

StemCell Keep™을 활용한 소난관상피세포의 초자화동결법

이재영*, 김성우*, 고응규*, 김찬란*
 *농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원센터
 e-mail:jay0i@korea.kr

The Optimized Vitrification Freezing Protocols for cryopreservation of Bovine Oviduct Epithelial Cell Using StemCell Keep™

Jae-Yeong Lee*, Sung Woo Kim*, Yeong Gyu Ko*, Chan-Lan Kim*
 *Animal Genetic Resources Center, National Institute of Animal Science, RDA

요 약

가축의 조직에서 유래한 동물세포는 재생산이 가능한 유전자원으로서, 유전분석에 필요한 DNA뿐 아니라 멸실된 개체를 복원하기 위한 자원으로도 이용될 수 있다. 본 연구에서는 세포를 동결하는 방법으로 초자화동결법을 적용하기 위하여 소 난관상피세포를 0.25ml 스트로에 밀봉하여 액체질소에 직접 노출하였다. 난관에서 추출된 소 난관상피세포를 StemCell Keep™ 5, 10, 25, 50, 75 및 100% 농도에서 생존율을 조사하였다. Trypan blue 염색시약과 SYTO-13/PI 핵염색시약을 이용하여 세포의 생존성을 판단하였다. Trypan blue 염색법에서는 각각 5.6±11.8, 12.5±7.2, 53.0±2.7, 85.1±6.9, 79.8±0.6 및 60.7±6.7%의 생존율이 관찰되었고, SYTO-13/PI 염색시약에서는 각각 4.6±2.5, 30.8±12.1, 58.4±2.5, 85.5±1.2, 79.8±0.6 및 71.2±1.2%의 생존율이 관찰되었다. 결과적으로, 소 난관상피세포는 50% StemCell Keep™ 농도의 동결배양액에서 가장 우수한 생존율을 보였다.

1. 서론

동결유전자원으로서 세포를 동결 보존하는 기술은 국가유전자원을 생산하는 주요 방법 중 하나라고 알려져 있다. 세포를 동결하는 일반적인 방법은 완만동결법(slow freezing protocol, SFP)이라 부르며 널리 이용되고 있다. 그러나 일부 한계가 존재하기에 이를 극복하기 위해서 본 연구에서는 소난관상피세포(bovine oviduct epithelial cell, BOEC)를 초자화동결법(vitrification freezing protocol, VFP)을 이용하여 동결보존 효율성을 높이고자 하였다.

2. 방법 및 결과

2.1 BOEC의 추출 및 동결

한우 발정기 2.5일째의 난관에서 소난관상피세포를 추출하여 배양하였다. 동결보호제 StemCell Keep™(SCK, Abnova, Taiwan)을 이용하여 0.25ml 스트로에 봉입하여 초자화동결을 실시하였다.

2.2 동결 BOEC의 용해 후 생존율 조사

용해된 세포의 생존성을 검증하기 위하여 4%의 Trypan blue(TB) 용액과 Propidium iodine(PI) 및 SYTO-13을 이용하여 세포의 생존율을 조사하였다.

[표 1] The effect of StemCell Keep™ concentration on viability rates of BOEC.

% of SCK	% of cell viability in	
	TB	SYTO-13/PI
5	5.6±9.6	4.6±2.5 ^a
10	15.3±5.5	30.8±12.1 ^b
25	53.0±2.1 ^a	58.4±2.5 ^{cA}
50	93.5±2.0 ^b	95.9±2.9 ^d
75	76.7±6.5 ^c	79.8±0.6 ^c
100	63.0±4.1 ^d	71.2±1.2 ^{iA}

Means with small letters of superscripts were significantly different between groups (p<0.05).

Means with capital letters of superscripts were significantly different within groups (p<0.05).

Data are expressed as the mean±SD for three independent experiments.

[표 1]에서와 같이 TB 및 SYTO-13/PI 모두 50% SCK 농도에서 생존율이 가장 높은 것으로 나타났다.

참고문헌

- [1] A. K. Belew, K. Tesfaye, G. Belay, "the state of conservation of animal genetic resources in developing countries: a review", Int. J. Pharm. Med. Biol. Sci., Vol.5, No.1, pp.58-66, Jun 2016.
- [2] C. J. Hunt. "Cryopreservation: vitrification and controlled rate cooling.", Methods Mol. Biol., Vol.1590, No.3, pp.41-77, March 2017.