

menstrual cycle was assessed semi-quantitatively by cumulative histologic score (HSCORE) and mean HSCORE was analyzed by ANOVA.

Results: All of the endometrial samples expressed two spliced variants of GnRH-II mRNA and the short variant had a 21-bp deletion in GnRH-associated peptide (GAP). Immunoreactive GnRH-II was localized in both stromal and glandular epithelial cells during the entire menstrual phase. In glandular epithelial cells, the mean (SEM) HSCORE of early and mid-secretory phase (3.5 ± 0.1 , 3.3 ± 0.3 , respectively) were significantly higher ($p < 0.05$) than those of proliferative and late secretory phase (2.1 ± 0.4 , 2.6 ± 0.3 , respectively). In stromal cells, the mean HSCORE of early and mid-secretory phase (3.0 ± 0.2 and 3.1 ± 0.3 , respectively) were significantly higher ($p < 0.05$) than those of proliferative and later secretory phase (1.6 ± 0.1 and 2.1 ± 0.1 , respectively). During the first trimester, decidualized stromal cells and glandular epithelial cells showed strong intensity of irGnRH-II.

Conclusion: Our study demonstrated that the second isoform of GnRH (GnRH-II) was expressed in cycling human endometrium and first trimester decidua. We suggest that a local expression of endometrial GnRH-II peptide, noted during the early and mid-secretory phase, may play an important role in human embryonic development and implantation. Moreover, maintenance of GnRH-II peptide expression in first trimester decidua may be involved in early pregnancy.

B-6 Laser Captured Microdissection (LCM)을 이용한 유전자 발현에 대한 연구: 난자의 RNA 추출 및 증폭을 위한 최소 한도의 확립

포천중문 의과대학교, 차병원 여성의학연구소

박창은 · 신창숙 · 윤세진 · 고정재 · 차광렬 · 이경아

목 적: 분자생물학적 기술의 발전은 조직으로부터 개별적인 세포단위의 유전적, 기능적인 변화를 찾는 수준에까지 진행되었다. LCM의 기법을 접목하면 여러 가지 세포가 혼합되어 있는 복잡한 조직 또는 매우 적은 양의 시료로부터 특정세포만을 선택적으로 얻어 특이적 유전자 발현을 연구할 수 있는 강점이 있다. 본 연구의 목적은 LCM을 이용하여 mRNA 수준에서 유전자 발현을 분석하기 위해 RT-PCR 실험을 할 때 필요한 최소한의 세포의 수를 결정하고, 이때 mRNA 추출 및 증폭을 위한 여러 가지 실험조건을 확립하는 것이었다.

재료 및 방법: 난자를 이용함으로써 세포의 숫자를 정확하게 조절할 수 있었으며, house-keeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH)의 유전자 발현을 연구함으로써 다른 세포를 연구할 때 본 연구 결과가 유용하게 사용될 수 있도록 했다. 3주된 ICR 생쥐에 PMSG를 주사 후, 48 시간에 난소를 적출하여 OCT compound로 포매한 후 cryostat을 이용해 $7 \mu\text{m}$ 로 절편하였다. 제작된 슬라이드를 70% EtOH에 고정한 후, Hematoxylin-Eosin으로 염색하고 마지막으로 xylene으로 5분 동안 탈수한 후 실온에서 20분 동안 말린 후 LCM으로 난자를 procure (포획) 하였다. 이때 laser beam은 선택하고자 하는 세포의 크기에 따라 $7.5 \mu\text{m} \sim 30 \mu\text{m}$ diameter까지 spot size를 조절하였고, power는 조직의 상태에 따라 20~40 mW 범위에서 사용하였다. 포획한 세포가 붙어 있는 transfer film cap은 GITC (guani-

dinium isothiocyanate) digestion buffer로 처리하여 mRNA를 추출하였다. GITC 용액은 42℃에서 2~30분간 처리한 후 GITC/phenol/chloroform 방법을 통해 total RNA를 추출하고, RT-PCR을 수행하였다. GAPDH의 발현 양상을 확인하기 위한 PCR cycle 수를 확인하였고, 이를 위해 필요한 cDNA의 양을 결정하였다.

결 과: Film에서 세포를 용해해 내는 시간은 2분만으로도 충분하였으며, 난자의 수는 25개 이상에서 유전자 발현의 관찰이 가능하였으나 재현성이 없었다. 25개 난자를 포획한 경우는 PCR cycle은 24 cycle부터 발현을 관찰할 수 있었고, 50개 이상을 포획한 경우에는 18 cycle부터 관찰 가능하였다. PCR을 위한 cDNA의 양 또한 50개 이상 포획한 경우에는 RT한 volume 20 µl 중 1 µl cDNA만으로도 충분히 관찰할 수 있었으나 오히려 많은 양의 cDNA는 inhibitory effect를 보여 일찍 PCR plateau를 형성하는 것을 관찰하였다.

결 론: 난자 25번을 포획하는 경우 재현성이 없었고, 50개 이상을 포획할 때 안정적으로 실험이 가능하였다. 이때 1 µl cDNA를 사용하고 24 cycle로 PCR할 경우, GAPDH를 확인할 수 있으므로, 남은 cDNA를 이용하여 다른 특정 유전자의 발현을 관찰하는데 사용할 수 있을 것이다. 본 연구 결과는 비교적 크기가 크고, RNA를 많이 갖고 있는 난자를 대상으로 얻은 것이므로, 다른 세포를 이용할 경우 이보다는 더 많은 수를 필요로 할 것임을 유추할 수 있겠다.

지 원: 본 연구는 한국과학재단 목적기초연구 (2000-2-20500-001-2) 지원으로 수행되었음.

B-7 Optimization of *In Vitro* Culture System of Mouse Preantral Follicles

Park EM, Kim EY, Nam HK, Lee KS, Park SY, Yoon JY, Hur YT, Cho HJ,
Kil KS, Shin HA, Park SP and Lim JH¹

마리아 기초의학연구소/마리아 생명공학연구소, ¹마리아 병원

Objective: This study was to establish *in vitro* culture system of mouse preantral follicles and to obtain higher *in vitro* development rates and production of live young.

Materials and Methods: Preantral follicles were obtained from 12-day-old FI mouse (C57BL×CBA) by enzymatical methods. Oocyte-granulosa cell complexes (OGCs) of preantral follicles were loaded on Transwell-COL insert and cultured in α MEM supplemented with 5% FBS, 100 mIU/ml FSH and 100 mIU/ml hMG for *in vitro* growing (IVG). *In vitro* maturation (IVM) was performed in α MEM supplemented 1.5 IU/ml hCG for 18 hrs and *in vitro* fertilization (IVF) was carried out in M16 medium. Embryos were cultured in modified M16 medium supplemented 10% FBS for 4 days.

Results: The effect of the OGCs size on the nuclear/cytoplasmic maturation was significantly higher in 120~150 µm (MII: 33.0%, ≥ 2 -cell: 36.7%, \geq morula: 20.9%) than in 70~110 µm (MII: 12.2%, ≥ 2 -cell: 10.2%, \geq morula: 4.8%) ($p < 0.001$). In period of the IVG days, the rate of ≥ 2 -cell was significantly higher in 10 days (38.2%) than in 12 days (20.0%) ($p < 0.01$). In period of IVF time, 9 hrs (≥ 2 -cell: 31.5%, \geq morula: 14.3%) indicated significantly higher cytoplasmic maturation rate than 4 hrs (≥ 2 -cell: 17.5%, \geq morula: 4.8%) and 7 hrs (≥ 2 -cell: 20.4%, \geq morula: 6.1%) ($p < 0.01$). However, there was no difference in cytoplasmic maturation between co-cultured preantral follicle (\geq morula: 17.4%) and preantral follicle cultured in M16 (\geq morula: 17.4%). Twenty-two morula and blastocysts produced in above optimal con-