

mary follicles (1차 난포)에서 성장이 개시되는 중요한 과정을 진행한다. 그러나 이 과정을 조절하는 요인과 기전에 대해서는 아직까지 많은 것이 알려져 있지 않다. 본 연구진은 선행연구에서 생후 1일자와 생후 5일자 생쥐 난소에서 차이 나게 발현하는 유전자 목록을 suppression subtractive hybridization (SSH)를 이용하여 얻었고, 이중에서 MTi7은 특히, 난자에서만 특이적으로 발현하는 유전자로 생후 5일자에서 더 높게 나타남을 발견하였다. 본 연구는 RNAi를 이용하여 기능이 알려져 있지 않은 MTi7이 난자와 배아에서 어떤 역할을 하는지 알아보기 위하여 수행하였다.

Method: ICR, BALB/C, C3H, C57BL/6, FVB/N strain 생쥐의 난소에서 in situ hybridization (ISH), Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)를 통해 mRNA 위치와 종간의 변이를 관찰하였고, RNAi를 위해 c-mos와 MTi7 dsRNA를 제작하고, 이를 미성숙 난자 (GV), pronucleus (PN), 2C에 미세주입하고 배양한 뒤, RT-PCR과 공초점 현미경을 통해 mRNA와 tubulin의 변화를 관찰하였다. 또한 GV, MII, PN, 2C, 4C, 8C, morular, blastocyst 시기에서 정상적인 c-mos와 MTi7 mRNA의 발현을 관찰하기 위해 real-time PCR을 수행하였다.

Results: Real-time PCR 결과, c-mos가 GV, MII 난자에서 발현하나 배아에서는 발현이 거의 없음에 반하여 MTi7은 난자뿐 아니라, 배아시기까지 계속 발현함을 관찰하였다. 또한 GV난자에 RNAi 결과, 43~54%가 GV arrest되었고, 이때 c-mos와 MTi7의 mRNA가 대조군에 비해 68%~90% 감소하였다. 또한 PN과 2C에 MTi7 dsRNA 주입한 배아에서도 대부분 발달이 멈추었다.

Conclusions: RNAi 결과, MTi7은 난자의 성숙 및 배아발달에 관여하며 그 기능이 특히 nuclear membrane breakdown에 연관되어 있을 것으로 추측되었다.

This study was supported by a grant of the Korea Health 21 R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (01-PJ10-PG6-01GN13-0002).

O-13 In vitro Spermatogenesis of the Mice in the Collagen Gel Matrix

JH Lee^{1,4}, YJ Jung¹, JH Lee¹, SJ Lee³, KW Choi¹, SJ Lee¹, HK Kim⁴

IVF & Genetic Institute, MD Plus¹, MiraeandHeemang Ob/Gyn Clinic²

Department of Animal Science, Sahmyook College³

Department of Biotechnology, Seoul Women's University⁴

Background & Objectives: Spermatogenesis is a complex and highly coordinated processes by which spermatogonia proliferate and differentiation produce mature sperm. Successful in vitro differentiation of spermatogenic cells is a potent method for the treatment of male sterility due to spermatogenic arrest. Many researches have been done to improve the culture efficiency and recent studies have shown that round spermatids could develop from the in vitro culture of immature male germ cells. Generally, Cell culture system provides the one-dimensional environment. It is no good efficiencies for cell differentiation and proliferation. We hypothesized that the mechanically active environment present in the effectiveness of three-dimensional collagen gel matrix for in vitro spermatogenesis.

Method: ICR male mice of 18 day-old were used. Testes were decapsulated and seminiferous tubules were dissociated enzymatically to release both somatic and germ cells. Collagen matrices were prepared from insoluble type collagen fiber which was extracted from rat tail by tendons by dissolving in 1/5000 acetic acid solution. For the collagen gel matrices and matrigel added collagen matrices, dissociated cells were incorporated into collagen matrices on culture dish containing concentrated culture media and then cultured for up to 18 day in modified RPMI 1640 medium at 32°C with 5% CO₂ in air. For the monolayer culture as control, a group of dissociated cells were seeded into petri dish containing the same medium. After culture, cells were smeared onto L-lysine coated microscope slides and examined for the presence of transitionprotein-2 (TP-2) known to be specific for the round spermatid using anti-goat rabbit transition protein (TP2) antibody.

Results: After the few days of incubation, Collagen gel matrices were contracted and firm testicular cell complex were formed. Based on immunocytochemistry, a haploid population of cells appeared in vitro that was not in 18-day-old mice testis. Viability of the cells cultured by monolayer method or in a collagen gel matrix was 55%, 75% respectively. Collagen gel matrix culture method was observation indicated that 75% of the TP2 antibody stained cells developed from seeding cells. And matrigel added collagen gel matrix was showed 85% of the TP2 antibody stained cells from seeding cells. In contrast, Monolayer culture method showed that only 20% of cultured germ cells developed to round spermatids.

Conclusions: The novel culture system developed in this study is promoting differentiation of gonocytes to presumptive spermatids in vitro based on the expression of spermatid-specific protein. A culture system consisting of a collagen gel matrix could support the in vitro differentiation of mouse male germ cells. Compared to the conventional monolayer culture method, the system appeared to be superior.

O-14 수컷 생쥐 생식줄기세포의 분리 및 증식과 체외배양을 통한 반수체 생식세포의 생산

포천 중문의과대학교 세포유전자 치료연구소¹, 차병원 여성의학연구소²

김계성 · 김수경¹ · 차광렬² · 양윤희² · 임정진² · 윤태기²
조정현² · 정태규² · 김현주² · 이동률²

Background & Objectives: 정자형성과정은 고환의 세정관내에서 생식줄기세포 (male germ-line stem cells, GSCs)의 분열과 분화를 통하여 성숙된 정자를 생산하는 일련의 과정이다. 생식줄기세포의 체외 배양을 통한 증식과 분화는 남성불임의 원인을 찾고 남성생식능력의 생물학적 기초를 제공하는데 매우 효율적인 접근방법이라 할 수 있다. 본 연구의 목적은 분리 후 동정과 증식을 한 생식줄기세포의 배양조건 확립과 반수체 생식세포로의 분화를 유도하는데 있다.

Method: 실험재료는 3~5일령의 ICR 수컷 생쥐를 사용하였으며, 생쥐의 생식줄기세포를 분리한 후 배양하여 multi-cellular colonies를 형성시키고 5회에 걸쳐 계대배양을 하였다. 이후 multi-cellular colonies의 일부는 alkaline phosphatase activity, surface marker expression (SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4), immunocytochemistry (integrin $\beta 1$, $\alpha 6$)와 in situ hybridization (Oct-4 mRNA probe)를 위하여 고정하였으며, 나머지