

소 동결분할배의 생존성에 영향을 미치는 요인에 관한 연구[†]

김상근 · 남윤이 · 이만휘* · 현병화**

충남대학교 수의과대학

Studies on the Factors Influencing Survival Rates of Frozen Bovine Demi-Embryos

Kim, S. K., Y. Y. Nam, M. H. Lee* and B. H. Hyun**

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University

SUMMARY

This study was carried out to investigate the effects of concentration and kinds of cryoprotectants, equilibration time, thawing temperature and time, sucrose concentration on the survival rates of frozen bovine demi-embryos. The bovine demi-embryos following dehydration by cryoprotectants a various concentration of sucrose were freezed by cell freezer and thawed in 30°C water bath. Survival and *in vitro* developmental rates was defined as development rates on *in vitro* culture or FDA-test.

The results are summarized as follows :

1. The high survival rates of demi-embryos after frozen-thawing in freezing medium was attained 2.0M glycerol. The high survival rates of demi-embryos after frozen-thawing in freezing medium was obtained using single cryoprotectant(25.0~30.0%) than mixed cryoprotectants(16.7~19.0%).
2. The survival rates of demi-embryos after frozen-thawing in freezing medium added 1.5M, 2.0M glycerol+0.25M sucrose(37.5~33.3%) were higher survival rates than those of sucrose concentration of 0.50, 0.75M(12.5~26.7%).
3. The equilibration time on the survival rates of demi-embryos was attained after short period of time(30.0~35.0%) in the freezing medium higher than long period of time(21.1%).
4. The thawing temperature on the survival rates of demi-embryos was attained at 30°C of thawing temperature(26.7~40.0%) higher than 25°C or 37°C of thawing temperature (13.3~20.0%).
5. The thawing time on the survival rates of demi-embryos was attained at 1~5 minutes of thawing time(26.7~33.3%) in the freezing medium higher than 10 minutes of thawing time (13.3~18.8%).

(Key words : Freezing of bovine demi-embryos, Concentration of cryoprotectants, Equilibration, Thawing temperature and time, Survival rates)

[†] 이 연구는 과학재단 핵심연구비(961-0607-169-2) 지원에 의하여 수행되었음.

* 웨이즈만 연구소(Weizmann Institute of Science, Israel)

** 한국과학기술원부설 생명공학연구소(Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology)

I. 서 론

초기배의 미세조작에 의한 분할배의 작출과 관련한 연구는 초기배를 분할하여 일란성 쌍자의 생산 또는 분할배의 한쪽은 동결 보존하면서 다른 쪽은 염색체 검사, 유전자 조작 및 이식 등에 제공하기 위한 분할배의 동결 이용이 보고되었다(Nagashima와 Ogawa, 1981; Lehn-Jenson과 Willadsen, 1983; Heyman, 1989; 김 등, 1996).

수정란의 분할방법은 holding pipette의 음압으로 수정란을 고정하고 glass needle(Bredbacka 등, 1992; Seike 등, 1989; Lambath 등, 1983) 또는 surgical blade(McEvoy와 Sreenan, 1990; Baker, 1985; Ozil, 1993; Ozil 등, 1982; Williams 등, 1982) 등을 이용하여 수정란을 분할하며, 분할배 작출 성공율은 80% 이상으로 보고되고 있다. 수정란을 분리한 분할배의 작출은 생쥐 2 세포기 배를 이용하여 성공한 Nicholas와 Hall(1942)에 이어, Tarkowski(1959)는 mouse의 2 세포기 배를 분리한 후 하나를 이식하여 산자를 얻는데 성공하였다. 분할배의 동결보존에 관한 연구는 생쥐에서 Nagashima와 Ogawa(1981) 및 Ogawa와 Fujikura(1983) 등이 각각 28.5%, 32.7%의 생존율을 얻었다고 보고하였다. Suzuki와 Shimohira(1986)는 소 수정란의 동결 용해시 sucrose를 첨가하여 분할하면 우수한 성적을 얻었다고 보고하였다. 분할배의 동결에는 내동제의 농도와 종류, 평형시간, 식빙방법, 동결속도, 용해온도와 용해시간 등 분할배의 생존성에 영향을 미치는 요인이 많아서 보고자들 간에 결과에 큰 차이가 있을 뿐만 아니라 생존율이 높은 동결 기술체계가 확립되지 않은 실정이다. 분할배의 동결은 생존성이 극히 낮아 실용화에 많은 어려움이 있어 이의 개선과 동결보존 기술의 확립이 시급한 과제라고 생각된다.

이에, 본 연구는 소 분할배의 급속동결시 내동제의 종류 및 농도, sucrose의 첨가농도, 평형시간, 예비동결시간 및 용해온도 등이 생존율 및 체외발생율에 미치는 영향을 구명하고자 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 수정란의 준비

도살우의 난소를 적출하여, 100 IU/ml의 penicillin G와, 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate를 첨가한 38 $^{\circ}$ C의 생리식염수에 침지하여 실험실로 옮겨 난포액을 흡입하여 petri dish에 채취한 후 실체현미경(20~40 \times) 하에서 난포란을 회수하여 10%(v/v)의 FCS(Sigma, USA)와 1 μ g/ml의 FSH(Sigma, USA), 2 IU/ml의 HCG(Sigma, USA), 1 μ g/ml의 β -estradiol(Sigma, USA), 100 IU/ml의 penicillin G 및 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate가 첨가된 TCM-199(Bioproducts Co. USA) 배양액으로 배양하였다.

체외수정은 배양액 50 μ l 소적내에 5개의 난포란을 주입후 mineral oil(Squibb Co., USA)로 피복하여 CO₂ 배양기내(5% CO₂, 95% air, 38.5 $^{\circ}$ C)에서 24시간 성숙배양 후 45 μ l의 배양액 소적에 5개의 난포란을 주입한 후, BO액 1 ml에 용해시킨 정액 0.2 ml를 혼합하여 CO₂ 배양기에서 swim-up 처리 후, 상층액을 수정용 배양액으로 500 rpm, 10분간 2회 원심분리하여 세척하고 정자괴를 동량의 100 μ g/ml의 heparin(Sigma, USA)과 희석하여 15분간 CO₂ 배양기에서 수정능획득을 유기시킨 정자부유액 2 μ l(1.5 \times 10⁶/ml)로 매정하였다.

2. 수정란의 분할

초기배의 분할은 video system micromanipulator(Narishige Co., Japan)가 부착되어 있는 도립현미경 stage위 petri dish내에 배양액 drop중에 배를 넣어 보정용 pipette으로 배를 흡인 고정한 후 반대측에서 투명대로부터 배세포피가 나오지 않을 정도로 15 $^{\circ}$ 각도의 microblade(Feather Co., Japan)로 눌러 배를 분할하여 투명대를 연화시켜 제거한 후 micropipette으로 분할하고 공투명대에 주입후 배양하였다.

3. 분할배의 동결

분할배의 동결은 자동 세포동결기(Planer Products, England)의 sensor에 내동제와 평형시킨 후 straw를 끼워 동결하면서 autorecorder로 확인하였으며, 내동제+0.25M sucrose+10% FCS+PBS의 조성으로 제조한 동결액으로 실온에서 -7 $^{\circ}$ C까지는

Table 1. Effects of various cryoprotectants in freezing medium on survival rates of frozen demi-embryos

Freezing medium	No. of demi-embryos frozen	No.(%) of embryos developed	
		Normal	Abnormal or degeneration
1.0M G	20	5(25.0)	15(75.0)
2.0M G	20	6(30.0)	14(70.0)
1.0M D+1.0M G	18	3(16.7)	15(83.3)
2.0M D+2.0M G	21	4(19.0)	17(81.0)

Table 2. Effects of various sucrose concentration in freezing medium on survival rates of frozen demi-embryos

Freezing medium	Sucrose concentration(M)					
	0.25		0.50		0.75	
	Frozen	Survival(%)	Frozen	Survival(%)	Frozen	Survival(%)
1.0M G	18	5(27.8)	15	4(26.7)	15	3(20.0)
1.5M G	15	5(33.3)	16	3(18.8)	16	2(12.5)
2.0M G	16	6(37.5)	15	3(20.0)	15	2(13.3)

-1℃/min., -7℃에서 -35℃까지는 -0.2℃/min., -35℃에서 -38℃까지는 -0.3℃/min.으로 동결후 LN₂ container에 침지하였다.

4. 생존성 및 체외발생율

Straw를 38℃의 온수에서 1분간 용해후 내동제를 제거하기 위하여 거꾸로 흔들어 10분간 방치한 후 PBS로 3회 세척한 다음 배양액에서 배양을 통해 배의 분할 및 발생상태를 관찰하거나, FDA-test에 의해 생존성을 판정하였다(Schilling, 1982).

III. 결과 및 고찰

1. 동결 분할배의 생존율에 미치는 영향

1) 내동제의 종류와 농도

소 분할배의 동결에 있어서 내동제의 종류와 농도별로 동결 용해하였을 때 생존율은 Table 1과 같다. 1.0M, 2.0M glycerol을 첨가한 내동액에서 동결 용해 후의 생존율은 25.0%, 30.0%였다. 또한, 분할배의 동결시 2종 이상의 복합내동제를 처리하였을 때 생존율은 16.7~19.0%로서 단일내동제 처리시의 25.0~30.04%에 비해 낮은 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는 생쥐 분할배의 동결 용해시 생존율은 28.5%라고 한 Nagashima와 Ogawa (1981) 및 32.7%라고 한 Ogawa와 Fujikura(1983) 등의 보고와 비교할 때 유사한 결과였다.

2) Sucrose의 첨가

소 분할배의 동결에 있어서 각 내동제에 여러 농도의 sucrose를 첨가한 내동액으로 동결하였을 때 생존율은 Table 2와 같다. 분할배의 동결에 있어서 1.0M, 1.5M, 2.0M glycerol에 0.25M, 0.50M, 0.75M sucrose를 첨가하여 동결 용해하였을 때 생존율은 각각 27.8~33.3%, 18.8~26.7%, 12.5~20.0%로서 0.25M sucrose 첨가가 0.50~0.75M 첨가군에 비해 높은 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는, 미분할란의 동결시 동결액에 첨가하는 sucrose의 적정 농도는 0.25M 농도라고 한 Szell과 Shelton(1987) 및 Wilton등(1989)의 보고와는 일치하였으나, 동결액에 sucrose를 1.0M과 1.5M 농도로 첨가하였을 때 생존율은 유사하다고 보고한 Mapletoft등(1987)과 sucrose 1.0M 농도가 0.5M보다 생존율이 높았다고 보고한 Andrede와 Rodrigues(1987)의 결과와는 상이한 성적이었다.

Table 3. Effects of equilibration time in the freezing medium(1.5M G + 0.25M S) on the survival rates of frozen demi-embryos

Equilibration time(min)	No. of demi-embryos frozen	No. (%) of embryos developed	
		Normal	Abnormal or degeneration
2.5	20	7(35.0)	13(65.0)
5.0	20	6(30.0)	14(70.0)
10.0	19	4(21.1)	14(73.7)

Table 4. Effects of thawing temperature in the freezing medium on the survival rates of frozen demi-embryos

Freezing medium (G+S)	Thawing temperature(℃)					
	25		30		37	
	Frozen	Survival(%)	Frozen	Survival(%)	Frozen	Survival(%)
1.0M G	15	3(20.0)	15	4(26.7)	16	3(18.8)
1.5M G	16	3(18.8)	15	6(40.0)	15	3(20.0)
2.0M G	15	3(20.0)	16	5(31.3)	15	2(13.3)

Table 5. Effects of thawing temperature on the survival rates of frozen bovine demi-embryos

Freezing medium (G+S)	Thawing time(min.)					
	1		5		10	
	Frozen	Survival(%)	Frozen	Survival(%)	Frozen	Survival(%)
1.0M	15	4(26.7)	15	3(20.0)	16	3(18.8)
1.5M	16	5(31.3)	15	4(26.7)	14	2(14.3)
2.0M	15	5(33.3)	14	3(21.4)	15	2(13.3)

3) 내동제의 평형시간에 따른 생존율

소 분할배의 동결시 각 내동제의 평형시간에 따른 동결 용해후의 생존율은 Table 3과 같다. 분할배의 동결에 있어서 1.5M glycerol + 0.25M sucrose가 첨가된 내동액으로 2.5, 5, 10분간 평형시킨 후 동결 용해하였을 때 생존율은 35.0~21.1%로서 2.5분의 평형시간이 가장 높게 나타났으며 대체로 짧은 평형시간(2.5~5분)이 긴 평형시간(10분)보다 높은 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는 생쥐 미분할란의 동결시 내동제의 적정 평형시간에 대해 Trounson 등(1987)은 2분 이하가, Mapletoft(1989)은 1분이라고 한 보고와 일치하였으나, 20분의 평형시간에서 현저하게 저조하였다는 Boon 등(1988)의 결과와는 약간의 차이가 있었다.

4) 용해온도에 따른 생존율

소 동결분할배의 용해온도에 따른 생존율은 Table 4에서 보는 바와 같이, 1.0, 1.5, 2.0M glycerol이 첨가된 내동액으로 25, 30 및 37℃로 용해하였을 때 생존율은 각각 18.8~20.0, 26.7~40.0, 13.3~20.0%로서 30℃에서 용해시 비교적 높은 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는 생쥐 미분할란의 동결에 있어서 적정 용해온도는 30℃라고 한 Mapletoft 등(1989), Mas-sip과 van der Zwahlen(1984), Bielanski 등(1984)의 결과와는 일치하였으나 37℃에서 30초간이 적정용해온도라고 한 Robertson 등(1989)의 결과와는 차이가 있었다.

5) 용해시간

소 동결분할배의 용해온도에 따른 생존율은 Table 5에서 보는 바와 같이, 1.0, 1.5, 2.0M glycerol +

0.25M sucrose가 첨가된 내동액으로 동결한 분할배를 30℃에서 1, 5, 10분간 용해하였을 때 생존율은 각각 26.7~33.3, 20.0~26.7, 13.3~18.8%로서 1분 또는 5분간의 용해가 10분간 용해시 보다 높은 생존율을 나타냈다.

이러한 결과는 생쥐 미분할란의 동결시 적정 용해온도는 30℃에서 수초 또는 1분간이라고 한 Mapletoft 등(1989)의 결과와는 일치하였으나 37℃에서 30초간이 적정하다고 한 Robertson 등(1989)과, 실온(23±3℃)에서 높은 생존율을 나타냈다고 한 Andrede와 Rodrigues(1987) 등의 결과와는 차이가 있었다.

IV. 적 요

본 연구는 소 분할배의 동결시 내동액의 종류와 농도, sucrose의 농도, 평형시간, 용해온도 및 시간 등이 생존율에 미치는 영향을 구명하고자 수행하였다.

1. 분할배의 동결시 내동액의 적정농도는 2.0M glycerol로 처리하였을 때 가장 높은 생존율을 나타냈다. 분할배의 단일내동제에 의한 동결 용해 후의 생존율은 25.0~30.0%로서 복합내동제에 처리시의 16.7~19.0%에 비해 높게 나타났다.
2. 분할배의 동결시 1.0, 1.5, 2.0M glycerol에 0.25M sucrose를 첨가하여 동결하였을 때 생존율은 27.8~33.3%로서, 0.50, 0.75M sucrose 첨가시의 12.5~26.7%보다 높게 나타났다.
3. 분할배의 동결시 1.5M glycerol + 0.25M sucrose가 첨가된 내동액으로 2.5, 5, 10분간 평형시킨 후 동결 용해하였을 때 생존율은 35.0~21.1%로서 2.5분의 평형시간이 가장 높게 나타났으며 대체로 짧은 평형시간(2.5~5분)이 긴 평형시간(10분)보다 높은 생존율을 나타냈다.
4. 동결분할배의 용해시 30℃에서 용해하였을 때 생존율은 26.7~40.0%로서 25℃ 및 37℃의 용해온도에 비해 높은 생존율을 나타냈다.
5. 동결분할배의 용해시 30℃에서 1, 5분간 용해하였을 때 생존율은 각각 26.7~33.3, 20.0~26.7%로서 10분간 용해시의 생존율 13.3~18.8%보다 높게 나타났다.

V. 인용문헌

1. Andrede, T. P. and J. L. Rodrigues. 1987. Rapid freezing of mouse embryos: In glycerol-sucrose medium. *Theriogenology*, 27:206 (Abstract).
2. Baker, R. D. 1985. Commercial splitting of bovine embryos. *Theriogenology*, 13(1):3-12.
3. Bielanski, A. 1987. Survival *in vitro* of zona pellucida-free mouse embryos after cooling conventional two step or vitrification methods. *Cryo-Letters*, 8:294-301.
4. Boon, W. R., C. A. Brown, J. M. Vasquez and S.S. Shapiro. 1988. Freezing of mammalian embryos without the aid of a programmable freezer. *Fertil. Seril.*, 50:348-354.
5. Bredbacka, P., M. Huhtinen, J. Aalto and V. Rainio. 1992. Viability of bovine demi- and quarter-embryos after transfer. *Theriogenology*, 38(1):107-113.
6. Heyman, Y. 1989. Factors affecting the survival of whole and half embryos transferred in cattle. *Theriogenology*, 23:63-75.
7. Lambeth, V. A., C. R. Looney, S. A. Voelkel, D. A. Jackson, K. G. Hill and R. A. Godke. 1983. Microsurgery on bovine embryos at the morula stage to produce monozygotic twin calves. *Theriogenology*, 20(1):85-95.
8. Len-Jensen, H. and S.M. Willadsen. 1983. Deep-freezing of cow 'Half and Quarter' embryos. *Theriogenology*, 19:49-54.
9. McEvoy, T. G. and J. M. Sreenan. 1990. Effect of embryo quality and stage of development on the survival of zona pellucida. *Proc. 11th Int. Cong. Anim. Reprod. & A.I.*, 1:175.
10. Mapletoft, R. J., J. S. Moker and A. Palasz. 1989. Effect of thawing temperature and time to sucrose dilution on survival of mouse embryos in culture. *Theriogenology*, 31:225 (Abstract).
11. Massip, A., P. van der Zwakmen. 1984. Di-

- rect transfer of frozen cow embryos in glycerol sucrose. *Vet. Record*, 115:3227-328.
12. Nagashima, H. and S. Ogawa. 1981. Studies on the developmental potential and survival after the deep freezing of microsurgically dichotomized morulae embryos in rats and rabbits. *Jap. J. Anim. Reprod.*, 27:12-19.
 13. Nicholas, J. S. and B. V. Hall. 1942. Experiments on developing rats. II. The development of isolated blastomeres and fused eggs. *J. Exp. Zool.*, 90:441-459.
 14. Ogawa, S. and H. Fujikura. 1983. Cryoviability of the half-embryos isolated by microsurgery from early developmental stage embryos in mice and rabbits. *Instit. of Sci. and Tech. Meiji Univ.*, 62:25-34.
 15. Ozil, J. P. 1993. Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. *J. Reprod. Fert.*, 69(2):463-468.
 16. Ozil, J. P., Y. Heyman and J. P. Renard. 1982. Production of monozygotic by micromanipulation and cervical transfer in the cow. *Vet. Rec.*, 110:126-127.
 17. Robetson, J. L., B. S. Minhas, G. W. Randal, M. G. Dodson, T. V. Palmer and D. D. Ricker. 1989. Ultrarapid freezing of mouse embryos with DMSO and trehalose. *Theriogenology*, 31:250(abstract).
 18. Schilling, E., H. Niemann and D. Smidt. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. *Cryobiology*, 15:245-248.
 19. Seike, N., M. Teranishi, S. Yamada, R. Takakura, Y. Nagao and H. Kanakawa. 1989. Increase in calf production by the transfer of bisected bovine embryos. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 51(6):1193-1199.
 20. Suzuki, T. and H. Shimohira. 1986. Viability of frozen-thawed bovine embryos bisected in sucrose. A preliminary report. *Theriogenology*, 26:336-339.
 21. Szell, A. and J. N. Shelton. 1987. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol sucrose solution on day-3 mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 78:699-703.
 22. Tarkowski, A. K. 1959. Experiments on the development of isolated blastomeres of isolated blastomeres of mouse egg. *Nature*, 184:1286-1287.
 23. Trounson, A., A. Peura and C. Kirby. 1987. Ultrarapid freezing ; A new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil. Steril.*, 48:843-850.
 24. Williams, T. J., R. P. Elsdon and G. E. Jr. Seidel. 1982. Identical twin bovine pregnancies derived from bisected embryos. *Theriogenology*, 17(1):114.
 25. Wilton, L. T., J. M. Shaw and A. O. Trounson. 1989. Successful single-cell biopsy and cryopreservation of preimplantation mouse embryos. *Fert. Steril.*, 51:513-517.
 26. 김상근, 이종진, 이명현. 1996. 소 초기배의 분할 후 생존율과 체외발생율에 관한 연구. *한국가축번식학회지*, 19(4):265-270.
(접수일자 : 1997. 8. 25. / 채택일자 : 1997. 9. 26.)