韓國家畜繁殖學會誌 11(2) : 122~126 (1987)
Korean J. Anim. Reprod.

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

曺南基

朝鮮大學校 自然科學大學

Effects of Glycerol Equilibration and Embryo Quality before Freezing and the Embryo Quality after Thawing in Mouse

Cho, Nam Ki

Department of Biology, College of Natural Science, Chosun University

Summary

This study was carried out to investigate the effects of the glycerol equilibration methods and embryo grades before freezing on the survival rate after thawing in mouse embryos.

The results obtained from this study were as follows:

1. The number of embryos of grade I (Excellent), II (Good) and III (Fair) before freezing in this study was 97 (27.4%), 160 (45.2%) and 97 (27.4%), respectively.
2. The average survival rate of frozen-thawed embryos in 3 and 5 steps glycerol equilibration was 66.7% and 64.1%, and the rate of transfererable embryos after culture was 68.9% and 69.0%, respectively.
3. Out of embryo grade I and II before freezing, the transferable rate after thawing was 75.2% and 48.1%, respectively, and grade I embryos before freezing was higher transferable rate than that of grade II.

Ⅰ. 緖 論

家畜의 優良形質을 一般家畜에 擴大 增殖시켜 經濟形質의 遺傳因子를 普及하는데 가장 效果的인 方法은 受精卵 移植技術인 것이다. 그러나 受精卵 移植은 供卵畜과 受卵畜의 發情同期化 技術이 先行되어야 하고 特히 우리나라 實情에서는 充分한 受卵畜 確保가 어려운 條件이므로 受精卵을 凍結保存하여 수시로 受精卵 移植을 하는 것이 절대 必要한 實情이다.

受精卵의 凍結은 Whittingham 等(1972)이 생쥐에서 成功한 이래 많은 硏究者들에 의하여 괄목할 만한 成績을 發表하였으며 最近에는 소의 凍結受精卵을 産業的으로 利用되고 있다. 그러나 아직도 凍結保存에 있어서 가장 重要한 凍結速度에 대해서는 Whittingham 等(1979) 및 Bank와 Maurer(1974)이 생쥐에서 0.2~0.8℃/分의 완만 凍結法이 좋았다고 하였으나 Maurer 等(1977)은 −2.5℃~−0.5℃/分씩 溫度를 하강하였고 Whittingham 等(1977)은 −6℃/分씩 凍結하여도 融解後 受精卵 生存에는 問題가 없으나 −7℃/分이상 生存可能性이 희박하다고 하여 硏究者와 供試家畜에 따라 다른 凍結速度를 報告하였다. 그러나 一般的으로 凍結速度는 −1℃/分 이상을 초과하지 않으면 높은 生存性을 報告하고 있다(Bilton과 Moore, 1976; Moore와 Bilton, 1977; Whittingham 等, 1977; Leibo, 1977).

한편 受精卵 凍結에 있어서 抗凍害劑인 glycerol과 DMSO(Dimethyl Sulfoxide)의 使用에 대해서는 最終 濃度가 1.0M (Whittingham 等, 1972; Leibo 等, 1974), 1.5M (Wilmut, 1972; Whittingham과 Adams, 1976) 그리고 2.0M (Maurer와 Haseman, 1976)까지 使用限界를 報告하고 있으며 glycerol과 DMSO는 受精卵의 凍結에 큰 差異가 없었다고 報告하였다 (Sherman, 1963, Wilmut, 1972). 그리고 凍結前 受

精卵의 狀態가 凍結融解後 生存性에 重要한 영향을 미친다고 하였다(Wright, 1985).

따라서 아직 硏究者들의 報告에 따라 다소 다른 結果를 얻고있는 glycerol濃度 및 平衡段階別 凍結融解後 受精卵의 生存性 및 凍結前 受精卵의 質에 따른 凍結成績을 調査하고자 本 試驗을 實施하였다.

Ⅱ. 材料 및 方法

1. 供試動物 : 7~15週齡의 ICR系統의 생쥐 50頭를 供試하였고 飼養管理는 自由採食 및 給水를 하였다.

2. 多排卵處理 및 採卵 : 受精卵을 多數 얻기 위하여 5IU의 PMSG(Folligon, Intervet, Holland)와 HCG(大成微生物, 韓國)를 各各 48時間 間隔으로 복강내 注射하고 HCG處理後 암수 1 : 1의 比率로 合舍시켰고 48~72時間에 屠殺하여 卵管과 子宮을 절취 實體顯微鏡下에서 受精卵만을 回收하여 凍結에 供試하였다. 採卵된 2, 8 및 桑實胚의 受精卵은 形態學的으로 正常인 것만을 選拔하였고 이때 使用된 採卵液은 modified Dulbecco's phosphate buffer(Gibco, 美國)였고, pH는 7.2~7.4, 滲透壓은 270~290mOSm/kg H_2O 였으며 使用前에 0.2μm 의 millipore filter(Gelman Sci U.S.A)로 여과하였다.

Table 1. Composition of flushing medium

Components	concentration
$CaCl_2$	0.1g
$MgCl_2$, $6H_2O$	0.1
NaCl	8.0
KCl	0.2
Na_2HPO_4	1.15
KH_2PO_4	0.2
Sodium pyruvate	0.036
Glucose	1.0
Bovine serum albumin	10.0
Streptomycin sulfate	50μg/ml
Penicillin G	100IU/ml
Distilled water	1,000ml

(Gibco; 美國)

3. 抗凍害劑 添加 : 採卵되어 選拔된 受精卵은 凍結液(Freezing Media, Gibco. 美國)에 20%의 fetal calf serum이 添加된 液에 3~5回 세척한 후 glycerol最終 濃度가 1.4M인 3段階平衡(0.35, 0.7 및 1.4M)과 1.5M인 5段階平衡(0.3, 0.5, 1.0, 1.2, 1.5M) 方法으로 各 段階別 5~10分間 정치하였고 最終 平衡段階가 끝난 후 0.25ml의 straw에 受精卵을 封入하였다.

4. 受精卵의 凍結 : glycerol平衡이 끝난 受精卵은 straw에 5~10個씩 封入하여 즉시 自動受精卵凍結器(planer, 美國)에서 凍結하였다. 凍結速度는 室溫에서 -7℃까지는 分當 -1℃, -7℃에서 植氷(seeding), 植氷後 -35℃까지 -0.3℃/分 溫度를 하강하고 -35℃에서 -196℃의 액체질소에 浸漬保存하였다.

5. 凍結受精卵의 融解 : 凍結된 受精卵을 含有한 straw를 室溫으로 꺼낸후 1~2초간 空氣中에 노출후 20℃의 water bath에서 완만융해하였으며 1.5M의 sucrose 融解液에 straw속의 受精卵을 넣고 實體顯微鏡下에서 形態學的 異狀有無를 판단하고 凍結液에 正常形態의 受精卵을 옮겨 놓았다.

6. 凍結融解 受精卵의 培養 : 20%의 FCS를 添加한 PBS에 凍結融解 受精卵을 옮겨 5%의 CO_2 培養器에서 24~48時間 培養後 正常 發達되는 것은 凍結成功卵으로 판정하였다.

Ⅲ. 結果 및 考察

1. 凍結前 受精卵의 狀態

PMSG와 HCG 各各 5IU를 注射하여 多排卵을 誘起한 후 48~72時間에 卵管 및 子宮角에서 回收된 受精卵中 未受精卵과 形態學的으로 기형인 것을 除外한 受精卵의 狀態는 Table 2와 같다.

Table 2에서 보는 바와같이 總 354個의 受精卵中 2, 8 및 桑實胚의 受精卵은 各各 123, 96 및 135個였으며 受精卵의 形態學的으로 透明帶와 割球가 充實한 1等級의 受精卵은 27.4%, 1等級보다 다소 그 充實度가 떨어진 2等級은 45.2%, 그리고 割球의 일부가 부서지고 退行卵은 아니나 약간 不良形態인 3等級은 27.4%였다. 그러나 細胞期間에 受精卵의 等級別 差異는 크지 않았으며 주로 2等級의 受精卵이 많았다.

2. 凍結融解後 受精卵의 培養

Glycerol 平衡段階에 따른 凍結融解한 受精卵의

Table 2. Morphological grade of pre-freezing mouse embryos

Cell stage	No. of embroys recovered	Embryo grade*		
		Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ
2-cell	123	30(24.4)	56(45.5)	37(30.1)
8-cell	96	25(26.0)	41(42.7)	30(31.3)
Morula	135	42(31.1)	63(46.7)	30(22.2)
Total	354	97(27.4)	160(45.2)	97(27.4)

* Ⅰ (Excellent) : Embryos perfectly symmetrical, showing even granulation and with a well defined, distinct outline;no blastomere extrusion.
Ⅱ (Good) : Embryos showing even granulation with a well defined distinct outline, some blastomere extrusion and some slight blastomere degeneration, occasionally slight asymmetric in shape.
Ⅲ (Fair) : Embryos integral but with a hazy outline in parts;some blastomere extrusion and degeneration;occasionally asymmetric in shape or with debris attached to zona.

Table 3. The results of in vitro development of frozen-thawed embryos according to glycerol equilibration methods

Treatment	Cell stage	No. of embryos thawed	No. of embryos cultured(A)	No. of transferable embryos(B)
3 Step	2-cell	63	39(61.9)	25(64.1)
	8-cell	60	41(68.3)	28(68.3)
	Morula	75	52(69.3)	38(73.1)
	Total	198	132(66.7)	91(68.9)
5 Step	2-cell	60	34(56.7)	23(67.7)
	8-cell	36	25(69.4)	17(68.0)
	Morula	60	41(68.3)	29(70.7)
	Total	156	100(64.1)	69(69.0)

*( ) : B/A%

培養成績은 Table 3과 같다.

Table 3에서 보는바와 같이 glycerol 最終濃度가 1.4M이 되게 3段階로 平衡한 凍結融解한 受精卵 중 24~48時間 培養後 移植可能한 受精卵의 比率은 2, 8 및 桑實胚에서 各各 64.1%, 68.3% 및 73.1%로 細胞期가 進行될수록 높았으며 平均은 68.9%였다. 그리고 5段階로 平衡하여 glycerol 最終 濃度가 1.5M인 處理에서 總 156個의 受精卵을 凍結融解하여 培養한 結果 64.1%가 生存하였고 그중 移植에 供試可能한 比率은 69%로 3段階나 5段階 glycerol 平衡間에는 差異가 없었고 實用上 및 實驗時보다 간편한 前者의 方法이 좋다고 思料된다.

本 試驗의 結果는 Willadsen(1977)과 Willadsen等(1978)이 受精卵 凍結時 滲透壓의 變化에 의한 衝擊을 줄이고 受精卵內의 自由水를 充實을 줄이고 脫水시키기 위해 6段階 glycerol 平衡이 좋다고한 報告와는 다소 相異한 成績이었으나 Leibo 等 (1974)이 自由水의 脫水는 抗凍害劑 添加後 5分以內에 이루어지고 細胞內外의 平衡狀態가 된다고 하였다. Rall과 Polge(1984)는 抗凍害劑 1段階 平衡으로 좋은 成績을 얻었고 Bilton과 Moore(1977)도 소에서 같은 結果를 報告하였으며 本 試驗의 結果와 비슷한 경향이었다.

한편 本 試驗에서 細胞期가 進行될수록 凍結融解 卵中 移植可能卵이 많았다는 結果는 Whittingham (1977)이 2細胞期보다 8細胞期가 그리고 Kanagawa(1982)가 初期胚보다 桑實胚가 凍結融解後 生存性이 높다는 報告와 一致되는 結果였다.

따라서 受精卵의 凍結時 抗凍害劑의 平衡을 3段階 이하로 하고 初期胚보다 桑實胚를 使用하는 것이 實用化측면에서 좋다고 할 수 있다(Tsunoda 等 1982;Rall과 Polge, 1984;Niemann, 1985).

Table 4. Effect of embryos quality pre-freezing on subsequent morphology post-thawing

Embryo quality pre-freezing	No. of embryos frozen	Embryo quality post-thawing			
		Excellent	Good	Fair	Poor
Excellent	97	40(41.2)	33(34.0)	15(15.5)	9(9.3)
Good	160	—	77(48.1)	48(30.0)	35(21.9)
Fair	97	—	—	46(47.4)	51(52.6)
Total	354	40(11.3)	110(31.1)	109(30.8)	95(26.8)

( ) : %

3. 凍結前 受精卵의 狀態에 따른 融解後 狀態

凍結前 受精卵의 狀態가 凍結融解後 受精卵의 狀態에 미치는 영향은 Table 4에 나타낸 바와 같다.

Table 4에서 보는 바와같이 凍結前에 受精卵의 等級에 따라 凍結融解後 그 狀態가 다양하게 變하였다. 즉 凍結前 最上의 形態學的인 受精卵(1等級)을 凍結融解後 그 等級을 調査한 바 Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ 및 Ⅳ等級이 受精卵이 各各 41.2%, 34.0%, 15.5% 및 9.3%였으며 Ⅱ等級의 受精卵은 凍結融解後 Ⅱ, Ⅲ 및 Ⅳ等級이 各各 48.1%, 30.0% 및 21.9% 였고 Ⅲ等級은 融解後 Ⅲ 및 Ⅳ等級이 47.4%와 52.6%로 凍結前의 受精卵의 等級이 凍結融解後 原狀態로 회복되는 比率은 50%미만이었고 特히 凍結融解卵이 移植은 Ⅱ等級까지 可能하므로 가급적 좋은 形態와 充實한 割球를 가진 受精卵만을 凍結하는 것이 受精卵의 使用効率을 높이고 移植成績도 좋다고 하였다(Kennedy 等, 1983; Wright, 1985).

Niemann 等(1985)과 Wright(1985) 等이 凍結前 受精卵의 狀態와 凍結融解後 狀態와는 밀접한 相關이 있고 融解後 Ⅰ, Ⅱ 및 Ⅲ等의 受精卵을 移植하여 各各 56.4%~43.2%, 33.3%~25.6% 그리고 45.0%~23.4%의 受胎成績을 報告하여 凍結前 受精卵의 狀態가 좋을수록 凍結融解後 그 原狀 회복이 좋았으면 높은 受胎率을 얻어 凍結受精卵을 利用한 受精卵 移植時 凍結前 受精卵의 狀態가 가장 重要하다고 報告하였다.

Ⅳ. 摘 要

本 試驗은 家畜受精卵의 凍結保存을 위한 基礎資料를 얻고자 생쥐 受精卵을 利用 抗凍害劑인 glycerol 平衡方法 및 凍結前 受精卵의 狀態에 따른 凍結融解後 生存性을 調査 究明하기 위하여 實施하였고 얻어진 결과는 다음과 같다.

1. 本 試驗에 供試된 凍結前 受精卵의 狀態는 Ⅰ等級이 27.4%, Ⅱ等級이 45.2% 그리고 Ⅲ等級이 27.4%였다.

2. Glycerol 3段階 및 5段階平衡時 各各 198個와 156個의 受精卵을 供試하여 凍結融解한 結果 平均 生存培養率은 各各 66.7%와 64.1%였고 그중 移植可能한 受精卵의 比率은 各各 68.9%와 69.0%로 處理間의 差異는 없었다.

3. 凍結前 受精卵의 狀態가 Ⅰ 및 Ⅱ等級이었을 때 凍結融解後 移植可能한 Ⅱ等級까지의 比率은 各各 75.2%와 48.1%였고 凍結前 受精卵의 狀態가 좋을수록 凍結融解後 生存率도 상당히 좋았다.

Ⅴ. 引用文獻

1. Bank, H. and R.R. Maurer, 1974. Survival of frozen rabbit embryos, Exp. Call Res. 89:188-196.
2. Bilton, R.J. and N.W. Moore, 1976. Effects of ice seeding and of freezing and thawing rate on the development of sheep embryos stored at minus 196 celsius, Theriogenology, 6:635 Abstr.
3. Bilton, R.J. and N.W. Moore. 1977. Storage of cattle embryos J. Reprod. Fert. 50: 363-364.
4. Kanagawa, H. 1982. Short-term preservation of bovine embryos. In: in vitro fertilization and embryo transfer. Ed. Hafez. E. S.E. and K. Semm. pp. 343-347, MTP. press.
5. 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.

6. Leibo, S.P., P. Mazur and S.C. Jackowiski. 1974. Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. Exp. Cell. 89:79-99.
7. Leibo, S.P. 1977. Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos. In: the freezing of mammalian embryos. Elsevier. Excerpta Medica. Amsterdam. pp. 69-96.
8. Maurer, R.R., H. Bank and R.E. Staples. 1977. Pre-and postnatal development of mouse embryos after storage for different period at cryogenic temperatures. Biol. Reprod. 16:139-146.
9. Maurer, R.R. and J.K. Haseman, 1976. Freezing morula stage rabbit embryos. Biol. Reprod. 14:256-263.
10. Moore, N.W. and R.J. Bilton, 1977. Frozen storage of embryos of farm animals: progress and implications. In: the freezing of mammalian embryos. Elsevier. Excepta Medica. Amsterdam. pp. 203-219.
11. Niemann, H. 1985. Freezing on bovine embryos: Effect of a one step addition of 1.1M glycerol. Theriogenology. 23: 369-379.
12. Rall, W.F. and C. Polge, 1984. Effect of warming rate on mouse embryos frozen and thawed in glycerol. J. Reprod. Fert. 70:285-292.
13. Sherman, J.K. 1963. Questionable protection by intracellular glycerol during freezing and thawing. J. Cell Comp. Physiol. 66:67-83.
14. Tsunoda, Y., T. Soma and T. Sugie. 1982. Frozen storage of rabbit and hamster embryos. In: Frozen storage of Laboratory animals. Ed. Asilmaker. G.H. pp.129-138.
15. Whittingham, D.G. 1971. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. Nature (London), 233:125-126.
16. Whittingham, D.G. and C.E. Adams. 1976. Ultrastructural Studies of frozen-thawed mouse embryos. J. Reprod. Fert. 48:137-140.
17. Whittingham, D.G., M.J. Wood, J. Farrant, H. Lee and J.D. Halsey, 1979. Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from 196°C. J. Reprod. Fert. 56:11-21.
18. Whittingham, D.G., M.F. Lyon and P.H. Glenister, 1977. Long-term storage of mouse embryos at minus 196°C: The effect of back-ground radiation. Genet. Res. 28:171-181.
19. Whittingham, D.G., S.P. Leibo and P. Mazur. 1972. Sruvival of mouse embryos frozen to −196°C and −296°C, Science. 178: 411-414.
20. Willadsen, S.M. 1977. Factors affecting the survival of sheep embryos during deep-freezing and thawing: In: the freezing of mammalian embryos. Elsevier. Excerpta. Medica. Amsterdam. pp. 175-201.
21. Willadsen, S.M., C. Polge, L.E.A. Rowson, 1978. In vitro storage of cattle embryos. In control of reproduction in the cow. Ed. J. Sreenan.
22. Wilmut, I. 1972. The low temperature preservation of mammalian embryos, J. Reprod. Fert. 31:513-514.
23. Wright, J.M. 1985. Commercial freezing of bovine embryos in straw. Theriogenology, 23:17-29.