

급속동결한 마우스 상실배의 체외배양후 생존성에 관하여

신 상 태

서울대학교 수의과대학

Viability of Mouse Morula Embryos Frozen Rapidly in Liquid Nitrogen Vapour

Sang Tae Shin

College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon

Summary

The effects of cryoprotectants (glycerol, DMSO and ethylene glycol) and the concentrations (0, 0.25, 0.5 and 1.0 M) of sucrose in the diluent on the *in vitro* survival of mouse morulae frozen rapidly in liquid nitrogen vapour were examined.

When the embryos were equilibrated in 1.5 M cryoprotectants + 0.25 M sucrose in one-step or in 3.0 M cryoprotectants + 0.25 M sucrose in two-step and diluted with 0, 0.25, 0.5, or 1.0 M sucrose solution after thawing, high survival rates were obtained in ethylene glycol (48.0% to 88.2 %) or in glycerol (35.0 % to 77.8 %).

These results show that 1.5 M ethylene glycol is a highly efficient cryoprotective agent for the rapid freezing of mouse morula embryos and 0.5 M sucrose was optimal concentration in the diluent after thawing.

서 론

동결수정란의 생사는 동결 및 융해과정에서 세포내액과 세포외액의 빙정형성에 따라 발생하는 삼투압 stress와 기계적 stress의 강도에 의해 결정된다(Schneider와 Mazur, 1984; Leibo와 Mazur, 1987; Bank와 Mazur, 1973). 따라서 동결수정란의 생존성을 극대화하기 위해서는 과도한 빙정의 형성을 방지하기 적절한 탈수방법과 융해후 수정란 내외에 잔류하는 동결보호제를 신속하고 완전하게 제거하여 수정란을 원상에 가깝도록 회복시키는 방법이 강구되어야 한다.

최초로 수정란의 동결보존에 성공한 Whittingham 등(1972)과 Wilmut(1972)는 마우스 수정란을 동결보존하기 위해서는 완만동결(-2.0~0.8°C/분)과 완만융해(4~25°C/분)가 필수적이라 하였으나, 이후 Willadsen(1976) 및 Polge와 Willadsen(1978)은 소 및 양 수정란을 -30°C 및 36°C 까지는 비교적 완만한 속도(0.3°C/분)로 동결한 후 -196°C의 액

체질소내에 직접 침지하는 2 단계 동결법과 급속 융해법(360°C/분)으로 높은 생존율을 얻었다고 하였다.

최근에 이르러 수정란의 동결전 탈수 및 융해후 동결보호제의 제거시에 sucrose를 이용하면 세포내액의 빙정형성을 극소화 할수 있으며, 급격한 삼투압의 변화로 인한 수정란의 손상을 방지할 수 있다는 이론에 근거한 수정란의 급속동결법이 개발되어 동물수정란의 동결에 소요되는 시간과 경비를 절감할 수 있게 되었다(Szell과 Shelton, 1987, 1988; Chupin과 De Reviere, 1986; Leibo, 1984; Schneider와 Mazur, 1984). 그러나 아직 급속동결법에 대한 연구는 동결보호제로서 glycerol을 이용한 것에 국한되어 있으며, 보문도 그리 많지 않다.

이에 저자는 급속동결시에 동결보호제인 glycerol, DMSO 및 ethylene glycol과 희석액으로서 농도를 달리한 sucrose액과의 상호관계에 따른 마우스 수정란의 생존성을 연구함으로써, 수정란의 급속동결시에 높은 생존율을 얻을 수 있는 최적조건을 구

하여 차후 산업동물의 수정란동결시에 응용하고자 본실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용된 공란마우스는 생후 약 4주령, 체중 약 20g의 ICR 계 미성숙 마우스였다. 사육조건은 실내온도를 20°C 정도로 유지하였으며, 오전 7시부터 오후 8시까지 13시간 동안은 점등하고 오후 8시부터 오전 7시까지 11시간 동안 소등하여 명암을 조절하였다. 사료와 물은 실험동물용 펠렛사료(천호 제일사료)와 깨끗한 수도물을 자유급식시켰다.

2. 과배란처리 및 수정란의 채취

과배란처리는 Hetherington(1987)의 방법에 준해 오후 4시에 pregnant mare's serum gonadotrophin (Folligon*, Intorvet Lab., Holland, 이하 PMSG로 약함) 7.5IU를, 그리고 47시간 후에 human chorionic gonadotrophin(Chorulon*, Intervet Lab., Holland, 이하 HCG로 약함) 7.5IU를 부강내 주사하였다. HCG 투여후 즉시 생후 10주령 이상인 동계의 수마우스와 동수로 하룻밤을 동거시키고 다음날 아침에 질전의 형성유무를 관찰하여 교미여부를 확인하였다.

HCG 투여후 평균 77시간에 공란마우스를 경추 탈구법으로 도살하여 난관 및 자궁의 절단, 분리하였다. 분리한 난관 및 자궁은 HEPES buffer가 첨가된 modified Krebs-Ringer bicarbonate medium (Quinn 등, 1982; 이하 M2-medium으로 약함)이 들어있는 plastic petri dish에 넣어 25배의 싼제현미경하에서 M2-medium이 들어있는 1ml 주사기에 끝이 무딘 30 gauge 재란용 주사침을 부착시켜 난관은 난관재측에서 하향식으로, 자궁은 자궁경관측에서 상향식으로 관류하여 상싼배기의 수정란을 채취하였다.

채취한 수정란은 100배의 도립현미경하에서 형태를 검정하여 정상형태를 지닌 상싼배만을 선정하여 실험에 사용하였다.

3. 동결보존

1) 동결보호제의 종류

동결보호제로는 glycerol, DMSO ethylene glycol의 3 종류를 선택하였으며, 동결보호제의 첨가농도는 각각 1.5 및 3.0M이었다. 동결액으로는 10%의 소태아혈청(fetal calf serum, 이하 FCS로 약함)이 첨가된 modified Dulbecco's buffered medium (Whittingham, 1974, 이하 10% FCS+PBI로 약함)에 sucrose를 0.25M이 되게 첨가하여 사용하였다.

2) 동결 및 용해방법

채취한 수정란은 실온에서 10% FCS+PBI로 각 5분간 2회 세척한 후 동결실험에 사용하였다. 동결보호제의 농도를 1.5M로 정한 군은 실온에서 각각의 동결보호제가 1.5M씩 함유된 3ml의 동결액내에 직접 잠지하여 10분간 유지하는 1단계로, 그리고 동결보호제의 농도를 3.0M로 정한 군은 각각의 동결보호제가 1.5 및 3.0M 함유된 3ml의 동결액내에 각각 10분간 유지하여 2단계로 동결보호제를 첨가, 평형시켰다.

최종농도인 1.5M 또는 3.0M의 동결보호제로 평형시킨 수정란은 0.25ml plastic straw에 각 straw당 7~15개씩 주입한 후, 조 등(1987)의 방법에 준하여 급속동결을 실시하였다. 동결한 수정란은 액체질소내에서 1~10일간 보존하였다.

수정란의 용해는 straw를 액체질소에서 꺼낸 즉시 38°C의 온수에 30초간 침지하여 급속용해하였다. 용해한 수정란은 실온에서 각각 0, 0.25, 0.5 및 1.0M의 sucrose가 함유된 3ml의 10% FCS+PBI에 직접 침지하여 10분간 방치한 후 3ml의 신선한 10% FCS+PBI로 수정란을 옮겨 5분간씩 2회 세척함으로써 동결보호제를 제거하였다.

4. 체외배양 및 생존성 판정

동결, 용해한 수정란은 동결보호제를 제거시킨 후 3ml의 Brinster's mouse ovum culture medium-3 (Brinster, 1971; 이하 BMOC-3로 약함)액으로 각 5분간씩 3회 세척한 다음 light weight paraffin oil(Mineral oil, Sigma, U, S. A)을 도포한 Brinster(1963)의 미소척배양법에 준해 37°C, 5% CO₂, 95% 공기 및 습도가 포화상태인 CO₂배양기(이하 CO₂배양기로 약함)내에서 48시간 이상 체외배양하면서 중기배반로 이상으로 발육되면 생존한 것으로

관정하였다.

5. 통계학적 분석

동결, 용해한 수정란의 체외배양후 생존율에 대한 비교는 한개의 straw내에 주입, 동결한 수정란 (7~15개)을 기본단위로하여 SPSS 통계system (Nie 등, 1975)을 이용하여 one-way 분산분석을 실시하였으며, 측정치는 생존율(%)로 나타내었다.

결 과

상실배기의 마우스수정란을 1.5M의 glycerol, DMSO 및 ethylene glycol을 동결보호제로서 1단계로 첨가, 평형시킨 후 급속동결, 용해한 후 sucrose의 첨가농도를 각각 0, 0.25, 0.5 및 1.0M로 달리한 희석액으로 동결보호제를 제거한 다음 체외배양한 결과, glycerol에서는 각각 50.0, 88.7, 77.8 및 37.5%가, DMSO에서는 각각 57.1, 85.7, 37.5 및 14.8% 그리고 ethylene glycol에서는 각각 59.4, 66.7, 88.2 및 70.0%가 배반포로 발육되어 희석액 중의 sucrose의 첨가농도에 따른 생존율은 glycerol 및 ethylene glycol에서는 0.5M, 그리고 DMSO에서는 0.25M일 경우에 가장 높았으나, DMSO에

서의 생존율을 제외한 나머지 2 가지 동결보호제에서는 유의성이 인정되지 않았다.

그러나 각 동결보호제간에는 희석액에 sucrose를 0, 0.25, 및 0.5M되게 첨가한 경우에는 상기의 3 가지 동결보호제간의 생존율에 대한 유의차는 인정되지 않았으나 희석액에 sucrose를 1.0M되게 첨가한 경우에는 뚜렷한 유의차가 인정되었으며 ($P < 0.01$), 생존율은 ethylene glycol, glycerol 그리고 DMSO의 순으로 높았다(Table 1).

이에 비해 3.0M의 glycerol, DMSO 및 ethylene glycol을 동결보호제로서 2 단계로 첨가, 평형시킨 후 급속동결한 집합배를 용해후 sucrose의 첨가농도를 각각 0, 0.25, 0.5 및 1.0M로 달리한 희석액으로 동결보호제를 제거한 경우, 체외배양에서 배반포로 발육된 생존율은 glycerol에서는 각각 35.0, 38.9, 72.7 및 70.0%였으며, DMSO에서는 각각 21.1, 10.0, 10.7 및 0.0%였고, ethylene glycol에서는 각각 52.4, 48.0, 73.3 및 80.0%로서 ethylene glycol 및 glycerol에서의 생존율이 DMSO에서 비해 월등히 높았으며, 특히 희석액중에 sucrose를 0.5 및 1.0M되게 첨가한 경우 ethylene glycol 및 glycerol에서의 생존율은 DMSO에서에 비해 현저히 높은 결과를 나타내었다($P < 0.01$).

Table 1. The effects of cryoprotectants at 1.5 M level and sucrose in the diluent on the viability of mouse morula embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour

Cryoprotectants	Percentage of embryos developed to blastocyst 48 hours after in vitro culture*			
	Sucrose concentration (M)			
	0	0.25	0.5	1.0
Glycerol	50.0 (14/28)	66.7 (14.21)	77.8 (14/18)a	37.5 (9/24)c
	57.1 (12/21)	85.7 (18/21)f	37.5 (6/16)b,g	14.8 (4/27)d,g
Ethylene glycol	59.4 (19/32)	66.7 (15/24)	88.2 (15/17)a	70.0 (21/30)e

*: (No. of embryos developed/No. of embryos cultured).

a,b: Different subscripts denote significant differences within column ($P < 0.05$).

c,d,e: Different subscripts denote significant differences within column ($P < 0.01$).

f,g: Different subscripts denote significant differences between row ($P < 0.05$).

Table 2. The effects of cryoprotectants at 3.0 M level and sucrose in the diluent on the viability of mouse morula embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour

Cryoprotectants	Percentage of embryos developed to blastocyst 48 hours after in vitro culture*			
	Sucrose concentration (M)			
	0	0.25	0.5	1.0
Glycerol	35.0 (7/20)	38.9 (7/18)a	72.7 (24/33)c	70.0 (21/30)c
DMSO	21.1 (4/19)	10.0 (2/20)b	10.7 (3/28)d	0.0 (0/28)d
Ethylene glycol	52.4 (11/21)	48.0 (12/25)a	73.3 (22/30)c	80.0 (24/30)c

*: (No. of embryos developed/No. of embryos cultured).

a,b: Different subscripts denote significant differences within column ($P < 0.05$).

c,d: Different subscripts denote significant differences within column ($P < 0.01$).

그러나 각각의 동결보호제에 대한 희석액중의 sucrose 첨가농도에 따른 생존율은 비록 sucrose의 첨가농도가 0.5 및 1.0M인 경우에서 높은 경향을 보였으나 유의차는 인정되지 않았다(Table 2).

고 찰

동물수정란의 동결법은 지난 10여년동안 급속도로 발전되어 왔다. 특히 1980년대 후반에 개발된 급속동결법은 수정란의 동결보존에 획기적인 전기가 될 것으로 전망된다.

본 연구결과, 마우스 수정란을 액체질소 가스내에 직접 침지하여 급속동결할 때 동결보호제로 1.5 M의 DMSO 및 ethylene glycol을 이용하면 동일농도의 glycerol에 비해 높은 수준의 생존율을 얻을 수 있음이 확인되었다. 이러한 결과는 마우스수정란의 2단계 급속동결시에 동결보호제로서 DMSO를 이용하여 glycerol에서보다 높은 생존율을 얻을 수 있다는 Wood 등(1987), Kasai 등(1980) 및 Leibo와 Mazur(1978)의 결과나, ethylene glycol을 이용하면 glycerol에서 보다 월등히 높은 생존율을 얻을 수 있다는 Miyamoto와 Ishibashi(1983)의 결과와 일치된다. 그러나 Kasai 등(1981)은 2단계로 급속동결한 마우스 상실패의 용해후 생존율은 1.5M의 DMSO, glycerol 및 ethylene glycol에서 각각 85

%, 49% 및 20%로서 DMSO에서 가장 높았다고 하였다.

동결보호제로서 3.0M의 DMSO를 사용하였을 경우에는 glycerol 및 ethylene glycol에 비해 생존율이 현저히 낮았다. 이러한 결과는 2.0M 이상의 DMSO는 독성이 강하여 수정란의 생존율이 현저히 감소시킨다는 Wood 등(1987)의 견해나, ethylene glycol 및 glycerol은 DMSO에 비해 독성이 적으므로 유용한 동결보호제라고 한 Kasai 등(1981)의 보고 및 2M의 DMSO를 동결보호제로 급속동결한 마우스 상실패의 생존율은 2M의 glycerol이나 ethylene glycol에서에 비해 매우 낮았다는 Miyamoto와 Ishibashi(1988)의 결과와는 부합되나, 0.25~0.5M의 sucrose를 첨가하면 3.0M 이상의 DMSO에서도 높은 생존율을 얻을 수 있다고 한 Trounson 등(1987)의 보고와는 상반된다.

Sucrose는 비투과성 용매로서 동결보호제의 평형이나 희석제거시에 세포표외액의 삼투압을 높여줌으로써, 수분의 탈수나 투과성 용매인 동결보호제가 세포표외로 신속히 확산되게 하여준다(Szell과 Shelton, 1987; Schneider와 Mazur, 1984; Leibo와 Mazur, 1978).

본 연구결과 희석액중의 sucrose 농도는 동결보호제의 농도를 1.5M로 첨가하였을 때는 0.25 및 0.5 M인 경우에서, 그리고 동결보호제의 농도를 3.0M

로 첨가하였을 때는 0.5 및 1.0M에서 높은 생존율을 나타내었다. 이러한 결과는 동결보호제의 농도가 1.0~2.0M인 경우에는 0.25 또는 0.5M의 sucrose액이 투과성 용매인 동결보호제를 제거할 수 있는 세포외액의 적절한 삼투압을 유지시킬 수 있는 농도이며, sucrose의 농도가 1.0M 이상이 되면 수정란이 파달수되어 세포막의 회복이 불가능하게 되므로 수정란이 사멸하게 되며, 동결보호제의 농도가 2.0~5.0M일 때는 1.0M의 sucrose액에서도 삼투압효과에 의한 세포의 손상이 일어나지 않다는 Szell과 Shelton(1987, 1986)의 보고결과와 일치한다.

그러나 1.5M의 DMSO에서는 희석액중의 sucrose의 농도에 상관없이 생존율이 현저히 저하되었던 바 그 원인이 1.5M의 DMSO에서는 0.5M 이상의 sucrose액이 과도한 삼투압 효과를 유발한 것인지, 그리고 3.0M의 DMSO는 DMSO의 독성에 기인된 것인지는 확인할 수 없었으므로 차후 지속적인 연구가 요망된다.

동결보호제로서 ethylene glycol을 이용하였을 경우에는 희석액중의 sucrose 농도에 관계없이 glycerol이나 DMSO에 비해 높은 생존율을 얻을 수 있었으므로 급속동결시 ethylene glycol이 가장 우수한 동결보호제이며, 희석액중의 sucrose 농도의 0.5M이 가장 좋은 것으로 사료된다.

결 론

급속동결한 마우스 수정란의 생존성을 증진시키기 위해 glycerol, DMSO 및 ethylene glycol의 3가지 동결보호제를 각각 1.5M 및 3.0M 되게 첨가한 후 액체질소 가스내에서 급속동결한 마우스 상신패를 용해후 희석액중의 sucrose를 각각 0, 0.25, 0.5 및 1.0M되게 첨가하여 동결보호제를 제거한 다음 체외배양하여 그 생존성을 관찰하였다.

실험결과, 상기의 3 가지 동결보호제를 1.5M 되게 1 단계로 첨가, 평형시키고 급속동결한 마우스 상신패의 용해후 생존율은 희석액중의 sucrose 농도가 0.25M일 경우 DMSO(85.7%)에서 가장 높았고, 0.5M일 경우 ethylene glycol(88.2%) 및 glycerol(77.8%)에서 DMSO(37.5%)에서에 비해 유의성있게 높았으며 ($P < 0.05$), 1.0M일 경우 ethy-

lene glycol(70.0%), glycerol(37.5%) 그리고 DMSO(14.8%)의 순으로 현저한 차이를 나타내었다 ($P < 0.01$).

상기의 3 가지 동결보호제를 3.0M되게 2 단계로 첨가, 평형시키고 급속동결한 마우스 상신패의 용해후 생존율은 희석액중에 sucrose를 0.25, 0.5 및 1.0M되게 첨가한 경우의 ethylene glycol 및 glycerol에서 DMSO에서에 비해 현저히 높았으며 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), glycerol 및 ethylene glycol에서는 희석액중에 sucrose를 0.5M 및 1.0M되게 첨가한 경우에서 높은 생존율을 나타내었다.

참 고 문 헌

- Bank H and Mazur P. 1973. Visualization of freezing damage. *J. Cell Biol.*, 57: 729-742.
- Brinster RL. 1971. Measuring embryonic enzyme activity. In: Daniel JC. Jr. *Methods in mammalian embryology*. W.H. Freeman and Company, San Francisco, USA, pp. 215-227.
- Brinster RL. 1963. A method for in vitro cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. *p. Cell Res.*, 32: 205-208.
- Chupin D and De Reviers MM. 1986. Quick freezing of rat embryos. *Theriogenology*, 26: 157-166.
- Hetherington CM. 1987. Mouse husbandry. In: Monk, M. *Mammalian development: a practical approach*. IRL press, Oxford, pp. 1-12.
- Kasai M, Niwa K and Iritani A. 1981. Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 63: 175-180.
- Kasai M, Niwa K and Iritani A. 1980. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J. Reprod. Fert.*, 59 51-56.
- Leibo SP. 1984. A one step method for direct non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 21: 767-790.
- Leibo SP and Mazur P. 1978. Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. In: Daniel. J.C. Jr. *Methods in mammalian reproduction*. Academic press, New York, pp. 179-201.
- Miyamoto H and Ishibashi T. 1988. Liquid nitrogen va-

- pour freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 78: 471-478.
- Miyamoto H and Ishibashi T. 1983. Survival of mouse embryos frozen-thawed slowly or rapidly in the presence of various cryoprotectants. *J. Exp. Zool.*, 226: 123-127.
- Nie NH, Hull CH, Jenkins JG, Steinbrenner K and Bent DH. 1975. *Statistical package for the social sciences (SPSS)*. 2nd ed. McGraw-Hill, New York. pp. 398-433, 267-275.
- Polge C and Willadsen SM. 1978. Freezing eggs and embryos of farm animals. *Cryobiology*, 15: 370-373.
- Quinn P, Barros C and Whittingham DG. 1982. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 66: 161-168.
- Schneider U and Mazur P. 1984. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology*, 21: 68-79.
- Szell A and Shelton JN. 1987. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solutions on day-3 mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 80: 309-316.
- Szell A and Shelton JN. 1986. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. *J. Reprod. Fert.*, 76: 401-408.
- Trounson A, Peura A and Kirby C. 1987. Ultrarapid freezing: a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil. Steril.*, 48: 843-850.
- Whittingham DG. 1974. Embryo banks in the future of developmental genetics. *Genetics*, 78: 395-402.
- Whittingham DG, Leibo SP and Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . *Science*, 178: 411-414.
- Willadsen SM, Polge C, Rowson LEA and Moor RM. 1976. Deep freezing of sheep embryos. *J. Reprod. Fert.*, 46: 151-154.
- Wilmot 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 Sci.*, 11: 1071-1079.
- Wood MJ, Whittingham DG and Rall WF. 1987. The low temperature preservation of mouse oocytes and embryos. In: Monk M. *Mammalian development: a practical approach*. IRL press. Oxford. pp. 255-280.
- 조종호, 황우식, 정장욱, 전효정, 이용식, 이상우. 1987. 젖소 수정란의 급속동결법 개발에 관한 연구. *한국임상수의학회지*, 4: 5-11.