

돼지 체세포 핵이식에 있어서 공여세포의 종류, 활성화방법, 배양조건에 의한 체외발달능력

윤희준^{1*}, 谷哲弥¹, 川上雅弘¹, 加藤容子¹, 角田幸雄¹

¹일본 긴기대학 농학부, * 현재주소: 경상대학교 응용생명과학부
낙농학과(yinxj33@hotmail.com)

돼지 체세포 핵이식에 있어서 체외발달률을 재고하기 위하여 공여세포의 종류, 활성화 방법, 배양조건등이 체외발달에 미치는 영향을 검토하였다. 도축장에서 채취한 난소에서 미성숙난자를 채취하여 NCSU-37 배양액에 10% pFF 와 0.6mM Cystein, 1mM dbcAMP, 0.1 IU/ml human menopausal gonadotrophin(hMG)에서 20시간 배양후 dbcAMP와 hMG 가 없는 배양액에서 18~24 시간 추가배양 성숙 후 성숙된 난자를 핵이식의 수핵난자로 사용하였다.

실험 1 : 전기융합 후 활성화자극방법으로 융합 후 1시간후에 활성화주는 방법, 융합과 활성화를 동시처리방법이 체외발달에 미치는 영향을 검토하였고 일부 융합된 난자는 Orcein과 Spindle 형식으로 핵의 상태를 관찰하였다.

실험 2 : 태아섬유아세포와 심장유래세포를 공여세포로 사용하여 핵이식시 활성화 방법으로서 전기+5 µg/ml Cytochalasin B(4시간), 전기+2mM 6-DMAP(4시간), 전기+150mM Butyrolacton(4시간), 전기+10mM Cycloheximide(4시간), 15 µg/ml Ionomycin에서 20분 +6-DMAP(4시간)를 사용하여 발달률을 검토하였다.

실험 3 : 한 개체의 암태지로부터 귀, 심장, 간장, 신장, 근육, 난관상피, 난구세포를 채취하여 계대배양 후 공여세포로 사용하여 핵이식을 실시하여 발달률을 검토하였다. 사용한 공여 세포의 세포주기는 5-Bromodeoxyuridine(BrdU) 와 FACS can flow cytometry 방법으로 추적하였다.

실험 4 : 체세포 핵이식한 난자를 체외배양시에 산소농도가 체외발달에 미치는 영향을 검토하였다.

실험 5 : 심장과 신장유래 세포를 공여핵으로 사용하여 핵이식한후 배양 12시간이나 36 시간에 대리모에 이식하여 산자 생산 여부를 검토하였다.

[결과] 실험 1 : 융합과 활성화 방법에 있어서 융합과 활성화를 동시에 실시한 처리구에서는 2% 의 배반포 발달률, 융합 후 1시간 후에 활성화한 처리구들에서는 4%~9% 의 배반포 발달률을 보였다.

실험 2 : 배반포의 발달률은 7~11%로 활성화 방법에 의해 유의차를 나타내지 않았다.

실험 3 : 공여 세포 유래에 따른 배반포 발달률은 1~9%였다.

실험 4 : 핵이식 난자를 체외배양시 5%O₂, 90%N₂, 5%CO₂에서 16%로 발달하여 5%CO₂, 20%O₂에서의 9% 보다 높은 경향을 보였다. 이상의 결과로부터 여러 가지 활성화 방법과 각종 장기 유래 체세포를 공여세포로 사용하여 핵이식한 난자의 배반포까지 발달률에서 는 차이를 나타냄을 알 수 있었다.

Key words) 돼지, 체세포 핵이식, 활성화방법