

돼지 受精卵의 急速凍結 融解法에 관한 研究

Ⅲ. 돼지 凍結受精卵에 대한 1段階 Straw法이 胚의 生存性에 미치는 影響

金相根·金武剛·徐吉雄*

忠南大學校 獸醫科大學

Studies on Rapid Freezing and Thawing of Porcine Embryos Ⅲ. Factors affecting the survival rate of porcine embryos cryopreserved and diluted by one-step straw method

S. K. Kim, M. K. Kim and K. W. Suh*

Coll. of Vet. Med., Chungnam National Univ.

Summary

This study were carried out to investigate the effective concentration of cryoprotective agents and sucrose by one-step straw method, and to determine the optimum thawing temperature and equilibration time of frozen porcine embryos. The porcine embryos following dehydration by cryoprotective agents and a various concentration of sucrose were directly plunged into liquid nitrogen and thawed in 30°C water. Survival rate was defined by FDA test.

The results are summarized as follows :

1. The survival rates of porcine embryos after ultrarapid frozen-thawing in the freezing medium with a various concentration of glycerol, DMSO and propanediol added 0.25M sucrose were higher survival rate than those of sucrose concentration of 0.50M.
2. The survival rates of porcine embryos after ultrarapid frozen-thawing in the freezing medium added 0.25M and 0.50M sucrose were higher survival rate than those of sucrose concentration of 0.75M and 1.00M.
3. The temperature thawed at 20°C and 30°C resulted in a significantly higher embryos survival rate after 72 hrs in culture than did at 35°C.
4. The equilibration time on the survival rate of porcine embryos was attained after short period of time(2.5~5 min.) in the freezing medium higher than long period of time(10~20 min.).

緒 論

受精卵의 凍結은 동결시 세포내의 脫水로부터 冰形成을 감소시킬 수 있는 緩慢凍結法으로 동결 보존하였으나(Leibo와 Mazur, 1972; Wilmut, 1972; Mazur,

1977; Miyamoto등, 1986), 최근에는 동결액을 이용하여 受精卵내에 수분을 탈수시킨 상태에서 急速으로 동결하는 연구가 활발하게 진행되고 있다(Szell과 Shelton, 1986a, b; Nakagata, 1989).

수정란의 동결시 mouse胚를 이용한 sucrose의 적

* 忠南大學校 農科大學(Coll. of Agricul. Chungnam Natl. Univ.)

정농도에 대해서 Mapletoft등(1989a.), Trounson등(1987)은 0.5M, Szell과 Shelton(1987), Wilton등(1989)은 0.25M, Hernandez-Ledezma등(1988a, b)은 0.01M, 0.25M, 0.50M 농도가 높은 농도(1.00M, 2.00M)보다 생존율이 높았다고 하였으며, Mapletoft등(1987)은 1.0M과 1.5M의 성적은 유사하다고 하였으며, Andrede와 Rodrigues(1987)는 1.0M이 0.5M보다 생존율이 높았다고 보고하였다.

耐凍劑의 平衡時間에 있어서는 Trounson등(1987)은 2.0M DMSO와 0.25M sucrose를 사용할 때 2분 이하의 평형시간이, Mapletoft(1989a, b)는 1분간이, Robertson등(1989)은 37℃에서 10초간이, Trounson등(1987)은 3.5M DMSO와 0.5M sucrose를 이용하여 two-step동결시 5분과 10분의 평형시간에는 차이가 없다고 하였으며, Boon등(1988)은 20분에서는 현저하게 저조하였다고 보고하였다.

受精卵의 용해온도별 生存率은 Mapletoft(1989a, b)는 20℃에 1분간의 용해가 가장 우수하며, 30℃가 35℃보다 높았다고 하였으며, Szell과 Shelton(1986a, b)은 20℃가 36℃보다 우수하며, Smorag등(1990)은 토끼 受精卵를 이용하여 20℃가 38℃보다 우수하다고 하였다.

한편, Palasz등(1990)은 22℃에서 1분간이, Takeda(1987)는 공기 또는 溫水槽(35℃)가, Andrede와 Rodrigues(1987)는 실온(23±3℃)이, Bielanski등(1984)은 30℃가 우수하다고 하였으며, Rall등(1986)은 22℃의 공기, 22℃의 ethyleneglycol, 22℃의 silicon oil, 35℃의 溫水槽에 1분간 용해했을 때 큰 차이가 없었다고 보고하였다.

凍結方法에 있어서는 대부분이 mouse 胚를 이용한 緩慢凍結法에 의존하여 凍結 融解하였으나, 최근에 와서는 2단계 또는 1단계의 急速凍結에 관한 연구가 이루어지고 있으나 생존율이 저조한 실정이다.

이에, 본 연구는 돼지 受精卵의 超急速凍結 融解技術을 확립하고자 초급속 동결에 있어서 1단계 straw법에 의한 耐凍劑의 有效濃度, 平衡時間, sucrose의 添加水準 및 融解溫度에 따른 生存率을 조사하였는 바 그 결과는 다음과 같다.

材料 및 方法

1. 材 料

1) 卵胞卵의 回收와 培養

屠殺直後の 雌豚으로부터 卵巢를 적출하여, 100IU/ml의 penicillin G와, 100μg/ml의 streptomycin sulfate를 첨가한 38℃의 생리식염수에 침지하여 실험실로 옮겨 주사기로 卵胞液을 흡입하여 時計皿에 채취한 후 實體顯微鏡(20~40×)하에서 卵胞卵을 회수하였다.

회수한 난포란을 배양액으로 3회 세척후 10%(v/v)의 FCS와 1μg/ml의 FSH(Sigma, USA), 2IU/ml의 HCG, 1μg/ml의 β-estradiol(Sigma, USA), 100IU/ml의 penicillin G 및 100ug/ml의 streptomycin sulfate가 첨가된 TCM-199(Whittaker, M. A., Bioproducts Co., USA) 배양액으로 배양하였다.

2. 方 法

1) 卵胞卵의 體外成熟 및 受精

卵胞卵의 體外成熟은 배양액 50 μl 小滴을 mineral oil(Squibb Co., USA)로 피복하여 배양 2~3시간전에 CO₂ 培養器내(5% CO₂, 95% air, 38.5℃)에서 5~6시간 平衡시킨 후 5개의 난포란을 주입하여 24~32시간 배양하였다.

體外受精은 성숙 난포란을 배양액으로 3회 세척한 후, 45 μl의 배양액 小滴에 5개의 난포란과, 雄豚의 精巢上體를 세절하여 얻은 精子浮遊液 0.01 ml와 BO액 2ml을 시험관에서 잘 혼합하여 배양기에서 1시간 swim up시킨 다음 약 0.5 ml의 상층액을 2,000rpm으로 10분간 원심분리한 후 침전된 精子 pellets을 동량의 heparin 용액(100ug/ml)과 함께 혼합하여 CO₂ 배양기에서 受精能獲得을 유기시킨 精子浮遊液 2 μl 1.5×10⁶/ml을 주입하여 媒精시킨 후 수정으로 판정된 胚를 이용하였다(Shea등, 1976; Ball등, 1983).

2) 超急速凍結, 融解 및 生存性 判定

돼지 受精卵의 超急速凍結은, 각 농도의 glycerol, DMSO 및 propanediol등의 耐凍劑 + 0.25M - 1.00M sucrose + 20% FCS + PBS의 조성으로 제조한 동결액으로 각각 2.5분, 5.0분, 10분, 20분간 平衡시킨 후 1cm 높이의 부표위에 straw를

농아 5분간 豫冷시킨 다음 액체질소에 곧 바로 침지함으로써 超急速凍結을 실시하였다.

凍結後 受精卵의 融解는 straw를 실온에 30초간 방치한 다음 30℃의 온수에서 용해후 거꾸로 흔들어 10분간 방치한 후 신선한 PBS로 3회 세척한 다음, fluorescence diacetate (FDA) 1mg을 acetone 1ml에 용해한 다음 PBS액(600,000 : 1, pH 7.0~7.4)으로 희석한 액에 수정란을 넣고 3~5분간 배양한후, PBS액에 옮겨 位相差顯微鏡하에서(×200) 生死與否를 판정하였다(Schilling등,1982).

結果 및 考察

1. 각 凍結液의 濃도에 따른 超急速凍結 融解後의 生存率

돼지 受精卵의 超急速凍結에 있어서 동결액에 첨가된 sucrose의 농도에 따른 超急速凍結 融解後의 生存率은 Table 1 및 2와 같다.

0.25M sucrose에 glycerol, DMSO 및 propanediol을 각각 1.5M 및 2.0M농도의 첨가에 따른 수정란의 超急速凍結 融解後의 生存率은 각각 45.2%, 59.5%, 42.9%, 57.6%, 27.8% 및 41.5%였으며 0.5M 농도의 첨가에 따른 생존율은 34.3%, 47.4%, 28.1%, 41.7%, 25.7% 및 26.3%로서 0.25M sucrose 첨가가 0.50M 농도보다 높은 생존율을 나타냈다. 한편, 1.5M glycerol + 1.5M DMSO, 2.0M glycerol + 2.0M DMSO, 1.5M DMSO + 1.5M propanediol 2.0M DMSO + 2.0M propanediol, 1.5M propanediol + 1.5M glycerol 및 2.0M propanediol + 2.0M glycerol 등을 동결액과 su-

Table 1. Effect of sucrose concentration in the freezing medium on the survival rate of ultrarapidly frozen porcine embryos

Freezing medium	Sucrose concentration(M)					
	0.25			0.50		
	Frozen	Recovery(%)	Survival(%)	Frozen	Recovery(%)	Survival(%)
1.5M G	42	40(95.2)	19(45.2)	35	32(91.4)	12(34.3)
2.0M G	37	34(91.9)	22(59.5)	38	37(97.4)	18(47.4)
1.5M D	35	32(91.4)	15(42.9)	32	30(93.8)	9(28.1)
2.0M D	33	30(90.9)	19(57.6)	36	33(91.7)	15(41.7)
1.5M P	36	32(88.9)	10(27.8)	35	31(88.6)	9(25.7)
2.0M P	41	38(92.7)	17(41.5)	38	33(86.8)	10(26.3)

G : Glycerol, D : DMSO, P : Propanediol

Table 2. Effect of sucrose concentration in the freezing medium on the survival rate of ultrarapidly frozen porcine embryos

Freezing medium	Sucrose concentration(M)					
	0.25			0.50		
	Frozen	Recovery(%)	Survival(%)	Frozen	Recovery(%)	Survival(%)
1.5M G + 1.5M D	42	40(95.2)	22(52.4)	34	32(94.1)	14(41.2)
2.0M G + 2.0M D	38	37(97.4)	23(60.5)	39	38(97.4)	19(48.7)
1.5M D + 1.5M P	40	39(97.5)	17(42.5)	35	34(97.1)	13(37.1)
2.0M D + 2.0M P	44	43(97.7)	15(34.1)	37	33(89.2)	15(40.7)
1.5M P + 1.5M G	46	44(95.7)	14(30.4)	32	30(93.8)	9(28.1)
2.0M P + 2.0M G	43	41(95.3)	19(44.1)	41	38(92.7)	16(39.0)

crose 0.25M 및 0.50M의 첨가에 따른 생존율은 각각 52.4%와 41.2%, 60.5%와 48.7%, 42.5%와 37.1%, 34.1%와 40.7%, 30.4%와 28.1% 및 44.1%와 39.0%의 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는 對象動物과 凍結方法에 차이가 있으나, mouse胚를 이용한 Szell과 Shelton (1987) Chipin과 Reviers(1986), Williams와 Johnson (1985) 및 Trounson등(1987)이 각각 95%, 79.6%, 84.0% 및 76.0%의 생존율을 나타냈다는 보고와 비교할 때 생존율이 저조하고 또한 상이한 결과였다.

2. 凍結液에 첨가된 sucrose의 濃度에 따른 超急速 凍結 融解後의 生存率

돼지 受精卵의 超急速 凍結에 있어서 각 동결액에 첨가된 sucrose의 농도에 따른 超急速 凍結 融解後의 生存率은 Table 4와 같다.

1.5M, 2.0M glycerol, 1.5M, 2.0M DMSO 및 1.5M, 2.0M propanediol에 0.25M, 0.50M, 0.75M, 1.00M sucrose농도의 첨가에 따른 超急速 凍結 融解 後의 生存率은 각각 35.3~63.3%, 31.0~60.7%, 21.4~44.1% 및 23.1~34.5%로서 0.25M sucrose의 농도에서 비교적 높은 생존율을 나타냈으나 0.75M 및 1.00M sucrose에서는 비교적 낮은 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는, 수정란의 동결시 sucrose의 적정농도를 0.25M이라고 한 Szell과 Shelton(1987) 및 Wilton등(1989)의 보고와 일치하였으나, Mapletoft 등(1989a, b), Trounson등(1987), Hernandez Ledezma등(1988a, b) 및 Andrede와 Rodrigues (1987)등 0.5M~1.5M 농도라고 한 보고와는 상이한 결과였다. 또한, 試驗動物은 다르지만, Williams와 Johnson(1985)의 70~80%와, Chupin과 Re-

Table 3. Effect of sucrose concentration and in the freezing medium on the survival rate of ultrarapidly frozen porcine embryos

Freezing medium	One step sucrose dilution(M)							
	0.25		0.50		0.75		1.00	
	Frozen	Survival(%)	Frozen	Survival(%)	Frozen	Survival(%)	Frozen	Survival(%)
1.5M G	32	17(53.1)	28	12(42.9)	34	14(38.2)	37	10(27.0)
2.0M G	34	18(52.9)	25	17(60.7)	32	13(40.6)	38	11(28.9)
1.5M D	34	15(35.3)	29	9(31.0)	28	6(21.4)	29	10(34.5)
2.0M D	30	19(63.3)	28	16(57.1)	31	13(41.9)	32	8(25.0)
1.5M P	28	13(46.4)	27	10(37.0)	34	15(44.1)	26	6(23.1)
2.0M P	33	16(48.5)	29	11(37.9)	37	13(35.1)	34	10(27.8)

Table 4. Effect of equilibration time in the freezing medium on the survival rate of ultrarapidly frozen porcine embryos

Freezing medium	Equilibration time in the freezing (min,)							
	2.5		5.0		10.0		20.0	
	Frozen	Survival (%)	Frozen	Survival (%)	Frozen	Survival (%)	Frozen	Survival (%)
1.5M G + 0.25M S	38	20(52.6)	34	16(47.1)	33	15(45.5)	27	8(29.6)
2.0M G + 0.50M S	42	26(61.9)	28	17(60.7)	27	15(55.6)	24	10(41.7)
1.5M D + 0.25M S	37	16(43.2)	30	16(53.3)	34	13(38.2)	32	7(21.9)
2.0M D + 0.50M S	40	23(57.5)	25	13(52.0)	30	14(46.7)	29	9(31.0)

viers(1986)의 57.5~96.4%의 생존율과는 큰 차이가 있었다.

4. 耐凍劑의 平衡時間에 따른 超急速凍結融解후의 生存率

돼지 受精卵의 超急速凍結에 있어서 耐凍劑의 平衡時間에 따른 동결 용해후의 生存率은 Table 4에서 보는 바와 같이, 1.5M, 2.0M의 glycerol 및 DMSO + 0.25M, 0.50M의 sucrose 동결액에서의 平衡시간을 2.5분, 5분, 10분, 20분으로 처리했을때 동결 용해후의 生存率은 각각 43.2~61.9%, 47.1~60.7%, 38.2~55.6% 및 21.9~41.7%로서 2.5분 및 5.0분의 平衡시간이 10분 및 20분에서의 平衡시간보다 높은 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는, 시험동물은 다르지만 Trounson등(1987)의 2.0M DMSO + 0.25M sucrose의 동결액에서 2분 이하의 平衡시간이 가장 우수하다고 한 보고와, Boon등(1988)의 3.5M DMSO와 0.5M sucrose를 이용하여 2세포기 受精卵를 two-step동결시 平衡시간이 5분과 10분간에는 차이가 없었으나 20분에서는 현저하게 저조하였다고 한 결과와 거의 일치하였다.

5. 融解溫度에 따른 超急速凍結融解후의 生存率

돼지 受精卵의 동결 용해에 있어서 融解溫度에 따른 生存率은 Table 5에 나타난 바와 같이 1.5M, 2.0M glycerol 및 1.5M, 2.0M DMSO + 0.25M, 0.50M sucrose로 처리한 동결 수정란을 20℃, 30℃ 및 35℃에서 용해했을때 생존율은 각각 38.2~52.7%, 20.7~67.6% 및 26.7~48.6%로서 30℃에서 용해했을때 비교적 높은 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는 Bielanski등(1984)이 30℃에서 용해했을때 높은 생존율을 나타냈다고 한 보고와 일치하였으나, Mapletoft등(1989a)의 20℃에서 1분간, Massip등(1984)은 20℃에서 수초간, Robertson등(1989)은 37℃에서 10초간, Hernandez-Ledezma등(1988c)은 37℃에 30초간, Takeda(1987)는 공기와 35℃ 온수조에서, Andrede와 Rodrigues(1987)은 실온(23℃ + 3℃)에서 높은 생존율을 얻었다는 보고와는 상이한 결과였다.

結 論

본 研究는 돼지 受精卵의 超急速凍結技術을 확립하고자 초급속 동결에 있어서 耐凍劑 및 sucrose의 濃度, 融解溫度 및 耐凍劑의 平衡時間에 따른 동결 용해후의 生存率을 조사하였는 바 그 결과는 다음과 같다.

1. 돼지 受精卵의 超急速凍結에 있어서 각 농도의 내동제와 0.25M 및 0.50M 농도의 sucrose의 첨가에 따른 生存率은 0.25M이 0.50M에 비해 유의하게 높았다.
2. 돼지 受精卵의 超急速凍結에 있어서 내동제에 첨가된 sucrose의 효과는 0.25M 및 0.50M 이 0.75M 및 1.00M에 비해 生存率이 유의하게 높았다.
3. 돼지 受精卵의 超急速凍結에 있어서 融解溫度별 처리효과는 20℃ 및 30℃가 35℃보다 生存率이 높게 나타났다.
4. 돼지 受精卵의 超急速凍結에 있어서 동결액에서의 平衡時間에 따른 生存率은 2.5분 및 5분의 平衡시간이 10분, 20분보다 높게 나타났다.

Table 5. Effects of thawing temperature on in-vitro development of frozen-thawed porcine embryos

Freezing medium	Thawing temperature(℃)					
	20		30		35	
	Frozen	Survival(%)	Frozen	Survival(%)	Frozen	Survival(%)
1.5M G + 0.25M S	37	16(43.2)	34	23(67.6)	26	11(42.3)
2.0M G + 0.50M S	39	20(51.3)	27	13(48.1)	35	17(48.6)
1.5M D + 0.25M S	36	19(52.7)	33	12(36.4)	28	12(42.9)
2.0M D + 0.50M S	34	13(38.2)	29	6(20.7)	30	8(26.7)

参考文献

- Andrede TP and Rodrigues JL. 1987. Rapid freezing of mouse embryos; In glycerol -sucrose medium. *Theriogenology* 31:225.
- Ball GD, Leibfried ML, Lenz RW, Ax RL, Bavister BD and First NL. 1983. Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *Biol. Reprod.* 28:717-725.
- Bielanski A, Johnson W, Schneider U and Mapletoft RJ. 1984. Plunge temperature and embryo survival. *Theriogenology* 21:221.
- Boon WR, Brown CA, Vasquez JM and Shapiro SS. 1988. Freezing of mammalian embryo without the aid of a programable freezer. *Fertil. Steril.* 50:348-354.
- Chupin D and De Reviere MM. 1986. Quick freezing of rat embryos. *Theriogenology* 26:157-166.
- Hernandez-Ledzma JJ, Gaskins CT and Wright RW. 1988a. Freezing of mouse embryos with cryoprotectant mixture(CPM) of glycerol and 1, 2-propanediol. *Theriogenology* 29:285.
- Hernandez-Ledzma JJ, Selgrath JP and Wright RW. 1988b. One step sucrose dilution of a cryoprotectant mixture(CPM) of glycerol and 1, 2-propanediol. *Theriogenology* 29:259.
- Hernandez-Ledzma JJ, Selgrath JP and Wright RW. 1988c. Effect of one-step sucrose dilution of glycerol on *in-vitro* development of frozen-thawed mouse embryos. *Theriogenology* 30:529-535.
- Leibo SP and Mazur P. 1972. Preservation of mammalian embryos by freezing. In: Daniel, JO, Jr. (ed). *Methods in mammalian reproduction*. Academic Press, New York, 179-197.
- Mapletoft RJ, Moker JS and Hagele WC. 1987. Comparison of two methods of removing glycerol from frozen-thawed mouse embryos with sucrose. *Theriogenology* 27:255.
- Mapletoft RJ, Moker J and Palasz A. 1989a. Effect of thawing temperature and time to sucrose dilution on survival of mouse embryos in culture. *Theriogenology* 31:225.
- Mapletoft RJ, Moker J and Palasz A. 1989b. The effect of sucrose concentration, temperature and time on survival of fresh mouse embryos in culture. *Theriogenology* 31:225.
- Massip A, Van der Zwalmen P, Puissant F, Camus M and Leroy P. 1984. Effects of *in-vitro* fertilization, culture, freezing and transfer on the ability of mouse embryos to implant and survive. *J. Reprod. Fert.* 71:199-204.
- Mazur P. 1977. Slow freezing injury in mammalian cells in the freezing of mammalian embryos. *Ciba Foun. Symp. Elsevier North-Holland, Amsterdam*, 52:19-45.
- Miyamoto H, Miyamoto Y and Ishibashi T. 1986. The importance of equilibration time to glycerol prior to freezing in the cryopreservation of mouse embryos. *Japan. J. Zootech.* 57:250-256.
- Nakagata N. 1989. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J. Reprod. Fert.* 87:479-483.
- Palasz A, Del Campo MR and Mapletoft RJ. 1990. The effect of methods of thawing and glycerol removal on survival of frozen mouse and bovine embryos. *Theriogenology* 33:294.
- Rall WF, Meyer TK and Leibo SP. 1986. Effect of warming conditions on the survival of mouse embryos cryopreserved and diluted a one-step straw procedure. *Theriogenology*

- 25:186.
- Robertson JL, Minhas BS, Randall GW, Dodson MG, Palmer TV and Ricker DD. 1989. Ultrarapid freezing of mouse embryos with DMSO and trehalose. *Theriogenology* 31:250.
- Schilling E, Niemann H and Smidt D. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. *Cryobiology* 15:245-248.
- Shea BF, Latour JPA, Berdin KN and Baker RD. 1976. Maturation *in vitro* and the subsequent fertilizability of extra follicular bovine oocytes. *J. Anim. Sci.* 43:809-815.
- Smorag Z, Heyman Y, Garnier V and Shapiro SS, 1990. Freezing of mammalian embryos without the aid of a programable freezer. *Fertil. Steril.* 50:348-354.
- Szell A and Shelton JN. 1987. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solution on day-3 mouse embryos. *J. Reprod. Fert.* 78:699-703.
- 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.* 80:401-408.
- Takeda T, Elsdon RP and Seider GE, Jr. 1987. Cryopreservation of mouse embryos by direct plunge into liquid nitrogen. *Theriogenology* 12:66(Abstract).
- Trounson A, Peura A and Kirby C. 1987. Ultrarapid freezing : a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil. Steril.* 48:843-850.
- Williams TG. and Johnson SE. 1985. Quick freezing of day four mouse embryos. *Theriogenology* 23:235(Abstract).
- Wilmut U. 1972. The effect of cooling rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sci.* 11:1071-1079.
- Wilton LT, Shaw JM and Trounson AO. 1989. Successful single-cell biopsy and cryopreservation of preimplantation mouse embryos. *Fertil. Steril.* 51:513-517.