

지방구가 제거된 돼지 미성숙 난포란의 유리화 동결에서 Straw법과 EM Grid법의 비교

최인경^{1,2}, 석상현¹, 김광식³, 송해범¹

대구대학교 자연자원대학¹, 미래여성병원², 연암축산원에대학³

많은 연구에서 돼지의 난포란 혹은 배아가 낮은 온도에 대해 민감한 것은 세포질 내에 함유된 지방구와 관련이 있다고 하였으며, 이런 세포질내의 지방구를 제거함으로 동결능력이 향상된다고 하였다. 이렇게 지방구가 제거된 돼지의 난포란과 배아를 효과적으로 동결보존하기 위해서는 새로운 개념의 동결보존 기술이 필요하다고 하겠다. 따라서, 본 연구는 미성숙 단계에서 지방이 제거된 돼지 난포란의 유리화 동결에 적합한 방법을 찾기 위하여 straw를 이용한 유리화 동결법과 electron microscopic grid(EM grid)를 사용한 유리화 동결법을 실시하여 효율적인 동결방법을 검토하였다.

난소에서부터 분리된 미성숙 난포란은 10분간 7.5 μ m/ml cytochalasin B 처리 후 12500 \times g에서 15분간 원심분리하여 세포질 내 지방구를 분극시키고, 미세조작기를 이용하여 세포질내의 분극된 지방구를 제거하였다. 지방구가 제거된 난포란은 1.5M ethylene glycol(EG) 용액에 2.5분간 평형 후 5.5M EG+1.0M sucrose 용액에 침지하였다. Straw 동결법은 5.5M EG + 1.0M sucrose 용액에서 20초 이내 0.25ml straw에 난포란을 주입하고 LN2에 침지함으로써 동결을 완료하였고, EM grid 동결법은 5.5M EG + 1.0M sucrose 용액에 20초간 침지 후 난포란을 EM grid상에 올려놓고 여과지로 남은 동결액을 제거한 후 LN2에 침지함으로써 동결을 완료하였다. 용해는 난포란을 1.0M, 0.5M, 0.25M, 0.125M, 0M sucrose 용액에 연속적으로 각각 2.5분씩 침지함으로써 세포질의 동해방지제를 제거하였다. 용해가 완료된 미성숙 돼지 난포란은 42~44시간동안 체외성숙 배양액에서 추가성숙을 완료한 다음 체외수정을 실시하여 배발달율을 조사하였으며, 그 결과는 Table 1과 같다.

Table 1. Effect of straw or EM grid methods on post-thaw clavage rates of vitrified delipated immature porcine oocytes.

Vitrification vessels	No.(%) of oocytes		No.(%) of embryos	
	Vitrified	Recovered (/Vitrified)	2~4cell (/Recovered)	8cell (/Recovered)
Straw	36	33(91.7)	2(5.6)	1(3.0)
Em-grid	29	28(96.6)	5(17.2)	0(0.0)

본 실험의 결과 straw와 EM grid를 이용한 동결방법의 차이에서 유의성을 얻을 수 없었는데 이것은 돼지난자의 특수성에 의한 것으로 여겨지며, 지방구제거만 성공적으로 이루어진다면 동결용기에 의한 차이는 없는 것으로 사료된다.

Key words) *Vitrification, Delipated, Straw, EM grid, Immature porcine oocyte*