

P0448

난자가 체외성숙된 시간에 따른 한우 체세포 복제수정란의 발달과 MPF(Maturation Promoting Factor)의 변화

김동훈¹, 이상기¹, 양병철¹, 임기순¹, 정운원², 박효숙¹, 김세웅¹, 황인선¹, 서진성¹, 양보석¹, 장원경¹

¹축산연구소 응용생명공학과, ²마이진 생명공학연구소

본 연구는 한우 체세포 복제수정란의 발달에 있어서 난자가 체외성숙된 시간이 미치는 영향을 확인하고, 또한 체외성숙 시간별 성숙난자의 MPF 활성화도 변화를 조사함으로써 소 복제수정란 생산을 위한 적정 체외성숙 조건을 살펴보는 데 목적이 있었다. 도축된 한우로부터 채취된 난소로부터 미성숙 난자를 채취하여, 1 µg/ml FSH와 1 µg/ml E2가 첨가된 TCM-199 배양액에서 18, 20, 22시간 체외성숙 후에 각각 성숙난자를 회수하여 22시간째 제핵을 실시하였다. 한우 귀 조직으로부터 구축된 섬유아세포를 공여세포로 이용하여 제핵된 난자에 핵이식을 실시하였으며, 25 V/mm, 10 µs, 1pulse 조건의 전기자극을 통하여 융합한 이후에 10 µM Ca ionophore에서 5분 그리고 2 mM 6-DAMP에 3시간 처리함으로써 활성화를 유도하였다. 복제수정란의 체외발달을 위해서는 CR2 배양액을 이용하여 7일간 배양을 실시하였으며, 배반포의 세포수와 세포자연사를 조사하기 위하여 TUNEL 방법을 이용하였다. 체외성숙된 난자의 MPF 활성화도는 cdc2 kinase ELISA kit를 이용한 cdc2 kinase 분석을 이용하여 측정하였다. 체외성숙 22시간까지의 전체 성숙율은 58.3% 이었으며, 전체 성숙된 난자 중 51.9%가 18시간째, 31.1%가 20시간째 그리고 17.0%가 22시간째 성숙되는 것을 확인하였다. 난자가 체외성숙된 시간에 따른 체세포 복제수정란의 배반포 발달율은 18시간째 성숙된 난자 (15.7%)가 20 시간 (23.5%), 22시간째 성숙된 난자보다 낮았으며, 전체 세포수 및 세포자연사가 유발된 세포수에 있어서는 18시간, 20시간, 22시간째 성숙된 난자간에 차이가 없는 것으로 나타났다. cdc2 kinase 활성화도는 난자가 성숙된 시간에 따라서 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나 18시간, 20시간째 성숙된 난자를 22시간째에 분석하면 cdc2 kinase 활성화도가 22시간째에 성숙된 난자보다 유의하게 높은 것으로 나타났다 ($P < 0.005$). 본 연구결과에서 대부분의 한우난자는 배양 20시간 경에 성숙이 되었으며, 난자가 성숙된 시간에 따른 발달율은 18시간째 난자에서 다소 감소되는 경향을 나타냈으나 세포수 및 세포자연사는 차이가 없었으며, MPF는 난자의 체외성숙 시간이 경과함에 따라 증가되는 양상이 나타났다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, 한우에 있어서 체세포 복제과정은 성숙배양 후 20시간째부터 시작하는 것이 바람직하다고 생각된다. 그리고 난자 성숙시간에 따른 MPF 활성화도와 복제수정란 발달에 관한 보다 심도있는 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

Key words: 체외성숙, 소 복제수정란, MPF