

## 최소 귀세포를 이용한 핵이식란의 배양방법이 배반포 발달율과 수태율에 미치는 영향

윤중택<sup>1,2</sup>, 이호준<sup>2</sup>, 최은주<sup>2</sup>

한경대학교 유전공학연구소<sup>1</sup>, (주)한경제능텍<sup>2</sup>

본 연구는 최소 귀세포를 공여핵으로 이용한 체세포 복제송아지 생산에 있어서 배양방법이 배발생 및 배반포 발달율에 미치는 영향과 체세포 복제란의 이식후 수태율에 미치는 영향을 조사하여 복제송아지의 생산 효율을 제고하고자 실시하였다. 실험에 공시된 공여핵은 최소의 귀세포를 회수하여 10%FBS가 첨가된 DMEM배지에서 3-4일 동안 배양하여 monolayer Confluent 형성 후 0.25% trypsin을 처리하여 준비하였으며 공여세포는 적어도 passage가 5회 이상의 세포만을 사용하였다. 복제수정란의 생산은 18-20시간 동안 체외성숙 된 난자의 핵을 제거하고 공여핵을 주입하여 2.2kv/cm, 10 $\mu$ s의 전압으로 2회 자극함으로 융합하였으며, 융합된 난자는 5 $\mu$ g/ml ionomycin에서 4분간, 1.9mM 6-dimethyl aminopurine에서 4시간동안 배양하여 활성화처리를 하였다. 핵이식수정란의 배양은 39 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub> incubator에서 처리구 I은 CR1aa에서 4일간 배양 후 CR2aa배지에서 배양, 처리구 II는 CR1aa에 4일간 배양 후 CR2aa배지에 cumulus cell과 공배양, 처리구 III은 CR2aa 배지에 cumulus cell과 함께 배양하였다. 수정란이식은 발정발현 7일째에 비외과적 방법으로 젖소 미경산우에 이식하였으며 이식란수는 2~4개의 핵이식된 수정란을 이식하였다. 임신진단은 45~60일 사이에 직장검사 및 초음파 진단기를 이용하여 실시하였다. 배양방법에 따른 배발생율은 처리구 I에서 92.2%(83/90)으로 처리구 II와 III의 62.4%(63/101)와 77.8%(144/185)에 비하여 높게 나타났으나 배반포 발달율은 처리구 II와 III에서 65.1%(41/63)와 50.0%(72/144)로 처리구 I의 30.1%(25/83)보다 높게 나타났다.

각 처리구에 따른 수정란 이식후 수태율은 처리구 II와 III에서 공히 20%의 수태율을 나타낸 반면 처리구 I에서는 수태가 되지 않았다. 따라서 체세포 복제수정란의 생산에 있어서 배반포 발달율과 수태율을 높이기 위해서는 단순배양보다 공배양이 더 효과적인 것으로 사료되지만 이런 결과가 복제송아지 생산효율에 있어서도 효과적일지는 향후 더 많은 연구가 있어야 할 것으로 사료된다.

Table 1. Pregnancy rate after embryo transfer of nuclear Tiger cattld embryo into Holstein heifer

Culture system	NO. of	
	Recipients	Pregnancy(%)
CR1aa+CR2aa	4	0
CR1aa+CR2aa with cumulus cells	5	1(20.0)
CR2aa with cumulus cells	10	2(20.0)

(Key words) Co-culture, Pregnancy rate, Ear cell, Nuclear transfer, Tiger cattle