

### 활성화 과정에 따른 돼지 단위발생란의 발달

최은주<sup>1</sup>, 이호준<sup>1</sup>, 임현선<sup>2</sup>, 김병정<sup>2</sup>, 김상환<sup>2</sup>, 민관식<sup>2</sup>, 윤종택<sup>1,2</sup>

한경대학교 유전공학연구소<sup>1</sup>, (주)한경계농택<sup>2</sup>

돼지 핵이식란의 발달은 다른 종의 것과 비교하여 효율이 낮다. 그 이유 중 하나가 난자활성화율이 낮기 때문이다. 따라서, 본 실험은 돼지 난자의 인위적 활성화처리에 따른 단위발생율을 조사함으로써, 이후 핵이식란 생산의 효율을 높이고자 수행되었다.

돼지 난포란을 10% pFF, 0.1mg/ml cysteine, 10IU/ml PMSG, 10IU/ml hCG, 10ng/ml EGF가 첨가된 TCM-199배양액에서 22시간 동안 배양한 후, 성선자극 호르몬이 배제된 배양액에서 추가로 22시간 동안 배양하여 성숙을 유도하였다. 체외성숙이 야기된 난자는 난구세포를 제거한 후 제2극체가 보이는 난자만을 선별하였다. 선별된 난자는 1) 아무것도 처리하지 않은 대조군과 2) 전기자극(2.0kv/cm, 30 $\mu$ s), 2) 7% ethanol에서 5분 배양 3) 5 $\mu$ M ionomycin에서 4분 배양의 groups들로 나누어 활성화 처리 후 5분 동안 TCM-199에서 세정하고 다시 4시간 동안 6-DMAP에서 배양한 후 12시간에 난자를 염색하여 핵상을 분석하였고, 나머지는 4mg/ml BSA가 첨가된 NCSU-23에서 39 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub> 배양기에서 각각 6~7일 동안 배양을 실시하였다.

본 실험의 결과는 Table 1에서 보는 바와 같이 대조군에서의 활성화는 보이지 않았으나, 높은 fragmentation율(49.0%)을 보였다. 전기자극에 의한 활성화율은 83.7%로, 1PN(25.0%), 2PN(55.0%),  $\geq$ 3PN(3.7%)였고, fragmentation율은 9.5%, 배반포 발생율은 20.9%였다. 7% ethanol에 의한 활성화율은 57.9%로, 1PN(14.3%), 2PN(36.1%),  $\geq$ 3PN(7.5%)였고, fragmentation율은 32.6%, 배반포 발생율은 14.5%였다. 5 $\mu$ g/ml ionomycin에 의한 활성화율은 70.4%로, 1PN(27.5%), 2PN(38.5%),  $\geq$ 3PN(4.4%)였고, fragmentation율은 22.5%, 배반포 발생율은 18.5%였다. 전기자극에 의한 활성화가 2PN으로의 활성화 및 배반포 발생율이 다른 chemical activation보다 더 효과적이었다. 일반적으로 돼지 난자는 chemical agents 보다 전기자극에 의한 방법이 더 효과적인 활성화를 낳는다(Liu 등, 1997). Hyun 등(2003)은 전기자극과 7% ethanol에 의한 활성화 처리 후 배반포 발생율이 24%와 8%를 보였고, Wang 등(1998)은 전기자극과 calcium ionophore A23187에 의한 활성화처리 후 활성화율 88% vs 65%, 2PN을 53% vs 9%, 배반포 발생율 21% vs 9%를 보임으로써, 본 실험의 data에 의해 전기자극의 활성화처리에 있어서의 유용성을 뒷받침한다. 따라서, 체외성숙 돼지난자의 활성화를 유도할 때, 화학적 처리보다는 전기자극이 효과적인 것으로 사료되었다.

Table 1. Development of pig oocytes activated by electrical pulse, ionomycin and ethanol

Activation method	No. of treated oocytes	No.(%) of		
		Fragmented	$\geq$ 2-cell	Blastocyst /2-cell
control	98	48(49.0)	0	0
E P	137	13(9.5)	105(76.6)	22(20.9)
Ethanol	138	45(32.6)	69(50.0)	10(14.5)
Ionomycin	120	27(22.5)	65(54.1)	12(18.5)

Key words) Activation, Oocytes, Electrical Pulse, Parthenogenesis, Pig