

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

柳 俊 熙 · 李 在 根
高麗大學校 農科大學

The Study on the Freezing Methods and the Cryoprotectants for Rat Embryo Preservation

J. H. You and J. K. Lee
College of Agriculture, Korea University

Summary

This experiment was carried out to investigate effects of DMSO or ethylene glycol as a cryoprotectant and of freezing methods on survival rate of frozen-thawed rat 2-cell embryos by morphological observation.

2-cell embryos were recovered from oviducts of Sprague Dawley females mated with males of same strain on day 2 of pregnancy after inducing superovulation by intraperitoneal injection of PMSG and HCG.

In slow freezing and thawing groups, embryos were frozen to -79°C or -196°C in a glass test tube containing 0.2ml PBI with 1.5M DMSO or 1.2M ethylene glycol at a rate of 0.3-1.0C/min. and thawed slowly. When samples were frozen to -79°C , higher survival rate was obtained in the medium containing DMSO (43.9%) than ethylene glycol (41%). And similar result was obtained (32.5% in DMSO vs. 31.4% in ethylene glycol) when samples were frozen.

In rapid freezing and thawing groups, embryos were frozen to -79°C or -196°C in a glass test tube containing 0.2ml of PBI with 1.5M DMSO or 1.2M ethylene glycol by rapid cooling, and thawed rapidly. When samples were frozen to -79°C , 1.5M DMSO (13.2%) was more effective than 1.2M ethylene glycol (6.1%). When the storage temperature was -196°C , survival rates were 9.8% in 1.5M and 5.4% in 1.2M ethylene glycol.

I. 緒 論

冷凍精液을 利用한 人工授精이 雄畜이 가지고 있는 遺傳形質을 後代에 効果的으로 傳하는데 크게 기여하고 있지만 家畜育種의 側面에서 본다면 目標한 바에 도달하는데 상당한 시일이 걸리고 또한 經濟的으로도 값비싼 種牡畜을 보유해야 하는 등의 缺陷도 있다.

受精卵의 凍結保存은 後代檢定時의 世代間隔을 단축시켜주며 (Whittingham, 1971) 遺傳的 漂流에 對한 假說 (Bailey, 1977) 및 母側의 仔畜에 對한 영향 (Whittingham et al, 1973)을 규명할 수 있게 하고

있다. 한편 家畜外에도 實驗小動物의 손실되기 쉬운 遺傳形質의 保存을 가능케 해주어 의학, 면역학, 유전학, 생화학 등의 研究에 많은 도움을 주게 되었다 (Whittingham, 1974).

그러나 아직도 受精卵移植에 關連된 技術的 및 그 기초가 되는 學門的 研究課題는 山積해 있다.

受精卵의 凍結保存은 精液이나 다른 細胞에서와 마찬가지로 凍結 過程中 일어나기 쉬운 細胞內氷結化에 의한 細胞의 파괴가 가장 큰 실패의 원인으로指摘되고 있다.

Bank와 Mazur (1973) 및 Mazur 등 (1972)은 冷却速度가 지나치게 빠르거나 느리면 冷却하는 細胞의 생존에 영향을 준다고 하였다. 이에 대하여는 Ma-

zur(1977) 및 Leibo 등(1974)도 의견을 같이 하고 있고 또 融解에 있어서도 너무 느릴 경우에 있어서는 細胞가 생존하기 어렵다고 하였다. 그러나 受精卵 凍結過程과 時間은 冷凍精液 製造의 過程과 時間에 비해 더 複雜하고 길며 高度의 技術이 요구되어 受精卵移植 技術을 包含하여 實用化 段階에 이르기까지는 아직도 많은 問題點이 있다.

日本에서는 Inoue 등(1982)이 개발한 미세조정 Computer에 의한 凍結裝置를 소의 受精卵에 적용시켜 效果를 보았으나 産業化에는 아직도 問題點을 안고 있다.

本 試驗은 dimethyl sulphoxide(DMSO) 및 ethylene glycol을 凍害防止劑로 使用하여 rat의 2細胞期 受精卵를 緩速 및 急速凍結方法으로 保存 및 融解를 실시하여 각 凍害防止劑別 凍結效果를 形態의 正常性を 觀察하므로써 家畜受精卵 凍結保存의 基礎資料를 얻고자 실시하였다.

II. 材料 및 方法

1. 試驗期間: 1983. 11. 20~1984. 4. 20

2. 試驗場所: 고려대학교 농과대학 축산학과
가축번식생리 실험실

3. 供試動物: 서울대학교 醫科大學 實驗動物 飼育室에서 繁殖시킨 Sprague Dawley種의 rat中 未成熟인 약 25~40日令의 암컷과 成熟한 100日令 以上の 숫컷을 使用하였으며 飼料給與는 實驗動物用 固型飼料를 무제한 給與하였고 1日 12時間 點燈飼育 하였다.

4. 試驗方法

(1) 過排卵 誘起 및 受精卵의 採取

各 處理區 모두 25 IU의 PMSG(Folligen, Intervet社)를 腹腔內에 注射하고 48時間 經過後 10 IU의 HCG(Chorulon, Intervet社)를 腹腔內에 注射하여 숫컷과 合舍, 交尾토록 하였다.

受精여부는 交尾시킨 다음날 오전에 암컷의 膺에서 精子를 관찰함으로써 확인하였으며 이날을 受精後 1日로 하였다. 受精後 2日에 암컷을 도살하여 受精卵를 採取하였다. 採取作業은 우선 난관전체를 1回用 plastic petri dish (50×9 mm)內에 담긴 液体 paraffin oil 下의 培養液內에서 2細胞期의 受精卵

를 採取하였다.

採取한 受精卵은 60倍의 實體顯微鏡下에서 形態學的으로 正常인것만을 선별하여 2~3回정도 新鮮한 培養液에 옮겨가며 卵子外 細胞片들을 제거하였다.

(2) 試驗區 配置

採取한 受精卵의 凍結 및 融解方法에 따라 緩速區 및 急速區로 나누었으며 두 區 모두 保存液으로 1.5M DMSO 및 1.2M ethylene glycol 保存液을 使用하였으며 保存溫度는 -79°C 및 -196°C 로 하였다. 8個 處理區에 각각 5首의 암컷들을 임의 배치하여 그로부터 受精卵를 採取하였던 바 그 配置狀況은 Table 1과 같다.

(3) 培養液의 調製

本 試驗에서 使用한 培養液은 Table 2의 修正 - Dulbecco's phosphate-buffered saline(PB 1; Whittingham, 1974)에 50%의 rat血清을 첨가하여 製造하였다.

rat血清은 우선 ether로 마취한 rat를 開腹하여 腹大動脈으로 부터 採血하여 0°C 에 保存해 두었던 遠心管에 넣어 즉시 3,000 rpm으로 10~15分間 遠心分離한 後 上清部에 형성된 fibrin clot를 멸균핀셋을 用심관에 넣고 用심관벽을 돌려 제거한 다음 56°C 의 water bath에서 30分間 熱處理하여 -20°C 에서 保存한 非動化血清을 使用하였다.

(4) 受精卵의 凍結 및 融解

1) 緩速凍結 및 融解區

採取한 rat 2-細胞期 受精卵를 1.5M DMSO 및 1.2M ethylene glycol이 첨가된 PB 1 培養液에서 Whittingham (1975)의 方法에 따라 凍結 및 融解를 실시하였다.

2) 急速凍結 및 融解區

採取한 2細胞期 受精卵를 PB 1 培養液에 1.5M DMSO 및 1.2M ethylene glycol이 첨가된 각각의 保存液에 넣어 Miyamoto 및 Ishibashi(1983 a)의 方法에 따라 -79°C 및 -196°C 까지 急速凍結後 融解를 실시하여 各 凍害防止劑 및 保存溫度別 受精卵의 生存率을 比較하였다.

Table 1. Experimental design

Method of freezing and thawing	Cryoprotectant	Final temperature	No. of embryos frozen
frozen and* thawed lowly	1. 5M DMSO 1. 2M ethylene glycol	-79°C	54 (5)*** 54 (5)
	1. 5M DMSO 1. 2M ethylene glycol	-196°C	54 (5) 54 (5)
frozen and** thawed rapidly	1. 5M DMSO 1. 2M ethylene glycol	-79°C	54 (5) 71 (5)
	1. 5M DMSO 1. 2M ethylene glycol	-196°C	58 (5) 67 (5)

*Frozen at the cooling rate of 0.8-1.0°C and thawed at the thawing rate of 4°C/min

**Frozen at the cooling rate of ~30°C between -10°C and -79°C, thawed at the thawing rate of ~500°C/min

***No. of parentheses is the number of female does.

Table 2. Composition of modified Dulbecco's phosphate-buffered saline used for rat embryo collection and storage (Whittingham, 1974)

Component	g/l	mM
NaCl	8.00	136.87
KCl	0.20	2.68
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.132	0.90
KH ₂ PO ₄	0.200	1.47
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.100	0.49
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.898	8.09
Na-pyruvate	0.036	0.33
Glucose	1.00	5.56
Penicillin	0.060	

III. 結果 및 考察

1. 緩速凍結 및 融解에 있어서의 受精卵 保存 狀況

過排卵 處理한 rat 암컷의 卵管에서 採取한 2細胞期 受精卵을 1.5 M DMSO 保存液 및 1.2 M ethylene glycol 保存液內에서 冷却速度 0.8~1.0°C/min 로 -79°C 및 -196°C 까지 冷却後 保存한 다음 4°C

/min의 速度로 融解하여 그 生存率을 檢査한바 結果는 Table 3 및 Table 4 와 같다.

Table 3 에서 보는 바와 같이 -79°C dry ice bath에 24時間 保存後의 生存率은 1.5 M DMSO 保存液內에서는 43.9%, 1.2 M ethylene glycol 保存液內에서는 41.0%로서 1.5 M DMSO 保存液의 경우가 2.9% 높아 약간의 效果的인 保存液으로 나타났다.

Table 4 에서 보는 바와 같이 -196°C의 液體室

Table 3. Survival of rat 2-cell embryos frozen to -79°C by slow cooling and thawing

Cryoprotectant	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. of normal embryos after thawing (%)*
1. 5M DMSO	54	41	18(43.9)
1. 2M ethylene glycol	54	39	16(41.0)

*Percentage of the number of embryos recovered

Table 4. Survival of rat 2-cell embryos frozen to -196°C by slow cooling and thawing.

Cryoprotectant	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. of normal embryos after thawing (%)
1.5M DMSO	54	37	12(32.5)
1.2M ethylene glycol	54	35	11(31.4)

*Percentage of the number of embryos recovered

素内에서 受精卵을 保存한 경우의 生存率은 1.5M DMSO 保存液内에서는 32.5%, 1.2M ethylene glycol 保存液内에서는 31.4%로서 거의 비슷한 結果를 보였다.

한편 Table 3 및 Table 4에서 保存液別 生存率을 보면 1.5M DMSO 保存液의 경우 -79°C 保存의 경우가 -196°C 保存의 경우에 比하여 11.4% 높았다. 1.2M ethylene glycol 保存液에서도 -79°C 保存의 경우가 -196°C 保存의 경우에 比하여 9.6% 높게 나타나, 대체로 保存液에 관계없이 -79°C 保存의 경우가 -196°C 保存의 경우에 比하여 높은 生存率을 보였다.

2. 急速凍結 및 融解에 있어서의 受精卵 保存 狀況

採取한 2細胞期 受精卵을 1.5M DMSO 保存液 및 1.2M ethylene glycol 保存液内에서 -79°C 및 -196°C 까지 急速凍結 시킨후 融解速度 $\sim 500^{\circ}\text{C} / \text{min}$ 로 融解하여 그 生存率을 檢査한 바 結果는 Table 5 및 Table 6과 같다.

受精卵 生存率은 -79°C 의 dry ice bath에 保存時, 1.5M DMSO 保存液内에서는 13.2%, 1.2M ethylene glycol 保存液内에서는 6.1%로서 1.5M DMSO 保存液의 경우가 7.1% 높았다.

한편 -196°C 의 液体窒素内에서 保存한 경우는

Table 6에서 보는 바와 같이 1.5M DMSO 保存液内에서의 生存率이 9.8%였으며 1.2M ethylene glycol 保存液内에서는 5.4%로서 DMSO의 경우가 높았다.

3. 緩速凍結과 急速凍結에 의한 生存率의 比較

緩速凍結 및 急速凍結後 融解하여 그 生存率을 比較하면 Table 7에서 보는 바와 같이 冷却速度가 $0.8\sim 1.0^{\circ}\text{C} / \text{min}$ 로 緩速일 때가 急速凍結의 경우에 比하여 顯著히 높다.

이는 Kasai 등(1982)의 rat 受精卵 凍結保存의 경우 緩速凍結時 DMSO 保存液에서는 生存率이 体外培養後 59%였고, ethylene glycol 保存液의 경우에는 50%로서 急速凍結의 경우 각각 31% 및 20%에 比하여 현저히 높았음에 비추어 비슷한 경향을 보였다.

다음에 이 表에서 保存液別 生存率을 보면 DMSO 保存液의 경우 -79°C 保存區에서는 緩速凍結時 43.9%, 急速凍結時 13.2%로서 ethylene glycol 保存液의 41.0% 및 6.1%에 比하여 약간 높았으며, -196°C 保存區에서는 緩速凍結時 DMSO 保存液의 경우 32.5%, 急速凍結時에는 9.8%로서 ethylene glycol 保存液의 31.4% 및 5.4%에 比하여 높은 경향을 보였으나, 凍害防止劑로서 ethylene glycol은

Table 5. Survival of rat 2-cell embryos frozen to -79°C by rapid cooling and thawing.

Cryoprotectant	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. of normal embryos after thawing (%) *
1.5M DMSO	64	38	5 (13.2)
1.2M ethylene glycol	58	33	2 (6.1)

Table 6. Survival of rat 2-cell embryos frozen to -196°C by rapid cooling and thawing.

Cryoprotectant	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. of normal embryos after thawing (%) *
1.5M DMSO	71 71	41	4 (9.8)
1.2M ethylene glycol	67 67	37	2 (5.4)

*Percentage of the number of embryos recovered

Table 7. Comparison of survival of rat 2-cell embryos frozen-thawed slowly or rapidly in the medium containing 1.5M DMSO or 1.2M ethylene glycol

Cooling and thawing rate	Final temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Cryoprotectant	Survival rate (%)
Slow	-79	1.5M DMSO	43.9(18/41) *
		1.2M ethylene glycol	41.0(16.39)
	-196	1.5M DMSO	32.5(12/37)
		1.2M ethylene glycol	31.4(11/35)
Rapid	-79	1.5M DMSO	13.2(5/38)
		1.2M ethylene glycol	6.1(2/33)
	-196	1.5M DMSO	9.8(4/41)
		1.2M ethylene glycol	5.4(2/37)

*Figures in parentheses represents No. of normal embryos per No. of embryos recovered after thawing

DMSO와 비슷한 효과를 지니고 있음을 알 수 있었다.

急速凍結時 生存率이 대체적으로 저조하였음은 Ashahina 등(1970) 및 Leibo(1977)가 지적한 대로 細胞内外의 삼투농도가 동결시 급격히 변화하기 때

문으로 여겨진다.

本試驗에서는 融解後 受精卵의 形態學的 檢査에 의하여 生存을 判別하였지만 비록 形態學的으로 正常인 受精卵일지라도 이후 細胞 發育을 지속하지 못하는 경우가 있기 때문에 그 培養 및 移植의 수

행이 필요하다고 여겨진다.

IV. 摘 要

本 試驗은 PMSG 및 HCG를 投與하여 過排卵을 유기한 rat (Sprague Dawley種) 암컷을 同種의 수컷과 交尾시켜 受精後 2日에 도살하여 卵管으로부터 2細胞期 受精卵을 採取하여 이를 凍結方法 및 凍害防止劑를 달리하여 凍結保存하여 形態學的 正常性에 의하여 生存率을 檢査하였던 바 그 結果를 要約하면 다음과 같다.

緩速凍結 및 融解의 경우 採取한 受精卵을 1.5M DMSO 및 1.2M ethylene glycol이 첨가된 0.2ml의 PB 1 培養液이 들어있는 시험관내에서 0.8~1.0 °C/min의 속도로 -79°C 및 -196°C까지 냉각하여 보존후 4 °C/min의 속도로 융해하여 그 생존율을 檢査하였던 바, DMSO 保存液의 경우 -79°C에서 보존시 43.9%, -196°C에서 보존시 32.5%였으며, ethylene glycol 保存液의 경우에는 각각 41.0% 및 31.4%였다.

急速凍結 및 融解의 경우 採取한 受精卵을 1.5M DMSO 및 1.2M ethylene glycol이 첨가된 0.2ml의 PB 1 培養液이 들어있는 시험관 내에서 -79°C 및 -196°C까지 ~30°C/min의 속도로 급속동결 후 급속융해하여 그 생존율을 檢査하였던 바, DMSO 保存液의 경우 -79°C 보존시 13.2%, -196°C 보존시에는 9.8%였으며 ethylene glycol 保存液의 경우에는 각각 6.1% 및 5.4%였다.

引 用 文 献

1. Ashahina, E.K. Shimada and Y. Hisada. 1970. A stable state of frozen protoplasm with invisible intracellular ice crystals obtained by rapid cooling. Exptl. Cell Res., 59: 349-358.
2. Bailey D.G. 1977. Genetic drift; the problem and its possible solution by frozen embryo storage. in Ciba Foundation Symposium 52 pp. 291-303.
3. Bank, H. and P. Mazur. 1973. Visualization of freezing damage. J. Cell Biol., 57: 729-742.
4. Bank, H. and R.R. Marker. 1974. Survival of frozen rabbit embryos. Exptl. Cell. Res., 89: 188-196.
5. Bilton, R.J. and N.M. Moor. 1976. In Vitro culture, storage and transfer of goat embryos. Aust. J. Biol. Sci., 29: 125-129.
6. Fisher, P.S. and J.W. Macpherson. 1977. Survival of mouse embryos after freezing in medium containing dimethyl sulphoxide and yolk extract. J. Dairy Sci., 60: 1301-1303.
7. Inoue, T., M. Yoshida, H. Kanagawa, N. Sakao and Y. Kuraoka. 1982. Development of computer controlled freeze-thaw apparatus and its application to bovine embryos. Jpn. J. Anim. Reprod., 28(3): 150-153.
8. Kasia, M., K. Niwa and A. Iritani. 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. J. Reprod. Fert., 59: 51-56.
9. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1982. Survival of rat embryos after freezing. J. Reprod. Fert., 66: 367-370.
10. Leibo, S.P., P. Mazur, and S.C. Jackowski. 1974. Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. Exptl. Cell Res., 89: 79-88.
11. Leibo S.P. 1977. Fundamental Cryobiology of mouse ova and embryos in Ciba Foundation Symposium 52 pp. 69-96.
12. Mazur, B., S.P. Leibo, and E.H.Y. Chu. 1972. A two-factor hypothesis of freezing injury. Exptl. Cell Res. 345-355.
13. Mazur B., 1977. Slow freezing injury in mammalian cells in Ciba Foundation Symposium 52 pp. 19-48.
14. 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.
15. 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.
16. Miyamoto, H., E. Okinasu and T. Ishibashi. 1979. Survival of mouse embryos after freezing to various low temperature under different cryoprotective agents and cooling rates. Jpn. Zootech.

- Sci. 50(5): 312-319.
17. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1980. Effects of the time and temperature of exposure to dimethylsulphoside prior to freezing on survival of frozen-thawed rat embryos. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 51 (10): 728-733.
 18. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1981. Survival of mouse embryos after freezing and thawing in the presence of erythritol. *J. Exptl. Zool.*, 216: 337-340.
 19. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1983a. Soild CO₂ freezing of mouse embryos *J. Reprod. Fert.* 67: 107-111.
 20. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1983b. Survival of mouse embryos frozen-thawed slowly or rapidly in the presence of various cryoprotectants. *J. Expl. Zool.* 226: 123-127.
 21. 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. Exptl. Zool.* 197: 369-374.
 22. Polge C. 1977. The freezing of mammalian embryos: Perspectives and possibilities.
 23. Whittingham D.G. 1971. Survival of Mouse embryos after freezing and thawing. *Nature* 233: 125-126.
 24. Whittingham D.G. and S.P. Leibo. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C *Science* 178: 411-414.
 25. Whittingham D.G. 1974. Embryo banks in the future of development genetics. *Genetics* 78: 395-402.
 26. Whittingham D.G. 1975. Survival of rat embryos after freezing and thawing *J. Reprod. Fert.* 43: 575-578.
 27. Whittingham D.G. and C.E. Adams. 1976. Low temperature preservation of rabbit embryos. *J. Reprod. Fert.* 46: 269-274.
 28. Whittingham D.G., M. Wood, J. Farrant, H. Lee and J.A. Halsey. 1979. Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196°C. *J. Reprod. Fert.* 46: 151-154.
 29. Willadsen S.M., C. Polge, L.E.A. Rowsen and M. Moor. 1976. Deep freezing of sheep embryos. *J. Reprod. Fert.* 46: 151-154.
 30. Willadsen S., C. Polge and L.E.Z. Rowson. 1978. The viability of deep-frozen cow embryos. *J. Reprod. Fert.* 52: 391-393.
 31. Wilmut L., C. Polge and L.E.A. Rowson. 1975. The effect on cow embryos of cooling to 20,0 and -196°C *J. Reprod. Fert.* 45: 409-411.
 32. Wood, J.J. and J. Farrant. 1981. Two-step freezing of mouse embryos in frozen storages of laboratory animals. ed. by Zeilmaker G.H. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart, New York pp. 55-59.