대한수의사회지 제27권 제 3 호
J. Korean Vet. Med. Assoc.
Vol. 27, No. 3, March, 1991

마우스 受精卵의 體外培養 및 凍結保存에 관한 硏究

李鳳洙* · 張京鎭**

緖 論

수정란의 체외배양 및 동결보존은 포유동물 발생에 관한 기초학문분야에서 뿐만 아니라 산업동물의 생산성 향상, 유전형질개선 등의 산업적 측면에서 중요한 수정란이식의 과정으로 연구되어 왔으며 현재에도 포유동물 수정란이 장기보존 및 동결보존후의 생존성 향상을 위하여 많은 연구가 진행되고 있다.

마우스 수정란의 체외배양은 1949년 Hammond, Jr.[6]가 난백과 난황이 첨가된 생리식염수를 배양액으로 하여 8세포기배를 배반포까지 체외배양하는데 처음 성공하였으며 그 이후 체외배양에 사용되는 배양액의 종류 및 조성, pH, 호르몬의 첨가 등 배양조건을 달리한 많은 실험이 실시되었고,[3,25~27] 수정란의 대사, 수정란의 발육단계에 따른 체외발육율, 이식후의 생존성 등이 조사와 체외수정 및 유전공학에의 응용을 위하여 광범위한 실험이 실시되고 있다.

한편 포유동물 수정란의 동결보존은 1971년 Whittingham[23]이 마우스 8세포기배 및 초기배반포의 수정란을 −79℃에 30분간 동결한후 체외배양 및 체내이식에 최초로 성공한 이래 이에 대한 많은 연구가 실시되어 이듬해 Whittingham 등[29]은 glycerol과 dimethylsulfoxide(DMSO)를 동결보호제로 마우스 1-8세포기배 및 초기배반포를 −196℃ 및 −269℃에 동결보존하는데 성공하였다. 이후 다른 포유동물 수정란의 동결보존실험도 활발히 진행되어 소,[32] 토끼,[1] 래트,[24] 양,[31] 염소,[2] 사람[20] 그리고 말 등[13]의 수정란을 각각 −196℃까지 동결보존시키는데 성공하였다. 이과같이 포유동물 수정란의 동결보존이 성공적으로 이루어 짐에 따라 glycerol, DMSO, ethylene glycol 등의 투과성 동결보호제와 PVP, dextran, sucrose 등의 비투과성 동결보호제의 종류와 그들의 농도가 각종 포유동물 수정란의 동결보호 효과에 미치는 영향을 조사한 연구가 광범위하게 실시되었다.[5,9,12,17,19,21] 그러나 각각의 동결보호제의 수정란 동결보호효과에 대한 보고는 많으나 동결과정중 여러가지 동결보호제의 동결보호효과와 수정란에 대한 독성 및 이점의 비교에 대한 보문은 드문 실정이다.

이에 저자는 수정란의 발육단계에 따른 체외발육율과 각종 동결보호제의 마우스 수정란에 대한 동결보호 효과를 조사함으로써 포유동물 발생과 수정란의 동결보존에 대한 기초자료를 제공하고자 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

공시동물 : 본 실험에 사용된 공란마우스는 생후 3~4주령, 체중 15~20 g의 ICR계 미성숙 마우스였다. 사육실은 실내온도를 약 20℃ 내외로 유지하였으며 오전 7시부터 오후 8시까지 13시간동안은 점등하고 오후 8시부터 오전 7시까지 11시간동안은 소등하여 명암을 조절하였다. 사료 및 물은 실험동물용 펠렛사료(천호 제일사료)와 깨끗한 수도물을 자유급식시켰다.

과배란처리 : 과배란처리는 Hetherington[7]의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 과배란을 유도하기 위하여 오후 4시에 pregnant mare's serum gonadotrophin(Folligon®, Intervet Lab., Holland, 이하 PMSG로 약함) 7.5 IU를 복강내 주사하하고 47시간 후에 다시 human chorionic gonadotrophin(Chorulon®, Iintervet Lab., Holland 이하 HCG로 약함) 7.5 IU를 복강내 주사하였다. HCG투여 후 즉시 ICR계 및 CBA계 수마우스와 동수로 하루밤을 동거시키고 다음날 아침에 질전(vaginal plug)의 형성유무를 관찰하여 교미여부를 확인하였다.

수정란의 채취 : HCG투여후 평균 56시간, 66시간 및 74

* 건국대학교 축산개발대학원 가축질병학과
** 건국대학교 축산대학 수의학과

시간에 각각 4세포기배, 8세포기배 및 초기상실배를 채취하였다.

공란마우수는 경추탈구법(cervical dislocation)으로 도살하고 난관채와 자궁난관접합부에 가까운 자궁선단부를 절단하여 난관을 분리하였다. 분리한 난관을 소량의 관류액이 들어 있는 plastic petri dish에 넣어 25배의 실체현미경(Wild Leitz, M5A, Canada)하에서 관류액이 들어 있는 1㎖ 주사기에 끝이 무딘 주사침을 삽입한후 하향식으로 관류하여 수정란을 채취하였다.

채취한 수정란은 100배의 도립현미경(Nikon, TMD, Japan)하에서 형태를 점정하여 정상형태를 지닌 4세포기배, 8세포기배 및 상실배만을 선정(Fig. 1~3), 실험에 사용하였다.

수정란의 횟수를 위한 관류액으로는 Hepes buffer가 처가된 modified Krebs-Ringer bicarbonate medium(이하 M2로 약함)[14]을 사용하였다.

동결보호제의 종류, 첨가 및 평형 : 동결보호제로는 glycerol, DMSO 및 ethylene glycol의 3종류를 선택하였으며 최종 첨가농도는 각각 1.5M이 되도록 하였다.

동결액은 10%의 우태아혈청(fetal calf serum, 이하 FCS로 약함)이 첨가된 modified Dulbecco's buffered medium(이하 10% FCS+PBS로 약함)[28]을 사용하였다.

동결에 사용된 수정란은 상실배로서 실온에서 각각의 동결보호재가 0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2M 및 1.5M 함유된 3㎖의 동결액내에 각단계 5분씩, 6단계로 첨가 및 평형시켰다.

동 결 : 최종농도(1.5M)의 동결보호제로 평형시킨 수정란은 Fig. 4에서와 같이 0.25㎖의 plastic straw에 straw당 7~15개씩 주입하여 programmable microcomputerized freezer(OSK, FFP-190형, Japan)를 이용, 동결하였다. 수정란을 넣은 straw는 황[33]의 방법에 준해 Fig. 5와 같이 동결곡선을 설정하여 동결시켰으며 -39℃에 도달한 straw는 즉시 액체질소내에 침지시켜 보존하였다.

본 실험에서 수정란의 액체질소내 보존기간은 1~20일간이었다.

융해 및 동결보호제의 제거 : 동결수정란의 융해는 straw를 액체질소에서 꺼낸 즉시 38℃의 온수에 30초간 침지하여 급속융해하였다. 융해시킨 수정란은 동결보호제 첨가시의 역순으로 처리하여 동결보호제를 희석, 제거하였다.

체외배양 및 생존성 판정 : 실험에 사용된 수정란은 Brinster's mouse ovum culture medium-3(이하 BMOC-3로

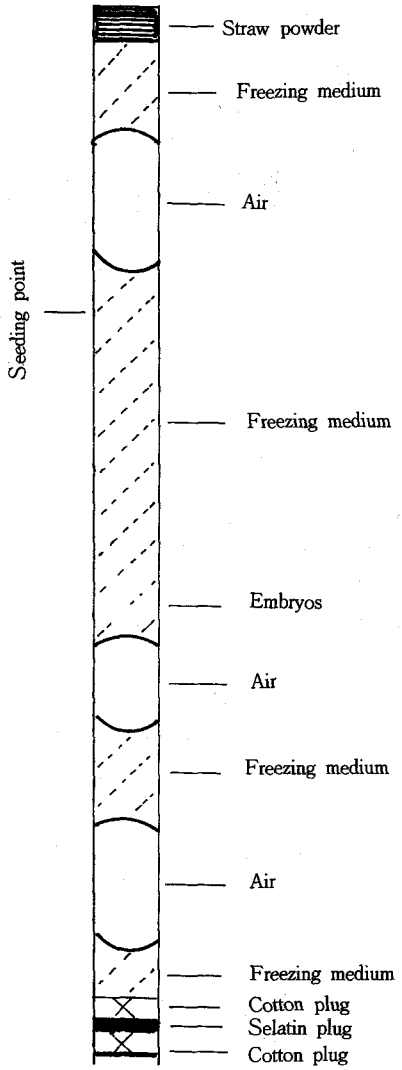


Fig. 4. Diagram of 0.25㎖ plastic straw loaded with freezing medium and embryos for the conventional slow freezing.

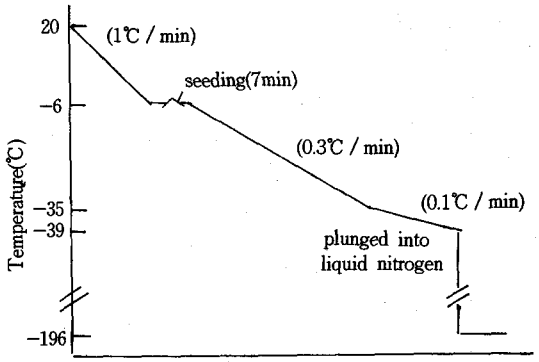


Fig. 5. Freezing curve for the conventional slow freezing.

약함)[4]를 사용하여 Brinster[3]의 미소적배양법에 준해 37℃, 5% CO_2, 95% 공기 및 습도가 포화상태인 CO_2 배양기(이하 5% CO_2 배양기로 약함)내에서 48시간이상 체외배양하여 발육상태를 관찰하였다. 동결, 융해한 수정란은 체외배양후 배반포 이상으로 발육되면 생존한 것으로 판정하였다.

통계학적 분석 : 체외배양 및 동결, 융해한 수정란의 생존율에 대한 비교는 동일 조건에서 배양한 수정란 또는 동일 straw내에 주입, 동결한 수정란을 기본단위로 SPSS 통계 system[13]을 이용하여 one-way 분산분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

마우스 수정란을 채취하여 체외배양 및 여러가지의 동결보호제를 이용하여 동결보존한 후의 생존율을 조사한 결과는 다음과 같다.

4세포기배, 8세포기배 및 상실배 수정란을 채취하여 72시간 체외배양한 결과 각각 22.0%, 2.2% 및 0%가 중기배반포까지만 67.8%, 95.7% 및 100%가 확장배반포로 발육되어 중기배반포로의 발육성적은 4세포기배가 8세포기배와 상실배 수정란에서 보다 유의성 있게 높았으며($p<0.01$), 확장배반포로의 발육성적은 8세포기배와 상실배 수정란이 4세포기배에서보다 유의성 있게 높았다($p<0.001$). 그러나 체외배양후 4세포기배, 8세포기배 및 상실배 수정란에서의 변성율은 각각 10.2%, 2.2%, 0%로서 유의적인 차이는 없었다(Table 1).

마우스 상실배 수정란의 동결보존에 있어서 동결보호제에 따른 생존율을 조사한 결과는 Table 2와 같다. glycerol, DMSO 그리고 ethylene glycol을 동결보호제로 이용하여 동결한후 융해하여 48시간 체외배양한 결과 중기배반포까지만의 발육율은 각각 9.3%, 2.3% 및 0%로서 각 군간에 유의적인 차이가 없었고 확장배반포로의 발육율도 각각 64.8%, 75.0% 및 79.2%로서 유의적인 차이가 인정되지 않았으며 각군에서의 변성율도 각각 25.9%, 22.7% 및 20.8%로서 유의차가 없었다.

McLaren과 Biggers[11]는 9~16세포기배 마우스 수정란을 2일동안 체외배양한 결과 87%가 배반포로 발육되었다고 보고하였고, Quinn과 Wales[15]는 phosphate-buffered medium과 bicarbonate-buffered medium을 이용하여 8세포기배를 체외배양한 결과 59~88%가 배반포로 발육되었다고 보고하였다. 본 실험에서는 8세포기배와 상실배 수정란의 배반포로의 발육률은 각각 97.8%와 100%로서 McLaren과 Biggers, Quinn과 Wales[15]의 결과보다는 높은 수준이었다. 본 실험에서 4세포기배가 8세포기배나 상실배 수정란에서 보다 배반포로의 발육율이 낮은 이유는 수정란의 할구수가 적으므로 할구에 손상을 받을 경우나 또는 할구에 이상이 있을 경우 생존할 수 있는 가능성이 감소되며 또한 배반포까지의 배양시간이 8세포기배나 상실배 수정란에 비해 길기 때문에

Table 1. The Viability of Mouse Embryos 72 Hours after *In vitro* Culture in Relation to the Developmental Stage

Developmental stage	No. of embryos cultured	No.(%) of embryos developed to: Mid-blastocyst	Expanded blastocyst	Degenerated
4-cell	59	13(22.0)a	40(67.8)c	6 (10.2)
8-cell	46	1(2.2)b	44(95.7)d	1 (2.2)
Morula	62	0(0.0)b	62(100.0)d	0 (0.0)

a, b : Significant differences within column($p<0.01$).
c, d : Significant differences within column($p<0.001$).

Table 2. The Effect of The Cryoprotectants on the Viability of Mouse Morulae after Freezing

Cryoprotectants	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No.(%) of embryos developed to* : Mid-blastocyst	Expanded blastocyst	Degenerated
Glycerol	59	54	5(9.3)	35(64.8)	14(25.9)
DMSO	47	44	1(2.3)	33(75.0)	10(22.7)
Ethylene glycol	55	53	0(0.0)	42(79.2)	11(29.8)

* : Agter 48 hours *In vitro* culture.

체외의 부적당한 환경에 노출될 개연성이 높기 때문인 것으로 사료된다.

또한 수정란의 발육이 진행됨에 따라 pyruvate, lactate, amino acid 등의 수정란에 의한 이용여부 또는 요구량에 의해 수정란의 발육이 저해 또는 촉진될 수 있다고 보고되었는데[16,22] 따라서 배양액의 성분도 수정란의 발육에 영향을 주는 것으로 생각된다.

Whittingham 등[30]은 1.5M DMSO를 동결보호제로 수정란을 동결보존한후 49.0~61.6%의 생존율을 보고하였으며, Kasai 등[8]은 glycerol, DMSO 및 ethylene glycol을 사용할후의 생존율을 각각 88%, 66% 및 83%로 glycerol에서 유의성 있게 높은 생존율을 얻었다고 보고하였다. 본 실험에서 glycerol, DMSO 및 ethylene glycol에서의 생존율에는 유의차가 없었으며, DMSO의 경우 Whittingham 등[30]의 결과보다는 높은 수준이었으나 glycerol과 ethylene glycol의 경우에는 Kasai등[8]의 결과보다는 낮은 수준이었다. Leibo와 Mazur[10]는 마우스 수정란의 동결보존시 DMSO가 glycerol보다 더 좋은 동결보호제라고 보고하였으나 본 실험의 결과와는 일치하지 않았다. Whittingham 등[30]은 동결보호제의 첨가방법(단계적 첨가 또는 1회 첨가)에 따라 생존율의 차이를 보고하였고, Miyamoto와 Ishibashi[12]는 동결보호제에 따라 융해시의 속도에 의해 영향을 받는다고 보고하였다. 따라서 수정란의 동결보존시 생존율에 영향을 주는 것은 매우 다양하다. 본 실험의 결과에서 볼 때 DMSO, glycerol 및 ethylene glycol이 마우스 수정란에 대한 동결보호 효과는 유사한 것으로 사료된다.

결 론

마우스 수정란의 발육단계에 따른 체외배양후의 발육율과 여러가지 동결보호제의 마우스 수정란에 대한 동결보호효과를 비교하기 위하여 4세포기배, 8세포기배 및 상실배 수정란을 체외배양하고 상실배 수정란을 동결, 융해한후 생존율을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 4세포기배, 8세포기배 및 상실배 수정란을 체외배양한후 중기배반포기까지만의 발육율은 각각 22.0%, 2.2% 및 0%로서 4세포기배가 8세포기배나 상실배 수정란에 비래 유의적으로 높은 발육율을 보였고($p<0.01$), 확장배반포로의 발육율은 각각 67.8%, 95.7% 및 100%로서 8세포기배와 상실배 수정란이 4세포기배 수정란에서보다 유의적으로 높은 발육율을 보였다($p<0.001$).

2. Glycerol, DMSO 및 ethylene glycol을 동결보호제로 상실배 수정란을 동결, 융해후 체외배양한 결과 중기배반포까지만의 발육율은 각각 9.3%, 2.3% 및 0%, 확장배반포로의 발육율은 각각 64.8%, 75.0% 및 79.2%로서 각 군간에는 유의적인 차이가 인정되지 않았다.

이상의 결과에서 볼 때 마우스 수정란의 체외배양시 8세포기배나 상실배가 4세포기배에서보다 더 높은 배반포로의 발육율을 얻을 수 있으며 glycerol, DMSO, ethylene glycol의 마우스 수정란에 대한 동결보호 효과에는 큰 차이가 없었다.

Legends for Figures

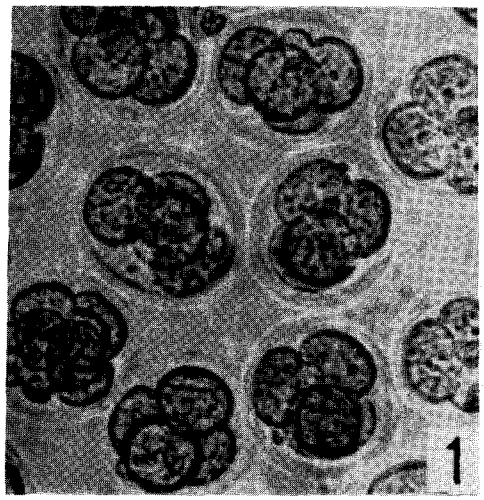
Fig. 1. Four-cell embryos obtained 56 hours after HCG injection. ×200.

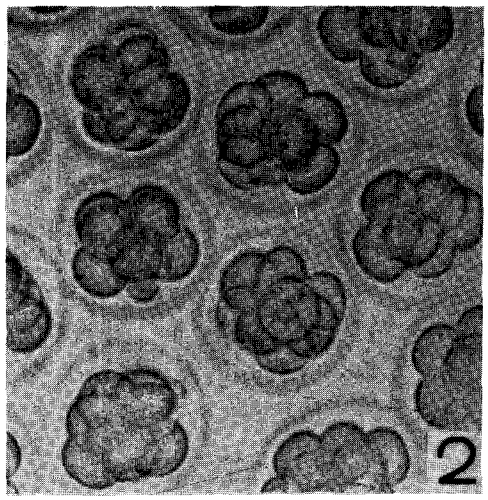
Fig. 2. Eight-cell embryos obtained 66 hours after HCG injection. ×200.

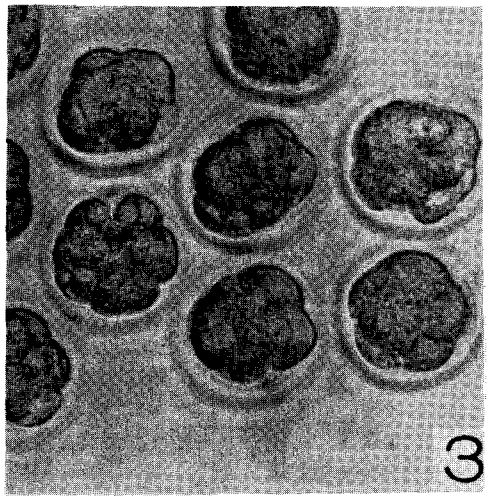
Fig. 3. Morula embryos obtained 74 hours after HCG injection. ×200.

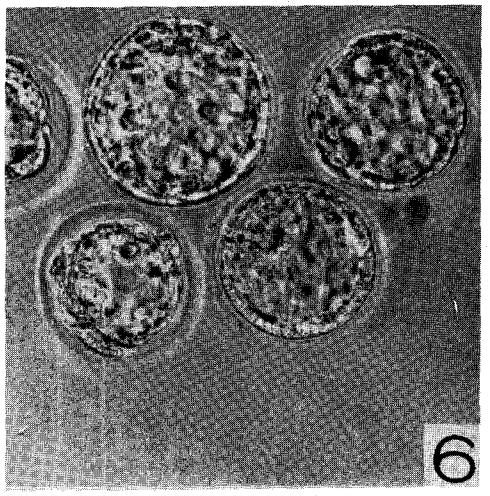
Fig. 6. Blastocysts developed from 4-cell, 8-cell and morula embryos after 72 hours of *In vitro* culture. ×200.

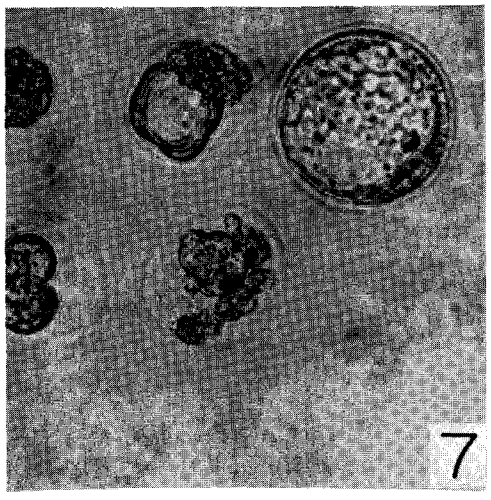
Fig. 7~8. Blastocyst and degenerated embryos after 48 hours of *In vitro* culture of morula embryos frozen-thawed. ×200.

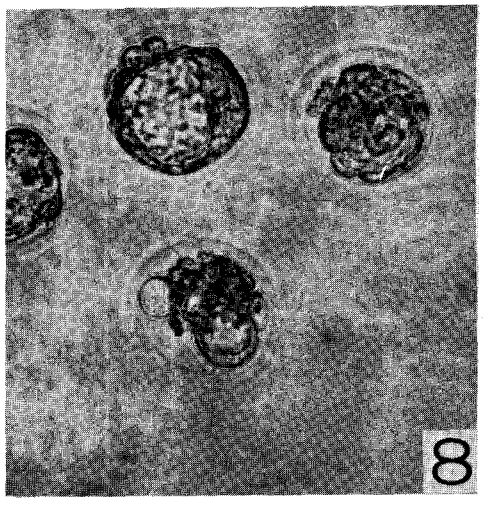

1


2


3


6


7


8

참 고 문 헌

1. Bank, H. and Maurer, R.R. : Survival of frozen rabbit embryos. Exp. Cell Res., (1974) 89 : 188~196.
2. Bilton, R.J. and Moore, N.W. : *In vitro* culture, storage and transfer of goat embryos. Aust. J. Biol. Sci., (1976) 29 : 125~129.
3. Brinster, R.L. : A method for *In vitro* cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. Exp. Cell Res., (1963) 32 : 205~207.
4. Brinster R.L. : Measuring embryonic enzymeactivity. In : Daniel, J.C., Jr. Methods in mammalian embryology. W.H. Freeman and Company, San Francisco, USA, (1971) 215~227.
5. Elsden, R.P., Seidel, G.E., Jr., Takeda, T. and Farrand, G.D. : Field experiments with frozen-thawed bovine embryos transferred nonsurgically. Theriogenology, (1982) 17 : 1~10.
6. Hammond, J., Jr. : Recovery and culture of tubal mouse ova. Nature, (1949) 163 : 28~29.
7. Hetherington, C.M. : Mouse husbandry. In : Monk, M. Mammalian development : apractical approach. IRL Press, Oxford, (1987) pp. 1~12.
8. Kasai, M., Niwa, K. and Iritani, A. : Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. J. Reprod. Fert., (1981) 63 : 175~180.
9. Lehn-Jensen, H. : Cryopreservation of bovine emvryos : an evaluation of factors influencing the survival of day 6 1/2-7 1/2 embryos during freezing and thawing. A/S Carl Fr. Mortensen, Copenhagen, (1986) pp.17~149.
10. Leibo, S.P. and Mazur, P. : Methods for the preservation of mammalian emvryos by freezing. In : Daniel, J.C., Jr. Methods in mammalian reproduction, Academic Press, New York, (1978) pp. 179~201.
11. Mclaren, A. and Biggers, J.D. : Successful development and birth of mice cultivated *In vitro* as early embryos. Nature, (1958) 182 : 877~878.
12. Miyamoto, H. and Ishibashi, T. : Survival of mouse embryos frozen-thawed slowly or rapidly in the presence of various cryoprotectants. J. Exp. Zool., (1983) 226 : 123~127.
13. Nie, N.H., Hull, C.H., Jenkins, J.G., Steinbrenner, K. and Bent, D.H. : Statistical package for the social sciences(SPSS). 2nd ed., McGraw-Hill, new York, (1975) pp. 398~433, 267~275.
14. Quinn, P., Barros, C. and Whittingham, D. G. : Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. J. Reprod. Fert., (1982) 66 : 161~168.
15. Quinn, P. and Wales, R.G. : Growth and metabolism of preimplantation mouse embryos cultured in phosphate-buffered medium. J. Reprod. Fert., (1973) 35 : 289~300.
16. Quinn, P. and Wales, R. G. : Fixation of carbon dioxide by preimplantation mouse embryos *In vitro* and the activities of enzyme involved in the process. Aust. J. Biol. Sci. (1971) 24 : 1277.
17. Renard, J.P. and Babinet, C. : high survival of mouse embryos after rapid freezin and thawing inside plastic straws with 1, 2-propanediol as cryoprotectant. J. Exp. Zool., (1984) 230 : 443~448.
18. Slade, N.P., Takeda, T., Spuires, E.L., Elsder., R.P. and Seidel, G.E., Jr. : A new procedure for the cryopreservation of equine embryos. Theriogenology, (1985) 24 : 45~58.
19. Tadeda, T. and Elsden, R.P. : Comparison of cryoprotectants for freezing mouse embryos. Theriogenology, (1982) 17 : 109.
20. Trounson, A. and Mohr. L. : Human pregnancy foolowing cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. Nature, (1983) 305 : 707~709.
21. Urano, K., Takahashi, Y. and Kanagawa, H. : Effect of various cryoprotectants on the survival of frozen-thawed mouse embryos. Jpn. J. Anim. Reprod., (1986) 32 : 130~133 (In Japanese).
22. Wales, R.G., Quinn, P. and Murdoch, R.N. : The fixation of carbon dioxide by the 8-cell mouse embryos. J. Reprod. Fert., (1969) 20 : 541.
23. Whittingham, D.G. : Sruvival of mouse embryos after freezing and thawing. nature, (1971) 233 : 125~126.
24. Whittingham, D.G. : Survival of rat embryos after freezing and thawing. J. Reprod. Fert., (1975) 43 : 575~578.
25. Whitten, W.K. : Culture of tubal ova. Nature, (1956) 177 : 95.
26. Whitten, W.K. : Culture of tubal ova. Nature, (1957) 179 : 1081~1082.
27. Whitten, W.K. and Biggers, J.D. : Complete developemt *In vitro* of the pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. J. Reprod. Fert., (1968) 17 : 399~401.
28. Whittingham, D.G. : Embryo banks in the future of developmental genetics. Genetics, (1974) 78 : 395~402.
29. Whittingham, D.G., Leibo, S.P. and Mazur, P. : Survival of mouse embryos frozen to -196℃ and -269℃. Science, (1972) 178 : 411~414.
30. Whittingham, D.G., Wood, M., Farrant, J., Lee, H. and Halsey, J.A. : Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196℃. J. Reprod. Fert., (1979) 56 : 11~21.
31. Willadsen, S., Polge, C., Rowson, L.E.A. and Moore, R.M. : Deep freezing of sheep embryos. J. Reprod. Fert., (1976) 46 : 151~154.
32. Wilmut, I. and Rowson, L.E.A. : Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. Vet. Rec., (1973) 92 : 686~690.
33. 왕우석 : 절단마우스 이분배의 동결보존실험. 2. 동결보존 후의 체외발육능 및 수태능에 관하여. 서울대 수의대 논문집, (1986) 11 : 179~185.

Studies on the *In vitro* Culture and Freezing of Mouse Embryos

Bong-Soo Lee* and kyung-Jin Chang**

Department of Veterinary Medicine, Graduate School of Agro-Livestock Development, Kon-kuk University

Abstract

This study was performed to investigate the viability of 4-cell, 8-cell and morula embryos after *In vitro* Culture and to compare the cryoprotective effectiveness of various cryoprotectants such as glycerol, DMSO and ethylene glycol in mouse.

The results were as follows;

1. The survival rate of 4-cell embryos(22.0%) that developed into mid-blastocyst was significantly higher than those of 8-cell(2.2%) and morula embryos(0%) ($p<0.01$) and the survival rates of 8-cell and morula embryos(95.7% and 100%, respectively) that developed into expanded blastocyst were significantly higher than that of 4-cell embryos(67.8%) ($p<0.01$).

2. The post-thawed survival rates of morula embryos that developed into mid-blastocyst and expanded blastocyst after conventional freezing in glycerol, DMSO and ethylene glycol were 9.3%, 2.35% and 0% and 64.8%, 75.0% and 79.2%, respectively. There were no significant differences in the survival rates among the three cryoprotectants.

In reviewing above results, it was considered that higher rates of development into blastocyst could be obtained in 8-cell and morula stage and the cryoprotective effects of glycerol, DMSO and ethylene glycol to mouse embryos were no different.