

미세조작이 소 배반포기 배의 동결에 미치는 영향

이영호, 윤희준, 이효상, 전세진, 서영일, 최유진, 공일근

순천대학교 동물자원과학과, 펫클론(주)

지금까지 체외수정란 생산을 위한 다양한 배양체계가 보완되었지만 수정란의 동결보존기술은 아직도 많은 문제점을 가지고 있다. 자동세포 동결기를 이용한 완만동결과 고농도 동결보호제를 이용한 초자화 동결법의 장단점을 보완하여 본 연구에서는 미세 조작기구를 이용하여 배반포에 구멍을 내서 고농도 동결보호제에 노출시킴으로써 탈수를 촉진하여 동결 시 수분으로 인한 빙점을 최소화하여 동결융해 후 생존율을 높이고자 하였다.

TCM-199에 10% FBS, 1 $\mu\text{g/ml}$ estradiol-17 β , 10 $\mu\text{g/ml}$ FSH, 22 $\mu\text{g/ml}$ sodium pyruvate, 96 $\mu\text{g/ml}$ cystein 및 1% P/S를 첨가하여 체외성숙을 유도하여 10 $\mu\text{g/ml}$ heparin을 이용하여 수정능 획득한 정자를 IVF-TALP로 수정시켰다. 체외수정 24시간 후 과립막세포를 제거한 난자를 CR1aa 배양액에 8일동안 체외발달을 유도한 후 배반포기까지 발달한 수정란 중에서 형태학적으로 우수한 수정란만을 선발하여 미세 조작기구를 이용하여 구멍을 내어서 실험에 공시하였다. 동결보존을 위해서 기본액(TCM-199+ 20% FBS)에 ethylene glycol과 DMSO를 10%씩 첨가한 VS1에 1분간 노출시킨 후 ethylene glycol, DMSO를 각각 20% 첨가한 VS2에 30초간 노출시켜 마우스 피펫으로 5 μl 이하 드롭을 액체질소에 직접 떨어뜨려 초급속 초자화동결을 실시하였다. 용해는 35 $^{\circ}\text{C}$ 의 0.25 M과 0.15 M sucrose solution 및 기본액에 각각 5분씩 처리하여 다시 기본액에 5분을 정체 후 체외배양액에 옮겨 배양을 실시하였다.

초자화 동결보존 후 12, 24, 48시간째에 생존율(+: 93, 91, 63% vs. -:

Table 1. Comparison of punctured and non-punctured blastocyst on post-thaw viability

Punc embryos thawed	No. of	Post-warming development					
		12 h		24 h		48 h	
		Survival	Hatched	Survival	Hatched	Survival	Hatched
+	91	85 (93.41%)	45 (52.94%)	83 (91.21%)	58 (69.88%)	58 (63.74%)	54 (93.10%)
-	95	39 (41.05%)	7 (17.95%)	32 (33.68%)	8 (25.00%)	18 (18.95%)	10 (55.56%)

41, 33, 18%)과 부화율(+: 52, 69, 93% vs. -: 17, 25, 55%)로서 동결 전에 미세조작이 동결 후 생존율과 부화율에 유의적인 영향을 미치는 것으로 판단된다.

* 본 연구는 Petclone Ltd.의 자체연구사업비에 의하여 수행되었음.

Key words) *Bovine, Cryopreservation, IVF*