

stics such as small cytoplasm, large nucleus, and prominent nucleoli. In long term culture of ES and EG cells, LIF (leukemia inhibitory factor) promotes the proliferation and suppresses the differentiation of ES and EG cells. To develop stem cell culture system, we cultured STO-SNL2 cells (transfected with plasmid containing the murine LIF gene) as a feeder cell in DMEM-high glucose supplemented with 15% FBS. To stop the proliferation of feeder cell, mitomycin C was treated, and we conformed LIF secretion from STO-SNL2 cells by western blotting and RT-PCR. Finally, gonadal ridges and mesenteries (PGCs isolated from 9 weeks human fetus) were mechanically disaggregated and then incubated in 0.5% trypsin-5.3 mM EDTA. PGCs initially cultured and subsequently passaged on STO-SNL2 feeder cell. Feeder cell duplicated every 48 hrs and had 80% plating efficiency after thawing. To find optimal mitomycin C concentration, serial diluted mitomycin C was treated and then cultured for 7 days. 10  $\mu$ g/ml of mitomycin C was optimal concentration to stop feeder cell proliferation. Secreted LIF proteins were confirmed by western blotting. Also, RT-PCR products of LIF mRNA was exactly the same as the expected sizes on the base of murine LIF gene sequence transcripts. Gonadal ridges and mesenteries were cultured on feeder cell for 7~15 days in the presence of forskolin, human basic fibroblast growth factor (hbFGF) and secreted LIF. PGCs gave rise to large compacted multicellular colonies resembling those of pluripotent stem cells termed embryonic germ cells. Most cells within the colonies were alkaline phosphatase positive. These results showed that the murine recombinant LIF can replace the human LIF in human PGCs culture. So, this advanced system can be used for human PGCs culture.

## O-15 돼지 단위발생란의 생산 및 아미노산 대사능

한경대학교 동물생명자원학과, <sup>1</sup>서울대학교 수의과대학

정연길 · 박용습 · 노상호 · 황우석<sup>1</sup> · 윤종택

최근 복제돼지의 생산에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있으나 후기배로의 발생율은 매우 저조한 실정이다. 본 연구에서는 돼지 체외성숙난자를 이용하여 인위적 활성화조건 의 확립과 배 발육률을 검토하였고, 단위발생 상실배 및 배반포의 아미노산 대사능을 측정 하였다.

도출된 유래 난자를 44시간 체외성숙배양한 후 (FSH 및 LH 첨가 배양액에서 22시간, 호 르몬이 제거된 배양액에서 22시간 배양) 난구세포를 제거하였다. 실험 1에서는 5  $\mu$ M iono- mycin (Ca), 7% ethanol (ET), 직류펄스 (DC, 1.2 kv/cm, 50  $\mu$ s)를 각각 또는 복합처리하여 활 성화를 유도하였고, 실험 2에서는 실험 1의 결과, 가장 적합한 것으로 나타난 DC의 최적 통전시간을 확립하기 위하여 통전시간을 각각 5, 10, 30, 50, 70 및 90  $\mu$ s로 나누어 실험을 실시하였다. 단위발생란의 배양은 NCSU-23 배양액을 이용하였다. 실험 3에서는 활성화 자극 후 5일째 상실배와 6일째 배반포를 필수아미노산 + 비필수아미노산 및 0.1% PVA가 첨가된 NCSU-23 배양액 30  $\mu$ l drop에 각 drop 당 46~154개씩 넣어 12시간 배양하여 배양 액 내 유리아미노산 농도를 측정하였다 (Biochrom20<sup>TM</sup>, Pharmacia, UK).

난자를 활성화할 경우 Ca, ET 보다 DC의 활성화율이 유의적으로 높았으며 ( $p < 0.001$ ), Ca, ET 및 DC를 복합처리할 경우에도 활성화율의 상승은 나타나지 않았다. 전기자극시간

에 따른 활성화율은 5 및 10  $\mu$ s보다 30, 50, 70 및 90  $\mu$ s가 유의적으로 높았으며 ( $p<0.01$ ) 발생율은 30, 50 및 70  $\mu$ s가 유의적으로 높게 나타났다 ( $p<0.05$ ). 단위발생 상실배의 아미노산 대사능은 glutamate, asparagine, phenylalanine, arginine, proline이 유의적으로 높았다. 배반포의 아미노산 섭취율이 상실배보다 높게 나타났으며, 특히 필수아미노산이 많이 소비되었다.

## O-16 인간정자의 침체 반응에서 T-형 $Ca^{2+}$ 채널의 관여 및 인간 고환에서 $Ca^{2+}$ 채널의 동정

대진의료재단 분당제생병원 <sup>1</sup>불임 및 생식의학연구소, <sup>2</sup>비뇨기과, <sup>3</sup>산부인과, <sup>4</sup>서강대학교 생명과학과

이재호<sup>1</sup> · 손원영<sup>1,4</sup> · 이진영<sup>4</sup> · 한징택<sup>4</sup> · 장석훈<sup>2</sup> · 김석중<sup>3</sup> · 김영찬<sup>1,2</sup>

인간정자의 침체 반응은  $Ca^{2+}$ 의 유입에 의해 일어나는 과정으로서 난자와 정자가 수정하는데 필수적인 단계이다.  $Ca^{2+}$ 의 유입조절은 전압의존성  $Ca^{2+}$ 채널 (Voltage dependent Calcium Channel: VDCC)에 의해 조절된다. 본 연구는 L-형과 T-형 VDCC를 특이적으로 저해하는 길항제를 사용하여 인간의 침체 반응에서 T-형 VDCC가 관여하는지 확인하고, RT-PCR 분석을 통해 T-형 VDCC가 고환 내에서 발현되는지 알아보기 위하여 시행하였다.

인간정자의 준비는 WHO기준으로 정상 정액 (n=10)을 선택하여 실험에 공시하였다. 준비된 정액을  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ 이 없는 PBS용액을 이용하여 2회 세척한 뒤 37°C, 30분간 부유시켜 운동성 있는 정자만을 취하여 실험에 공시하였다. 본 실험에 사용된 VDCC길항제는 T-형 VDCC길항제로서 mibefradil, pimoizide와 L-형 VDCC길항제로 nifedipine를 처리하였고 침체 반응은  $Ca^{2+}$  ionophore ( $Ca^{2+}$ i)와 Progesterone (P4)을 사용하여 유도하였다. 침체 반응은 *Pisum sativum* agglutinin FITC (PSA-FITC)의 염색을 통해 확인하였고 한 표본 당 100개 이상의 정자를 분석하였다. T-형 VDCC에 대한 분자 생물학적인 동정은 T-형 VDCC에 특이한 degenerative primers를 이용해 정상인의 고환조직에서 touch down RT-PCR를 시행하여 산물을 pMOSBLUE 벡터에 cloning, sequencing한 후 유전자 은행 검색을 통하여 확인하였다.

$Ca^{2+}$ i과 P4의 침체유도 반응에 대하여 mibefradil이 높은 저해율을 보였으나 pimoizide는  $Ca^{2+}$ i보다 P4에 대해 높은 저해율을 나타냈다 (Table 1). 그러나 L-형 VDCC길항제인 nifedipine은  $Ca^{2+}$ i, P4의 침체 반응 유도에 대하여 낮은 저해율이 관찰되었다 (Table 1). 인간 고환 조직에서 T-형 VDCC에 대한 RT-PCR 후 489 bp의 산물을 얻었으며, 유전자 은행 검

Table 1. IC50 for VDCC inhibitor on human sperm AR

Ca <sup>2+</sup> inhibitor	IC50	
	Ca <sup>2+</sup> i	P4
T-type VDCC		
Mibefradil	1.3 $\mu$ M	1.6 $\mu$ M
Pimoizide	85 $\mu$ M	30 $\mu$ M
L-type VDCC		
Nifedipine	150 $\mu$ M	60 $\mu$ M