

소 난관상피세포 배양액 유래 배발육촉진인자의 정제와 소 수정란 체외배양시 발육에 미치는 효과

김현일 · 노상호* · 박종임* · 신태영* · 이병천* · 황우석*

제일화학(주)

Purification of Embryogenesis Stimulating Activity from Bovine Oviduct Epithelial Cell Conditioned Medium and Its Effect on the Development of Bovine Embryos

H. I. Kim, S. Roh*, J. I. Park*, T. Y. Shin*, B. C. Lee* and W. S. Hwang*

Jeil Chem Co.

SUMMARY

The embryogenesis stimulating activity(ESA) had been shown in co-culture of embryos with bovine oviduct epithelial cell(BOEC) and culture in BOEC-conditioned medium. The present study was undertaken to purify and quantify the embryotropic proteins and to determine the optimum concentration of the embryotropic protein for the proper development of embryos.

In BOEC-conditioned medium, five major bands of proteins were detected(66, 53, 40, 32 and 24 kDa) by SDS-PAGE. From these proteins, 288 μ g of protein that had a 32kDa molecular weight was purified by gel filtration column and perfusion chromatography ion-exchange column. When purified protein was supplemented to the *in vitro* culture media at various concentrations in protein-free media, 2.5 μ g/ml supplement group showed significantly higher rates of embryo development into morula/blastocyst stages than other groups($p < 0.05$).

In conclusion, we purified 32kDa protein from BOEC-conditioned medium and this protein showed optimum embryogenesis stimulating effect at 2.5 μ g/ml.

(Key words: bovine oviduct epithelial cell, conditioned medium, embryotropic effect, cELISA, embryo stimulating activity)

서 론

수정란의 배양에 관한 초기 연구에서 포유류 수정란의 발육이 일정단계에서 정지되는 것이 발견되었다(Wright와 Bondioli, 1981). 이러한 장애는 토

끼 난관으로의 이식(Elington 등, 1990; Rexroad와 Powell, 1988), 배양액내 EDTA 첨가(Abramczuk 등, 1977), 삼투압조정(Lawitts와 Biggers, 1991), 자궁관류액의 첨가(Fischer 등, 1990) 등으로 극복되어 왔으며, 난관 상피세포(bovine oviduct epithelial cell: 이하 BOEC; Fukui, 1989; Eystone

* 서울대학교 수의과대학(College of Veterinary Medicine, Seoul National University)

이 논문은 1997년도 과학재단 핵심연구과제(971-0605-033-1) 지원에 의해 수행되었음.

과 First, 1989; Ellington 등, 1990), 과일막세포 (Fukui와 Ono, 1989) 및 다른 체세포와의 공배양 (buffalo rat liver cell: Smith와 Hooper, 1987; Vero cell: Menezo 등, 1990) 또한 *in vitro* block을 극복시키는 것으로 보고되어 있다.

소의 수정란 배양시 BOEC는 배양이 용이할 뿐 아니라 배발육을 촉진하는 작용이 뛰어나 널리 이용되어 왔다(Ellington 등, 1990; Gandolfi 등, 1989). 이러한 초기 배발육에 주는 자극의 기전은 아직 밝혀져 있지 않지만 embryotropic factors의 분비(Heyman 등, 1987) 및 발육저해인자의 제거(Chatot 등, 1989)가 제시되고 있다. 전자의 경우는 이들이 열에 민감하고 proteinase 처리로 불활성화되므로 단백질의 일종으로 추정되고 있다(Hoshi 등, 1992). 배양된 BOEC 분비 단백질이 몇몇 동물 종에서 밝혀졌으며(마우스: Kapur와 Johnson, 1985; 토끼: Oliphant 등, 1984; 양: Sutton 등, 1984; 소: Roberts 등, 1975), 또한 BOEC monolayer는 체외에서 양의 수정란을 배반포까지 발육시킬 수 있는 난관액 분비 단백질과 동일한 수종의 단백질을 분비하는 것이 밝혀졌다(Gandolfi와 Moor, 1987). 이러한 BOEC의 발육향상효과를 확인하기 위하여 conditioned medium이 사용되어 왔는데 이 배양액은 공배양시 야기되는 부작용의 제거 및 가용성 배발육인자의 추적이 용이하다는 점에서 공배양에 비해 많은 이점을 지니고 있다(Eyestone 등, 1991).

영양막세포의 conditioned medium 분획 중 저분자량(<27kDa) peptide의 존재가 증명된 이후(Heyman 등, 1987) 몇몇 단백질들이 체세포 conditioned medium으로부터 분리되었다. 수정란의 발육을 촉진하는 단백질들이 혈청을 첨가하지 않은 소 난구/과립막세포(Kobayashi 등, 1992; Satoh 등, 1994), BOEC(Satoh 등, 1994)의 conditioned medium에서 발견되었으며 난관 특이의 분자량 85~95kDa의 estrus-associated glycoprotein이 난관 조직 및 난관 관류액의 conditioned medium에서 발견되었다. 공배양 시스템에 있어 세포수와 전배양시간은 수정란의 발육에 큰 영향을 미칠 수 있으므로 최적의 배양조건을 설정하는 것이 매우 중요하다. 그러나, 이 촉진인자의 적정농도는 아직 밝혀

져 있지 않다.

따라서 본 연구는 BOEC에서 생산된 단백질의 정제, 농도변화의 측정, 배발육촉진효과의 확인 및 수정란의 발육에 있어 최적농도를 설정하기 위하여 수행되었다.

재료 및 방법

1. 세포배양 및 conditioned medium의 준비

기본 배양액으로는 0.27mM Na-pyruvate와 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 tissue culture medium-199(이하 TCM-199, Gibco BRL, U.S.A.)이 이용되었다. 소 난관은 초기 황체기의 도출된 한우 암소에서 채취되었다. 회수된 난관은 멸균된 50ml centrifuge tube에 담아 얼음과 함께 1시간 이내에 실험실로 운반하였다. 난관 주위의 여분의 결체조직을 제거하고 멸균된 생리 식염수가 담긴 60 mm petri dish에서 세정하였다. 난관은 22-gauge needle이 장착된 10ml 주사기에 세정용 TCM-199을 5ml 흡입, 관류 후 압착, 세포를 채취하였다. 관류액은 신선한 세정용 TCM-199으로 교환하면서 800×g에서 10분간 3회 원심분리하였다. 원심분리된 BOEC는 혈청이 첨가되지 않은 TCM-199 1ml에 부유시키고 50ml의 TCM-199이 있는 75cm² 세포 배양 flask에 옮겨 공기 및 습도가 포화상태인 39°C, 5% CO₂ incubator 내에서 3~5일간 배양되었다.

2. 단백질 정제

배양 후 BOEC conditioned medium은 10,000×g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 회수, 실험시까지 -30°C에 보관되었다. 총 단백질 농도는 Lowry method로 측정되었다. 회수된 상층액은 4°C 0.01M phosphate buffered saline(이하 PBS) 2ℓ에서 cellulose membrane (Membrane Filtration Products, Inc., U.S.A.)으로 투석되었으며 48시간 후 단백질 용액을 채취하고 영하 50°C(10⁻³mbar)에서 동결건조 되었다. 동결건조한 단백질은 20mM Tris buffer(pH 7.5) 1ml에 재용해되었다. 용해단백용액은 20mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)로 충전된 perfusion chromatography ion-exchange column(PerSeptive Biosystems, Inc., U.S.A.)에 직

접 주입되었다. 각종 결합단백질은 column 내에서 동일 buffer내 0~500mM의 NaCl linear gradient와 함께 추출되었다. 추출된 분획들은 자동분획수집장치에 의해 280nm에서 흡광도에 따라 분리되었다. 각각의 분획내 단백질들은 ELISA와 SDA-PAGE로 분석되었다.

3. 전기영동

Embryo stimulating activity(ESA)의 순도와 분자량은 Mini-protean II (Bio-Rad, U.S.A.)를 이용한 SDA-PAGE(10% polyacrylamide gel)로 분석하였다. 전기영동 후 분리된 gel은 이중염색법(Coomassie blue 염색과 imidazole-sodium dodecyl sulfate-zinc reverse 염색; Fernandez-Patron 등, 1995)으로 염색하였다. 분자량은 기준단백질(BSA: 66.2kDa; ovo-albumin: 45kDa; glyceraldehyde-3-phosphate: 36kDa; Bovine erythrocyte carbonic anhydrase: 29kDa; trypsinogen 24kDa; trypsin inhibitor: 20kDa)의 이동거리와 비교하여 계산하였으며 분자량은 Rf. value에 기초한 그래프에 의하여 분석되었다.

4. ESA에 의한 항혈청의 생산

항혈청 생산을 위하여 토끼(New Zealand 산, 6개월령)에 200 μ g의 정제된 ESA가 함유된 1ml complete Freund's adjuvant(Sigma, U.S.A.)를 주사하였다. 추가접종은 100 μ g의 ESA가 함유된 1ml의 complete Freund's adjuvant를 2주 간격으로 2회 주사하였다(Sigma, U.S.A.). 최종 추가접종 2개월 후 항혈청을 회수하여 immunoblotting과 ELISA에 의해 특이 항체의 존재 여부를 검사하였다.

5. 항 ESA 혈청에 의한 BOEC의 형광면역염색

BOEC는 24-well plate에서 3일간 배양되었다. 배양 plate는 PBS(0.01M, pH 7.2)로 3회 세정하였고 80% acetone으로 고정하였다. ESA의 토끼 다클론 항체(1 : 500)를 배양 plate에 첨가하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 토끼 IgG(Sigma, U.S.A.)에 대한 2차 항체가 결합된 fluorescein isothiocyanate(FITC)는 1:20,000으로 희석되어 monolayer에 첨가되었다. 세정 후 plate는 450nm에서 형광

현미경으로 관찰되었다.

6. ELISA

항원[50mM NaHCO₃(pH 9.6)내에 10 μ g/ μ l의 ESA 함유]은 ELISA plate(Falcon, U.S.A.)에서 하룻밤, 실온에서 코팅되었다. ELISA plate는 0.01M PBS(pH 7.2)에서 3회 세정하고 비특이반응을 방지하기 위하여 well당 200 μ l의 탈지분유가 함유된 PBS(2% w/v)로 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 block하였다. PBS로 3회 세정한 후 100 μ l의 다클론 항체(1:1,000 희석)와 100 μ l의 horseradish-peroxidase conjugated anti-rabbit IgG(1:4,000 희석; Sigma, U.S.A.)를 차례로 첨가하였다. ELISA plate는 0.01% thimerosal이 함유된 0.05M citrate phosphate buffer(pH 5.2)와 0.15% o-phenylenediamine dihydrochloride 용액이 9:1로 혼합된 용액을 100 μ l 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 배양하였다. 흡광도는 490nm에서 ELISA reader로 측정하였다.

7. 난자 회수 및 체외성숙

도축장에서 난소를 채취한 후 100IU/ml의 penicillin과 100 μ g/ml의 streptomycin이 첨가된 38 $^{\circ}$ C의 생리식염수가 들어있는 보온병에 넣어 2시간내에 실험실로 운반하였다. 주사침(18gauge)이 연결된 10ml의 주사기로 5% FBS(Gibco BRL, USA)이 첨가된 TCM199(Gibco BRL, USA)을 2ml정도 흡인한 다음 직경 3~5mm의 난포로부터 난자를 채취하였다. 회수된 난포란은 난구세포가 치밀하게 부착되고 세포질이 균질한 것만을 선별하여 사용하였다. 배양액은 10% FBS첨가 TCM199이 분주되어 있는 4-well dish(Nunclon, Denam가)의 각각의 well내에 2.5 μ g/ml의 FSH(Antrin[®], Japan)를 첨가하고 이후 각 well당 15개씩의 난자를 넣어 공기 및 습도가 포화상태인 39 $^{\circ}$ C, CO₂ 배양기내에서 20~24시간 배양하였다.

8. 체외수정

정액은 straw당 4 \times 10⁷개의 정자가 들어있는 동결정액을 사용하였으며 기본배양액은 modified Tyrode's medium(Parrish 등, 1986; 이하 TALP로 약함)을 사용하였다. 난자의 성숙배양개시 22시

간 후에 체외수정을 위해 동결정액을 38℃ 수조에 30초간 침지하여 진탕용해시킨 후 현미경하에서 운동성을 확인하였다. 준비된 10개의 round bottom plastic tube(Falcon, U.S.A. ; 11×55mm)에 1ml의 수정능획득용 배양액(sp-TALP)을 넣고 0.2ml 씩의 정자를 첨가하여 CO₂ 배양기내에서 1시간 정치하였다(swim-up처리). 그후 정자의 상층액 0.8ml를 pasteur pipette으로 흡입하여 하나의 원심관에 모으고 세정을 위해 2회 원심분리(700×g, 5분)하여 동결보호제 및 희석액을 제거하고 생존성 있는 활력정자를 선별하였다. 수정능획득은 원심관에 들어있는 정자를 농도가 1×10⁸개/ml 되도록 조정하고 heparin(Gibco BRL, U.S.A. ; 200μg/ml)을 포함한 sp-TALP를 동량첨가하여 CO₂ 배양기에 15분간 배양함으로써 유도하였다. 한편 정자를 swim-up시키는 동안 성숙난자는 세정과정을 통하여 팽대된 난구세포 1/3정도를 벗겨낸 후 light white oil(mineral oil, Sigma, U.S.A.)이 도포된 35mm petridish(Costar, U.S.A.)내의 수정용-TALP 43μl drop에 3μl의 배지와 함께 각각 5개씩 주입하였다. 체외수정은 준비된 난자의 drop에 heparin처리 후 동량의 sp-TALP를 혼합한 다음 4μl의 배지로 정자를 최종농도가 2×10⁶/ml가 되도록 첨가하여 CO₂ 배양기 내에서 18~24시간 동안 배양하여 실시하였다.

9. ESA supplement

체외수정 후 난자는 mouth pipetting으로 과립막 세포를 제거하고 정제된 ESA가 각각 0, 1.25, 2.5, 2.5와 5μg/ml의 농도로 첨가된 TCM-199에 분주되었다. 배양 144시간 후 실험현미경에서 후기배로의 발육률을 조사하였다.

10. 통계학적 분석

정제된 ESA가 소 수정란의 발육에 미치는 영향은 t-test로 유의성을 검정하였다.

결 과

1. ESA의 정제

배양 72시간 후의 BOEC conditioned medium은 0.16mg/ml의 단백질을 함유하였다. BOEC con-

ditioned medium 200ml 내에 있는 단백질들은 투석과 동결건조에 의해 농축되었다. 단백질분말은 3ml의 0.02M Tris-buffer(pH 7.5)에 용해되었으며 SDS-PAGE로 분석되었다(Fig. 1). 단백질용액은 gel filtration column에서 분획별로 분리하였으며(Fig. 2), 각각의 분획은 진공원심분리로 농축 후 SDS-PAGE로 검사하였다. 예비실험결과 이 분획 중에서 35분획(분자량 약 32,000 ; Fig. 3 및 4)이

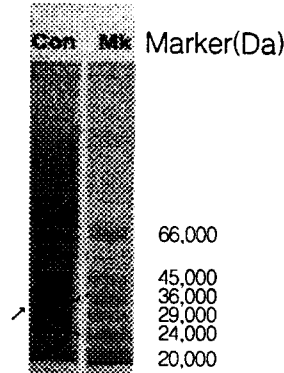


Fig. 1. 10% polyacrylamide gel SDS-PAGE analysis of BOEC produced proteins. The arrow indicate the 32kDa protein.

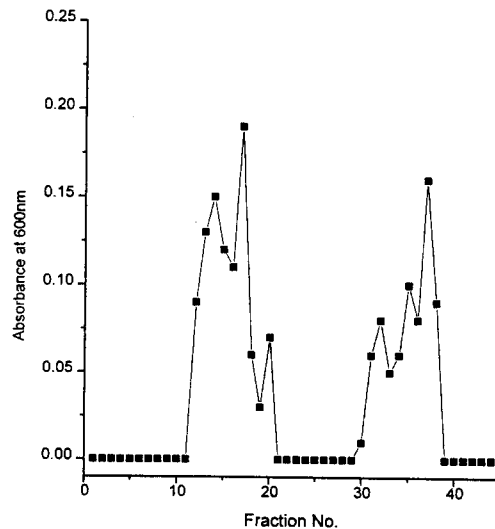


Fig. 2. Gel filtration column chromatography elution profile of the proteins secreted by bovine oviduct epithelial cells. Proteins were eluted with 20mM Tris buffer(pH 8.0).

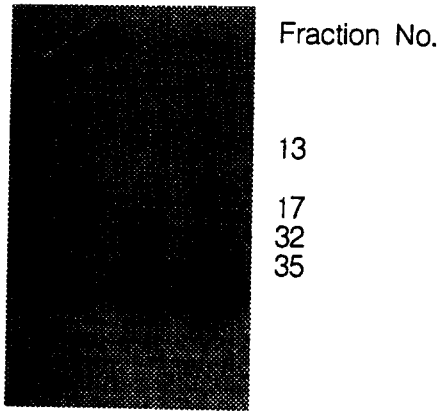


Fig. 3. 10% polyacrylamide gel SDS-PAGE protein elution profile of the purified protein obtained by gel filtration chromatography.

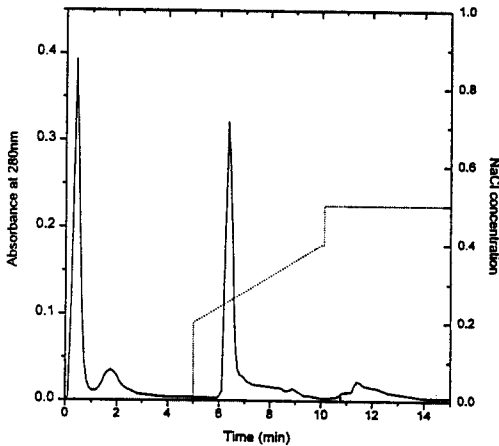


Fig. 4. Elution profile of the embryogenesis stimulating activity(ESA) by ion-exchange chromatography.

ESA was eluted with 20mM tris buffer (pH 5) containing 0.5M NaCl at a flow rate of 5ml/ min.

소 수정란의 발육에 있어 효과를 나타내었다. 분리된 단백질은 농축 후 perfusion chromatography ion-exchange column에서 분리되었다. ESA는 0.24~0.26M NaCl, 280nm에서 검출되었으며 이때 단백질의 peak도 동시에 나타났다. ESA 분획의 총량은 3ml였고 농도는 96 μ g/ml였다. ESA는 환원조

건하에서 분자량 32kDa의 명확한 단일밴드를 나타내었다(Fig. 5).

2. ESA에 대한 혈청가

다클론 항체를 생산하기 위해 정제된 ESA를 토끼에 주사하였다. 간접 ELISA에 의해 항체를 측정하기 위해 대조군 혈청, 1차 면역 및 boosting 접종(2차 면역) 혈청을 이용하였다. 1차 면역 및 2차 면역된 토끼 혈청을 대조군과 비교한 결과 두 군 모두 대조군보다 높은 흡광도를 나타내었다(Fig. 6).

ESA의 표준곡선은 정제된 ESA를 coated antigen으로, ESA-항혈청을 1차 항체로 하여 490nm에서 흡광도를 측정, 작성하였다(Fig. 7).

3. 무단백 conditioned medium에서의 ESA 농도

외래 단백질을 첨가하지 않은 군의 총 단백질 농도는 160 μ g/ml까지 증가되었다. Competitive ELISA에 의해 정량된 ESA는 BOEC 배양시간이 증가함에 따라 축적되었다. 배양 3일째 총 단백질 농도는 83 μ g/ml로 증가하였고 ESA 농도는 2.5 μ g/ml로 증가하였다(Fig. 8).

4. BOEC에서 ESA의 형광 면역염색법

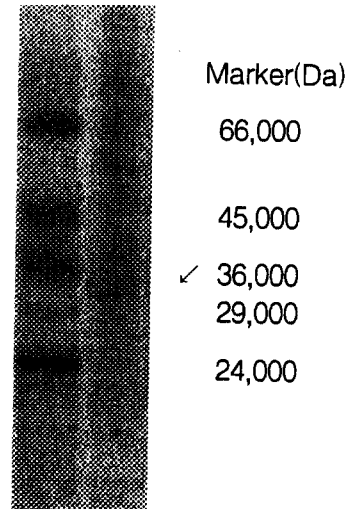


Fig. 5. 10% polyacrylamide gel SDS-PAGE analysis of the protein purified by perfusion chromatography ion-exchange column. The arrow indicate the purified protein(32kDa).

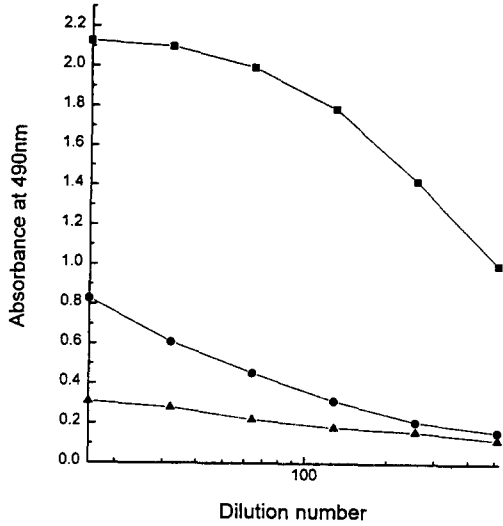


Fig. 6. Titers of rabbit antisera against ESA by indirect ELISA. Sera were collected 10 days after first immunization(—■—) and first boosting(—●—), Normal serum represented (—▲—).

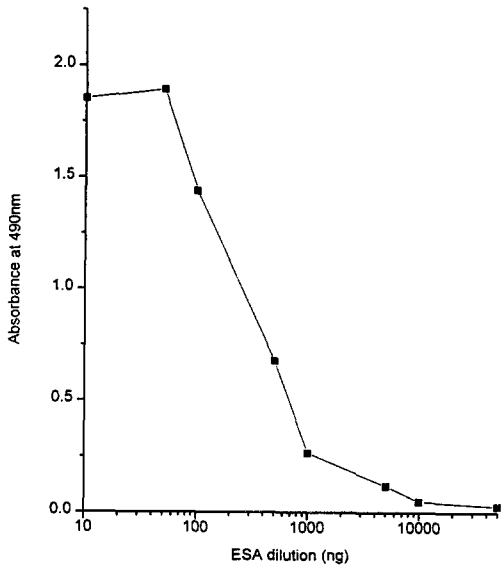


Fig. 7. The standard curve of ESA indirect cELISA using anti-rabbit IgG as the secondary antibody.

Anti-ESA rabbit serum and the purified ESA were used as the primary antibody and the coating antigen, respectively.

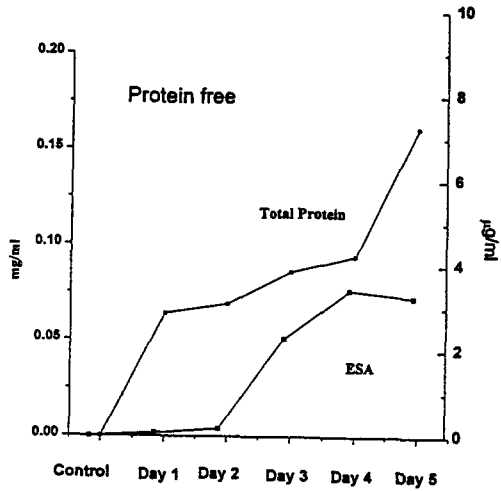


Fig. 8. Total protein and ESA concentrations of protein free media conditioned in BOEC.

4. BOEC에서 ESA의 형광 면역염색법

BOEC는 24-well dish에서 3일간 배양 후 monolayer가 형성되었다(Fig. 9). ESA에 대한 토끼 항혈청과 함께 BOEC의 형광면역화학 염색은 일반적인 세포내 단백질 염색법에 준하였다(Fig. 10).

5. 정제된 ESA의 수정란 발육촉진효과

정제된 ESA를 배양액에 첨가하여 후기배로의 발육촉진효과를 조사하였다(Table 1). ESA는 후기배로의 발육을 촉진하였고 2.5µg/ml의 농도에서 가장 높은 효과를 나타내었다.

고찰

모든 포유류 수정란은 체외배양시 일정 단계에서 발육정지를 나타내는 것으로 보고되어 있다(Wright와 Bondioli, 1981). 최근 연구는 체외에서 성숙 및 수정된 소의 난자가 BOEC, 과립막세포 혹은 영양막세포를 이용한 공배양체계에서 정상발육이 가능함을 증명하였다(Rexroad, 1989; Fukui 등, 1991). Satoh 등(1994)은 과립막세포에서 분비된 단백질(32kDa)이 수정란의 발육촉진효과가 있다고 보고하였다. 본 연구의 예비실험결과, 이 단백질에



Fig. 9. The monolayer of bovine oviduct epithelial cells after 3 day culture.



Fig. 10. Fluorescent microscopic finding of fluorescein isothiocyanate-conjugated antibodies bound to the bovine oviduct epithelial cell monolayers.

Table 1. Purified ESA* dose dependent stimulation of bovine embryo development. The ESA was added to the bovine embryo culture medium according to the concentration of ESA in actual BOEC conditioned medium

ESA ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Number of 2-cell	8-cell embryo	Morulae and blastocysts /2-cell (%)
0	74	32	1(1.4) ^a
1.25	83	28	3(3.6)
2.5	88	37	7(8.0) ^b
5	86	35	3(3.5)

* Embryogenesis stimulating activity.

^{ab} Different superscripts denote significant differences ($p < 0.05$).

대한 항체는 본 실험에서 정제한 ESA와 교차반응하지 않았다.

따라서 본 연구에서는 BOEC에서 분리된 단백질이 수정란의 발육촉진효과를 지니고 있는지의 여부를 검정하였다.

1. 단백질 정제와 항체 준비

소에서 BOEC conditioned medium은 공배양체계하에서 후기배로의 발육에 효과적인 것으로 보고되어 있다(Eyestone 등, 1991). 많은 연구자들이 BOEC monolayer 공배양시 특정물질이 수정란의 발육을 촉진하거나(Kapur과 Johnson, 1985; Kane, 1985) 배양액내 독성물질을 제거하는 역할을 한다고 하였다(Chatot 등, 1989).

공배양체계에서 5일간 전배양된 BOEC conditioned medium은 ml당 총 160 μg 의 단백질을 함유하였고 동결건조에 의한 농축으로 76%의 단백질이 회수되었다. Satoh 등(1994)은 초원심분리방법으로 56%의 단백질을 회수하였다. 이를 전기영동한 후 5종류(24, 32, 40, 53 및 66kDa)의 주요 단백질이 검출되었다. King과 Killian(1994)의 보고에 의하면 BOEC conditioned medium내의 단백질 중 90kDa, 66kDa, 53kDa, 34kDa 및 24kDa 분획이 소의 정자에 결합되었다. Gel filtration column에 의한 분획에서 과립막세포에서 생산된 수정란 발육촉진단백질과 유사한 분자량을 나타내는 분획이 perfusion chromatography ion-exchange column에 의하여 정제되었다. 이 단백질에 대한 항체가 토끼 면역에 의해 만들어졌으며 이때 생성된 항체의 특이성은 cELISA, western blotting 및 FITC에 의

해 조사되었다. FITC와 cELISA에서는 양성반응이 나타났으나(Fig. 8, 10) western blotting에서는 나타나지 않아(결과 미제시) 항체에 의해 인식된 epitope이 전기영동이나 전사도중 소실된 것으로 추정된다.

2. 정제된 단백질이 수정란의 발육에 미치는 영향

체세포가 수정란의 발육을 촉진하는 현상에 대해 Menezo 등(1990)은 공배양의 유효효과는 생식도관 특이성이 아닌 상피세포 의존성이라 보고하였다. 난관액에서 발견된 단백질의 일부는 BOEC에서도 분리되는 것으로 추정되었다(Gandolfi와 Moor, 1987). Caird와 Rexroad(1989)는 monolayer의 효과는 투명대 내로 특정단백질이 도입되어 나타나는 것이 아니고 수정란의 발육 초기단계에서 이런 단백질이 어떠한 조절역할을 담당할 것이라는 견해를 제시하였다.

수정란의 발육시 유효한 효과를 나타내는지 조사하기 위하여 무단백 배양액에서 각각 다른 농도로 정제된 ESA를 배양액에 첨가하였다. ESA의 유효효과는 전 실험군에 있어 8세포기까지는 나타나지 않았지만 상실배나 배반포로의 발육에 있어서는 현저한 발육촉진효과가 관찰되었다. 소 수정란발육에 유효한 농도는 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 였다.

3. ESA의 농도

정제된 ESA의 농도는 배양시간에 따라 증가하였고 이러한 결과는 수정란 배양에서 conditioning 기간 중 48시간제 가장 높은 효과를 나타낸다는 Eyestone 등(1991)의 결과와는 차이를 나타내었으나 이

는 배양액에 첨가된 단백질 및 기타 물질이나 배양된 BOEC의 농도가 다르기 때문일 것이다. 따라서 본 실험에서 정제된 ESA는 수정란의 발육을 결정하는 인자가 아니라 단지 발육을 촉진하는 인자라고 추정된다. 배양액으로부터 정제된 ESA와 다른 많은 단백질들이 수정란의 발육에 영향을 미치기 때문에 한 인자의 최적농도결정이 수정란의 발육향상조건에 일치하여 적용될 수 없다. 수정란의 발육에 영향을 미치는 다른 유용한 단백질들이 정제된다면 장차 재조합 DNA기법으로 대량생산을 할 수 있을 것이고 체세포와의 공배양 대신에 최적배양조건을 확립할 수 있을 것이다. 공배양한 BOEC에서 분비된 단백질이 수정란의 발육에 유효한 효과를 가지는가에 대한 정확한 기전은 후속 연구가 수행되어야 할 것이다.

적 요

본 연구는 수정란 발육촉진효과를 지닌 단백질의 정제와 이 단백질을 BOEC-conditioned medium에 첨가한 후 소 수정란의 발육에 있어 최적의 배양조건을 확립하기 위하여 수행되었다. 정제된 ESA는 BOEC 공배양에서 실제적으로 나타나는 농도에 따라 배양액에 첨가되었다.

1. BOEC conditioned medium 200ml로부터 288 μ g의 ESA가 회수되었다. 본 실험에서 적용된 방법으로, 총 단백질 중 0.9%의 ESA가 정제되었다.
2. 배양에 있어 최적의 ESA 농도는 2.5 μ g/ml였다. 배양액내 ESA 첨가는 대조군에 비하여 발육율의 향상을 나타내었다(8.0% vs 1.4%).
3. 최적의 ESA 농도(2.5 μ g/ml)는 무단백 배양액내에서 배양 3일째 도달되었다.

참고문헌

- Abramczuk J, Solter D and Koprowski H. 1977. The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. *Dev. Biol.* 61:378-383.
- Brown CR and Cheng WKT. 1986. Changes in composition of the porcine zona pellucida during development of the oocyte to the 2- to 4-cell embryo. *J. Embryol. Exp. Morph.* 92:183-191.
- Caird E and Rexroad Jr CE. 1989. Co-culture of domestic animal embryos. *Theriogenology.* 31:105-114.
- Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis GL and Torres I. 1989. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 86:679-688.
- Elington JE, Farrell PB, Simkin ME, Foote RH, Goldman EE and Mcgrath AB. 1990. Development and survival after transfer of cow embryos cultured from 1-2 cells to morulae or blastocysts in rabbit oviducts or in a simple medium with bovine oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fert.* 89:293-299.
- Eyestone WH and First NL. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.* 85:715-720.
- Eyestone WH, Jones JM and First NL. 1991. Some factors affecting the efficacy of oviduct tissue-conditioned medium for the culture of early bovine embryos. *J. Reprod. Fert.* 92:59-64.
- Fischer B, Jung T, Hegele-Hartung C and Reier HM. 1990. Development of preimplantation rabbit embryos in uterine flushing-supplemented culture media. *Mol. Reprod. Dev.* 27:216-223.
- Fukui Y. 1989. Effects of sera and steroid hormones on development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro* and co-cultured with bovine oviduct epithelial cells. *J. Anim. Sci.* 67:1318-1323.
- Fukui Y and Ono H. 1989. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine ooc-

- ytes. J. Reprod. Fert. 86:501-506.
- Fukui Y, McGowan LT, James RW, Pugh PA and Tervit HR. 1991. Factors affecting the *in vitro* development to development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. J. Reprod. Fert. 92:125-131.
- Gandolfi F and Moor. 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. J. Reprod. Fert. 81:23-28.
- Gandolfi F, Brevini TAL, Richardson L, Brown CR and Moor RM. 1989. Characterization of proteins secreted by sheep oviduct epithelial cells and their function in embryonic development. Development. 106:303-312.
- Heyman Y, Menzo Y, Chense P, Camous S and Garnier V. 1987. *In vitro* cleavage of bovine and ovine early embryos: improved development using co-culture with trophoblastic vesicles. Theriogenology. 27:59-68.
- Hoshi H, Onodera M and Oikawa T. 1992. Isolation, cell characterization, and growth regulation of bovine oviduct epithelial cells *in vitro*. Tissue Culture Res Commun. 11:5-11.
- Kane MT. 1985. A low molecular weight extract of bovine serum albumin stimulates rabbit blastocysts cell division and expansion *in vitro*. J. Reprod. Fert. 73:147-150.
- Kapur R and Johnson LV. 1985. Selective Sequestration of an Oviductal Fluid Glycoprotein in the Perivitelline Space of Mouse Oocytes and Embryos. J. Exp. Zool. 238: 249-260.
- Kobayashi K, Takagi Y, Satoh T, Hoshi H and Oikawa T. 1992. Development of early bovine embryos to the blastocyst stage in serum free conditioned medium from bovine granulosa cells. In Vitro Cell & Dev Biol. 28A:255-259.
- Lawitts JA and Biggers JD. 1991. Overcoming the 2-cell block by modifying standard components in a mouse embryo culture medium. Biol. Reprod. 42:301-306.
- Menezes YZR, Guerin JF and Czyba JC. 1990. Improvement of human early development *in vitro* by co-culture on monolayers of vero cells. Biol. Reprod. 42:301-306.
- Oliphant G, Reynolds AB, Smith PF and Marta JS. 1984. Immunocytochemical localization and determination of hormone-induced synthesis of the sulfated oviductal glycoproteins. Biol. Reprod. 31:165-174.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JJ, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eystone WH and First NL. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. Theriogenology, 25: 591-600.
- Rexroad CE Jr. and Powell AM. 1988. Co-culture of ovine ova with oviductal cells in medium 199. J. Anim. Sci. 66:947-953.
- Rexroad CE Jr. 1989. Co-culture of domestic animal embryos. Theriogenology. 31:105-114.
- Roberts GP, Parker JM and Symontheads HW. 1975. Proteins in the luminal fluid from the bovine oviduct. J. Reprod Fert. 45:301-313.
- Satoh T, Kobayashi K, Yamashita S, Kikuchi M, Sendai Y and Hoshi H. 1994. Tissue inhibitor of Metalloproteinases (TIMP-1) Produced by granulosa and oviduct cells enhances *in vitro* development of bovine embryo. Biol. Reprod. 50:835-844.
- Smith AG and Hooper ML. 1987. Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. Dev. Biol. 121:1-9.
- Sutton R, Nancarrow CD, Wallace ALC and Ridgway NW. 1984. Identification of an oestrus associated glycoprotein in oviductal fluid of the sheep. J. Reprod. Fert. 72:415-422.
- Wright RW Jr. and Bondiloi KR. 1981. Aspects of *in vitro* fertilization and embryo culture of domestic animals. J. Anim. Sci. 53:702-729.

(접수일자 : 1998. 11. 29 / 채택일자 : 1998. 2. 19)