韓國家畜繁殖學會誌 13(3) : 141~148(1989)
Korean J. Anim. Reprod.

Mouse 受精卵의 急速凍結에 關한 硏究

第 II 報 Mouse 受精卵 急速凍結에 있어서 受精卵의 發育段階와 植氷(seeding)이 生存率에 미치는 影響

姜萬鍾・金瑩勳・文星浩・金重桂

濟州大學校 農科大學

Studies on the Rapid Freezing of Mouse Embryo

II. Effects of the Development Stage and Seeding on the Mouse Embryo Survival of Rapid Freezing

Kang, M.J., Y.H.Kim, S.H.Moon and J.K.Kim

College of Agriculture, Che Ju National University

SUMMARY

The effects of seeding method and optimum time for freezing embryos according to the developmental stages on embryo survival rates after rapid freezing were determined using the FDA-test. The summarized results are as follows :

1. In the rapid freezing of embryos, the sucrose added medium together with Co-seeding or non-seeding showed the FDA scores of 4.67 and 4.20, respectively, but, raffinose additions obtained FDA scores of 4.27 and 3.97.
2. The developmental stage of embryos at freezing was most critical on the survival of embryos after thawing. Higher FDA scores were obtained in the order of blastocyst stage(4.94), morula stage (3.82) and ealy stage(2.65) in sucrose added medium. The same trend was observed in the raffinose addded medium with an order or 4.91, 4.47 and 2.32.
3. Microscopic study of embryo before freezing and post-thawing indicated that the embryo showed shrinkage within 5 minutes after the embryo was transfer to the freezing medium. When thawed embryo was transfered to the dilution medium, swelling of the embryo was observed and there after it reshrank indicating the removal of cryoprotectant from the embryo. The size of the embryo recovered to the original state when it was moved into a PBS-solution.

Ⅰ. 緖　　論

受精卵의 凍結은 緩慢凍結에서 急速凍結로 간편화 되어 왔으며, 最近에는 急速凍結에 의하여 대부분 受精卵 凍結實驗이 수행되고 있다(Whittingham et at, 1972 ; Mazur, 1977 ; Bouyssou 과 Chupin, 1982 ; Renard et al, 1984 ; Hsu et al, 1986 ; Széll 과 Shelton, 1986 ab, 1987).

植氷은 受精卵 凍結에서 發生하는 受精卵의 過冷却을 防止하기 위하여 緩慢凍結에서 實施되어 왔으나(Whittingham et al, 1972 ; Leibo 와 Mazur, 1978 ; Miyamoto 와 Ishibashi, 1978), Bui-Xuan-Nguyen et al(1984)은 凍結液에 sucrose을 添加하면 受精卵이 凍結前 脫水되기 때문에 植氷하지 않아도 受精卵은 生存할 수 있다고 하였다. 또한 急速凍結에서도 sucrose 와 같은 外部細胞膜을 보호하는 耐凍劑를 添加하여 植氷을 實施하지 않고 急速凍結이 수행되고 있다.

受精卵 發育段階에 따른 凍結時 生存率은 다소 다르게 發表되고 있으며 주로 morula stage 가 生存率이 높은 것으로 報告되고 있다(Renard et al, 1984 ; Williams 와 Johnson, 1986 ; 金 등, 1988 ; Miyamoto 와 Ishibashi, 1986).

또한, 凍結液에 除去液에서의 受精卵 分割球 變化에 있어서 Schneider 와 Mazur(1986), Hiemann (1985)은 glycerol 을 凍結液에 添加하였을 때 受精卵 分割球가 收縮되었다가 팽창되면서 分割球는 凍結液 添加前과 같은 크기로 된다고 하였다. 그러나 sucrose를 glycerol 과 같이 凍結에 添加하면 受精卵 內外의 滲透壓 狀態가 等張일 때 收縮과 膨脹이 멈춘다고 Szeffll 과 Shelton(1986 ab, 1987)은 報告하였다.

本 實驗은 mouse 受精卵의 急速凍結에 있어서 植氷의 影響, 受精卵 發育段階에 따른 生存率과 sucrose 의 代用으로 raffinose 의 利用 可能性을 檢討하여 效率的인 受精卵의 急速凍結 方法을 선택하고자 實施하였다.

Ⅱ. 材料 및 方法

供試動物은 雌性 ICR mouse(5 週齡, 體重 20～30 g)을 使用하였고, 配合飼料와 물을 自由採食시켰으며, 日照時間을 14 h/day 로 調節하였다.

過排卵誘起를 위하여 PMSG(5～7 IU)를 腹腔內에 注射하고, 48 時間後 同量의 HCG 를 같은 方法으로 注射한 다음 同一系의 雄性 mouse 를 1 : 1 로 合舍하여 自然交尾를 誘導하였다.

受精卵의 採卵은 HCG 注射後 30～90 時間에 mouse 를 開腹手術하여 卵管과 子宮을 切取하였다. 切取한 子宮과 卵管을 m-PBS 로 灌流하여 HCG 注射後 30～60 時間에 early stage 受精卵(2 cell～8 cell), 70～75 時間에 morula stage 受精卵과 85～90 時間에 blastocyst stage 의 受精卵을 回收하였으며, 回收된 受精卵은 形態的으로 優秀한 受精卵을 選別凍結에 利用하였다.

凍結液은 3.0 M glycerol+0.3 M sucrose 또는 raffinose+20% serum+m－PBS 의 組成으로 製造하여 使用하였고, 凍結液의 添加는 Ⅰ報와 同一한 方法으로 行하였다.

受精卵의 凍結은 liquid nitrogen 을 利用하였으며, 急速凍結方法으로 liquid nitrogen container 內에서 實施하였다. 凍結時 straw 의 位置는 cotton plug 가 밑으로 향한 垂直狀態에서 行하였으며, 凍結方法은 straw 를 常温에서 1 分 이내에 liquid nitrogen 表面 2～3 mm 까지 下降시킨 다음(－36±7.5℃) 5 分間 停滯後(－188.8±3.3℃) liquid nitrogen 에 浸漬 1～2 週間 保管하였다.

植氷은 1 mm 銅線을 straw 밑에서 부터 3 mm 의 間隔으로 윗부분까지 감아 liquid nitrogen gas 로 凍結時에 自然植氷되도록 하였다.

受精卵의 融解는 38℃ 温水에서 約 10 秒 동안 實施하였으며, 耐凍劑의 除去는 0.3 M sucrose 또는 raffinose 가 添加된 除去液에서 10 分間 行하였다.

受精卵의 生死判定은 3′,6′-diacetyl fluorscence (FDA)를 利用하여 Ⅰ報와 同一한 方法으로 判定하였다.

統計處理는 分散分析과 t-檢定에 의하였고, 分散分析 後 有意性이 認定된 境遇에는 最少有意差(L.S.D)에 의하여 各 處理間의 有意差을 檢定하였다.

Ⅲ. 結果 및 考察

Mouse 受精卵을 急速凍結했을때 凍結液과 植氷與否에 따른 FDA-score 는 Table 1 에 나타낸 바와 같다.

Table 1. Effects pf seedoing prpcedires om the embryo survival pf rapid freezimg with 3.0 M glycerol plus 0.3 M sucrose or raffinose

Freezing medium	Seeding procedure	No. of embryos frozen	No. of recovery embryos post-thaw	No. of survival embryos evaluated by FDA-test						FDA score
				P_5	P_4	P_3	P_2	P_1	N	
PGS	Co-S	33	26(78.8)	24 (92.3)	0 (0)	0 (0)	1 (3.9)	0 (0)	1 (3.9)	4.67
	N-S	25	25(100)	15 (60.0)	4 (16.0)	3 (12.0)	2 (8.0)	1 (4.0)	0 (0)	4.20
	Total or mean	58	51(87.9)	39 (76.5)	4 (7.8)	3 (5.9)	3 (5.9)	1 (2.0)	1 (2.0)	4.45
PGR	Co-S	24	22(91.7)	11 (50.5)	8 (36.4)	2 (9.1)	0 (0)	1 (4.6)	0 (0)	4.27
	N-S	31	30(96.8)	14 (46.7)	8 (26.7)	4 (13.3)	2 (2.7)	1 (3.3)	1 (3.3)	3.97
	Total or mean	55	52(94.5)	25 (48.1)	16 (30.8)	6 (11.5)	2 (3.9)	2 (3.9)	1 (1.9)	4.10

PGS ; 3.0 M glycerol + 0.3 M sucrose + 20% serum + m-PBS
PGR ; 3.0 M glycerol + 0.3 M raffinose + 20% serum + m-PBS
Co-S ; Copper wired seeding N-S ; Non seeding
percentage of embryos in parentheses
P_5 : Positive-5 P_4 ; Positivè-4 P_3 : Partial-3
P_2 : Partial-2 P_1 ; Parital-1 N ; Negative-0

急速凍結에 있어 FDA-score는 統計的 有意差는 없었으나 PGS와 PGR에서 Co-seeding이 다소 높은 傾向을 보이고 있었으며 N-seeding은 PGS, PGR에서 모두 떨어지고 있었다. P_5와 P_4의 生存受精卵 比率은 PGS와 PGR에서 모두 Co-seeding (92.3%, 86.9%)이 N-seeding(76.0%, 73.4%)보다 良好한 生存比率을 나타내고 있었던 것은 急速凍結에서도 植氷의 影響이 있는 것으로 생각되었다. PGS와 PGR의 FDA-score를 綜合的으로 比較하여 보면 PGS(4.45)가 PGR(4.10)에 비해 높았으나 統計的 有意差는 없었다.

Vitrification solution을 利用하여 mouse受精卵을 急速凍結한 Hsu et. al(1986)은 生存率을 53~93%로, 다른 vitrification solution solution을 使用한 Kono와 Tsunoda(1987)는 77%의 生存率을 報告하고 있으나 本 成績의 FDA-score를 生存率로 換算할 때 本 實驗에서 얻어진 結果는 이들 結果보다 높은 生存率을 얻고 있었다.

Glycerol과 sucrose를 凍結液에 添加하여 急速凍結을 研究한 (Szeffill과 Shelton, 1986 a, 1987 ; Whilliams와 Johnson, 1986)成績은 生存率 80~95%로 報告하고 있으며, 本 實驗의 結果는 70.4~93.4%로 sucrose와 raffinose에서 거의 同一하게 生存率을 높일 수 있음을 示唆하고 있다.

急速凍結에 있어 受精卵 發育段階가 FDA-score에 미치는 影響은 Table 2와 같다.

Glycerol과 sucrose를 凍結液에 添加하였을 때 受精卵의 FDA-score는 blastocyst stage(4.94), morula stage(3.82), early stage(2.65)의 順이었으며 blastocyst stage와 early stage間에는 有意差가 있었다($p<0.05$). P_5와 P_4의 生存受精卵 比率은 blastocyst stage, morula stage, early stage에서 各各 100%, 74.0%, 50.0%로 FDA-score와 같은 傾向을 보이고 있었다.

家兎受精卵 early stage의 凍結에서 Renard et al(1984)는 77~83% 生存率은 얻었으나, Critser et al(1988)은 mouse 受精卵 early stage에서 36.8~63.9%의 낮은 生存率을 報告하였다. 또한, 그는 受精卵 發育段階別 生存率의 差異가 있는 것은 水分의 浸透力과 이에 따르는 活性化 energy가 다

Table 2. Effects of various embryo stage on embryo survival of rapid freezing with 3.0 M glycerol plus 0.3 M sucrose

Embryo stage	No. of embryos frozen	No. of recovery embryos post-thaw	No. of survival embryos evaluated by FDA-test						FDA score
			P_5	P_4	P_3	P_2	P_1	N	
Early stage	30	26(86.7)	9 (34.6)	4 (15.4)	1 (3.9)	2 (7.7)	1 (3.9)	9 (34.6)	2.65[a]
Morula stage	31	27(87.1)	15 (55.5)	5 (18.5)	2 (7.4)	1 3.7	0 (0)	4 (14.8)	3.82[ab]
Blastocyst stage	31	31(100)	29 (93.6)	2 (6.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4.94[b]

Freezing medium ; 3.0 M glycerol + 0.3 M sucrose + 20% serum + m-PBS
Diiution medium ; 0.3 M sucrose + m-PBS
percentage of embryos in parentheses
P_5 ; Positive-5 P_4 ; Positive-4 P_3 ; Partial-3
P_2 ; Partial-2 P_1 ; Partial-1 N ; Negative-0
Different superscripts denote significant differences within columns($P<0.05$).

Table 3. Effects of various embryo stage on survival of rapid freezing with 3.0 M glycerol plus 0.3 M raffinose

Embryo tage	No. of embryos frozen	No. of recovery embryos post-thaw	No. of survival embryos evaluated by FDA-test						FDA score
			P_5	P_4	P_3	P_2	P_1	N	
Early stage	29	24(82.8)	8 (33.3)	1 (4.2)	1 (4.2)	3 (12.5)	5 (20.8)	7 (29.2)	2.32[a]
Morula stage	31	30(96.8)	22 (73.3)	6 (20.0)	0 (0)	330 (0)	0 (0)	2 (6.7)	4.47[b]
Blastocyst stage	33	32(97.0)	30 (93.8)	1 (3.1)	1 (3.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4.91[b]

Freezing medium ; 3.0 M glycerol + 0.3 M raffinose + 20% serum + m-PBS
Dilution medium ; 0.3 M raffinose + m-PBS
percentage of embryos in parentheses
P_5 ; Positive-5 P_4 ; Positive-4 P_3 ; Partial-3
P_2 ; Partial-2 P_1 ; Partial-1 N ; Negative-0
Different superscripts denote significant differences within columns($P<0.05$).

르기 때문이라고 指摘하여, 本 實驗에서 early stage의 低調한 FDA-score도 이와 같은 原因에 基因된 것으로 사료된다.

Mouse 受精卵의 blastocyst stage와 morula stage의 凍結比較試驗에서 Williams와 Johnson (1986), 金 등(1988)은 blastocyst stage보다 morula stage의 生存率이 優秀하다고 하였으며, Miyamoto와 Ishibashi(1986)는 morula stage와 blastocyst stage 사이에는 生存率에 큰 差異가 없다고 하였다. 그러나 浦野 등(1986)과 金 등(1988)은 mouse와 bovine 受精卵의 凍結에서는 blastocyst stage가 높은 生存率을 얻었다고 報告하여 本 實驗結果와 一致하고 있다.

急速凍結에 있어 raffinose를 凍結液과 除去液에 添加하여 受精卵 發育段階別 FDA-score를 比較한 結果는 Table 3과 같다.

受精卵의 FDA-score는 blastocyst stage와 morula stage에서 early stage에 비하여 높았으며,

blastocyst stage에서 優秀하였다. P_5와 P_4의 生存受精卵 比率은 blastocyst stage, morula stage, early stage의 順으로 各各 96.9%, 93.3%, 37.5%를 보여 early stage에서 낮은 比率을 보였다.

Raffinose 處理區를 sucrose 處理(Table 2)와 比較할 때 FDA-score는 類似한 成績을 나타내고 있으며, 各 處理 모두 blastocyst stage에서 가장 높은 score를 나타내고 있어 受精卵 發育段階別 凍結에 있어서는 early stage와 morula stage에 비하여 blastocyst stage에서 높은 生存率을 얻을 수 있었다.

이상의 結果를 土臺로 볼 때 raffinose를 sucrose 代用으로 利用하여도 生存率은 오히려 sucrose에 대하여 raffinose가 優秀하거나 類似하였음을 알 수 있었다.

顯微鏡下에서 凍結液(PBS+3.0 M glycerol+0.3 M sucrose 또는 raffinose+20% serum)內의 受精卵 分割球 變化를 觀察한 것은 Plate 1과 같다.

正常的인 受精卵(A)을 凍結液에 옮겨 5分(B), 10分(C), 15分(D)後의 變化를 나타낸 것으로 5分以內에 sucrose와 raffinose 添加區에서 分割球 收縮이 일어났다. 凍結液에 옮겨 5分後에는 分割球의 量的 變化가 거의 없어 sucrose와 raffinose가 添加된 高滲透壓의 凍結液에서는 5分 以內에 受精卵 內部의 自由水 대부분이 脫水되는 것으로 생각되었다.

이러한 現像은 glycerol를 凍結液에 添加하였을 때 受精卵 分割球가 收縮되어 自由水 脫水가 일어나며, 脫水 以後 glycerol이 分割球 內部로 浸透되면서 分割球는 凍結液 添加前과 같은 크기로 된다는 Schneider와 Mazur(1984), Niemann(1985)의 報告와는 相異하였다.

그러나 sucrose와 glycerol를 같이 凍結液에 添加하면 glycerol 單獨으로 添加하였을 때와 비슷한 收縮과 膨脹이 일어나며 受精卵 內外의 滲透壓狀態가 等張일 때는 收縮과 膨脹이 멈춘다고 Szefflll과 Shelton(1986 ab, 1987)은 指摘하였다.

本 觀察에서 5分 以後 分割球가 膨脹되지 않고 收縮된 狀態로 維持된 것은 受精卵 內外의 滲透壓이 等張이기 때문이라고 思料된다.

Glycerol 除去液內에서 受精卵 分割球의 變化는 Plate 2에 提示한 것과 같다.

凍結 融解後 glycerol를 除去하기 위하여 受精卵을 除去液으로 옮겼을때 10分後(F)의 分割球가 5分後(E)의 分割球보다 收縮된 狀態를 보여 glycerol이 除去된 것으로 생각된다. 除去液內에서 10分後(F)에 PBS內로 옮겼을때(G)는 水分이 分割球 內部로 浸透되어 凍結 과 같은 分割球 크기로 膨脹되는 것이 確認되었다.

除去液內에서 5分後(E)의 分割球形態가 凍結前 凍結液內에서 15分後(plate 1, D)의 形態보다 膨脹된 것은 凍結前 分割球의 高滲透壓 狀態에서 低滲透壓인 除去液으로 옮기므로서 水分이 分割球 內部로 浸透된 現象 때문이라고 생각된다.

本 觀察의 結果는 glycerol 除去液에 sucrose를 添加하면 受精卵 內部에 浸透되어 있는 glycerol를 除去하면서 分割球의 變化를 調節하고, glycerol이 除去된 受精卵을 生理的 溶液으로 옮기면, 最初의 分割球 形態로 되돌아 간다는 Szefflll과 Shelton(1986 ab, 1987)의 報告와 一致되는 傾向을 보였다.

이상의 觀察에서 sucrose와 raffinose 添加區의 分割球 變化가 거의 같은 것으로 보아 raffinose와 sucrose가 耐凍劑로서의 效果가 類似한 것으로 생각된다.

IV. 摘 要

本 試驗은 mouse 受精卵의 效率的인 急速凍結 方法을 提示하기 위하여 植氷與否, 受精卵의 發育段階別 生存率과 sucrose 代用으로서 raffinose의 利用可能性을 檢討하고자 實施하였다. 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. Sucrose 또는 raffinose가 添加된 凍結液을 利用하여 急速凍結할 때는 sucrose 處理에서 Co-seeding : 4.67, N-seeding : 4.20 이었고, raffinose 處理에서는 Co-seeding : 4.27, N-seeding : 3.97로서 處理間에는 有意差가 없었다.

2. 受精卵 發育段階別 生存率에 있어서는 sucrose 處理에서 early stage, morula stage, blastocyst stage가 各各 2.65, 3.82, 4.94의 score를 보였고, raffinose 處理에서는 2.32, 4.47, 4.91으로서 blastocyst stage가 優秀하였다($P<0.05$).

3. 受精卵을 凍結液에 옮긴 後 5分 以內에 脫水收縮되었으며, 15分 까지는 큰 變化가 없었다. 凍結融解後 受精卵을 耐凍劑 除去液으로 옮겼을 때는 分

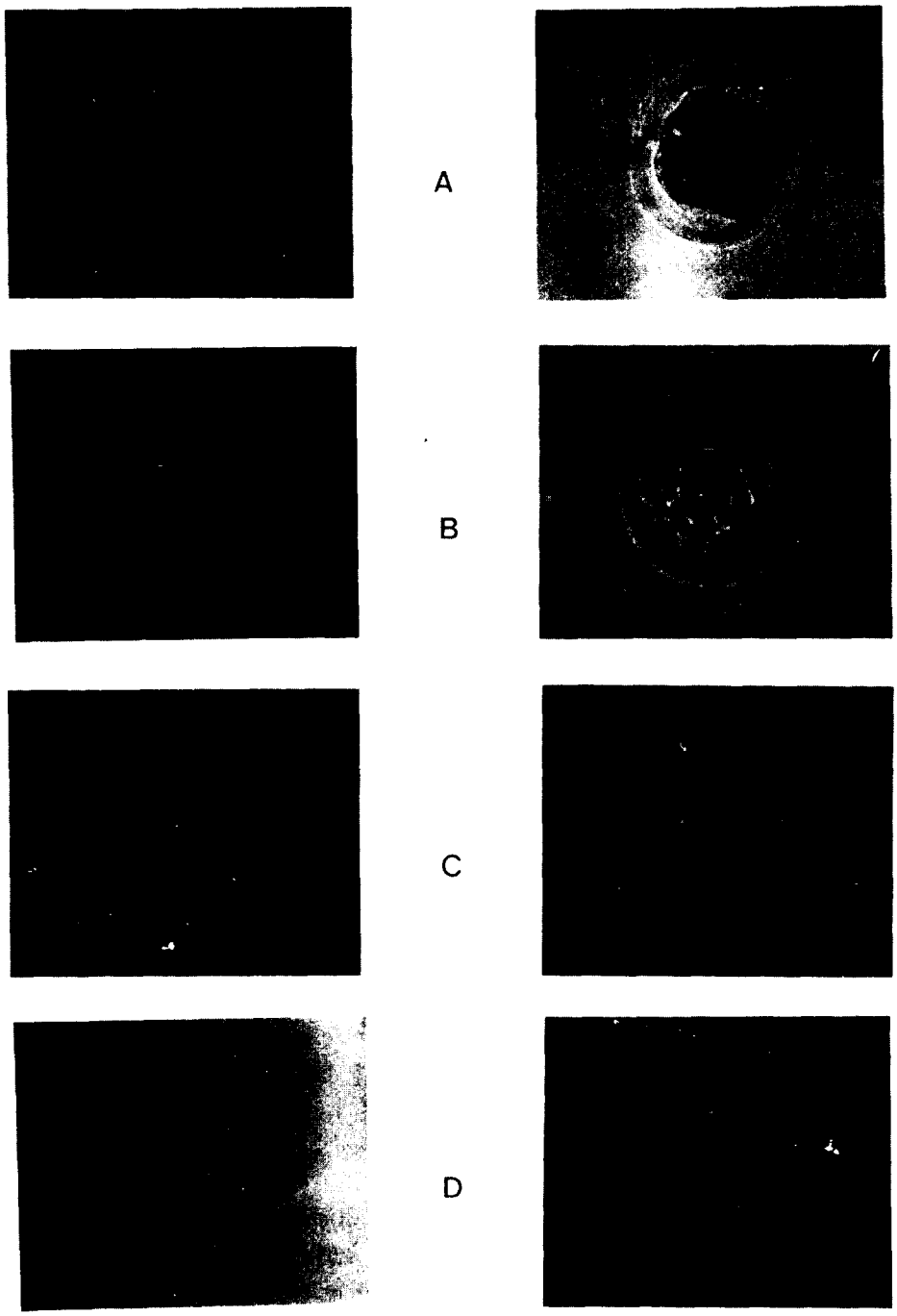

Plate 1. Volume changes of a day-3 fresh mouse embryos in freezing medium with 3.0 M glycerol plus 0.3 M sucrose ; prior to freezing medium addition(A), after 5 min(B), 10 min(C) and 15 min(D) in freezing medium(×150).

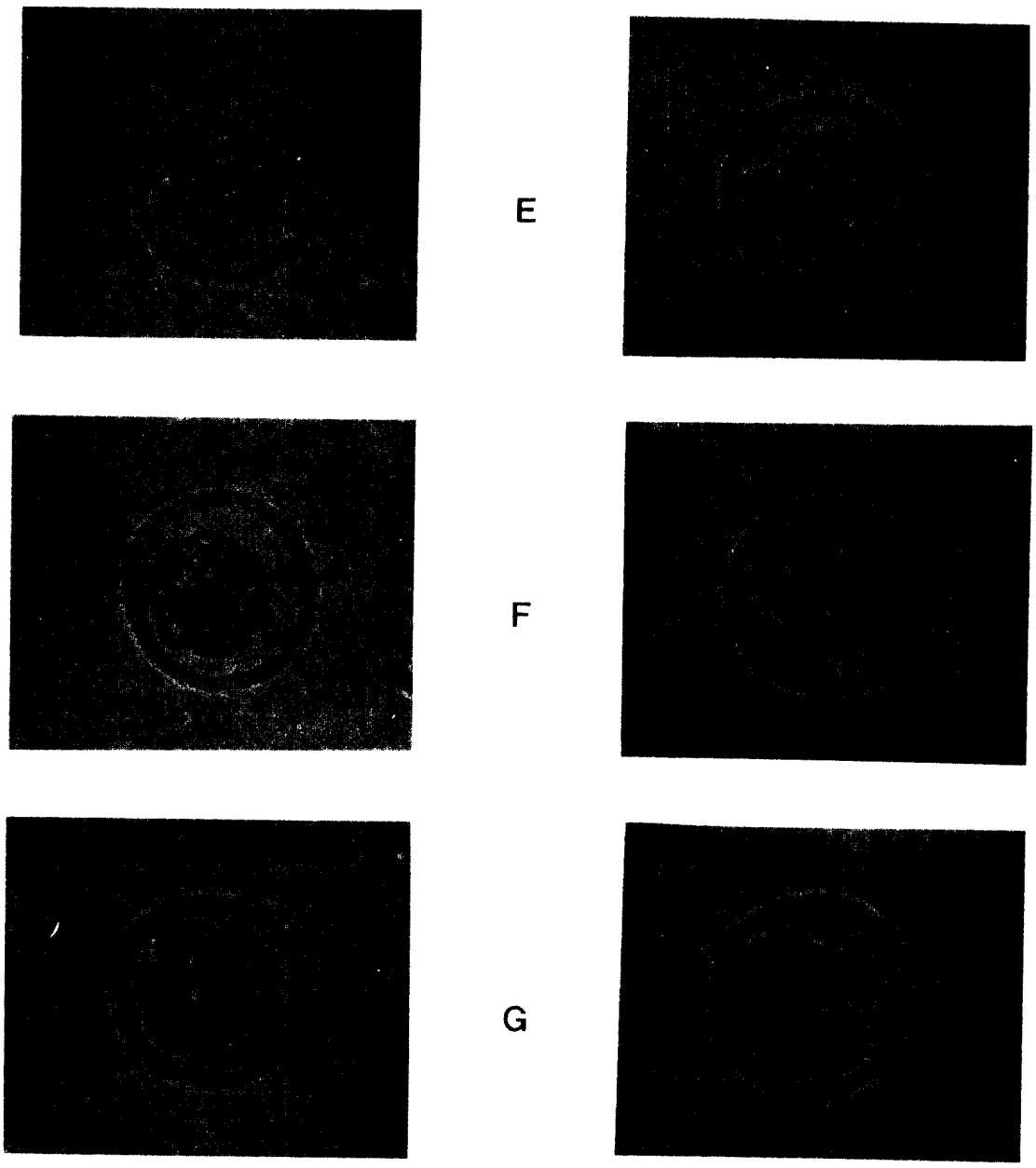

Plate 2. Volume changes of post-thaw day-3 mouse embryos in dilution medium with 0.3 M sucrose or raffinose and PBS-solution ; after 5 min(E) and 10 min(F) in dilution medium and after 5 min(G) in PBS-solution(×150).

割球가 膨脹하였다가 收縮되면서 耐凍劑가 除去되는 것을 確認하였다. 耐凍劑 除去後 受精卵을 PBS 液으로 옮겼을 때는 凍結前과 같은 크기로 分割球가 回復되었다.

V. 引用文獻

1. Bouyssou, B. and D.Chupin. 1982. Two-step freezing of cattle blastocysts with dimethyl sulfoxide(DMSO) or glycerol. Theriogenology, 17 : 159-166.
2. 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.
3. Critser, J.K., B.W.Arneson, D.V.Aaker, A. R. Huse-Benda and G.D.Ball.1988. Factors affecting the cryosurvival of mouse two-cell embryos. J.Reprod. Fert., 82 : 27-33.
4. Hsu, T.T., H.Yamakawa, J.Yamanoi and S. Ogawa. 1986. Survival and transfer test of mouse early embryos frozen by vitrification method. Japan. J.Anim. Reprod., 32 : 29-32.
5. Kono, T.and Y.Tsunoda. 1987. Frozen storage of mouse embryos by vitrification. Japan. J.Anim. Reprod., 33 : 77-81.
6. Leibo, S.P.and P.Mazur. 1978. Preservation of mammalian embryos by freezing. Academic Press, New York : 179-197.
7. Mazur, P.1977. Slow freezing injury in mammalian cells. in : The freezing of mammalian embryos. Ciba Foun Symp. No.52 : 19-45, Elsevier North-Holland, Amsterdam.
8. Miyamoto, H.and T.Ishibashi. 1987. The protective action of glycerol against freezing damage of mouse and rat embryos. J.Repord. Fert., 54 : 427-432.
9. Miyamoto, M.and T.Ishibashi. 1986. Liquid nitrogen vapour freezing of mouse embryos. J. Reprod. Fert., 78 : 471-478.
10. Renard, J.P., B.X.Nguyent and V.Garnier. 1984. Two-step freezing of two-cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. J.Reprod.Fert., 71 : 573-580.
11. Szefflll, A. and J.N. Shelton. 1986 a. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. J. Reprod. Fert., 76 : 401-408.
12. Szefflll, A, and J.N.Shelton. 1986 b. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. J.Reprod. Fert., 78 : 699-703.
13. Szefflll, A.and J.N. Shelton. 1987. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solutions on Day-3 mouse embryos. J.Reprod. Fert., 80 : 309-316.
14. Williams, T.J. and S.E. Johnson. 1986. A method for one-step freezing of mouse embryos. Theriogenology, 26 : 125-133.
15. Whittingham, D.G., S.P.Leibo and P.Mazur. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -296°C. Science, 178 : 411-414.
16. 浦野造司, 高橋芳幸, 金川弘司. 1986. 凍結融解後のマウス胚 生存性に及ぼす各種 凍結保護劑의 效果. 日本家畜繁殖誌, 32 : 130-132.
17. 金重桂, 李癸勳, 姜萬鍾, 金瑩勳, 吳雲龍, 康珉秀, 1988. 肉牛 受精卵 簡易凍結 및 融解方法에 關한 硏究. 第5報 : Glycerol 耐凍劑에 sucrose 添加與否가 FDA-test에 依한 mouse 受精卵의 生存率에 미치는 影響. 韓國家畜繁殖學會報, 12 : 65-71.
18. 金重桂, 李癸勳, 姜萬鍾, 金瑩勳, 金承浩. 1988. 肉牛 受精卵 簡易 凍結 및 融解方法에 關한 硏究. 第6報 : 耐凍劑에 sucrose 添加에 다른 液體窒素 container에서 諸凍結方法이 mouse 受精卵 生存率에 미치는 影響. 韓國家畜繁殖學會報, 12 : 72-78.