

A0417

고양이에서 난자의 체외성숙과 체세포 핵이식 수정란 생산

윤희준, 이효상, 이영호, 전세진, 이영일, 조수진, 최유진, 공일근

순천대학교 농업생명과학대학 동물자원과학과

고양이 체세포 복제산자의 생산은 Shin 등(2002, Nature 415: 859) 1마리의 "Cc"를 성공한 이래 재현 생산한 보도가 없다. 그리하여 본 실험에서는 체세포 복제산자 생산을 위한 기초 실험으로서 난자의 체외성숙, 체세포 핵이식 수정란의 체외발달을 검토하고자 수행하였다. 성숙한 고양이에서 난소적출수술로 난소를 적출한 후 4시간내에 실험실로 운반하여 면도칼로 난소를 절제한 후 미성숙난자를 채취하여 TCM199 + 0.4% BSA + 1000 IU/ml bST에서 24시간 체외성숙하였다. 체외성숙한 난자는 난구세포를 제거 후 핵이식에 공시하였다. 도나세포는 태아섬유아 세포와 피부섬유아 세포를 passaged 1 부터 9로 사용하였고 실험공시 3일전부터 DMEM + 0.5% FCS에서 배양하여 도나세포로 공시하였다. 핵이식 방법은 윤 등(2002, B.O.R 67: 442-446)의 방법에 준하여 실시하였다. 주입된 체세포는 0.28 M mannitol + 0.1 mM Mg²⁺에서 2차, 60 used, 180 V/mm DC pulse로 융합을 유기하였고, 1시간 후 100 nM의 칼슘이 첨가된 0.28 M mannitol에서 2차, 20 used, 120 V/mm DC pulse에서 활성화를 유기하였다. 활성화한 난자는 50 ul 드롭의 TCM-199, 4 mg/ml BSA + 5 ug/ml cytochalasin B에서 38℃, 5% CO₂ 에서 4시간 배양하였다. 체외배양은 500 ul TCM-199 + 4 mg/ml BSA에서 6일간 배양하여 배반포 발달을 조사하였다.

태아섬유아세포를 도나를 사용시 핵이식난자의 분할율은 71% 배반포 발달율은 4%로 피부섬유아세포를 도나로 사용시 분할율 58%, 배반포 발달율 6%와 유의차를 보이지 않았다.

Table 1. Development of cloned embryos with somatic cells in cat

Donor cell types	No. of reconstructed	No. of fusion (%)	No. of cultured	No. of 2, 4-cell (%)	No. of blastocyst (%)
Fetal fibroblast	174	124(71)	124	88(71%)	5(4%)
Skin fibroblast	151	101(67)	33	19(58%)	2(6%)

Key words: 고양이, 난자체외성숙, 핵이식, 체외발달, 태아 및 피부섬유아세포