

체세포 복제고양이 생산

윤희준, 이효상, 이영호, 민원기, 공일근

순천대학교 동물자원과학과, 펫클론(주)

고양이 체세포 복제 고양이는 2002년 Shin 등(Nature 415:859)이 난구 세포를 이용하여 1마리의 "Cc"를 생산하였고, 2004년 윤 등(Reproduction. accepted)이 태아섬유아 세포를 이용하여 산자 생산에 성공하였으나 피부세포를 이용하여 생존한 복제산자를 성공한 보고가 없었다. 그리하여 본 실험에서는 체세포 복제 산자 생산을 위하여 난자의 체외성숙, 체세포 핵이식수정란의 체외발달, 핵이식수정란을 대리모에 이식하여 복제 산자를 생산하고자 하였다. 실험에 공시한 난자의 일부는 성성숙한 고양이에서 난소적출수술로 난소를 척출한 후 4시간내에 실험실로 운반하여 면도칼로 난소를 절제한 후 미성숙난자를 채취하여 TCM-199 +0.4%BSA +1000iu/ml bST에서 36시간 체외성숙을 유도하였으며, 일부는 고양이를 PMSG 처리 후 체내성숙한 난자를 사용하였다. 도나세포는 성성숙한 숫놈인 Turkish Angora 고양이 귀 조직으로부터 체세포를 채취하여 DMEM+10% FCS에서 체세포를 건립한 후 Passage 1부터 4를 실험에 공시하였고, 적어도 실험 3일전부터 DMEM+0.5% FCS에서 혈청기아 배양하였다. 핵이식방법은 윤 등(2002 BOR 67: 442-446)의 방법에 준하여 실시하였다. 주입된 체세포는 0.28 M mannitol+0.1 mM Mg+2 에서 60 used, 180 V/mm DC pulse로 2회 융합을 유기하였고, 1시간 후 100 nM의 칼슘이 첨가된 0.28 M mannitol에서 20 used, 120 V/mm DC pulse 에서 2회 활성화를 유기하였다. 활성화한 난자는 50 ul drop의 TCM-199, 4 mg/ml BSA+5 ug/ml cytochalasin B에서 38%, 5% CO₂에서 4시간 배양하였다. 체외배양은 500 ul TCM-199, 4 mg/ml BSA에서 6일간 배양하여 배반포 발달율을 조사하였다. 일부 핵이식한 난자는 50 ul drop의 TCM-199, 4 mg/ml BSA에서 38%, 5% CO₂에서 1일간 배양한 후 대리모에 이식하여 산자생산을 유도하였다.

체외배양에서 도나세포를 0.5% FCS에서 혈청기아 배양 시 핵이식난자의 체외발달율은 8.5%로 혈청기아를 실시하지 않은 대조구 3.8%보다 높았으며, 이식한 8마리의 대리모 중 4마리에서 6마리의 복제 산자가 정상 분만하였다.

Key words) 고양이, 체세포, 핵이식