

## Open Pulled Straws, EM Grid, Nylon Loop법에 의한 돼지성숙난자의 유리화동결 비교

안미현, 김인덕, 석호봉

단국대학교 생명자원과학대학

돼지 난자의 유리화 동결 처리 방법 중 난자를 담는 용기(loading vessel)의 재료로 최근에 알려진 것으로 open-pulled straws(OPS)[Vajta등, Mol Reprod Dev, 51:53-58, (1998)], electron microscope grids(EMG)[Martino등, Biol Reprod, 54:1059-1069, (1996)], nylon loop system(NLS)[Lane등, Fertil Steril, 72: 1073-1078, (1999)] 등이 보고되고 있다. OPS는 1/4cc straws를 열을 가하여 길게 뽑아 내벽을 얇게 함으로써 filling된 난자나 수정란이 액체 질소와 접촉했을 때 유리화가 신속하게 되도록 하는 방법으로 돼지에서는 별로 보고된 것이 없다. EMG는 열전도가 예민한 전자현미경용 copper grid를 이용한 방법으로 최근 국내 기술진의 연구성적을 포함한 몇몇 학자들에 의하여 보고되었고 NLS는 0.5mm직경의 nylon loop를 이용하여 급속 동결한 성적이 보고되었으나, 돼지 난자에 응용된 것은 없다. 따라서 이와 같은 동결 재료는 사람과 반추류, mouse외에 돼지 난자에 대하여는 전혀 시도되지 않았지만 유리화 동결기술에서 가장 중요한 실험으로 생각된다. 성공적인 유리화 동결을 위해서는 수정란이 냉각의 전도성이 빠르고, 작은 용액을 수정란과 같이 filling해야 하며 모든 동작이 신속 간편해야 하며 용해 방법도 초고속도의 용해가 요구되므로 이에 부합되어야 한다. 연구 목적은 돼지 난자를 유리화 동결/용해 시 동결 재료-straw/glass, copper grid, nylon 3가지에 대한 제작 방법, 난자 loading, 동결 처리, 보관 방법, 용해 방법 등을 난자의 회수, 수정 후 생존율을 비교 조사하여 가장 우수한 방법을 선택할 목적이었다. 수행 내용은 3가지의 재료의 sample을 제작하고 소독한 다음 준비된 돼지 COCs을 40시간 동안 IVM한 후 난자를 5~15개 정도로 선정 하여 준비된 VS 용액에 평형처리 하였다. 각 재료의 용기에 loading 한 후 동결/보관 하였고, 용해는 역순으로 평형하여 maturation 배지에 3~4시간 배양한 다음 경검하고 IVF한 후 NCSU-23 배지에 담아 IVC 배양하면서 cell cleavage상태를 확인하였다.

- 재료는 OPS용으로 OPS straw (Minitub, Germany) 또는 hematocrit micropipette을 제작하였고, cryo-loop용은 시중의 nylon 낚시 줄을 cryo-bottle에 특수제작하였으며, EMG는 300-400mesh EM copper grid(Ted Fella Co, USA)를 사용하였다.
- 동결 방법과 loading의 편의성은 OPS, NLS, EMG순, 액체 질소 내 동결보관의 수용성은 NLS, EMG, OPS 순으로 많은 난자를 loading 할 수 있었다.
- 용해 처리의 편의성과 단순성은 큰 차이가 없었으나 OPS, NLS, EMG순으로 처리가 쉬웠다.
- 난자를 용해한 후 난자 회수율, 회수 후 세포 형태, 수정율/세포 분화율은 OPS, NLS, EMG 순으로 높았다.

Key words) 돼지성숙난자, 유리화동결, Open pulled straws, EM grid, Nylon loop