

행하였고, 용해 후 임신 및 분만된 2례를 보고한다.

증례 1은 30세의 여성으로 양측 난관 폐쇄에 의한 불임 기간 4년의 환자였고, 증례 2는 34세의 여성으로 남성 인자 및 배란 장애에 의한 불임 기간 6년의 환자였으며 ICSI를 시행하였다. IVF-ET 후 3일까지 P1 배양액에서 배양된 증례 1과 2의 배아 각각 10개, 11개를 난구 세포와 함께 20% 난포액이 첨가된 YS 배양액에서 2~3일간 추가 배양하여 5개 (증례 1)와 6개 (증례 2)의 포배기 배아를 획득하였고, 이를 유리화 동결하였다. 유리화 동결은 20% FBS가 첨가된 PBS를 기본 배양액으로 1.5 M ethylene glycol에서 2.5분, EFS 40에서 20~30초간 노출시킨 후 electron microscope grid에 옮겨 액체 질소에 침지하였다. 동결된 포배기 배아의 용해는 증례 1과 2의 포배기 배아 각각 5개와 3개를 0.5 M, 0.25 M, 0.125 M sucrose가 첨가된 PBS 용액에서 각각 2.5분씩 노출함으로써 용해하였다. 용해 후 난구 세포와 6시간 공 배양을 실시하여 다시 팽창된 포배기 배아만을 이식하였다. 증례 1은 hMG만을 투여한 배란 주기에 맞추어 3개의 포배기 배아를 이식하였고, 증례 2는 Estradiol valerate로 준비된 주기에 3 개의 포배기 배아를 이식하였다.

증례 1은 임신 19주에 양수천자를 시행하여 정상 핵형임을 확인하였고, 2001년 2월 임신 39주에 3.43 kg의 건강한 여아를 제왕 절개 분만하였으며, 증례 2는 분만 예정일 2001년 12월 16일로 현재 임신 진행 중이다.

이상의 결과는 EFS 40과 electron microscope grid를 이용하여 인간 포배기 배아의 유리화 동결 보존 및 용해 후 이식하여 정상적으로 발생하는 것을 확인하였으며, 이러한 EFS 40과 electron microscope grid를 이용한 유리화 동결법이 인간 포배기 배아의 동결 보존에 효과적으로 이용될 수 있으리라 사료된다.

P-4 2-cell Block 전후의 생쥐 초기 배아의 Ca^{2+} -channel 분포에 관한 연구

성신여자대학교

강 문 주 · 배 인 하

목 적: Ca^{2+} 은 생쥐의 2-cell block 현상과 밀접한 관계가 있는데 생쥐 난자에서 초기 2-세포기 배와 후기 2-세포기 배에서의 Ca^{2+} 요구성이 다른 것은 배 내의 Ca^{2+} -channel의 변화가 있는 것이 아닌가 하는 추정이 가능하다. Ca^{2+} -channel은 크게 (1) voltage-dependent Ca^{2+} -channel (2) ligand-gated Ca^{2+} -channel (3) Ca^{2+} -leak channel 등의 세 종류가 알려져 있고 세포의 분화에 따라 이들 channel들의 종류도 변화하고 있다고 알려져 있다. 여포난자성숙, 수정, 밀집화 및 부화 과정에 Ca^{2+} -influx가 일어나고 있으나 발생 단계에 따라 어떤 type의 Ca^{2+} -channel이 관여하고 있고 어떻게 변하고 있는지 또 몇 가지 type의 Ca^{2+} -channel 등이 공존하고 있는지에 대한 연구는 거의 이루어지고 있지 않다.

본 실험에서는 생쥐 초기 2-세포기 배를 수집하여 2-cell block 현상이 나타난 배와 2-cell block이 극복 (overcome)된 배, Ni^{2+} 에 의해 2-cell block이 극복된 배의 Ca^{2+} -channel의 변화를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법: Swiss albino인 ICR 계통의 생후 6~8주된 암컷은 5 IU의 PMSG와 hCG를 주사하여 과배란을 유도시키고 생후 12주 이상 되어 생식력이 있는 수컷과 합사하여 hCG 주사 후 32시간에 초기 2-세포기 배를, hCG 주사 후 36시간에 4-세포기 배를 얻었다. 2-cell block 극복은 Ni^{2+} 50 μ l를 이용하였다. 각 처리군의 배들은 면역세포화학적 방법 (immunocytochemical method)으로 관찰하였다.

결 과: P/Q-type Ca^{2+} -channel에 대한 염색 실험에서 초기 2-세포기, 체외배양 2-세포기, Ni^{2+} 처리한 2-세포기 배 대부분이 부분적인 분포를 나타내는 localized staining이었고 4-세포기 배에서는 세포막 전체로 퍼져 나타나는 homogeneous staining이 많았으나 체외에서 배양한 4-세포기 배나 Ni^{2+} 처리로 2-cell block을 극복한 배에서는 homogeneous staining 보다 localized staining이 많이 나타남으로서 체내 발생된 세포와는 다른 양상을 보임을 알 수 있었다.

N-type Ca^{2+} -channel에 대한 염색 실험에서는 초기 2-세포기 배에서부터 2-cell block에 걸린 세포와 Ni^{2+} 로 극복된 2-세포기 배, 체내 발생 4-세포기 배와 체외 발생 4-세포기 배, Ni^{2+} 처리로 2-cell block이 극복된 4-세포기 배로 갈수록 homogeneous staining이 약 90%로 나타나 발생과정이 진행될수록 세포 전체에 N-type Ca^{2+} -channel이 퍼져 존재한다고 사료된다. 항체 Anti- α_{1C} 를 이용한 L-type Ca^{2+} -channel은 초기 2-세포기 배를 비롯한 발생정지 현상이 나타난 배, 자연적으로, Ni^{2+} 처리로 인해 극복된 배 등 모두에서 대부분이 localized staining으로 나타났으나 2-세포기 때는 2개의 localized staining이 나타난 것이 가장 많았고 4-세포기 배가 되어서는 4개의 localized staining을 나타낸 것이 가장 많아 2-세포기 배에서 4-세포기 배로 발달하면서 각 할구에 1개씩의 localized staining이 나타나도록 발달한다는 것을 알 수 있었다. L-type Ca^{2+} -channel이지만 항체 Anti- α_{1D} 의 경우 homogeneous staining과 homogeneous와 localized staining이 함께 나타나는 mixture staining이 많이 나타나 항체 Anti- α_{1C} 와는 다른 분포를 나타내었다.

결 론: 본 실험에서 자연적으로, Ni^{2+} 을 처리하여 2-cell block 극복 전후의 배에 대한 Ca^{2+} -channel 분포양상은 2-세포기에서 4-세포기로 발생된 배라도 2-cell block이 완전하게 극복된 것이 아니라 포배기에 이르지 못하고 발생정지 현상을 나타냄으로서 체내에서 발생한 배들과는 분포양상에 차이가 있음이 확인되었다. 또한 Ni^{2+} 을 처리하여 2-cell block이 극복된 경우에서도 Ni^{2+} 의 영향으로 Ca^{2+} -channel 형성이 체내 발생한 배와 다르게 나타나고 이것은 Ni^{2+} 이 세포내 대사에 영향을 미친 것으로 추정할 수 있었다.

P-5 Systems for Production of Calves from Hanwoo IVM/IVF/IVC Blastocyst: IV. Direct Transfer of Vitrified and One-Step Diluted Hanwoo Blastocysts

마리아 기초의학연구소/생명공학연구소, ¹농협중앙회 가축개량사업소,
²건국대학교, ³마리아병원

김은영 · 박세필 · 김덕임¹ · 이문걸¹ · 이종우¹ · 이금실 · 박세영 · 박은미
윤지연 · 허영태 · 조현정 · 길광수 · 이훈택² · 정길생² · 임진호³

Objective: This study was to examine whether the vitrified, one-step diluted and direct transferred Hanwoo IVM/IVF/IVC blastocysts can be successfully survived in vivo and they were succeeded into the live birth.

Materials and Methods: For vitrification, blastocysts were serially exposed in glycerol (G) or/and ethylene glycol (EG) mixtures [10% (v/v) G for 5 min, 10% G plus 20% EG (v/v) for 5 min, and 25% G plus 25% EG (v/v) for 30 sec] which is diluted in 10% FBS added D-PBS. Thawing of straw was carried out in