

소 배반포 내부세포괴 유래 콜로니의 지속적 배양

이유연¹, 김선욱², 송봉석¹, 김지수¹, 박정선¹, 김학룡¹, 이경광¹, 구덕본¹

¹한국생명공학연구원 발생분화연구단, ²의약유전체연구센터

소 배반포의 내부 세포괴를 체외에서 분리 배양하여 분화가 억제된 내부 세포괴 유래 증식 세포를 미분화 상태에서 무한히 증식할 수 있는 전능성을 지닌 배아 줄기 세포 (embryonic stem cell)로 확립하고자 본 연구를 실시하였다. 소 미성숙 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후 38.5°C, 5% CO₂의 배양기에서 9~10일간 체외배양을 통하여 얻은 부화 배반포를 77% DMEM, 20% FBS, 1% nonessential amino acids, 1% vitamin solution, 1% penicillin-streptomycin solution 및 40 ng/mL LIF (세포 분화 억제 인자)가 첨가된 기초 배양액에 mitomycin C를 처리한 MEF 단층배양세포 위에 배양하여 분화가 억제된 내부 세포괴 유래의 콜로니를 확보하였다. 본 실험에 사용한 배반포는 하나의 완전한 배반포와 4등분한 배반포로서 각각의 세포를 MEF 단층배양세포와 3일간 공배양한 결과, 콜로니 형성율은 각각 87.5%, 91.7%로 유의적 차이는 없었으며, 이후 2일에 한 번 배양액을 교환하면서 콜로니를 유지하였다. 이들 콜로니는 약 5~7일 간격으로 반복하여 계대배양을 실시하였으며, 이때 사용된 세포 분리 방법은 두 개의 주사침을 이용하여 세포들을 일정한 크기로 잘라 덩어리를 만들었고, 분리된 세포 덩어리들을 준비된 신선한 MEF 단층배양세포 위에 옮겨주는 것으로 계대배양의 과정을 수행하였다. 5차 계대배양 후 뚜렷한 분화 양상 없이 배양된 미분화 세포군에 대한 alkaline phosphatase (AP) 염색을 실시한 결과, 미분화 세포에서 적색의 AP 양성 반응이 확인되었으며 체외에서 미분화 형성이 유도됨에 따라 콜로니의 지속적인 배양을 수행할 수 있었다. 이러한 실험을 통해 소 수정란 유래 배아 줄기세포 개발 방법의 확립이 가능할 것으로 판단되며, 아울러 복제수정란으로부터 배아 줄기세포 개발 기술의 확립을 통한 세포치료 관련 연구에도 크게 기여할 것으로 기대된다.

Key words) 소 배반포, 내부세포괴, 배아 줄기세포