

Ethylene Glycol을 이용한 유리화 동결시 배 발달단계별 생쥐배의 생존성

정기화* · 공일근 · 박준규 · 광대오** · 박충생
경상대학교 농과대학 축산학과

Post-thaw Survival of Mouse Embryos of Various Developmental Stages Cryopreserved by Vitrification in Ethylene Glycol-Based Solution

K.H. Chung*, I.K. Kong, J.K. Park, D.O. Kwack**, C.S. Park
Departments of Animal Science, Gyeongsang National University

SUMMARY

The post-thaw survival of mouse embryos of the various developmental stages was determined after cryopreservation by vitrification in a solution containing ethylene glycol, Ficoll and sucrose(EFS). All the embryos were equilibrated for 2 minutes just prior to freezing. The number of blastomeres during *in vitro* development was counted by nuclei higher rates of post-thaw survival were obtained from the embryos of 2-cell(92.2%), 8-cell(77.2%) or morula stage(90.0%) than those of blastocyst stage(62.7%). The number of blastomeres per embryo following *in vitro* culture for 24 hours was significantly($P < 0.05$) smaller as 66.0 ± 22.3 in vitrified and thawed morulae than fresh morulae(91.7 ± 12.2).

서론

Whittingham 등(1972)과 Wilmut(1972)에 의하여 생쥐배의 동결보존이 최초로 보고된 이래 포유동물 배의 동결보존 기법은 괄목할 발전을 이룩하고 있으며(Wood 등, 1987), 최근의 기술 개선은 주로 동결과정의 단순화에 치중하고 있다고 하겠다(Wood와 Farrant, 1980; Kasai 등, 1980; Miyamoto와 Ishibashi, 1986; Szell과 Schelton, 1986; Trounson 등, 1987).

Rall과 Fahy(1985)에 의하여 개발된 vitrification 방법은 결빙의 형성없이 액체질소에서 동결

될 수 있도록 고농도로써 점조도가 높은 vitrification 용액을 개발하여 높은 생존율을 보고하였다. 그러나 이들이 최초로 개발한 유리화 동결보존액인 VS-1은 독성이 강하여 4℃에서 평형을 시켜야만 하는 점과 단계적으로 평형을 유도해야만 하는 단점이 있다.

그러나 vitrification 방법은 다른 기존의 동결방법보다는 동결에 요하는 시간이 짧으며, 세포에 가장 치명적인 상해를 입히는 세포내 외의 결빙형성을 적도록 하는 방법으로서 유리한 점이 많다. 방법적인 간편함 외에도 동결 용해 후의 배의 생존율도 아주 높다. 본 연구실에서도 VS-3 보존액에 의한 생쥐배의 유리화 동결보존에서 상당히 높은 용해후

* 국립종축원(National Animal Breeding Institute)

** 경상대학교사범대학 과학교육과*(Department of Science Education, Gyeongsang National University)

생존율을 얻은 바 있다(이 등, 1992).

본 연구에서는 Kasai 등(1990)에 의하여 개발된 ethylene glycol, Ficoll 및 sucrose(EFS) 용액을 이용한 유리화 동결시의 생쥐배의 생존성과 기법의 간관성을 검토하고자 배발달 단계별 동결 용해후 생존율을 비교 조사하고, 아울러 동결 용해과정에서 할구의 손상 여부를 확인하기 위하여 Hoechst 33342로 핵염색을 실시하여 할구수를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 배의 채취

본 실험에 공시된 실험동물은 ICR계통의 생쥐로서 공란생쥐는 4~6 주령, 교미용 수컷은 10~12 주령의 생쥐를 공시하였다. 과배란의 유기는 Kong 등(1991)의 방법에 준하여 실시하였으며, hCG 투여 후 45, 64, 86 및 92 시간경에 각각 2 및 8 세포기, 상실기 및 배반포기배를 채취하였다. 채취한 배는 “기본액”(D-PBS+10 FCS)으로 3~4회 세척하여 정상형태의 배 만을 선별하여 사용하였다.

2. 배양액

생쥐배의 관류 및 세척에는 기본액을 사용하였고, 배양액은 Brinster's mouse ovum culture medium-3(BMOC-3, Brinster, 1971)를 사용하였다. 배양액의 pH는 7.4로 조정하였으며, 사용직전에 0.2 μ m의 Milipore filter(Gelman Science Co., U.S.A.)로 여과시킴으로써 제공하였다. 배양액의 사용은 light weight paraffin oil(Junsei Chem. Co., Japan)을 도포한 Brinster(1963)의 미소적 배양법에 따라 실시하였으며, 체외배양 조건은 37 $^{\circ}$ C의 5% CO₂, 95% O₂ 및 포화습도 상태인 CO₂ 배양기(Leec, U.K.) 내에서 실험전 2 시간동안 전배양

시킨 후 사용하였다.

3. 유리화 동결 보존액의 제조

Kasai 등(1990)의 방법에 준하여 상기한 기본액에 40%(v/v) ethylene glycol, 18%(w/v) Ficoll 70(average Mw 70,000; Sigma Chem. Co., U.S.A.) 및 0.3 M sucrose가 최종 농도로 되도록 혼합 제조하였다. 동결 용해후 동결보존 제제의 제거를 위하여 사용한 희석액은 기본액에 0.5 M 수준의 sucrose를 첨가하여 이용하였다. 이들 보존액과 희석액은 다같이 0.2 μ m Milipore filter로 여과한 후 사용하였다.

4. Vitrification 방법

동결방법: 동결을 실시할 2 및 8 세포기, 상실기 및 배반포기배를 1 ml의 EFS 용액에서 2 회 세척하여 Fig. 1과 같이 준비된 straw의 EFS column에 주입하여 평형을 유도한 후 액체질소에 담그도록 하였다. 평형유도시 온도는 20~23 $^{\circ}$ C로 유지하였고 평형시간은 2, 5 및 10분으로서 EFS 용액에서 세척하는 시간부터 액체질소에 담그는 시간까지를 평형시간으로 통산하였다.

용해방법: straw를 액체질소에서 꺼낸 즉시 20 $^{\circ}$ C의 물에 침지시켜서 약 10 초간 흔들면서 용해하였다. 용해한 straw는 ethylene glycol의 독성을 방지하기 위하여 재빨리 희석용액(0.5 M sucrose)으로 5 분간 정체시킨 후 기본액으로 3~4 회 세척한 다음 5 분간 정체하여 배양하였다.

5. 배의 생존성 판정

동결 용해후 2 및 8 세포기, 상실배 및 배반포기배를 100 μ M의 ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA: Sigma Chem. Co., U.S.A.)가 첨가

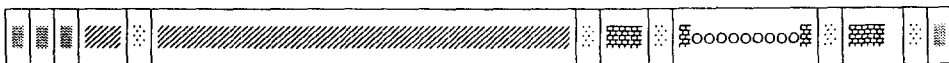


Fig. 1. Diagrammatic representation of 0.25 ml plastic straw loaded with EFS solution and embryos for vitrification.

(\cdot) Air bubbles, (||||) Cotton plug and straw powder, (///) 0.5 M sucrose, (|||||) EFS solution and embryos.

된 NaHCO_3 -BMOC-3 배양액으로 옮겨 각각 72, 48, 24 및 12 시간 동안 배양을 실시하여 Fig. 2와 같이 확장 배반포기까지 발육한 것을 정상 배반포(normal blastocyst)로, 포배강은 형성되었지만 배의 반 이상이 퇴화된 것은 거짓 배반포(false blastocyst)로, 나머지는 완전퇴화(degenerated)된 것으로 판정하였다.

6. 배의 핵염색 및 할구수의 조사

신선한 상실기배와 동결융해한 상실기배를 24 시간 배양한 후 배반포기배까지 발육한 배는 염색하여 할구의 손상 여부를 조사하였다. 배의 염색은 Pursel 등(1985)의 방법에 준하여 형광염색액인 Hoechst 33342(Sigma Chem. Co., U.S.A.)로 염색하여 200~400배의 형광현미경(Nikon, Japan) 하에서 핵 수를 조사하였다.

7. 통계학적 분석

동결 융해후의 배의 생존율과 염색후의 할구수는 Microsta computer statistical program package를 사용하여 χ^2 -test와 t-test를 실시하여 각 처리간의 유의차를 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 배의 발달단계별 동결 융해 후의 생존성

EFS 용액을 이용한 vitrification 방법에서 생쥐

배의 발달단계에 따른 동결·융해후 생존율을 알아보고자 2 및 8 세포기, 상실배 및 배반포기배를 2분간의 평형시간으로 동결을 실시하였다. Table 1에서와 같이 2 및 8 세포기, 상실기 및 배반포기배에서 동결·융해후 각각 생존율은 92.2, 77.2, 90.0 및 62.7%로서 2 및 8 세포기, 상실기배가 배반포기배보다 유의적으로 높은 생존율을 나타내었다.

상실기배와 8 세포기배의 생존율은 Kasai 등(1990)의 98%보다는 저조하나, VS-3를 이용한 Valdez 등(1990)의 80%보다는 높은 성적이며, 이 등(1992)의 89.4%와는 비슷한 성적이었으며, 2 세포기배는 92.2%로서 초기배에서도 EFS 용액을 이용한 동결이 상당히 좋은 결과를 보였으므로 이용 가능성을 확인하게 되었다. 그러나, 배반포기배에서는 62.7%로서 이 등(1992)의 74.6%보다는 다소 저조한 성적이었다. 이러한 결과는 40%의 ethylene glycol은 약 7.2M의 농도가 되므로 배반포기배가 다른 발달단계의 배보다 세포내피, 영양막층 및 포배강 등이 복잡하여 세포형태, 대사활동 및 동결보호제의 투과성 등의 차이에 따라 생존율의 저하가 일어난다고 한 van der Zwalmen 등(1988) 및 Valdez 등(1990)의 생쥐배의 동결실험 보고와 일치한다. 체외수정에 의하여 생산된 소의 배반포기배의 동결 융해 후의 생존성은 74~77%의 생존율을 Tachikawa 등(1993)이 보고와 비교하여 볼 때 동결 융해후의 생존성에는 종간의 특이성을 나타내고 있음을 알 수 있었다.



Fig. 2. Appearance of mouse blastocysts cultured for 24 hours after freezing and thawing (200X). a) Normal blastocyst, b) False blastocyst, c) Degenerated.

Table 1. Effect of cell stage on post-thaw survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification in EFS solution following equilibration for 2 minutes

Cell stage	No. of embryos frozen	No. and (%) of embryos developed to		
		Normal blastocyst*	False blastocyst	Degenerated
2-cell	51	47(92.2) ^a	3	2
8-cell	79	61(77.2) ^a	4	14
Morula	50	43(90.0) ^a	3	4
Blastocyst	51	32(62.7) ^b	11	8

*Values with different superscripts denote significant ($P < 0.05$) difference.

2. 동결 융해가 배의 발달에 미치는 영향

동결 융해과정에서 할구의 손상 여부 및 동결 융해가 융해 후 배의 발달에 미치는 영향을 규명하기 위하여 상실기배를 동결 융해후 24 시간 배양하여 배반포기까지 발육한 것과 대조구로서 상실기배에서 채란하여 24 시간 배양하여 배반포기까지 발육한 것들을 Pursel 등(1985)의 방법에 준하여 형광

염색액인 Hoechst 33342로 염색하여 핵수는 200~400 배의 형광현미경하에서 비교 조사한 결과는 Table 2 및 Fig. 3에서와 같다.

대조구로 28 개의 배를 염색하여 핵수를 조사한 결과 평균 핵수는 91.7 ± 12.2 개였으나, 동결 융해한 배의 핵수는 평균 66.0 ± 22.3 개로서 25.7개의 핵수가 적게 나타나 동결 융해한 배의 할구수가 유의적($P < 0.05$)으로 감소된 것을 알 수 있는데, 이러한

Table 2. Effect of embryo cryopreservation on the number of blastomeres of mouse blastocyst following *in vitro* culture for 24 hours

Types of embryo	No. of embryos examined	No. of blastomeres*
Fresh	41	91.7 ± 12.2^a
Frozen	40	66.0 ± 22.3^b

* Mean S. E. * Values with different superscripts denote significant ($P < 0.05$) difference.

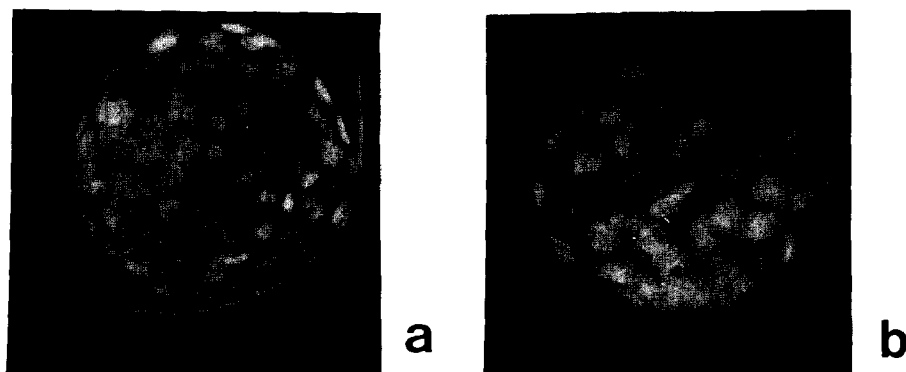


Fig. 3. Fresh(a) and frozen-thawed(b) mouse embryos stained with Hoechst 33342 and counterstain of trypan blue(400X).

결과는 동결 용해 과정에서의 할구의 손상 및 동결 용해가 배의 발달과정을 지연시켰을 것으로 사료되며, Tekeli 등(1987)도 동결에 의한 할구의 손상 때문에 생존할구수가 감소한다고 하였다.

적 요

EFS 용액을 이용한 vitrification 방법에서 생쥐 배의 발달단계에 따른 동결·용해후의 생존율을 조사하고, 동결 용해과정에서의 할구의 손상 여부를 알아보기 위하여 핵염색을 실시하여 핵의 수를 조사하였다.

평형시간을 2 분으로 고정하여 배의 발달단계에 따른 동결 용해후의 생존율을 조사한 결과 2 및 8 세포기, 상실기 및 배반포기배에서 각각 92.2, 77.2, 90.0 및 62.7%의 생존율을 나타내어 2, 8세포기 및 상실기배 간에는 처리간에 차이가 없었으나 배반포기배는 유의적($P < 0.05$)으로 생존율이 낮았다. 동결 용해과정에서 할구의 손상 여부를 확인하기 위하여 핵염색을 실시한 결과 신선배 및 동결 용해배에서 핵수가 각각 91.7 ± 12.2 개 및 66.0 ± 22.3 개로 나타나 동결 용해과정에서 할구의 일부가 손상됨을 확인할 수 있었다.

이상의 결과에서 동결보존에 가장 적당한 배 발달단계는 배반포기보다 초기배인 2 및 8 세포기와 상실배기가 적당한 것으로 사료되며 동결 용해시 배의 일부 할구가 손상됨을 알 수 있었다.

참고문헌

- Brinster RL. 1963. A method for *in vitro* cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. *Exp. Cell Res.* 32:205~208.
- Brinster RL. 1971. Measuring embryonic enzyme activity. In: *Methods in mammalian embryology*. Ed. Daniel, J. C. Jr. W. H. Freeman and Company. San Francisco. U. S. A. pp. 215~227
- Kasai M, Hamaguchi Y, Zhu SE, Miyake T, Sakurai T and Machida T. 1992. High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Biol. Reprod.* 46:1042~1046.
- Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T and Machida 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.
- Kasai M, Niwa K and Iritani A. 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J. Reprod. Fert.* 59:51~56.
- Kong IK, Lee EB, Kang DJ and Park CS. 1991. Effects of equilibration time, precooling and straw loading method on survival of mouse embryos frozen by vitrification. *Korean J. Anim. Reprod.* 15:49~57.
- Miyamoto H and Ishibashi T. 1986. Liquid nitrogen vapour freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.* 78:471~478.
- Pursel VG, Wall RJ, Rexroad Jr., CE, Hammer RE and Brinster, RL. 1985. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenology* 24:687~691.
- Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 313:573~575.
- Szell A and Shelton JN. 1986. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. *J. Reprod. Fert.* 76:401~408.
- Tachikawa S, Otoi T, Kondo S, Machida T and Kasai M. 1993. Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by *in vitro* maturation and fertilization. *Mol. Reprod. and Develop.* 34:266-271.
- Tekeli T, Kweon OK and Wroblewska J. 1987. Development of blastomeres of mouse eggs

- isolated at the 4- and 8-cell stage. *J. Embryol. Morph.* 18:155~180.
- Trounson A, Peura A and Kirby C. 1987. Ultrarapid freezing: a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fert. Steril.* 48:843~850.
- Valdez CA, Abas Mazni O, Takahashi Y, Hishinuma M and Kanagawa H. 1990. Effects of equilibration time, precooling and developmental stage on the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology* 33:627~636.
- van der Zwalmen P, Gaurois B, Ecotors FJ, Touati K, Massip A and Ectors F. 1988. Some factors affecting successful vitrification of mouse blastocysts. *Theriogenology* 30:1177~1183.
- Whittingham DG, Leibo SP and Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . *Science* 178:411~414.
- Wood MJ and Farrant J. 1980. Preservation of mouse embryos by two-step freezing. *Cryobiology* 17:178 180.
- Wood MJ, Whittingham DG and Rall WF. 1987. The low temperature preservation of mouse oocytes and embryos. In *Mammalian Development-A Practical Approach*. M. Monk. IRL Press, Oxford, U.K. pp. 255~280.
- 이은봉, 공일근, 강대진, 박충생. 1992. Vitrification 방법에 의한 생쥐의 정상배 및 분할배의 생존성에 관한 연구. *한축지*. 34:69~75.