

생쥐 分割胚의 凍結保護物質 開發

尹昌鉉 · 李炳五 · 成煥厚* · 吳錫斗

慶尙大學校 農科大學

Development of Antifreezing Agent for Bisected Embryo in Mouse

Yun, C. H., B. O. Lee, H. H. Seong* and S. D. Oh

College of Agriculture, Gyeongsang National University

SUMMARY

This study was conducted to investigate the effects of cryoprotective agents and thawing temperature on the survival rates of the bisected embryos of mouse. The results of this study were summarized as follows:

1. In *in vitro* culture after frozen with DMSO, glycerol, ethylene glycol or propanediol and thawed, the rates of normally developed bisected morula which was denuded were 31.7, 39.1, 28.0 and 23.1%, respectively.
2. The survival rates of bisected morula encased into the zona pellucida in *in vitro* culture after frozen with DMSO, glycerol, ethylene glycol or propanediol and thawed were 72.4, 68.7, 64.0 and 59.5%, respectively.
3. The survival rates of bisected denuded blastura in *in vitro* culture after frozen with DMSO, glycerol, ethylene glycol or propanediol and thawed were 48.3, 44.8, 32.1 and 28.6%, respectively.
4. The survival rates of bisected blasturae encased into the zona pellucida in *in vitro* culture after frozen with DMSO, glycerol, ethylene glycol or propanediol and thawed were 73.6, 67.4, 53.0 and 49.1%, respectively.
5. In *in vitro* culture after frozen with DMSO, glycerol, ethylene glycol or propanediol and thawed at room temperature, the rates of the normally developed bisected morula which was encased into the zona pellucida were 67.1, 62.3, 57.7 and 53.0%, respectively, and those of the bisected blasturae encased into the zona pellucida were 70.8, 65.4, 56.6 and 52.1%, respectively.
6. The survival rates of bisected morula which was encased into the zona pellucida in *in vitro* culture after frozen with DMSO, glycerol, ethylene glycol or propanediol and thawed at 37°C were 74.3, 71.3, 63.9 and 57.4%, respectively, and those of bisected blastura encased into zona pellucida were 76.0, 69.1, 61.1 and 56.1%, respectively.

* 축산기술연구소(National Livestock Research Institute)

이 논문은 경상대학교 연구장학재단 연구비에 의해서 연구되었음.

差異에 의한 mouse 分割卵의 生存率을 檢討하였다.

I. 緒 論

포유동물의 着床前의 受精卵이 凍結保存되고 있으며 生存性的의 低下는 대부분 일어나지 않았고 保存中에는 遺傳的인 결함도 나타나지 않는다. 凍結卵의 生存性에는 多數의 因子가 복잡하게 關여하고 있다. 예를 들면 受精卵의 발육시기, 냉각과 融해속도, 그리고 어떤 종류의 凍結保護物質이 사용되는나에 따라서 영향을 받는다. 가축에는 桑實期부터 胚盤胞期의 受精卵의 凍結能이 다른 시기의 것에 비하여 높다고 하였다. (Mohr와 Trounson, 1981; Slade 등, 1985)

동시에 凍結方法의 개량에 의하여 受胎率은 향상되고 (Takeda 등, 1985; Nelson과 Nelson, 1988) 이를 반영하여 소의 凍結受精卵은 商品價値를 가지게 되었으며 세계적으로 輸出入되고 있다.

一卵性 雙子와 一卵性 雙生子는 동일한 遺傳子 組成을 가지고 있고 一卵性 雙子の 작출은 수적인 증가의 가능성 이외에도 遺傳的 生物學的 研究에도 이용되고 있다.

최근 축산분야에는 경제동물에서 一卵性 雙子の 작출이 이루어지고 있다. 이를 위하여 家畜胚에서는 소, 면양, 말, 돼지 등의 胚를 割球分離와 胚自體를 分割하여 一卵性 雙子를 作출하고 있다. (Willadsen, 1979; Willadsen, 1982; Willadsen 등, 1981; Suzuki와 Shimohira, 1986; Lehn-Jensen과 Willadsen, 1983)

2分胚 또는 胚의 斷片의 일부를 性判別에 제공하고 他方의 胚를 移植하는 방법이 이용되고 있다. (Anderson, 1985). 이는 性判別에 染色體解析과 같은 細胞學的方法을 이용할 것을 前提한다면 여기에 제공되는 2分胚 또는 胚의 斷片은 충분한 細胞數와 細胞分裂能을 가지고 있어야 한다. 이에 대하여 최근 生化學的方法의 응용에 의하여 多數의 細胞(割球)를 요하지 아니하고도 精度의 胚의 性判別이 이루어지고 있다. (Monk와 Handyside, 1988; Bondioli 등, 1989) 그러나 移植하고자 하는 胚의 발달능력은 損傷함이 없이 필요한 數와 良質의 細胞(割球)를 가지고 있는 胚의 顯微手術이 요구된다. 또한 初期胚의 性判別을 家畜의 性支配에 유효하게 이용하기 위하여는 性判別된 胚를 凍結保存하는 것이 필요하게 된다. 이상과 같은 연구성과는 分割胚에 대하여 많은 可能性을 시사해 주고 있다.

본 연구에서는 凍結保護物質의 種類와 融解溫度의

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 함유한 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 포함한 PBS(Ca^{2+} , Mg^{2+} , -free)액에 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 PBS액으로 3~4회 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) 내에서 胚의 切斷은 micromanipulator(日本, 成戒科學機械 MM-33)에 micro blade와 holding pipette을 접속하여 實施하였다. 5~10개의 胚를 slide glass상의 小滴의 PBS+15%FCS중에서 淨置하고 胚를 視野의 中央에 集合시켰다.

다음은 holding pipette으로 胚를 固定시키고 micror 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 偏平形으로 되었을 때 顯微鏡의 stage를 blade의 方向과 正逆方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 상태로 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내 收納 分割胚를 4種類의

凍結保護劑를 사용하여凍結保存하였다. 胚를 각각 1.5M濃度の DMSO, glycerol, ethylene glycol 및 propanediol를 포함한 PBS(+0.4% BSA) 溶液에 直接投入하고 室溫에서 15分 이상의 平衡을 實施하였다. 그후 胚를 plastic straw(0.25ml)내에 溶液과 같이 吸引하였다.

裸化 分割胚와 空透明帶내 收納 分割胚는 2개를 1조로 하여 straw 1개에 封入하였다. 胚가 들어있는 straw를 -5.5°C 까지 冷却하고 이 溫度에서 植氷하여 氷晶을 形成시켰다. 植氷後 15分間 平衡을 維持한 다음 -32.5°C 까지 $0.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 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 straw를 室溫에서와 37°C 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 petri dish에 回收하여 胚를 0.75M sucrose를 包含한 PBS(+0.4% BSA) 溶液으로 室溫에서 6分間 處理하여 DMSO, glycerol, ethylene glycol 및 propanediol을 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 (Hazelton, USA)에 15% FCS를 添加한 培地(Ander-son, 1980)를 使用하였다. 細胞 培養用 plastic petri dish에 4ml의 流動 paraffin을 넣은 다음 하나의 petri dish에 0.4ml의 培養液 小滴 3~4개를 넣어 petri dish 底面에 附着시켰으며 小滴當 1~5개의 分割胚를 넣어 培養하였다. 38°C 에서 5% CO_2 , 95%空氣條件의 CO_2 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. 分割桑實胚의 凍結·融解後의 生存率

裸化 分割桑實胚 및 空透明帶內에 收納한 分割桑實胚를 4種類의 凍結保護劑를 使用하여 凍結·融解하였을 때 生存率은 Table 1에서 보는 바와 같다. 凍結·融解後의 體外培養으로 정상적으로 발육된 비율은 裸化 分割桑實胚에서 DMSO, glycerol, ethylene glycol 및 propanediol은 각각 31.7, 39.1, 28.0 및 23.1%였다. 空透明帶內에 收納한 分割 桑實胚에는 각각 72.4, 68.7, 64.0 및 59.5%였다.

이상과 같이 裸化 分割桑實胚와 空透明帶內에 收納 分割桑實胚의 발육률은 큰 差異가 認定되었으며 凍結 保護劑에 의한 差異도 認定되었다. 分割胚의 凍結保存에서 透明帶의 有無는 발육율에 크게 영향을 미치는

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

Type of embryos	Cryoprotective agents	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	Normal blastocyst (%)	Blastomers degenerated (%)
Bisecting morula(1/2)	DMSO	86	82	26 (31.7)	56 (68.3)
	Glycerol	92	87	34 (39.1)	53 (60.9)
	Ethylene glycol	78	75	21 (28.0)	54 (72.0)
	Propanediol	82	78	18 (23.1)	60 (76.9)
Total or Mean		338	322	99 (30.7)	223 (69.3)
Z. Pencased into alien	DMSO	90	87	63 (72.4)	24 (27.6)
	Glycerol	84	83	57 (68.7)	26 (31.3)
	Ethylene glycol	88	86	55 (64.0)	31 (36.0)
	Propanediol	76	74	44 (59.5)	30 (40.5)
Total or Mean		338	330	219 (66.4)	111 (33.6)

요인으로 나타났다. 이와 같은 결과는 Ogawa와 Fjikura(1983)와 Hwang 등(1986)의 성적과 대체로 일치되고 있다. 따라서凍結保護劑 種類와 分割胚의 凍結, 融解後의 발달율은 DMSO와 glycerol이 우수하였으며 ethylene glycol, propanediol의 순으로 나타났다.

2. 分割胚盤胞의 凍結·融解後의 生存率

裸化 分割胚盤胞 및 空透明帶內 收納한 分割胚盤胞를 4種類의 凍結保護劑를 使用하여 凍結·融解하였을 때 生存率은 Table 2에서 보는 바와 같다. 凍結·融解後의 體外培養으로 정상적으로 발육된 비율은 裸化 分割胚盤胞에서 DMSO, glycerol, ethylene glycol 및 propanediol은 각각 48.3, 44.8, 32.1 및 28.6%였다. 空透明帶內 收納한 分割胚盤胞에서는 각각 73.6, 67.4, 53.0 및 49.1%였다. 이상과 같이 裸化 分割胚盤胞와 空透明帶內 收納 分割胚盤胞의 발육율은 큰 差異가 認定되었으며 凍結保護劑에 의한 差異도 認定되었다. 이와 같은 결과는 Ogawa와 Fjikura(1983)와 Hwang 등(1983)의 생쥐성적과 대체로 일치되는 경향이였다. Lehn-Jensen과 Willadsen(1983)은 소의 胚를 절단하여 2分割胚 및 4分割胚로 만들고 空透明帶內 收納하여 凍結後 각각 70 및 75%의 발육율을 얻을 수 있었다고 하였고, Niemann 등(1987)은 소의 胚를 兩分하여 agar chip로 봉하여 동결후 68.5%의 발육율

을 얻은 보고와도 合致되는 경향이였다.

透明帶가 정상적인 胚는 -30℃까지 冷却하여도 透明帶의 내측에는 氷晶의 形成이 인정되지 않으므로 細胞가 직접 氷晶에 접촉될 가능성은 낮으나 透明帶가 除去되었을 때는 植水後 반드시 細胞는 氷晶間에 埋沒되기 때문에 傷害를 받을 것으로 思料된다.

3. 凍結 分割卵의 融解溫度 差異에 의한 生存率

空透明帶內 收納한 分割桑實胚와 分割胚盤胞를 4種類의 凍結保護劑를 使用하여 凍結·融解하였을 때 融解溫度 差異에 의한 生存率은 Table 3에서 보는 바와 같다. 凍結·融解後의 體外培養으로 정상적으로 발육된 비율은 室溫에서 融解하였을 때 分割桑實胚에서 DMSO, glycerol, ethylene glycol 및 propanediol은 각각 67.1, 62.3, 57.7 및 53.0%였으며 分割胚盤胞에서는 각각 70.8, 65.4, 56.6 및 52.1%였다.

37℃에서 融解하였을 때 分割桑實胚에서 각각 74.3, 71.3, 63.9 및 57.4%였으며 分割胚盤胞에서는 각각 76.0, 69.1, 61.1 및 56.1%였다.

이상과 같이 37℃의 溫湯에서 融解는 室溫에서 融解한 것보다 細胞에 損傷을 입은 胚의 數가 증가하였다. 이것은 牛의 未受精卵의 凍結에서 얻은 結果와 일치하고 있다. (Takeda, 1987) DMSO와 ethylene glycol로 凍結한 分割卵은 37℃에서 融解하였을 때 細胞에 損傷을 받은 割球數는 적었다. 그러나 室溫에서 融解

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

Type of embryos	Cryoprotective agents	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	Normal blastocyst (%)	Blastomers degenerated (%)
Bisecting blastocyst(1/2) Z. Premoved	DMSO	128	120	58 (48.3)	62 (51.7)
	Glycerol	132	125	56 (44.8)	69 (55.2)
	Ethylene glycol	114	109	35 (32.1)	74 (67.9)
	Propanediol	108	98	28 (28.6)	70 (71.4)
	Total or Mean	482	452	177 (39.2)	275 (60.8)
Bisecting blastocyst(1/2) Z. Pencased into alien	DMSO	112	106	78 (73.6)	28 (26.4)
	Glycerol	138	132	89 (67.4)	43 (32.6)
	Ethylene glycol	122	117	62 (53.0)	55 (47.0)
	Propanediol	120	112	55 (49.1)	57 (50.9)
	Total or Mean	492	467	284 (60.8)	183 (39.2)

Table 3. Effects of thawing temperature in the freezing medium on the survival rate of bisected morula and blastocyst

Type of embryos	Cryoprotective agents	Thawing temperature (°C) and embryos numbers			
		Room		37°C	
		Frozen	Survived(%)	Frozen	Survived(%)
Bisecting morula(1/2)	DMSO	82	55 (67.1)	74	55 (74.3)
	Glycerol	69	43 (62.3)	80	57 (71.3)
	Ethylene glycol	78	45 (57.7)	72	46 (63.9)
	Z. Premoved	66	35 (53.0)	68	39 (57.4)
	Total or Mean	295	178 (60.3)	294	197 (67.0)
Bisecting blastocyst(1/2)	DMSO	72	51 (70.8)	75	57 (76.0)
	Glycerol	81	53 (65.4)	68	47 (69.1)
	Ethylene glycol	76	43 (56.6)	72	44 (61.1)
	Z. Pencased into alien	71	37 (52.1)	66	37 (56.1)
	Total or Mean	300	184 (61.3)	281	185 (65.8)

하였을 때 損傷된 細胞數는 急激히 증가하였다. Glycerol은 融解條件의 差異에 關係없이 각 시기의 割球를 양호하게 保護하였다.

IV. 摘要

본 연구에서는 凍結保護物質의 種類와 融解溫度의 差異에 의한 생쥐 分割胚의 生存率을 檢討하였다.

1. 凍結·融解後의 體外培養으로 정상적으로 발육된 비율은 裸化 分割桑實胚에서 DMSO, glycerol, ethylene glycol 및 propanediol은 각각 31.7, 31.9, 28.0 및 23.1%였다.
2. 空透明帶內에 收納한 分割桑實胚의 生存率은 각각 72.4, 68.7, 64.0 및 59.5%였다.
3. 裸化 分割胚盤胞의 生存率은 각각 48.3, 44.8, 32.1 및 28.6%였다.
4. 空透明帶內에 收納한 分割胚盤胞의 生存率은 각각 73.6, 67.4, 53.0 및 49.1%였다.
5. 凍結·融解後의 體外培養으로 정상적으로 발육된 비율은 室溫에서 融解하였을 때 空透明帶內에 收納한 分割桑實胚에서 DMSO, glycerol, ethylene glycol 및 propanediol은 각각 67.1, 62.3, 57.7 및 53.0%였으며 空透明帶內에 收納한 分割胚盤胞의 生存率은 각각 70.8, 65.4, 56.6 및 52.1%였다.

6. 37°C에서 融解하였을 때 空透明帶內에 收納한 分割桑實胚의 生存率은 각각 74.3, 71.3, 63.9 및 57.4%였으며 空透明帶內에 收納한 分割胚盤胞의 生存率은 각각 76.0, 69.1, 61.1 및 56.1%였다.

V. 引用文獻

1. Anderson, G. B. 1985. Indentification of sex in mammalian embryos. *In*: Genetic engineering of animals (Evans JW et al. ed.), Plenum press, New York. pp 243-250.
2. Bondioli, K. R., S. B. Ellis, J. H. Pryor, M. W. Williams and M. M. Harpold. 1989. The use of male-specific chromosomal DNA fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos. *Theriogenology*, 31: 95-104.
3. Hwang, W. S., A. Nakagawa, M. Hishimura, Y. Takahashi and H. Kanagawa. 1986. Tge 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. Mohr, L. R. and A. O. Trounson. 1981. Structural changes associated with freezing of bovine embryos. *Biol. Reprod.*, 25, 1009-1025.
6. Monk, M. and A. H. Handyside. 1988. Sexing of preimplantation mouse embryos by measurement of X-linked gene dosage in a single blastomere. *J. Reprod. Fert.*, 82: 365-368.
7. Nelson, C. F. and L. D. Nelson, 1988. Cryopreservation of 7- to 9-day bovine embryos. *Theriogenology*, 29, 281.
8. Niemann, H., J. H. Pryor and K. R. Bondiol. 1987. Effects of splitting the zona pellucida and subsequent sealing on freezing survival of day-7 bovine embryo. *Theriogenology*, 28: 675-681.
9. Ogawa, S. and H. Fjikura. 1983. Cryoviability of the half embryos isolated by micrugy from early developmental stage embryos in mice and rabbits. *Institute of Science and Technology Meiji University*. 62: 25-34.
10. Slade, N. P., T. Takeda, E. L. Squires, R. P. Elsdén and G. E. Jr. Seidel. 1985. A new procedure for cryopreservation of swine embryos. *Theriogenology*, 24: 45-58.
11. Suzuki, I. T. and Shimohira. 1986. Viability of frozen-thawed bovine embryos bisected in sucrose. A preliminary report. *Theriogenology*, 26: 333-339.
12. Takeda, T., R. P. Elsdén and G. E. Jr. Seidel. 1985. Survival of cryopreserved bovine embryos cooled at 0.5 or 1°C /minute. *Theriogenology*, 23, 232.
13. Takeda, T. 1987. Effect of thawing procedures on damage to zonae pellucidae of bovine ova frozen in plastic straws. *Theriogenology*, 27, 284.
14. Willadsen, S. M. 1979. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature*, 277: 298-300.
15. Willadsen, S. M. 1982. Manipulation of eggs. In: *Mammalian Egg Transfer*. Ed. Adams, C. F. CRC press, Boca Raton, FL, pp: 185-210.
16. Willadsen, S. M., H. Lehn-Jensen, C. B. Fehilly and R. Newcomb. 1981. The production of monozygotic twins of preselected parentage by micromanipulation of nonsurgically collected cow embryos. *Theriogenology*, 15: 23-29.
17. 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.