Total or mean	315	10	229	72.5

ab: Percentaes with superscripts not in common are different (P<0.05)

率は 37°C, 常溫, 0°C 順位로 發表한 것과 一致하였다.

그리고 Schmidt(1985), Krag(1985) 등이 發表한 65%의 生存率 보다는 높고 Williams와 Jehnsen(1985), Nakagata와 Toyoda(1980) 등이 報告한 生存率 보다는 떨어진 成績을 提示하여 주었다.



V. 要 約

本 試 驗 은 凍 結 受 精 卵 의 複 雜 한 處 理 및 製 造 過 程 을 簡 素 化 시 켜 受 精 卵 移 植 技 術 을 向 上 시 키 기 위 하 여 家 兪 를 利 用 試 驗 을 實 施 하 였 다.

過 排 卵 誘 起 時 호 르 모 ン 의 滴 定 水 準 을 決 定 하 였 고, 凍 結 保 存 液 의 選 定, 保 存 液 의 添 加 方 法, 凍 結 速 度 및 方 法, 融 解 溫 度, 融 解 後 耐 凍 劑 除 去 方 法, 그 리 고 生 死 判 定 等 이 受 精 卵 에 미 치 는 影 響 等 을 調 査 하 였 고, 그 結 果 는 다 음 과 같 다.

1. 過 排 卵 誘 起 時 호 르 모 ン 의 處 理 水 準 은 PMSG 200IU 單 一 處 理, 50IU 2日 間 2回 處 理 그 리 고 100IU 單 一 處 理 에 서 排 卵 點 (回 收 率) 은 各 各 13.1±1.4(81%), 19.1±1.6(86%), 21.7±1.5(94%)로 서 100IU 單 一 處 理 區 가 第 一 良 好 하 였 다.

2. 1.5M DMSO 添 加 時 凍 結 融 解 後 生 存 率 은 53%, 10% glycerol 添 加 時 59% 였 으 며, 耐 凍 劑 는 1段 階 에 서 는 54%로 耐 凍 劑 는 glycerol이 더 優 秀 하 였 고 添 加 方 法 은 1-S가 良 好 하 였 다 (P<0.05).

3. 10% glycerol을 添 加 한 後 液 體 窒 素 容 器 에 서 -7°C까 지 는 分 當 1°C씩 凍 結 시 키 고 그 後 分 當 0.3°C (I-F), 3~5°C (II-F), 15°C (III-F), 液 體 窒 素 表 面 에 서 直 接 凍 結 (IV-F)시 켜 保 存 하 였 다 가 融 解 하 여 培 養 한 結 果 各 各 78%, 71%, 62%, 63%의 生 存 率 을 나 타 내 였 고, 凍 結 速 度 間 에 는 緩 慢 凍 結 이 더 좋 았 으 며 (P<0.05), 急 速 凍 結 도 좋 은 生 存 率 을 나 타 내 어 利 用 可 能 性 을 보 여 주 었 다.

4. 耐 凍 劑 에 10% sucrose를 添 加 하 여 1段 階 로 耐 凍 劑 를 處 理 한 後 Non-seeding, pincette seeding, Cupper-seeding 方 法 을 利 用 하 여 植 水 하 고 凍 結 融 解 後 FDA test score는 各 各 3.2, 2.8, 3.0로 pincette seeding이 다 른 두 方 法 에 비 해 낮 았 으 나, 有 意 性 은 없 었 다 (P>0.05).

5. 融 解 方 法 에 서 38°C 溫 水 에 直 接 融 解 時 生 存 率 이 62%였 고, 5°C 冷 水 에 서 는 55%로 서 38°C 溫 水 가 더 適 合 하 였 다.

6. 耐 凍 劑 除 去 方 法 에 는 5% sucrose를 添 加 한 PBS液 을 使 用 할 때 1-S가 生 存 率 이 75%, 3-S에 서 70%였 다 (P<0.05).

7. 耐 凍 劑 에 10% sucrose를 添 加 하 여 液 體 窒 素 container를 利 用 하 여 I-F, II-F, III-F, IV-F로 凍 結 融 解 하 여 FDA(3, 6-diacetyl fluorescence) test score는 各 各 3.1, 3.2, 3.3, 3.0으로 生 存 率 은 서로 相 似 하 였 다 (P>0.05).

REFERENCES

1. Bank, H. and R.R. Maurer. 1974. Survival of frozen rabbit embryos. *Exptl cell Res.*, 89: 188~196.
2. 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.
3. Bilton, R. J. and N. W. Moore. 1977. Successful transport of frozen cattle embryos from New Zealand to Australia. *J. Reprod. Fert.*, 50: 363~364.
4. 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.
5. 卞泰鎬, 沈金燮, 李在根, 1984. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ 處理에 따른 過排卵 家兔의 卵管内 卵子運搬 및 分布에 關한 研究. 韓國家畜繁殖研究會報, 8(1): 10~15.
6. Chupin, D. and M. M. De Reviere, 1986. Quick freezing of rat embryos. *Theriogenology*, 26: 157~166.
7. Forgrave, L. F., P. Rajamahendran and R. D. Baker. 1977. Cryopreservation of mouse embryos in macdonald Freeze-Thaw apparatus. *Can. J. Anim. Sci.*, 57: 389~394.
8. Franks, G. C., S. L. Coley, B. Betterbed and R. D. Page. 1986. The effect of freezer type, cryoprotectant, and processing methods on viability of frozen embryos. *Theriogenology*, 26: 135~144.
9. 韓基硯, 1984. 反復過排卵 토끼의 卵巢反應에 關한 研究. 韓國家畜繁殖研究會報, 8: 36~45.
10. 田暢其, 1970. 家兔의 受精卵 移植에 關한 研究. 韓國畜産學會誌, 12: 11~15.

11. 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. 韓國畜産學會誌. 28: 474~479.
12. Kasai, M., A. Iritani and M. C. Chang, 1979. Fertilization in vitro of Rat ovarian oocytes after freezing and thawing. *Biology of Reproduction*. 21: 839~844.
13. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani, 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J. Reprod. Fert.*, 59: 51~56.
14. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritan, 1982. Survival of rat embryos after freezing. *J. Reprod. Fert.*, 66: 367~370.
15. 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.
16. 金正翊, 梁富根, 南相憲, 李相榮, 任石基, 高光斗, 1985. 牛受精卵의 凍結保存에 관한 研究. II. 凍結保存後 融解卵의 生存性. 韓國家畜繁殖研究會報. 9: 36~39.
17. 金正翊, 梁富根, 南相憲, 高光斗, 1983. 家兎의 受精卵移植에 관한 研究. II. 凍結融解卵의 發育段階別 生存性. 韓國家畜繁殖研究會報. 7: 19~23.
18. 金重桂, 徐國聖, 申源報, 吳然格, 薛東攝, 金相喆, 李用斌, 1974. 토끼의 受精卵 移植에 있어서 卵細胞 分裂期와 移植部位에 관한 研究. 韓國畜産學會誌. 16: 93~99.
19. Koiima, T., Y. Tsunoda, N. Oquri, T. Soma and T. Sugie, 1984. Survival of frozen-thawed rabbit morulae in the presence of ethylene glycol. *Japan. J. Anim. Reprod.*, 30: 50~53.
20. Lehn-Jensen, H. 1983. Survival of cow blastocysts cooling rate of 1°C/min to -25°C before plunging. *Theriogenology*. 19: 138.
21. Lehn-Jensen, H and T. Greve, 1977. Low Temperature preservation of cattle blastocysts. *Theriogenology*. 9: 313~322.
22. Leibo, S. P. 1985. Field trial of one-step diluted frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*. 23: 201.
23. Leibo, S. P. and P. Mazur, 1978. *Method in mammalian Reproduction*. Academic Press, New York, 179.

24. Massip, A., Van der Zwalmen, F., Ectors, R., De Coster, G., D'Ieteren, C., Hanzen, 1979. Deep freezing of cattle embryos in glass ampules or french straws. *Theriogenology*, 12: 79~84.
25. Massip, A., P. Van der Zwalmen, F., Puissant, M., Camus and F. Leroy, 1984. Effects of in vitro fertilization, culture, freezing and transfer on the ability of mouse embryos to implant and survive. *J. Reprod. Fert.*, 71: 199~204.
26. Maurer, R. R. and J. K. Haseman, 1976. Freezing morula stage rabbit embryos. *Biology of Reproduction*, 14: 256~263.
27. Merry, D. A., R. L. Allen, K. Krag and R. W. Wright, Jr, 1983. Sucrose dilution of frozen mouse embryos: in the reaction of glycerol and sucrose concentrations. *Theriogenology*, 20: 325~332.
28. Miyamoto, H. and T. Ishibashi, 1978. The protective action of glycols against freezing damage of mouse and rat embryos. *J. Reprod. Fert.*, 54: 427~432.
29. 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.
30. Miyamoto, H., Y. Miyamoto and T. Ishibashi, 1986. The important of equilibration time to glycerol prior to freezing in the cryopreservation of mouse embryos. *Jpn J. Zootech. Sci.*, 57: 250~256.
31. Nakagata, N. and Y. Toyoda, 1980. Normal young after transfer of frozen-thawed 2-cell mouse embryos obtained by fertilization in vitro. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 51: 740~744.
32. Niemann, H. 1985. Freezing of bovine embryos: Effects of a one-step addition or 1.4M glycerol. *Theriogenology*, 23: 369~379.
33. 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 thawing method. *Theriogenology*, 17: 102.
34. Niwa, K., M. Kasai and A. Iritani, 1979. Fertilization in vitro of rat eggs after freezing and thawing. *Jap. J. Zoot. ech Sci.*, 50: 742~752.

35. 朴欽大, 李景廣, 鄭吉生, 1980. 家兔卵子의 體外受精과 體外培養. 韓國家畜繁殖研究會報. 4: 75~82.
36. Parkening, T. A., Y. Tsunoda and M.C. Chang. 1976. Effects of various low temperatures. Cryoprotective agents and cooling rates on the survival, fertilizability and development of frozen-thawed mouse eggs. *J. Exp. Zool.*, 369~374.
37. Renard, J. P., Bui-Xuan-Nguyen and V. Garnier. 1984. Two-step Freezing of two cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. *J. Reprod. Fert.*, 71: 573~580.
38. Schilling, E., H. Niemann and D. Smidt. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. In vitro fertilization and embryos transfer. Hafez and Emm. MTP Lancaster. 349~355.
39. Schmidt, P. M., M. C. Schiewe and D. E. Wildt. 1985. Variables influencing post-thaw embryos survival rates in mice. *Theriogenology*. 23: 229.
40. Schneider, U and P. Mazur. 1984. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thaw embryos. *Theriogenology*. 21: 68~79.
41. Tsunoda, Y and T. Sugie. 1976. Survival of rabbit eggs preserved in plastic straws in liquid nitrogen. *J. Reprod. Fert.*, 49: 173~174.
42. Tsunoda, Y and T. Sugie. 1977. Effect of the freezing medium on the survival of rabbit eggs after deep freezing. *J. Reprod. Fert.* 50: 123~124.
43. Whittingham, D. G. 1971. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature*. 233: 125~126.
44. Whittingham, D. G. 1974. The viability of frozen-thawed mouse blastocysts. *J. Reprod. Fert.*, 37: 159~162.
45. Whittingham, D. G. 1975. Survival of rat embryos after freezing and thawing. *J. Reprod. Fert.*, 43: 575~578.
46. Whittingham, B. G. 1977. Re-establishment of breeding stocks of mutant and inbred strains of mice from embryos stored at -196°C for prolonged periods. *Genet. Res. Camb.*, 30: 287~299.

47. Whittingham, D. G and C. E. Adams, 1976. Low temperature preservation of rabbit embryos. *J. Reprod. Fert.*, 47: 269~274.
48. Whittingham, D. G., M. Wood, J. Farrat, H. Lee and J. A. Halsey. 1979. Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196°C . *J. Reprod. Fert.*, 56: 11~21.
49. William, H and Pettit, Ir. 1985. Commercial freezing of bovine embryos in glass ampules. *Theriogenology*. 23: 13~16.
50. Williams, T. J and S. E. Johnson. 1985. Quick-freezing of day four mouse embryos. *Theriogenology*. 23: 234~235.
51. Wilmot, I. 1972. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Lif. Sci.*, 11: 1071~1079.
52. Wright, J. M, 1985. Commercial freezing of bovine embryos in straws. *Theriogenology*. 23: 17~29.
53. 梁富根, 南相憲, 高光斗, 金正翊, 1983. 家兔의 受精卵移植에 關한 研究. I. PMSG와 HCG 投與에 따른 卵巢反應. *韓國家畜繁殖研究學報*. 7: 15~18.
54. 柳俊熙, 李在根, 1984. Rat 受精卵의 凍結保存에 있어 凍結速度 및 凍害防止劑에 關한 研究. *韓國家畜繁殖研究會報*. 8: 22~28.



謝 辭

本 研究 遂行에 있어 實驗設計에서 부터 論文作成에 이르기까지 모든 實驗與件을 마련해주시고 始終 아낌없이 直接 指導하여 주신 金重桂教授님께 衷心으로 깊은 感謝를 드립니다.

本 論文을 審査하여 주신 金承浩教授님, 梁奇千教授님께도 感謝를 드리오며, 畜産學科 모든 教授님께 感謝한 마음을 금할 길이 없습니다. 또한 繁殖學實驗室에 있는 大學生 및 再學生 여러분의 誠實한 勞苦와 처음부터 끝까지 論文을 整理하여 준 妻弟 允靈에게 謝意를 표합니다. 本 論文이 結實될 때까지 모든 뒷바라지와 온갖 精誠과 勇氣를 준 사랑하는 아내 宋月淑에게 이 論文을 바칩니다.

