O-1 Annealing Control Primer (ACP) System을 이용한 미성숙 난자와 성숙 난자의 유전자 발현 차이에 관한 연구

차병원 여성의학연구소[1], 포천중문의과대학교 생명과학전문대학원[2],
충북대학교 농과대학 축산학과[3]

윤세진 · 김영훈[2] · 윤내영[1] · 권 황[1] · 고정재[1,2] · 김남형[3] · 이경아[1,2]

Background & Objectives: 본 연구는 Germinal Vesicle 단계의 미성숙 난자 (GV)와 배란된 Metaphase II 단계의 성숙 난자 (MII)로 부터 유전자 발현의 차이를 동정함으로써 난자 성숙에 관여하는 유전인자를 밝히고자 실시하였다.

Method: 실험에 사용된 GV는 4주령된 ICR 암컷 생쥐에 PMSG를 주사한 후 48시간 뒤에 배란 직전의 난포에서 회수하였으며 MII는 PMSG와 hCG를 48시간 간격으로 5 IU씩 주사하고, hCG 주사 후 16시간째에 회수하였다. Dynabeads mRNA DIRECT kit (Dynal, Oslo, Norway)를 이용하여 GV와 MII 난자에서 mRNA를 정제한 후 ACP (Annealing Control Primer; Seegene, Inc., Seoul, Korea) System을 이용하여 cDNA를 합성하고 PCR하여 두 그룹간의 유전자 발현차이를 2% agarose gel 상에서 분석하였다. 양적으로 서로 다르게 발현하거나 한쪽에서만 특이적으로 발현하는 유전자를 TOPO TA cloning vector (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 cloning하고, BLAST database로 확인하였다. 이들 유전자 발현의 차이는 Semi-quantitative RT-PCR을 통해 18s rRNA에 대한 상대적인 값을 구하여 비교 분석하였다.

Results: ACP primer 1번부터 12번까지를 사용하여 GV와 MII에서 서로 다르게 발현하는 26개의 유전자를 찾았는데 이중에 pleckstrin는 GV-specific였으며, protein kinase D2, COP9 complex, myomesin2 등은 GV에서 더 높게, MCM2, Mor2, Gas-6, Diva 등은 MII에서 더 높게 발현하였다. Diva를 제외한 대부분의 유전자는 본 연구를 통해 난자에서 발현한다는 사실을 처음 밝혔으며, 특히 MCM2, Gas-6, Diva의 경우는 난소 조직에서의 Immunohistochemistry를 통해 이들의 단백질 또한 난자에서 발현하는 것을 확인하였다.

Conclusions: COP9 signalosome은 signaling pathway와 ubiquitin-dependent protein degradation에 관여하며, PKD와 상호작용하는 유전자로 알려져 있는데 본 실험의 결과 두 가지 유전자를 모두 확인함으로써, PKD-COP9 System이 난자에서 작용하고 있다는 것을 알 수 있었다. 본 연구의 결과, 난자 성숙 과정에서 서로 다르게 발현하는 유전인자를 밝혀냈으며 이들 유전인자의 기능을 연구함으로써 난자 성숙에 관여하는 조절기전을 연구하는데 기여할 것이다.

O-2 체내와 체외에서 수정된 생쥐의 배반포에서 Apoptosis와 IGF-II 발현에 관한 연구

마리아병원[1], 고려대학교[2]

윤 정 · 윤혜진[1] · 윤산현[1] · 고 용[2] · 임진호[1] · 이원돈[1]

Background & Objectives: 체외에서 수정된 수정란은 apoptosis가 높게 나타나고, 체내에서 수정된