

생쥐 初期胚의 裸化 分割胚와 空透明帶內 收納 分割胚의 凍結保存

尹昌鉉·姜大珍·閔觀植·張奎泰·吳錫斗*

慶尙大學校 農科大學

Cryopreservation of Zona Pellucida Removed and Encased Into Alien Bisected Embryo of the Mouse Early Embryos

Yun, C.H., D.J. Kang, K.S. Min, K.T. Chang and S.D. Oh*

College of Agriculture, Gyeongsang National University

SUMMARY

This study was carried out to investigate the survival rate *in vitro* culture after frozen-thawed to used DMSO(dimethyl sulfoxide), glycerol and ethylene glycol of cryoprotective agents at the zona pellucida removed and encased into alien bisected embryo of the mouse early embryos.

The results obtained from this study were as follows :

1. The survival rate of *in vitro* culture after frozen-thawed to used cryoprotective agents of three kinds at the zona pellucida removed bisected morula was 46.6%, 35.8% and 27.3%, total or mean were 36.6%, respectively.
2. The survival rate of *in vitro* culture after frozen-thawed to used cryoprotective agents of three kinds at the encased into alien bisected morula was 70.6%, 65.3% and 66.4%, total or mean were 67.4%, respectively.
3. The survival rate of *in vitro* culture after frozen-thawed to used cryoprotective agents of three kinds at the zona pellucida removed bisected blastocysts was 50.4%, 36.7% and 30.4%, total of mean were 39.2%, respectively.
4. The survival rate of *in vitro* culture after frozen-thawed to used cryoprotective agents of three kinds at the encased into alien bisected blastocysts was 71.1%, 66.7% and 63.9%, total or mean were 67.2%, respectively.

(Key words : DMSO, glycerol, ethylene glycol, zona pellucida removed bisected embryo, encased into alien bisected embryo)

I. 緒 論

생쥐의 初期胚를 切斷한 分割胚를 體外胚養한 다음 移植하여 個體發生에 成功한 보고는 多數의 研究者들에 의해 試圖되어 왔으며(Tarkowski, 1959; Nagashima 등, 1982; Nagashima 등, 1984; Hwang 등, 1986) 소에 대하여도 初期胚 切斷한 分割胚를 移

植하여 一卵性 雙仔의 作出에 成功하고 있다(Willadsen 등, 1981; Ozil 등, 1982; Williams 등, 1982; Lehn-Jensen 과 Willadsen, 1983).

한편 생쥐의 分割胚를 凍結保存한 보고에서는 (Nakashima와 Ogawa, 1981; Ogawa와 Fjikura, 1983; Hwang 등, 1986) 分割 桑實胚의 凍結 融解後에 胚盤胞胚까지의 發育率은 각각 28.5%, 32.7%

* 晉州農林專門大學 (Chinju National Agricultural and Forestry Junior College)

및 33.6%였다고 하였으며 정상 桑實胚의凍結融解後의生存率보다 30~40%정도 낮은 것으로 나타났다. 그 原因은 分割時 透明帶의 損傷, 細胞數의 半減, 分割面 治癒力 등이라고 하였다. 소의 分割胚(Hoppe와 Bavister, 1983)와 正常胚(Massey 등, 1982)를 體外培養하는데는 透明帶가 반드시 必要한 것은 아니나 凍結後의 發育率은 一般의 것으로 낮다고 하였다(Takeda 등, 1987). 또한 一層의 透明帶로 保護하는 것보다 二層의 透明帶로 保護하는 것이 凍結後의 發育率이 높다고 보고하였다(Niemann 등, 1986).

Lehn-Jensen과 Willadsen(1983)은 소의 2分割胚와 4分割胚를 空透明帶에 收納하고 透明帶 外側을 寒天으로 包埋한 狀態로 凍結한 結果 60~70%의 分割胚가 生存하였고 2分割胚 18개를 移植하여 11개가 正常的으로 發達하는 것을 確認하였다. Suzuki와 Shimohira(1986)는 소의 凍結胚를 融解後에 12.5%의 sucrose 液內에 浸漬한 다음 分割하여 82%가 生存하였고 移植하여 個體發生에 成功하였다.

以上과 같은 研究成果는 分割胚에 대하여 많은 可能性을 시사해 주고 있다. 家畜에 있어서 胚의 分割은 家畜繁殖生理를 研究하는데 重要한 手段으로 되어 있으며 重要한 點은 家畜改良繁殖에 크게 期待되기 때문이다. 初期胚의 一部 또는 分割胚를 採取하여 性別과 發現形質을 測定한다면 他方의 胚를 數時間 培養하여 損傷部를 修復한 後에 凍結保存한다면 保存中의 胚의 性別과 遺傳能力의 豫知가 可能하게 된다.

따라서 目的으로 하는 胚를 移植에 이용한다면 兩性에서 얻은 가장 優秀한 遺傳形質을 지닌 優良家畜의 計劃生産에 크게 有效할 것으로 展望된다.

本 研究는 裸化 分割胚와 空透明帶內 收納 分割胚를 凍結融解하고 體外培養하여 生存性を 檢討하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試動物과 供試胚

供試動物은 ICR系 4~5週齡의 생쥐를 사용하였다. 5IU의 PMSG를 腹腔內에 投與하고 48時間後에 6IU의 HCG를 같은 方法으로 投與하여 過排卵을 誘起하였다. 雄생쥐와 同居시키고 交配後 3~4日째에 屠殺하여 卵管 또는 子宮에서 桑實胚부터 胚盤胞期까지의 初期胚를 採取하여 供試하였다. 採卵用 灌流液은 0.4%

BSA를 包含한 PBS(日本, 日水製藥)를 사용하였다.

2. 胚의 透明帶 除去

桑實胚와 胚盤胞의 透明帶를 除去하기 위하여 室溫에서 0.5% pronase(日本, 科研製藥)를 包含한 PBS(Ca^{2+} , Mg^{2+} , -free)液에 5~6分間 處理한 後 實體顯微鏡下에서 觀察하면서 透明帶가 軟化되었을 때 新鮮한 PBS液으로 3~4回 洗滌한 다음 pipetting 操作으로 透明帶를 除去하여 裸化시켰다.

3. 胚의 分割

胚의 分割은 PBS + 15% FCS(fetal calf serum, 日本, 三菱化成)內에서 胚의 切斷은 micro-manipulator(日本, 成戒科學機械 MM-33)에 micro blade와 holding pipette을 接續하여 實施하였다. 5~10개의 胚를 slide glass 1:의 小滴의 PBS + 15% FCS 中에 淨置하고 胚를 視野의 中央에 集合시켰다.

다음은 holding pipette으로 胚를 固定시키고 micro blade를 接近시켜 blade가 胚表面의 頂點 正中線에 正確하게 위치하도록 調整하여 下方으로 切斷하여 胚가 약간 扁平形으로 되었을 때 顯微鏡의 stage를 blade의 方向과 正逆兩으로 數回 微動함으로써 分割하였다(Williams와 Seidle, 1983). 裸化시킨 分割卵은 作出하여 空透明帶에 插入하였으며 他方의 裸化 分割卵은 裸化된 狀態로 供試하였다. 分割 後의 分割卵의 크기가 크게 差異가 있는 것과 波喪된 것은 供試하지 않았다.

4. 胚의 凍結保存

裸化 分割胚와 空透明帶內 收納 分割胚를 3種類의 凍結保護劑를 사용하여 凍結保存하였다. 胚를 각각 1.5 M 濃度の DMSO, glycerol 및 ethylene glycol를 包含한 PBS(+0.4% BSA) 溶液에 直接 投入하고 室溫에서 15分 이상의 平衡을 實施하였다. 그後 胚를 plastic straw(0.25ml)內에 溶液과 같이 吸引하였다.

裸化 分割胚와 空透明帶內 收納 分割胚는 2개를 1조로 하여 straw 1개에 封入하였다. 胚가 들어있는 straw를 $-5.5^{\circ}C$ 까지 冷却하고 이 溫度에서 植水하여 氷晶을 形成시켰다. 植水後 15分間 平衡을 維持한 다음 $-32.5^{\circ}C$ 까지 $0.6^{\circ}C/min$ 의 速度로 冷却시킨 後에 液體窒素에 投入하여 保存하였다.

5. 凍結胚의 融解

凍結胚의 融解는 液體窒素에서 直接移動하여 straw 를 35°C의 溫水에서 浸漬하는 方法으로 각각 融解하였다.

6. 凍結保護劑의 除去

融解後 straw 內容物을 plastic petridish 에 回收하여 胚를 0.75M sucrose 를 包含한 PBS(+0.4% BSA)溶液으로 室溫에서 6分間 處理하여 DMSO, glycerol 및 ethylene glycol 을 除去하였다.

7. 融解胚의 培養

凍結保護劑의 除去後 胚를 PBS(+0.4%BSA)溶液으로 數回 洗滌하였다. 培養液은 Ham's F-10(Hazleton, USA)에 15% FCS 를 添加한 培地(Anderson, 1980)를 사용하였다. 細胞 培養用 plastic peridish 에 4ml의 流動 paraffin 을 넣은 다음 하나의 petridish 에 0.4ml의 培養液 小滴 3~4개를 넣어 petridish 底面에 附着시켰으며 小滴當 1~5개의 分割胚를 넣어 培養하였다. 38°C에서 5% CO₂, 95% 空氣條件의 CO₂ 培養器內에서 48時間 培養하면서 胚의 發生狀態를 觀察하였다.

III. 結果 및 考察

1. 裸化 分割桑實胚와 空透明帶內에 收納한 分割桑實胚의 凍結融解後 生存性

裸化 分割桑實胚 및 空透明帶內에 收納한 分割桑實胚를 3種類의 凍結保護劑를 사용하여 凍結融解하였을 때

生存性은 Table 1에서 보는 바와 같다. 凍結融解後의 體外培養으로 正常的으로 發育된 比率은 裸化 分割桑實胚에서 DMSO, glycerol 및 ethylene glycol 은 각각 46.6%, 35.8% 및 27.3%였으며 平均 33.6%였다. 空透明帶內에 收納한 分割桑實胚에는 각각 70.6%, 65.3% 및 66.4%였고, 平均 67.4였다.

以上과 같이 裸化 分割桑實胚와 空透明帶內에 收納한 分割桑實胚의 發育率은 큰 差異가 認定되었으며 凍結保護劑에 의한 差異는 認定되지 않았다. 分割胚의 凍結保存에서 透明帶의 有無는 發育率에 크게 影響을 미치는 要因으로 나타났다. 이와 같은 結果는 Ogawa와 Fjikura(1983)와 Hwang 등(1986)의 생쥐 裸化 分割桑實胚의 凍結融解後의 發育率 32.7% 및 33.6%와 大體로 一致되고 있다. 또한 Lehn-Jensen과 Willadsen(1983)은 소의 裸化 2分割胚와 4分割胚를 空透明帶內에 收納하고 透明帶 外側을 寒天으로 包埋한 狀態로 凍結하여 60~70%의 發育率을 나타낸 成績과도 一致되었으며 Niemann 등(1986)의 一層의 透明帶로 保護하는 것보다 二層의 透明帶로 保護하는 것이 凍結後 發育率이 높다고 보고한 成績과도 合致되는 傾向이다.

2. 裸化 分割胚盤胞胚와 空透明帶內에 收納 分割胚盤胞의 凍結融解後 生存性

裸化 分割胚盤胞 및 空透明帶內에 收納한 分割胚盤胞를 3種類의 凍結保護劑를 사용하여 凍結融解하였을 때 生存性은 Table 2에서 보는 바와 같다. 凍結融解後의 體外培養으로 正常的으로 發育된 比率은 裸化 分割胚盤胞에서 DMSO, glycerol 및 ethylene glycol 은 각각 50.

Table 1. Survival rate after frozen-thawed of zona pellucida removed and encased into alien of bisected morula

Type of embryos	Cryoprotective agents	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	Normal blastocyst (%)	Blastomeres degenerated (%)
Bisecting morula	DMSO	114	88	41(46.6)	47(53.4)
	Glycerol	152	120	43(35.8)	77(64.2)
	Ethylene glycol	156	121	33(27.3)	88(72.7)
	Total or Mean	422	329	117(36.6)	212(63.4)
Bisecting morula	DMSO	128	102	72(70.6)	30(29.6)
	Glycerol	140	118	77(65.3)	41(34.7)
	Ethylene glycol	136	113	75(66.4)	38(33.6)
	Total or Mean	404	333	224(67.4)	109(32.6)

Table 2. Survival rate after frozen-thawed of zona pellucida removed and encased into alien of bisected blastocyst

Type of embryos	Cryoprotective agents	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	Normal blastocyst (%)	Blastomeres degenerated (%)
Bisecting blastocyst	DMSO	154	123	62 (50.4)	61 (49.6)
	Glycerol	140	120	44 (36.7)	76 (63.3)
Z.P removed	Ethylene glycol	112	92	28 (30.4)	64 (69.6)
	Total or Mean	406	335	134 (39.2)	201 (60.8)
Bisecting blastocyst	DMSO	138	114	81 (71.1)	33 (28.9)
	Glycerol	142	120	80 (66.7)	40 (33.3)
Z.P encased into alien	Ethylene glycol	124	108	69 (63.9)	39 (36.1)
	Total or Mean	404	342	230 (67.2)	112 (32.8)

4%, 36.7% 및 30.4%였으며 평균 39.2%였다. 空透明帶內에 收納한 分割胚盤胞에서는 각각 71.1%, 66.7% 및 63.9%였고 평균 67.2%였다.

以上과 같이 裸化 分割 胚盤胞와 空透明帶內에 收納 分割胚盤胞의 發育率은 큰 差異가 認定되었으며 凍結保護劑에 의한 差異는 크게 認定되지 않았다. 이와 같은 結果는 Ogawa와 Fjikura(1983)와 Hwang 등 (1983)의 생쥐 成績과 大體로 一致되는 傾向이었다. Lehn-Jensen과 Willadsen(1983)은 소의 胚를 切斷하여 2分割胚 및 4分割胚로 만들고 空透明帶內에 收納하여 凍結後 각각 70% 및 75%의 發育率을 얻을 수 있었다고 하였고, Niemann 등(1987)은 소의 胚를 兩分하여 agar chip으로 封하여 凍結後 68.8%의 發育를 얻은 보고와도 合致되는 傾向이었다.

透明帶가 正常的인 胚는 -30°C까지 冷却하여도 透明帶의 內側에는 氷晶의 形成이 認定되지 않으므로 細胞가 直接 氷晶에 接觸될 可能性은 낮으나 透明帶가 除去되었을 때는 植水後 반드시 細胞는 氷晶間에 埋浸되기 때문에 傷害를 받을 것으로 思料된다.

IV. 摘要

本 研究는 생쥐 初期胚의 裸化 分割胚와 空透明帶內에 收納 分割胚를 3種類의 凍結保護劑 DMSO, glycerol 및 ethylene glycol을 사용하여 凍結融解하고 體外培養하여 生存性을 檢討하였다.

1. 裸化 分割胚를 3種類의 凍結保護劑를 사용하여 凍結

融解後의 體外培養한 生存率은 각각 46.6%, 35.8% 및 27.3%였으며 평균 36.6%였다.

2. 空透明帶內에 收納한 分割桑實胚를 3種類의 凍結保護劑를 사용하여 凍結融解後의 體外培養한 生存率은 각각 70.6%, 65.3% 및 66.4%였으며 평균 67.4%였다.

3. 裸化 分割胚盤胞를 3種類의 凍結保護劑를 사용하여 凍結融解後의 體外培養한 生存率은 각각 50.4%, 36.7% 및 30.4%였으며 평균 39.2%였다.

4. 空透明帶內에 收納한 分割胚盤胞胚를 3種類의 凍結保護劑를 사용하여 凍結融解後의 體外培養한 生存率은 각각 71.1%, 66.7% 및 63.9%였고 평균 67.2%였다.

V. 引用文獻

- Anderson, G.B. 1980. Methods in mammalian reproduction, J.C. Danial, ed., p: 273. Academic Press.
- Hoppe, R.W. and B.D. Bavister. 1983. Effect of removing the zona on development of hamster and bovine embryos *in vivo*, Theriogenology. 19: 391.
- Hwang, W.S., A. Nakagawa, M. Hishimura Y. Takahashi and H. Kanagawa. 1986. The developmental of bisected frozen-thawed mouse embryos. Jpn. J. Anim.

- Reprod., 32(3) : 153-155.
4. Lehn-Jensen, H. and S.M. Willadsen. 1983. Deep freezing of cow half and quarter embryos. *Theriogenology*. 19 : 49-54.
 5. Massey, J.M., J.G. Anderson, W.C. Ellis, A.M. Sorenson, Jr. and D.C. Kreamer. 1982. Development of bovine embryos following enzymatic removal of the zona pellucida. *Theriogenology*. 17 : 99.
 6. Nagashima, H. and S. Ogawa. 1981. Studies on the developmental potential and the survival after the deep freezing of microsurgically dichotomized morula embryos in rats and rabbits. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 27 : 12-19.
 7. Nagashima, H., A. Fjikura and S. Ogawa. 1982. Studies on the developmental ability and viability after deep freezing of the blastomeres isolated from 2-cell stage embryos in mice and rabbits. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 28 : 20-23.
 8. Nagashima, H., K. Matsui, T. Sawaski and Y. Kono. 1984. Production of monozygotic mouse twins from microsurgically bisected morula. *J. Reprod. Fert.*, 70 : 357.
 9. Niemann, H., J.H. Pryor and K.R. Bondioli. 1987. Effects of splitting the zona pellucida and subsequent sealing on freezing survival of day-7 bovine embryo. *Theriogenology*. 28 : 675-681.
 10. Niemann, H., G. Brem, B. Sacher, D. Smidt and H. Krausslich. 1986. An approach to successful freezing of demi-embryos derived from day-7 bovine embryos. *Theriogenology*. 25 : 519.
 11. Ogawa, S. and H. Fjikura. 1983. Cryoviability of the half embryos isolated by micrurgy from early developmental stage embryos in mice and rabbits. Institute of Science and Technology Meiji University. 62 : 25-34.
 12. Ozil, J.P., Y. Heyman and J.P. Renard. 1982. Production of monozygotic twins by micromanipulation and cervical transfer in the cow. *Vet. Res.*, 110 : 126-127.
 13. Suzuki, I. T. and Shimohira. 1986. Viability of frozen-thawed bovine embryos bisected in sucrose. A preliminary report. *Theriogenology*. 26 : 333-339.
 14. Takeda, T., W.B. Henderson and J.F. Hasler. 1987. Deep freezing of split and intact bovine embryos. *Theriogenology*. 27 : 285.
 15. Tarkowski, A.K. 1959. Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. *Nature*. 184 : 1286-1287.
 16. Willadsen, S.M., H. Lehn-Jensen, C.B. Fehling and R. Newcomb. 1981. The production of monozygotic twins of preselected parentage by micromanipulation of non-surgically collected cow embryos. *Theriogenology*. 15 : 23-29.
 17. Williams, J.J. R.P. Elsdon and G.E. Seidel, Jr. 1982. Identical twin bovine pregnancies from bisected embryos. *Theriogenology*. 17 : 114(Abstr).
 18. Williams, J.J. and G.E. Seidel, Jr. 1983. Methodology and equipment from microsurgery with mammalian ova. IX the Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society, Proceeding of the Workshop. 33-55.