

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0058879 (43) 공개일자 2014년05월15일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 5/02 (2006.01) A01N 1/02 (2006.01) C12N 5/073 (2010.01) C12N 5/075 (2010.01) (21) 출원번호 10-2012-0125289 (22) 출원일자 2012년11월07일 심사청구일자 2012년11월07일 기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도		(71) 출원인 경상대학교산학협력단 경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동) (72) 발명자 공일근 경상남도 진주시 남강로477번길 7, 가동 602호(신안동, 신안한주빌라) 진종인 경상남도 진주시 정촌면 강주길 104 (뒷면에 계속) (74) 대리인 위병갑

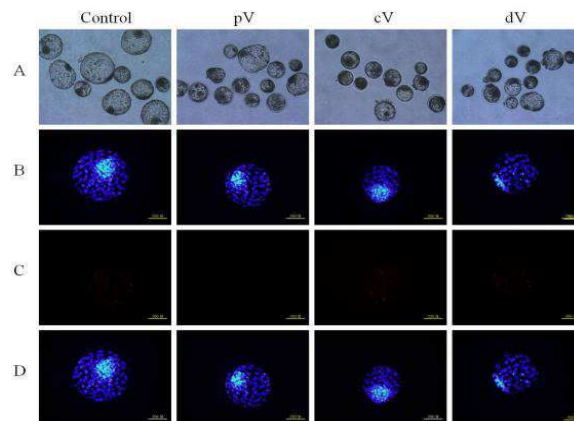
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 스트로우 내벽에 배아를 부착하는 부착성 스트로우 유리화 동결법

(57) 요약

본 발명은 스트로우 유리화동결(straw vitrification) 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 스트로우의 내벽에 생식세포를 붙이는 부착성 스트로우 유리화동결(paste an embryo in the vitrification straw, pV)시키는, 생식세포의 동결보존 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법은 로딩 부피를 감소시킴으로써 동결 속도를 증가시킬 뿐만 아니라, 추가의 실험 공정 없이 용해 후 수령체에 유리화동결된 배아를 직접적으로 이식시킬 수 있어 유용하다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

방재일

부산광역시 사하구 마하로 57, B동 206호(당리동, 대원연립)

최병현

경상북도 경주시 안강읍 근계5길 55-26

하아나

경상남도 진주시 상대로 17-3 (상대동)

조현태

부산광역시 금정구 금강로647번길 24, 202호(남산동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	112020-03-1-CG000
부처명	농림수산식품부
연구사업명	생명산업기술개발사업주관과제
연구과제명	수정란이식의 산업화적용을 위한 수정란동결기술 개발
기 여 율	1/2
주관기관	경상대학교 산학협력단
연구기간	2012.08.10 ~ 2013.08.09이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	PJ007990012012
부처명	농림수산식품부
연구사업명	차세대바이오그린21사업
연구과제명	효율적인 형질전환 복제 소 생산기술 정립
기 여 율	1/2
주관기관	경상대학교 산학협력단
연구기간	2012.01.01 ~ 2012.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

스트로우의 내벽에 생식세포를 붙이는 부착성 스트로우 유리화동결(paste an embryo in the vitrification straw, pV)법을 이용하는, 생식세포 유리화 동결방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 생식세포는 난자, 체외수정란 또는 배아세포인 것을 특징으로 하는 생식세포 유리화 동결방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 배아 세포는 포배기 세포(blastocyst)인 것을 특징으로 하는 생식세포 유리화 동결방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

유리화동결 전에 상기 생식세포에 천공을 형성시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 생식세포 유리화 동결방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

홀딩 배지 (HM: 25 mM Hepes 및 20% FBS가 첨가된 TCM199),

유리화 동결 용액 1 (VS1: HM + 10% 에틸렌 글리콜),

유리화 동결 용액 2 (VS2: HM + 35% 에틸렌 글리콜 + 5% PVP + 0.5 M 수크로오스),

희석 용액 1 (DS1: HM + 0.3 M 수크로오스), 및

희석 용액 2 (DS2: HM + 0.15 M 수크로오스)로 구성된 유리화 동결용 조성물을 이용하여 유리화 동결시키는 것을 특징으로 하는 생식세포 유리화 동결방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 생식세포 유리화 동결방법은

내벽에 생식세포가 부착되어 있는 스트로우를 밀봉하여 액체 질소(LN₂)에 담지하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 생식세포 유리화 동결방법.

청구항 7

제1항 또는 제4항의 방법으로 유리화 동결된 생식세포를 융해 후 추가의 공정 없이, 인간을 제외한 포유류에게 직접적으로 이식하는 것을 특징으로 하는, 생식세포 이식방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 생식세포는 난자, 체외수정란 또는 배아세포인 것을 특징으로 하는 생식세포 이식방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 배아 세포는 포배기 세포(blastocyst)인 것을 특징으로 하는 생식세포 이식방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 인간을 제외한 포유류는 소과인 것을 특징으로 하는 생식세포 이식방법.

청구항 11

제1항의 방법을 수행하기 위한,

홀딩 배지 (HM: 25 mM Hepes 및 20% FBS가 첨가된 TCM199),

유리화 동결 용액 1 (VS1: HM + 10% 에틸렌 글리콜),

유리화 동결 용액 2 (VS2: HM + 35% 에틸렌 글리콜 + 5% PVP + 0.5 M 수크로오스),

희석 용액 1 (DS1: HM + 0.3 M 수크로오스), 및

희석 용액 2 (DS2: HM + 0.15 M 수크로오스)로 구성된, 부착성 스트로우 유리화동결용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 스트로우 유리화 동결법(straw vitrification)에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 스트로우의 내벽에 생식세포를 붙이는 부착성 스트로우 유리화동결(paste an embryo in the vitrification straw, pV)에 의한 생식세포의 동결보존 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 세포나 조직, 개체 등과 같은 생물학적 재료를 형태와 기능적인 변화가 일어나지 않은 상태로 저온에서 장기간 보관하고, 원래 상태의 기능을 회복하도록 융해하는 과정을 동결보존(cryopreservation)이라 한다.

[0003] 이러한 동결보존은 인류의 생활과 매우 밀접한 관련을 맺고 발전해 왔고, 특히 최근 들어 눈부시게 발전하는 생식생물학 (reproductive biology)과 인간과 동물의 보조생식술 (assisted reproductive technology, ART) 분야에 접목되어 그 중요성이 점점 커지고 있다. 초기에는 크기가 작은 정자나 배아에서만 사용할 수 있었던 동결기법은 그 발전을 통해 가장 큰 세포인 난자와 조직의 보관으로 그 적응증을 넓혀가고 있다.

[0004] 일반적인 체세포에 비해 상대적으로 크기가 크고 수분의 함유량이 높은 배아와 난자의 동결보존을 위해 연구자들은 우선적으로 일반적인 완만동결-급속융해법 (slow cooling-rapid thawing)을 도입하여 사용하였다. 완만동결 방법은 우선 세포질 내 수분의 일부와 투과 동결억제제 (permeable cryoprotectant)를 치환하여 평형시킨다. 이후 세포 동결기에 넣어 세포외부의 수분을 천천히 동결시키는 과정을 통해 세포외부의 동결억제제의 농도를 올려 삼투압을 발생시키고, 이 힘을 이용하여 세포 내에 남아있는 물을 천천히 제거함으로 최소한의 수분만을 남겨 얼음결정의 생성을 최소화 시키는 기술이다. 완만동결은 비교적 그 기술이 단순하여 손쉽게 사용 가능한 장점을 가지고 있으나, 상대적으로 고가의 장비와 많은 액체질소의 사용량, 많은 시간의 소요, 얼음결정에 의한 동결상해 (cryoinjury)와 같은 단점을 가지고 있다.

[0005] 동결과정 중에 세포의 손상을 유발하는 가장 큰 원인은 동결 시 생기는 빙결정의 형성에 의한 기계적인 손상이다. 따라서 이러한 손상을 극복하기 위해 많은 학자들은 동결방법, 동결속도, 동결보호제의 선택 및 융해방법에 대한 다양한 연구를 시도하였으며, 최근에는 아예 빙결정형성이 일어나지 않는 유리화 동결법을 도입하였다. 연구에 따르면 배아나 난자와 같이 상대적으로 크고 수분함량이 높은 세포의 유리화동결을 위해서는 일반적인 체세포에 비해 고농도의 동결억제제의 노출시간을 줄이거나 냉각속도를 올리는 것이 필수적이다.

[0006] 따라서 연구자들은 첫째, 투과율이 높고 독성이 적은 동결억제제를 도입하거나 투과성과 비투과성 동결억제제를 조합하여 상대적 농도의 변화 없이 절대적인 농도를 낮추는 전략을 통해 세포에 미치는 독성을 감소시켜 유리화 동결/융해 후 효율을 증진시키고 있다. 둘째 냉각속도를 올리기 위해 유리화 동결하는 세포와 동결억제제의 부

피를 줄일 수 있는 여러 가지 방법을 개발하고자 하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) 1. AGCA, Y., MONSON, R.L., NORTHEY, D.L., PESCHEL, D.E., SCHAEFER, D.M. and RUTLEDGE, J.J., 1998. Normal calves from transfer of biopsied, sexed and vitrified IVP bovine embryos. Theriogenology, 50(1), pp. 129-145.
- (비특허문헌 0002) 2. AKIYAMA, K., KOBAYASHI, J., SATO, Y., SATA, R., OHASHI, M., SASAKI, E., ODA, Y., OGAWA, Y., UEDA, S., NABENISHI, H. and MATOBA, S., 2010. Calf production from vitrified bovine sexed embryos following in-straw dilution. Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho, 81(4), pp. 461-466.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 융해 후 생식세포의 생존률이 높으면서도 수행이 용이한 부착성 스트로우 유리화 동결방법(paste an embryo in the vitrification straw, pV)을 제공하는 데 있다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 부착성 스트로우 유리화 동결방법에 의해 유리화 동결된 생식세포 및 이의 용도를 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 스트로우 유리화 동결법(straw vitrification)을 사용하면서, 스트로우의 내벽에 생식세포를 붙이는 부착성 스트로우 유리화동결(paste an embryo in the vitrification straw, pV)법을 이용하는 생식세포 유리화 동결방법을 제공한다.
- [0011] 대상으로는 동결 보존이 필요한 생체물질이면, 제한은 없으나, 바람직하게는 생식세포는 난자, 체외수정란 또는 배아세포이고, 더욱 바람직하게는 포배기 세포(blastocyst)를 사용한다. 본 발명의 일 실시예에서는 7일령의 포배를 사용하였다.
- [0012] 바람직한 예에서, 상기 유리화 동결 전에 생식세포에 천공을 형성시키는 단계를 포함할 수 있는데, 이러한 천공 형성을 통해 배아 등의 부화능을 향상시킬 수 있는 효과가 있다.
- [0013] 본 발명의 부착성 스트로우 유리화동결(paste an embryo in the vitrification straw, pV)법은 하기의 성분을 주요성분으로 포함하는 유리화 동결용 조성물을 이용하는 것을 특징으로 한다:
- [0014] 홀딩 배지 (HM: 25 mM Hepes 및 20% FBS가 첨가된 TCM199),
- [0015] 유리화 동결 용액 1 (VS1: HM + 10% 에틸렌 글리콜),
- [0016] 유리화 동결 용액 2 (VS2: HM + 35% 에틸렌 글리콜 + 5% PVP + 0.5 M 수크로오스),
- [0017] 희석 용액 1 (DS1: HM + 0.3 M 수크로오스), 및
- [0018] 희석 용액 2 (DS2: HM + 0.15 M 수크로오스).
- [0019] 따라서, 본 발명을 실시하기 위한 상기 부착성 스트로우 유리화동결용 조성물 또한 본 발명으로서 제공될 수 있다.
- [0020] 한편, 본 발명은 상기 방법으로 유리화 동결된 생식세포 및 이의 다양한 용도를 제공한다.
- [0021] 상기 유리화 동결된 생식세포는, 융해 후 추가의 공정 없이 직접적으로 이식하여도 우수한 생존율 및 임신율을 나타낸다. 따라서, 본 발명은 유리화 동결된 생식세포를 융해 후 추가의 공정 없이, 인간을 제외한 포유류에게 직접적으로 이식하는 것을 특징으로 하는 생식세포 이식방법을 제공한다.

[0022] 특히, 소 등의 가축 관리에서 효과적으로 이용할 수 있는데, 바람직한 특성을 가지는 자손의 생산을 증가시키는 데 사용될 수 있다.

[0023] 이처럼, 본 발명의 스트로우의 내벽에 생식세포를 붙이는 부착성 스트로우 유리화동결법을 사용하면, 신선한 배아를 사용하는 경우와 거의 유사한 효과를 발휘하는바, 배아의 효율적인 이용이 가능하다.

발명의 효과

[0024] 본 발명에 따른 스트로우의 내벽에 생식세포를 붙이는 부착성 스트로우 유리화동결(paste an embryo in the vitrification straw, pV) 방법은 로딩 부피를 감소시킴으로써 동결 속도를 증가시킬 뿐만 아니라, 유리화동결 용액의 재결정화의 감소에 의해 용해 후 생존 가능성을 향상시킨다. 따라서, 본 발명에 의한 유리화동결된 배아 등은 추가의 실험 공정 없이 용해 후 수령체(대리모)에 직접적으로 이식하여 높은 효과를 발휘하므로, 생식세포의 보관 및 활용에 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 본 발명의 부착성 스트로우 유리화동결법(paste an embryo in the vitrification straw, pV)의 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 2는 종래 컬럼형 스트로우 유리화동결법(column in the vitrification straw, cV)의 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 3은 TUNEL 염색법으로 확인한 전체 세포, 사멸 세포에 대한 현미경 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] "동결보존"이란 용어는 생물 물질의 극저온에서의 보존을 나타낸다.

[0027] "동결물질"이란 용어는 생물 물질의 초자화를 일으킬 수 있는 임의의 물질을 나타낸다. 이론상 샘플이 동결매질과 직접 접촉하지 않기 때문에 충분히 저온인 임의의 동결매질을 사용할 수 있다. 적합한 물질로는 비 제한적으로 액체 기체, 예를 들어 액체 질소, 액체 프로판, 액체 헬륨, 에탄 등이 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 액체 질소를 사용하였다.

[0028] "직접적으로"이란 용어는 생물 물질이 예를 들어 상기 생물 물질의 표면, 또는 상기 물질이 존재하는 매질, 용액 또는 물질이 동결 물질과 접촉하게 되는 경우 상기 동결 물질에 "직접적으로" 접촉하거나 또는 "직접적으로" 노출됨을 의미한다.

[0029] "배아"란 용어는 수정 후 기관과 기관 시스템이 발생하기 시작하는 임신후 3개월 개시 시점까지의 배아를 의미한다.

[0030] "포배 배아"란 용어는 외부 세포층, 액체 충전강 및 내부 세포피를 가진 세포의 볼(ball) 또는 구로 구성된 착상 전의 배아를 지칭한다.

[0031] "배지"란 용어는 본 발명의 세포를 유지할 수 있는 적합한 배지를 의미한다. 세포가 증식할 수 있고, 정상적인 핵형을 유지할 수 있고, 다능성을 유지할 수 있는 조성물을 말한다. 다양한 배지가 당해 업계에서 알려져 있다.

[0032] "약"이라는 것은 참조 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 30, 25, 20, 25, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1% 정도로 변하는 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 의미한다.

[0033] 본 명세서를 통해, 문맥에서 달리 필요하지 않으면, "포함하다" 및 "포함하는"이란 말은 제시된 단계 또는 구성요소, 또는 단계 또는 구성요소들의 군을 포함하나, 임의의 다른 단계 또는 구성요소, 또는 단계 또는 구성요소들의 군이 배제되지는 않음을 내포하는 것으로 이해하여야 한다.

[0034] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0035] 본 발명은 스트로우 유리화 동결(straw vitrification) 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로는 스트로우의 내벽에 생식세포를 붙이는 것을 주요한 특징으로 하는 부착성 스트로우 유리화동결(paste an embryo in the

vitrification straw, pV)법을 이용하는, 생식세포 유리화 동결방법에 관한 것이다.

[0036] 유리화 동결방법에 있어서, 동결 용액의 종류 및 이의 노출 온도, 보관용기의 열전도율, 동결용액의 양, 배아 발달시기 및 질 등이 많은 요소들이 유리화 동결의 결과에 많은 영향을 미치기 때문에 이를 표준화하기에는 다소 어려움이 있다.

[0037] 본 발명자들은 종래의 칼럼 형성의 스트로우 유리화동결(column in the vitrification straw, cV)법이 아니라, 스트로우의 내벽에 생식세포를 붙이는 것을 주요한 특징으로 하는 부착성 스트로우 유리화동결(paste an embryo in the vitrification straw, pV)법을 이용함으로써, 냉각속도의 개선 및 배아의 유리화 동결-융해 후 생존율 향상의 우수한 효과를 확인할 수 있었다.

[0038] 대상

[0039] 본 발명의 대상으로 동결보존을 필요로 하는 생물물질이라면 제한은 없지만, 상시 생물물질은 살아있는 세포 또는 세포 주, 특히 생식 세포 또는 생식세포로부터 유래된 세포이다. 상기 세포는 임의의 발생 단계에 있을 수 있다. 바람직하게는, 상기 세포는 포유동물 공급원, 예를 들어 비 제한적으로 인간, 비-인간 영장류, 예를 들어 원숭이, 실험실 동물, 예를 들어 래트, 마우스 및 햄스터, 농업용 가축, 예를 들어 돼지, 양, 소, 염소 및 말을 포함한 동물 공급원으로부터 얻을 수 있다.

[0040] 주로 정자와 난자, 배아 등의 생식세포, 더욱 바람직하게는 난자, 수정란, 배아들을 동결 보존하는 데 본 발명을 이용할 수 있다.

[0041] 이들이 어떠한 발달단계에 있는지와 무관하게 본 발명의 방법을 사용할 수 있지만, 특히, 배아에 있어서, "포배기 배아세포(blastocyst)"는 그 세포수가 많고 크기가 작으므로 전핵기의 배아나 초기분열기의 배아보다 동결보존 후 생존율이 높으며, 보다 발달가능성이 크므로, 동결 보존 대상으로 가장 바람직하다. 포배기의 배아를 사용하면, 융해(해동) 후 적은 수의 배아를 이식해도 적절한 임신율을 유지함과 동시에 다태임신을 줄일 수 있는 장점도 지닌다. 본 발명의 일 실시에서는 7일령의 포배기 세포를 사용하였다.

[0042] 배아의 발달을 위한 배양은 공지의 방법을 참조하여 당업자가 적절히 수행할 수 있다.

[0043] 가능한 기간은 10 초 내지 20 분일 수 있는데, 그 이유는 이 단계에서 상기 시점이 용액과의 평형을 증진시키고 동결보호제가 충분히 살포되도록 하기 때문이나, DMSO가 존재하는 경우 세포는 다소 독성이 있는 DMSO에 너무 오래 노출되어서는 안된다.

[0044] 통상적으로는 5 초 내지 약 20 분의 기간 동안, 예를 들어 약 10 초 내지 약 15 분, 약 15 초 내지 약 10 분, 약 20 초 내지 약 7.5 분, 약 30 초 내지 약 5 분, 약 40 초 내지 약 4 분, 약 50 초 내지 약 3 분, 약 30 초 내지 약 2 분, 약 45 초 내지 약 1.5 분 또는 약 1 분의 기간 동안 약 37 °C에서 수행할 수 있다.

[0045] 인간을 포함한 포유류의 난자, 배아 등은 그 수가 매우 적고 발생학적 중요성 때문에 그 어떤 세포보다도 동결보존의 필요성이 높다. 즉, 인간 난자와 배아의 성공적인 동결보존은 생식력보전의 중요한 수단으로 사용될 뿐만 아니라 생성 및 이식 배아의 수 조절을 가능하게 해 윤리 또는 법적인 문제점을 해결하는데 많은 기여를 할 수 있다.

[0046] 한편, 본 발명에서는 상기 생식세포에 대하여 유리화 동결 전에 천공(Puncture)을 형성시켜 사용하는 것이 바람직하다.

[0047] 바람직하게는 상기 생식세포는 배아, 더욱 바람직하게는 포배(blastocyst)를 사용할 수 있고, 상기 천공 형성은 당업계의 공지의 기술을 적절히 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 미세 파스츄어 피펫(fine Pasteur pipette)으로 포배낭을 파쇄(collapsing)시킴으로써 천공을 형성하였다. 이와 같이 유리화 동결 전에 천공을 형성시킴으로써 생식세포의 부화(hatching) 및 부화된 배아에 대한 발달 능력(developmental competence)을 증가시킬 수 있다.

[0048] 유리화 동결법

[0049] 난자 및 배아 등은 일반 세포에 비해 부피가 크고 더불어 수분함유량이 매우 많아 이를 효과적으로 동결보존하기 위해서는 특히 얼음결정을 최소화하는 동결보존 기술이 필요한데, 이런 관점에서 도입되어진 방법이 유리화

동결법(vitrification)이다.

- [0050] 유리화 동결은 세포를 -196°C 의 액체질소 (liquid nitrogen, LN_2)에 직접 노출시켜 동결보존을 유도하지만, 실제로는 동결과정에서 세포 내에 얼음결정이 형성되지 않고 수분이 액체와 고체의 중간인 비결정질과 같은 상태를 유지하도록 하는 기술이다. 이러한 상태를 "유리화"라고 하며, 이를 얻기 위해서는 세포 내 수분이 고농도의 동결억제제로 치환되는 것이 필요하며, 이에 더불어 매우 높은 냉각속도 (분당 $-3,000^{\circ}\text{C}$ 이상)가 필요하다. 유리화 동결의 장점은 조작이 간단하며 고가의 장비가 필요 없다는 점이며, 무엇보다도 얼음결정이 원천적으로 형성되지 않아 상해를 최소화할 수 있다는 것이 대표적이다
- [0051] 본 발명의 방법은 기본적으로 이러한 유리화 동결방법에 관한 것이고, 그 중에서도 스트로우 (Straw) 방법을 이용하므로, 이에 필요한 통상적인 공정은 당연히 포함한다. 예를 들어, 스트로우를 밀봉하여 액체 질소(LN_2)에 담지하는 등의 공정들이 포함되지만, 이하에서는 종래의 방법과 구별되는 본 발명의 특징적인 점을 중심으로 기술한다.
- [0052] (i) 유리화 동결용 조성물
- [0053] 본 발명의 유리화 동결용 조성물은 하나 이상의 동결방지제 또는 동결방지제들의 혼합물을 함유할 수 있다.
- [0054] 무독성 동결방지제가 물론 바람직하다. 동결방지제는 동결되지 않은 물 중에 남아있는 다른 용질들의 물 분율을 감소시킴으로써 수축을 최소화하는데 일조한다. 상기는 결정성 얼음의 형성을 억제하며, 따라서 물의 빙점을 낮춘다. 상기는 또한 결합수와의 수소 결합에 의해 단백질 변성을 방지할 수 있다. 세포가 냉각됨에 따라, 용매수는 세포 외 얼음으로 전환하며, 불투과성 전해질 또는 비-전해질의 증가하는 세포 외 농도는 세포를 손상시킨다.
- [0055] 세포는 동결보호제로 처리될 때, 훨씬 더 낮은 온도에 도달할 때까지, 처리되지 않은 세포의 염 농도에 도달하지 않는다. 화학 반응은 상기와 같이 낮은 온도에서는 매우 느리게 진행하며 결과적으로 세포 손상이 최소화된다.
- [0056] 대개는 동결보호제들의 조합을 사용하는데, 그 이유는 상이한 유형들간에 차이가 있을 수도 있기 때문이다. 상기 동결보호제들은 또한 삼투 활성제로서도 작용할 수 있다.
- [0057] 적합한 동결보호제를 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 디메틸설폭사이드, 글리세롤, 프로판 디올, 당, 예를 들어 수크로오스, 트레할로즈, 말토오스, 락토오스 및 메틸 펜탄 디올로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수 있다.
- [0058] 특히, 본 발명에서 사용하는 유리화 동결에 사용되는 조성물은 다음의 성분을 포함하는 것이 바람직하다:
- [0059] 홀딩 배지 (HM: 25 mM Hepes 및 20% FBS가 첨가된 TCM199),
- [0060] 유리화 동결 용액 1 (VS1: HM + 10% 에틸렌 글리콜),
- [0061] 유리화 동결 용액 2 (VS2: HM + 35% 에틸렌 글리콜 + 5% PVP + 0.5 M 수크로오스),
- [0062] 희석 용액 1 (DS1: HM + 0.3 M 수크로오스), 및
- [0063] 희석 용액 2 (DS2: HM + 0.15 M 수크로오스).
- [0064] 본 발명의 유리화 동결용 조성물은 유리화 동결 용액(VS) 두 종류를 포함하고, 이러한 VS1 및 VS2는, VS2 용액 중에 함유된 개별적인 작용제들의 농도는 통상적으로 5 내지 50% v/v, 예를 들어 약 5% 내지 약 40% v/v, 예를 들어 약 5% 내지 약 25% v/v(VS1 용액) 및 약 5% 내지 약 30% v/v(VS2 용액)의 범위이다. 통상적으로는, 상기 VS2 용액 중의 동결보호제의 총 농도(v/v, w/v 또는 M으로서 계산됨)는 VS 1 용액 중의 농도보다 크다. 상기 VS1 및 VS2 용액은 동일하거나 상이한 하나 이상의 동결보호제를 함유할 수 있다. 상기 VS1 및 VS2 용액 중의 하나 이상의 동결보호제의 농도는 동일하거나 상이할 수 있으며, 통상적으로는 상기 제 VS2 용액 중의 동결보호제의 총 농도가 VS1 용액 중의 농도보다 크다.
- [0065] 본 발명의 일 구체예에서, 희석제로 수크로오스를 사용할 수 있다. 상기 유리화동결 조성물에 함유된 수크로오스의 농도는 통상적으로는 약 0.02 M 내지 약 1 M, 예를 들어 약 0.05 M 내지 약 0.9 M, 약 0.1 M 내지 약 0.8 M, 약 0.2 M 내지 약 0.7 M, 약 0.3 M 내지 약 0.65 M, 약 0.4 M 내지 약 0.6 M, 약 0.45 M 내지 약 0.55 M의

범위 내에 있다.

- [0066] 수크로오스는 독특한 천연 이당류이며, 수백 개의 식물 및 동물에서 발견된다. 수크로오스는 중요한 에너지원이며 동결 시기 동안 유기체의 안정화에 주요한 인자이다. 수크로오스는 세포막의 상전이 온도를 낮추어 상기 세포막이 건조 시에조차도 액정 상태로 남아있게 할 수 있는 것으로 나타났다. 이는 재 수화 중에 세포막 누출을 방지하여, 세포 생육력을 보존함이 가정되어 있다. 단백질에 관해서, 수크로오스는 세포가 수화된 상태로 있을 때 단백질 표면으로부터 물의 배제에 의한 단백질 변성을 억제한다.
- [0067] 본 발명의 상기 유리화 동결용 조성물은 상기 설명한 조성물로 구성되는 것이 가장 바람직하나 당업자가 필요에 따라 농도 등을 적절히 조절하여 사용할 수 있다.
- [0068] 또한, 선택적으로, 상기 유리화 동결용 조성물은 하나 이상의 점도 조절제를 포함할 수 있다.
- [0069] 점도 조절제로서, 피콜(Ficoll), 퍼콜(Percoll), 히아루론산, 알부민, 폴리비닐 피롤리돈, 알긴산, 젤라틴 및 글리세롤 등로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수 있다. 하나 이상의 점도 조절제의 농도는 동일하거나 상이할 수 있다
- [0070] (ii) 동결과정
- [0071] 동결시킬 생식 세포 및 상기 유리화 동결용 조성물의 혼합물을, 동결시키기 위해 스트로우에 로딩시킨다. 이때, 유리 피펫 (Pasteur, VWR International)등을 사용하여, 상기 혼합물로 종래처럼 컬럼 (column)을 만들지 않고 스트로우 내벽의 표면에 붙인다. 이러한 차이는 본 명세서 도 1 및 도 2를 통해서도 확인할 수 있다.
- [0072] 이처럼 스트로우의 내벽에 생식세포를 붙이는 특징으로 인해, 본 발명에 대해서 "부착성 스트로우 유리화동결 (paste an embryo in the vitrification straw, pV)"법이라고 명명하였다. 그리고, 상기 스트로우를 밀봉하고, 액체질소(LN₂)에 담지한다.
- [0073] 동결배아의 생존성에 영향을 미치는 요인 중 하나는 동결속도 (cooling rate)인데, 본 발명의 방법은 스트로우 상에 유리화 동결 용액의 로딩 부피를 줄임으로써 동결 속도를 증가시킬 수 있다. 또한, 배아를 함유하는 유리화동결 용액의 재결정화(recrystallization)의 감소에 의해 용해 후 생존 가능성(post-thaw survivability)을 향상시킨다.
- [0074] (iii) 용해과 동결보호제의 제거
- [0075] 상기 방법으로 유리화 동결보존된 배아를 이용하기 위해서는 용해과정(thawing procedure)을 거쳐야 한다.
- [0076] 용해방법은 배아를 LN₂에서 꺼내 상온이나 37℃ 온수에 넣어 용해하는 급속용해 (rapid thawing)과 LN₂에서 꺼낸 배아를 -80℃ 내지 -100℃로 조정된 동결기에 넣어 서서히 용해하는 완만용해(slow thawing)가 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 급속용해방법이 이용되고 있다. 배아의 용해과정 시에 손상이 가장 많이 일어나며 특히 용해 시 재결빙 현상이 일어나기 쉬우므로 각별히 주의해야 한다.
- [0077] 용해된 배아는 세포내에 유입된 동결보호제를 제거해야 한다. 세포내 동결보호제의 제거에는 여러가지 방법이 이용되고 있지만 대표적으로 수크로오스 같은 당 (sugar)이 함유된 용액을 사용하여 용해된 배아의 세포질 손상이 없이 동결보호제를 제거하는 방법이 이용된다. 즉, 용해 시에 여러 가지 농도가 함유된 수크로오스 용액을 준비하여 고농도에서 저농도로 배아를 처리함으로써 용해과정에서의 급격한 삼투압의 변화에 따른 세포막의 손상을 최소화하면서 배아세포질내의 동결보호제를 제거하는 방법이 이용되고 있다
- [0078] 본 발명에서는 스트로우의 내용물을 단지 용해시키는 것으로, 상기 온도는 실온 내지 40℃일 수 있다. 보다 높은 온도는, 세포를 용해 후 수욕으로부터 신속하게 제거하지 않는 경우 상기 세포의 용해 시 열 쇼크를 유발할 수 있다.
- [0079] **이용**
- [0080] 또한, 본 발명은 상기 스트로우의 내벽에 생식세포를 붙이는 부착성 스트로우 유리화동결(pV)법에 의해 유리화

동결된 생식 세포 및 이의 이용을 포함한다.

[0081] 본 발명의 방법은 배아를 포함하는 유리화동결 대상의 스트로우에 대한 로딩 부피를 감소시킴으로써 동결 속도를 증가시킬 뿐만 아니라, 이러한 방법을 거친 유리화동결된 배아는 추가의 실험 공정 없이 융해 후 수령체에 직접적으로 이식하여도 생존율과 융해 후 발생률, 임신율을 향상시킨다. 그러므로, 인공수정("AI") 및 생체의 수정("IVF")와 같은 과정에 유용하게 사용할 수 있다.

[0082] 본 발명은 일 구체예로써, 상기 유리화 동결된 생식세포를 융해 후 추가의 공정 없이, 인간을 제외한 포유류에게 직접적으로 이식하는 것을 특징으로 하는, 생식세포 이식방법을 포함한다.

[0083] 인간을 제외한 포유류로서, 비 제한적으로 비-인간 영장류, 예를 들어 원숭이, 실험실 동물, 예를 들어 래트, 마우스 및 햄스터, 농업용 가축, 예를 들어 돼지, 양, 소, 염소 및 말을 포함한 동물 공급원을 말한다.

[0084] 즉, 본 발명의 유리화 동결 방법은 잉여의 배아를 효율적으로 이용함으로써 불임환자에게 임신의 기회를 제공하는 효과적인 보조생식술로서, 예를 들어, 특히, 가축 관리에서의 효과적으로 이용할 수 있는데, 바람직한 특성을 가지는 자손의 생산을 증가시키는데 사용될 수 있다. 특히, 이것은 젖소 또는 식용우와 같은 동물의 생산자가 가축 생산 효율 및 품질을 증가시킬 수 있을 것이다.

[0085] <실시예>

[0086] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0087] 실험 공정은 경상대학교의 ACDAL(Accreditation Committee of the Division of Animal Laboratory)의 승인을 받았고, 모든 화합물 및 배지를 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)로부터 구입하였다.

[0088] 또한, 결과들을 평균 $\pm$ SD로 표현하였고, $P < 0.05$ 는 별도의 애기가 없는 한 통계학적으로 유의미한 것으로 간주한다. 데이터들을 one-way ANOVA (SPSS Inc., Chicago, IL)을 이용하여 분석하였다. 그룹간의 유의미한 차이는 Duncan's multiple range tests를 이용하여 검출하였다.

[0089] <실시예 1>

[0090] 동물 준비 및 배아 제조

[0091] 1-1. 동물 준비

[0092] 실험에 사용할 수란우(Recipient cows)를 개인 농장으로부터 받아 사용하였다. 수란우(한우종, 한국 고유종)를 GnRH-PGF2 α -GnRH 프로토콜 (Momcilovic D, et al., 1998; Thatcher WW, Santos JE. 2007)을 이용하여 동기화하였다(synchronized).

[0093] 1-2. 배아 제조

[0094] 소의 IVP 포배기 세포를 제조하기 위해, 지방 도살장으로부터 난소들을 수집하여 4시간 동안 수송하였다. In vitro 배아 생성 프로토콜은 Jeong et al. 2009 문헌에 기재되어 있다.

[0095] 간략히 말하면, 난자-난구 복합체(cumulus-oocyte complexes, COC)를 진공펌프에 붙여 있는 18 게이지 바늘을 이용하여 직경 2 내지 8 mm 모낭으로부터 회복하였다. 뾰뾰한 난구세포 및 세포질에의 3-5 레이어를 가지고 있는 난자들을 TL-HEPES (114 mM 염화나트륨, 3.2 mM 염화칼륨, 2 mM 중탄산나트륨, 0.34 mM 이인산나트륨, 10 mM 소듐 락테이트, 0.5 mM 염화마그네슘, 2.0 mM 염화칼슘, 10 mM HEPES, 1 μ L/mL 페놀 레드, 100 IU/mL 페니실린, 및 0.1 mg/mL of 스트렙토마이신)에서 세척하고, 마지막으로 IVM (in vitro maturation) 배지에서 세척하고, 23-24시간 동안 700 μ L의 IVM 배지 [10% (vol/vol) FBS, 1 μ g/mL 에스트라디올-17 β , 10 μ g/mL FSH, 0.6 mM 시스테인, 및 0.2 mM 소듐 피루베이트가 보충된 TCM199] 를 함유하는 4-웰 디쉬의 웰로 옮겼다

- [0096] IVM 후, 1분 동안 36℃에서 중탕기에서 용해시킨 한우 수컷의 정자와 COC를 수정시키고 세척한 후, 상온에서 5분 동안 Dulbecco's PBS (D-PBS) 에서 $750 \times g$ 원심분리에 의해 펠렛화시켰다. 상기 펠렛을 조심해서 IVF (in vitro fertilization) 배지(6 mg/mL BSA, 22 μ g/mL 소듐 피루베이트, 100 IU/mL 페니실린, 및 0.1 mg/mL 스트렙토마이신이 보충된 Tyrode's lactate 용액)에 희석시키고 5% CO₂의 습한 대기에서 15분 동안 배양하여 정자가 수정 능력을 가질 수 있도록 하였다.
- [0097] 수정능이 있을 것이라고 여겨지는 정자들을 1×10^6 spermatozoa/mL 밀도로 IVF 배지에 희석하고, 성숙된 난자들을 18-20 시간 동안 정자들을 함유하고 있는 IVF 배지 (700 μ L)로 옮겼다.
- [0098] TL-HEPES in a 35-mm 디쉬 (SPL Life Sciences Co. Ltd., Gyeonggi-do, Republic of Korea)에서 TL-HEPES로 접합체를 형성하고 있는 것으로부터 피펫팅으로 난구세포들을 제거하였다.
- [0099] Denuded 접합체를, 44 μ g/mL 소듐 피루베이트, 14.6 μ g/mL 글루타민, 10 μ L/mL 페니실린/스트렙토마이신, 3 mg/mL BSA 및 310 μ g/mL 글루타치온이 보충된 700 μ L CR1-aa 배지 (Rosenkrans et al., 1993) (IVC-I)를 함유하는 4-웰 디쉬의 웰에 두었다.
- [0100] 이들은 배아 발달 7일까지 (d 0; day of IVF) 배양하되, BSA가 10% (vol/vol) FBS로 대체된 점만 다르게 동일한 조성물의 배지(IVC II)에서 배양하였다. IVM, IVF, 및 IVC 동안 배양조건은 최대 습기 하 38.5℃에서 대기 중 5% CO₂ 조건이다. 포배의 발달율은 IVC-I 배지 내로 옮겨진 접합체의 비율로서 7일째에 평가하였다. 확장된 및/또는 중간 확장된 포배를 우수한 및/또는 좋은 경우로 선별하여 7일째 유리화 동결하였다
- [0101] **1-3. 포배의 천공(Puncture)**
- [0102] Choi YH. et al. (2010)의 기재에 따라, 7일령 포배낭을 미세 파스츄어 피펫 (fine Pasteur pipette)으로 2-3회 피펫팅하여 포배낭을 파쇄하였다. 파스츄어 피펫의 내부 직경을 약 120 μ m로 조정하고 피펫 말단을 불로 다듬었다
- [0103] **<실시예 2>**
- [0104] **유리화동결 및 융해 공정**
- [0105] 유리화동결 용액을, 홀딩 배지 (HM: TCM199 with 25 mM Hepes plus 20% FBS), 유리화동결 용액 1 (VS1: HM plus 10% 에틸렌 글리콜), 유리화동결 용액 2 (VS2: HM plus 35% 에틸렌 글리콜 + 5% PVP + 0.5 M 수크로오스), 희석 용액 1 (DS1: HM plus 0.3 M 수크로오스) 및 희석 용액 2 (DS2: HM plus 0.15 M 수크로오스)으로 구성하였다.
- [0106] 형태학적으로 우수하고 좋은 수준의 IVP 포배를(ref.) 선별하여 임의로 각 처리군에 배분하였다. 포배를 HM에 노출시킨 후 미세 유리 파스츄어 피펫으로 VS1에 옮겼다.
- [0107] VS1에서 5분 후, 포배를 VS2로 옮기고 미세 유리 파스츄어 피펫으로 0.25 mL 스트로우 에 로딩하여, 컬럼을 만 들지 않고 스트로우 내벽의 표면 상에 붙이거나 (psV, 도 1); 또는 종래의 스트로우 로딩 방법인 0.25 mL 스트로우로 로딩하여 칼럼 스트로우 유리화동결시킨다.
- [0108] 로딩된 스트로우를 약 10초 동안 가열된 포셉으로 밀봉하였다. 상기 밀봉된 스트로우 를 액체질소 LN2 에 잠시 담지하고, 배아 함유 스트로우의 사이드를 먼저 1분 동안 담지하고 그 후 천천히 전체 스트로우를 액체질소 LN2 에 담지하였다. 이는 동결된 스트로우의 분해(와해)를 방지한다. ddV의 경우, 한 포배를 미세 파스츄어 피펫내 로 로딩하고 직접적으로 LN2상에 떨어뜨렸다.
- [0109] 유리화 동결된 스트로우를 LN2 탱크로부터 꺼내서 상온에 10초 동안 노출시킨 후 30초 동안 37℃ 물에 담지하였 다. 융해된 스트로우를 종이 타월로 깨끗이 닦고 윗 부분에 전체 배지가 모이도록 스트로우를 위로 흔들고, 그 다음 아랫 부분에 전체 배지가 모이도록 스트로우를 아래로 흔들었다. 희석 후, 밀봉된 스트로우 윗 부분을 잘라서 30 mL 페트리 디쉬에 쏟아붓고, HM으로 세척하였다
- [0110] pV 및 cV를 스트로우 내부에서 희석하고 dV 액적은 30-mL 배양 접시에서 0.3 M 수크로오스에서 5분 동안, 및 0.15 M 수크로오스에서 3분 동안 순차적으로 희석하였다.

[0111] 융해 후 포배의 회복율을 계수하고, 융해 후 생존가능성의 분석을 위해 10% (v/v) FBS가 보충된 CR1aa에서 배양하였다(24시간째 재확장 및 부화 및/또는 36시간째 부화 단계 발달) 이 때, 임의로 선택된 각 그룹의 살아있는 배아를 Deb GK et al., (2011) 기재에 따라 TUNEL 염색을 수행하여 포배에 대한 사멸세포 및 전체 평가를 하였다.

[0112] <실시예 3>

[0113] 배아 이식(Embryo transfer) 및 임신 진단

[0114] psV 그룹의 신선한 및 융해후 포배를, 기능적인 좋은 황체(CL)를 가지고 있는 수령체의 동기화된 자궁 난소에 직접적으로 이식하였다. 스트로우마다 하나의 포배(신선한 것 또는 유리화동결된 것)를 로딩하여, 하나의 배아를 수령체마다 각각 이식하였다. 발정기에 돌아온 것들을 제외한 모든 수령체에 대하여, 이식 60일 째 촉진하여 임신을 진단하였다.

[0115] <실험예 1>

[0116] 소 포배의 융해후 생존가능성에 대한 스트로우 로딩방법의 영향

[0117] 7일령의 포배를, 부착성 스트로우 유리화동결법(paste an embryo in the vitrification straw, pV), 칼럼 스트로우 유리화동결법 (column in the vitrification straw, cV) 및 직접적 액적 유리화동결법 (droplet vitrification, dV)를 포함하는 3개의 다른 방법으로 유리화동결하였다.

[0118] 개별적인 포배들을 3개의 모든 유리화동결법으로 각 시간에 유리화동결하였다. 유리화동결된 포배를 액체 질소(LN₂) 컨테이너에 적어도 일주일 동안 보관하고, 융해후 회복율, 24시간 째 재확장 또는 부화 및/또는 36시간째 부화된 포배의 평가 및 전체 사멸세포 수의 계수를 위해 CR1aa (IVC2 배지)에서 배양하였다. 모든 데이터들을 비-유리화동결된 대조군의 포배(대조군)과 비교하였다. 상기 실험은 반복하였다.

[0119] 그 결과, 유리화동결 포배의 융해 후 회복율은 psV, csV 및 ddV의 경우 높게 나타났다(표 1).

표 1

로딩타입	유리화동결 배아수	회복된 배아(%)	발달된 배아(%)	
			재확장율(24 h)	변성
pV	37	37 (100)	37 (100.0%) ^{a, b}	-
cV	25	21 (84.0)	12 (57.14%) ^c	9 (42.9)
dV	26	16 (61.5)	15 (93.75%) ^b	1 (6.3)
Control	20	-	20 (100.0%) ^{a, b}	-

[0121] psV 및 ddV 방법은 대조군인 비-유리화동결된 포배와 비슷한 재-확장율을 보였다(P > 0.05). 그러나, cV 방법은 pV, dV 및 대조군과 비교할 때 낮은 재확장율을 보였다(P < 0.05)

[0122] pV에 따른 후-융해된 유리화동결 포배 및 대조군은 배양 24시간까지 변성되지(degenerate) 않은 반면, 약 42.9% cV 및 6.3% dV 그룹은 변성되었다. pV에 따른, 후-융해된 유리화동결 포배는 포배마다 전체 세포 수가 낮았지만 (114 ± 48.1 in psV vs. 102 ± 35.1 in cV vs. 105.6 ± 33.9 in dV) (P < 0.05), 이는 대조군 포배와 비교하면(134.4 ± 38.9) 유리화 동결방법과 무관함을 알 수 있었다.

[0123] 3가지의 유리화동결 방법들 중에서, psV 그룹의 포배가 다른 두 그룹(cV 및 dV)보다 더 높은 전체 세포수를 보였다 (P < 0.05). 포배마다 사멸세포의 수도 대조군 포배보다 (0.4 ± 1.4) 후-융해된 유리화동결 포배에서 더 높게 나타났다 (P < 0.05). 사멸 세포의 수는 각각 6.6 ± 9.5 (pV) vs. 14.5 ± 9.5 (sV) vs. 10.9 ± 9.6 (dV)으로 나타났다.

표 2

로딩타입	계수된 배아수	계수된 핵 수 (mean $\pm$ S.E.)	
		전체 세포	사멸 세포
pV	13	114.0 $\pm$ 48.1 ^b	6.6 $\pm$ 9.5 ^{a,b}
cV	10	102.0 $\pm$ 35.1 ^{b,c}	14.5 $\pm$ 9.5 ^b
dV	10	105.6 $\pm$ 33.9 ^{b,c}	10.9 $\pm$ 9.6 ^b
Control	13	134.4 $\pm$ 38.9 ^a	0.4 $\pm$ 1.4 ^a

<실험예 2>

소 포배의 융해 후 생존 가능성에 대한 포배강 천공의 영향

유리화 동결 전에 미세 파스츄어 피펫으로 천공함으로써 포배강 파쇄가 psV의 유리한 효과를 매개하는지 여부를 평가하기 위해, 7일령 포배를 파쇄그룹과 비-파쇄 그룹으로 나누었다. 이 양 그룹 모두 psV법의 동일한 프로토콜을 이용하여 유리화동결시켰다. 모든 유리화동결된 포배들을 융해하고 배양하여 회복을, 24시간째의 재확장 또는 부화 및/또는 36시간째 부화된 포배의 평가, 및 전체 사멸세포의 수를 계수하였다. 모든 데이터들을 비-유리화동결된 대조군의 포배(대조군)과 비교하였다. 상기 실험은 반복하였다.

그 결과, 배양 24시간째 후-융해된 재확장된 포배 발달은 유리화동결전 포배의 파쇄에 의해서는 아무런 영향을 받지 않았다(표 3).

표 3

천공여부	유리화동결 배아수	재확장된 BL 발달(%)	
		24 h	부화중 또는 부화된 경우 모두
Puncture pV	32	32 (100) ^a	20 (62.5) ^a
Non-puncture pV	32	32 (100) ^a	12 (37.5) ^b
Control	17	17 (100) ^a	14 (82.3) ^a

그러나 천공에 의한 포배의 파쇄는 배양 36시간째 전체 부화 및 부화된 포배에 대한 발달 능력(developmental competence)을 증가시켰다($P < 0.05$). 이는 대조군과 유사하였다(62.5% in pV vs. 37.5% in cV vs. 82.3% in control). pV에 의한 유리화동결 전에 천공하였을 때, 포배마다 전체 세포수가 증가하였다(152.4 $\pm$ 39.6 천공그룹 vs. 117.5 $\pm$ 14.4 비-천공그룹) ($P < 0.05$) 유리화동결 전 포배의 천공은 대조군과 비교하여 포배마다 전체 세포 수를 채워주었다 (152.4 $\pm$ 39.6 vs. 160 $\pm$ 48.3)

사멸세포 수는 천공된 pV, 비-천공된 pV 및 대조군 포배 사이에서 크게 다르지 않았다 (34.5 $\pm$ 20.1 vs. 34.6 $\pm$ 40.4 vs. 21.3 $\pm$ 12.0).

표 4

천공여부	계수된 배아	계수된 핵 수 (mean $\pm$ S.E.)	
		전체 세포	사멸 세포
Puncture pV	11	152.4 $\pm$ 39.6 ^{a,b}	34.5 $\pm$ 20.1
Non-puncture pV	11	117.5 $\pm$ 14.4 ^b	34.6 $\pm$ 40.4
Control	12	160.4 $\pm$ 48.3 ^a	21.3 $\pm$ 12.0

<실험예 3>

[0134] 신선한 배아 이식과 pV 유리화동결된 배아의 임신율 비교

[0135] 이번 실험에서는 pV방법이, 유리화동결된 포배가 동기화된 수령체의 자궁에 융해후 이식된 후, 임신능력을 회복하는지 여부를 평가하였다.

[0136] 단일 포배(신선 또는 유리동결된)를 자궁의 윗 부분에 이식하였다. 신선 또는 유리동결된 포배를 이식한 수란우를 임의로 선별하고, 유리화동결 및 신선한 포배를 이식한 후 수란우에서의 임신율을 비교하였다.

[0137] 즉, 유리화동결 및 신선한 배아를 7일째에 동기화된 수란우에 이식하고, 각 수령체에게 하나의 신선한 포배(7일) 또는 천공된 pV 유리화동결된 포배를 제공하였다. pV 포배를 액체질소(LN₂)에서 수행하고 스트로우 융해 후 동기화된 수령체 자궁에 직접적으로 이식하였다. 반면, 단일 신선한 포배를 37℃ 에서 플라스크에서 스트로우 내로 로딩하였다. 신선한 포배를 50 수령체에 이식하였고 pV포배를 45두의 대리모에 이식하였다.

[0138] 배아 이식 60일 째 질 촉진 방법(vaginal palpation method)으로 임신을 진단하였다.

[0139] 그 결과, 임신율은 신선한 경우와 pV 그룹 사이에 크게 다르지 않았다(54.4% vs. 53.3%)(P > 0.05)

표 5

[0140]

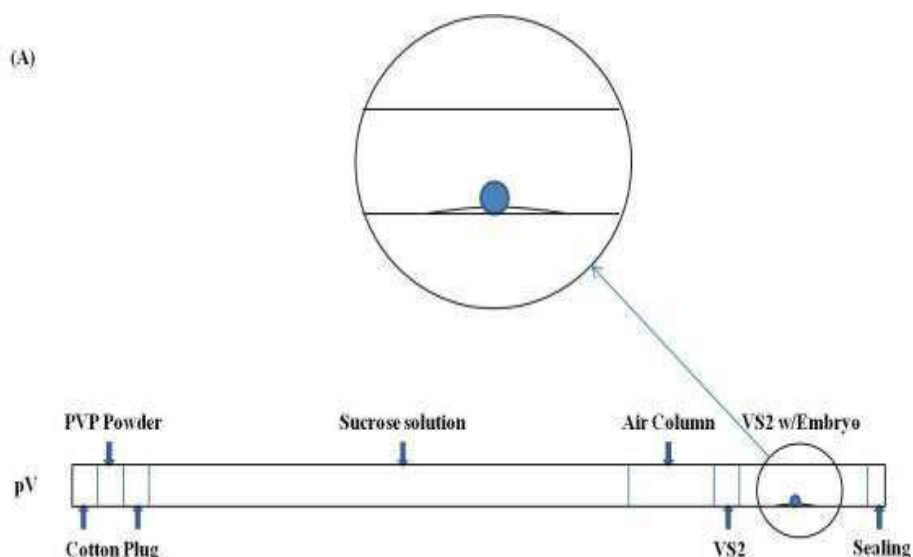
배아타입	이식 배아수	임신 60일째
Fresh	50	27 (54.0)
pV	45	24 (53.3)

[0141] 즉, 본 발명의 스트로우의 내벽에 생식세포를 붙이는 부착성 스트로우 유리화동결법을 사용하면, 신선한 배아를 사용하는 경우와 거의 유사한 효과를 발휘함을 확인하였다.

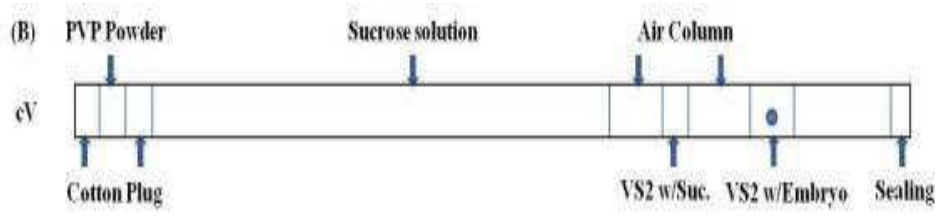
[0142] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 본 발명의 이와 같은 우수한 효과를 통해, 당업자들은 다른 생물학적 물질, 예컨대, 인간을 포함한 말, 염소, 돼지 등에게도 용이하게 적용 가능함은 명확히 이해될 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

