

## 동결보호제 및 Sucrose 농도가 급속동결한 마우스 집합배의 생존성에 미치는 영향

신 상 태

충남대학교 수의과대학

(1991. 8. 1 접수)

### Effects of cryoprotectants and sucrose concentrations on the viability of aggregated mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour

Sang-tae Shin

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University

(Received Aug 1, 1991)

**Abstract:** The effects of ethylene glycol, DMSO and glycerol as cryoprotectants and the effect of concentrations(0, 0.25, 0.5 and 1.0M) of sucrose in the diluent on the viability of the aggregated morulae frozen rapidly in liquid nitrogen(LN<sub>2</sub>) vapour were examined. The morulae were produced by aggregation of ICR and CBA mice embryos at 8-cell stage.

Before freezing the embryos were equilibrated in 1.5M cryoprotectants+0.25M sucrose in one-step or in 3.0M cryoprotectants+0.25M sucrose in two-steps. The embryos were pipetted into the freezing medium fraction of 0.25ml plastic straws. The straws were frozen by directly transfer into LN<sub>2</sub> vapour(about 1cm above LN<sub>2</sub>) for 2 minutes, and then plunged into LN<sub>2</sub>. After thawing the cryoprotectants were diluted with 0, 0.25, 0.5 or 1.0M sucrose solution.

The post-thawed *in vitro* viability of the aggregated embryos was significantly dependent on the type and concentration of cryoprotectants in the freezing medium and also on the concentration of sucrose in the diluent. When the aggregated embryos were equilibrated in 1.5M cryoprotectants+0.25M sucrose in one-step and diluted with 0.5M sucrose after thawing, the survival rate of the embryos was significantly( $p<0.05$ ) higher in DMSO(62.5%) or ethylene glycol(52.2%) than in glycerol(33.3%). In the case that the concentration of the cryoprotectants was raised to 3.0M in two-steps, the higher survival rate of the embryos was obtained in ethylene glycol or glycerol than in DMSO followed by diluting them with 0.5 or 1.0M sucrose after thawing( $p<0.01$ ).

**Key words:** Cryoprotectants, sucrose, rapid freezing, aggregated mouse embryo.

### 서 론

최근 포유동물 특히 마우스 수정란의 동결법은 간단한 기구를 사용하여 단지간내에 많은 수정란을 빠르게 동결시키면서도 높은 생존율을 얻을 수 있는 방법인 급속동결법으로 전환되고 있다.<sup>1,2</sup> 그러나, 급속동결시

에는 과도한 빙정의 형성에 따른 극심한 삼투압 및 물리적 stress가 가해짐으로 완만동결에 비해 융해후 생존율이 심하게 저하된다.<sup>3,4</sup> 그러므로 이러한 stress를 최대한으로 줄이는 것이 동결수정란의 생존율을 높이는 첩경이며, 동결보호제의 종류와 농도 및 융해후 동결보호제의 제거방법은 동결방법과 더불어 수정란의

생사를 결정하는 가장 중요한 요인으로 작용한다.<sup>4-7</sup> 이중 동결보호제로는 1.5~3.0M의 glycerol, DMSO 및 ethylene glycol이, 그리고 동결보호제의 제거방법으로는 0.25~2.0M의 sucrose희석법이 현재 가장 높은 생존율을 나타내는 것으로 알려져 있다.<sup>7-13</sup>

그러나 수정란의 동결보존실험은 투명대가 존재하는 intact embryo에 관한 보문이 대부분이며, 투명대제거배에 대한 보고는 그리 많지 않다.<sup>14-16</sup> 특히 집합배의 동결 보존에 관한 보고는 극히 희소할 뿐만아니라,<sup>17,18</sup> 아직까지 집합배의 급속동결에 관한 연구보고는 전무하다.

### 재료 및 방법

**집합배의 작성:** 공란마우스는 생후 약 4주령의 ICR 계 미성숙 마우스로서, PMSG 및 hCG를 복강내 주사하여 과배란을 유도하였다.<sup>19</sup> hCG투여후 평균 66시간에 8세포기배를 채취하여 0.5% pronase액으로 투명대를 제거하였다. 투명대가 제거된 수정란은 소량의 Brinster's mouse ova culture medium<sup>20</sup>(이하 BMOc-3액)에 각각 한쌍의 수정란을 정지시키고, 前報<sup>18</sup>의 집합배작성법에 따라 접착시킨후 체외배양하였다. 접착시킨배는 24시간 체외배양한 후 100배의 도립현미경 하에서 검사하여 단일소형화상실배로 발육된 것만을 동결보존실험에 사용하였으며, 대조군은 투명대를 제거한 정상적인 소형화 상실배를 이용하였다.

**동결보존:** 동결보호제로는 glycerol, DMSO 및 ethylene glycol의 3종류를 선택하였으며, 수정란은 실온에서 10% fetal calf serum 첨가 Dulbecco's phosphate buffered saline(이하 FCS+PBS)에 각각의 동결보호제가 1.5M 또는 3.0M씩 함유된 3ml의 동결액내에 10분간씩 1단계 또는 2단계로 침지하여 동결보호제를 첨가, 평형시켰다. 최종농도인 1.5M 또는 3.0M의 동결보호제로 평형시킨 수정란은 0.25ml plastic straw에 주입하여 액체질소 표면 약 1cm 상부에서 2분간 유지(seeding) 한후 액체질소내에 직접 침지하는 방법으로 급속동결시킨 후 액체질소내에서 4일 이상 보존하였다 액체질소에서 straw를 꺼낸 즉시 38°C의 온수에 30초간 침지하여 급속융해하였다. 융해한 수정란은 실온에서 각각 0, 0.25, 0.5 또는 1.0M의 sucrose가 함유된 3ml의 FCS+PBS에 10분간 유지시킨 다음, FCS+PBS로 5분간씩 2회 세척함으로써 동결보호제를 제거하였다.

**체외배양 및 생존성판정:** 동결, 융해한 수정란은 동결보호제를 제거시킨후 3ml의 BMOc-3액으로 각 5분간씩 3회 세척한 다음 5% CO<sub>2</sub> 배양기내에서 48시간

이상 체외배양하면서 증기배반포이상으로 발육되면 생존한 것으로 판정하였다. 측정치는 생존율(%)로 나타내었으며, one-way 분산분석을 이용하여 통계처리하였다.

### 결 과

동결보호제로서 1.5M의 glycerol, DMSO 및 ethylene glycol을 1단계로 첨가, 평형시킨 후 급속동결한 집합배를 융해 후 sucrose의 첨가농도를 각각 0, 0.25, 0.5 및 1.0M로 달리한 희석액으로 동결보호제를 제거한 경우, 체외배양에서 배반포로 발육된 생존율은 glycerol에서는 각각 11.1, 28.1, 33.3 및 36.8%로서 sucrose 첨가농도에 따른 유의차가 인정되지 않았다. 그러나, DMSO에서는 각각 23.3, 33.3, 62.5 및 11.1%의 생존율을 그리고 ethylene glycol에서는 각각 19.4, 46.7, 52.2 및 12.9%의 생존율을 보여 희석액에 sucrose를 0.5M되게 첨가한 경우가 0 및 1.0M되게 첨가한 경우에 비해 유의성있게 높은 생존율을 나타내었다 ( $p < 0.05$ ). 또한 각 동결보호제간에는 희석액에 sucrose를 0.5M되게 첨가한 경우에는 DMSO에서의 생존율이 glycerol에서보다 유의성있게 높았으나 ( $p < 0.05$ ), 반대로 희석액에 sucrose를 1.0M되게 첨가한 경우에는 glycerol에서의 생존율이 DMSO 및 ethylene glycol에서의 생존율보다 유의성있게 높았다( $p < 0.05$ ). 이에 대한 대조군으로서의 투명대제거배에서는 희석액에 각각 0, 0.25, 0.5 및 1.0M로 sucrose의 첨가농도를 달리한 경우, glycerol에서는 각각 33.3, 50.0, 70.0 및 43.5%의 생존율을, DMSO에서는 각각 26.3, 38.1, 50.0 및 12.5%의 생존율을 그리고 ethylene glycol에서는 각각 37.0, 68.0, 52.0 및 43.5%의 생존율을 보여, DMSO에서만 희석액에 sucrose를 0.25 및 0.5M되게 첨가한 경우에서의 생존율이 sucrose의 첨가농도가 1.0M인 경우에서보다 유의성있게 높았을 뿐 ( $p < 0.05$ ), 기타 동결보호제간이나 희석액중의 sucrose 농도차이에 따른 유의차는 인정되지 않았으며 집합배와 투명대제거배간의 유의차도 인정되지 않았다(Table 1).

이에 비해 3.0M의 glycerol, DMSO 및 ethylene glycol을 2단계로 첨가, 평형시킨후 급속동결한 집합배를 융해후 sucrose의 첨가농도를 각각 0, 0.25, 0.5 및 1.0M로 달리한 희석액으로 동결보호제를 제거한 경우, 체외배양에서 배반포로 발육된 생존율은 glycerol에서는 각각 0, 27.3, 44.0 및 40.0%였으며, DMSO에서는 각각 0, 0, 0 및 4.8%였고, ethylene glycol에서는 각각 0, 28.6, 57.1 및 45.8%로서 glycerol 및 ethylene glycol에서 희석액에 sucrose를 첨가한 경우

**Table 1.** The effects of cryoprotectants at 1.5M level and concentration of sucrose in the diluent on the viability of aggregated and zona-free mouse morulae frozen rapidly in liquid nitrogen vapour

Type of embryos	Cryoprotectants	Percentage of embryos developed to blastocyst 48 hours after <i>in vitro</i> culture*			
		Sucrose concentration(M)			
		0	0.25	0.5	1.0
Aggregated	Glycerol	11.1( 3/27)	28.1(9/32)	33.3(9/27)a	36.8(7/19)a
	DMSO	23.3( 7/30)c	33.3(7/21)	62.5(15/24)b, d	11.1(2/18)b, c
	Ethylene glycol	19.4( 6/31)c	46.7(14/30)d	52.2(24/46)d	12.9(4/31)b, c
Zona-free	Glycerol	33.3( 8/24)	50.0(10/20)	70.0(14/20)	43.5(10/23)
	DMSO	26.3( 5/19)	38.1( 8/21)d	50.0( 9/18)d	12.5( 2/16)c
	Ethylene glycol	37.0(10/27)	68.0(17/25)	52.0(13/25)	43.5(10/23)

\* : (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 between rows( $p < 0.05$ ).

**Table 2.** The effects of cryoprotectants at 3.0M level and concentration of sucrose in the diluent on the viability of aggregated and zona-free mouse morulae frozen rapidly in liquid nitrogen vapour

Type of embryos	Cryoprotectants	Percentage of embryos developed to blastocyst 48 hours after <i>in vitro</i> culture*			
		Sucrose concentration(M)			
		0	0.25	0.5	1.0
Aggregated	Glycerol	0.0(0/20)a	27.3( 6/22)b	44.0(11/25)b, d	40.0( 8/20)b, d
	DMSO	0.0(0/21)	0.0( 0/22)	0.0( 0/20)e	4.8( 1/21)e
	Ethylene glycol	0.0(0/21)a	28.6( 8/28)b	57.1(16/28)c, d	45.8(11/24)b, c, d
Zona-free	Glycerol	20.0(4/20)a	55.9(19/34)b, d	62.9(22/35)b, d	56.7(17/30)b, d
	DMSO	10.0(2/20)	9.5( 2/21)e	4.8( 1/21)e	0.0( 0/28)e
	Ethylene glycol	13.6(3/22)a	45.8(11/24)b, d	51.9(14/27)b, d	63.0(17/27)b, d

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

a, b, c : Different subscripts denote significant differences between rows( $p < 0.01$ )

d, e : Different subscripts denote significant differences within column( $p < 0.001$ ).

가 sucrose를 첨가하지 않은 경우에 비해 유의성있게 높은 생존율을 나타내었다( $p < 0.01$ ). 그러나 각 등결 보호제간에는 희석액중의 sucrose 첨가유무에 따라 심한 차이를 보여 희석액에 sucrose를 0.5 및 1.0M 되게 첨가한 경우 glycerol 및 ethylene glycol에서의 생존율은 DMSO에서에 비해 현저히 높은 결과를 나타내었다( $p < 0.001$ ). 이에 대한 대조군으로서의 투명대 제거 배에서도 희석액에 sucrose의 첨가농도를 각각 0, 0.25, 0.5 및 1.0M로 달리한 경우, glycerol에서는 각각 20.0, 55.9, 62.9 및 56.7%의 생존율을, DMSO에서는 각각 10.0, 9.5, 4.8 및 0%의 생존율을, 그리고 ethylene glycol에서는 각각 13.6, 45.8, 51.9 및 63.0%의 생존율을 보여 집합배에서와 유사한 경향을 나타내었으며, 집합배와 투명대 제거배간의 유의차는 인정

되지 않았다(Table 2).

## 고 찰

Kasai et al<sup>8</sup>은 마우스 수정란의 급속동결에는 등결 보호제로서 glycerol, DMSO 및 ethylene glycol을 사용할 수 있으나 DMSO는 용해후 높은 생존율을 나타내지만 glycerol이나 ethylene glycol에 비해 독성이 강하다고 하였으며, Wood et al<sup>13</sup>도 2M 이상의 DMSO는 세포에 유해하다고 하였다. Szell과 Shelton<sup>11,12</sup>은 급속동결, 용해한 수정란의 생존율은 희석액중의 sucrose 농도에 의해 좌우되며 적합한 농도는 0.25에서 1.0M로서 1.0M을 초과할 경우 과도한 삼투압효과로 인해 세포가 과탈수되므로 세포막의 생성이 불가능하게 된다고 하였고, glycerol의 농도를

3.0M 이상으로 했을 경우 동결보호제의 평형은 2단계로 그리고 sucrose의 농도는 1.0M로 높여 주는 것이 바람직하다고 하였다. 본 실험의 결과, 집합배 및 투명대제거배의 급속동결, 용해후 생존율은 희석액 중에 sucrose를 0.25, 0.5 및 1.0M로 첨가한 경우, 동결보호제로서 1.5M의 glycerol에 대해 각각 평균 30 및 54%를, 3.0M의 glycerol에 대해서는 각각 평균 37.3 및 58.6%를 나타내어, 희석액중에 sucrose를 첨가하지 않은 경우에 비해 유의성있게 높았다. 이러한 결과는 급속동결한 수정란은 용해후 sucrose액으로 희석하면 높은 생존율을 나타낸다는 선인들의 보고 결과와는 부합되었으나, 3.0M 이하의 glycerol에서는 sucrose의 농도가 0.25M이 최적 농도라는 Szell과 Shelton<sup>12</sup>의 결과나, 3.0M 이상의 glycerol에서는 sucrose의 농도가 1.0M이 최적농도라고 한 Szell과 Shelton<sup>11</sup>의 결과와는 차이가 있었다.

Kasai et al<sup>8</sup>은 2.0M의 DMSO로 처리한 마우스 상실패는 급속동결, 용해후 0.75M의 sucrose액으로 희석하면 높은 생존율을 얻을 수 있다고 하였다. Wood et al<sup>13</sup>은 2.0M 이상의 DMSO는 세포에 유해하다고 하였고, Miyamoto와 Ishibashi<sup>2</sup>는 2.0M 이상의 DMSO로 처리하면 용해후 생존율이 낮다고 하였다. 그러나 Trounson et al<sup>11</sup>은 DMSO에 0.25 또는 0.5M의 sucrose를 첨가하여 초급속동결한 마우스 2세포기배는 DMSO의 농도가 3.0~4.0인 경우에도 60% 이상의 생존율을 나타낸다고 하였다. 본 실험결과, 동결보호제로서 1.5M의 DMSO를 사용한 집합배 및 투명대제거배는 용해후 0.5M sucrose액으로 희석한 경우에서 생존율이 가장 높았으며, sucrose를 첨가하지 않은 경우나 1.0M 이상으로 첨가한 경우에는 낮은 생존율을, 그리고 3.0M 이상의 DMSO를 사용한 경우에는 거의 생존치 못하였다.

Miyamoto와 Ishibashi<sup>2</sup>는 2단계로 급속동결한 마우스 8세포기배의 용해후 생존율은 DMSO에서보다 glycerol 및 ethylene glycol에서 월등히 높았다고 하였으나 Kasai et al<sup>8</sup>은 2단계로 급속동결한 마우스 상실패의 용해후 생존율은 ethylene glycol 및 glycerol에서보다 DMSO에서 월등히 높았다고 하였다. 본 실험에서 동결보호제로 1.5M의 ethylene glycol을 이용, 급속동결한 집합배 및 투명대제거배를 용해후 0.5 및 1.0M sucrose액으로 희석한 경우에서 0, 또는 1.0M의 sucrose액으로 희석한 경우에 비해 비교적 높은 생존율을 나타내었다. 또한 동결보호제로서 3.0M의 ethylene glycol에 대한 생존율은 희석액중에 sucrose를 첨가한 경우에서 첨가하지 않은 경우에 비해 유의성있게 높은

결과를 나타내었다.

따라서 마우스 집합배 및 투명대제거배의 급속동결시 동결보호제의 농도를 1.5M로 하였을 경우에는 glycerol, DMSO 및 ethylene glycol의 3가지가 모두 유용하며 이때의 희석액중의 sucrose 농도는 0.5M인 경우가 가장 적합하다고 생각된다. 또한 동결보호제의 농도를 3.0M로 하였을 경우에는 glycerol 및 ethylene glycol이 효과적인 동결보호제이며 이때의 희석액중의 sucrose 농도는 0.5 또는 1.0M인 경우가 적합하다고 생각된다. 그러나, 본 실험에서 급속동결, 용해후체외배양에서 생존한 집합배는 대부분이 위배반포 또는 trophoctodermal vesicle로 발육되었다. 이러한 결과는 급속동결한 경우에는 완만동결한 경우에서보다 할구의 동태가 더욱 심했던 때문인 것으로 판단되며, 급속동결법은 앞으로 더욱 연구, 발전시켜야 될 것으로 생각된다.

## 결 론

급속동결법으로 동결한 마우스 집합배의 생존율은 동결보호제의 종류와 농도 그리고 희석액중의 sucrose 농도에 따라 유의성있는 차이를 나타내었다.

집합배의 급속동결, 용해후 생존율은 희석액중에 sucrose를 첨가(0.25, 0.5 및 1.0M)한 경우가 sucrose를 첨가하지 않은 경우에 비해 높았으며, 희석액중의 sucrose 농도에 따른 생존율은 동결보호제의 농도가 1.5M인 경우에는 0.5M에서, 그리고 동결보호제의 농도가 3.0M인 경우에는 0.5 및 1.0M에서 가장 높았다 ( $p < 0.05$ ).

동결보호제에 따른 집합배의 용해후 생존율은 동결보호제의 농도가 1.5M인 경우에는 DMSO 및 ethylene glycol에서 glycerol에서보다 유의성있게 높았으나 ( $p < 0.05$ ), 동결보호제의 농도가 3.0M인 경우에는 ethylene glycol 및 glycerol에서 DMSO에서보다 현저히 높았다( $p < 0.01$ ).

## 참 고 문 헌

1. Miyamoto H, Ishibashi T. Survival of mouse embryos frozen-thawed slowly or rapidly in the presence of various cryoprotectants. *J Exp Zool* 1983;226:123~127.
2. Miyamoto H, Ishibashi T. Liquid nitrogen vapour freezing of mouse embryos. *J Reprod Fert* 1986;78:471~478.
3. Renard JP, Babinet C. High survival of mouse embryos after rapid freezing and thawing inside

- plastic straws with 1-2 propanediol as cryoprotectant. *J Exp Zool* 1984;230:443~448.
4. Schneider U, Mazur P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology* 1984;21:68~79.
  5. Bank H, Mazur P. Visualization of freezing damage. *J Cell Biol* 1973;57:729~742.
  6. Leibo SP, Mazur P. Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. In: Daniel JC Jr, ed. *Methods in mammalian reproduction*. New York: Academic press, 1978;179~201.
  7. Lehn-Jensen H. *Cryopreservation of bovine embryos: An evaluation of factors influencing the survival of day 6 1/2~7 1/2 embryos during freezing and thawing*. Copenhagen: A/S Carl Fr. Mortensen, 1986;17~149.
  8. Kasai M, Niwa K, Iritani A. Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. *J Reprod Fert* 1981;63:175~180.
  9. Williams TJ, Johnson SE. A method for one-step freezing of mouse embryos. *Theriogenology* 1986;26:125~133.
  10. Chupin D, De Reviere MM. Quick freezing of rat embryos. *Theriogenology* 1986;26:157~166.
  11. Szell A, Shelton JN. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. *J Reprod Fert* 1986;76:401~408.
  12. Szell A, Shelton JN. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solutions on day-3 mouse embryos. *J Reprod Fert* 1987;80:309~316.
  13. Wood MJ, Whittingham DG, Rall WF. The low temperature preservation of mouse oocytes and embryos. In: Monk M, ed. *Mammalian development: a practical approach*. Oxford: IRL press, 1987;255~280.
  14. Nagashima H, Ogawa S. 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* 1981;27:12~19(In Japanese).
  15. 황우식. 절단마우스 이분배의 동결보존실험. 2. 동결보존후의 체외발육능 및 수태능에 관하여. 서울대수의대논문집 1986;11:179~185.
  16. Lehn-Jensen H, Willadsen SM. Deep-freezing of cow 'half' and 'quarter' embryos. *Theriogenology* 1983;19:45~54.
  17. Tekeli T, Kweon OK, Kanagawa H. The viability of deep-frozen aggregated mouse embryos. *Jpn J Vet Res* 1987;35:283~286.
  18. 신상태, 조충호. 동결보존한 마우스 집합배의 생존성과 chimera의 생산에 관한 연구. 대한수의학회지 1990;30:231~241.
  19. Hetherington CM. Mouse husbandry. In: Monk M, ed. *Mammalian development: a practical approach*. Oxford: IRL press, 1987;1~12.
  20. Brinster, R.L. Measuring embryonic enzyme activity. In: Daniel JC Jr, ed. *Methods in mammalian embryology*. San Francisco: Freeman and Company, 1971;215-227.
  21. Trounson A, Peura A, Kirby C. Ultrarapid freezing: a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil Steril* 1987;48:843~850.