韓國受精卵移植學會誌(1994) 第9券 第2號
Korean J. Emb. Trans. (1994) Vol. 9, No. 2 pp. 173~179

# Ethylene Glycol을 이용한 유리화 동결시 평형시간과 배 발달단계별 생쥐 배의 생존성

공일근 · 정기화* · 노규진** · 조성근 · 이은봉*** · 박충생
경상대학교 농과대학 축산학과

# Effect of Equilibration Time and Developmental Stages on the Survival of Mouse Embryos Cryopreserved by Vitrification in EFS Solution

**I. K. Kong, K. H. Chung*, G. J. Rho**, S. K. Cho, E. B. Lee***and C. S. Park**
*Department of Animal Science, College of Agriculture, Gyeongsang National University*

## SUMMARY

The present experiments on cryopreservation were carried out to investigate effect of solution toxicity, equilibration time and cell stages on the post-thaw survival of mouse morulae and blastocyst embryos cryopreserved by vitrification in EFS solution. The mouse embryos were exposed to the EFS solution in one step at room temperature, kept in the EFS solution during different period for toxicity test, vitrified in liquid nitrogen and thawed rapidly. After the mouse morulae embryos were exposed to EFS solution for 2 and 5 min. at room temperature and then they were washed in 0.5 M sucrose solution and basal medium(D-PBS + 10% FCS), they were cultured to examined cryoprotectant toxicity induced injury during exposure, most of embryos developed to expanded blastocysts(100 and 90.0%). However, when the exposure time was extended to 10 and 20 min, these development rates dropped dramatically in 10 min. (75.0%) and 20 min. (4.5%), respectively. When the compacted morulae were vitrified in EFS solution after equilibration for 2 and 5 min, the embryos have developed to normal blastocyst following thawing, washing and culture processes was 89.3 and 89.6%. However, when the exposure time was expanded to 10 min, this survival rate dropped to 68.8%. When the blastocyst were vitrified in EFS solution after equilibration for 2, 5 and 10 minutes, the survival rate of embryos which developed to normal blastocyst following thawing and culture processing were 58.5, 46.7 and 22.4%, respectively. The optimal time of equilibration of mouse morula and blastocysts in EFS solution seemed to be 2 and 5 min.

**Key words**: mouse embryo, vitrification, equilibration time, EFS solution

* 국립종축원(National Animal Breeding Institute)
** 경상대학교 수의과대학(College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University)
*** 순천대학교 축산학과(Department of Animal Science, Sunchon National University)

## 서 론

초기배의 동결보존을 위한 vitrification 방법은 고농도의 동결보존액에 단시간의 평형으로서 직접 액체질소에 침적시킴으로써 동결에 요하는 시간이 짧을 뿐만 아니라 동결·융해과정에서 발생하는 세포내 외수의 결빙을 형성시키지 않고 과냉각상태로 유지하여 투명한 유리와 같이 변하게 하는 방법으로서 초기배의 생존율을 높게 유지시켜 주는 동결방법으로 알려져 있다. 배의 동결·융해후 생존율은 생물학적, 물리학적 및 생화학적인 상호반응으로 동결보호제의 종류, 농도, 냉각속도, 동결방법 및 융해속도 등에 따라 크게 영향을 받는다. Rall과 Fahy(1985)가 최초로 DMSO에 acetamide, propylene glycol 및 polyethylene glycol을 첨가한 vitrification solution-1(VS-1)을 이용하여 생쥐배의 vitrification방법에 성공한 이래, glycerol과 propylene glycol이 포함된 vitrification solution-2 (VS-2)로 생쥐(Scheffen 등, 1986), 소(Massip 등, 1986) 및 토끼(Smorag 등, 1989; Kobayashi, 1990) 등의 배를 동결하는데 성공하였다. 그러나, 그들의 방법은 고농도의 투과성 동결보호제의 독성 및 고농도의 삼투압에 의한 상해를 줄이기 위한 단계적인 평행과 평형시 온도조절을 실시함으로써 많은 노력과 시간이 소요되어 짧은 시간에 편리하게 높은 생존율을 나타낼 수 있는 방법의 개발이 요구되어졌다. 최근에 Kasai 등(1992)은 EFS 용액(vitrification solution)으로 생쥐 및 토끼배를 동결보존하여 양호한 성적을 보고하였다. 이때 Ficoll은 비투과성 동결보호제로서 VS solution의 거대분자에 속하며, 반면에 적은 분자량의 sucrose는 배의 수축을 일으킨다. 이 용액은 독성이 적으며 배의 평형시 전냉각이 필요치 않은 것으로 알려져 있다. 이러한 새로운 동결보존액을 이용한 동결방법은 간편하며 비교적 용이하게 현장에서 이용할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 EFS solution을 이용한 vitrification 방법으로 가축배에 적용하기 위한 예비실험으로서 생쥐의 상실배 및 배반포기 배를 이용하여 고농도의 동결보호제의 사용에 따른 생쥐배에 대한 독성검사와 EFS solution에 적당한 평형시간을 구명하여 동결·융해후의 생존성을 높이기 위하여 실시하였다.

## 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 투여후 86, 92 시간경에 상실기 및 배반포기의 배를 채취하였다. 채취한 배는 기본용액(D-PBS + 10% FCS ; 이하 기본용액으로 약함)으로 3~4 회 세척하여 정상형태의 상실기 및 배반포기 배만을 선별하여 사용하였다.

### 2. 배양액

생쥐배의 관류 및 세척에는 기본액을 사용하고, 배양액에는 Brinster's mouse ovum culture medium-3(BMOC-3, Brinster, 1971)를 사용하였다. 배양액의 pH는 7.2±0.2로 조정하였으며, 사용직전에 0.2 ㎛ Milipore filter(Gelman Science Co., 미국)로 여과시킴으로써 제균하였다. 배양액의 사용은 light weight paraffin oil(Junsei Chem. Co., 일본)을 도포한 Brinster(1963)의 미소적 배양법에 따라 실시하였으며, 체외배양조건은 37℃의 5% $CO_2$, 95% $O_2$ 및 포화습도상태인 $CO_2$ 배양기(Forma, 미국) 내에서 실험전 2 시간동안 평형시킨 후 사용하였다.

### 3. 동결보존액의 준비

동결보존액은 10% FCS를 포함한 D-PBS를 기본용액으로 Kasai 등(1992)의 방법에 준하여 EFS solution을 제조하였다. 동결보존액의 제조방법은 기본용액에 0.3M sucrose를 첨가하여 완전 용해후 18%(w/v) Ficoll 70(average Mr 70,000; Sigma, U.S.A.)을 첨가하여 용해하고 40%(v/v) ethylene glycol을 혼합한 후 마지막으로 기본용액으로 용량을 맞추어 제조한다. 또한 희석용액은 0.5M sucrose를 기본용액에 첨가하여 완전용해후 각각 0.2 ㎛ filter로 여과 후 냉장보관하면서 이용하였다.

#### 4. 동결보존액의 독성검사

동결보존액의 적정한 농도, 독성 여부 및 평형시간 등을 알아보기 위하여 EFS solution에 상실기 배를 2, 5, 10 및 20 분간 평형시킨 후 동결은 실시하지 않고 곧바로 0.5 M sucrose solution에 약 5분 동안 희석하고 이를 다시 기본용액으로 3~4 회 세척한후 24 시간 배양하여 형태학적으로 확장 배반포기 배까지 발육한 것을 생존한 것으로 판단하였다.

#### 5. Vitrification 방법

배의 동결보존은 상실기 및 배반포기 배를 1 ml의 EFS 용액에 2회 세척하여 Fig. 1과 같이 Kong

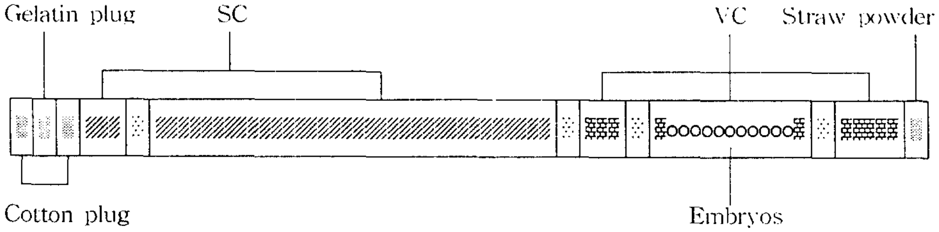


Fig. 1. Diagramatic representation of 0.25 ml plastic straw loaded with solutions and embryos for vitrification. (▒) air bubbles, (▨) cotton plug and straw powder, (SC) 0.5 M sucrose solution column, (VC) vitrification solution column and (o) embryos in vitrification solution.

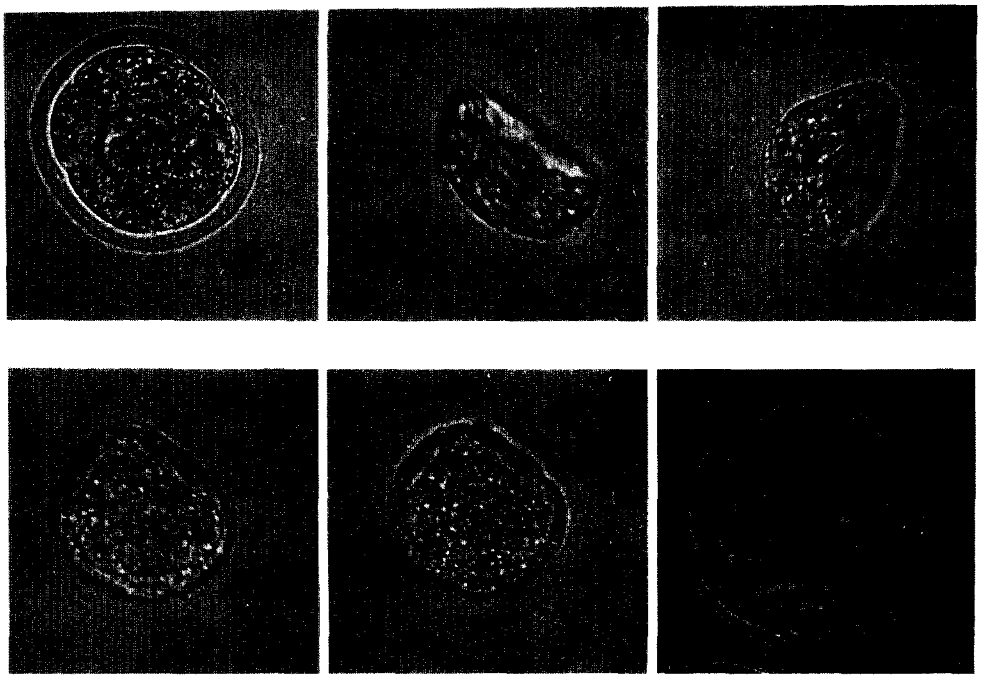

Fig. 2. Volume change of compacted morulae before and after addition of EFS solution(100X). a) prior to addition, b) 2 minutes, c) 5 minutes, d) 10 minutes, e) 20 minutes after addition, and f) normal blastocyst cultured during 24 hours after freezing-thawing.

등(1991)의 방법으로 동결보존액이 준비된 0.25 ml plastic straw(IMV, 프랑스) 내의 EFS solution column으로 주입하여 polyvinylalcohol (powder)로 straw 끝부분을 봉입하였다. 이렇게 straw내에 주입되어 있는 배는 일정시간 평형을 유도한 후 액체질소에 침적하였다. 평형은 실내온도에서 실시하였으며 이때 평형시간은 각각 2, 5 및 10 분으로써 EFS 용액에 접촉되는 순간부터 액체질소에 침적되는 시간까지를 평형시간으로 계산하였다. 이때 straw를 액체질소에 침적하는 순간 동결보호제의 팽창으로 인한 straw의 파괴를 방지하기 위하여 배가 주입되어 있는 column 부분은 재빨리 침적하지만 나머지 부분은 천천히 침적하여야 한다.

동결보존한 배의 융해는 straw를 액체질소에서 꺼낸 즉시 고농도의 동결보호제에 의한 독성과 삼투압에 의한 손상을 방지하기 위하여 20℃ 전후의 물에 직접 침적시켜 약 10 초간 흔들면서 융해하였다. 융해한 straw는 재빨리 희석용액(0.5 M sucrose solution)으로 5 분간 희석하여 세포내·외 동결보호제를 제거하였다. 희석이 완료된 수정란은 다시 기본용액으로 3~4 회 세척하여 약 5분간 정체시키면서 잔여 동결보호제의 완전제거를 실시한 후 배양하였다.

### 6. 배의 생존성 판정

동결 융해후 ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA: Sigma, 미국)가 첨가된 $NaHCO_3$-BMOC-3 배양액으로 옮겨 12~24 시간동안 체외배양을 실시하여 확장배반포기까지 발육한 것을 정상배반포(normal blastocyst)로, 포배강은 형성되었지만 배의 절반이상이 퇴화된 것은 거짓배반포(false blastocyst)로, 나머지는 완전퇴화(degenerated)된 것으로 판정하였다.

### 7. 통계학적 분석

동결 융해후 체외배양한 배의 생존율은 Microsta computer statistical program package를 사용하여 $\chi^2$-test로 각 처리간의 유의차를 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. EFS 용액의 독성검사

동결보존시 생존성에 관여하는 중요한 요인으로는 동결보존액의 종류, 농도, 평형시간, 온도 및 배 발달단계 등으로서 이와 같은 요인들을 종합적으로 고려한 적정 평형시간을 결정하는 것이 가장 급선무라고 사료된다. 고농도의 동결보존액에 지나친 노출은 화학적 독성 및 삼투압의 영향 등으로 배가 손상을 받을 수 있기 때문에 동결보존액의 선택과 평형시간 등의 결정시 독성검사는 필수적이라 사료된다. EFS 용액의 독성 및 삼투압의 영향을 조사한 결과, Table 1에 나타난 바와 같이 EFS 용액에 전혀 평행시키지 않은 대조구는 100% 정상배반포로 발달하였으며, 2, 5 분간 평행시킨 구에서도 각각 100, 90.0%가 정상배반포로 발달하였다. 그러나, 10, 20 분간의 평형시간에 따른 배발달율은 각각 75.0, 4.5%로 나타나 평형시간이 10분 이상으로 길어질수록 정상배반포로의 발달율은 유의적($P<0.05$)으로 낮아지는 결과를 나타내었다. 이 실험은 동결 보호제에 평형시킨 후 동결은 실시하지 않으므로써 동결에 의한 배의 손상보다 순수하게 동결보호제가 배에 미치는 독성 및 삼투압의 영향을 판단코자 하였는데, 평형시간이 길어짐에 따라 동결보호 목적의 필요량보다 지나친 동결보호제가 세포내로 침투하여 고농도의 침투성 동결보호제인 ethylene glycol의 독성과 비침투성의 동결보호제인 Ficoll에 의한 지나친 삼투압 영향 등으로 배가 손상을 받은 것으로 판단된다. 즉, 최적의 동결시기는 동결보존에서 평형시 최소용적이 도달하는 시기라고 Takahashi와 Kanagawa (1990) 및 이 등(1992)이 보고하였는데 본 실험의 결과에서도 Fig. 2와 같이 2~5 분대에서 최소용적에 도달하였다가 10분이 경과하였을 때는 최초의 동결보존액에 평형시키기 전보다도 더 용적이 증가한 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 Kasai 등(1990, 1992)이 EFS 용액에서 5, 10, 15 및 20 분간 평형후 독성검사에서 생존율이 98, 80, 78 및 20%로서 평형시간이 증가할수록 생존율이 급격히 떨어진다는 보고와 비슷한 결과로써 동결전의 평형시간이 10 분 이상으로 길어지면 배의 손상율이 높다는 것을 증명하는 것으로 판단된다.

Table 1. Survival of mouse compacted morulae exposed to vitrification solution at room temperature

| Types of solution | Time of exposed (min.) | No. of embryos cultured | No. and (%) of embryos developed to | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Normal blastocyst | False blastocyst | Degenerated |
| Control | | 45 | 45(100)[a] | 0 | 0 |
| EFS solution | 2 | 40 | 40(100)[a] | 0 | 0 |
| | 5 | 40 | 36(90.0)[a] | 4 | 0 |
| | 10 | 40 | 30(75.0)[b] | 4 | 6 |
| | 20 | 22 | 1( 4.5)[c] | 3 | 18 |

* Control was cultured for 24 hours at morulae stage
* Values with different superscripts denote significant($P<0.05$) difference.

### 2. 배발달단계별 평형시간에 대한 동결 융해후 생존율

EFS solution을 이용한 vitrification 방법에서 2, 5 및 10분간의 평형시간이 동결·융해후 생존율에 미치는 영향을 구명하고자 생쥐의 상실배 및 배반포기 배를 이용한 실험결과는 Table 2, 3에서와 같다. 앞의 독성검사에서 평형시간이 10분 이상으로 길어졌을 때 생존율이 급격히 떨어지는 경향이 있었기 때문에 동결보존에는 2, 5 및 10분간의 평형시간으로 실시하였다.

상실기 배에서 2, 5 및 10 분간의 평형시간에 따른 동결·융해후 생존율은 각각 89.3, 83.3 및 68.6%로써 2, 5분간의 평형시간에는 높은 생존율을 보이고 있으나 10분간의 평형시간에서는 낮은 생존율을 보이므로써 평형시간이 길어짐에 따라 생존율이 유의적($P<0.05$)으로 낮아짐을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같이 평형시간이 길어짐에 따라 Ficoll에 의한 삼투압과 ethylene glycol에 의한 독성의 영향을 받으므로써 손상을 받은 것으로 사료된다. Kasai 등(1990)은 2 분과 5 분간의 평형시간으로 98 및 98%의 생존율을 얻었는데 이는 본 실험의 성적보다 높은 성적이었다. 그러나, 이 등(1992)은 VS-3 용액으로 10 분간의 평형시간으로 89.4%의 생존율을, van der Zwalmen 등(1988) 및 Valdez 등(1990)은 VS-3용액으로 생쥐배의 동결 융해후 80% 이상의 생존율을 보고하여 본실험과 비슷한 성적을 보고하였다.

배반포기 배에서는 2, 5 및 10 분간의 평형시간에 따른 생존율은 각각 58.5, 46.7 및 22.4%로써 2, 5 분간의 평형시간에는 생존율에 차이가 없으나, 10 분간의 평형시간으로는 평형시간이 길어짐에 따라 정상배반포로의 생존율은 유의적($P<0.05$)으로 감소하여 상실기의 경우와 비슷한 경향을 보였다. Fig. 3에서 보면 평형시간과 배 발달단계별 동결·융해후 생존율을 나타내고 있는데 2, 5 및 10분간의 평형시간에서 각각 배반포기배보다 상실기 배에서 유의적으로 높은 생존율을 보였으며, 또한 2~5 분간의 평형시간대에서 10 분보다 높은 생존율을 얻었다. 이와 같은 결과에서 EFS solution을 이용

Table 2. Effect of equilibration time on survival of mouse compacted morulae cryopreserved by vitrification in EFS solution

| Equilibration time(min.) | No. of embryos frozen | No. and (%) of embryos developed to | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Normal blastocyst | False blastocyst | Degenerated |
| 2 | 56 | 50(89.3)[a] | 3 | 3 |
| 5 | 48 | 40(83.3)[a] | 3 | 5 |
| 10 | 51 | 35(68.6)[b] | 7 | 9 |

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

Table 3. Effect of equilibration time on survival of mouse balstocyst cryopreserved by vitrification in EFS solution

| Equilibration time(min.) | No. of embryos frozen | No. and (%) of embryos developed to | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Normal blastocyst | False blastocyst | Degenerated |
| 2 | 4 | 24(58.5)[a] | 4 | 13 |
| 5 | 45 | 21(46.7)[a] | 7 | 17 |
| 10 | 49 | 11(22.4)[b] | 8 | 30 |

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

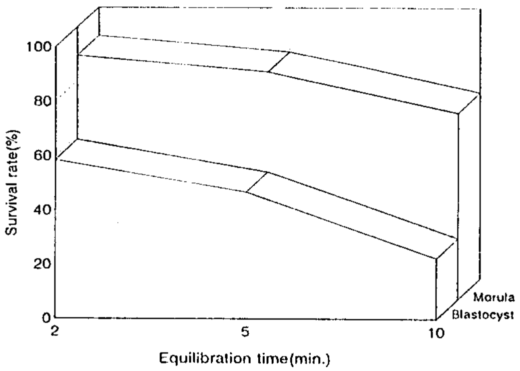


Fig. 3. Comparation of post-thaw survival rate(%) of mouse embryos cryopreserved by vitrification solution.

한 동결보존시 배반포기 배보다는 상실기 배에서 실시하는 것이 높은 생존율을 얻을 수 있을 것으로 판단된다. 또한 상실기 및 배반포기 배에서 적당한 평형시간은 2~5 분인 것으로 판단된다.

## 적 요

EFS solution을 이용한 vitrification 방법에서 생쥐의 상실기 및 배반포기 배를 이용한 평형시간에 따른 독성 및 삼투압에 의한 손상여부를 판단하고, 동결보존 후의 생존율을 조사하였다. 실온에서 생쥐의 상실기 배를 2, 5, 10 및 20, 분간 EFS solution에 평형시킨 후 동결은 실시하지 않고 동결보존액의 독성을 검사하기 위하여 곧바로 0.5 M sucrose solution으로 약 5 분간 희석한 후 기본용액으로 다시 3~4회 세척하고 이를 24 시간 정도 배양시킨 결과 확장배반포기 배까지의 발달율은 100, 90.0, 75.0 및 4.5%로서 평형시간이 10분 이상일 경우에는 생존율이 저조하였으며, 20분일때는 4.5%의 생존율로서 유의적($P<0.05$)으로 감소하였다. 상실기 배로 동결·융해후 생존율은 2, 5 및 10 분간의 평형시간에 따라 각각 89.3, 89.6 및 68.6%의 생존율을 보였고, 배반포기 배에서는 평형시간에 따라 각각 58.5, 46.7 및 22.4%의 생존율을 보였다. 상실기 및 배반포기 배의 평형시간이 2, 5 분간에는 유의차가 없었으나, 10 분간의 평형시간으로는 동결·융해후 생존율이 유의적($P<0.05$)으로 저조하였다. 따라서 2, 5분간의 평형시간으로 상실기 배로 동결보존을 실시하는 것이 효과적이라고 사료된다. 이상의 실험결과에서 EFS solution을 이용한 vitrification 방법으로 생쥐의 상실기 및 배반포기 배의 동결보존시 적정 평형시간은 약 2~5 분 정도이며 배반포기 배보다 상실기 배에서 동결보존을 실시함으로써 더욱더 높은 생존율을 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

## 참고문헌

Brinster RL. 1963. A method from *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: Daniel, JC. Methods Jr in mammalian embryology. 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 sur-

vival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method. Biol. Reprod. 46:1042-1046.

Kasai M, Komi H, 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.

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.

Kobayashi K, Nagashima H, Yamakawa H, Kato Y, Ogawa S. 1990. The survival of whole and bisected rabbit morulae after cryopreservation by the vitrification method. Theriogenology 33:777-788.

Massip A, Van Der Zwalmen P, Scheffen B and Ectors F. 1986. Cryo-Letters. 7:270-273.

Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at −196℃ by vitrification. Nature 313:573-575.

Scheffen B, Van Der Zwalmen P and Massip A. 1986. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. Cryo-Lett. 7:260-269.

Smorag Z, Gajda B, Wieczorek B and Jura J. 1989. Stage-dependent viability of vitrified rabbit embryos. Theriogenology 31:1227-1231.

Takahashi Y and Kanagawa H. 1990. Effect of equilibration period on the viability of frozen-thawed mouse morula after rapid freezing. Mol. Reprod. Dev. 26:105-110.

Valdez CA, Abas Mazni O, Takahashi Y, Hishinuma M and Kawagawa 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.

이은봉, 공일근, 강대진, 박충생. 1992. Vitrification 방법에 의한 생쥐의 정상배 및 분할배의 생존성에 관한 연구. 한국축산학회지 34:69-75.