

## 체외 성숙시 Dibutyryl cAMP의 첨가에 따른 돼지 복제 수정란의 체외 발생

김지수, 박정선, 송봉석, 김학룡, 이유연, 이경광, 구덕본

한국생명공학연구원, 발생분화연구단

Dibutyryl cAMP (dbcAMP)는 핵 성숙 시 GV 단계에서 GVBD 단계로 진전되는 것을 억제하여 세포질 성숙과 동시에 핵 성숙이 이루어지도록 하여 난포란의 체외성숙을 향상시킨다. 돼지 복제수정란의 생산에 있어서 우선적으로 난포란의 핵 성숙 및 세포질 성숙이 미흡하기 때문에 궁극적으로 복제 수정란의 배 발생을 및 질적 측면에 상당한 영향을 미친다고 할 수 있다. 본 실험에서는 체외 성숙시 dbcAMP가 첨가 배양된 돼지 난포란을 핵이식에 이용하였을 때 체외 발생 및 질적 측면에 대한 차이점을 대조구와 비교 조사하였다. 체외 성숙을 유도하기 위하여 돼지 난포란은 10% PFF, 0.1 mg/mL cysteine, 10 IU/mL PMSG, 10 IU/mL hCG, 10 ng/mL EGF, 25  $\mu$ M/mL  $\beta$ -mercaptoethanol이 함유된 NCSU-23 배양액에 dbcAMP를 22시간 동안 첨가 배양을 실시하고 호르몬이 배제된 배양액에 22시간을 배양하였다. 체외 성숙이 완료된 난포란으로부터 난구세포를 제거하고 제 1극체가 돌출된 난자를 대상으로 체세포 핵이식을 실시하였다. 핵이식이 완료된 난자는 DC 1.6 kv/cm, 15  $\mu$ sec의 조건으로 BTX를 이용 실시하여 전기적 융합을 유도하였으며, 세포활성화는 AC 3V 5초, DC 1.2 kV/cm 15  $\mu$ sec의 조건으로 유도하였다. 체세포 복제 수정란은 0.4 mg/mL BSA가 함유된 NCSU-23 배양액을 이용하여 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 각각 6일간 배양하였으며, 실험 결과는 SAS/STAT를 이용하여 통계 분석을 실시하였다. 본 연구 결과에서 체외 성숙시 배양액에 dbcAMP를 첨가하여 생산된 난포란을 이용하여 체세포 복제 수정란을 생산한 결과, 배반포로의 발달율(21/123, 17.1%)이 처리하지 않은 군의 배반포 발달율(5/146, 3.4%) 보다 유의적으로 높게 나타났다( $p < 0.05$ ). 복제 돼지 수정란의 질적 향상을 확인하기 위해서 핵 염색을 통해 세포수를 조사한 결과, dbcAMP를 처리한 군의 배반포가 처리하지 않은 군에서 발달한 배반포에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 또한, 세포 사멸을 조사하기 위해 TUNEL 염색을 실시한 결과, dbcAMP를 처리한 군이 처리하지 않은 군보다 적은 수의 세포 사멸이 일어남을 확인할 수 있었다. 본 실험 결과를 통해 나타난 결과를 종합해 볼 때, dbcAMP

처리에 의한 효율적인 체외 성숙 유도는 궁극적으로 복제 수정란의 체외 발생 및 배반포의 질적 향상 유도에 핵심적인 부분 중의 하나라고 판단된다.

Key words) *Dibutyl cAMP*, 체외 성숙, 복제 수정란, 체외 발생, 돼지