

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 μ l 중 1 μ l 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 μ l 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 \times 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 μ m (MII: 33.0%, \geq 2-cell: 36.7%, \geq morula: 20.9%) than in 70~110 μ m (MII: 12.2%, \geq 2-cell: 10.2%, \geq morula: 4.8%) ($p < 0.001$). In period of the IVG days, the rate of \geq 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 (\geq 2-cell: 31.5%, \geq morula: 14.3%) indicated significantly higher cytoplasmic maturation rate than 4 hrs (\geq 2-cell: 17.5%, \geq morula: 4.8%) and 7 hrs (\geq 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-

dition were transferred to uterus of 2 pseudopregnant recipients, 1 recipient was pregnant and then born 1 live young.

Conclusion: This result demonstrates that *in vitro* culture system of preantral follicles can be used efficiently as another method to supply mouse oocyte.

B-8 CHO 세포주와 공배양을 통한 미성숙 돼지 난자의 성장과 성숙을 향상

미즈메디병원 불임의학연구소

도병록 · 전일경 · 윤수정 · 김 철 · 백혜란 · 조정현 · 윤현수 · 노성일

서 론: 인간을 포함한 대동물의 난자는 시상하부-뇌하수체-난소를 축으로 하는 내분비 조절과 난소내의 국부 조절인자들의 작용으로 난소내에서 충분한 성장이 이루어진 후 성숙하게 된다. 인간의 보조생식술 시행 시 자연주기에 채취된 미성숙 난자는 과배란 유도법으로 얻은 난자에 비하여 성숙율과 수정율이 낮고, 직경 90 μm 이하의 난자는 성숙이 불가능한 것으로 보고되고 있다.

연구목적: 본 연구는 사람 미성숙 난자의 체외 성숙률을 향상시키기 위한 기초연구로 돼지의 미성숙 난자에서 체외 성장과정을 거친 성숙 유도과정과, 난자와 CHO 세포의 공배양법의 효용성을 알아 보고자 하였다.

재료 및 방법: 직경 5 mm 이하의 돼지 난포로부터 얻은 3097개의 미성숙 난자를 성장 배양액과 성숙 배양액에 각각 24시간씩 혹은 각 배양액 단독으로 48시간 배양하여 성숙률을 조사하였다. 성장 배양액은 TCM-199에 2.5 mIU/ml 사람의 고순도 FSH, 0.23 mM/L pyruvic acid, 5.35 $\mu\text{g/ml}$ linoleic acid, 2.0 ng/ml ascorbic acid, 5 $\mu\text{g/ml}$ ITS (insulin, transferrin, selenium), 10% fetal bovine serum을 첨가하여 이용하였다. 성숙 배양액은 TCM-199에 1 $\mu\text{g/ml}$ cystein, 25 IU/ml 사람의 고순도 FSH, 1 mg/ml E_2 그리고 10% 돼지 난포액이 첨가하여 이용하였으며, CHO cell monolayer가 있거나 또는 없는 조건에서 39 C, 5% CO_2 가 공급되는 배양조건을 유지하였다. 배양을 마친 각 군의 난자는 0.5% glutaraldehyde 용액에 고정하여, hochest 33258 (200 $\mu\text{g/ml}$)로 염색한 후 형광현미경으로 난자의 성숙 정도를 판단하여 다음의 결과를 얻었다.

결 과:

Table 1. Maturation rate of immature oocyte during *in vitro* culture in porcine

Experimental groups		M II (%)	GV (%)	Abnormal (%)
미배양 대조군	W/o culture	0.0	93.3 ^d	6.8
성숙 배양군 (48 hrs)	W/o co-culture	34.4 ^a	22.6	14.4
성장 배양군 (48 hrs)	W/o co-culture	0.0	75.3 ^e	13.3
	W/ co-culture	8.7	46.9 ^f	6.1
성장 배양 (24 hrs) 및 성숙 배양군 (24 hrs)	W/o co-culture	43.6 ^b	18.6	17.9
	W/ co-culture	52.4 ^c	9.8	20.1

^b vs. (^a, ^c), $p < 0.05$; ^a vs. ^c, ^d vs. (^e, ^f), ^e vs. ^f, $p < 0.0001$