

생쥐胚의凍結保存

尹文錫·鄭吉生
建國大學校畜産大學

The Freezing of Mouse Embryos

Moon Seok Yoon and Kil Saeng Chung

College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

SUMMARY

These experiments were carried out to examine the effect of rapid thawing (500°C/min) on the survival of 8-cell mouse embryos cooled slowly (0.5-1°C/min) to precooling temperatures between -10 and -70°C before direct transfer of embryos to -196°C, and to compare the survival of embryos thawed slowly (20°C/min) and rapidly (500°C/min) after in vitro culture. In addition, the sensitivity of 8-cell mouse embryos to the rate of addition and removal of cryoprotectant at room temperature, and the effect of developing stages on the survival of embryos frozen-thawed slowly were investigated.

The results obtained were summarized as follows:

1. Embryos were survived in rapid thawing (500°C/min) only when slow cooling was terminated at relatively high subzero temperature (-20 to -60°C). The highest survival rate(77.0%) in in vitro culture of embryos thawed rapidly was obtained after transfer to -196°C from -40°C.
2. For the survival of embryos in slow thawing (20°C/min.), slow cooling to lower subzero temperature (-50°C and below) was required before transfer of embryos to -196°C. These results indicate that embryos transferred to -196°C from high subzero temperature contain much intercellular ice to damage them during slow warming but to permit survival of embryos after rapid warming.
3. The Survival rate (72.7%) of 8-cell mouse embryos after rapid addition and removal of cryoprotectant, DMSO at room temperature was similar to that (83.9%) after slow addition and removal of cryoprotectant at same temperature.
4. The survival rates of 1-, 2-, 4- and 8-cell embryos frozen-thawed slowly were 26.7, 76.4, 70.0 and 83.9%, respectively.

I. 結 論

受精卵移植 技術은 家畜의 改良과 増殖을 위한 有効한 手段이긴 하지만 卵子의 供給畜과 收容畜의 發情을 同期化시키지 않으면 안된다. 그러나 受精卵을 採取한 狀態로 凍結하여 長期間 保存하게 되면 發精同期化 過程은 省略할 수 있다.

受精卵의 凍結保存에 있어서 가장 중요한 要因으로 作用하는 것은 受精卵을 凍結, 融解하는 速度이다(Bank等, 1974; Whittingham 等, 1979). 생쥐胚

의 경우 비교적 완만한 凍結速度(0.2~0.8°C/min)와 融解速度(4~25°C/min)에서 높은 生存率을 얻을 수 있다(Whittingham 等, 1972; Wilmut, 1972). -196°C에 保存한 8-細胞期 생쥐胚의 경우 높은 生存率을 얻기 위해서는 凍結時에는 -4~-60°C에서 緩慢凍結(0.2~0.8°C/min)을, 融解時에는 -70~-20°C에서 緩慢融解(4~25°C/min)를 實施하여야 한다(Leibo 等, 1974). 그러나 緬羊과 소의 受精卵은 -30~-40°C까지 分當 0.3°C의 速度로 凍結한 後, 액체질소로 옮겨 保存하였다가 每分 360°C의 急速融解를 實施하였을 때 生存할 수 있으며(Willadsen,

1977 : Willadsen 等, 1978 : Polge 等, 1978), 8 - 細胞期 생쥐胚에서도 $-35 \sim -40^{\circ}\text{C}$ 까지 分當 0.3°C 의 速度로 凍結한 後 액체질소로 옮겨 保存하였다가 分當 500°C 의 速度로 急速融解하였을 때 높은 生存率을 얻을 수 있다(Whittingham 等, 1979)

本 試驗은 家畜受精卵의 凍結保存에 필요한 基礎知識을 습득할 目的으로 생쥐胚를 利用하여 緩慢融解와 急速融解 後의 生存性, 室温에서의 凍害防止劑의 添加 및 除去方法에 따른 凍結-融解 後의 生存性 등을 조사하고, 發達段階別로 凍結保存한 受精卵의 耐凍性을 검토하기 위하여 實施하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試動物 및 多排卵의 誘起

4 ~ 10週齡, 體重 16 ~ 25g인 inbred ICR 系統의 생쥐를 供試하였으며, PMSG (Folligon, Intervet, Holland)와 HCG (Chorulon, Intervet, Holland) 를 45 ~ 48시간 간격으로 首當 5IU씩 腹腔에 注射하여 多排卵을 誘起하였다. 授精을 위하여 HCG 注射 후 1對1의 比率로 雄性 생쥐를 舍畜시켰다. 이어 翌日 아침에 陰栓의 有無를 確認하여 陰栓이 없는 個體는 採卵對象에서 除外시켰다.

2. 保存液

受精卵의 灌流, 保存 및 培養에 使用한 保存液은 Whittingham (1971)이 생쥐胚의 培養에 使用한 수정 Dulbecco's Phosphate buffered Saline (m-PBS) 였으며 pH는 7.2 ~ 7.3, 滲透壓은 270 ~ 290mOsm 로 調整하여 使用하였다.

3. 受精卵의 回收

交尾後 適切한 時間(陰栓 發見: 1日, 1-, 2-細胞期 受精卵, 2日: 4-細胞期 受精卵, 3日: 8-細胞期 受精卵, $3\frac{1}{2}$ 日)에 屠殺, 外科的으로 卵管을 剔出하여 實體顯微鏡 (Kyowa optical Co. Japan)下에서 上記 保存液으로 灌流하였다. 이 때 microneedle을 附着한 2ml들이 注射器가 使用되었다. 回收된 受精卵중 形態學的으로 正常的인 것만을 골라 新鮮한 保存液으로 2回 洗滌한 다음 試驗에 使用하였다.

4. 凍害防止劑의 添加

受精卵을 1ml의 新鮮한 保存液이 들어있는 PI-

astic petri dish로 옮긴 다음, 3M의 Dimethyl Sulphoxide (DMSO)를 含有한 保存液을 5分 間隔으로 0.3, 0.3, 0.4ml씩 添加하여 최종농도가 1.5M이 되게 한 다음 5分間 平衡시키거나, 3M의 DMSO를 含有한 保存液 1ml를 1회에 添加하여 최종농도(1.5M)로 만든 다음 15分間 平衡을 시키는 두가지 方法을 採擇하였다.

受精卵回收로부터 凍害防止劑 添加까지의 모든 操作은 室温下에서 實施하였다.

5. 受精卵의 凍結

DMSO平衡이 끝난 受精卵은 精液注入用 0.25ml들이 Plastic Straw (Fujihara industry Co, Ltd., Japan)내로 옮겨 밀폐하였다. 밀폐는 Straw powder (Fujihara industry Co. Ltd., Japan)를 使用하여 실시하였으며 Straw當 受精卵數는 10 ~ 20個로 調整하였다. 밀폐된 Straw는 곧바로 20°C 의 Ethanol로 옮겨 액체질소 gas中에서 分當 10°C 의 速度로 -4°C 까지 하강시켜 植水(seeding)하고 -4°C 에서 5분간 방치한 후에 分當 $0.3 \sim 0.5^{\circ}\text{C}$ 의 速度로 $-10 \sim -70^{\circ}\text{C}$ 까지 豫備凍結시켰다. 各 豫備凍結溫度에서는 바로 액체질소내에 침지시켜 1 ~ 2日間 保存하였다. 植水는 액체질소gas로 미리 냉각시킨 핀셋트를 受精卵이 들어있는 straw의 外部에 접촉시켜 實施하였다 (Elsden 等, 1982).

6. 凍結受精卵의 融解

액체질소내에서 일정기간 保存한 straw를 實溫에서 分當 20°C 로 緩慢하게 融解하거나 40°C 의 Water bath에 浸漬하여 分當 500°C 의 急速으로 融解하였다.

7. 凍害防止劑의 除去

融解한 Straw의 내용물을 petri dish로 옮긴 후 에 新鮮한 保存液을 1分 간격으로 0.3, 0.3, 0.4ml씩 添加하여 세포질내의 DMSO를 除去한 다음 新鮮한 保存液으로 2회 이상 洗滌하였다.

8. 凍結融解卵의 培養

組職培養用 petri dish에 10 ~ 13ml의 액체 paraffin을 넣은 다음 하나의 petri dish에 $40\mu\text{l}$ 의 保存液 小滴 4個를 넣어 petri dish 低面에 附着시켰으며, 5% CO_2 , 95% Air, 37°C 의 CO_2 培養器에서 2時間동안 平衡을 實施하였다. 保存液 小滴當 3

~4개의 受精卵을 넣어 上記와 同一한 條件 하에서 16~70時間 동안 培養하면서 凍結-融解한 受精卵의 發達狀態를 觀察하였다(Biggers 等, 1971). 凍結融解卵의 生存性은 in vitro 培養時 桑實胚 또는 胚盤胞까지 發達할 수 있는 能力으로 判定하였다.

III. 結果 및 考察

本 試驗에서 얻어진 結果를 項目別로 요약하여 考察하면 다음과 같다.

1. 緩慢凍結融解後의 發達段階別 生存性

各 發達段階에 있는 생쥐의 受精卵을 分當 0.5~1.0°C의 速度로 -70°C까지 豫備凍結시킨 後에 액체질소로 옮겨 保存하였다가 分當 20°C의 速度로 融解하였을 때 各 發達段階別 生孫率은 Table1에서 보는 바와 같았다.

이 表에 의하여 알 수 있듯이 2-, 4-, 8-細胞期胚의 生存率은 各各 76.4, 70.0, 83.9%로써 1-細胞期胚의 26.7% 보다 良好하였다.

이와같은 성적은 생쥐胚는 2-~8-細胞期胚가 1

-細胞期胚에 비하여 凍結融解後 生存率은 높으며 2-~8-細胞期의 範圍内에서는 별다른 차이가 없다고 한 Whittingham 等(1972)의 報告와 一致하는 것이었으며, 家兔胚는 發達段階에 따라 凍結融解後의 生存性에 차이가 認定된다고 한 Tsunodo 等(1977, 1979)의 報告와도 一致하는 것이었다. 發達段階에 따른 如斯한 차이는 受精卵 자체 및 분할구의 크기에 따른 투과성(permeability)의 차이에 基因하는 것으로 생각된다.

2. 豫備凍結溫度에 따른 緩慢融解後의 生存性

豫備凍結溫度에 따른 緩慢融解後의 胚生存은 Table2에서 보는 바와 같이 -10~-30°C의 豫備凍結溫度에 있어서는 胚의 生存이 인정되지 않았으나 -40°C에서는 9.5%, -50°C에서 47.6%, -60°C에서 55.8%, 그리고 -70°C에서는 83.9%의 生存率이 인정되어 豫備凍結溫度가 낮아짐에 따라 緩慢融解(20°C/min)후의 生存率이 增加하였다. 이러한 結果는 緩慢凍結-緩慢融解方法으로 생쥐의 受精卵을 凍結保存할 경우, 急速凍結로 인한 凍害를 防止

Table 1. Effect of developing stage on the frozen-thawed mouse embryos

Developing stage of embryos	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. of embryos developed to morula	Survival rates %
1-cell	64	60	16	26.7
2-cell	76	72	55	76.4
4-cell	52	50	35	70.0
8-cell	66	62	52	83.9

Table 2. Survival of 8-cell mouse embryos cooled slowly before transfer to -196°C and then thawed slowly (20°C/min)

Pre-cooling temperature °C	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. of embryos developed to	Survival rates %
-10	76	72	0	0
-20	80	76	0	0
-30	76	72	0	0
-40	86	84	2	9.5
-50	88	84	40	47.6
-60	90	86	48	55.8
-70	99	93	78	83.9

하기 위해서는 -50°C 이하까지 緩慢하게 豫備凍結을 실시해야 한다고 한 Whittingham 等 (1972), Wilmut (1972)와 Leibo 等 (1974)이나 Miyamoto 等 (1983)의 報告와 一致하는 것이었다. 이러한 현상은 緩慢凍結時 일어나는 受精卵의 脫水와 관계가 있는 것으로 생각된다. 緩慢凍結時에는 受精卵 周圍의 水分이 동결됨에 따라 滲透壓이 높아지게 되는데, 이러한 변화에 따라 受精卵 内部의 水分이 脫水되고, 이러한 脫水가 凍害로부터 受精卵을 保護하는 것으로 생각된다.

3. 豫備凍結溫度에 따른 急速融解後의 生存性

豫備凍結溫度에 따른 緩慢凍結-急速融解後의 8-細胞期 생쥐胚의 生存率은 Table 3에서 보는 바와 같았다.

최고의 生存率을 보인 것은 -40°C 까지 豫備凍結을 실시한 區로서, 77.0%였으며 -40°C 보다 높거나 낮으면 急速融解後의 생존율은 저하하였다. 한 가지 특이한 것은 -10°C 에서도 5.6%의 生存율을

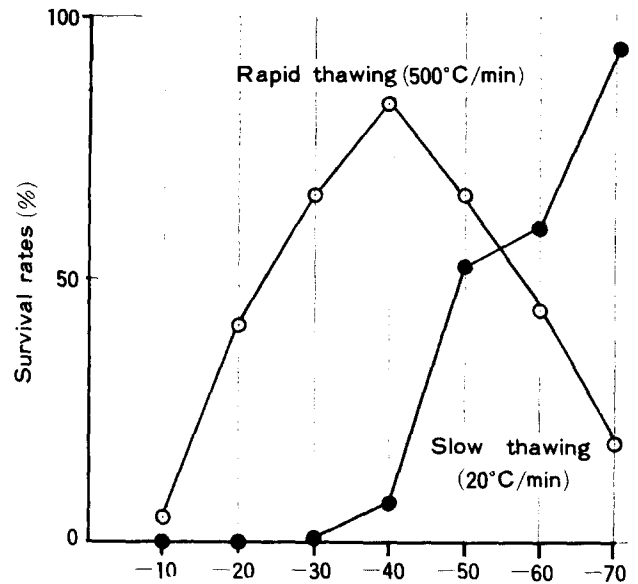


Fig. 1. Effect of Preliminary cooling temperature and thawing method on the survival of 8-cell mouse embryos.

Table 3. Survival of 8-cell mouse embryos cooled slowly before transfer to -196°C and then thawed rapidly ($500^{\circ}\text{C}/\text{min}$)

Pre-cooling temperature °C	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. of embryos developed to morula	Survival rates %
-10	80	72	4	5.6
-20	76	72	28	38.9
-30	76	71	44	62.0
-40	80	74	57	77.0
-50	80	72	44	61.1
-60	75	70	27	38.6
-70	85	80	15	18.8

보였다는 사실이다. 이러한 結果는 豫備凍結溫度 -35°C ~ -40°C 에서 최고의 生存率(71.9~87.5%)을 보였다는 Whittingham 等 (1979)의 報告나 Leibo 等 (1974), Miyamoto 等 (1983, 1984)의 報告와도 대체로 一致하였으며 家兎의 桑實胚로 試驗한 Tsunoda 等 (1981)의 報告와도 一致하는 것이었다.

凍結受精卵을 緩慢과 急速으로 融解했을 때의 生存性을 豫備凍結溫度에 따라 비교해보면 Fig. 1과 같았다.

주요변화는 예비동결온도가 -40°C 이하일 때에 나타났다. -50°C 의 경우 緩慢이나 急速融解後의 生存율은 각각 47.6%와 61.1%로 심한 차이가 없으나 예비동결온도가 -70°C 인 경우 緩慢融解後의 生存율은 83.9%인데 대하여 急速融解後의 그것은 18.8%로서 현저한 차이를 보였다.

생쥐의 수정란을 分當 1°C 보다 느린 속도로 -60°C 이하까지 동결시키면 수정란 주변의 保存液의 水分이 동결함에 따라 전해질의 농도가 증가하

며 이로인해 탈수가 일어나고 그 결과 수정란은 수축된다. 이때까지는 세포내 수분의 氷晶化는 일어나지 않는다(Leibo, 1977). 이러한 상태에서는 内部氷晶의 再結晶에 기인하는 위험은 없기 때문에 緩慢融解後의 생존율이 높을 것이라는 것은 쉽게 생

사용하여 20°C에서 1단계와 3단계로 DMSO를 첨가하고, 융해후에도 같은 방식으로 DMSO를 제거하여, DMSO의 첨가와 제거방법에 따른 동결-융해후의 생존성을 조사하였는데 그 결과는 Table 4에서 보는 바와 같았다.

Table 4. Effect of DMSO addition and removal method on the survival of frozen-thawed 8-cell mouse embryos

Addition	Removal	No. of embryos	No. of embryos	Survival rate %
		recovered after freezing	developed to morula	
Slow ^a	Slow ^a	62	52	83.9
Rapid ^b	Rapid ^b	66	48	72.7
Slow	Rapid	65	35	53.8
Rapid	Slow	60	25	41.7

note) a) Three stepwise addition or removal
b) Single addition or removal.

각할 수 있다. 그러나 내부빙정의 형성도 없이 완전히 수축된 수정란들이 急速融解後에는 生存率이 저조한 현상에 관해서는 그 원인을 좀더 검토해야 할 것이다. Whittingham 等(1979)은 이러한 현상을, 수정란 내부구조들의 再組合(re-assembly)을 위하여 수분의 재침입(re-hydration)이 필요한 때문일 것이라고 추측하였다.

생쥐수정란을 -40°C까지 완만하게 동결한 후, 그대로 액체질소로 옮겨 보존하게 되면, 수정란 내부에는 내부빙정이 형성된다. 이때 형성된 내부빙정은, 동결수정란을 완만하게(8~20°C/min) 융해할 경우에는 동해를 초래하지만 급속하게(275~500°C/min) 융해할 경우에는 凍害를 초래할 수 있는 정도에는 미치지 못한다(Whittingham 等, 1979).

4. DMSO의 첨가 및 제거방법과 수정란의 생존성

DMSO는 그 자체의 독성때문에 고온에서의 첨가나 회석은 피하는 것이 통례로 되어왔다. 그러나 Miyamoto 等(1980)은 흰쥐의 8-細胞期胚를 동결하기 전에 30°C에서 1.5M의 DMSO에 0.5분간 노출시켰음에도 불구하고 동결-융해후에 45%의 생존율을 얻었다고 한다. 또 Kasai 等(1981)은 생쥐桑實胚의 경우, 1.5M의 DMSO를 함유한 보존액으로 20°C에서 보존을 하면, 50% 이상이 12시간 이상 생존하며 완전히 사멸하는데는 24시간 이상 걸린다고 하였다. 본 시험에서는 생쥐 8-細胞期胚를

이 表에 의하여 알 수 있는 바와 같이, 완만첨가-완만제거시의 수정란 생존율은 83.9%였으며 급속첨가-급속제거시의 그것은 72.7%로서 어느 방법에서든지 다같이 높은 생존율을 얻었다. 이러한 결과는 같은 방법으로 실험을 실시한 Whittingham 等(1979)의 56.3%와 61.6%에 비하여 다소 높은 성적이었으며 절대치에는 차이가 있었으나 경향은 일치하는 것이었다.

이상의 결과들을 종합하여 고찰할 때 DMSO의 급속첨가, 급속동결후의 급속융해 및 DMSO의 급속제거방법 등과 같은 간편한 방법을 적절히 배합하면 생쥐胚의 동결보존방법은 현재보다 훨씬 더 간편화 할 수 있다고 생각된다.

IV. 摘要

本 試驗은 家畜受精卵의 凍結保存에 필요한 基礎知識을 습득할 목적으로 실시하였다. 8-細胞期의 생쥐胚를 供試하여 緩慢融解와 急速融解, 室温에 있어서 DMSO의 첨가방법 등이 凍結-融解後의 生存性에 미치는 방법을 조사함과 동시에 발달단계별 내동성을 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 緩慢凍結-緩慢融解後 1-, 2-, 4- 및 8-細胞期 수정란의 생존율은 각각 26.7, 76.4, 70.0 및 83.9%였다.

2. 豫備凍結溫度가 -40, -50, -60 및 -70°C였을 때의 緩慢融解後의 수정란 생존율은 각각 9.5, 47.6, 55.8 및 83.9%였으며 -30°C 이상에서는 수

정란의 생존이 인정되지 않았다.

3. 예비동결온도가 -10, -20, -30, -40, -50, -60 및 -70°C일 때, 급속용해후의 수정란의 생존율은 각각 5.6, 38.9, 62.0, 77.0, 61.1, 38.6 및 18.8%였다.

4. 室温에서 DMSO의 첨가와 제거방법이 완만첨가-완만제거 또는 완만첨가-급속제거, 급속첨가-급속제거, 급속첨가-완만제거시의 胚生存率은 각각 83.9, 53.8, 72.7 및 41.7%였다.

REFERENCE

1. Bank, H. and R.R. Maurer. 1974. Survival of frozen rabbit embryos. *Expl. Cell Res.*, 89:188-196.
2. Biggers, J.D., W.K. Whitten, and D.G. Whittingham. 1971. The culture of mouse embryos in vitro. In *Methods in Mammalian Embryology*. pp. 86-116. Ed. J.C. Daniel, Jr. W.H. Freeman & Co., San Francisco.
3. Elsdon, R.P. and G.E. Seidel, Jr. 1982. Embryo transfer procedures for cattle. *Theriogenology*, 14:251-256.
4. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1981. Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 63:175-180.
5. Leibo, S.P., P. Mazur and S.C. Jackowski. 1974. Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Expl. Cell Res.*, 89:79-88.
6. Leibo, S.P. 1977. Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos. In *The Freezing of Mammalian Embryos (Ciba Fndn. Symp. No. 52)*. pp. 69-92. Eds. K. Elliott and J. Whelan. Elsevier North Holland, Amsterdam.
7. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1980. Effects of the time and temperature of exposure to dimethylsulphoxide rat embryos. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 51(10):728-733.
8. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1983. Survival of mouse embryos frozen-thawed slowly or rapidly in the presence of various protectants. *J. Expl. Zool.*, 226:123-127.
9. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1984. Survival of epididymal spermatozoa of the goat and sheep, and mouse and rat embryos after direct transfer into liquid nitrogen from preliminary freezing temperatures. *Jpn. J. Artf. Insem.*, 6(1):1-3.
10. Polge, C. and S.M. Willadsen. 1978. Freezing eggs and embryos of farm animals. *Cryobiology*, 15:370-373.
11. Tsunoda, Y. and T. Sugie. 1977. Survival of rabbit eggs preserved in plastic straws in liquid nitrogen at different developing stages. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 25(4):189-193.
13. Tsunoda, Y., T. Soma and T. Sugie. 1981. The survival of rabbit morulae preserved in liquid nitrogen after rapid thawing. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 27(3-4):157-160.
14. Whittingham, D.G. 1971. Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 14:7-21.
15. Whittingham, D.G., S.P. Leibo and P. Mazur. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C. *Science*. 178:411-414.
16. Whittingham, D.G., M. Wood, J. Farrant, H. Lee and J.A. Halsey. 1979. Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196°C. *J. Reprod. Fert.*, 56:11-21.
17. Willadsen, S.M. 1977. Factors affecting the survival of sheep embryos during freezing and thawing. In *The Freezing of Mammalian Embryos (Ciba Fndn. Symp. No. 52)*. pp. 175-189. Eds. K. Elloitt and J. Whelan. Elsevier North Holland, Amsterdam.
18. Willadsen, S.M., C. Polge and L.E.A. Rowson. 1978. In vitro storage of cattle embryos. In *Control of Reproduction in the Cow*. Ed. J. Sreenan. European Economic Community, Luxembourg.
19. Wilmut, I. 1972. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sciences*, 11:1071-1079.