

생쥐 初期胚의 正常胚와 透明帶除去 裸化胚의 凍結保存

尹昌鉉·姜大珍·閔觀植·張奎泰·吳錫斗*

慶尙大學校 農科大學

Cryopreservation of Zona Pellucida Removed Embryo and Normal Embryo of the Mouse Early Embryos

Yun, C.H., D.J. Kang, K.S. Min, K.T. Chang and S.D. Oh*

College of Agriculture, Gyeongsang National University

SUMMARY

This study was carried out to investigate the survival rate of *in vitro* culture after frozen-thawed, to used DMSO(dimethyl sulfoxide), glycerol and ethylene glycol of cryoprotective agents at the zona pellucida removed and intact on the morulae and blastocysts.

The results obtained from this study were as follows :

1. The survival rate of *in vitro* culture after frozen-thawed to used cryoprotective agents of three kinds at the morulae was 86.0%, 87.1% and 83.3%, total or mean were 85.5%, respectively.
2. The survival rate of *in vitro* culture after frozen-thawed to used cryoprotective agents of three kinds at the zona pellucida removed morulae was 53.2%, 42.3% and 37.5%, total or mean were 44.3%, respectively.
3. The survival rate of *in vitro* culture after frozen-thawed to used cryoprotective agents of three kinds at the blastocysts was 89.4%, 86.2% and 84.6%, total or mean were 86.7%, respectively.
4. The survival rate of *in vitro* culture after frozen-thawed to used cryoprotective agents of three kinds at the zona pellucida removed blastocysts was 55.8%, 51.6% and 40.6%, total or mean were 49.3%, respectively.

(Key words : DMSO, glycerol, ethylene glycol, zona pellucida removed and intact embryo)

I. 緒 論

생쥐胚에 대한 凍結保存은 Whittingham 등(1972)에 의하여 1細胞期에서부터 初期胚盤胞期까지를 -196°C 와 -296°C 에서 8日間 保存하여 多數의 胚가 生存하였고 産仔를 生産하는데 成功하였다고 報告하였다. 또한 Wilmut(1972)는 생쥐胚에 대하여 같은 實驗을

실시하여 高率의 生存胚를 얻을 수 있음을 認定하였다. 이와 같은 實驗 成果를 契機로 哺乳動物胚의 凍結保存은 개개의 完全한 遺傳形質을 半永久的으로 保存할 수 있다는 點에서 重要な 意義를 가질 수 있으므로 이에 關한 研究는 活潑하게 進行되고 있다.

생쥐에 대하여는 Leibo 등(1974), Whittingham 과 Whitten(1974), Maurer 등(1977), Kasai 등

* 晋州農林專門大學(Chinju National Agricultural and Forestry Junior College)

(1980), Whittingham(1981), Hsu 등(1986), Miyamoto와 Ishibashi(1986) 및 Miyamoto 등(1986)에 의하여凍結保存에 관한報告가 있었다.

또한 家畜의 胚에 대하여도 信賴도가 높은 多數의 研究가 報告되고 있다. 胚의 凍結保護劑로는 주로 DMSO, glycerin 및 ethylene glycol 등이 사용되고 있으며 添加濃度, 添加法, 添加溫度 그리고 添加後의 平衡時間과 溫度 등이 胚의 生存에 密接하게 關係하고 있다. 그밖에 植水溫度, 凍結速度, 融解溫도와 速度 및 凍害防止劑의 除去가 胚의 生存性에 크게 影響을 미치고 있으나, 아직까지는 이와 같은 問題들에 대한 最適方法은 確立되어 있지 않다.

한편 透明帶를 除去한 1/4 및 1/8의 分離割球는 胚盤胞까지 發達이 매우 不良할 뿐 아니라 着床以後의 發達は 거의 不可能한 것을 알려졌다(Rossant, 1976). 그러나 agar coating 한 것과 空透明帶內에 胚를 收納하여 培養을 實施하는 方法에 의하여 2~8細胞期의 胚에서 얻은 單一 分離割球를 移植하여 생쥐, 면양 및 소에서 一卵性 雙胎 또는 三胎를 生産하는데 成功하였다(Willadsen, 1979, 1980, 1981; Willadsen과 Polge, 1981; Willadsen 등, 1981). 正常胚에 비하여 透明帶를 除去한 裸化胚의 凍結融解後의 生存性은 低率이며, 이는 透明帶 除去에 起因되며 透明帶의 凍結保護 效果가 缺如되었기 때문으로 推測된다고 하였다(Ogawa와 Fjikura, 1983).

本 研究는 正常 桑實胚의 胚盤胞와 透明帶를 除去한 裸化 桑實胚 및 胚盤胞胚를 凍結融解하고 體外培養하여 生存性을 檢討하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試動物과 供試胚

供試動物은 ICR系 4~5週齡의 생쥐를 사용하였으며 5IU의 PMSG를 腹腔內에 投與하고 48時間後에 6IU의 HCG를 같은 方法으로 投與하여 過排卵을 誘起하였다. 雄 생쥐와 同居시키고 交配後 3~4일째에 屠殺하여 卵管 또는 子宮에서 桑實胚로부터 胚盤胞까지의 初期胚를 採取하여 供試하였다. 採卵用 灌流液은 0.4% BSA를 包含한 PBS(日本, 日水製藥)를 사용하였다.

2. 胚의 透明帶 除去

桑實胚와 胚盤胞胚의 透明帶를 除去하기 위하여 室溫에서 0.5% pronase(日本, 科研製藥)를 包含한 PBS(Ca^{2+} , Mg^{2+} , -free)液에 5~6분간 處理한 後 實體顯微鏡下에서 觀察하면서 透明帶가 軟化되었을 때 新鮮한 PBS液으로 3~4회 洗滌한 다음 pipetting 操作으로 透明帶를 除去하여 裸化시켰다.

3. 胚의 凍結保存

正常胚 및 透明帶를 除去한 裸化胚를 3종류의 凍結保存劑를 사용하여 凍結保存하였다. 胚를 각각 1.5M濃度の DMSO, glycerol 및 ethylene glycol을 包含한 PBS(+0.4% BSA)溶液에 直接 投入하고 室溫에서 15分以上의 平衡을 實施하였다. 그후 胚를 plastic straw(0.25mm)內에 溶液과 같이 吸引하였으며 桑實胚 및 胚盤胞胚와 裸化 桑實胚 및 胚盤胞胚를 straw 1개에 8~10개를 封入하였다. 胚가 들어있는 straw를 $-5.5^{\circ}C$ 까지 冷却하고 이 溫度에서 植水하여 氷晶을 形成시켰다. 植水後 15分間 平衡을 維持한 다음 $-32.5^{\circ}C$ 까지 $0.6^{\circ}C/min$ 의 速度로 冷却시킨 後에 液體窒素에 投入하여 保存하였다.

4. 凍結胚의 融解

凍結胚를 液體窒素에서 直接 移動하여 straw를 $35^{\circ}C$ 의 溫水에 浸漬하는 方法으로 각각 融解하였다.

5. 凍害保護劑의 除去

融解한 다음 straw 內容物을 plastic petri dish에 回收하여 胚를 0.75M의 sucrose를 包含한 PBS(+0.4% BSA)溶液으로 室溫에서 6分間 處理하여 DMSO, glycerol 및 ethylene glycol을 除去하였다.

6. 融解胚의 培養

凍結保護劑를 除去한 다음 胚를 PBS(+0.4% BSA)溶液으로 數回 洗淨하였으며 培養液은 Ham's F-10(Hazleton, USA)에 15%FCS(fetal calf serum; 日本, 三菱化成)를 添加한 培地(Anderson, 1980)를 사용하였다. Plastic petri dish에 4ml의 流動 paraffin을 넣은 다음 하나의 petri dish에 0.4ml의 培養液 小滴 3~4개를 넣어 petri dish 底面에 附着시켰으며 小滴當 胚를 1개씩 넣어 培養하였다. $38^{\circ}C$ 에서 5% CO_2 , 95% 空氣條件下의 CO_2 培養器內에서 48時間 培養하면서 胚의 發生狀態를 觀察하였다.

III. 結果 및 考察

1. 正常 및 裸化 桑實胚의 凍結融解後 生存性

正常 및 透明帶를 除去한 裸化桑實胚를 3종류의 凍結 保護劑를 사용하여 凍結, 融解하였을 때 生存性은 Table 1에서 보는 바와 같다. 凍結, 融解後의 體外培養으로 正常的인 胚盤胞胚로 發育된 比率은 正常 桑實胚에서 DMSO, glycerol 및 ethylene glycol은 각각 86.0%, 87.1% 및 83.3%였으며, 平均 85.5%였다. 裸化 桑實胚에서는 각각 53.2%, 42.3% 및 37.5%였고 平均 44.3%였다.

이와 같은 結果는 DMSO를 凍結保護劑로 사용한 Leibo 등(1974), Miyamoto와 Ishibashi(1984), Tsunoda 등(1981) 및 Willadsen(1977)의 成績과 대체로 一致되고 있다. Glycerol을 凍結保護劑로 사용하여 얻은 Rall과 Polge(1984), Lehn-Jensen과 Rall(1983)의 成績과는 비슷한 경향이였다. Ethylene glycol을 凍結保護劑로 사용한 Miyamoto와 Ishibashi(1983)의 成績과도 비슷한 수준이였다. 透明帶를 가진 桑實胚의 凍結融解後 生存率이 극히 높고, 裸化 桑實胚에서 極端的인 低生存率은 透明帶 除去에 起因되는 것으로 思料되며 透明帶의 凍結保護 效果가 缺如되었기 때문으로 推測된다.

일반적으로 凍結保護劑의 濃度는 높을 수록 效果가 높게 나타나나 高濃度는 毒性에 의하여 胚生存에 不利하며 融解時와 融解後에 保護劑를 除去할 때 급속한 水

分の 세포내 침입이 일어나 세포와 세포내 器官이 膨潤하여 희석 충격의 傷害를 받게 됨으로 保護劑의 除去는 단계적으로 하여야 하며 添加와 除去는 溫度, 滲透壓의 抵抗性 및 耐藥害性을 考慮하여 선택 사용되어야 할 것으로 思料된다.

2. 正常 및 裸化 胚盤胞胚의 凍結融解後 生存性

正常 및 透明帶를 除去한 裸化 胚盤胞胚를 3종류의 凍結保護劑를 사용하여 凍結 融解하였을 때 生存性은 Table 2에서 보는 바와 같다. 凍結, 融解後의 體外培養時 正常的으로 發育된 比率은 正常 胚盤胞胚에서 DMSO, glycerol 및 ethylene glycol은 각각 89.4%, 86.2%, 84.6%였으며 平均은 86.7%였으며 裸化 胚盤胞胚에서는 각각 55.8%, 51.6% 및 40.6%였고 平均 49.3%였다.

이와 같은 結果는 Leibo 등(1974), Miyamoto와 Ishibashi(1984), Willadsen(1977), Rall과 Polge(1984) 및 Miyamoto와 Ishibashi(1983)의 成績과 비슷한 경향이였다. 그리고 Hwang 등(1983)은 透明帶를 除去한 裸化胚의 凍結, 融解後의 平均 生存率은 36.8%였다고 하였으며, Ogawa와 Fjickura(1983)는 裸化胚의 凍結, 融解後의 發育率은 38.4%라고 보고하였다.

正常胚에 비하여 透明帶를 除去한 裸化胚의 凍結, 融解後 生存性의 低下는 透明帶가 없기 때문에 割球의 物理的 損傷이 증가되었기 때문이라고 생각되며, 凍結時 透明帶의 有無에 대하여는 앞으로 많은 檢討가 있어야 할 것으로 思料된다.

Table 1. Survival rate after frozen-thawed of zona pellucida removed and intact on the morulae

Type of embryos	Cryoprotective agents	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	Normal blastocyst (%)	Blatomeres degenerated (%)
Morula (Z.P. intact)	DMSO	52	50	43(86.0)	7(14.0)
	Glycerol	64	62	54(87.1)	8(12.9)
	Ethylene glycol	66	66	55(83.3)	11(16.7)
	Total or Mean	182	178	152(85.5)	14(14.5)
Morula (Z.P. removed)	DMSO	62	62	33(53.2)	29(46.8)
	Glycerol	54	52	22(42.3)	30(57.7)
	Ethylene glycol	58	56	21(37.5)	35(62.5)
	Total or Mean	174	170	76(44.3)	94(55.7)

Table 2. Survival rate after frozen-thawed of zona pellucida removed and intact on the blastocysts

Type of embryos	Cryoprotective agents	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	Normal blastocyst (%)	Blatomeres degenerated (%)
Blastocyst (Z.P. intact)	DMSO	66	66	59(89.4)	7(10.6)
	Glycerol	58	58	50(86.2)	8(13.8)
	Ethylene glycol	54	52	44(84.6)	8(15.4)
	Total or Mean	178	176	153(86.7)	23(13.3)
Blastocyst (Z.P. removed)	DMSO	52	52	29(55.8)	23(44.2)
	Glycol	62	62	32(51.6)	30(48.4)
	Ethylene glycol	64	64	26(40.6)	38(59.4)
	Total or Mean	178	178	87(49.3)	91(50.7)

IV. 摘要

本 研究는 생쥐의 正常 桑實胚 및 胚盤胞胚와 透明帶를 除去한 裸化 桑實胚 및 胚盤胞胚를 3종류의 凍結保護劑 DMSO, glycerol 및 ethylene glycol 을 사용하여 凍結, 融解하고 體外培養하여 生存性을 檢討하였다.

1. 桑實胚를 3종류의 凍結保護劑를 사용하여 凍結, 融解後의 體外培養한 生存率은 각각 86.0%, 87.1% 및 83.3%였으며 平均 85.5%였다.
2. 裸化 桑實胚를 3종류의 凍結保護劑를 사용하여 凍結, 融解後의 體外培養한 生存率은 각각 53.2%, 42.3% 및 37.5%였으며 平均 44.3%였다.
3. 胚盤胞胚를 3종류의 凍結保護劑를 사용하여 凍結, 融解後의 體外培養한 生存率은 각각 89.4%, 86.2% 및 84.6%였으며 平均 86.7%였다.
4. 裸化 胚盤胞胚를 3종류의 凍結保護劑를 사용하여 凍結, 融解後의 體外培養한 生存率은 각각 55.8%, 51.6% 및 40.6%였고 平均 49.3%였다.

V. 引用文獻

1. Anderson, G.B. 1980. Methods in mammalian reproduction, Daniel, J.C. ed., p. 273. Academic Press.
2. Hsu, T.T., H. Yamakawa, J. Yamanoi, and S. Ogawa. 1986. Survival and transfer test of mouse embryos frozen by vitrification

method. Jpn. J. Anim. Reprod., 32(3) : 29-32.

3. Hwang, W.S., A. Nakagawa, M. Hishinuma, Y. Takahashi and H. Kanagawa. 1986. The developmental of bisected frozen-thawed mouse embryos. Jpn. J. Anim. Reprod., 32(3) : 153-155.
4. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. J. Reprod. Fert., 59 : 51-56.
5. Lehn-Jensen, H. and W.F. Rall. 1983. Cryomicroscopic observation of cattle embryos during freezing and thawing Theriogenology, 19 : 263-277.
6. Leibo, S.P., P. Mazur and S.C. Jackowski. 1974. Factor affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. Exp. Cell. Res., 89 : 79-88.
7. Maurer, R.R., H. Bank, and R.E. Staples. 1977. Pre-postnatal development of mouse embryos after storage for different periods at cryogenic temperature. Biol. Reprod., 16 : 139-146.
8. Miyamoto, H. and T. Ishibashi, 1983. Survival of mouse embryos frozen-thawed slowly or rapidly in the presence of various

- protectants. *J. Expl. Zool.*, 226 : 123-127.
9. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1984. Survival of epididymal spermatozoa of the goat and sheep, and mouse and rat embryos after direct transfer into liquid nitrogen from preliminary freezing temperature. *Jpn. J. Artf. Insem.*, 6(1) : 1-3.
 10. Miyamoto, H., and T. Ishibashi. 1986. Liquid nitrogen vapour freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 78 : 471-478.
 11. Miyamoto, H., Y. Miyamoto, and T. Ishibashi. 1986. The importance of equilibration time to glycerol prior to freezing in the cryopreservation of mouse embryos. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 57 : 250-256.
 12. Ogawa, S. and H. Fjikura. 1983. Cryoviability of the half-embryos isolated by micrurgy from early developmental stage embryos in mice and rabbits. *Institute of Science and Technologe Meiji Univ.*, 62 : 25-34.
 13. 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.
 14. Rossant, J. 1976. Postimplantation development of blastomeres isolated from 4- and 8-cell mouse eggs. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 36 : 283-290.
 15. Tsunoda, Y., T. Soma and T. Sugie. 1981. The survival of rabbit morulae preserved in liquid nitrogen after rapid thawing. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 27(3-4) : 157-160.
 16. Whittingham, D.G. 1981. Sensitivity of mouse embryos to the rate of thawing. 21-31. In *frozen storage of laboratory animals.* (G.H. Zeilmaker, ed.,) Gustay Fisher Verlag, Stugat.
 17. Whittingham, D.G. and W.K. Whitten. 1974. Long-term stroage and aerial transport of frozen mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 36 : 433-435.
 18. 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.
 19. Willadsen, S.M. 1977. Factors affecting the survival of sheep embryos during freezing and thawing. In *the mammalian embryos*(Ciba Fndn. Symp. No. 52) p : 175-189. Eds. K. Elliott and J. Whelan. Elsevier North Holland, Amsterdam.
 20. Willadsen, S.M. 1979. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature(London)*. 277 : 298-300.
 21. Willadsen, S.M. 1980. The viability of early cleavage stages containing half normal number of blastomere in the sheep. *J. Reprod. Fert.*, 59 : 357-362.
 22. Willadsen, S.M. 1981. The developmental capacity of blastomeres from four and eight -cell sheep embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 65 : 165-172.
 23. Willadsen, S.M. and C. Polge. 1981. Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere sepalation. *Vet. Record.*, 198 : 211.
 24. Willadsen, S.M., H. Lehn-Jensen, C.B. Fehill and R. Newcomb. 1981. The production of micromanipulation of nonsurgically collected cow embryos. *Therigenology*. 15 : 23.
 25. Wilmut, I. 1972. The effect of colling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development of survival of mouse of embryos during freezing and thawing. *Life Sci.*, 11 : 1071-1079.