

체외배양조건이 체세포 핵이식란의 배발달 및 배반포의 동결-융해후 생존성에 미치는 영향

최은주¹, 이호준¹, 연승은¹, 윤종택^{1,2}

한경계놈텍(주)¹, 한경대학교 동물생명자원학과²

체세포 핵이식에 의한 산자가 양, 소, 염소, 쥐 및 최근에 돼지에서 보고되었지만, 생산된 배반포의 동결보존에 관한 연구결과는 보고되지않고있다. 따라서, 본 연구는 체세포 핵이식란의 활용과 산업화 촉진을 위해서 체세포 핵이식 유래 배반포의 동결성 향상에 배양조건이 미치는 영향을 조사하고자 실시하였다.

공여세포는 60일령의 태아세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM에서 39℃, 5% CO₂의 incubator에서 배양하여 monolayer confluent 형성을 유도한 후 0.25%trypsin처리하였다. 체외성숙 후 제핵된 난자에 핵이식을 실시하였으며, 1.8kv/cm, 15μs/2times의 전기자극으로 융합 후 5μg/ml의 ionomycin에서 4min, 1.9mM 6-D MAP에서 4h동안 배양함으로써 활성화를 유도하였다. 대조구는 0.3% BSA가 첨가된 CR1aa배지에서 7일동안 배양하였고, 처리구는 CR1aa에서 4일간 배양 후 나머지 3일은 5%FBS가 첨가된 CR2aa배지에서 cumulus cell과 공배양하였다. 생산된 배반포는 10%Glycerol이 첨가된 D-PBS에서 10분간 평형 후 -6℃ ~ -34℃까지 -0.3℃/min으로 동결 후 LN₂에 침지하여 동결보존하였다. 동결된 난자의 융해는 35℃의 온수에서 15~20초간 급속 융해하여, 6%, 3%, 0%의 glycerol이 첨가된 배지에 단계별 5분씩 침지하여 동해방지제를 제거하였다.

대조구와 처리구에서 난할율과 배반포 발달율은 각각 97.2%와 83.7%와, 32.1%와 58.2%로 처리구에서 높은 결과를 보였고, 배반포의 세포수 또한 평균 99.5, 126.5개로 역시 처리구에서 높게 나타났다(Table 1). 동결-융해 후 생존율은 각각 33.3%와 60.0%로 처리구에서 유의적으로 높았다(Table 2).

따라서, 핵이식 유래 배반포의 동결성에 배양조건이 영향을 미치는 것으로 판단되며 이는 세포수에 기인한 것으로 사료된다.

Key words) 핵이식, 공배양, 동결-융해

Table 1. Effect of culture systems on *in vitro* development of nuclear transfer embryos

Culture method	No. oocytes	Fused(%)	2-cell(%)	Blasto/2-cell(%)	No. of cells/blastocyst Mean
CR1aa	330	282(85.0)	274(97.2)	88(32.1)	99.5
Cumulus cell co-culture	310	263(84.8)	220(83.7)	128(58.2)	126.5

Table 2. Survival rate of frozen-thawed nuclear transfer blastocysts

Culture Method	No.of blastocyst	
	Post-thaw	Survived(%)
CR1aa	15	5(33.3%)
Cumulus cell co-culture	15	9(60.0%)