

Method: 난소는 3개월령과 성숙 미니돼지 (PWG Genetics Korea, Ltd.)를 구매하여 시료로 사용하였다. 추출된 total RNA는 first-strand cDNAs로 역전사 합성하였다. cDNA 합성은 아래의 조건으로 실시하였다. 최종 산물의 양은 20 µl로 하였으며 여기에 3 µg of the purified total RNA, 4 µl of 5× reaction buffer (Promega, Madison, WI, USA), 5 µl of dNTPs (each 2 mM), 2 µl of 10 µM dT-ACPI, 0.5 µl of RNasin® RNase Inhibitor (40 U/µl Promega), and 1 µl of MMLV reverse transcriptase (200 U/µl Promega) 등이 함유되도록 하여 1.5h at 42°C 조건으로 실시하였다. 여기에 80 µl의 초순수 증류수를 섞어 최종적으로 100 µl가 되도록 하여 GeneFishing™ PCR을 실시할 때까지 -20°C에 보관하였다. Annealing Control Primer (ACP)-PCR은 GeneFishing™ DEG kits (Seegene, Seoul, South Korea)를 이용하여 실시하였으며, 조건은 다음과 같다. 연쇄중합 반응의 조건은 94°C 1분, 50°C 3분, 및 72°C 1분으로 한차례 처리한 다음, 94°C 40초, 65°C 40초, 및 72°C 40초의 조건으로 40차례 반복하여 증폭시킨 다음 최종적으로 72°C 5분 동안 처리하였다. 염기서열 분석은 ABI PRISM®3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 실시하였다.

Results: 450개 이상의 유전자가 확인되었으며 그중 38개의 특이발현 유전자가 확인되었다. 이들 중에서 30개의 특이발현 유전자들의 염기서열을 파악한 결과 25개의 유전자는 그 기능이 알려져 있는 유전자임이 확인되었고, 나머지 5개의 유전자는 아직 그 기능이 파악되지 않은 유전자임이 확인되었다.

Conclusions: 아직 그 기능이 확인되지 않은 유전자에 대한 연구가 추가적으로 이루어져야 할 것으로 판단되며, 또한 그 기능이 확인된 유전자라도 난소의 발달과 관련된 기능에 대하여 추가적인 연구가 이루어질 경우 난소의 성장에 따른 유전적인 이해가 높아질 것으로 사료된다.

This work was supported by the Research Project on the Production of Bio-Organs.

P-8 미니돼지 난포의 발달단계에 따른 분류체계 확립과 난포 Pool 조사에 관한 연구

황성수¹ · 이은영¹ · 민관식¹ · 황수연¹ · 윤종택²

¹생물정보통신전문대학원, ²동물생명자원학과, 국립환경대학교

Background & Objectives: 미니돼지는 바이오장기 생산용으로서의 가능성 때문에 많은 의·과학적 가치를 가지고 있다. 하지만 이들 동물에 대한 번식 및 발달관련 연구는 미진한 편이다. 따라서 본 연구의 목적은 미니돼지의 성장단계에 따른 난포의 발달을 분류할 수 있는 체계를 확립하고 이들 동물의 난소에 존재하는 난포의 pool을 조사하고자 실시하였다.

Method: 미니돼지는 0, 2, 4, 및 6개월령 (PWG Genetics Korea, Ltd.)을 사용하였으며, 도축 즉시 난소를 회수하여 고정, 탈수, 투명화 및 파라핀 포매 과정을 거쳐 난소파라핀 블록을 제작하였다. 난소 조직을 절편하여 슬라이드에 고정시킨 다음 H&E 염색을 실시하였다. 염색된 난소 조직을 광학현미경 하에서 관찰하였다. 난포의 발달단계별 분류는 난자 또는 한 층의 편평과립막세포로만 둘러 쌓여 있는 것을 원시난포, 난자와 한 층의 완전한 형태의 과립막세포로 구성되어 있는 것을 제1차 난포, 2개층 이상의 과립막세포층으로 구성되어 있는 것을 제2차 난포, 난포강이 형성되기 시작하는 것을 제3차 난포, 그리고 완전한 형태의 우성난포를 Graafian 또한 난소의 성장단계별 난포의 수를 확인하기 위

하여 난포의 발달단계별 분류에 따라 각 난포의 수를 계수하였다.

Results: 미니돼지 성장에 따른 난포의 수는 원시난포, 제1차, 제2차, 제3차 및 Graafian 난포로 구분하였으며, 출생 직후 원시난포의 수가 10,000여개 분포하였으나 돼지가 성장함에 따라 난포수가 급격히 감소하여 6개월령에서는 300여개만이 확인이 되었다. 하지만 제1차, 2차, 및 3차 난포들은 난소의 성장에 따라 급격히 늘어나는 것을 확인할 수 있었다. 특히 제2차 난포의 경우 유의하게 증가하는 경향을 보였다.

Conclusions: 본 연구를 통하여 미니돼지 난소의 성장단계에 따른 번식학적 연구의 기초 자료가 될 수 있을 것으로 사료된다.

This work was supported by the Research Project on the Production of Bio-Organs.

P-9 Effects of Bovine Somatotropin (bST) on the Microenvironments of Uterus at day 7 of Estrus Cycle in Hanwoo During Superovulation Treatment

Ho Hun Lee¹, Kyong-Sub Jung¹, Kwan-Sik Min¹,
Jong Taek Yoon¹, Seongsoo Hwang²

¹The Graduate School of Bio- and Information Technology, Hankyong National University;

²Animal Biotechnology Division, National Livestock Research Institute

Background & Objectives: This study was performed to determine the effect of bovine somatotropin (bST) treatment on the concentration of plasma hormonal levels, the production of embryos, and the expression of the specific gene in uterine epithelial cells (BUEC) at day 7 of estrus cycle (D-7) in Korean native beef cattle (Hanwoo) during hyperstimulation.

Method: For superovulation treatment, Hanwoos were treated with controlled internal drug release (CIDR) combined with bST (bST, n=4) or without bST (control, n=6). To analyse specific gene expression, RAPD-PCR, cloning, sequencing, and semi-quantitative RT-PCR were performed.

Results: The concentration of plasma IGF-I level was significantly higher in bST group compared to that of control group at day 7 of estrus cycle ($p < 0.01$). The number of excellent quality embryos was significantly higher in bST group than that of control group ($p < 0.01$). After random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) using 40 random primers, we identified four specific bands in D-7 BUEC from bST group. Result of DNA sequencing, a 584 bp band of the specific gene was obtained. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) searches revealed that it had homology with 7 bovine expressed sequencing tags (ESTs) ranged from 84% to 89%. The specific gene was expressed in the fetus brain (7 months, ♂), fetus ovary (4 months, ♀), D-7 BUEC of bST group, but not in control group by semi-quantitative RT-PCR.

Conclusions: Based on these results, bST treatment during superovulation treatment was an effective method to increase the plasma hormonal levels and to produce high quality of embryos because of the