

## O-11 Ovum Bank 확립을 위한 생쥐 미성숙 난자의 Vitrification에 관한 연구

마리아병원<sup>1</sup>, 고려대학교<sup>2</sup>

김정원 · 윤혜진<sup>1</sup> · 윤산현<sup>1</sup> · 고 용<sup>2</sup> · 이원돈<sup>1</sup> · 임진호<sup>1</sup>

**Background & Objectives:** 본 연구는 human ovum bank의 확립을 위한 기초 연구로써 생쥐의 germinal vesicle (GV) 단계의 난자와 체외에서 Metaphase II (MII)까지 성숙시킨 난자를 각각 vitrification 후 용해하였을 때의 생존율과 meiotic spindle의 존재 유무를 비교해 보고자 하였다.

**Method:** 실험에 사용된 성숙난자의 회수는 4주령 된 ICR 암컷 생쥐에 PMSG 5 IU를 주사하고, 44~46시간째 oocytes-cumulus-complex 형태의 미성숙 난자를 난소로부터 puncture하여 얻었다. 회수된 미성숙 단계의 난자는 0.2% hyaluronidase 용액을 이용하여 난구세포층을 제거하였고 무작위로 두 그룹으로 나누었다. 그룹 1은 GV 단계에서 vitrification을 실시하였으며, 그룹 2는 GV 단계의 난자를 체외에서 MII 단계까지 배양한 후 vitrification을 실시하였다. Vitrification은 동결 보존할 난자를 1.5 M EG에서 1분간 전처리 하였으며, 5.5 M EG+0.1 M sucrose 용액에서 20초간 노출시킨 후 EM grid로 옮겨 바로 LN2 용액에 침지하였다. 동결난자의 용해는 0.5 M sucrose와 20% hFF가 첨가된 PBS 용액에 각각 5분씩 처리하였다. 각 그룹에서 생존한 난자는 1시간 정도 전 배양 한 후 pol-scope를 이용하여 meiotic spindle의 존재 유무를 확인하였다.

**Results:** GV 단계에서 vitrification을 시행한 그룹 1 난자의 생존율은 84% (85/101)였고, 생존한 난자를 체외 성숙 배양액에서 14시간 이상 배양하였을 때 82% (70/85)가 MII 단계에 도달하였고, 모든 난자에서 spindle이 관찰되었다. 그리고 11% (10/85)가 MI 단계 5% (5/85)가 GV 단계에 머물렀다. 이에 반해 체외에서 MII 단계까지 성숙시킨 후 vitrification을 시행한 그룹 2 난자의 생존율은 64% (40/62)였고, 97% (39/40)의 난자에서 spindle이 관찰되었다.

**Conclusions:** 체외에서 MII 단계까지 성숙시켜 vitrification을 실시한 난자에 비해 GV 단계에서 vitrification을 실시한 난자에서 생존율과 성숙율이 높게 나타났다. 본 실험의 결과로 볼 때 immature cycle에서 많은 수의 미성숙 난자가 채취되었을 경우 채란된 난자는 GV 단계에서 vitrification을 실시하는 것이 효과적일 것으로 사료된다.

## O-12 RNA Interference (RNAi)를 이용한 생쥐 난자와 배아에서 MT Transposon Like-element, Clone 7 (MTi7) 유전자의 역할 규명에 관한 연구

차병원 여성의학연구소<sup>1</sup>, 포천중문의과대학교 생명과학전문대학원<sup>2</sup>,

충북대학교 농과대학 축산학과<sup>3</sup>, 서울대학교 생명과학부<sup>4</sup>

박창은<sup>1,2</sup> · 신미라<sup>3</sup> · 전은현<sup>2</sup> · 조성원<sup>1</sup> · 이숙환<sup>1,2</sup>

윤태기<sup>1</sup> · 김경진<sup>4</sup> · 김남형<sup>3</sup> · 이경아<sup>1,2</sup>

**Background & Objectives:** 여성의 난소는 primordial follicles (원시난포)로 성장이 멈추어 있고, pri-

mary follicles (1차 난포)에서 성장이 개시되는 중요한 과정을 진행한다. 그러나 이 과정을 조절하는 요인과 기전에 대해서는 아직까지 많은 것이 알려져 있지 않다. 본 연구진은 선행연구에서 생후 1일자와 생후 5일자 생쥐 난소에서 차이 나게 발현하는 유전자 목록을 suppression subtractive hybridization (SSH)를 이용하여 얻었고, 이중에서 MTi7은 특히, 난자에서만 특이적으로 발현하는 유전자로 생후 5일자에서 더 높게 나타남을 발견하였다. 본 연구는 RNAi를 이용하여 기능이 알려져 있지 않은 MTi7이 난자와 배아에서 어떤 역할을 하는지 알아보기 위하여 수행하였다.

**Method:** ICR, BALB/C, C3H, C57BL/6, FVB/N strain 생쥐의 난소에서 in situ hybridization (ISH), Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)를 통해 mRNA 위치와 종간의 변이를 관찰하였고, RNAi를 위해 c-mos와 MTi7 dsRNA를 제작하고, 이를 미성숙 난자 (GV), pronucleus (PN), 2C에 미세주입하고 배양한 뒤, RT-PCR과 공초점 현미경을 통해 mRNA와 tubulin의 변화를 관찰하였다. 또한 GV, MII, PN, 2C, 4C, 8C, morular, blastocyst 시기에서 정상적인 c-mos와 MTi7 mRNA의 발현을 관찰하기 위해 real-time PCR을 수행하였다.

**Results:** Real-time PCR 결과, c-mos가 GV, MII 난자에서 발현하나 배아에서는 발현이 거의 없음에 반하여 MTi7은 난자뿐 아니라, 배아시기까지 계속 발현함을 관찰하였다. 또한 GV난자에 RNAi 결과, 43~54%가 GV arrest되었고, 이때 c-mos와 MTi7의 mRNA가 대조군에 비해 68%~90% 감소하였다. 또한 PN과 2C에 MTi7 dsRNA 주입한 배아에서도 대부분 발달이 멈추었다.

**Conclusions:** RNAi 결과, MTi7은 난자의 성숙 및 배아발달에 관여하며 그 기능이 특히 nuclear membrane breakdown에 연관되어 있을 것으로 추측되었다.

---

This study was supported by a grant of the Korea Health 21 R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (01-PJ10-PG6-01GN13-0002).

## O-13 In vitro Spermatogenesis of the Mice in the Collagen Gel Matrix

JH Lee<sup>1,4</sup>, YJ Jung<sup>1</sup>, JH Lee<sup>1</sup>, SJ Lee<sup>3</sup>, KW Choi<sup>1</sup>, SJ Lee<sup>1</sup>, HK Kim<sup>4</sup>

*IVF & Genetic Institute, MD Plus<sup>1</sup>, MiraeandHeemang Ob/Gyn Clinic<sup>2</sup>*

*Department of Animal Science, Sahmyook College<sup>3</sup>*

*Department of Biotechnology, Seoul Women's University<sup>4</sup>*

**Background & Objectives:** Spermatogenesis is a complex and highly coordinated processes by which spermatogonia proliferate and differentiation produce mature sperm. Successful in vitro differentiation of spermatogenic cells is a potent method for the treatment of male sterility due to spermatogenic arrest. Many researches have been done to improve the culture efficiency and recent studies have shown that round spermatids could develop from the in vitro culture of immature male germ cells. Generally, Cell culture system provides the one-dimensional environment. It is no good efficiencies for cell differentiation and proliferation. We hypothesized that the mechanically active environment present in the effectiveness of three-dimensional collagen gel matrix for in vitro spermatogenesis.