

P-8 Identification of Differentially Regulated Genes in Bovine Blastocysts using an Annealing Control Primer System

Park SY, Hwang CH¹, Cui XS¹, Shin MR¹, Kim EY, Kim NH¹,
Lee WD², Park SP, Lim JH²

*Maria Infertility Hospital Medical Institute/Maria Biotech, ¹Department of Animal Science
Chungbuk National University, ²Maria Infertility Hospital*

Background & Objectives: The identification of embryo-specific genes would provide insights into early embryonic development. However, the current methods employed to identify the genes that are expressed at a specific developmental stage are labor intensive and suffer from high rates of false positives. In the present study, we used a new differential display method, to analyze differentially expressed genes (DEGs) in bovine blastocysts produced in vitro.

Method: Here we employed a new and accurate reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) technology that involves annealing control primers (ACPs) to identify the genes that are specifically or prominently expressed in bovine early blastocysts and hatched blastocysts produced in vitro.

Results: Using these techniques, a total of nine expressed sequence tags (ESTs) of genes that were differentially expressed in hatched blastocysts, as compared to blastocyst embryos, were cloned and sequenced. The cloned genes or ESTs (C1-C9) all exhibited significant sequence similarity with known bovine genes (99~100%; FTL, RPS12, LAPT4a, and RPL12) or ESTs (80~94%; AIBP, CULLIN-1, HDLP, COX5a, and RECS1) of other species. As revealed by real time RT-PCR, these genes were regulated upstream in the hatched blastocyst stage during early implantation.

Conclusions: These results suggest that this new, PCR-based differential display RT-PCR technique is a very useful tool for the identification of stage-specific genes of preimplantation embryos.

P-9 생쥐 수정란에서 발현되는 IGFs와 Apoptosis간의 연관성에 관한 연구

윤 정¹ · 윤산현¹ · 이석윤¹ · 고 용² · 이원돈¹ · 임진호¹

¹마리아병원, ²고려대학교

Background & Objectives: 체외에서 수정한 수정란은 체내에서 수정한 수정란에 비하여 apoptosis가 높게 나타나고, 발생하는 속도가 느리다. 이러한 양상은 체외의 여러가지 요인으로 수정란에서 성장인자들이 잘 발현되지 않는다는 것을 시사한다. 수정란은 다양한 성장인자들의 리간드와 수용체를 발현할 수 있으며, 그 내인성 성장인자들이 다양한 형태로 수정란의 발생을 조절한다고 알려져 있다. 특히, IGFs를 배양액에 첨가하면 높은 난할율과 포배기 배아 발생율을 얻을 수 있다는 보고가 있으나, 수정 환경에 따른 성장인자들의 발현과 apoptosis 사이의 상관관계에 관한 연구는 현재로서는 미흡하다. 따라서, 본 연구는 체내외에서 수정한 생쥐 수정란의 IGF-I과 -II의 발현양상을 조사하고, 이들과 apoptosis

발생간의 연관성을 조사하고자 실시하였다.

Method: 5주령의 B6/CBA F1 생쥐에게 7.5 IU의 PMSG를 주사하고, 48시간 후에 7.5 IU의 HCG를 주사하여 다배란을 유도하였다. 체내수정은 동종의 웅성생쥐와 합사하여 유도하였으며, 체외수정은 HCG를 주사한 14시간 후에 난자를 회수하여 정자를 첨가함으로써 유도되었다. 두 군에서 2-세포기 수정란을 각각 회수하여 0.4% BSA를 함유한 MTF 배양액으로 포배기까지 배양하였다. 두 군간의 세포수 차이는 포배기 배아를 PI로 염색한 후 관찰하였으며, apoptosis 빈도는 TUNEL 방법을 사용하여 형광현미경하에서 확인하였다. 또한 2-세포기와 포배기 배아에서 RT-PCR 방법을 사용하여 IGF-I과 -II의 발현양상을 조사하였다.

Results: 두 군간의 포배기 배아 발생율을 비교한 결과, 체내에서 수정한 군에서 98.2% (807/822), 체외에서 수정한 군에서 92.9% (695/748)로 차이가 없었다. 그러나 부화율은 체내에서 수정한 군에서 64.1% (527/822)를 나타내, 체외에서 수정한 군의 44.8% (335/748)에 비하여 높은 경향을 보였다. 포배기 배아의 총 세포수도 체내에서 수정한 군 (68.4±5.3)보다 높게 나타났다. 포배기 배아에서 총 세포수에 대한 apoptosis를 나타낸 세포 수를 비교한 결과, 체내에서 수정한 군에서 3.4%로 체외에서 수정한 군 (6.5%)보다 낮게 나타났다. IGFs의 발현은 체내에서 수정한 군의 2-세포기와 포배기 배아에서 체외에서 수정한 군의 배아들보다 높게 나타났다.

Conclusions: 체내에서 수정한 군이 체외에서 수정한 군에 비하여 IGF-I과 -II의 발현과 부화율이 증가하였고, apoptosis의 빈도는 낮게 나타났다. 이 결과는 IGFs의 발현을 증가시킬 수 있다면 수정란이 체외에서 배양하더라도 apoptosis의 빈도가 낮아질 것이라는 것을 제시하고 있다. 향후, 여러 성장인자들이 수정란 발생 및 apoptosis에 어떠한 영향을 끼치는지를 규명하기 위해 더 많은 성장인자들에 대한 정량적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

P-10 생쥐 난소에서의 Wig1 (Wild-type p53-induced Gene 1) 발현에 관한 연구

김경화¹ · 윤세진² · 박창은^{1,2} · 이경아^{1,2}

¹포천중문의대 생명과학전문대학원, ²차병원 여성의학연구소

Background & Objectives: 후기난포발달에 관한 연구가 많이 되어 있는 반면 초기난포발달 즉, 원시난포-1차난포-2차난포로의 발달에 관련된 연구는 매우 미흡한 상태이다. 본 연구진은 이전의 연구에서 각 발달단계별 초기난포를 분리하여 cDNA microarray를 이용한 분석방법으로 유전자 발현에 관한 연구를 시행하였다. 본 연구는 이들 유전자 중에서 p53에 의해 발현이 증가되면서 매우 특이한 zinc finger protein을 만들며, 과발현될 경우 세포의 성장을 저해하는 기능을 갖는 것으로 알려진 wig1에 대하여 유전자 발현 양상을 규명하고자 실시하였다.

Method: ICR 생쥐의 난소에서 각 발달단계별 난포 (원시난포; 200개, 1차난포; 150개, 2차난포; 70개)를 분리하고, RNA를 분리하고 증폭한 후, cDNA microarray를 실시하였다. 이렇게 얻어진 유전자 중에서 발현빈도가 높은 유전자중 하나가 wig1 이었다. Dig-labeled wig1 probe (1:100)를 제작하여 in situ hybridization을 수행하였고, 각 발달단계별 난포에서의 유전자발현 양상을 분석하였다.

Results: Microarray 결과 wig1은 1차난포에서 2차난포로 발달하는데 현저히 증가하는 유전자로 나