Conclusions: Based on these results, according to culture condition changes the maturation rate and increases the expression of cyclin B1 during in-vitro first meiotic maturation of bovine immature oocytes. And the maturation rate shows good correlation with the expression of cyclin B1 protein.

P-6 사람 난포액 내에 존재하는 생쥐 난구세포의 확장을 유도하는 단백질의 분리

서울여자대학교 생명공학과[1], 미래와 희망 산부인과[2],
을지대학교 의과대학 산부인과[3], 한양대학교 생명과학과[4]

김지영[1] · 김해권[1] · 황종대[2] · 이승재[2] · 권혁찬[3] · 윤용달[4]

목 적: 포유동물의 난포 내 난자-난구 복합체는 LH 호르몬에 의해 많은 변화를 일으킨다. 특히 난구세포는 hyaluronic acid-enriched extracelluar matrix를 합성 분비하여 확장 현상을 나타낸다. 난구세포의 확장은 체외에서도 가능한데 이때에는 난자와 FSH/PMSG, 그리고 혈청/난포액이 필요한 것으로 알려져 있다. 혈청/난포액 성분 중 확장을 유도하는 요인은 inter-α-trypsin inhibitor (IαI)인 것으로 여겨지고 있다. 본 연구에서는 생쥐의 난자-난구 복합체를 이용하여 사람 난포액 내의 난구세포 확장 요인의 정체를 규명하고자 하였다.

대상 및 방법: 난포액은 체외수정 시술시 얻은 난포액을 사용하였고 생쥐의 난자-난구 복합체는 생후 3주된 암컷에 5 i.u PMSG를 주사하고 48시간 후에 난소로부터 얻었다. 난포액의 단백질은 ammonium sulfate 침전법, 음이온 교환 크로마토그래피, 염색친화 크로마토그래피, 젤 여과 크로마토그래피 방법을 이용하여 분리하였다. 분리된 단백질을 난자-난구 복합체의 배양액에 18시간 동안 처리하여 난자-난구 복합체의 95% 이상의 시료에서 확장이 일어난 경우 활성이 있는 것으로 판정하였다. 필요에 따라 단백질은 전기영동을 하거나 전기영동 후, micro-electroeluter를 이용 gel로부터 단백질을 추출하였다.

결 과: DEAE Sepharose Fast Flow를 이용하여 사람 난포액의 확장 유도 단백질 분리를 실시한 결과 0.3 M NaCl 분획에서만 활성이 나타났다. 이 활성을 나타내는 분획을 Cibacron Blue 3GA Agrose type 3000-CL을 이용하여 각각 0.154 M, 0.3 M, 1 M NaCl로 분리한 결과 1 M NaCl 분획에서만 활성이 나타났다. 이 1 M NaCl 분획을 R-2757 Reactive Brown 10 Agrose을 이용하여 염색친화 크로마토그래피를 시행한 결과 0.3 M NaCl 분획에서 활성이 나타났다. 이 활성을 나타내는 분획만을 모아 다시 ammonium sulfate로 각각 20%, 40%, 50%, 60%, 80%로 침전시킨 결과 40%와 50% 분획에서 난자-난구 복합체의 확장이 유도되었다. Ammonium sulfate로 침전시킨 40%와 50% 분획을 다시 Sephacryl S300-HR을 이용하여 젤 여과 크로마토그래피를 실시하였다. 이중 활성을 나타낸 분획을 농축하여 전기영동을 실시하고 commassie blue로 염색한 결과 350 kDa, 300 kDa, 220 kDa, 130 kDa의 4종류의 단백질이 관찰되었다. 이들 각각의 단백질을 gel에서 분리 추출하여 활성을 조사한 결과 300 kDa의 단백질만 생쥐의 난자-난구 복합체의 확장을 유도하는 활성을 나타내었다. 이 단백질을 환원시킨 후 전기영동한 결과 75 kDa 단백질만이 관찰되었다.

결 론: 사람의 난포액 내에는 생쥐 난자-난구 복합체의 확장을 유도하는 분자량 300 kDa의 단백질이 존재하며 이 단백질은 기존에 알려진 inter-α-trypsin inhibitor (IαI)와는 다른 새로운 단백질로써 이황화결합을 통해 homotetramer의 형태로 존재하는 것으로 여겨진다.