

<단보>

북방대합, *Spisula sachalinensis* 답륜자와 초기 D상 유생의 냉동보존을 위한 동해방지제의 선택

김영신 · 최윤희 · 이정용* · 장영진
부경대학교 수산과학대학 양식학과, *국립수산진흥원 강릉수산종묘시험장

Selection of Cryoprotectant for the Cryopreservation of Trochophores and Early D-shaped Larvae of Surf Clam, *Spisula sachalinensis*

Young Sin KIM, Youn Hee CHOI, Jeong Yong LEE*
and Young Jin CHANG

Department of Aquaculture, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea
*Kangnung Hatchery, National Fisheries Research and Development Institute,
Kangnung 210-800, Korea

This study was performed to find out the cryoprotectants for cryopreservation of trochophores and early D-shaped larvae of surf clam, *Spisula sachalinensis*. Dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol, 1,2-propanediol and methanol were used as cryoprotectant. Each cryoprotectant was made to 1.0 M, 2.0 M, 3.0 M with dilution of 0.2 M fructose and 0.2 M sucrose. The trochophores and early D-shaped larvae were immersed in each preparation for 10 minutes to reach equilibration and cryopreserved in liquid nitrogen. Survival rates of post-thawed trochophores and early D-shaped larvae in 2.0 M DMSO with 0.2 M sucrose were the highest as 97.4% and 78.9%, respectively.

Key words: Surf clam, *Spisula sachalinensis*, Trochophore, Early D-shaped larva, Cryoprotectant, Cryopreservation

동물 발생배의 냉동보존에 관한 연구는 주로 포유류와 인간을 대상으로 이루어져 왔으며, Whittingham et al. (1972)이 쥐의 발생배를 냉동보존하는 데 성공한 이후, 포유류를 대상으로 발생배의 냉동보존에 관한 연구들이 이루어져 왔다 (Arii et al., 1987). 그러나, 수산동물에 대해서는 송사리, *Oryzias latipes* (Arii et al., 1987)와 무지개송어, *Oncorhynchus mykiss* (Billard, 1992) 등의 어류 알과 발생배를 대상으로 약간의 연구가 이루어져 있을 뿐, 그 내용 또한 기초적인 연구에 불과하다. 이와 같이, 경골어류의 알과 발생배의 냉동보존이 어려운 이유는 알의 크기가 크고, 난황의 양이 많으며 (Mazur, 1984), 두 개의 다른 세포막이 존재할 뿐만 아니라, 막을 통과하는 물의 투과성이 낮기 때문이다 (Wallace and Selman, 1990). 그러나 조개류의 발생배는 크기도 작을 뿐만 아니라 소황란 (microlecithal egg)으로 난황의 양이 적어 냉동보존이 비교적 쉬워 최근 참굴, *Crassostrea gigas* (Chao et al., 1997), 진주조개, *Pinctada fucata martensii* (Chang et al., 1999) 등을 비롯한 몇몇 연구결과가 보고된 바 있다. 본 연구에서는 동해안의 유용 조개자원인 북방대합, *Spisula sachalinensis*의 답륜자와 초기 D상유생에 대한 4가지 동해방지제의 냉동보존 효과를 비교하여 적정 동해방지제를 찾고자 하였다.

실험에 사용한 자연산 북방대합은 산란기인 6월에 채집하여 유수식 수조에서 사육하여 안정된 것만을 사용하였다. 채란·채정용 어미의 크기는 각장 102.0±3.5 mm, 각고 82.5±3.2 mm, 각폭 57.8±2.2 mm, 전중 266.0±17.7 g이었다. 북방대합의 알은 난핵포 붕괴

(GVBD) 이전이라도 수정이 가능한 종이므로, 성숙한 암수의 생식소 부위를 절개하여 암수 3 : 1의 비율로 각각 채란·채정하였다. 채취한 알과 정자를 미리 준비해 둔 여과해수 (17℃, 34‰)에 넣어 수정 후 세란하여 발생시켰다.

냉동보존 실험을 위해 발생배의 50% 이상이 섬모로 유평하는 답륜자에 이른 유생 (수정 후 19.5시간 경과)과 초기 D상 유생 (수정 후 25.5시간 경과)을 사용하였다. 회석액으로는 인공해수 (NaCl 2.7 g, KCl 0.07 g, NaHCO₃ 0.05 g, CaCl₂ 0.12 g, MgCl₂ 0.46 g, 증류수 100 mL)에 녹여 만든 0.2 M fructose와 0.2 M sucrose를, 동해방지제로는 dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG), 1,2-propanediol (PD), methanol을 사용하였다. 위의 2가지 회석액에 4가지 동해방지제를 각각 첨가하여 최종농도가 1.0 M, 2.0 M, 3.0 M이 되도록 한 다음 냉동보존 실험을 실시하였다. 각 용액의 삼투질농도는 삼투압 측정기 (The Advanced™ Osmometer)를 사용하여 측정하였다 (Table 1). 냉동을 위한 답륜자를 실온 (23℃)에서 각 용액에 10분 동안 침지한 후 0.5 mL straw (Japan, FHK)에 봉입하여 최초 온도 0℃로 설정되어 있는 프로그램 냉동기 (Samwon Freezing Engineering Co., Korea)로 옮겼다. 이어서, 냉동률 1℃/분으로 -12℃까지 냉동한 후 -12℃에서 10분 동안 식빙 (seeding)한 다음 동일한 냉동률로 -35℃까지 냉동하였다. 이후 -196℃의 액체질소통 (USA, MVE)에 옮겨 보관하였으며, 보관 1시간 후 25℃의 담수에서 급속해동하여 인공해수로 회석한 다음, 광학현미경에 의해 섬모로 활발한 회전운동을 하는

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구 (과제번호: 2000-1-22300-001) 지원으로 수행되었음.

Table 1. Osmolality of cryoprotectants and diluents used in the cryopreservation of trochophores and early D-shaped larvae

Diluent		Cryoprotectant		Osmolality (mOsm/kg)
Kind	Conc. (M)	Kind	Conc. (M)	
Fructose	0.2	DMSO	1.0	2541.3±24.2
			2.0	>3000
			3.0	>3000
		EG	1.0	2603.7±28.7
			2.0	>3000
			3.0	>3000
		PD	1.0	2,294.7±6.4
			2.0	>3000
			3.0	>3000
		Methanol	1.0	2,088.3±12.7
			2.0	>3000
			3.0	>3000
Sucrose	0.2	DMSO	1.0	2,624.7±43.5
			2.0	>3000
			3.0	>3000
		EG	1.0	2,632.7±14.5
			2.0	>3000
			3.0	>3000
		PD	1.0	2,370.3±31.5
			2.0	>3000
			3.0	>3000
		Methanol	1.0	2,374.7±83.9
			2.0	>3000
			3.0	>3000

DMSO: dimethyl sulfoxide, EG: ethylene glycol, PD: 1,2-propanediol.

담륜자의 수를 헤아려 생존율을 조사하였다. D상 유생의 냉동에서는 담륜자의 냉동 결과에서 가장 성적이 좋았던 회석액과 동해방지제를 적용하였고, 그 외 냉동보존 과정은 동일하게 하였다. 해동된 D상 유생은 심장박동 여부로 생존율을 조사하였다.

모든 자료는 Computer Program Statistix 3.1 (Analytical Software, St. Paul, Min. USA)로 ANOVA를 실시하여 최소 유의차검정으로 평균간의 유의차 유무를 판정하였다.

동해방지제 종류 및 농도에 따라 담륜자를 냉동보존한 결과, DMSO와 EG에서 생존율이 높게 나타났다. 특히 회석액으로 0.2 M sucrose를, 동해방지제로 2.0 M DMSO와 EG를 사용하였을 때, 각각 97.4±0.5%와 85.0±2.5%의 생존율을 보였다 (P<0.05) (Fig. 1). 또한 PD에서는 8.1±2.8%로 생존율이 낮았으며, methanol의 경우에는 모두 폐사하였다. 회석액으로 0.2 M sucrose를 사용하였을 경우 fructose에 비해 유의하게 높은 생존율을 보였다 (P<0.05) (Fig. 1). 한편, 회석액과 동해방지제의 종류에 상관없이 2.0 M의 동해방지제를 사용하였을 때, 냉동후 담륜자의 생존율이 높았다 (P<0.05).

초기 D상 유생을 이용한 냉동보존의 경우, 담륜자의 냉동보존시 생존율이 높았던 회석액과 동해방지제를 사용하였다. 즉 회석액으로 0.2 M sucrose, 동해방지제로 2.0 M DMSO, 2.0 M EG를 사용한 결과, 각각 78.9±9.4%, 31.2±4.9%의 생존율을 나타내어(P<

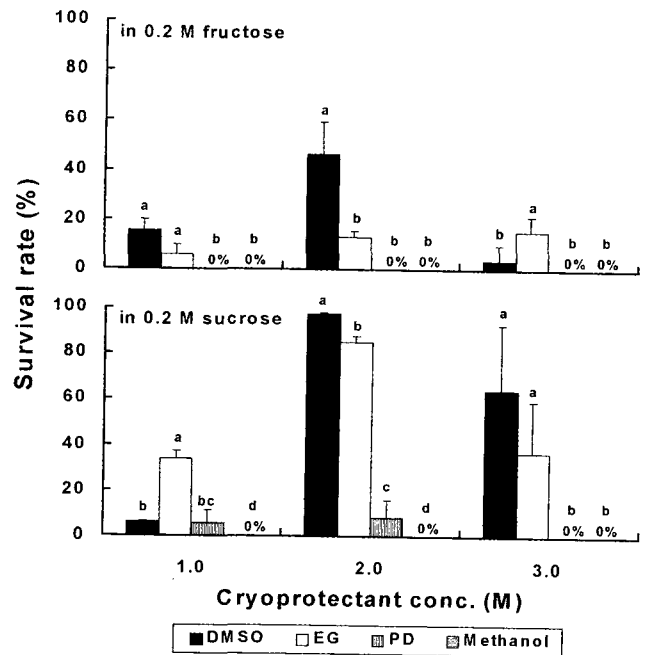


Fig. 1. Survival rates of post-thawed trochophores with four different cryoprotectant concentrations. DMSO: dimethyl sulfoxide, EG: ethylene glycol, PD: 1,2-propanediol. Different superscripts within same concentration of cryoprotectants are significantly different (P<0.05).

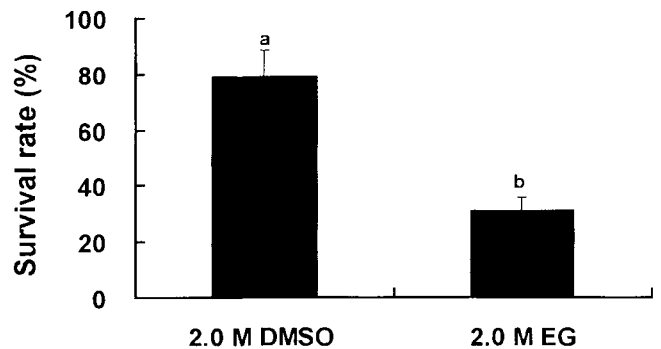


Fig. 2. Survival rates of post-thawed early D-shaped larvae with two different cryoprotectants. Different superscripts are significantly different (P<0.05).

0.05) (Fig. 2), DMSO가 EG에 비해 생존율이 유의하게 높은 것을 알 수 있었다(P<0.05).

동해방지제는 냉동에 의한 손상을 막기 위해 첨가하는 물질로 세포내 전해질의 농축이나 삼투압의 상승과 세포내외의 빙결정 (icecrystal) 형성 등 냉동-해동 후 발생배의 생존에 불리한 상태를 완화하거나 조절하는 작용을 한다 (한국수정관인식학회, 1995). 이러한 동해방지제는 단백질에 선택적으로 결합하여 세포내 소기관을 보호하는 저분자의 투과성 동해방지제 (acetamide, DMSO, EG, glycerol, methanol, polyethylene glycol, propylene glycol)와 인지질의 극성부위에 결합하여 세포막을 안정시키는 고분자의 비투과성 동해방지제 (fructose, sucrose, trehalose 등 당류)가 있다.

본 연구에서는 투과성 동해방지제인 DMSO, EG, PD, methanol과 회석액으로 비투과성 동해방지제인 fructose와 sucrose를 사용하였다. 동해방지제의 높은 삼투질농도 (Table. 1)는 발생배에 삼투압적, 생화학적으로 손상을 주는 것으로 알려져 있지만 (Renard and Cochard, 1989), 이 연구에 사용한 담륜자와 D상 유생의 생존율에는 큰 영향을 미치지 못했다. 특히 비투과성 동해방지제인 sucrose와 투과성 동해방지제인 DMSO를 혼합하여 사용하였을 경우, 다른 동해방지제에 비해 해동 후 생존율이 높았다. 이는 동해방지제로 인한 삼투압 충격을 회석액인 sucrose가 세포막 외부에서 완화시키는 것으로 판단된다 (Choi and Chang, 1999). 각 동해방지제의 농도에서 1.0 M, 3.0 M과 비교해 2.0 M의 농도를 이용하였을 때 높은 생존율을 보였다. 이는 동해방지제 중 1.0 M DMSO를 사용하였을 때 높은 생존율을 보인 진주조개 (Chang et al., 1999)와는 다르게 나타났다. DMSO의 경우, 송사리 (Arii et al., 1987), 무지개송어 (Arii et al., 1992), 초어, *Ctenopharyngodon idella* (Zhang et al., 1992)와 참굴 (Chao et al., 1997)에서 냉동보존시 효과적인 동해방지제로 보고된 바 있다. Methanol은 zebrafish, *Brachydanio rerio* (Zhang et al., 1993; Hagedorn et al., 1997)와 잉어, *Labeo rohita* (Ahammad et al., 1998) 발생배의 냉동보존에서 가장 적합한 동해방지제인 것으로 나타났으나, 본 연구에서는 담륜자와 D상 유생 모두가 폐사하여 복방대합의 발생배를 냉동보존하는 데는 부적합한 것으로 나타났다. 따라서 동해방지제의 투과성 여부만으로는 냉동보존 효과를 판단할 수 없을 것으로 생각되며 (Renard, 1991; Choi and Chang, 1999), 어류와 조개류의 발생배에 대한 methanol의 동해방지 효과는 서로 다른 것으로 보인다.

참 고 문 헌

Ahammad, M.M., D. Bhattacharyya and B.B. Jana. 1998. Effect of different concentrations of cryoprotectant and extender on the hatching of Indian major carp embryos (*Labeo rohita*, *Catla catla*, and *Cirrhinus mrigala*) stored at low temperature. *Cryobiology*, 37, 318~324.

Arii, N., K. Nami, F. Gomi and T. Nakazawa. 1987. Cryoprotection of medaka embryos during development. *Zool. Sci.*, 4, 813~818.

Arii, K., T. Suzuki, R. Takai and T. Kozima. 1992. Tolerance of fish eggs to dimethyl sulfoxide as the cryoprotectant. *J. Tokyo Univ.*

Fish., 79, 121~126.

Billard, R. 1992. Reproduction in rainbow trout: Sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. *Aquaculture*, 100, 263~298.

Chang, Y.J., Y.H. Choi and Y.J. Chang. 1999. Selection of cryoprotectants for cryopreservation of pearl oyster, *Pinctada fucata martensii* trochophore. *Dev. Reprod.*, 3, 107~111 (in Korean).

Chao, N.H., T.T. Lin, Y.J. Chen, H.W. Hsu and I.C. Liao. 1997. Cryopreservation of late embryos and early larvae in the oyster and hard clam. *Aquaculture*, 155, 31~44.

Choi, Y.H. and Y.J. Chang. 1999. Survival rates of trochophores from pearl oyster, *Pinctada fucata martensii* and Pacific oyster, *Crassostrea gigas* immersed in four kinds of cryoprotectant. *J. Korean Fish. Soc.*, 32, 476~480 (in Korean).

Hagedorn, M., E. Hsu, F.W. Kleinhans and D.E. Wildt. 1997. New approaches for studying the permeability of fish embryos; Toward successful cryopreservation. *Cryobiology*, 34, 335~347.

Mazur, P. 1984. Freezing of living cells; Mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.*, 274, C125~C142.

Renard, P. 1991. Cooling and freezing tolerances in embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: methanol and sucrose effects. *Aquaculture*, 92, 43~57.

Renard, P. and J.C. Cochard. 1989. Effect of various cryoprotectants on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* thunberg, Manila clam, *Ruditapes philippinarum* Reeve and king scallop, *Pecten maximus* (L) embryos: Influence of the biochemical and osmotic effects. *Cryo-Letters*, 10, 169~180.

Wallace, R.A. and K. Selman. 1990. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *J. Electron Microsc. Tech.*, 16, 175~201.

Whittingham, D.G., S.P. Seibo and P. Mazur. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . *Science*, 178, 411~414.

Zhang, L., X. Liu, D. Lu, S. Chen and J. Fang. 1992. Effects of several factors on the survival rate of fish embryo before it cryopreserved. *Freshwat. Fish. Danshui. Yuye.*, 1, 20~24.

Zhang, T., D.M. Rawson and G.J. Morris. 1993. Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Aquat. Living Resour. Vivanties. Aquat.*, 6, 145~153.

한국수정란이식학회. 1995. 소 수정란 이식. 정문각. 290pp.

2000년 9월 25일 접수

2000년 11월 27일 수리