

## 초급속 동결융해한 생쥐 2세포기 수정란의 개체발생능

강만중 · 한용만 · 이철상 · 유대열 · 이경광

한국과학기술연구원 유전공학연구소

### Full-Term Development of Ultrarapidly Frozen-Thawed Mouse 2-Cell Embryos

M. J. Kang, Y. M. Han, C. S. Lee, D. Y. Yu and K. K. Lee

Genetic Engineering Institute, KIST

#### Summary

This study investigated full-term development potential of ultrarapidly frozen and thawed mouse 2-cell embryos. Mouse 2-cell embryos, dehydrated by exposure to freezing medium, were directly immersed into liquid nitrogen and thawed in 37°C water. The embryos that were frozen and thawed were cultured *in vitro* and transferred to foster mothers to examine their developmental potential. As a result, the frozen-thawed 2-cell embryos developed to blastocysts *in vitro* as a similar rate as control 2-cell embryos did (*in vitro* 2-cell, 86.4%; *in vivo* 2-cell, 90.9%; solution control, 89.9%; control, 89.7%). Normal live young were obtained from transfer of frozen-thawed embryos to the oviduct and uterus of pseudopregnant recipients (31.4~56.7%).

#### 서 론

포유동물 수정란의 동결은 1972년 Whittingham 이 생쥐 수정란을 -196°C에 동결융해후 이식하여 산자를 얻은 다음 부터 수 많은 연구가 수행되어 왔으며, 이는 형질이 우수한 가축 및 희귀동물의 수정란을 반영구적으로 보존할 수 있다는 점에 큰 의의가 있다.

포유동물 수정란의 동결방법은 세포내의 자유수를 서서히 탈수시키는 완만동결방법(Miyamoto와 Ishibashi, 1977; Mazur, 1979)과 고농도의 동결액을 사용하여 실온에서 직접 액체질소에 침지하는 초급속 동결방법으로 구분할 수 있다(Nakagata, 1989; Trounson 등, 1987; Rall 등, 1987; Szell과 Shelton, 1986a,b 1987).

초급속동결 방법에는 각종 내동제를 혼합하여 세포 내외에 빙정형성을 방지시키는 vitrification 방법(Nakagata, 1989; Rall과 Fahy, 1985)과 세포내외를 각각 보호하는 두가지 내동제를 이용하여 동결전 세포내부의 수분을 탈수시키는 방법(Wilton 등,

1989; Chupin과 Reviers, 1986; Takahashi와 Kanagawa, 1985)으로 구분할 수 있다. 이러한 초급속 동결방법은 완만동결시에 필요한 고가의 장비(cell freezer)가 불필요하고, 또한 많은 시간과 다량의 액체질소 등을 최대한 절약함은 물론 완만동결시 보다 훨씬 간편하게 액체질소 container 내에서 동결을 실시할 수 있는 장점이 있다.

그러나 이러한 연구는 주로 동결융해한 수정란의 체외 발달까지의 생존 능력을 검토하였으며, 개체발생 능력에 관한 연구는 보고자마다 동결방법, 수정란의 발육단계 등에 따라 다소 상이하게 보고하고 있다 (Shaw 등, 1991; Wilton 등, 1989; Nakagata, 1989; Rall 등, 1987; Trounson 등, 1987). 한편, 국내의 경우 동결융해 후 수정란이식에 관한 연구는 8세포기 이후의 수정란을 이용하여 토끼(김 등, 1983), 생쥐(권, 1989) 등에서 보고되고 있으나, 2세포기 수정란의 개체발생에 관한 연구는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구는 초급속 동결융해한 생쥐 2세포기 수정란의 개체 발생을 유도하고자, 체내 또는 체외발

달시켜 얻은 2세포기 수정란을 동결융해 후 가임신된 생쥐의 난관 또는 자궁에 이식하여 개체 발생 여부를 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 다배란 유기 및 수정란 준비

공시동물은 유전공학연구소 생물검정실로 부터 분양받은 교잡종 생쥐(C57BL/6XCBA)를 사용하였다. 다배란 유기를 위하여 PMSG(제국장기, 일본)와 HCG(Sigma, USA)를 48시간 간격으로 각각 5 IU씩 복강내에 주사한 다음, 동일 계통의 웅성 생쥐와 1:1로 합사시켜 자연교미를 유도하였으며, 다음 날 아침 질전이 확인된 개체만을 실험에 사용하였다. 실험에 공시한 2세포기 수정란은 체외배양하여 얻은 것(이하 *in vitro* 2세포기 수정란)과 체내발달시킨 것(이하 *in vivo* 2세포기 수정란)으로 나누었으며, *in vitro* 2세포기 수정란의 준비는 HCG 주사후 18~19시간째에 난관으로 부터 회수한 1세포기 수정란을 hyaluronidase(300 unit/ml, Sigma, USA) 용액에서 3분간 처리하여 난구세포를 제거하였다. 난구세포가 제거된 수정란을 신선한 PBS(modified Dulbecco's phosphate buffered saline)로 5회 세척한 후 M16 배양액에서 24시간 체외배양하여 정상적인 2세포기 수정란으로 발달한 수정란만을 선별, 실험에 사용하였다. 그리고 *in vivo* 2세포기 수정란은 HCG 주사후 42~43시간째에 난관으로 부터 회수하였다.

### 2. 수정란 동결

준비된 수정란을 0.25ml straw내의 동결액에서 2.5분간 평형시킨 후 액체질소에 곧바로 침지함으로써 초급속 동결을 실시하였다. 동결액은 3M DMSO, 0.25M sucrose, 20% FCS가 함유된 PBS를 사용하였다. 수정란의 융해는 동결후 1일 내지 1주일 동안 보존된 straw를 실온에서 40초간 방치한 후 37°C 온수에서 30초간 천천히 흔들어 실시하였다. 융해 후 내용물을 제거하기 위하여 straw의 powder plug 부위를 엄지와 검지로 잡고 흔들어 straw 내의 희석액(0.25M sucrose+PBS)과 수정란이 들어 있는 동결액을 섞어 10분간 상온에 방치하였다. 내용물이 제거된 수정란은 신선한 PBS로 3회 세척하여 5분간 방치

한 후 M16 배양액에서 72시간 동안 배양하면서 수정란의 체외 발달상태를 관찰하였다.

### 3. 수정란 배양

본 실험에 사용된 배양액은 0.4% BSA(Sigma, USA)와 EDTA(100 $\mu$ M)가 함유된 bicarbonate-buffered M16 배양액(Whittingham, 1971)을 사용하였으며, 체외배양을 위하여 pertri dish(Falcon, USA)에 약 50 $\mu$ l의 배양액 소적을 만들어 heavy mineral oil(Sigma, USA)로 피복한 다음, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 최소한 2시간 이상 평형을 실시하였다. 그리고 동결액의 독성 여부를 규명하기 위하여 *in vitro* 2세포기 수정란을 동결액에 평형시킨 후 동결하지 않고 바로 희석액으로 옮겨 내용물을 제거한 다음 72시간 동안 배양하였으며(solution control), 대조구로는 동결시키지 않은 2세포기 수정란을 동일한 조건에서 배양하였다.

### 4. 수정란 이식

동결융해한 *in vivo* 또는 *in vitro* 2세포기 수정란을 융해후 2시간 배양한 다음 이식하거나, 체외배양하여 배반포기배로 발달한 수정란을 자궁에 이식하였다. 가친으로는 가임신이 유도된 ICR 생쥐를 사용하였으며, 생쥐 체중 10g당 0.5mg에 sodium pentobarbital(Somnopentyl; Pitman-Moore, USA)을 복강내에 주사하여 진신마취를 실시하였다. 마취된 생쥐의 배측 정중선을 약 1cm 정도 절개하고 난소, 난관, 자궁을 들어내어 각각의 난관 또는 자궁에 10개 내외의 수정란을 이식한 다음 근육층과 표피를 봉합하였다.

## 결과 및 고찰

초급속 동결융해한 *in vivo* 또는 *in vitro* 2세포기 수정란의 체외발달율은 Table 1과 같다. 동결을 실시한 *in vivo* 2세포기 수정란과 *in vitro* 2세포기 수정란에서 동결융해후 회수율과 회수된 수정란중 정상수정란의 비율은 각각 95% 이상의 높은 성적을 얻고 있다. 그리고 상실배까지의 발달율(48시간 배양)은 양처리구에서 동일한 성적(96.5%, 96.4%)을 보여주었으며, 배반포기배까지의 발달율(72시간 배양)에서

Table 1. *In vitro* development of frozen-thawed 2-cell mouse embryos

Treatment	No. of embryos			No. of normal embryos cultured	
	Tested	Recovered	Normal at recovery	embryos cultured	
		(%)*	(%)**	48h %***	72h %***
<i>In vivo</i>	147	143	142	137	129
2-cell		(97.3)	(99.3)	(96.5)	(90.9)
<i>In vitro</i>	120	116	110	106	93
2-cell		(96.7)	(97.8)	(96.4)	(84.6)
Solution control	99	—	—	96	89
		—	—	(97.0)	(89.9)
Control	97	—	—	95	87
		—	—	(97.9)	(89.7)

M; morula B; blastocyst.

percentage of embryos in parentheses.

\* No. of embryos recovered / No. of embryos frozen × 100.

\*\* No. of normal embryos post-thaw / No. of embryos recovered × 100.

\*\*\* No. of blastocysts and morula / No. of normal embryos post-thaw × 100.

는 각각 90.9%와 84.6%로 *in vitro* 2세포기에서 다소 낮은 성적을 나타내고 있다. 그러나 이러한 성적은 *in vitro* 2세포기 수정란을 동결액에 평행시킨 후 동결하지 않고 바로 희석액으로 옮겨 내동제를 제거한 다음 배양한 solution control구와 *in vitro* 2세포기 수정란을 아무런 처리없이 배양한 control구와 비교하였을 때 거의 일치하였다.

본 연구의 성적은 초급속 동결에 있어 Trounson 등(1987)이 보고한 75%의 발달율 및 Critser 등(1988), Na 등(1988), 백 등(1989)의 완만동결 성적(63.9%~83.6%)과 vitrification 방법을 이용한 46~89%의 발달율(Kono와 Tsunoda, 1987; Friedler 등, 1987) 보다 우수하거나 유사하였다. 그리고 *in vitro* 수정란에서 타 처리구보다 다소 저조한 발달율(84.6%)을 보이고 있으나, 처리구간에 유의성은 인정되지 않았다. Solution control에서 타 처리구와 유사한 성적을 나타내는 것은 본 실험에 사용한 동결액이 생쥐 2세포기 수정란의 생존에 영향이 없으며, control 과 모든 처리구를 비교하여도 발달율에 차이가 없는 것은 본 실험의 동결방법이 2세포기 생쥐 수정란의 초급속 동결에 적합한 방법이라고 할 수 있다.

초급속 동결용해한 2세포기 수정란을 가임시킨 생쥐에 이식한 결과 Table 2와 같다. *In vivo* 2세포기

수정란에 있어서 동결용해 후 배반포기배까지 배양한 다음 자궁에 이식한 처리구와 동결용해 후 직접 난관에 이식한 처리구에서 각각 52.3%와 41.9%의 개체발생율을 얻었다.

이러한 결과는 Whittingham(1972)이 완만동결 방법을 이용하여 2세포기 수정란을 동결용해 후 직접 또는 배반포기배까지 배양한 후 각각 난관과 자궁에 이식하였을 때의 개체발생율(31.5%, 35.6%)보다 높은 성적이었다. 그리고 3M DMSO를 이용한 초급속 동결에 있어서 Trounson 등(1987)의 성적(31%) 보다는 높았으나, 임신 15일째까지의 개체발생을 관찰한 Shaw 등(1991)의 성적(65.7%)보다는 다소 낮은 성적이었다. 또한, 배반포기배까지 배양한 후 자궁에 이식하였을 때 다소 높은 성적을 얻은 결과는 Whittingham(1972)의 보고와 유사하였다. 그리고 Whittingham(1979)은 8세포기 수정란의 경우에 있어 동결용해 후 직접 자궁에 이식하는 것보다 24시간 체외배양한 후 이식하는 것이 높은 성적을 얻을 수 있었다고 하였으며, 동결용해한 수정란은 세포수가 감소하기 때문에 동결용해 후 체외 배양에 의하여 세포수를 증가시켜 주는 것이 개체발생에 유효하다고 하였다.

그러나 본 연구 결과에 있어서 *in vitro* 2세포기 수정란의 경우는 동결용해 후 바로 난관에 이식하는

Table 2. Transfer of frozen-thawed 2-cell mouse embryos

Source of embryos	Embryo stage at transfer	Transfer site (days of pregnancy)	No. of embryos transferred	No. of live young(%)*
<i>In vivo</i> 2-cell	2-cell	Oviduct (day 1)	43	18(41.9)
	Blastocyst	Uterus (day 3)	44	23(52.3)
<i>In vitro</i> 2-cell	2-cell	Oviduct (day 1)	37	21(56.7)
	Blastocyst	Uterus (day 3)	35	11(31.4)

\* No. of live young / No. of embryos transferred × 100.

것이 높은 개체 발생율(56.7%)을 나타내어 *in vivo* 2세포기 수정란과는 상반되는 결과를 보여주고 있다. 이러한 결과는 1세포기에 2세포기까지의 체외배양이 동결융해 후 체외 발달에 나쁜 영향을 미치는 것으로 생각되므로, 이를 실증할 수 있는 구체적인 연구를 추후에 수행할 예정이다.

이러한 결과를 종합하여 볼 때 *in vivo* 2세포기 수정란은 동결융해 후 직접 또는 일정시간 배양 후 자궁에 이식하는 것이 바람직 하며, *in vitro* 2세포기 수정란은 동결융해 후 직접 난관에 이식하는 것이 양호한 개체발생을 유도할 수 있을 것으로 생각된다.

### 적 요

초급속 동결융해한 생쥐 2세포기 수정란의 개체발생 여부를 확인 하고자, 수정란을 동결융해 후 가임신된 생쥐의 난관에, 또는 배반포기배까지 배양후 자궁에 이식하여 개체발생 여부를 검토하였다. 이들 수정란의 체외 발달율은 84.6~90.0%였으며, 가임신된 생쥐에 이식한 결과 31.4~56.7%의 개체 발생율을 얻을 수 있었다.

### 참 고 문 헌

Critser JK, Arneson BW, Aaker DV, Huse-Benda AR and Ball GD. 1988. Factors affecting the cryosurvival

of mouse two-cell embryos. *J. Reprod. Fert.*, 82: 27-33.

Chupin D and De Reviers MM. 1986. Quick freezing of rat embryos. *Theriogenology*, 17:1-10.

Friedler S, Shen E and Lamb EJ. 1987. Cryopreservation of mouse 2-cell embryos and ova by vitrification: methodologic studie. *Fertil. Steril.*, 48:306-314.

Kasai M, Komi JH, Takakano A, Tsudera H, Sakurai T and Mahida T. 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution without appreciable loss of viability. *J. Reprod. Fert.*, 89:91-97.

Kono T and Tsunoda Y. 1987. Frozen storage of mouse embryos by vitrification. *Japan J. Anim. Reprod.*, 33:77-81.

Mazur P. 1979. Slow freezing injury in mamalian cells. in: *The freezing of mammalian embryos*, Ciba Foun Symp., Elsevier North-Holland, Amsterdam, No. 52:19-45.

Miyamoto H and Ishibashi T. 1977. Survival of frozen-thawed mouse and rat embryos in the presence of ethylene glycol. *J. Reprod. Fert.*, 50:373-375.

Nakagata N. 1989. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J. Reprod. Fert.*, 87:479-483.

Na Soon-Chye, Sathananthan H, Bongso A, Mui-Nee Lee, Mok H, Perg-Cheang Wong and Ratnam SS.

1988. The use of amniotic fluid and serum with propanediol in freezing of murine 2-cell embryos. *Fertil. Steril.*, 50:510-513.
- Rall WF, Wood MJ, Kirby C and Whittingham DC. 1987. Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *J. Reprod. Fert.*, 80:499-504.
- Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at  $-196^{\circ}\text{C}$  by vitrification. *Nature*, 313:573-575.
- Shaw JN, Kola I, MacFarlane DR and Trounson AO. 1991. An association between chromosomal abnormalities in rapidly frozen 2-cell mouse embryos and the ice-forming properties of the cryoprotective solution. *J. Reprod. Fert.*, 91:9-8.
- Szell A and Shelton JN. 1987. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solution on Day-3 mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 80:309-316.
- Szell A and Shelton JN. 1986a. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 78:699-703.
- Szell A and Shelton JN. 1986b. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. *J. Reprod. Fert.*, 76:401-408.
- Trounson A, Peura A and Kirby A. 1987. Ultrarapid freezing: a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil. Steril.*, 48:843-850.
- Whittingham DG. 1979. Some factors affecting embryo storage in laboratory animals. in: *The freezing of mammalian embryos*. Ciba Foun Symp., Elsevier North-Holland, Amsterdam, No. 52:97-108.
- Whittingham DG. 1971. Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 14:7-21.
- Whittingham DG, Leibo SP and Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to  $-196^{\circ}\text{C}$  and  $-269^{\circ}\text{C}$ . *Science*, 78:411-414.
- Willton LT, Shaw JM and Trounson AO. 1989. Successful single-cell biopsy and cryopreservation of preimplantation mouse embryos. *Fertil. Steril.*, 51:513-517.
- 김성익, 양부근, 남상현, 고광두. 1983. 가토의 수정란 이식에 관한 연구. II. 동결 용해난자의 발육단계별 생존성. *한국가축번식학회지*, 7:19-23.
- 권오룡, Kono T and Nakahara T. 1989. Mouse배의 Glass화 보존. *한국가축번식학회지*, 13:63-69.
- 백정순, 서병희, 이재현, 이경광. 1989. 생쥐 2세포기배의 동결보존. *대한불임학회지*, 16:9-14.