

생쥐 4세포기 및 상실배기 수정란의 초급속동결에 있어서 동결보호제의 종류와 농도가 생존성에 미치는 영향

임준호* · 신상태* · 강만중 · 한용만 · 이경광
한국생명공학연구소 동식물세포공학연구부

Effects of Various Kinds and Concentrations of Cryoprotectants on Viabilities of Ultrarapidly Frozen 4-cell Mouse Embryos and Morulae

J. H. Lim*, S. T. Shin*, M. J. Kang, Y. M. Han and K. K. Lee

*Plant and Animal Cell Technology Research Division
Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology*

SUMMARY

This study was carried out to select the best cryoprotectant and to establish optimal concentration of the cryoprotectant in ultrarapid freezing of mouse 4-cell embryos and morulae, respectively. We investigated survival of ultrarapid frozen embryos according to various cryoprotectants such as glycerol, ethylene glycol, propylene glycol and dimethyl sulfoxide (DMSO). Survival of the embryos frozen at different concentrations (3.0, 4.0 and 5.0 M) of individual cryoprotectant was also tested. Preimplantation developmental rate (96.3%, 83/86) of 4-cell mouse embryos treated with 4.0 M ethylene glycol after ultrarapid freezing and thawing was higher than those of other cryoprotectants (glycerol, propylene glycol and DMSO). In the ultrarapid freezing of mouse morulae, the highest developmental rate (98.8%, 89/90) of the embryos to blastocysts was shown in the group of 5.0 M glycerol. Thus, these results demonstrate that 4.0 M ethylene glycol and 5.0 M glycerol are optimal for ultrarapid freezing of 4-cell mouse embryos and morulae, respectively.

서론

포유동물 수정란의 동결보존은 Whittingham 등 (1972)에 의해 최초로 성공된 이래, 1970년대에는 동결시 일어나는 자유수의 탈수로 인해 빙정형성을 감소시키는 이론에 기초를 둔 완만동결방법이 주로 사용되었다. 그 후 1980년대에는 보다 간편한 동결

법인 two-step동결법이 Bouyssou와 Chupin (1984), Renard (1984)등에 의해 개발되었다. 또한 세포내외를 각각 보호하는 두가지 동결보호제를 이용하여 동결전 수정란내의 수분을 탈수시켜 동결 및 융해시 급격한 삼투압 변화로 인한 세포의 손상을 방지하는 급속동결 또는 초급속동결법에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다 (Trounson 등, 1987 ; Miyamoto와 Ishibashi, 1986 ; Szell과 Shelton,

* 충남대학교 수의과대학 (College of Veterinary Medicine, Chungnam National University)

† 본 연구는 국가선도기술개발사업(HS100M)의 일환으로 수행되었음.

1986 : Williams와 Johnson, 1986 : Kasai 등, 1980). 그리고 고농도의 각종 동결보호제를 혼합하여 세포 내외의 빙정 형성을 방지함으로써 동결시 수정란의 손상을 줄이는 vitrification법이 Rall과 Fahy 등 (1985)에 의해 보고되었다. 그러나 vitrification법은 고농도의 동결보호제를 사용하기 때문에 낮은 온도에서 (0~5℃) 수정란을 평형시켜야 하는 단점이 있다 (Trounson 등, 1988). 최근에는 vitrification방법의 문제점을 보완하는 초급속동결에 대한 연구들이 보고되고 있다 (Ishimori 등, 1992 ; Kasai 등, 1990 ; Rall 등, 1987). 한편 수정란의 미세조작 기술이 개발됨에 따라 수정란의 성감법, 핵치환, 외래유전자 주입 등의 연구도 활발히 진행되고 있다. 초기 포유동물 수정란의 미세조작은 각각의 발달 단계에서 수행될 수 있으므로 미세조작된 수정란의 이용성을 높이기 위해서는 이들 수정란의 동결보존이 매우 유용할 것이다. 따라서 본 연구에서는 미세조작된 수정란의 초급속동결을 위한 기초실험으로서, 4세포기 및 상실배기 생쥐 수정란에 대하여 각각 가장 좋은 동결보호제의 종류를 선별하고 최적의 농도조건을 확립하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물 및 과배란 유도

공시동물은 생명공학연구소 실험동물실에서 분양 받은 4~6주령의 교잡종 마우스(F_1 : C57BL/6 × DBA)로서, 배합사료와 물은 자유급식시켰으며 일조시간은 14시간으로 조절하였다. 과배란유기를 위하여 PMSG (pregnant mare's serum gonadotropin, 제국장기, Japan)와 hCG (human chorionic gonadotropin, Sigma, USA)를 48시간 간격으로 각각 5 IU씩 복강내에 주사하였다. hCG 주사 후 동일 계통의 웅성 마우스와 1:1로 합사시켜 자연교미를 유도하였으며, 다음날 아침 질전이 확인된 개체만을 실험에 사용하였다.

2. 수정란의 준비

실험에 사용한 4세포기 및 상실배기 수정란은 hCG 주사 후 각각 약 54시간과 74시간째에 경추탈

구법으로 도살한 공란마우스의 난관 및 자궁을 실험체현미경 (Nikon, Japan)하에서 30 gauge 주사바늘을 이용하여 HEPES-buffered M2 배양액 (Quinn et al., 1982)으로 관류시켜 회수하였다. 회수된 수정란들을 100배의 도립현미경 (Nikon, Japan)하에서 관찰하면서 형태적으로 정상적인 것만을 선별하여 동결실험에 사용하였다.

3. 수정란의 동결 및 융해

4세포기 및 상실배기 수정란의 동결에 있어서 동결보호제의 적정농도를 결정하기 위하여 다음과 같이 동결액을 제조하였다. 6 mg/ml의 BSA (bovine serum albumin, Sigma, USA)를 함유하고 있는 PBS (modified Dulbecco's phosphate buffered saline)용액에 glycerol, ethylene glycol, propylene glycol 및 DMSO (dimethyl sulfoxide)의 최종농도를 각각 3.0, 4.0 및 5.0 M이 되도록 조절하였으며, 모든 동결액의 sucrose농도는 최종적으로 0.25 M이 되도록 제조하였다. 회수한 4세포기 및 상실배기 수정란을 PBS (50 μ l)로 3회 세척하고 동결액 (25 μ l)에서 3분간 평형시킨 후 즉시 0.25 ml straw에 넣은 다음, 액체질소 (-196℃)에 직접 침지하는 초급속동결법으로 동결하였다. 수정란의 융해는 동결된 straw를 실온에서 40초간 방치한 후 37℃ 온수에서 30초 동안 흔들면서 실시하였다. 융해된 수정란의 동결보호제를 제거하기 위하여 0.5 ml의 희석액 (0.25 M sucrose + 3 mg/ml PBS)에 수정란들을 10분간 정지시키고 신선한 PBS로 3회 세척하였으며, 형태적으로 정상적인 수정란만을 선별하여 M16 배양액 (Whittingham, 1971)에서 체외 배양하면서 발달상태를 관찰하였다.

4. 수정란의 체외배양 및 생존성 판정

본 실험에 사용된 배양액은 4 mg/ml BSA와 100 mM의 EDTA (ethylene diaminetetraacetic acid, Sigma, USA)가 함유된 bicarbonate-buffered M16 배양액으로서 pH는 7.2 ~ 7.4, 삼투압은 280 ~ 290 mOsm로 조정하였다. 체외배양을 위하여 조직배양용 petri dish (Falcon, USA)에 약 50 μ l의 배양액 소적을 만들어서 mineral oil (Sigma, USA)로 피복한 후 37℃, 5% CO₂ 배양기내에서 최

소한 2시간 이상 평형을 실시한 다음 실험에 사용하였다. 본 실험에서 수정란의 생존성은 동결, 융해후 배반포기까지 발달한 것만을 생존한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

각각 3.0, 4.0 및 5.0 M 농도의 glycerol, ethylene glycol, propylene glycol 및 DMSO를 동결보호제로 사용하여 초급속 동결 융해후 4세포기 생쥐 수정란의 체외발달율은 Table 1에서 보는 바와 같다. 전반적으로 모든 처리군에서 융해후 동결수정란의 회수율은 95% 이상으로서 높은 편이었다. Glycerol 및 propylene glycol의 모든 처리군에서는 초급속 동결융해후 수정란이 전혀 발달하지 않았으나 (0%), 각 농도의 ethylene glycol 처리군에서는 높은 체외발달율을 나타내었다. DMSO 처리군에서는 농도가 증가할수록 발달율이 저조한 경향

이 관찰되었으며 (3.0 M, 84.5%; 4.0 M, 18.5%; 5.0 M, 0%), 3.0 M에서 가장 높은 생존율을 나타내었다. Trounson 등 (1987)도 sucrose 농도를 0.25 M로 고정하고 다양한 DMSO 농도에서 2세포기 생쥐 수정란을 초급속 동결하였던 바, 이들 동결수정란의 배반포기까지 체외발달율은 3.0 M DMSO 농도에서 가장 높았다고 보고하였다. 한편 높은 DMSO 농도 (4.0 및 5.0 M), glycerol 및 propylene glycol 처리군에서 동결된 수정란들의 체외발달율은 매우 낮거나 전혀 발달하지 않았다 (Table 1). 즉, 4세포기 생쥐수정란의 초급속 동결보존에 있어서 고농도의 DMSO, glycerol 및 propylene glycol이 동결보호제로서 적합하지 않은 것으로 나타났다. 반면에 ethylene glycol 처리군에서는 각 농도에서 모두 높은 생존율을 나타냈으며 (3.0 M, 91.3%; 4.0 M, 96.5%; 5.0 M, 73.3%) 이 중 4.0 M에서 가장 높은 발달율을 보여주었다. 이러한 결과는 생쥐 4세포기 수정란의 초급속 동결에 있어서 4.

Table 1. Effects of various kinds and concentrations of cryoprotectants on viability of ultrarapidly frozen mouse 4-cell embryos

Cryoprotectant conc (M)	No. of embryos			No. of embryos developed to normal blastocysts (%) ³
	Frozen	Recovered (%) ¹	Normal (%) ²	
Glycerol				
3.0	86	84(97.6)	0(0)	0(0)
4.0	86	86(100)	0(0)	0(0)
5.0	83	82(98.7)	0(0)	0(0)
Ethylene glycol				
3.0	95	95(100)	46(48.4)	42(91.3)
4.0	98	95(100)	86(90.5)	83(96.5)
5.0	95	94(98.9)	60(63.8)	44(73.3)
Propylene glycol				
3.0	62	60(96.7)	0(0)	0(0)
4.0	62	61(98.3)	0(0)	0(0)
5.0	62	60(98.9)	0(0)	0(0)
DMSO				
3.0	95	95(100)	71(74.7)	60(84.5)
4.0	90	90(100)	54(60.0)	10(18.5)
5.0	89	87(97.7)	41(47.1)	0(0)

¹ No of embryos recovered / No. of embryos frozen × 100

² No. of normal embryos post-thawing / No. of embryos recovered × 100

³ No. of normal blastocysts / No. of normal embryos post-thawing × 100

0 M의 ethylene glycol이 동결보호제로 가장 적합하다는 것을 시사하는 것이다.

또한 초급속 동결 용해된 상실배기 생쥐 수정란의 생존율이 다양한 동결보호제 및 농도조건하에서 검토되었다 (Table 2). Glycerol 처리군에서의 초급속 동결 용해후 생존율은 5.0 M 에서 가장 높았으며 (98.8%), 4.0 M (74%), 3.0 M (58.4%)순이었다. 한편, ethylene glycol 처리군에서의 동결 용해후 수정란의 발달율은 3.0 M에서 52.5%, 4.0 M에서 23.6%, 5.0 M에서 0%로서 3.0 M 농도군의 발달율이 다른 농도군에 비해 높았으나 glycerol 처리군 보다는 낮은 발달율을 보여주었다. 그리고 propylene glycol과 DMSO 처리군에서 초급속 동결 용해후 대부분의 수정란들은 이미 세포질 파괴가 일어난 상태이며 일부 생존한 수정란들에서도 계속적인 발달 능력을 전혀 관찰할 수 없었다. 이러한 결과는 상실배기 생쥐 수정란에 초급속 동결에 있어서 propylene glycol 및 DMSO가 직접적으로

수정란에 손상을 입히는 것으로 생각되며, 따라서 이들은 동결보호제로서 적합하지 않음을 알 수 있었다. Williams와 Johnson (1986)은 2.0 M의 glycerol과 0.25 M의 sucrose를 혼합한 동결액이 용하여 상실배기 수정란을 동결 용해하였을 때 생존율이 가장 높았다고 보고하였고 (67%), Miyamoto와 Ishibashi (1986)는 sucrose 농도를 0.5 M로 고정하고 glycerol를 0.5 M에서 4.0 M까지 각각의 농도별로 하여 상실배기 수정란을 급속동결하였던 바, 2.0 M glycerol 처리군에서 가장 높은 체외 발달율을 보여주었다. 또한 Szell과 Shelton (1987)도 0.5 M sucrose와 다양한 농도의 glycerol이 첨가된 동결액으로 급속동결을 실시한 결과, 3.0 M glycerol처리군에서의 생존율이 4.0 M의 처리군보다 높았다고 보고하였다. 그러나 본 실험에서는 상실배기 수정란의 초급속동결보존에 있어서 glycerol이 다른 동결보호제보다 양호한 결과를 보여주었으며, 5.0 M glycerol 처리군에서 가장 높은 생존율

Table 2. Effects of various kinds and concentrations of cryoprotectants on survival of ultrarapidly frozen mouse

Cryoprotectant conc (M)	No. of embryos			No. of embryos developed to normal blastocysts (%) ³
	Frozen	Recovered (%) ¹	Normal (%) ²	
Glycerol				
3.0	94	90(96.7)	65(72.2)	38(58.4)
4.0	93	92(98.9)	81(88.0)	60(74.0)
5.0	94	92(97.8)	90(97.8)	89(98.8)
Ethylene glycol				
3.0	95	95(100)	40(42.1)	21(52.5)
4.0	98	95(96.9)	76(80.0)	18(23.6)
5.0	95	94(98.9)	12(12.7)	0(0)
Propylene glycol				
3.0	92	92(100)	0(0)	0(0)
4.0	95	93(97.8)	0(0)	0(0)
5.0	92	92(100)	0(0)	0(0)
DMSO				
3.0	94	94(100)	6(6.3)	0(0)
4.0	94	93(98.9)	4(4.3)	0(0)
5.0	94	94(100)	0(0)	0(0)

¹ No of embryos recovered / No. of embryos frozen × 100

² No. of normal embryos post-thawing / No. of embryos recovered × 100

³ No. of normal blastocysts / No. of normal embryos post-thawing × 100

을 나타내었다. 강 등 (1992)도 biopsy된 생쥐 상실배기 수정란에서 5.0 M glycerol을 이용하여 초급속 동결을 실시한 결과 95%이상의 수정란이 배반포기까지 발달하였다고 보고하였다. 이렇게 상실배기 생쥐수정란의 동결에 있어서 최적의 glycerol 농도가 다른 연구자들과 다른 이유 중의 하나는 다른 연구자들은 급속동결을 실시하였고, 본 실험에서는 초급속동결법을 수행하였기 때문에 차이가 있는 것으로 생각된다.

본 실험의 결과들을 종합하여 볼 때, 생쥐 4세포기 및 상실배기 수정란의 초급속 동결에 있어서 동결보호제로 각각 4.0 M ethylene glycol 및 5.0 M glycerol을 사용하는 것이 가장 좋다고 생각된다.

적 요

본 연구는 4세포기 및 상실배기 생쥐 수정란의 초급속 동결에 있어서 최적의 동결보호제 및 농도조건을 확립하기 위하여 수행하였다. 먼저 glycerol, ethylene glycol, propylene glycol 및 DMSO 등 각각의 동결보호제에 있어서 3.0, 4.0, 5.0 M의 각각 농도에 따른 초급속 동결된 생쥐 수정란의 생존성을 조사하였다. 4세포기 생쥐 수정란의 초급속 동결에 있어서 동결보호제로 4.0 M ethylene glycol이 처리된 실험군에서 가장 높은 생존율을 보여주었다 (96.3%). 그리고 동결된 상실배기 수정란의 배반포기까지 생존율은 5.0 M glycerol 처리군이 98.8%로서 가장 높게 나타내었다. 결론적으로, 4세포기 및 상실배기 생쥐 수정란에 있어서 동결보호제는 각각 4.0 M ethylene glycol 및 5.0 M glycerol이 가장 적합한 것으로 증명되었다.

참고문헌

Bouyssou B and Chupin D. 1982. Two-step freezing of cattle blastocysts with dimethylsulfoxide (DMSO) or glycerol. *Theriogenology*, 17:159-166.

Ishimori H, Takahashi Y and Kanagawa H. 1992. Viability of vitrified mouse embryos using various cryoprotectant mixtures. *Ther-*

iogenology, 37:481-487.

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. 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J. Reprod. Fert.*, 59:51-56.

Miyamoto H and Ishibashi Y. 1986. Liquid nitrogen vapour freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 78:471-478.

Quinn P, Barros C and Whittingham DG. 1982. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 66:161-168.

Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 313:573-575.

Rall WF, Wood MJ, Kirby C and Whittingham DG. 1987. Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *J. Reprod. Fert.*, 80:499-504.

Renard JP, Bui-Xuan-Nguyen and Garnier V. 1984. Two-step freezing of two-cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. *J. Reprod. Fert.*, 71:573-580.

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.

Szell A and Shelton JN. 1987. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solution on Day-3 mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 80:1309-316.

Trounson A, Peura A, Freemann L and Kirby C. 1988. Ultrarapid freezing of early cleavage stage human embryos and eight-cell mouse embryos. *Fertil. Steril.*, 49:822-826.

Trounson A, Peura A and Kirby C. 1987. Ultrar-

- apid freezing : a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil. Steril.*, 48:843-850.
- 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 freezing to -196°C and -296°C . *Science*, 178:411-414.
- Williams TJ and Johnson SE. 1986. A method for one-step freezing of mouse embryos. *Theriogenology*, 26 : 125-133.
- Wilton LJ, Shaw JM and Trounson AO. 1989. Successful single-cell biopsy and cryopreservation of preimplantation mouse embryos. *Fertil. Steril.*, 51:513-517
- 강만중, 이철상, 한용만, 유대열, 이경광. 1992. 할구한개가 제거된 생쥐 4세포기 수정란의 초급속동결. *한국수정란이식연구회지*, 7:81-88.