

P-8 Efficient Cryopreservation of Hanwoo (Korean Cattle) Blastocysts Derived from Nuclear Transfer with Somatic Cell Using Vitrification

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

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

Objective: This study was to compare the *in vitro* survival after vitrification and thawing of Hanwoo blastocysts derived from nuclear transfer with Hanwoo adult ear cell and *in vitro* fertilized blastocysts.

Materials and Methods: For vitrification, day 7 or day 8 blastocysts were serially exposed in glycerol (G) or/and ethylene glycol (EG) mixtures (10% G for 5 min, 10% G plus 20% EG for 5 min, and 25% G plus 25% EG for 30 sec) which was diluted in 10% FBS added D-PBS. Thawing of straw was carried out in air for 10 sec and then in water bath of 25°C for 20 sec. The contents of the straw (0.2 ml) was expelled into a culture dish contained with 0.5 M sucrose and 10% FBS (S-DPBS) by cutting the cotton plug and then the recovered embryos were put into fresh 0.25 M and 0.125 M S-DPBS for 30 sec, respectively. The embryos were transferred into D-PBS with 10% FBS for 5 min and were cultured in a 10 ul droplet of co-culture environment (cumulus cell monolayer + 10% added CR1 medium) for 24 h.

Results: In the result, survival rates were 88.9% and 85.4% for nuclear transfer embryos and *in vitro* fertilized embryos, respectively. After transfer of vitrified-thawed blastocysts produced from nuclear transfer, 4 of 5 total recipients did not return to the subsequent estrus cycle at 30 days.

Conclusion: It is concluded that the Hanwoo blastocysts derived from nuclear transfer can be successfully cryopreserved using simple and efficient vitrification method.

P-9 성숙이 정지된 생쥐난자의 Ca²⁺-channel에 관한 연구

성신여자대학교

이 재 현 · 배 인 하

목 적: 근육세포 및 신경세포 등에서 크게 (1) voltage-dependent Ca²⁺-channel (① P/Q-type Ca²⁺-channel, ② N-type Ca²⁺-channel, ③ T-type Ca²⁺-channel, ④ L-type Ca²⁺-channel 및 ⑤ R-type Ca²⁺-channel) (2) ligand-gated Ca²⁺-channel (3) Ca²⁺-leak channel (B₁, B₂ and B₃-type Ca²⁺-leak channel) 등의 세 종류가 알려져 있으나 포유동물의 난자나 수정 후 embryo에서 어떤 type의 Ca²⁺-channel이 존재하는지에 대해서는 많이 알려지지 않았다.

본 실험에서는 정상적인 여포난자 (germinal vesicle, GV)와 여포난자를 3시간 배양하여 GVBD (germinal vesicle breakdown)가 일어난 난자의 Ca²⁺-channel의 분포 양상과 17시간 배양하여 제 1극체를 형성하지 못하고 GV나 GVBD에서 정지한 난자를 voltage-dependent Ca²⁺-channel 단백질을 대한 항체를

이용한 면역세포화학적 방법 (Immunocytochemical methods)으로 Ca^{2+} -channel의 분포 양상을 동정, 비교해보았다. 또 체내에서 성숙되어 배란된 난자 (MII)와 체외에서 성숙하여 제 1극체를 형성한 난자의 Ca^{2+} -channel 분포 양상을 동정, 비교해보았다.

대상 및 방법: 미성숙 난자를 얻기 위해 3~4주된 생쥐 암컷에서 적출한 난소를 배양액 (New MHBS)에 넣어 난소의 성숙 난포를 해부현미경 (Wild M5A, Swiss) 하에서 미세한 바늘 (26 G needle)로 터트려 여포로부터 난자를 분리해냈다.

배란난자를 얻기 위해 6~8주된 생쥐 암컷에 과배란 (superovulation)을 유도한 후 적출한 수란관의 팽대부 (ampulla region)를 찢는 방법으로 난자-난구 복합체 (oocyte-cumulus complex)를 얻었다. 이 난자-난구 복합체를 0.1% hyaluronidase (Sigma)가 포함된 배양액에서 처리하여 난구세포를 제거하고, 수확한 난자는 해부현미경하에서 관찰하여 제 2 감수분열 중기상태의 난자만을 수집하여 실험에 사용하였다.

실험에 사용된 배양액은 Modified Hank's Balanced Salt Solution (MHBS; Bae and Channing, 1985)에서 인산 성분을 줄이고 완충작용을 강화하여 삼투압을 280mOsm로 조정된 New MHBS 배양액을 사용했다.

수집된 난자는 microdroplet 방법으로 배양접시 (60×15 mm, Falcon) 위에 30 μ l의 배양액 (New MHBS) 방울을 만들어 그 위에 고압 멸균된 equilibrated mineral oil (light oil, Sigma)을 덮어 37°C, 5% CO₂와 95% 공기가 공급되며 100% 습도가 유지되는 배양기 (Forma Scientific, Model 3130)에서 2시간 이상 평형시킨 후, 그 속에 20~25개의 난자를 넣어 배양하였다. 배양한 난자를 voltage-dependent Ca^{2+} -channel 단백질에 대한 항체를 이용한 면역세포화학적 방법 (Immunocytochemical methods)으로 Ca^{2+} -channel의 분포 양상을 동정, 비교해보았다.

결 과: 본 연구의 결과 여포난자와 3시간 배양하여 GVBD가 일어난 난자의 염색 양상은 localized 또는 homogeneous staining이 대부분을 차지하였으나, 17시간 배양하여 제 1극체를 형성하지 못하고 GV나 GVBD에서 정지한 난자는 대부분이 염색이 되지 않았다. 또한 체내에서 성숙되어 배란된 MII 상태의 난자 (대조군)와 체외 배양하여 자발적 성숙이 유도되어 제 1극체를 형성한 MII 난자 (실험군)의 P/Q-type Ca^{2+} -channel의 분포 양상에서는 대조군 (3.0%) 보다 실험군의 no staining (8.8%) 양상이 유의하게 많았지만 ($p < 0.01$) localized 또는 homogeneous staining 양상은 유의한 차이가 없었다. N-type Ca^{2+} -channel의 분포 양상에서는 대조군은 homogeneous staining (55.1%) 양상이 많은 것에 비해 실험군에서는 homogeneous staining 보다 localized staining (69.1%) 양상이 더 유의하게 많았다 ($p < 0.01$). L-type (anti- α_{1C} , anti- α_{1D}) Ca^{2+} -channel의 분포 양상에서는 대조군은 localized, homogeneous staining이 대부분이었으나 실험군에서는 localized staining이 유의하게 더 많았다 ($p < 0.01$).

결 론: 이상의 실험을 종합하여 볼 때 17시간 배양하여 제 1극체를 형성하지 못하고 GV나 GVBD에서 정지한 난자는 여러 가지 요인이 있겠지만 Ca^{2+} -channel의 면역염색시 no staining이 많은 것을 미루어 볼 때 Ca^{2+} 이 드나드는 Ca^{2+} -channel 발현 이상의 하나의 이유로 추정된다. 이런 추정은 다시 한번 Ca^{2+} , Ca^{2+} -channel의 중요성을 인지시켜준다.

배란난자 (MII)와 17시간 배양하여 제 1극체를 형성한 난자의 염색 양상이 유의한 차이를 보였다는 것은 체내 조건과 체외 조건이 다르다는 것을 뒷받침하며, 이것에 따라 Ca^{2+} -channel 분포 양상에도 영향을 미쳤음을 알 수 있었다.