

P-75

배양액의 조성과 무혈청 배지를 이용한 개 미성숙난자의 체외성숙에 관한 연구

김창희, 황성수, 윤종택

한경대학교 생물정보통신전문대학원, 유전공학연구소, 동물생명자원학과

본 연구는 배양액의 조성과 배양액에 첨가하는 에너지원 및 배양시간이 개 미성숙 난자의 체외성숙에 미치는 영향을 조사하고자 실시하였다.

개 난자는 도축장에서 채취한 평균 2-6세의 암컷의 난소를 면도날로 세절하여 난자를 회수하였다. 난자의 선택은 난구세포가 2-4층 이상으로 둘러싸여 있고, 세포질이 균등한 색조를 지닌 크기가 110 μ m 이상인 난자를 선별하여 실험에 공시하였다. 배양액은 L-Glutamine의 농도에 따라 TCM-199 (100mg/L), RPMI1640 (300mg/L) 또는 DMEM (584mg/L)을 기본 배양액으로 사용하였다. Serum의 첨가 유무에 따른 체외성숙율을 비교하여 보고자 각 배양액에 10% Serum을 첨가한 Group과 2.5mM Pyruvate를 첨가한 Group으로 나누어 96시간과 120시간동안 배양하였다. 체외성숙 난자의 핵상 관찰은 체외성숙 후 96시간 또는 120시간째에 0.2% Hyluronidase 용액에 1~5분간 침지하여 glass pipette으로 난구세포를 제거한 후 세포막이 생존한 난자만 10 μ g/ml의 Hoechst 33342로 5분간 염색 후 형광현미경 하에서 핵상을 관찰하였다.

배양액의 종류에 따른 체외성숙율의 차이는 96시간째에 MII로의 성숙율이 각각 TCM-199 (2%), RPMI1640 (3.7%) 그리고 DMEM (4.2%)로 나타났으나, 120시간째에서는 각각 8.7%, 13.4%, 14.5%로 나타나 L-Glutamine 농도가 가장 높은 DMEM이 다른 배양액들 보다 성숙율이 높았다. 이것은 배양액의 종류 즉, 배양액의 조성에 따라 체외성숙율이 영향을 받을 수 있음을 나타내고, 또한 체외성숙시간도 120시간이상 체외배양을 하는 것이 체외성숙율을 높일 수 있는 요인이라 할 수 있다. 혈청첨가 유무에 따른 체외성숙율에서는 배양액에 각각 10% Serum과 2.5mM Pyruvate를 첨가하여 96시간동안 배양한 실험에서는 GV, GVBD, MI 및 MII 모두 큰 차이를 보이지 않았다. 120시간동안 배양한 경우 10% serum을 첨가한 처리군의 MII로의 성숙율은 TCM-199 (7.1%), RPMI1640 (16.1%) 그리고 DMEM (5.4%)로 나타나 RPMI1640 처리군이 높았고, 2.5mM Pyruvate를 첨가한 처리군에서는 각각 8.9%, 10.1%, 20.8%로 DMEM 처리군의 성숙율이 높은 것으로 나타났다. 이것은 무혈청배지를 이용하여



개 난자의 높은 체외성숙율을 얻는 것이 가능하다는 것을 보여주는 결과라 할 수 있다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 개 난자의 체외성숙에 배양액의 조성 및 에너지원이 영향을 미칠 수 있음을 알 수 있었고, 또한 배양시간도 체외성숙에 많은 영향을 미침을 알 수 있었다. 따라서 개 난자의 체외성숙율을 높일 수 있는 더욱 다양한 연구가 필요하다고 사료된다.

Keywords: 개, 미성숙난자, *L-Glutamine*, 무혈청배지