

생쥐 8細胞期 受精卵의 凍結保存에 關한 研究

崔善昊 · 李揆丞 · 朴昌植 · 徐吉雄

忠南大學校 農科大學

Studies on Cryopreservation of 8-Cell Mouse Embryos

Choi, S.H., K. S. Lee, C. S. Park, and K. W. Seo

College of Agriculture, Chungnam National University

Summary

This study was carried out to determine the effects of cryoprotectants, freezing and thawing rates on the survival of 8-cell mouse embryos.

The female ICR mice were induced to superovulated by intraperitoneal injections of 5 i.u. PMSG and 5 i.u. HCG given 48h apart and then were paired with males of the same strain. They were killed and embryos were flushed from the oviducts and uteri on 3 days after injection of HCG. Embryos were flushed with modified Dulbecco's phosphate buffered saline and equilibrated with 1.5M-dimethyl sulfoxide (DMSO) or 1.5M-glycerol by 3-step procedure.

The freezing rates of the embryos were 1°C/min from room temperature to -5°C and the embryos were seeded at -5°C. After being held for 3 min at the seeding temperature, the rates were 0.3°C/min from -5°C to -35°C. From -35°C to -70°C, the rates were divided into 0.1°C/min, 1°C/min and 10°C/min, respectively. After being held for 5 min at -70°C, the embryos were plunged directly into liquid nitrogen.

The embryos were thawed at 4°C/min and 12°C/min from -196°C to 37°C, and for 2 min in 37°C water bath, respectively.

The average number of ovulation points and embryos recovered were 42.7 and 34 appearing 79.5% recovery rate. Eight cell embryos in the embryos recovered were 26.3.

The survival rates of embryos according to the freezing rates in the presence of 1.5M-DMSO were 73.5~80.6% at 0.1°C/min, 75.0~79.5% at 1°C/min and 52.8~54.7% at 10°C/min, but in the presence of 1.5M-glycerol were 62.9~67.6% at 0.1°C/min, 61.4~68.3% at 1°C/min and 25.5~30.2% at 10°C/min.

The survival rates of embryos were not affected by the thawing rates.

I. 緒 論

冷凍生物學의 發展과 더불어 家畜改良 및 增殖의 한 方法으로 受精卵를 凍結 保存하였다가 利用하러는 研究가 活潑히 進行되고 있다.

受精卵의 凍結保存은 遺傳形質을 長期間 保存할 뿐만 아니라 受精卵의 移植時 發情同期化의 過程

을 省略할 수 있게 하고, 家畜의 國際間 輸送을 容易하게 하므로 產業的 側面에서 볼 때 그 意義가 크며, 免疫學, 遺傳學, 生物學 等の 研究에 크게 寄與할 것으로 期待하고 있다.

생쥐의 凍結受精卵의 生存性에 關한 研究 結果를 살펴보면 培養液의 條件, 凍害防止劑의 添加 및 除去方法, 凍結 및 融解速度 等に 따라 매우 相異한

報告를 하고 있다. Whittingham 등(1972)과 Wilmot (1972)는 凍害防止劑로 dimethylsulfoxide나 glycerol을 사용할 境遇 0.2~0.8°C/min의 緩慢凍結과 4~25°C/min의 融解速度가 受精卵의 生存性에 좋은 結果를 가져온다고 하였다. Parkening 등(1976)은 凍害防止劑로는 1.5M의 dimethylsulfoxide가 가장 좋았으며, -4°C부터 -30°C와 -50°C까지 0.33°C/min速度로 凍結하였을 때는 各各 51%와 56%의 生存率을 나타내는데 反하여 同一한 速度로 -75°C까지 凍結하였을 때는 다만 18%만이 生存하였다. 그러나 -45°C까지 0.33°C/min의 速度로 凍結하다가 -45°C부터 -75°C까지 1°C/min의 速度로 凍結하였을 때는 72%의 生存率을 얻을 수 있다고 報告하면서 생쥐 受精卵의 凍結保存에 있어서는 -45°C부터 -75°C까지의 凍結速度가 가장 重要하다고 하였다. 한편 Whittingham 등(1979)은 緩慢凍結로 -35°C에서 -40°C까지 凍結시킨 後 바로 液體窒素에 沈漬하는 境遇 急速融解가 좋다고 하였다.

그러나 最近에는 Wood와 Farrant (1980), Kasai 등(1980, 1981), 그리고 Miyamoto와 Ishibashi(1981)에 의하면 急速凍結과 急速融解時에 생쥐 受精卵의 生存率이 높다고 報告하였다.

따라서 本 研究은 8細胞期에 있는 생쥐 受精卵의 融解 後 生存性에 對한 凍害防止劑의 種類 및 凍結速度의 影響을 좀 더 綜合的으로 究明하므로써 앞으로 家畜受精卵의 凍結 保存에 必要한 基礎 資料를 얻고자 實施하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試動物 및 飼育方法

供試動物은 忠南大學校 農科大學 畜産學科 家畜繁殖學 敎室에서 飼育하고 있는 6~8週齡의 未經産 雌性 ICR 생쥐(體重 20~25g)와 10週齡의 雄性 ICR 생쥐(體重 25~30g)를 使用하였다.

飼養管理는 plastic cage에 N. R. C.飼養標準에의 해 配合된 pellet 飼料를 自由給餌시켰으며, 물은 地下水를 自由給水하였고, 飼育室의 溫度는 23~25°C, 濕度는 50~55%, 日照時間은 1日 14時間으로 automatic time switch에 의해 調節하였다.

試驗은, 1985年 3月 20日부터 同年 9月 30日까지 7個月에 걸쳐 實施하였다.

2. 過排卵의 誘起 및 受精卵의 採取

過排卵 誘起를 爲하여 午後 4時에 未經産 雌性 ICR 생쥐의 腹腔內에 5 IU의 PMSG(Folligon, Intervet Co., Holland)를 注射하고, 48時間 後 5 IU의 HCG(Chorulon, Intervet Co., Holland)를 同一한 方法으로 注射하고 同時에 雌性 생쥐와 雄性 생쥐를 1:1로 合券하여 自然交尾를 誘導하였다.

다음날 아침 10:00時에 陰에서 陰栓(coital plug)을 確認하였으며, 陰栓이 確認되지 않은 個體는 本 試驗에서 除外시켰다.

受精卵의 採取는 HCG 注射 後 72時間後에 屠殺하여, 子宮 및 卵管을 體外로 剔出한 後 濾過紙에 옮겨 子宮 周圍의 結體組織과 血管 및 血液을 除去한 後 子宮의 한쪽 끝을 forceps으로 잡고 注射針(blunt needle)을 插入하여 1 ml 內외의 灌流液을 注入하여 watch glass內로 回收하였다.

이 때 使用된 灌流液 및 洗滌液은 Whittingham (1974)의 생쥐 受精卵 凍結保存液으로 使用하였다. Dulbecco's phosphate buffered saline(m-PBS)로서 pH 6.8~7.2, 滲透壓 280~290 mOsm.로 調整하였으며, 使用直前에 0.2µm milipore filter로 濾過시켜 無菌 處理하였다.

回收된 受精卵은 發育狀態를 實體顯微鏡 下에서 檢査하여 形態學的으로 正常的인 8細胞期 受精卵을 選別하여 m-PBS로 3回以上 洗滌한 後 供試하였다.

3. 受精卵의 凍結保存

保存液은 上記한 m-PBS를 使用하였으며, 凍害防止劑로는 dimethylsulfoxide(DMSO)와 glycerol을 各各 0.5M, 1.0M, 1.5M 添加한 液에 段階別로 10分, 10分, 30分間씩 受精卵을 옮겨 平衡시킨 後 0.5 ml plastic straw에 注入하여 straw powder로 封하였다. 封入된 straw는 곧 바로 自動細胞 凍結機(R-204 Cell Freezer, Planner Products, England)의 chamber에 넣어 凍結를 實施하였는 바, 凍結速度는 室温에서 -5°C까지 -1°C/min의 速度로 下降시켰으며, -5°C에서 Elsdon과 Seidel (1982)의 方法에 依據하여 液體窒素속에 미리 넣어 둔 핀셋으로 straw의 外壁를 接觸시켜 植水(seeding)을 實施하였다. 植水 後 3分間 -5°C에서 放置시키고 -35°C까지는 0.3°C/min의 速度로 下降시켰으며,

-70°C까지는 0.1°C/min, 1°C/min 그리고 10°C/min의 세 처리로凍結시켰다. -70°C에서 5分間 靜置시킨後 -196°C의 液體窒素에 沈漬 保存하였다.

4. 受精卵의 融解 및 培養

受精卵의 融解는 4°C/min와 12°C/min의 速度로 37°C까지 融解하는 方法과 37°C의 水槽에서 2分間 沈漬하여 融解하는 方法으로 實施하였다.

融解後의 受精卵은 DMSO를 除去하기 위하여 室温이 37°C로 調整된 室内에서 DMSO가 添加되지 않은 mPBS液으로 凍害防止劑의 平衡時와는 逆順으로 3回 處理하여 細胞質內的 DMSO를 除去하였고, 곧이어 受精卵을 新鮮한 m-PBS液으로 watch glass를 옮겨가면서 洗滌하여 卵子 周圍의 DMSO를 除去하고 20分間 靜置한 後 位相差 顯微鏡으로 形態學的으로 正常的인 것만을 選別한後 選別된 受精卵을 培養하였는데, 그 方法은 組織 培養用 plastic petridish에 10ml의 液體 paraffin을 넣은 다음, 하나의 petridish에 40μl의 m-PBS液 小滴 4個를 petridish 底面에 附着시키고 培養液 小滴當 3個씩의 受精卵을 넣은 다음 37°C의 CO₂ 培養器(95% air, 5% CO₂)에서 48時間 동안 培養한 다음 發達如否를 判別하여 生存率을 算出하였다.

III. 結果 및 考察

1. 排卵 成績

過排卵 透起에 의해서 얻어진 排卵成績은 Table 1에 나타난 바와 같다.

左右 한 雙의 卵巢에서 發見된 排卵點은 平均 42.7인데 比하여 回收된 受精卵은 平均 34.0個로서 79.5%의 回收率을 나타내었다. 回收된 受精卵中에서 8細胞期에 있는 것은 平均 26.3個로서 그 比率은 77.4%였다.

以上の 結果는 頭當排卵數에 있어서 13.7個라는 吳等(1983)의 報告나 89.6個라는 Gates (1971)의

報告와는 많은 差異를 나타내고 있는 바, 이는 使用한 호르몬의 種類, 호르몬의 投與時期와 量, 實驗動物의 系統 및 飼育條件 等の 差異에 起因된 것으로 思料된다.

한편, 吳等(1983)이 HCG注射後 72時間에 回收한 受精卵 中에 8細胞期 受精卵이 55%였다는 報告보다는 本 實驗의 結果가 相當히 높았다.

2. 受精卵의 凍害防止劑와 凍結速度에 따른 生存率

생쥐 8細胞期 受精卵의 凍害防止劑로는 各各 1.5 M-DMSO와 1.5M-glycerol을 使用하고, 凍結速度는 0.1°C/min, 1°C/min 및 10°C/min로 하여 凍結한 後, 다시 4°C/min, 12°C/min 및 37°C 水槽에서 2分間 沈漬의 速度로 融解했을 때의 生存率이 Table 2, 3, 4에 나타나 있다.

融解速度를 4°C/min로 했을 境遇를 살펴보면, 凍害防止劑로 1.5M-DMSO를 使用하였을 境遇가 1.5 M-glycerol을 使用하였을 境遇보다 受精卵의 回收率이 有意하게 (P<0.5) 높았다. 한편 凍結速度에 따른 受精卵의 生存率은 1.5M-DMSO와 1.5M-glycerol을 使用했을 境遇 모두 0.1°C/min와 1°C/min의 速度로 凍結하는 것이 10°C/min의 速度로 凍結하는 것보다 有意하게 (P<0.1) 높았다.

融解速度를 10°C/min와 37°C 水槽에서 2分間 沈漬로 했을 境遇를 살펴보면 融解速度를 4°C/min로 했을 境遇와 똑같은 結果를 보였다.

以上の 結果로 볼때 DMSO를 使用하는 것이 glycerol을 使用하는 것보다 여러 가지 凍結速度에서 受精卵의 生存率이 높다는 Leibo(1976)나 Fisher等(1977)의 報告와는 잘 一致하고 있으나, Jin等(1986)이나 盧等(1986)의 1.5M-DMSO와 1.5M-glycerol 사이에 生存率의 差異를 認定할 수 없다는 報告와는 差異가 있었다. 한편, Kasai等(1981)은 DMSO나 glycerol과 같은 凍害防止劑를 添加할 境遇 添加時 溫度, 凍結速度 및 融解速度에 따라 受精卵

Table 1. Embryo recovery rate from 33 heads of superovulated mouse by PMSG and HCG

Item	Ovulation points			Recovered embryos		8-cell embryos	
	Left	Right	Total	Number	%	Number	%
Total	697	712	1,409	1,120	79.5	867	77.4
Mean	21.1	21.6	42.7	34.0	79.5	26.3	77.4

Table 2. Effects of cryoprotectants and freezing rates on the survival of 8-cell mouse embryos after thawing at 4°C/min

Cryoprotectants	Freezing rates	No. of embryos recovered	No. of embryos developed to morula	Survival rates (%)
1.5M - DMSO	0.1°C/min	34	25	73.5 ^c
	1°C/min	39	31	79.5 ^c
	10°C/min	51	27	52.9 ^d
	\bar{X}	—	—	68.6 ^a
1.5M - glycerol	0.1°C/min	35	22	62.9 ^c
	1°C/min	44	27	61.4 ^c
	10°C/min	51	13	25.5 ^d
	\bar{X}	—	—	49.9 ^b

ab Means (only \bar{X} 's were compared) in the same column with different superscripts differ significantly ($P < .05$).

cd Means in the same column within cryoprotectant with different superscripts differ significantly ($P < .01$).

Table 3. Effects of cryoprotectants and freezing rates on the survival of 8-cell mouse embryos after thawing at 12°C/min

Cryoprotectants	Freezing rates	No. of embryos recovered	No. of embryos developed to morula	Survival rates (%)
1.5M - DMSO	0.1°C/min	34	26	76.5 ^c
	1°C/min	40	30	75.0 ^c
	10°C/min	53	29	54.7 ^d
	\bar{X}	—	—	68.7 ^a
1.5M - glycerol	0.1°C/min	33	21	63.6 ^c
	1°C/min	46	30	65.2 ^c
	10°C/min	57	17	29.8 ^d
	\bar{X}	—	—	53.0 ^b

ab Means (only \bar{X} 's were compared) in the same column with different superscripts differ significantly ($P < .05$).

cd Means in the same column within cryoprotectant with different superscripts differ significantly ($P < .01$).

Table 4. Effects of cryoprotectants and freezing rates on the survival of 8-cell mouse embryos after thawing at 37°C water bath for 2min

Cryoprotectants	Freezing rates	No. of embryos recovered	No. of embryos developed to morula	Survival rates (%)
1.5M - DMSO	0.1°C/min	36	29	80.6 ^c
	1°C/min	41	32	78.0 ^c
	10°C/min	53	28	52.0 ^d
	\bar{X}	—	—	70.5 ^a
1.5M - glycerol	0.1°C/min	34	23	67.6 ^c
	1°C/min	41	28	68.3 ^c
	10°C/min	53	16	30.2 ^d
	\bar{X}	—	—	55.4 ^b

ab Means (only \bar{X} 's were compared) in the same with different superscripts differ significantly ($P < .05$).

cd Means in the same column within cryoprotectant with different superscripts differ significantly ($P < .01$).

의 생존률의 차이가 많다고 報告하였다. 또한 凍結 및 融解速度에 있어서 緩慢 凍結 및 融解가 急速凍結 및 融解보다 좋은 생존률을 나타낸다는 Whittingham等(1972), Wilmut(1972) 그리고 Parkening等(1976)의 報告와도 잘 一致하고 있으며, 本 試驗에서 나타난 바와 같이 融解速度에 따른 생존률에 차이가 없는 것은 緩慢凍結 後 急速融解로도 좋은 成績을 얻었다는 Whittingham(1979)의 報告를 잘 뒷받침 해 주고 있다.

그러나 最近 急速 凍結 및 融解로도 생쥐 受精卵의 생존률을 높일 수 있다는 Wood와 Farrant(1980), Kasai等(1980, 1981) 그리고 Miyamoto와 Ishibashi(1981, 1983) 등의 報告가 있어 앞으로 DM-SO나 glycerol의 添加時 溫度 條件이나 濃度 등에 따른 凍結速度나 融解速度가 좀 더 綜合的으로 檢討되어야 할 것으로 思料된다.

IV. 摘 要

本 研究는 凍害防止劑와 凍結速度 및 融解速度가 8細胞期 생쥐 受精卵의 생존률에 미치는 影響을 究明하기 爲하여 實施하였다.

受精卵은 생쥐 頭當 5IU의 PMSG를 腹腔內에 注射하고 48時間 後에 HCG를 同一한 方法으로 注射하였으며, HCG 注射 後 3日째에 屠殺하여 子宮과 卵官을 灌流하여 回收하였다.

回收된 受精卵의 洗滌과 凍結 保存時 使用한 保存液은 Dulbecco's phosphate buffered saline(m-PBS)이었으며, 凍害防止劑로는 DMSO와 glycerol을 使用하였는데, 3段階로 最終濃度가 1.5M이 되게 하였다.

受精卵의 凍結方法은 室溫에서 -5°C 까지 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 速度로 下降시켜 植氷하고 3分間 放置시킨 다음 $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 速度로 -35°C 까지 冷却시켰으며 -70°C 까지는 $0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 및 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 로 冷却시키고 5分間 放置 後 -196°C 의 液體窒素에 保存하였다.

融解는 $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 와 $12^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 速度로 37°C 까지 加溫하는 方法과 37°C 의 水槽에서 2分間 沈漬시키는 方法을 利用하였다.

平均 排卵點은 42.7個인데 比하여 回收된 受精卵은 34.0個로서 回收率은 79.5%였으며, 受精卵 中에서 8細胞期の 것은 26.3個였다.

受精卵의 凍結速度에 따른 생존률은 1.5M-DM-SO 使用時 $0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 에서 73.5~80.6%, $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 에서 75.0~79.5%, $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 에서 52.8~54.7%였으며, 1.5M-glycerol 使用時 $0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 에서 62.9~67.6%, $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 에서 61.4~68.3%, $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 에서 25.5~30.2%였다.

受精卵의 融解速度에 따른 생존률의 差異는 認定되지 않았다.

V. 引用文獻

1. Elsdon, R.P. and G.E. Seidel, Jr. 1982. Embryo transfer procedures for cattle. *Theriogenology*, 14:251.
2. Fisher, P.S. and J.W. Macpherson. 1977. Survival of mouse embryos after freezing in medium containing dimethylsulfoxide and yolk extract. *J. Dairy Sci.*, 60:1301-1303.
3. Gate, A.H. 1971. Maximizing yield and Developmental uniformity of eggs. *Methods in Mammalian Embryology*. W.H. Freeman and company. 64-75.
4. Jin, D.I., K.S. Im, B.K. Ohh and Y.B. Lee. 1986. Effect of cryoprotectants, ice induction, cooling rate and storage length on survival of mouse embryos. *Korean J. Anim. Sci.*, 28(7):474-479.
5. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J. Reprod. Fert.*, 59:51-56.
6. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1981. Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 63: 175-180.
7. Leibo, S.P. 1976. Nucleation temperature of intracellular ice formation in mouse ova. *Cryobiology*, 13:6 Abstr.
8. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1981. Survival of mouse embryos after freezing

- and thawing in the presence of erythriol. *J. Exptl. Zool.*, 216:337-340.
9. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1983. Survival of mouse embryos frozen-thawed slowly or rapidly in the presence of various cryoprotectants. *J. Exptl. Zool.*, 226:123-127.
 10. Parkening, T.A., Y. Tsunoda and M.C. Chang. 1976. Effects of various low temperatures, cryoprotective agents and development of frozen-thawed mouse eggs. *J. Exptl. Zool.*, 197:369-374.
 11. Whittingham, D.G., S.P. Leibo and P. Mazur. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . *Science*, 178: 411-414.
 12. Whittingham, D.G. 1974. The viability of frozen-thawed mouse blastocysts. *J. Reprod. Fert.*, 37:159-162.
 13. 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.*, 56:11-21.
 14. Wilmut, I. 1972. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development of survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sci.*, 11:1071-1079.
 15. Wood, M.J. and J. Farrant. 1980. Preservation of mouse embryos by two-step freezing. *Cryobiology*, 17:178-180.
 16. 吳成宗, 任京淳, 李用斌. 1983. 생쥐와 흰쥐 胚의 微細的 分離에 關한 研究. *韓畜誌* 25(4): 362-368.
 17. 盧煥喆, 白雲和, 李光旭, 高大煥, 鄭吉生. 1986. 抗凍害劑의 種類가 凍結생쥐 胚의 生存性에 미치는 影響. *韓國家畜繁殖學會誌* 10(2): 175 - 181.