

최 중
연구보고서

산란관련 내분비인자의 능동면역법을 이용한
한국재래오골계의 산란능력 향상 기술 개발

고 려 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “산란관련 내분비인자의 능동면역법을 이용한 한국재래오골계의 산란능력 향상 기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 11월 14일

주관연구기관명: 고려대학교

총괄연구책임자: 유승권

세부연구책임자: 고용

세부연구책임자: 홍기창

요 약 문

I. 제 목

산란관련 내분비인자에 능동면역법을 이용한 한국재래오골계의 산란능력 향상 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 식생활이 안정됨에 따라 기능적, 약리적 성격의 생리활성을 갖는 식품에 대한 소비자의 관심이 높아졌으며, 한국재래오골계 및 오골계란 또한 고부가가치 식품으로서 그 가치를 인정받고 있다. 이에 유전·육종학적 측면에서 한국재래오골계의 산란능력을 향상시키기 위한 많은 연구가 이루어 졌으나, 한국재래오골계는 그 혈통을 지키기 위한 근친교배로 여전히 저조한 산란율을 보이는 관계로 이를 향상시키기 위한 다른 각도에서의 연구접근방법이 필요하다. 따라서 본 연구는 한국재래오골계에서 산란능력의 주요 내분비인자인 1)VIP(vasoactive intestinal peptide)와 INH(inhibin)를 능동면역법(active immunization)을 통해 발현양을 조절함으로써 산란율이 저조한 한국재래오골계의 산란능력을 직접적으로 향상시키고, 2)능동면역법을 위한 재조합 단백질을 대량생산함으로써 능동면역기술의 현장적용을 위한 기반을 마련하며, 또한 3)오골계의 산란능력 관련 내분비인자의 발현 변화를 분석함으로써 능동면역법을 통한 내분비인자들의 상호기작을 구명하고, 4)각각의 내분비인자 조절 계군 및 기초계군 내의 산란능력과의 연관성을 종합적으로 분석함으로써 한국재래오골계의 산란능력향상 방안을 구체적으로 제시하고자 한다. 이는 비단 한국재래오골계의 산란능력향상 뿐 아니라, 난 생산성을 가지는 조류를 대상으로 생산성 향상의 구체적 방안을 제시할 수 있으며, 국내 재래오골계 농가를 비롯한 양계산업의 생산성 증대에 기여할 수 있음은 물론 산란능력 관련 최신기술을 확립함으로써 가금 산업 전반의 경쟁력 향상에 이바지 할 수 있을 것으로 사료된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

제1세부과제에서는 Active immunization을 위한 recombinant VIP and/or INH의 생산기술 확립 및 오골계의 산란능력 비교 분석을 위해 recombinant VIP 생산 및 active immunization을 통한 산란능력의 변화 분석, recombinant INH 생산 및 active immunization을 통한 산란능력 변화 분석 Recombinant VIP + INH 생산 및 active immunization과 VIP or INH active immunization을 통한 산란능력 변화 비교 분석을 하며, 제2세부과제에서는 VIP and/or INH active immunization을 통한 오골계의 산란능력 관련 내분비 인자 변화 및 발현 분석을 위해 오골계의 산란능력 관련 내분비

인자 발현 분석, VIP 및 INH active immunization을 통한 산란능력 관련 내분비인자 발현 분석, VIP + INH active immunization을 통한 산란능력 관련 내분비인자 발현 분석하며 제3세부과제에서는 VIP and/or INH active immunization 계군에서의 유전 능력 분석을 위해 VIP active immunization 계군/기초계군 내의 산란형질과의 연관성 분석, INH active immunization 계군/기초계군 내의 산란형질과의 연관성 분석, VIP + INH active immunization 및 VIP or INH active immunization 계군 내의 산란형질과의 연관성 분석을 한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

오골계의 산란능력관련 내분비인자의 변화를 분석함으로써 이후 오골계 및 기타 가금에서 경제형질에 미치는 여러 내분비적 요인들의 작용기전을 밝히는데 그 기초를 제공할 것이다.

본 연구를 통해 축적된 정보과 기술은 오골계 뿐 아니라 가금류 전반에 이용될 수 있는 것으로 난 생산성을 가지는 가금류의 생산성 향상에 구체적인 방안을 제시할 것이다.

최신 기술인 능동면역법(active immunization)을 통해 오골계의 산란능력과 관련하여 내분비인자를 조절함으로써, 기타의 주요한 경제형질과 관련된 내분비 인자를 조절하는데 있어 이 기술이 활용될 것이다.

능동면역법을 이용하여 얻어지는 산란능력의 변화를 유전 및 내분비에서 다각적으로 분석함으로써 산란형질을 개량하는데 있어 그 기틀을 마련할 것이다.

능동면역법을 위한 약품의 대량생산을 통해 직접적으로 산란능력을 향상시키는데 필요한 약품생산의 가능성을 제시할 것이다.

SUMMARY

The purpose of this study was to improve egg production in Korea Native Ogor Chicken (KNOC) by active immunization of chicken Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) and Inhibin (INH). For this purpose, recombinant VIP and INH were produced using E.coli expression system. Also, we evaluated hormone expression and utilized its results for the genetic selection of KNOC based on the egg production.

The results of our study showed that recombinant protein production was clearly established and this result will contribute for the related research area. Furthermore, active immunization was also proved as an alternative approach for the indirect genetic manipulation. The outcome of the active immunization of VIP clearly showed the improved egg production in KNOC. This improvement was correlated with the hormone secretion including LH, FSH, PRL as well as IGF-1.

From this study, we established recombinant protein production and its application into poultry industry. We are currently initiating commercial application of our results, expecting improved egg production and concomitant increased income in poultry farmers.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	9
1. Research Background	9
2. Research Requirement	11
Chapter 2. Present Condition of Technique	13
1. Present Condition and Problem	13
2. Prospect	15
3. Reasonability	16
Chapter 3. Results and Discussion	17
1. Part I	17
2. Part II	21
3. Part III	25
4. Reasonability	26
Chapter 4. Achievements and Contributions	76
1. Part I	76
2. Part II	77
Chapter 5. Application	78
1. Part I	78
2. Part II	78
3. Part III	79
Chapter 6. International Scientific Information	81

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	9
제 1절 연구개발의 목적 및 범위	9
제 2절 연구개발의 필요성	11
제 2 장 국내외 기술개발 현황	13
제 1절 국내외 관련 기술의 현황과 문제점	13
제 2절 앞으로의 전망	15
제 3절 기술도입의 타당성	16
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	17
제 1절 연구개발의 목표 및 내용	17
제 2절 연구개발의 필요성	21
제 3절 연구개발 추진체계	25
제 4절 연구개발 내용 및 결과	26
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	76
제 1절 연구개발 목표의 달성도	76
제 2절 관련분야에의 기여도	77
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	78
제 1절 활용계획	78
제 2절 산업화 추진 방향	78
제 3절 연구목표 달성을 위한 연구수행에 따른 문제점 및 향후 활용계획	79
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	81

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 목적 및 범위

최근 식생활이 안정됨에 따라 기능적, 약리적 성격의 생리활성을 갖는 식품에 대한 소비자의 관심이 높아지면서, 축산에 있어서도 과학적 방법을 이용한 고부가가치 식품을 생산하기 위한 연구가 진행되었으며, 이미 생리활성의 기능성이 인식되어온 한국재래오골계에 대한 연구도 활발히 진행되었다.

천연기념물 제265호의 한국재래오골계는 현재 충남 논산군 연산면 화악리에서 사육되고 있으며, 우리나라에서는 과거로부터 약용계로 사용되어 왔다. 최근 오골계 및 오골계란의 희소성과 약리적 기능성이 고부가가치 식품으로서 그 가치를 인정받게 되면서 오골계에 대한 연구가 활발히 진행되었다. 현재까지 오골계를 개량하기 위한 연구는 주로 고능력의 선발이나 저능력의 개량을 위한 유전적, 환경적, 육종학적 요인들을 분석함으로써 이루어졌다. 그러나 이러한 많은 연구에도 불구하고 오골계의 산란능력은 그 혈통을 유지하기 위한 근친교배로 인해 일반계와 비교하여 매우 낮은 산란율을 나타내고 있다. 이는 오골계의 산란능력을 향상시키는데 있어 유전·육종학적 방법의 한계를 나타낸 것이었으며, 산란능력을 직접적으로 향상시킬 수 있는 연구의 부재를 의미한 것이었다. 따라서 오골계의 산란능력을 향상시키기 위해 유전적, 환경적, 육종학적 연구 뿐 아니라 기술적 측면에서의 종합적 연구를 필요로 하고 있다. 산란능력을 향상시키기 위한 연구는 우리나라 뿐 아니라 세계적으로 많은 연구가 이루어지고 있으며, 특히 야생성 칠면조의 낮은 산란능력을 향상시키기 위해 산란관련 호르몬을 조절함으로써 유의적인 결과를 얻고 있다. 이는 최근 연구되고 있는 산란관련 호르몬 조절 기술을 오골계에 활용함으로써 오골계의 산란능력을 향상시킬 수 있다는 가능성을 제시하고 있다. 산란관련 호르몬을 조절함으로써 산란능력을 향상시키는 연구는 지금까지 수행되어온 선발이나 개량의 유전적, 육종적 접근 방식이 아닌 산란능력과 직접적으로 연관된 내분비적 요인을 조절함으로써 당대에 있어 직접적 효과를 기대할 수 있으며, 현재까지 이루어진 연구들과 비교·분석함으로써 오골계의 산란능력을 향상시키는 방안을 구체적으로 제시할 수 있다. 또한 이러한 기술은 오골계 뿐 아니라 일반 산란계나 육용계에도 적용될 수 있으며, 가금 이외의 난 생산성을 가지는 조류에서도 그 성과를 기대할 수 있다.

따라서 본 연구는 한국재래오골계에서 산란능력의 주요 내분비인자인 1)VIP(vasoactive intestinal peptide)와 INH(inhibin)를 능동면역법(active immunization)을 통해 발현 양을 조절함으로써 **산란율이 저조한 한국재래오골계의 산란능력을 직접적으로 향상**시키고, 2)능동면역법을 위한 재조합 단백질을 대량생산함으로써 **능동면역기술의 현장적용을 위한 기반을 마련**하며, 또한 3)오골계의 산란

능력 관련 내분비인자의 발현 변화를 분석함으로써 능동면역법을 통한 **내분비인자들의 상호기작을 구명**하고, 4)각각의 내분비인자 조절 계군 및 기초계군내의 산란능력과의 연관성을 종합적으로 분석함으로써 **한국재래오골계의 산란능력향상 방안을 구체적으로 제시**하고자 한다.

이는 비단 한국재래오골계의 산란능력향상 뿐 아니라, 난 생산성을 가지는 조류를 대상으로 생산성 향상의 구체적 방안을 제시할 수 있으며, 국내 재래오골계 농가를 비롯한 양계산업의 생산성 증대에 기여할 수 있음은 물론, 산란능력 관련 최신기술을 확립함으로써 가금 산업 전반의 경쟁력 향상에 이바지 할 수 있을 것으로 사료된다.

제 2절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

최근 분자생물학의 발전으로 가축의 생체 내 호르몬 및 기능성 인자들을 구명하고, 또한 DNA 수준에서 유전자의 발현이나 작용기전을 구명할 수 있게 됨으로써 인위적으로 유전적, 내분비적 인자의 조절을 가능케 하였다. 이는 선발을 통한 후 대검정으로 이루어지는 육종학적 개량의 시간적 한계를 극복하고, 과학적 분석방법을 이용하여 개량의 효과를 직접 확인할 수 있게 함으로써 보다 신속하고 정확한 자료를 제시할 수 있게 하였다.

한국재래오골계에 있어서도 산란능력의 형질을 개량하기 위해 오골계의 유전물질을 DNA 수준에서 직접 확인하였다(황 등, 1997). 그러나 이러한 연구들은 산란능력을 향상시키는데 있어 기초단계에 불과한 것이었으며, 산란능력과 관련된 복잡한 양적형질을 유전·육종적 방법을 통해 개량하는 것은 환경적, 영양적 변이 등으로 인해 정확한 분석이 어려웠다. 또한 고부가가치 식품으로서의 가치를 갖는 오골계란은 모두 자연방사식의 야생성 오골계에서 생산되는 것이며, 한국재래오골계의 혈통을 유지하기 위한 근친교배로 유전적으로 낮은 부화율과 산란율을 가지는 특성으로 인해 유전·육종학적 방법은 산란능력을 향상시키는데 있어 그 한계가 있었다.

이에 최근 강 등(2000)에 의해 오골계의 산란능력 관련 내분비인자를 구명함으로써 산란능력을 향상시키려는 연구가 이루어졌으며, 이를 통해 유전자의 발현에 의하여 지배되는 산란능력의 발현과 내분비인자를 분석함으로써 산란능력을 향상시켰다고 보고하였다. 이는 한국재래오골계의 산란능력 향상을 위한 유전·육종학적 방법의 한계를 극복하고, 내분비인자의 조절을 통한 산란능력 향상의 가능성을 제시한 것이다.

또한 El Halawani 등(1993)은 산란능력을 향상시키기 위한 연구에서 능동면역법(active immunization)을 이용하여 야생성 칠면조에서 산란수의 유의적인 증가를 보고하였으며, 이 또한 산란능력 관련 내분비 인자를 조절함으로써 얻어진 것이었다.

따라서 본 연구에서는 현재까지 연구되어온 유전·육종학적 측면과 더불어 내분비학적, 면역학적 방법을 이용한 기술적 측면에서 오골계의 산란능력을 향상시키기 위한 구체적인 방안을 제시하고자 한다. 이는 산란능력과 관련된 내분비 인자를 조절함으로써 산란수를 증가시키고자 하는 것으로 오골계뿐 아니라 일반계, 메추리, 타조, 오리, 칠면조 등 가금류 전체를 대상으로 본 실험의 효과를 기대할 수 있으며, 특히 야생성 및 저조한 난 생산성을 가지는 가금류에 있어 난 생산능력을 향상시키는데 크게 이바지 할 수 있을 것이라 사료된다.

특히 본 연구에서의 면역학적 접근방법은 최근에 이루어지고 있는 것으로, 그 기술이나 접근 방법에 있어 독창성을 확보할 수 있으며, 이 기술의 적용 또한 가금류 전반에 그 현실성을 두고 있어 우리나라 가금 산업에 있어 크게 기여할 수 있을 것이라 사료된다.

2. 경제 산업적 측면

1980년대 이후 경제성장을 통해 식생활이 안정되고 소비자의 요구가 다양해지면서 식품에 있어서도 고부가가치 식품을 생산하기 위한 여러 가지 시도들이 계속되어 왔다. 최근 소비자의 기호도가 식품의 가격보다는 그 식품이 가지는 희소성이 나 기능성을 더 중시하는 방향으로 변화함에 따라 기능성·건강보조·고부가가치의 식품이 고가에도 불구하고 식품시장에서 높은 경쟁력을 유지하고 있다.

식품생산의 가장 큰 부분을 담당하는 축산에서도 이러한 고부가가치를 지니는 식품을 생산하기 위해 많은 분야에서 과학적 접근을 시도하였다. 그 결과로 많은 천연물에서 약리적 기능적 효과에 대한 과학적 근거를 제시하였으며, 이를 상품화하여 한해 1조 2천억원대의 건강보조식품 시장을 형성하고 있다.

우리나라 천연기념물 제265호의 한국재래오골계 또한 약리적·기능적 생리활성을 갖는 고부가가치 상품으로 인정되고 있으나 그 산업규모나 시장규모는 아직까지 영세한 실정이다. 그러나 양계산업에 있어 오골계란은 재래품종을 이용한 유일한 수출품이며 수당 연간 150개 정도의 낮은 생산량에도 불구하고 그 수요를 국내뿐 아니라 국외에서도 형성하고 있다. 특히 일본으로 수출되는 오골계란은 이미 그 식품적 영양가치를 인정받아 일본 내에서도 여러 가지 제품으로 생산·판매되고 있으며, 오골계란을 이용한 식품을 개발하기 위한 연구도 활발히 진행되고 있다(Ishibashi 등, 1997).

따라서 최신기술을 통한 오골계의 산란수 증대는 오골계 사육농가의 생산성을 증대시키고, 양계산업을 활성화시킬 수 있을 것으로 사료된다. 또한 이 기술을 활용함으로써 가금 산업 전반의 생산성 증대를 통한 가금 산업의 활성화로 궁극적으로 축산농가의 소득을 증대시킬 수 있을 것이다.

3. 사회·문화적 측면

한국재래오골계는 천연기념물 제265호로 희소성을 지니는 우리나라 천연의 자원이다. 오골계는 과거로부터 이미 약리적, 기능적 효능을 인정받으면서 국민 식생활에 있어 건강보조식품으로써 이용되어 왔다. 최근 이러한 오골계의 약리적, 기능적 효과에 대한 과학적 근거를 제시함으로써 고부가가치의 건강보조식품으로도 개발되고 있다. 가금에 있어 계란은 혈중 생리물질이 가장 많이 이행된 산물로써, 오골계란 또한 오골계의 특이적 생리활성물질을 함유하는 약리적 식품으로서 그 가치를 인정받고 있으며, 국외에서도 그 가치가 인정되어 수출을 통한 가금 산업의 국제 경쟁력 신장에 이바지하고 있다.

따라서 면역학적 방법에 의한 산란능력의 향상은 기본적으로 오골계사육농가의 소득증대와 가금류 전반에 있어 계란 생산성 증대를 통한 가금 산업의 활성화를 도모할 수 있으며, 수출을 통한 외화소득을 증대시킬 수 있다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

한국재래오골계에 대한 연구는 주로 천연기념물 제265호의 연산오골계를 대상으로 이루어 졌다. 그러나 과거 한국재래오골계에 대한 연구는 주로 오골계의 유전자형을 밝히고 이에 근거한 육종가를 추정함으로써 오골계의 혈통을 확립하기 위한 것이었다(한, 1996). 지금까지의 연구결과로 유전·육종학적 방법에서 오골계의 유전물질을 DNA 수준에서 확인하였으며(이 등, 1995), RAPD(Random Amplified Polymorphic DNAs)를 이용한 유전 특성 분석(황 등, 1997) 및 형질전환동물(transgenic animal) 생산을 위한 chimeric chicken 생산(서 등, 1995)이 이루어졌다. 또한 한국재래오골계의 식품적 가치를 밝히기 위해 육질에 대한 연구가 이루어졌으며(권, 1980), 오골계의 체성장과 산육능력을 일반 육용계와 비교한 연구도 진행되었다(한 등, 1989).

국외로 수출되는 오골계란은 이미 그 식품영양적 가치를 인정받고 있으며, 오골계란에 대한 연구도 심도있게 이루어졌다(백 등, 1989; 한 등, 1986). 그러나 이러 한 연구는 대부분 유전·육종학적 측면에서 이루어진 것으로서 한국재래오골계의 혈통을 유지하기 위한 근친교배로 인한 낮은 산란율과 부화율의 한계점을 극복하지는 못하였다.

최근 내분비인자를 이용한 한국재래오골계의 산란능력을 향상시키려는 연구가 시도되어(서 등, 2001), 한국재래오골계의 산란능력 향상에 유의적인 결과가 보고 되었다. 이는 당해 연구기관에서 수행한 내분비인자를 이용한 오골계 산란능력향상에 대한 연구이며, 오골계의 산란능력에 있어 내분비적 접근 방법은 유의적인 결과를 보여주었다. 따라서 산란능력의 조절에 있어 내분비학적 방법은 유전·육종학적 방법의 한계점을 극복하고, 산란능력향상에 있어 새로운 가능성을 제시하는 방법이라 할 수 있을 것이다.

특히 국외에서는 산란능력 관련 내분비인자의 조절을 통한 산란능력 향상의 연구가 활발히 진행되고 있으며, 내분비인자를 조절하기 위한 기술적 측면에서 능동면역법(active immunization)을 통한 산란능력 향상에 대한 연구가 특히 주목을 받고 있다. 이미 산란능력 관련 내분비인자의 조절에 있어 선진기술을 가진 El Halawani 등(1993)은 칠면조에서 능동면역법을 통해 내분비인자를 조절함으로써 산란수의 유의적인 증가를 보고한 바 있으며, 이러한 내분비인자를 조절하기 위해 산란능력관련 내분비호르몬의 기전을 밝히려는 연구도 활발히 이루어 졌다.(Macnamce 등, 1986).

최근의 연구에서도 당해 연구책임자와 El Halawani 등(2001)은 능동면역법(active immunization)을 통해 산란능력 관련 내분비인자를 조절함으로써 칠면조에서 산란수 증가에 대한 유의적인 결과를 보고하고 있으며, 이 연구에서 효율적 생산성 향상을 위한 기반연구가 당해 연구책임자에 의해 보고되었다(You et al, 1995; You et al,

1998; El Halawani et al, 1998)

그러나 현재까지 산란능력 향상을 위한 국내의 연구에서 능동면역법을 이용한 기술적 접근은 시도된 바 없으며, 국외의 연구에서도 칠면조 이외의 가금류에서는 능동면역법을 이용한 연구가 시도되지 않았다.

따라서 본 연구에서는 한국재래오골계의 산란능력을 향상시키기 위해 능동면역법을 위한 재조합 단백질 생산 및 산란능력의 변화를 분석하고, 능동면역법을 통한 산란능력관련 내분비인자의 변화를 구명하는 한편, 각 계군내의 산란형질과의 연관성을 유전적 측면에서 종합적으로 분석함으로써 한국재래오골계의 산란능력을 향상시키고 또한 한국재래오골계 이외의 가금류에서 난 생산성 향상을 위한 발전적 방안을 제시하고자 한다.

제 2절 앞으로의 전망

최근 오골계의 약리적, 기능적 가치가 인정받게 되면서 고부가가치 식품으로써 오골계란의 수요가 급증하였으며, 이미 국외에서도 오골계란의 식품적 가치가 인정되어 수출되고 있다. 이에 한국재래오골계의 산란능력을 향상시키기 위한 많은 연구가 이루어졌으나, 한국재래오골계는 자연방사식과 혈통유지를 위한 근친교배로 인해 유전·육종에 의한 산란능력 향상의 방법은 그 한계성을 보여 왔다.

이에 당해 연구기관에서 내분비인자를 조절함으로써 한국재래오골계의 산란능력을 향상시키려는 연구를 수행하였으며, 산란수의 증가에 있어 유의적인 증가를 확인하였다. 또한 국외에서는 이미 산란능력 관련 내분비인자에 대한 연구가 진행되고 있으며, 특히 능동면역법을 이용한 산란능력 관련 내분비인자의 조절에 대한 연구에서 산란수의 유의적인 증가를 보고하였다.

따라서 본 연구에서 직접적으로 산란능력을 향상시킬 수 있는 기술적 측면에서의 면역학적 방법을 사용함으로써 내분비인자를 조절하고, 이에 따른 내분비인자의 변화와 각 산란형질과의 연관성 분석을 종합적으로 분석함으로써 오골계뿐 아니라 가금류 전반에서 산란능력을 향상시킬 수 있는 방법을 제시하고자 한다.

제 3절 기술도입의 타당성

내분비인자를 조절함으로써 산란능력을 향상시키려는 연구는 세계적으로 많이 이루어지고 있으나, 능동면역법을 이용한 내분비인자 조절에 있어 현재까지 양계에서 이루어진 바 없으며, 국내에서도 전무한 실정으로 유사 기술의 도입이 불가능하다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1절 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구개발의 목표와 내용

- 가. 제1세부과제 : **Active immunization을 위한 recombinant VIP and/or INH의 생산기술 확립 및 오골계의 산란능력 비교 분석**
- Recombinant VIP 생산 및 active immunization을 통한 산란능력 변화 분석
 - Recombinant INH 생산 및 active immunization을 통한 산란능력 변화 분석
 - Recombinant VIP + INH 생산 및 active immunization과 VIP or INH active immunization을 통한 산란능력 변화 비교 분석
- 나. 제2세부과제 : **VIP and/or INH active immunization을 통한 오골계의 산란능력 관련 내분비 인자 변화 및 발현 분석**
- 오골계의 산란능력 관련 내분비 인자 발현 분석
 - VIP 및 INH active immunization을 통한 산란능력 관련 내분비인자 발현 분석
 - VIP + INH active immunization을 통한 산란능력 관련 내분비인자 발현 분석
- 다. 제3세부과제 : **VIP and/or INH active immunization 계군에서의 유전능력 분석**
- VIP active immunization 계군/기초계군 내의 산란형질과의 연관성 분석
 - INH active immunization 계군/기초계군 내의 산란형질과의 연관성 분석
 - VIP + INH active immunization 및 VIP or INH active immunization 계군 내의 산란형질과의 연관성 분석

2. 연차별 연구개발 목표와 내용

구분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1차 년도 (2002 -2003)	제 1 세 부 과 제 Recombinant VIP 생산 및 active immunization 을 통한 산란능력 변화 분석	<p>오골계의 VIP active immunization을 위한 VIP peptide를 제작하고, 오골계 기초계군에서 VIP active immunization에 의한 산란능력의 변화를 비교 분석하며, active immunization에 필요한 recombinant VIP를 제작하여 대량생산한다.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ VIP peptide의 제작 <ul style="list-style-type: none"> - VIP active immunization을 위해 Glutaldehyde 방법에 의한 KLH conjugated VIP peptide를 제작한다. ○ recombinant VIP의 제작 <ul style="list-style-type: none"> - 유전자 재조합을 이용한 recombinant VIP를 제작하여 E-coli에서 대량생산하고 affinity chromatography를 이용하여 분리한다. ○ 오골계 기초계군의 VIP active immunization에 의한 산란능력 비교 분석 - 산란능력 관련 산란수, 난중, 난포 수와 크기 분석
	제 2 세 부 과 제 오골계의 산란능력 관련 내분비인자 발현 분석	<p>오골계의 산란기 전반에 걸쳐 산란능력에 관련된 호르몬 및 내분비인자의 발현변화를 분석하기 위하여, 혈액을 주기적으로 채혈한 후 혈중 각종 호르몬을 분석하고, 산란능력에 관련된 내분비인자의 조직특이적 발현을 조사하기 위하여 도계 후 산란 관련 기관 조직에서 내분비인자의 발현을 조사한다.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 산란능력 관련 내분비인자 변화 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 혈청 내 VIP, PRL, FSH, LH, INH, IGF-I의 농도를 방사선 면역측정법(radioimmunoassay)을 이용하여 조사한다. ○ 산란능력 관련 내분비인자 발현 기관/조직 내의 유전자 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 난소 및 뇌하수체의 조직에서 VIP, PRL, FSH, LH, INH, IGF-I의 발현을 RT-PCR을 이용하여 조사한다.
	제 3 세 부 과 제 VIP active immunization 계군/기초 계군 내의 산란형질과의 연관성 분석	<p>오골계의 산란형질의 발현을 파악, 분석하기 위해서 VIP active immunization 계군과 기초계군을 독립개체관리하고, 각 계군별로 산란능력을 분석하여 체계화한다.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 기초계군의 산란능력 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 계군의 개체별 생존율, 초산일령, 체중, 난중, 평균난중 등 산란능력 측정 ○ VIP active immunization 계군의 산란능력 분석 <ul style="list-style-type: none"> - VIP active immunization 계군의 개체별 생존율, 초산일령, 체중, 난중, 평균난중 등 산란능력 측정 ○ VIP active immunization 계군과 기초계군 내의 산란형질과의 상관관계 비교, 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 계군 간 산란능력성적과 VIP, PRL, FSH, LH, INH, IGF-I의 발현과의 상관관계 비교, 분석한다.

구분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
2차 년도 (2003 -2004)	제 1 세 부 과 제 Recombinant INH 생산 및 active immunization 을 통한 산란능력 변화 분석	<p>VIP active immunization을 통한 산란능력 관련 호르몬 조절의 부작용을 방지하고 그 효과를 최대화하기 위해 INH active immunization을 위한 INH peptide 및 recombinant INH를 제작하고, 오골계 기초계군에서 INH active immunization에 의한 산란능력의 변화를 비교 분석한다.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ INH peptide의 제작 <ul style="list-style-type: none"> - INH active immunization을 위해 Glutaldehyde 방법에 의해 KLH conjugated INH peptide를 제작한다. ○ recombinant INH의 제작 <ul style="list-style-type: none"> - 유전자 재조합을 이용한 recombinant INH를 제작하여 E-coli에서 대량생산하고 affinity chromatography을 이용하여 분리한다. ○ 오골계 기초계군의 INH active immunization에 의한 산란능력을 VIP active immunization 실험구와 비교 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 산란능력 관련 산란수, 난중, 난포 수와 크기 분석
	제 2 세 부 과 제 VIP 및 INH active immunization 을 통한 오골계의 산란능력 관련 내분비인자 발현 분석	<p>VIP 및 INH active immunization을 통한 오골계 산란능력 관련 내분비 인자의 변화를 분석하기 위하여, 혈중 산란 관련 호르몬을 분석하고, VIP 및 INH active immunization에 기인하는 산란능력관련 내분비인자의 발현을 조사하기 위하여 도계 후 번식기관의 조직에서 내분비인자의 발현을 조사한다</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ VIP 및 INH 각각의 antibody titer 측정 <ul style="list-style-type: none"> - VIP 및 INH active immunization의 역할을 알아보기 위하여 채혈 후 혈청에서 각각의 antibody titer를 측정한다. ○ 산란능력관련 내분비인자 변화 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 혈청 내 VIP, PRL, FSH, LH, INH, IGF-I의 농도를 방사선 면역측정법(radioimmunoassay)를 이용하여 조사한다. ○ 산란능력 관련 내분비 인자 발현 기관/조직 내의 유전자 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 난소 및 뇌하수체의 조직에서 VIP, PRL, FSH, LH, INH, IGF-I의 발현을 RT-PCR을 이용하여 조사한다.
	제 3 세 부 과 제 INH active immunization 계군/기초 계군 내의 산란형질과의 연관성 분석	<p>오골계의 산란능력형질 발현을 파악, 분석하기 위해서 INH active immunization 계군과 기초계군을 독립개체관리하고, 각 계군별로 산란능력을 비교 분석한다.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 기초계군의 산란능력 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 계군의 개체별 생존율, 초산일령, 체중, 난중, 평균난중 등 산란능력 측정 ○ INH active immunization 계군의 산란능력 분석 <ul style="list-style-type: none"> - INH active immunization 계군의 개체별 생존율, 초산일령, 체중, 난중, 평균난중 등 산란능력 측정 ○ INH active immunization 계군과 기초계군 내의 산란형질과의 상관관계 비교, 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 계군 간 산란능력성적과 VIP, PRL, FSH, LH, INH, IGF-I의 발현과의 상관관계 비교, 분석한다.

구분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
	<p>제 1 세 부 과 제</p> <p>Recombinant VIP + INH 생산 및 active immunization 과 VIP or INH active immunization 을 통한 산란능력 변화 비교 분석</p>	<p>오골계의 산란능력 관련 내분비인자를 조절하기 위해 VIP and INH active immunization을 위한 VIP and INH peptide 및 recombinant VIP and INH를 제작하고, VIP 및 INH 각각의 active immunization 개체와 비교 실험하여, VIP and/or INH active immunization을 통한 오골계의 산란능력 변화를 종합적으로 분석한다.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ VIP and INH peptide의 제작 <ul style="list-style-type: none"> - VIP and INH active immunization을 위해 VIP와 INH를 조합하여 Glutaldehyde 방법에 의한 KLH conjugated VIP and INH peptide를 제작한다. ○ recombinant VIP and INH의 제작 <ul style="list-style-type: none"> - 유전자 재조합을 이용한 recombinant INH를 제작하여 E-coli에서 대량생산하고 affinity chromatography을 이용하여 분리한다. ○ VIP 및 INH active immunization과 VIP and INH active immunization에 의한 산란능력의 변화를 오골계 기초계군과 비교 분석 - 산란능력 관련 산란수, 난중, 난포 수와 크기 분석
<p>3차 년도 (2004 -2005)</p> <p>제 2 세 부 과 제</p>	<p>VIP + INH active immunization 을 통한 오골계의 산란능력 관련 내분비인자 발현 분석</p>	<p>VIP and INH active immunization을 통한 산란능력 관련 내분비 인자의 변화를 산란관련 호르몬의 혈중 농도를 분석함으로써 알아보고, VIP and INH active immunization을 통한 산란능력 관련 내분비인자의 발현을 조사하기 위하여 도계 후 산란관련 기관의 조직에서 내분비인자의 발현을 유전자 분석을 통해 조사한다</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ VIP and INH 각각의 antibody titer 측정 <ul style="list-style-type: none"> - VIP and INH active immunization의 역가를 알아보기 위하여 채혈 후 혈청에서 antibody titer를 측정한다. ○ 산란능력관련 내분비인자 변화 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 혈청 내 VIP, PRL, FSH, LH, INH, IGF-I의 농도를 방사선 면역측정법(radioimmunoassay)를 이용하여 조사한다. ○ 산란능력 관련 내분비 인자 발현 기관/조직 내의 유전자 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 난소 및 뇌하수체의 조직에서 VIP, PRL, FSH, LH, INH, IGF-I의 발현을 RT-PCR을 이용하여 조사한다.
<p>제 3 세 부 과 제</p>	<p>VIP + INH active immunization 계군/기초 계군 내의 산란형질과의 연관성 분석</p>	<p>오골계의 산란능력형질 발현을 파악, 분석하기 위해서 VIP + INH active immunization 계군과 기초계군을 독립개체관리하고, 각 계군별로 분리·비교분석하며 계군의 산란능력을 분석하여 체계화한다.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 기초계군의 산란능력 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 계군의 개체별 생존율, 초산일령, 체중, 난중, 평균난중 등 산란 능력 측정 ○ VIP + INH active immunization 계군의 산란능력 분석 <ul style="list-style-type: none"> - VIP + INH active immunization 계군의 개체별 생존율, 초산일령, 체중, 난중, 평균난중 등 산란능력 측정 ○ VIP + INH active immunization 계군과 기초계군 내의 산란형질과의 상관관계 비교, 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 계군 간 산란능력성적과 VIP, PRL, FSH, LH, INH, IGF-I의 발현과의 상관관계 비교, 분석한다.

제 2절. 연구개발 방법 및 설계

1. 연구개발의 이론적 접근방법

산란계에 있어서 산란능력을 향상시키기 위한 연구는 분자생물학적 또는 분자유전학적 기법을 활용한 표지인자를 이용하거나 내분비인자를 이용한 연구들이 많이 이루어지고 있다. 그러나 산란계의 산란능력을 분석하기 위한 내분비학적 연구는 포유류와 비교하면 아직도 많은 연구가 필요한 실정이다.

최근 국외에서는 산란계에서 내분비인자의 발현 분석 뿐 아니라 이를 기초로 한 능동면역법(active immunization)을 이용하였을 때 산란능력이 향상되었다는 결과들이 보고되고 있다(EI halawani 등, 1996, Ahn 등, 2001). 또한 가금류는 포유류와 달리 광주기 조절에 의해 성숙시기의 조절이 가능하여 내분비인자의 발현 또한 광주기에 의해 많은 영향을 받으며, 특히 PRL은 산란에 관여하는 주요한 내분비인자로서 광주기 및 취소성과 밀접한 관련이 있는 내분비인자 중 하나이다(Proudman 등, 1988). 취소성은 산란계에 있어 산란능력을 저해하는 주요한 행동학적 요인으로써 Etches 등(1979)은 PRL이 취소성을 유발한다고 보고한 바 있다.

VIP(Vasoactive intestinal peptide; VIP)는 뇌하수체에서 분비되는 내분비인자로서 PRL의 분비 조절에 관여한다고 알려져 있으며(Samson 등, 1980), 특히 EI Halawani 등(1996)은 VIP를 이용한 능동면역법을 통해 prolactin의 분비를 억제시킴으로써 칠면조에서 산란수를 향상시켰다고 보고하였다.

FSH는 이미 잘 알려진 바와 같이 난소에 있어 난포의 성숙을 자극함으로써 산란에 기인하는 주요한 호르몬이다. 뇌하수체로부터 분비되는 FSH는 필요 이상의 유의적인 수준에서는 Inhibin에 의해 조절되는데, 이러한 작용기전에 대한 능동면역법을 이용함으로써 난포의 성장 및 FSH의 발현조절에 대한 유의적인 결과가 보고되기도 하였다(Ahn 등, 2001)

배란주기를 조절하는 주요한 내분비인자인 LH는 PRL과 상대적 관계에 있으며(EI Halawani 등, 1988; Nicholls 등, 1988; Wingfield 등, 1993), LH는 steroidogenesis에 직접적으로 관련되어 있다(Robinson 등, 1988). LH의 분비는 시상하부에서 분비되는 GnRH-1(Gonadotrophin-releasing hormone-1)의 발현에 의해 조절되며, 일반적으로 VIP에 의한 PRL의 분비가 증가하면 LH의 분비는 감소하는 것으로 알려져 있다. 또한 가금에서 취소성을 보이는 개체에서는 LH의 분비가 감소하고 PRL 농도가 증가한다는 보고가 있었다(Sharp 등, 1998). 이와 같은 보고들은 취소성이 산란에 관여하는 주요한 내분비인자의 발현에 관여하고 있음을 제시하고 있다.

따라서 본 실험에서는 취소성과 관련된 PRL의 분비조절 및 산란관련 내분비인자인 FSH의 발현을 조절하기 위한 능동면역법의 이용에 있어, 기초계군에서의 내분비인자 발현 및 산란성적을 분석함으로써 본 연구과제의 최종 목표인 능동면역 처리 후 계군에서의 산란능력과 내분비인자의 발현 변화에 대한 기초자료를 제시코자 하였다

2. 연구개발의 실험적 접근방법 및 연구내용

가. Active immunization을 위한 recombinant VIP and/or INH의 생산기술 확립 및 오골계의 산란능력 비교 분석

- (1) VIP active immunization을 위한 VIP peptide 제작
synthetic chicken VIP를 제작하고 이를 adjuvant인 KLH에 조합하여, VIP active immunization을 위한 VIP conjugated KLH peptide를 제작한다.
- (2) VIP active immunization을 위한 recombinant VIP의 대량생산
plasmid를 restriction enzyme으로 잘라 cVIP를 conjugation 시킨 후, E-coli에서 배양하여 recombinant VIP를 생산하는 방법을 구축함으로써, VIP active immunization의 위한 recombinant VIP를 대량생산 할 수 있도록 한다.
- (3) rtINH active immunization을 위한 INH peptide 제작
rtINH를 제작하고 이를 glutaldehyde 방법에 의해 adjuvant인 KLH에 조합하여, VIP active immunization을 위한 rtINH conjugated KLH peptide를 제작한다.
- (4) INH active immunization을 위한 recombinant INH의 대량생산
plasmid를 restriction enzyme으로 잘라 rtINH를 conjugation 시킨 후, E-coli에서 배양하여 recombinant INH를 생산하는 방법을 구축함으로써, INH active immunization의 위한 recombinant INH를 대량생산 할 수 있도록 한다.
- (5) VIP + INH active immunization을 위한 recombinant VIP + INH 제작
plasmid를 restriction enzyme으로 잘라 VIP와 INH를 접합시킨 VIP + INH를 conjugation 시킨 후, E-coli에서 배양하여 recombinant VIP + INH를 생산하는 방법을 구축함으로써, VIP + INH active immunization의 위한 recombinant VIP + INH를 대량생산 할 수 있도록 한다.
- (6) active immunization을 통한 산란능력 변화 분석
산란능력 관련 산란수, 난중을 기록하고, 각 연차별 54주령 도계를 통해 난포수와 크기를 관찰·분석한다.

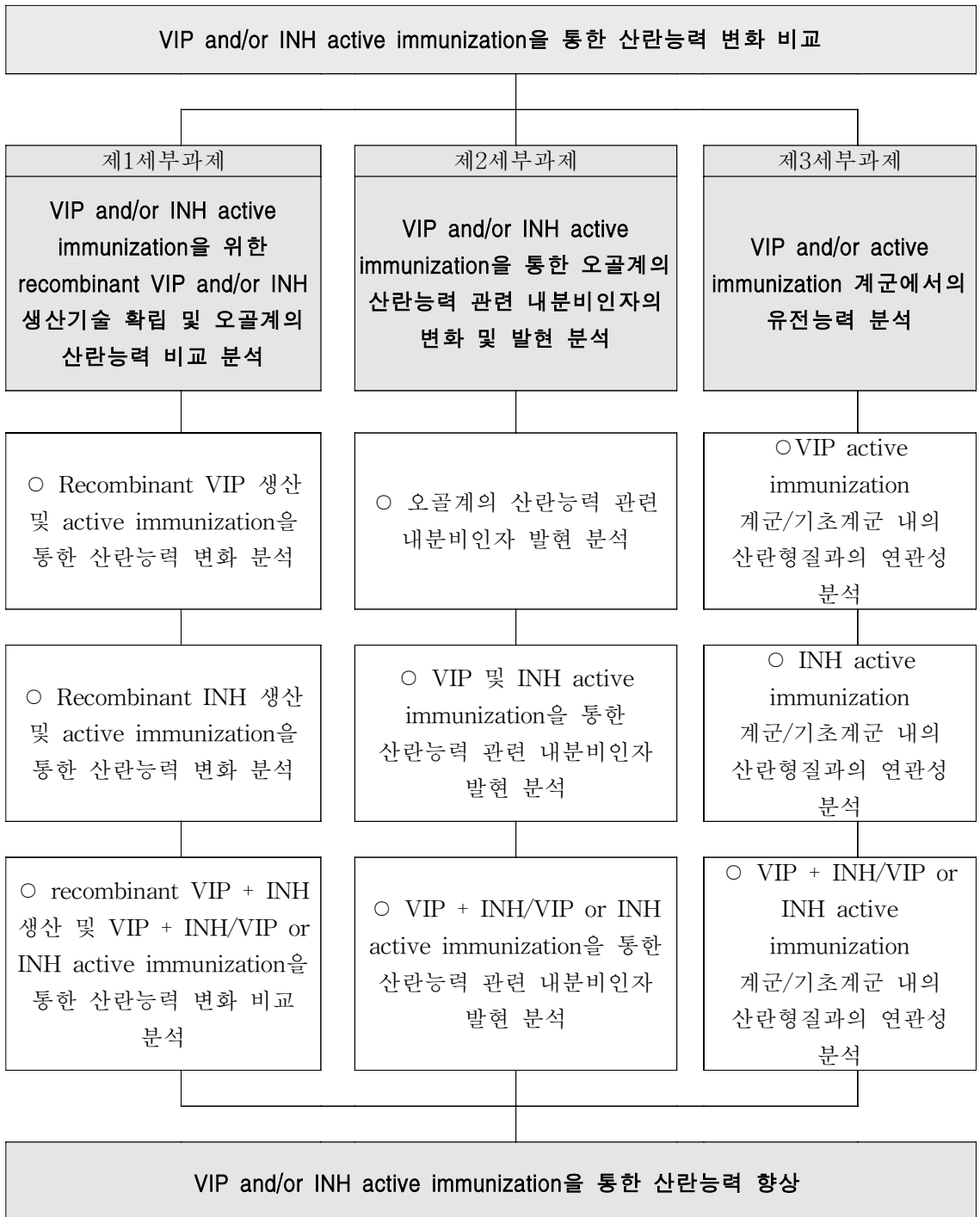
나. VIP and/or INH active immunization을 통한 오골계의 산란능력 관련 산란능력 관련 내분비 인자 변화 및 발현 분석

- (1) 실험공시축으로 사용될 오골계를 천연기념물로 지정된 충남 논산군 연산읍 화악리에 소재한 오골계 농장으로부터 구입 및 자연방사의 사육형태로 상기 농장에 위탁사육 하여, 천연기념물의 오골계와 동일한 사양조건을 확립한다.
- (2) 산란능력 관련 호르몬 분리방법 확보
성장 전반에 걸쳐 산란능력과 관련된 호르몬의 영향을 알아보기 위하여, 혈액을 주기적으로 채혈하고 산란능력 관련 호르몬의 변화를 발표된 표준 방법을 이용하여 측정한다.
- (3) 혈중 산란능력 관련 호르몬 발현 분석
혈청 내에 존재하는 산란능력과 관련 호르몬의 함량 및 존재여부를 분석하기 위해 방사선 동위원소를 이용한 방사선 면역 측정법(radioimmunoassay) 또는 상업용 kit를 이용하여 측정한다.
- (4) 산란능력관련 내분비인자 발현 분석
내분비인자의 발현을 분석하기 위해 난소 및 뇌하수체의 분리방법을 확립하고, RT-PCR을 위한 primer 제작 및 이를 이용하여 산란능력 관련 내분비 인자의 발현을 분석한다.
- (5) VIP + INH / VIP or INH active immunization
VIP + INH / VIP or INH active immunization을 위해, VIP + INH / VIP or INH peptide를 4주 간격으로 5회에 걸쳐 오골계에 주사한다.
- (6) Antibody titer 측정
active immunization의 역가를 알아보기 위해 active immunization 후 일정기간 주기적으로 채혈하고, 발표된 표준방법에 따라 혈중 antibody titer를 측정한다.

다. VIP and/or INH active immunization 계군에서의 유전능력 분석

- (1) 실험공시축으로 사용될 오골계를 자연방사 사육형태로 상기 농장에 사육하며, 천연기념물의 오골계와 동일한 사양조건으로 active immunization 계군과 기초 계간간의 독립적 사양방식을 취하여 상호 산란능력비교를 위한 독립개체관리를 한다.
- (2) VIP active immunization 계군과 기초계군 내의 산란형질과의 연관성 분석
VIP active immunization 계군과 기초계군 각 개체별 생존율, 초산일령, 체중, 난중, 평균 난중 등 산란 관련 능력을 분석 비교하여 체계화하고, VIP, PRL, FSH, LH, INH, IGF-I의 발현과의 상관관계를 비교, 분석함으로써 계군 간의 기초자료를 제공한다.
- (3) INH active immunization 계군과 기초계군 내의 산란형질과의 연관성 분석
INH active immunization 계군과 기초계군 각 개체별 생존율, 초산일령, 체중, 난중, 평균 난중 등 산란 관련 능력을 분석 비교하여 체계화하고, VIP, PRL, FSH, LH, INH, IGF-I의 발현과의 상관관계를 비교, 분석함으로써 계군간의 기초자료를 제공한다.
- (4) VIP + INH active immunization 계군과 기초계군간 산란능력관련 측정 체계화
VIP + INH active immunization 계군과 기초계군 각 개체별 생존율, 초산일령, 체중, 난중, 평균 난중 등 산란 관련 능력을 분석 비교하여 체계화하고, VIP, PRL, FSH, LH, INH, IGF-I의 발현과의 상관관계를 비교, 분석함으로써 계군간 기초자료를 제공한다.
- (5) VIP + INH / VIP or INH active immunization 계군과 기초계군 내의 산란형질과의 연관성 분석
VIP + INH / VIP or INH active immunization 계군과 기초계군 각 개체별 생존율, 초산일령, 체중, 난중, 평균 난중 등 산란관련능력을 분석 비교하여 체계화하고, VIP, PRL, FSH, LH, INH, IGF-I의 발현과의 상관관계를 비교, 분석함으로써 계군간의 기초자료를 제공한다.
- (6) Active immunization 관련 계군과 기초계군간 산란능력 검토
Active immunization에 의한 계군의 산란능력관련 성적과 기초계군간의 성적등의 종합자료를 통해 발현정도를 상관분석하고, 산란능력관련 형질의 발현정도에 따른 상관관계를 분석하는 통계적 모형을 제시한다.

제 3절. 연구개발 추진체계



제 4절. 연구개발 내용 및 결과

1. VIP and/or INH active immunization을 위한 recombinant VIP and/or INH 생산기술 확립 및 오골계의 산란능력 비교 분석

가. Chicken VIP synthetic 및 recombinant peptide 제작

VIP active region (28 amino acids)을 이용한 synthetic chicken VIP를 제작 한 후 적절한 carrier protein의 선발 (KLH; keyhole limper hemocyanin)하여 Glutaraldehyde coupling method을 이용한 synthetic VIP와 carrier protein conjugate을 제조하여 active immunization에 이용하였다.

나. Chicken VIP 발현 plasmid 구축

Chicken VIP 발현 plasmid의 구축하기 위해 PCR에 의한 chicken VIP의 증폭한 후 증폭된 chicken VIP cDNA를 E. coli용 TA-vector를 이용하여 cloning하였다. 발현백터 구축이 확인 된 clone들에 대해서는 Automatic sequencing system을 이용하여 TA-vector에 cloning된 chicken VIP cDNA의 염기서열을 확인하였다. 염기서열이 확인된 chicken VIP cDNA을 단백질 발현 plasmid (pTRX-FUS vector, Invitrogen, USA)에 cloning 한 후 단백질 발현 양을 증가시키기 위해 1 copy, 2 copy 및 3 copy가 연결된 chicken VIP cDNA를 pTRX-FUS vector (pTRX-FUS-chVIP-1X, 2X, 및 3X)에 cloning 하였다. Automatic sequencing system을 이용하여 pTRX-FUS vector에 cloning된 1 copy, 2 copy 및 3 copy가 연결된 chicken VIP cDNA의 염기서열 및 open reading frame (ORF)을 확인하였다. 제한효소를 이용하여 pTRX-FUS-chVIP-1X, 2X, 및 3X constructs를 절단한 후 정확한 size의 insert를 확인하였다. (Fig. 1.)

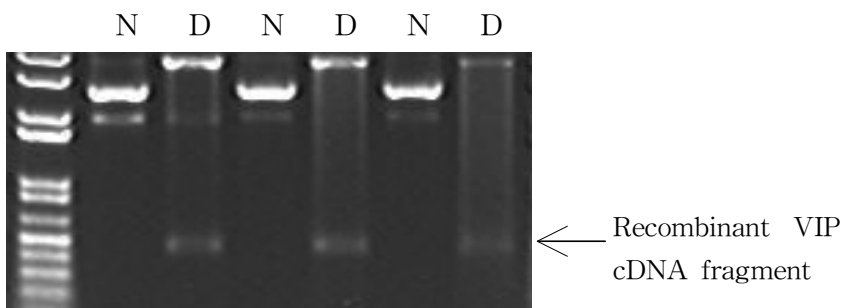


Fig. 1. Restriction enzyme digestion of pTRX-FUS-chVIP-1X, 2X and 3X isolated from DH5 α E. Coli. N: non-digested; D: digested

Insert를 가진 clone들에 대해서는 Automatic sequencing system을 이용하여

pTRX-FUS vector에 cloning된 1 copy, 2 copy 및 3 copy가 연결된 chicken VIP cDNA의 염기서열 및 open reading frame (ORF)을 재확인하였다.

다. Recombinant VIP의 대량생산

Construction이 확인된 pTRX-FUS-chVIP-1X, 2X, 및 3X plasmid를 단백질 발현을 위해 적절한 bacteria host인 G1724 및 G1698 균주에 형질전환을 시켰다. G1724 및 G1698 균주로부터 pTRX-FUS-chVIP-1X, 2X, 및 3X plasmid를 분리하여 제한효소를 이용하여 바람직한 plasmid를 가지고 있는 E. coli를 선발하였다. (Fig 2)

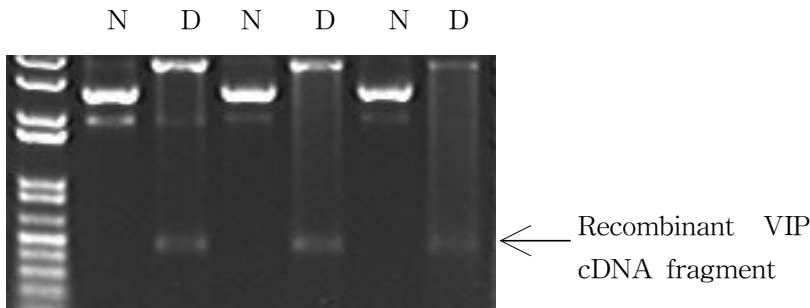


Fig. 2. Restriction enzyme digestion of pTRX-FUS-chVIP-1X, 2X, and 3X isolated from G1724 protein expression E.coli. N: non-digested; D: digested

라. Recombinant VIP 단백질발현 균주의 배양

pTRX-FUS-chVIP-1X, 2X, 및 3X plasmid를 함유하고 있는 G1724 및 G1698 균주를 RM media에 접종하여 30°C shaking incubator에서 16시간 배양을 하였다. RM media에서 배양된 신선한 균주를 Induction media에 접종한 후 37°C shaking incubator에서 OD550값이 0.5일 때 까지 배양한 후 1시간 간격으로 세포를 회수하였다. E. coli로부터 recombinant VIP의 분리의 최적 조건을 확립하기 위해 회수된 균주를 ultrasonicator를 이용한 whole cell lysis 방법으로 균주를 파괴한 후 단백질을 회수하였다. 또는 회수된 균주를 Osmotic shock method (Osmotic shock solution #1 과 #2의 이용)을 통해 단백질을 회수하였다. 회수된 단백질은 SDS-PAGE를 이용하여 E. coli로부터 recombinant VIP의 발현을 확인하기 위해 4-12% gradient SDS-PAGE gel에 loading하여 recombinant VIP의 발현과 induction을 확인하였다. Induction한 후 1시간부터 4시간까지 지속적으로 recombinant VIP의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. (Fig. 3, 4)

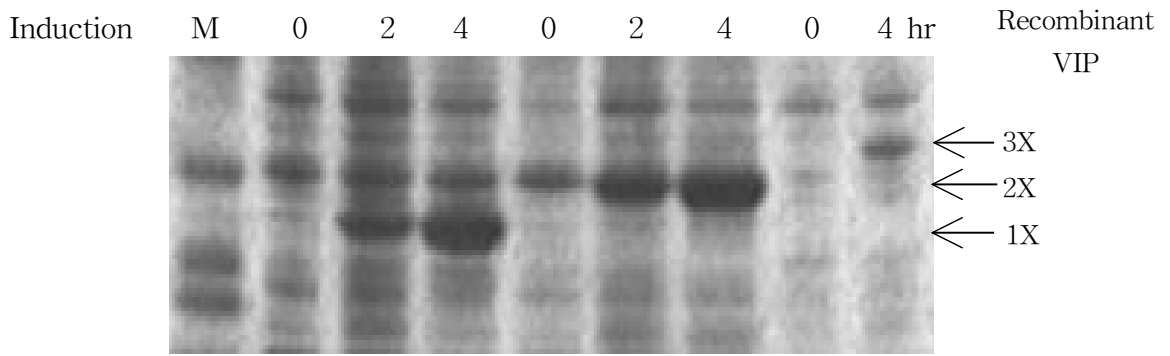


Fig. 3. Expression of recombinant VIP 1X and 2X prepared by whole cell lysis method. Different induction times are indicated as 0, 1, 2, 3, and 4 hours. M: protein size marker.

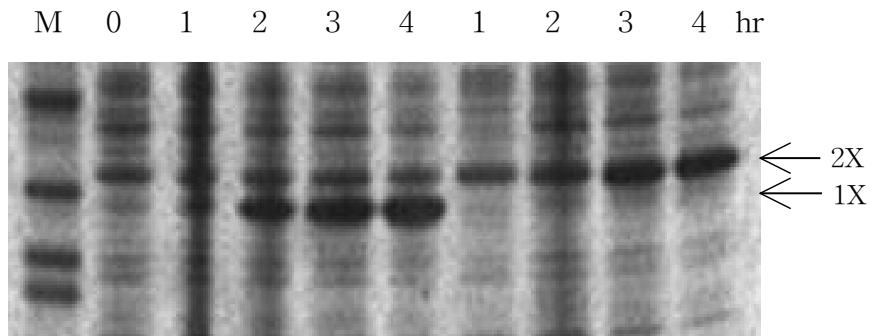


Fig. 4. Expression of recombinant VIP 1X and 2X prepared by osmotic shock method. Different induction times are indicated as 0, 1, 2, 3, and 4 hours. M : protein size marker.

E. coli로부터 분리된 affinity chromatography를 이용한 recombinant VIP의 정제를 위해 ThioBond resin을 이용한 affinity chromatography를 통한 정제하였다. Fig 5에서와 같이 Affinity chromatography를 통한 정제된 recombinant VIP를 SDS-PAGE를 이용하여 VIP를 확인하였다.

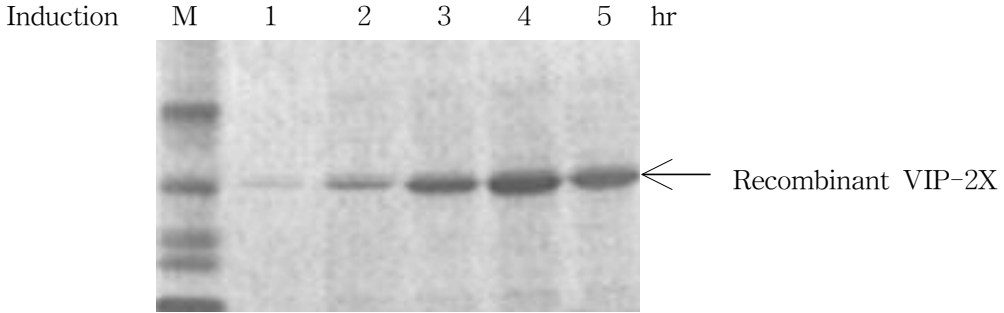


Fig. 5. Purification of recombinant VIP 2X by affinity chromatography using ThioBond®

마. Chicken INH synthetic peptide 제작 및 active immunization을 위한 적정 conjugation 방법의 확립

Chicken INH의 active region (25 amino acids)을 이용한 synthetic chicken INH를 제작하였다. Active region은 Fig 6의 이탤릭체로 표시되어 있다.

Fig. 6. amino acid sequence of chicken INH mature region. Italic letters represent active region for the synthetic peptide

1 SAVPWSPAAL SLLQRPSADV AAHTNCRRAS LNISFEELGW DNWIVHPSSF
 51 VFHYCHGNCA *EGHGLSHRLG VQLCCAALPG TMRSLRVRTT* SDGGYSFKYE
 101 TVPNLAQDC TCV

합성된 synthetic INH의 경우 1차년도에 확립된 여러 방법 중 Glutaraldehyde coupling, m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide (MBS) coupling 및 carbodiimide coupling과 같은 다양한 conjugation 방법 중 Glutaraldehyde coupling method를 선발하였다. KLH (keyhole limper hemocyanin), BSA 및 thyroglobulin과 같은 다양한 carrier protein 중 KLH를 conjugate로 선발하였다. KLH를 carrier protein으로 이용하여 합성된 chicken INH peptide 2mg과 10mg의 KLH를 2ml의 0.1M ammonium acetate (pH 7.0)에 용해시킨 후, 0.02M glutaraldehyde 1.3ml을 서서히 가하여 상온에서 5시간 반응시켰다. 반응액을 4℃ 증류수로 2회 투석하여 lyophilysis시켜 chicken INH peptide + carrier protein conjugate를 제조했다.

바. Chicken INH 발현 plasmid 구축

RT-PCR에 의해 증폭된 chicken INH cDNA를 TA-vector에 이용하여 cloning 및 automatic sequencing을 이용한 염기서열의 확인하였다 (Fig. 7 및 Fig. 8). Automatic sequencing system을 이용하여 chicken INH cDNA의 mature region을 확인한 결과 GenBank database에 발표되어 있는 염기서열과 동일하였다.

INH 유전자의 RT-PCR cloning

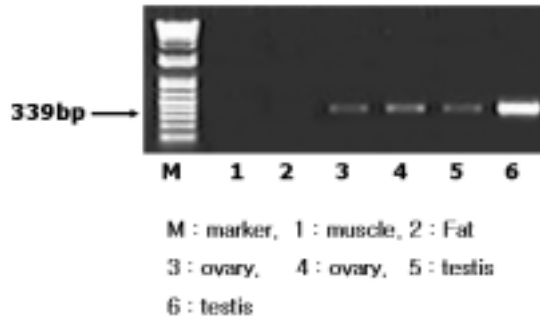


Fig. 7. RT-PCR amplification of chicken INH mature region

```

1   tccgccgtgc  cctggtcgcc  ggctcgctc  agcctgctgc  agcgcccatc  ggaggacgtg
61  gccgcccaca  ccaactgccg  cggggcgtc  ctcaacatct  ctctcgagga  gctgggctgg
121 gacaattgga  tcgtgcacc  cagcagctc  gtttccact  actgccacgg  gaactgtgcc
181 gaaggccacg  ggctgagcc  accggctggg  gtgcagctgt  gctgcgccgc  gctgccggc
241 accatgcgct  cactgcgtgt  cgcaccacc  tctgatggg  gctactcct  caagtacgag
301 acggtgccca  acatcctggc  gcaggactgc  acctgtgc
  
```

Fig. 8. Nucleotide sequence of chicken INH mature region

염기서열이 확인된 Chicken INH cDNA을 5종류의 단백질 발현 plasmid (GST, His6, HisGB1, HisNusA, HisTrx-)에 cloning 한 후 제한효소를 이용하여 정확한 size의 insert를 확인하였다 (Fig. 9).

INH 유전자의 Expression vector construction

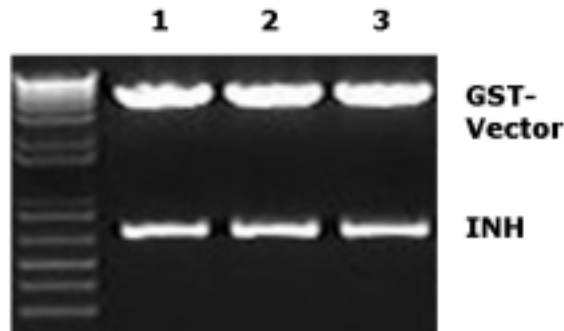


Fig. 9. Restriction enzyme digestion of recombinant plasmid containing chicken INH mature region

확인된 발현벡터는 다시 한번 Automatic sequencing system을 이용하여 5종류의 단백질 발현 plasmid (GST, His6, HisGB1, HisNusA, HisTrx-)에 cloning 한 chicken INH cDNA의 염기서열 및 reading frame을 재확인하였다.

사. Recombinant INH의 대량생산

Chicken INH cDNA를 5종류의 단백질 발현 plasmid (GST, His6, HisGB1, HisNusA, HisTrx-)에 cloning 한 후 E. coli에 전이하기 위해 bacteria host인 BL21, G1724 및 G1698 균주에 형질전환을 시켰다. 이와 관련된 단백질 발현벡터의 발현 조건은 다음과 같다 (Fig. 10). 전이 후 INH mature region을 함유하고 있는 E. coli 균주를 적정 media에 접종하여 18°C 또는 37°C shaking incubator에서 3-16시간 배양을 하였다. - Media에서 배양된 신선한 균주를 Induction media에 접종한 후 적정온도에서 shaking incubator에서 OD550값이 0.5일 때 까지 배양한 후 1시간 간격으로 세포를 회수하였다. E. coli로부터 recombinant INH의 분리의 최적 조건을 확립하기 위해 회수된 균주를 ultrasonicator를 이용한 whole cell lysis 방법으로 균주를 파괴한 후 단백질을 회수하였다. 또는 회수된 균주를 Osmotic shock method (Osmotic shock solution #1과 #2의 이용)을 통해 단백질을 회수하였다. 회수된 단백질을 4-12% gradient SDS-PAGE gel에 loading하여 recombinant INH의 발현과 induction을 확인하였다(Fig. 10).

Protein Expression systems in *E.coli*: Inhibin (INH)

Fusion Tag:

#	Fusion tag	Fusion tag size (kDa)
1	GST-	27.8
2	His6-	2.2
3	HisGB1-	11.8
4	HisNusA-	57.5
5	HisTrx-	17.0

단백질 발현 조건:

1. 18°C, overnight
2. 37°C, 3 hr

Fig. 10. 재조합 단백질의 대량생산을 위한 재조합 단백질 발현백터의 종류 및 단백질 발현 조건

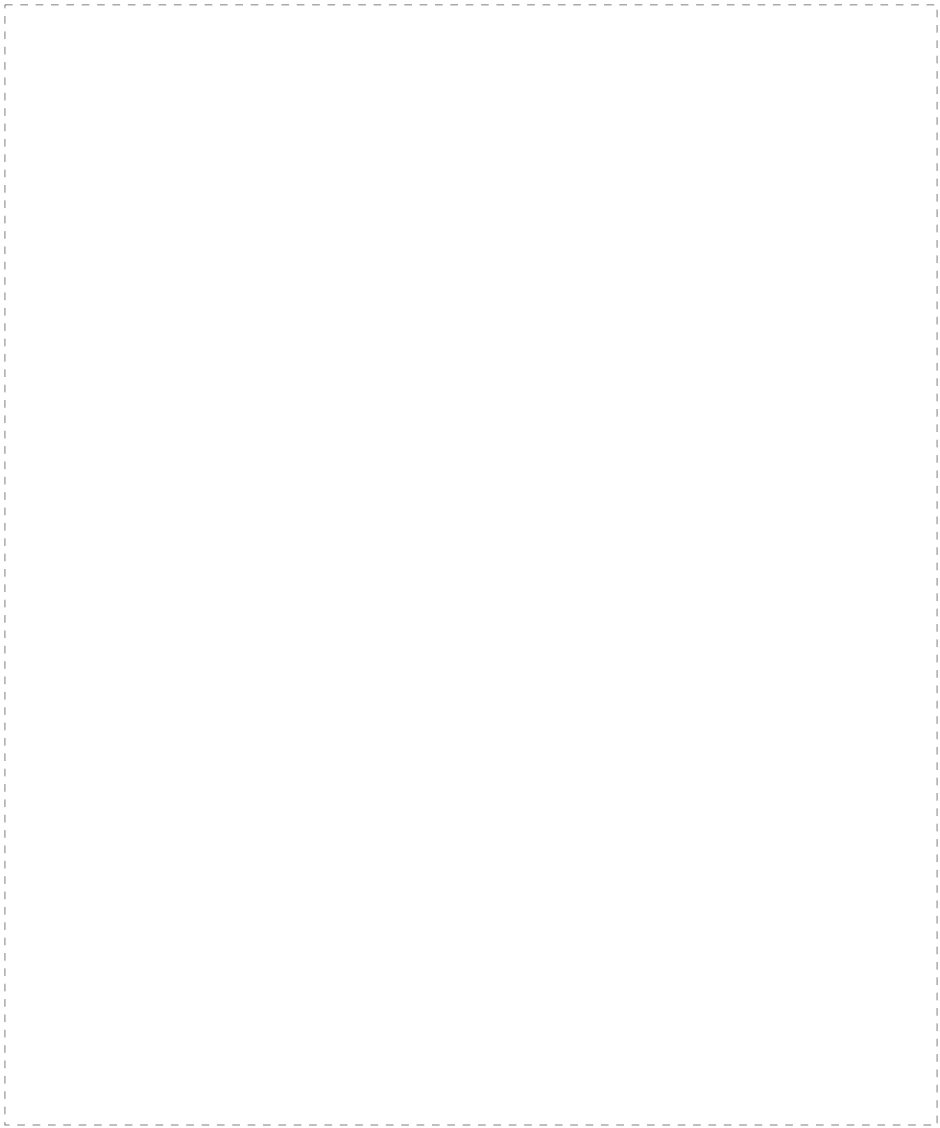


Fig. 11. 재조합 단백질 발현백터의 단백질 발현, induction 및 solubility screening

아. Recombinant INH의 정제

위의 Figure 11에서와 같이 재조합 단백질의 생산은 HisTrx-fusion 단백질의 생산이 solubility 및 purification에서 가장 좋았다. 따라서 recombinant INH의 대량 생산을 위해 HisTrx-expression vector를 이용하여 생산하였다. E. coli로부터 분리된 affinity chromatography를 이용한 recombinant INH를 Trx 또는 HisTag Bond resin을 이용한 affinity chromatography를 통한 정제하였다. Affinity chromatography를 통한 정제된 recombinant INH를 SDS-PAGE를 이용하여 INH를 확인하였다(Fig. 12).

재조합 단백질의 대량생산

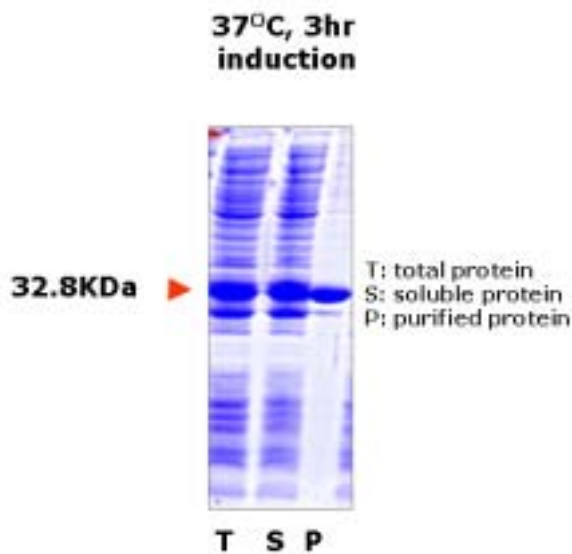
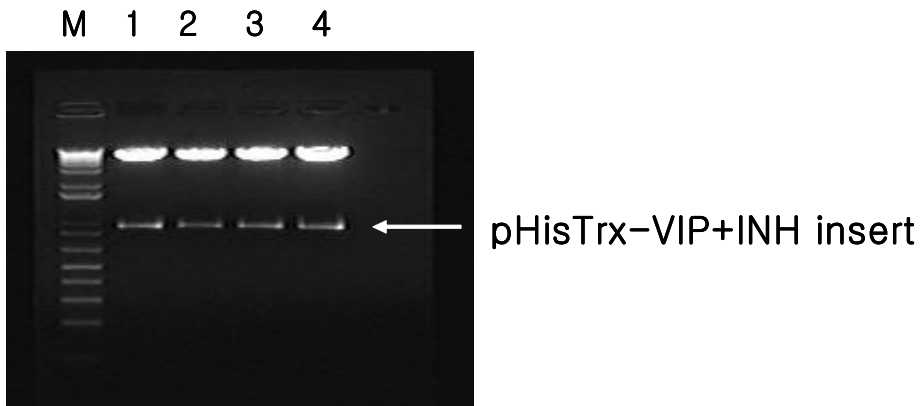


Fig. 12. 재조합 단백질의 대량 생산 및 정제

자. Recombinant VIP + INH 제작

Chicken VIP + INH 발현 plasmid의 구축하기 위해 PCR에 의한 chicken VIP cDNA와 INH cDNA를 PCR 증폭 한 후 E. coli용 TA-vector를 이용하여 cloning하였다. 발현벡터 구축이 확인 된 clone들에 대해서는 Automatic sequencing system을 이용하여 TA-vector에 cloning된 chicken VIP + INH cDNA의 염기서열을 확인하였다. 염기서열이 확인된 chicken VIP + INH cDNA를 단백질 발현 plasmid (pHisTrx expression vector, Invitrogen, USA)에 cloning 하였다. 재조합 유전자의 발현양 및 solubility 및 purification step에서 가장 적절한 발현벡터를 선별하기 위해 VIP 및 INH 재조합 단백질의 생산 방법과 동일하게 5 종류의 발현벡터를 사용하였다. 이중 가장 좋은 결과를 보여주고 있는 pHisTrxchVIP-IINH 발현벡터를 사용하여 재조합 단백질을 대량생산 하였다. 제한효소를 이용하여 pHisTrxchVIP-IINH constructs를 절단한 후 정확한 size의 insert를 확인하였다(Fig. 13).



M : marker, 1 ~ 4 : pHisTrx-VIP+INH

Fig. 13. Restriction enzyme digestion of pHisTrxchVIP-IINH plasmids isolated from DH5 α

Insert를 가진 clone들에 대해서는 Automatic sequencing system을 이용하여 pHisTrxchVIP-IINH가 연결된 chicken VIP 및 INH cDNA의 염기서열 및 open reading frame (ORF)을 재확인하였다.

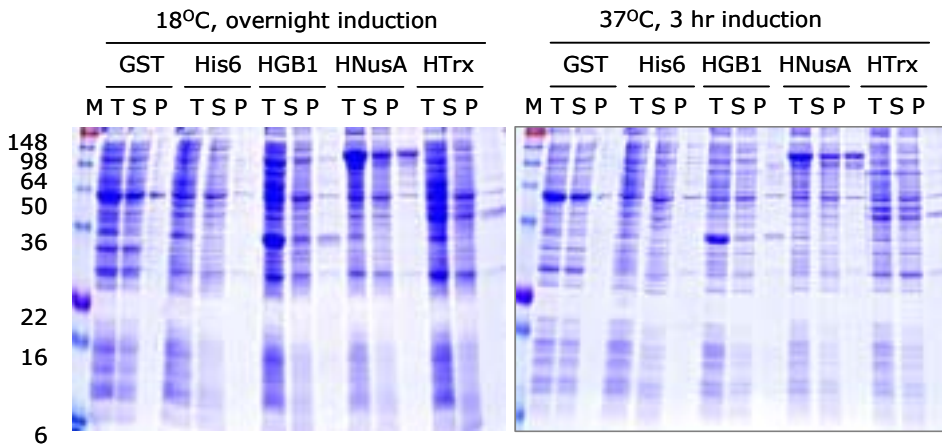
차. Recombinant VIP + INH의 대량생산

Construction이 확인된 pHisTrxchVIP-IINH plasmid를 단백질 발현을 위해 적절한 bacteria host인 G1724 및 G1698 균주에 형질전환을 시켰다. G1724 및 G1698 균주로부터 pHisTrxchVIP-IINH plasmid를 분리하여 제한효소를 이용하여 바람직한 plasmid를 가지고 있는 E. coli를 선발하였다.

pHisTrxchVIP-IINH plasmid를 함유하고 있는 G1724 및 G1698 균주를 RM media에 접종하여 30C shaking incubator에서 16시간 배양을 하였다. RM media에서 배양된 신선한 균주를 Induction media에 접종한 후 37℃ shaking incubator에서 OD550값이 0.5일 때 까지 배양한 후 1시간 간격으로 세포를 회수하였다. E. coli로부터 recombinant VIP의 분리의 최적 조건을 확립하기 위해 회수된 균주를 ultrasonicator를 이용한 whole cell lysis 방법으로 균주를 파괴한 후 단백질을 회수하였다. 또는 회수된 균주를 Osmotic shock method (Osmotic shock solution #1과 #2의 이용)을 통해 단백질을 회수하였다. 회수된 단백질은 SDS-PAGE를 이용하여 E. coli로부터 recombinant VIP의 발현을 확인하기 위해 4-12% gradient SDS-PAGE gel에 loading하여 recombinant VIP의 발현과 induction을 확인하였다. Induction한 후 1시간부터 4시간까지 지속적으로 recombinant VIP의 발현이 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 14-16).

#	Fusion Tag	Fusion Tag Size (KDa)
1	GST -	27.8
2	His6 -	2.2
3	HisGB1 -	11.8
4	HisNusA -	57.5
5	HisTrx -	17.0

Fig. 14. 재조합 단백질의 대량생산을 위한 재조합 단백질 발현백터의 종류



T: total protein
 S: soluble protein
 P: purified protein

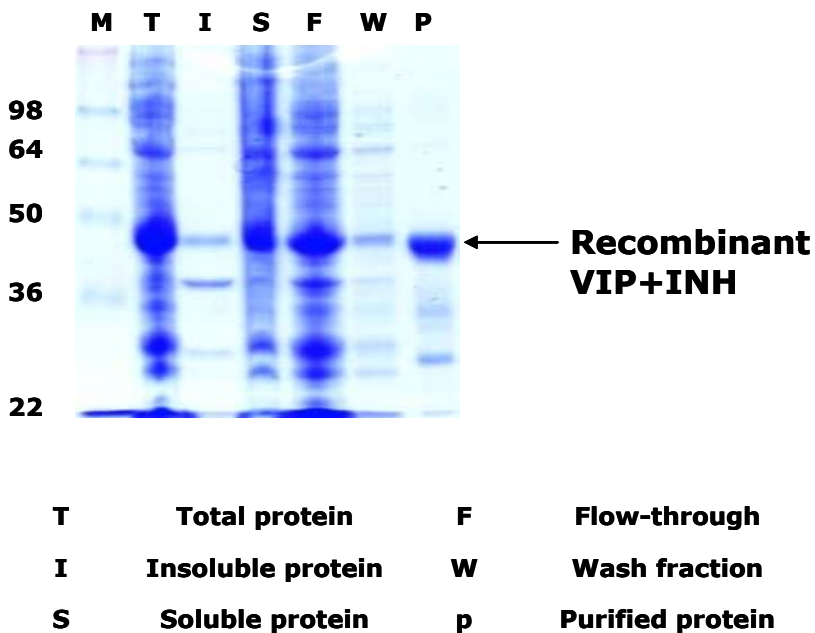
Fusion tag	Estimated Size (kDa, fused)
GST-	51.8
His6-	26.3
HisGB1-	36.0
HisNusA-	81.5
HisTrx-	41.1

Fig. 15. 재조합 단백질 발현백터의 단백질 발현, induction 및 solubility screening

카. Recombinant INH의 정제

위의 Figure 11에서와 같이 재조합 단백질의 생산은 HisTrx-fusion 단백질의 생산이 solubility 및 purification에서 가장 좋았다. 따라서 recombinant INH의 대량 생산을 위해 HisTrx-expression vector를 이용하여 생산하였다. E. coli로부터 분리된 affinity chromatography를 이용한 recombinant INH를 Trx 또는 HisTag Bond resin을 이용한 affinity chromatography를 통한 정제하였다. Affinity chromatography를 통한 정제된 recombinant INH를 SDS-PAGE를 이용하여 INH를 확인하였다 (Fig. 16).

재조합 단백질의 대량 생산



Induction 조건 : 37C, 3시간

Fig. 16. 재조합 단백질의 대량 생산 및 정제

2. VIP and/or INH active immunization을 통한 오골계의 산란능력 관련 내분비 인자의 변화 및 발현 분석

가. 공시동물

충남 논산군 연산면 화악리에서 확보된 한국재래오골계 암컷 120 마리를 대상으로 취소성을 유도할 수 있는 자연방사의 사육환경을 조성하였으며, 매일 일정시간에 채란하여 산란수와 난중을 하여 기록하였다. 체중은 20주령부터 2주 간격으로 측정 후 기록하였다. 오골계 기초계군에 대하여 20주령부터 2주 간격으로 기초계군의 내분비 인자의 발현을 분석하였으며, 성성숙 이후 취소성이 높고 낮은 계군으로 나누어 계군 간 내분비인자의 발현 및 산란능력을 분석하였다. 또한 20주령부터 4주 간격으로 도계를 통하여 조직 내 내분비인자의 발현을 분석하였다.

나. 산란수

Fig. 17에서 나타난 주령별 평균 산란수는 오골계 기초계군의 평균 산란수를 4주 간격의 도계개체수를 감안하여 보정한 것이다. 28주령이후 광주기 조절에 의해 산란 개시가 이루어지면서 34주령까지 주령별 평균산란수가 7.4개로 최고치를 보인 후 점차 감소하였으며 48주령 이후 약간 증가하는 경향을 보여주었다. 이러한 결과는 기존의 보고(강 등, 2000)와 비교해 볼 때 산란 peak가 약 6주정도 앞당겨졌으며, 이는 체성숙이 완료된 후 성성숙이 광주기 조절에 의하여 인위적으로 이루어졌기 때문으로 사료된다. 또한 각 주령별 평균산란수를 기존의 보고(강 등, 2000)와 비교한 결과 개체사육 보다 자연방사 형태로 사육하였을 때 산란수가 더 높은 경향을 보여주었다.

다. 난중성적

Fig. 17에서 나타난 난중은 2주 단위의 주령별로 평균난중을 정리한 것이다. 주령이 증가함에 따라 난중이 조금씩 증가하는 경향을 보였으며, 평균난중은 45.6g으로 기존의 보고(강 등, 2000)와 유사한 결과를 보여주었으나 큰 차이를 확인할 수 없었다.

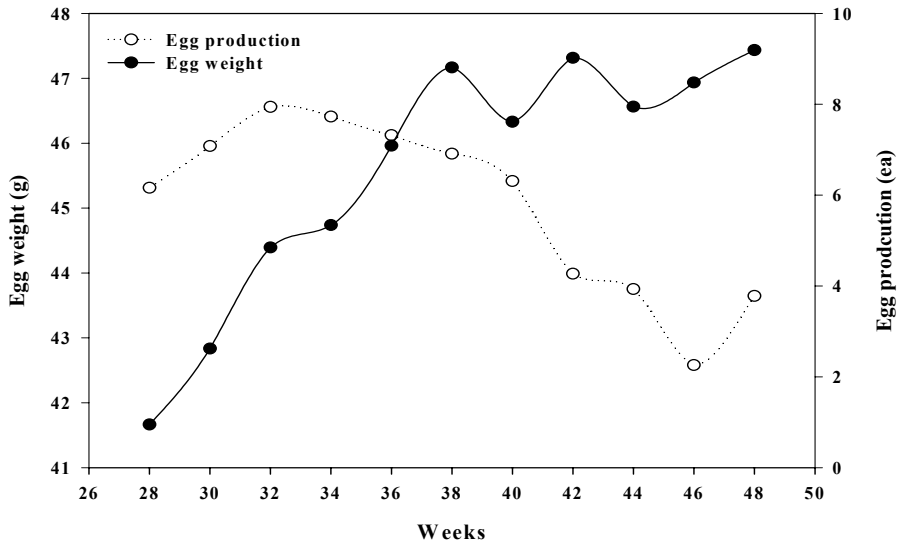


Fig. 17. General egg productivity of Korean Native Ogol Chickens(KNOCs)

라. 체중성적

Fig. 18의 체중은 기초계군의 평균 체중을 주령별로 나타낸 것이다. 주령이 증가함에 따라 체중이 조금씩 증가하는 경향을 보여주었으며, 초기 30주령까지 점차 증가하는 경향을 보였으나 30주령 이후에서는 증체율이 조금씩 감소하는 경향을 보여주었다. 이러한 경향은 난중과 동일한 것으로 기존의 보고(한 등, 1996)에서 제시한 바와 같이 난중이 체중과 정의 상관관계에 있음을 보여준 결과이다.

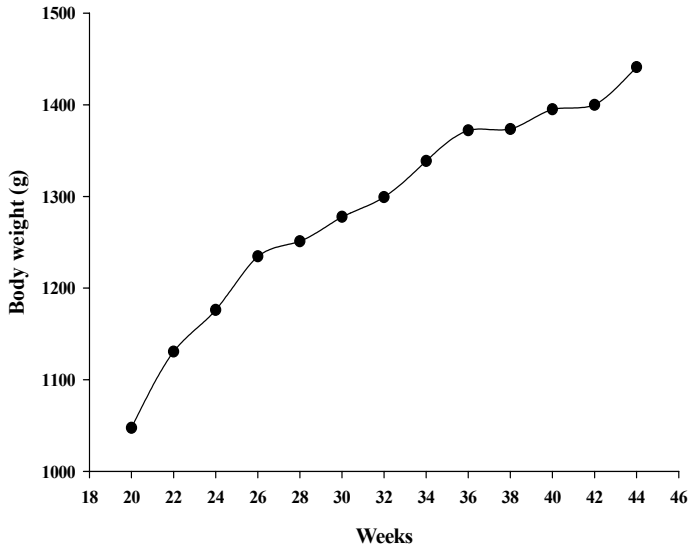


Fig. 18. Body weight of Korean Native Ogol Chickens(KNOCs)

마. 기초계군의 내분비인자 발현

1) 혈중 PRL 의 발현 분석

혈중 PRL의 농도를 측정하기 위하여 [125I] PRL과 polyclonal prolactin 항체를 이용한 방사선 면역측정법을 실시하였다. 재조합 chicken PRL (Pituitary Hormones and Antisera Center, UCLA-Harbor Medical Center, Torrance, CA)과 1mCi Na¹²⁵I(Amersham Pharmacia, U.S.A.)를 chloramine-T 방법을 이용하여, specific activity가 약 60uCi/ug이 되도록 PRL을 iodination시켰다. 준비된 혈청 50ul를 취하여 PRL RIA 완충액(0.05M PBS, 0.02% NaN₃, 0.1% BSA, pH7.4) 및 1:400,000으로 희석된 rabbit anti-chicken PRL polyclonal antiserum(Pituitary Hormones and Antisera Center, UCLA-Harbor Medical Center, Torrance, CA)을 첨가하였으며, 각각의 glass tube에 [125I] PRL 12,000cpm을 첨가하여 4°C에서 24시간 동안 정치시켰다. 정치 후 1:20으로 희석된 goat anti-rabbit IgG antibody (GroPep Pty Ltd., Australia)를 첨가하여 4°C에서 24시간 동안 정치하였다. 침전물을 얻기 위해 1:50으로 희석된 normal rabbit serum을 각각 glass tube에 추가한 후 상온에서 다시 1시간 정치시킨 후 PRL RIA 완충액을 첨가하고 4°C, 3,000×g에서 30분간 원심분리시켜 상층액과 침전물을 분리시켰다. 분리된 상층액을 제거한 후 나머지 침전물에 있는 radioligand의 방사능을 gamma counter (Packard, U.S.A)로 측정하였으며, 측정에 들어간 control serum 및 단백질의 양을 고려하여 농도를 보정하였다. 혈중 PRL 농도는 28주령까지 25.32ng/ml로 낮은 수준을 보이다가 28주령 이후부터 증가하는 경향을 보여주었으며, 34주령에서는 233.36ng/ml까지 증가하였다. 이후 38주령까지 높은 발현을 보인 후 감소하는 경향을 보여주었다 (Figure 15). 광조절에 의한 28주령까지의 혈중 PRL 농도는 기존의 보고(Etches, 1982)와 유사한 경향을 보였으며, 광주기 조절에 의한 28주령 이후의 산란개시에서도 동일한 경향을 보여주었다.

그러나 기존의 보고(Sharp 등, 1981)에서는 PRL 농도가 600ng/ml의 수준을 보여준 반면 본 실험에서는 매일 일정시간에 채란을 실시함으로써 포란 행위를 저해하여, 취소성으로 인해 유도되는 혈중 PRL 농도가 상대적으로 낮아진 것으로 사료된다 (Proudman 등, 1988). 또한 광주기 조절에 의해 일제히 산란개시를 유도하였으나 개체에 따라 성 성숙이 이루어지지 않거나 산란개시가 늦어진 개체의 변이로 인해 혈중 PRL 농도에 있어서도 개체간의 큰 변이차를 보여주었다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 산란 peak에 도달하는 34주령에서 PRL 농도 또한 유의적으로 증가하며, VIP active immunization을 통해 산란수의 증대를 얻기 위해 산란 peak인 34주령을 기준으로 하여 active immunization을 실시하면 유의적인 결과를 얻을 수 있으리라 사료된다.

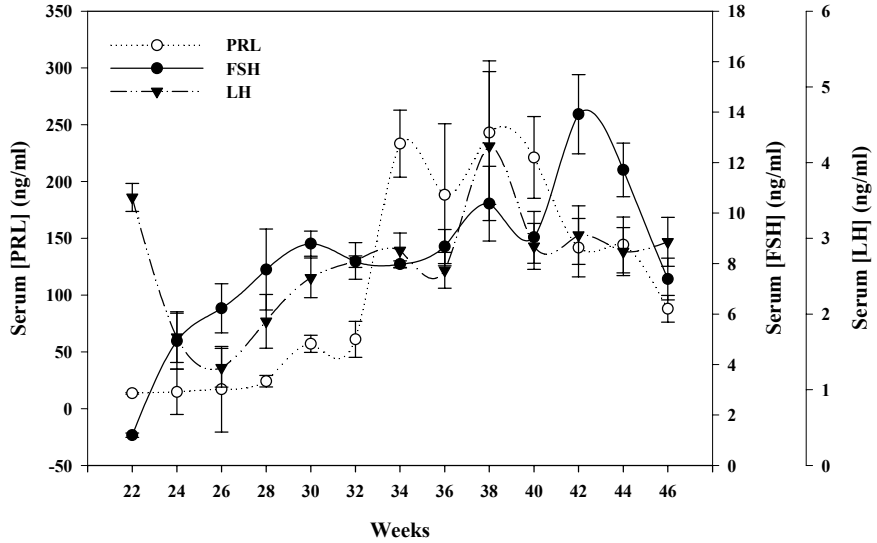


Fig. 19. Serum concentrations of endocrine factors in KNOCs.

2) 혈중 LH 발현 분석

혈중 LH의 농도를 측정하기 위하여 [125 I] LH와 polyclonal LH 항체를 이용한 방사선 면역측정법을 실시하였다. 재조합 rabbit LH (Pituitary Hormones and Antisera Center, UCLA-Harbor Medical Center, Torrance, CA)과 1mCi Na 125 I(Amersham Pharmacia, U.S.A.)를 chloramine-T 방법을 이용하여, specific activity가 약 60uCi/ug이 되도록 LH를 iodination시켰다. 준비된 혈청 5ul를 취하여 LH RIA 완충액(0.04M sodium phosphate, 0.15M NaCl, 0.02% NaN $_3$, 0.01M EDTA, 0.5% BSA, pH7.1) 및 1:1,000,000으로 희석된 guinea pig anti rabbit polyclonal antiserum (Pituitary Hormones and Antisera Center, UCLA-Harbor Medical Center, Torrance, CA)을 첨가하였으며, 각각의 glass tube에 [125 I] LH 12,000cpm을 첨가하여 4°C에서 24시간 동안 정치시켰다. 정치 후 1:30으로 희석된 goat anti-guinea pig IgG antibody (KDMA biotech Inc)를 첨가하여 4°C에서 24시간 동안 정치하였다. 침전물을 얻기 위해 1:100으로 희석된 normal guinea pig serum(Jackson Immuno Research Laboratories, Inc)을 각각 glass tube에 추가한 후 상온에서 다시 1시간 정치시킨 후 LH RIA 완충액을 첨가하고 4°C, 3,000×g에서 30분간 원심분리시켜 상층액과 침전물을 분리시켰다. 분리된 상층액은 제거한 후 나머지 침전물에 있는 radioligand의 방사능을 gamma counter (Packard, U.S.A)로 측정하였으며, 측정에 들어간 control serum 및 단백질의 양을 고려하여 농도를 보정하였다.

Fig. 19에서와 같이 혈중 LH 농도는 약 1ng/ml에서 4ng/ml 정도로 초기에 높은 발현을 보인 후 점차 감소하다가 26주령 이후 다시 증가하는 경향을 보였으며, 이후

38주령까지 최고치로 증가 후 감소하였다. 26주령부터 32주령까지는 FSH와 유사한 경향을 보이며 증가하였으나, 32주령 이후에서는 각 주령마다 FSH와 반대의 경향을 보여주었다. 이는 FSH와 LH의 발현이 각각 생식주기에 있어 난포의 생성과 퇴화에 관여하기 때문이며, 26주령 이후에서는 성성숙 이후의 난포의 성장에 관여하는 FSH와 LH의 발현수준이 동시에 증가한 것으로 사료된다(Groome 등, 1995). PRL과의 비교에서 기존의 보고(You 등, 1995)와 달리 PRL수준의 변화에 따른 LH의 상반적 경향치는 확인할 수 없었으며, 이는 LH의 생리적 주기를 동기화시키지 못했기 때문으로 사료된다.

3) 혈중 FSH 농도 분석

혈중 FSH의 농도를 측정하기 위하여 [¹²⁵I] FSH와 polyclonal FSH 항체를 이용한 방사선면역측정법을 실시하였다. 제조합 rabbit FSH (Pituitary Hormones and Antisera Center, UCLA-Harbor Medical Center, Torrance, CA)과 1mCi Na¹²⁵I(Amersham Pharmacia, U.S.A.)를 chloramine-T 방법을 이용하여, specific activity가 약 60uCi/ug이 되도록 iodination시켰다. 준비된 혈청 5ul를 취하여 FSH RIA 완충액(0.04M sodium phosphate, 0.15M NaCl, 0.02% NaN₃, 0.01M EDTA, 0.5% BSA, pH 7.1) 및 1:75,000으로 희석된 guinea pig anti-rabbit polyclonal antiserum(Pituitary Hormones and Antisera Center, UCLA-Harbor Medical Center, Torrance, CA)을 첨가하였으며, 각각의 glass tube에 [¹²⁵I] FSH 12,000cpm을 첨가하여 4°C에서 24시간 동안 정치시켰다. 정치 후 1:30으로 희석된 goat anti-guinea pig IgG antibody (KDMA biotech Inc)를 첨가하여 4°C에서 24시간 동안 정치하였다. 침전물을 얻기 위해 1:100으로 희석된 normal guinea pig serum(Jackson Immuno Research Laboratories, Inc)을 각각 glass tube에 추가한 후 상온에서 다시 1시간 정치시킨 후 FSH RIA 완충액을 첨가하고 4°C, 3,000×g에서 30분간 원심분리시켜 상층액과 침전물을 분리시켰다. 분리된 상층액은 제거한 후 나머지 침전물에 있는 radioligand의 방사능을 gamma counter (Packard, U.S.A)로 측정하였으며, 측정에 들어간 control serum 및 단백질의 양을 고려하여 농도를 보정하였다.

Fig. 19에서와 같이 혈중 FSH 농도는 초기 낮은 수준을 보이다 점차 증가하였으며 44주령에서 가장 높은 발현을 보여주었다. 혈중 FSH의 발현을 PRL과 비교했을 때 22주령부터 40주령까지의 경향은 기존의 보고와 마찬가지로 상반된 경향을 보여주었으며, 이는 VIP 능동면역법을 통해 PRL 분비를 억제했을 때 FSH의 분비를 촉진할 수 있다는 것을 간접적으로 확인할 수 있었다. 또한 각 주령에서의 혈중 농도가 점차 증가한 것은 시간에 따라 변화하는 생리적 주기나 계절적 변화(Kikuchi 등, 1998)에 의해 FSH의 농도가 점차 증가한 것이 아니라 체성숙과 성성숙으로 인해 생식기관에 작용하는 호르몬 농도가 상대적으로 높아진 것으로 사료된다.

4) 혈중 IGF-I 농도 분석

2주 간격으로 채취된 혈액에서 혈중 IGF-I의 농도를 측정하기 위하여 [¹²⁵I] IGF-I과 polyclonal IGF-I 항체를 이용한 방사선면역측정법을 실시하였다. 재조합 chicken IGF-I(Pituitary Hormones and Antisera Center, UCLA-Harbor Medical Center, Torrance, CA)과 1mCi Na¹²⁵I(Amersham Pharmarcia, U.S.A.)를 chloramine-T 방법을 이용하여, specific activity가 약 300uCi/ug이 되도록 IGF-I을 iodination 시켰다. 각 시료(100ul)들은 400ul acid-ethanol(87.5% ethanol, 12.5% HCl)과 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 4°C에서 1,000×g로 30분간 원심분리하여 IGF-I을 binding protein과 분리시켰다. IGF-I이 함유된 상층액 50ul를 취하여 RIA 완충액(30mM sodium phosphate, 0.02% protamine sulfate, 10mM EDTA, 0.05% Tween-20, 0.02% sodium azide, pH 7.5) 및 1:72,000으로 희석된 rabbit anti-human IGF-I polyclonal antiserum (Pituitary Hormones and Antisera Center, UCLA-Harbor Medical Center, Torrance, CA)을 첨가하였으며, 각각의 glass tube에 [¹²⁵I] IGF-I 15,000cpm을 첨가하여 4°C에서 18시간 동안 정치시켰다. 정치 후 1:20으로 희석된 goat anti-rabbit IgG antibody (GroPep Pty Ltd., Australia)를 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 정치하였다. 침전물을 얻기 위해 1:30으로 희석된 normal rabbit serum을 각각 glass tube에 추가한 후 4°C에서 다시 1시간 정치시킨 후 RIA 완충액을 첨가하고 4°C, 3,000×g에서 30분간 원심분리시켜 상층액과 침전물을 분리시켰다. 분리된 상층액은 제거한 후 나머지 침전물에 있는 radioligand의 방사능을 gamma counter (Packard, U.S.A)로 측정하였으며, 측정에 들어간 control serum 및 단백질의 양을 고려하여 농도를 보정하였다.

Fig. 20에서와 같이 IGF-I 농도는 오골계 기초계군에서의 혈중 IGF-I 농도를 주령별로 나타낸 그림이다. 오골계 기초계군의 혈중 IGF-I 농도는 28주령까지 감소 후 증가하였으며, 34주령까지 최고로 증가 후 다시 감소하는 경향을 보여주었다. 28주령에서 광주기 조절에 의한 성성숙이 이루어지기 전까지 혈중 IGF-I 농도 또한 감소하는 경향을 보여주었으며, 34주령에서 혈중 IGF-I 농도가 최고치를 보인 후 다시 감소하는 경향을 보임으로써 산란수와 동일한 경향을 보여주었다. 이는 강 등(2000)의 보고와 동일한 결과이며 본 실험을 통하여 혈중 IGF-I 농도가 산란수와 정의 상관관계에 있음을 직접적으로 확인할 수 있었다.

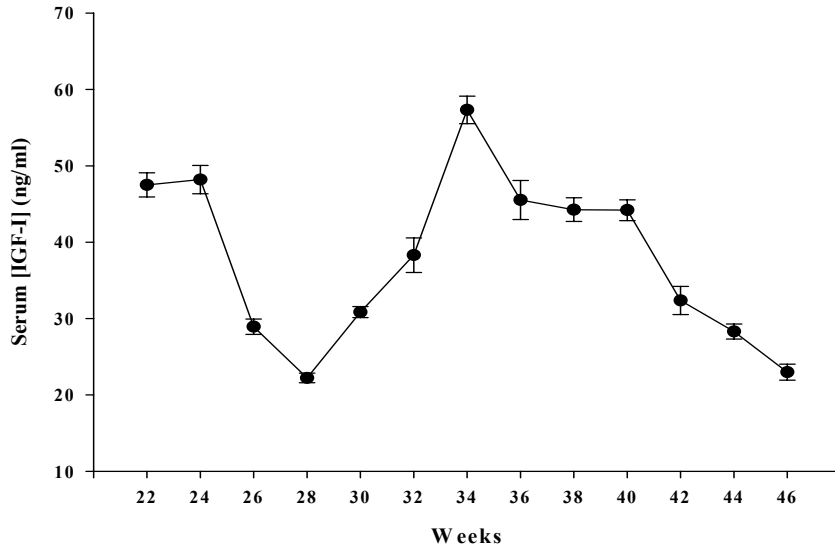


Fig. 20. Serum concentration of IGF-I in KNOCs

5) 시기별 조직(뇌하수체, 난포)내 내분비인자 mRNA 발현 비교

유전자의 발현을 위해 실험에 사용된 오골계를 20주령부터 50주령까지 4주 간격으로 8마리씩 경추분리를 통하여 도계 후 뇌하수체와 난소를 추출하였다. 뇌하수체는 도계 직후 뇌를 절개하여 시상하부 및 뇌를 제거하고 뇌하수체를 추출하였으며 실험 전까지 -70°C 에서 보관하였다. 난소는 도계 후 복강을 절개하여 난소의 형태를 확인 후 핀셋을 이용하여 추출하였으며, 성숙한 난포는 PBS(phosphate buffered saline)를 이용하여 세척한 후 mRNA를 추출하였다.

Total RNA는 Chomzynski와 Sacchi (1987)에 의해 보고된 방법에 따라 guanidine thiocyanate 방법을 변형하여 다음과 같이 실시하였다. -70°C 에 보관중인 sample을 액체질소와 막자사발로 곱게 부순 다음 4M guanidine thiocyanate 용액[25mM sodium citrate, pH 7.0; 0.5% sarcosyl; 0.1M β -mercaptoethanol]을 조직에 첨가하여 균질한 후 2M sodium acetate(pH 4.0) $50\mu\text{l}$, chloroform $120\mu\text{l}$, phenol $700\mu\text{l}$ 을 첨가하여 완전히 혼합하였다. 4°C 에서 20분간 정치한 후 $17,000\times\text{g}$ 에서 10분간 원심분리 하였으며, 상층액을 회수하여 동량의 isopropanol을 첨가한 후 다시 4°C 에서 10분간 정치시켰다. 정치 후 10분간 원심분리하여 RNA를 침전시킨 후 99% ethanol을 첨가하였으며 다시 10분간 원심분리하여 상층액을 제거 후 건조시켰다. DEPC처리된 증류수 $50\mu\text{l}$ 로 RNA 침전물을 녹여 -70°C 에서 보관하였다.

cDNA 합성 후 RNA 분리 및 cDNA의 균일한 합성을 알아보기 위하여 β -actin primer를 이용하여 PCR을 실시하였다. PCR은 10mM Tris-HCl(pH 9.0), 40mM KCl, 1.5mM MgCl_2 1U DNA polymerase, 1mM dNTP가 포함되어 있는

AccuPower™ premix에 10pmole의 primer와 5 μ l의 cDNA를 넣은 후 3차 증류수를 이용하여 총부피를 20 μ l가 되도록 조정하고 GeneAmp PCR system 2400(Perkin Elmer, USA)로 PCR을 실시하였으며, 반응조건과 primer는 Table. 1과 같이 사용하였다.

Table 1. Primer sequences and PCR conditions

	Primer	PCR condition						Cycles	Size(bp)
		Denaturation		Annealing		Extension			
		TE2	T3	TE	T	TE	T		
IGF-I	F 5' GTATGTGGAGACAGAGGCTTC 3' R 5' TTTGGCATATCAGTGTGGCGC 3'	94	0:30	59	0:30	72	0:30	35	200
PRL	F 5' CGCAGAGATTCACAAAAAT 3' R 5' CCTGGTGCTGTACAATGTGG 3'	94	0:30	60	0:30	72	0:30	30	182
LH	F 5' GACTGCACCGTACAGGGATT 3' R 5' ATTACCCCAAAACCCCATAG 3'	94	0:30	55	0:30	72	0:30	30	225
FSH	F 5' TGCAATAGCTGTGAACTGACCAACAT 3' R 5' CCA TTG TGA CTG AAG GAG CAG TA 3'	94	0:30	60	1:00	72	2:00	35	332
β -actin	F 5' TCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGT 3' R 5' CCTAGAAGCATTTGCGGTGCACGATG 3'	94	0:30	57	0:30	72	0:30	30	285

Fig. 21에서와 같이 뇌하수체에서의 PRL mRNA 발현은 24주령에서 약간의 발현을 보였으나 이후 감소하였으며, 40주령에서 PRL mRNA의 발현이 높은 수준을 보였으나 특이적인 경향은 찾을 수 없었다. 기존의 보고(Tong 등, 1998)에 의하면 성성숙 이전과 이후에서 PRL 발현에 유의적인 차이를 보이며, 취소성에 의해서도 유의적인 차이를 보이는 것으로 알려져 있으나, 본 실험에서는 특이적 경향이나 유의적인 차이를 발견하지 못하였다. 이는 자연방사의 사육형태로 인해 산란이 개시된 개체와 초산 일령이 지연된 개체를 구별하지 못하였으며, 계군별로 임의적으로 선발하여 도제하였으므로 개체간의 차이로 인해 PRL mRNA 발현이 특이적 경향을 보이지 못한 것으로 사료된다.

LH mRNA의 발현은 다른 내분비인자들에 비해 발현이 매우 적었으며, 48주령에서 약간의 발현을 확인하였으나 다른 주령에서는 LH mRNA가 거의 발현되지 않았다. 기존의 보고(Ahn 등, 2001)와 마찬가지로 LH의 발현이 다른 내분비인자중 가장 작게 발현되며, 성성숙 및 취소성에 의해 변화하는 LH mRNA의 발현을 확인 할 수 없었다. 또한 LH의 발현은 그 주기가 시간에 따라 변화하기 때문에 동시에 성성숙을 개시하여도 주령이 지남에 따라 각각의 개체별 차이에 따라 생리적 주기가 동기화되지 않은 것으로 사료된다(Knight 등, 1996).

뇌하수체에서의 FSH mRNA 발현 분석 또한 Fig. 21에서 같이 뇌하수체에서의 FSH mRNA의 발현을 각 주령별로 볼 때 28주령에서 약간 높은 발현을 보였으나 모든 주령에서 차이를 발견하지 못하였으며, 특이적 경향은 확인하지 못하였다. FSH나 LH에서는 포유류의 경우 생리주기가 상대적으로 가금에 비해 길며, 이에 따른 FSH 및 LH의 주기 또한 길게 나타난다(Nigel 등, 1996). 그러나 가금의 경우 평균 일일 1

회의 산란으로 인해 포유류에 비해 생리주기가 짧으며, 시간에 따라 변화하는 FSH mRNA의 산란개시의 동일화를 통해 생리주기를 동기화 시키지 못했던 것으로 사료된다. 따라서 차년도 에서는 시간대별 및 일별로 변화하는 FSH의 발현을 측정하기 위해 FSH 분석기간의 단축과 시료 채취 회수증가가 필요하리라 사료된다.

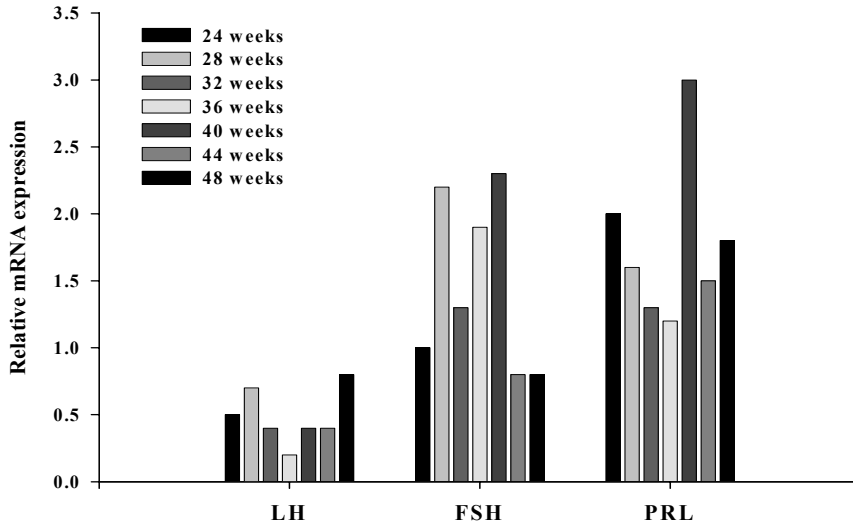


Fig. 21. Messenger RNA expression in pituitary

6) 난포에서의 IGF-I mRNA 발현 분석

Fig. 22에서와 같이 초기 24주령에서 IGF-I mRNA 발현수준이 조금 높은 발현을 보이다 이후 감소하였으며, 성 성숙 전후를 비교해 볼 때 광주기 조절에 의한 성 성숙을 통해 32주령에서 IGF-I mRNA 발현수준이 높아지는 것을 확인 할 수 있었다. 혈중 IGF-I 농도와 비교했을 때 성성숙 전 24주령에서의 mRNA 발현수준이 28주령에 비해 높게 나타남으로써 혈중 IGF-I의 발현과 동일한 결과를 보여주었으며, 성성숙 이후 34주령까지 산란이 증가함에 따라 높아지는 혈중 IGF-I의 발현과도 동일한 경향을 보여주었다. 이는 IGF-I의 발현이 산란의 중요 생식기관인 난소에 작용하여 직접적으로 영향을 미친다는 것을 직접적으로 확인한 것이다(Onagbesan 등, 1999; Williams 등, 1994).

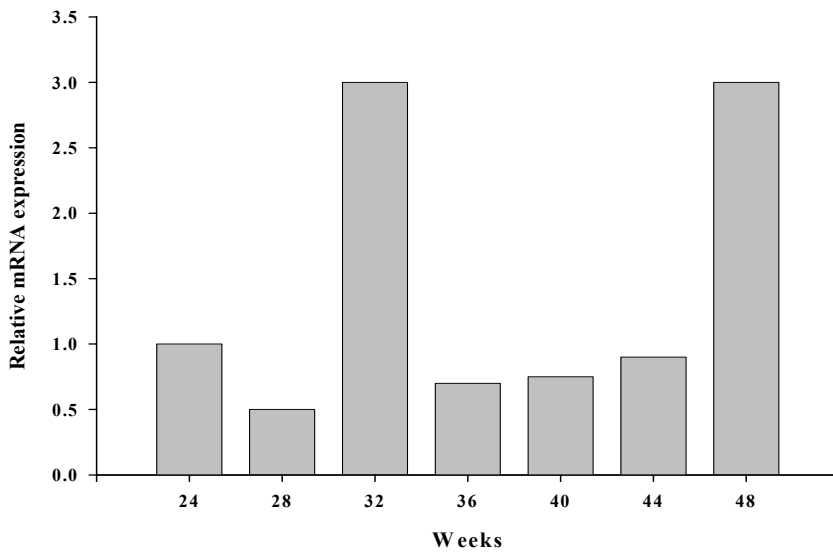


Fig. 22. IGF-I messenger RNA expression in Ovary

7) 성숙시기에 따른 난소와 뇌하수체의 비교

Fig. 23은 성 성숙 전후의 난소와 뇌하수체를 나타낸 것이다. 성 성숙전의 난소는 약 2cm 정도의 손가락 한마디였으며, 뇌하수체는 검정의 피막질로 둘러싸여 약 3mm의 크기를 나타내었다. 28주령 이후 광주기 조절을 통한 성 성숙으로 인해 난포가 성장한 것을 확인 할 수 있었으며, 뇌하수체에서는 성 성숙 전후에 아무런 차이점을 발견하지 못하였다.

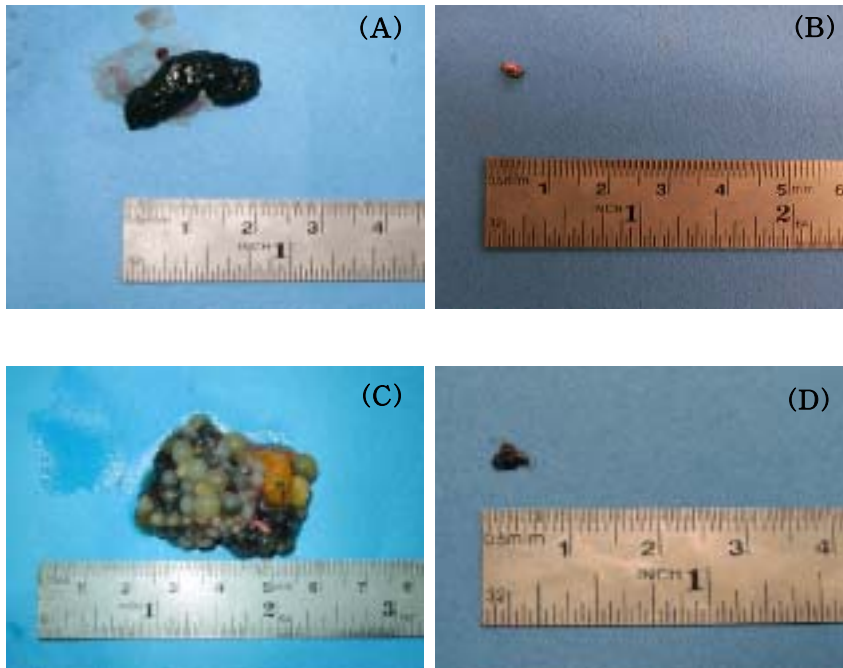


Fig. 23. Comparison of follicular morphology between sexual mature and premature. (A) premature follicle (24 wks), (B) pituitary (24 wks), (C) mature follicle (32 wks), (D) pituitary (32 wks)

바. VIP antibody titer

Fig. 24은 혈중 VIP active immunization에 의한 antibody의 titer 측정을 위해 VIP active immunization을 실시한 계군에 대하여 2주 간격으로 채혈을 실시한 후 ELISA를 통해 혈중 VIP의 발현 변화를 확인하였다. VIP active immunization을 실시한 35, 39, 43, 47주령에서 각각의 혈중 VIP농도는 점진적인 증가양상을 나타내었으며, VIP active immunization이 완료된 52주령의 VIP antibody 농도는 active immunization 이전 (30주령)의 농도보다 4배정도 증가됨을 확인 할 수 있었다

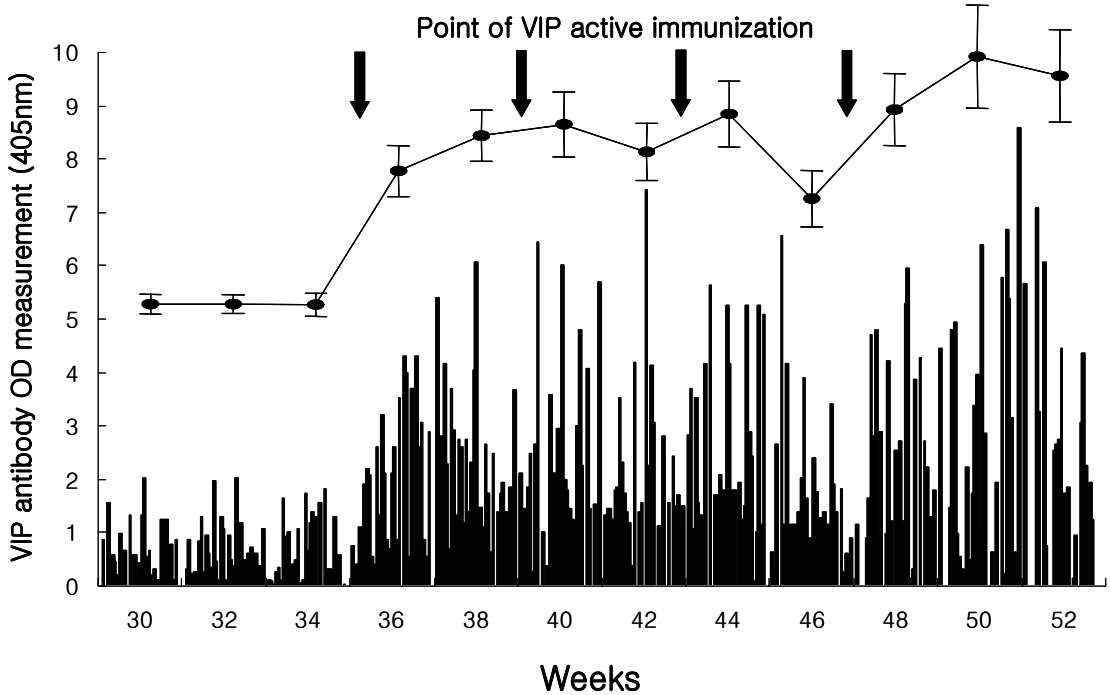


Fig. 24. Antibody titer of VIP

사. VIP-immunized 계군과 대조군과의 내분비인자 발현

1) 혈중 PRL 농도 분석

Figure 25은 혈중 PRL 농도는 산란개시(30주령) 이후부터 VIP active immunization된 계군과 대조군 모두에서 증가하는 경향을 보였으며, 산란 peak를 보이는 46주령에서 최대 발현을 나타내었다. 이후 PRL의 발현 양상은 급격히 감소하였으나, 대조군의 경우 48주령 이후부터 발현이 증가한 반면 VIP immunized 계군에서는 PRL 발현이 증가하지 않았다. 이는 4차에 걸친 VIP active immunization의 효과로 인해 PRL의 발현이 억제되었기 때문인 것으로 사료된다.

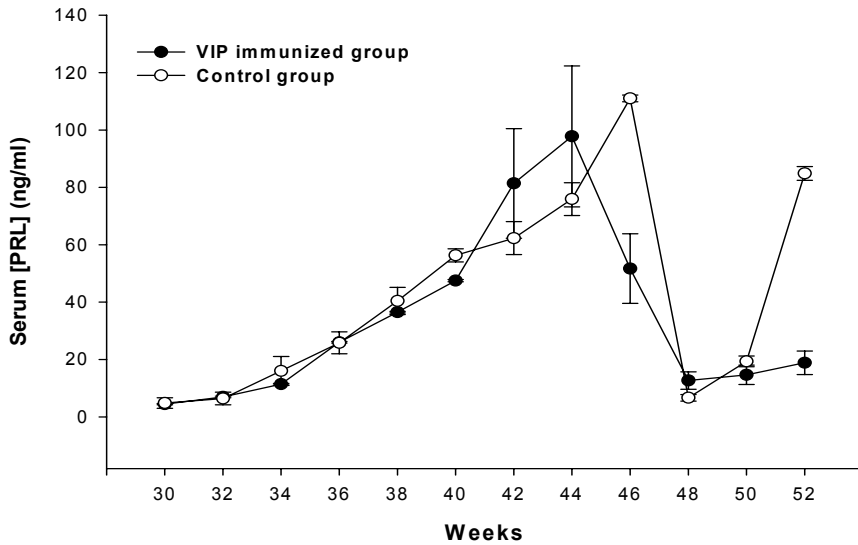


Fig. 25. Comparison of serum PRL concentrations between VIP-immunized and control group

2) 혈중 FSH 농도 분석

Fig. 26에 보는 바와 같이 혈중 FSH의 발현은 산란개시(30주령) 이후 증가하는 경향을 보여주었으며, 산란 peak인 46주령까지 최대로 증가하는 경향을 보였다. 이후 산란의 감소와 더불어 FSH의 발현도 감소하는 경향을 보였으나 50주령 이후 대조군에서는 FSH 발현의 변화가 크게 나타나지 않은 반면 VIP immunized 계군에서는 발현이 크게 증가하였다. 이는 PRL의 발현 양상과 대조적인 결과로써 Ahn 등(2001)의 보고와 같이 VIP active immunization에 의한 PRL 조절을 통해 FSH의 발현이 증가되었기 때문인 것으로 생각된다. 또한 35주령 이후 VIP active immunization을 실시한 35, 39, 43, 47 주령에서 FSH의 농도가 증가되는 양상을 나타내었으며 이를 통해 VIP active immunization이 PRL의 발현을 조절함으로써 FSH의 발현을 직접적으로 조절할 수 있음을 확인할 수 있었다.

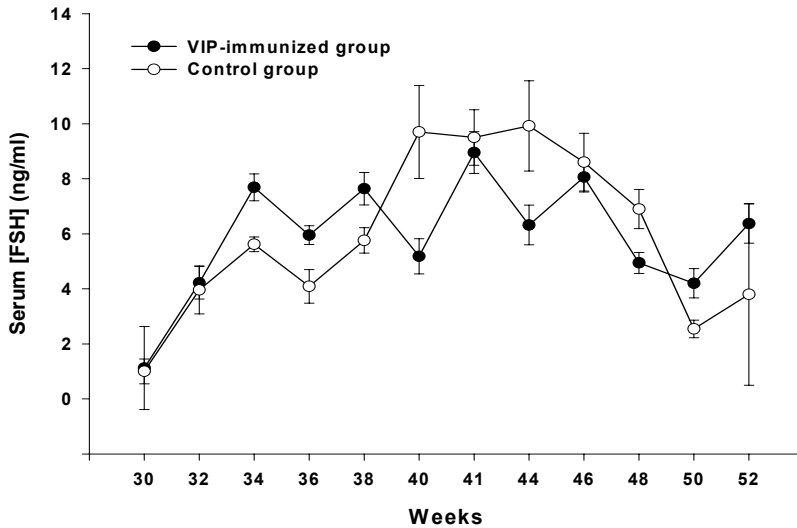


Fig. 26. Comparison of serum FSH concentrations between VIP-immunized and control group

3) 혈중 LH 농도 분석

Fig. 27는 혈중 LH 농도는 40주령에서 높은 발현을 보인 후 48주령까지 감소하는 양상을 나타내어 혈중 FSH 농도와 반대의 경향을 보였다. 또한 48주령 이후 VIP-immunized 계군은 50주령까지 LH 농도가 증가된 후 다시 감소하였으나, 대조군은 지속적인 증가 양상을 나타내었다. 이는 VIP active immunization에 의해 50주령 이후 FSH의 발현이 조절되어 혈중 FSH 농도와 상반된 결과를 나타낸 것으로 사료된다. 일반적으로 VIP에 의해 PRL의 분비가 증가되면 LH의 분비는 감소되는 것으로 알려져 있으며(Sharp 등, 1998), 본 실험에서도 40주령 이후 LH의 감소는 PRL의 발현 증가가 그 원인인 것으로 사료된다.

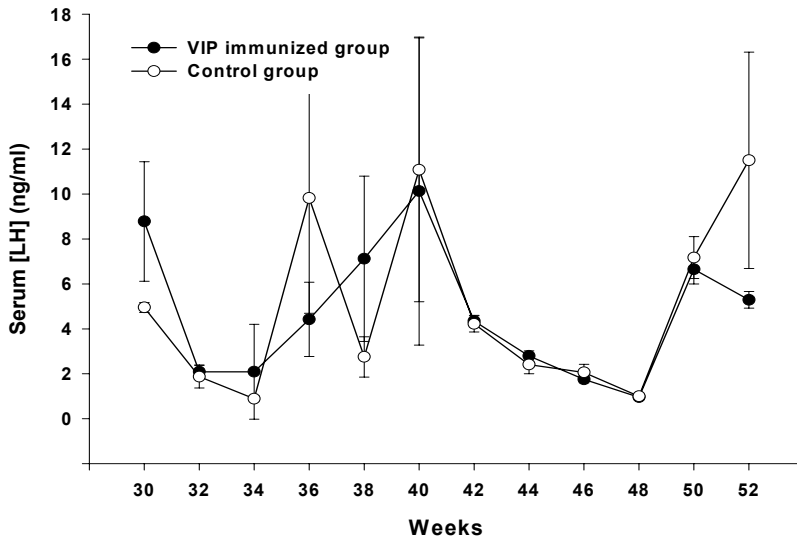


Fig. 27. Comparison of serum LH concentrations between VIP-immunized and control group

4) 혈중 IGF-I 농도 분석

Fig. 28은 혈중 IGF-I 농도는 VIP-immunized 계군과 대조군 모두에서 산란개시(30주령) 이후 증가하여 36주령에서 가장 높은 발현을 나타내었다. 이후 점차 감소하는 경향을 나타내었으며, VIP-immunized 계군과 대조군 사이의 차이는 나타나지 않았다. 이는 IGF-I의 발현이 산란초기에 집중되어 초기 산란형질을 조절하고 상대적으로 산란 후기에는 그 영향이 미약하기 때문인 것으로 생각된다.

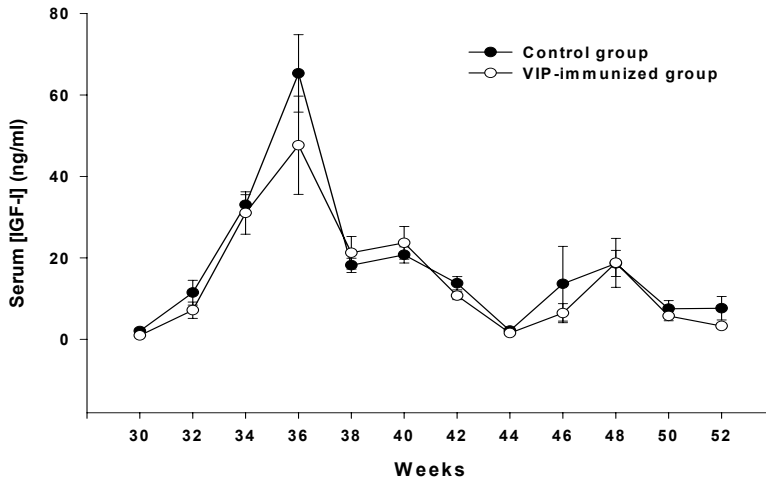


Fig. 28. Comparison of serum IGF-I concentrations between VIP-immunized and control group

아. 조직(뇌하수체, 난포)내 내분비인자 mRNA 발현 비교

1) 뇌하수체에서의 내분비인자 mRNA 발현 분석

뇌하수체에서 VIP mRNA의 발현을 분석한 결과 VIP-immunized 계군에서 대조군에 비해 유의적으로 높은 발현을 나타내었으며, 이는 VIP active immunization이 직접적으로 조직내 내분비인자의 발현 조절 효과를 가지기 때문인 것으로 생각된다.

PRL mRNA의 발현은 VIP-immunized 계군이 대조군에 비해 낮은 양상을 나타내어 성성숙 전후에 PRL의 발현이 유의적인 차이를 보이며 취소성에 의해서도 유의적인 차이를 보인다는 기존의 보고(Tong 등, 1998)와 일치하는 경향을 나타내었다. 이와 같은 결과는 VIP active immunization이 조직내 발현 조절 효과를 나타내어 PRL의 발현을 조절하였기 때문인 것으로 사료된다.

VIP active immunization에 따른 혈중 FSH의 농도와 유사하게 뇌하수체에서의 FSH mRNA 발현 또한 PRL의 발현과 상반된 결과를 나타내어 VIP active immunization에 의해 발현이 조절되는 PRL이 FSH의 발현에 직접적으로 영향을 보임을 확인할 수 있었다 (Fig. 29).

LH mRNA의 발현은 기존의 보고(Ahn 등, 2001)와 동일하게 다른 내분비인자들에 비해 그 발현이 매우 적었으며, 특이적 경향을 확인할 수 없었다.

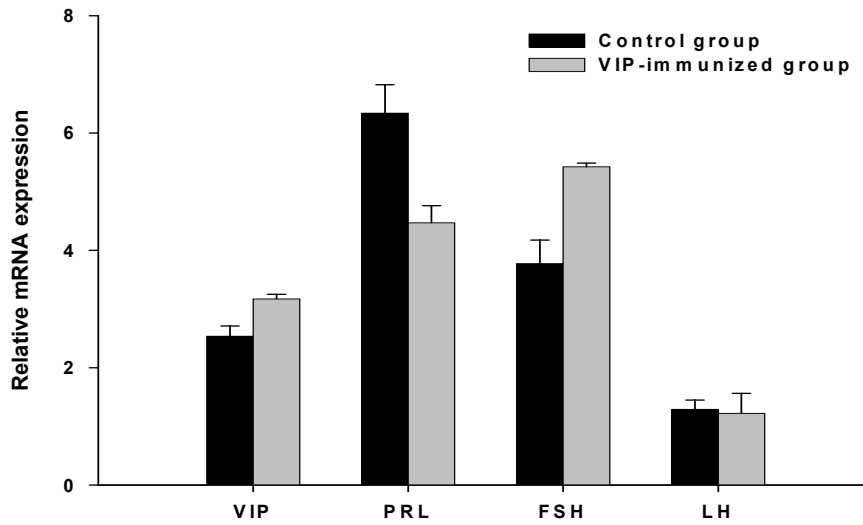


Fig. 29. Messenger RNA expression in pituitary

2) 난포에서의 IGF-I mRNA 발현 분석

Fig. 30에서 난포내 IGF-I의 발현은 계군간의 차이를 보이지 않았으며, 혈중 IGF-I의 발현이 산란초기에는 많이 관여하였으나 이후에는 큰 차이를 보이지 않는 경향과 유사하게 52주령 이후 도계를 통한 조직내 IGF-I의 발현에서도 차이를 발견하지 못하였다.

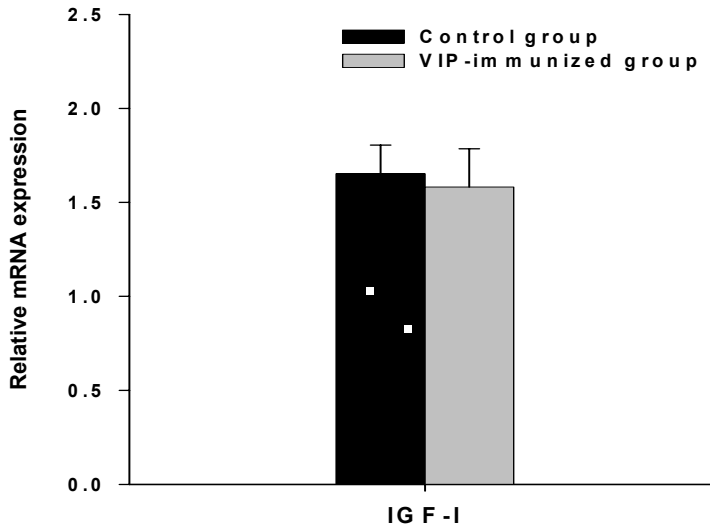


Fig. 30. IGF-I messenger RNA expression in Ovary

3) VIP antibody titer

혈중 VIP active immunization에 의한 antibody의 titer 측정을 위해 VIP active immunization을 실시한 계군에 대하여 2주 간격으로 채혈을 실시한 후 ELISA를 통해 혈중 VIP의 발현 변화를 확인하였다. VIP active immunization은 44, 48, 52, 56주령에서 각각 실시하였으며, 혈중 56주령 이후 VIP농도는 감소하지 않는 양상을 보였다 (Fig. 31).

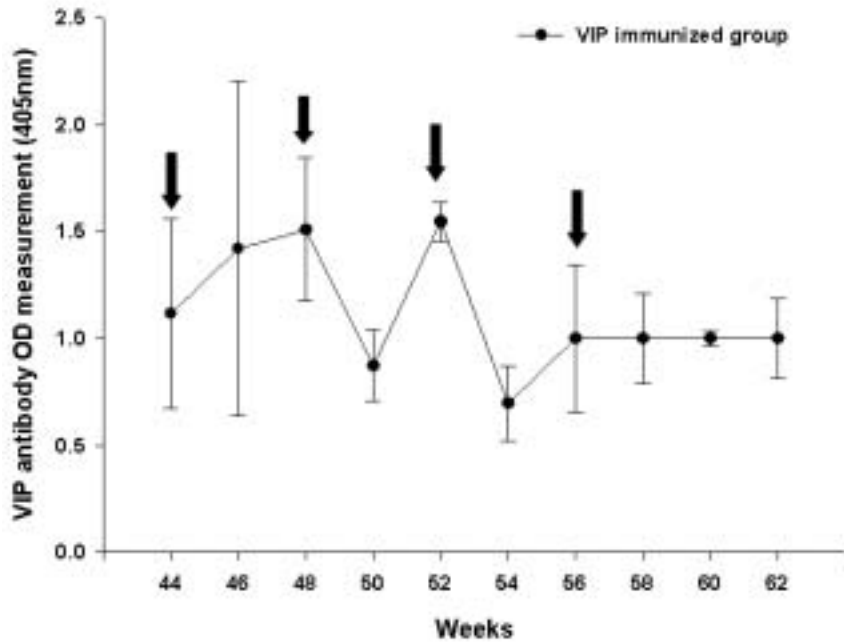


Fig. 31. Antibody titer of VIP

4. 사양환경에 따른 VIP immunized 계군, INH immunized 계군 그리고 대조군과의 내분비인자 발현

가. 혈중 PRL 농도 분석

Fig. 32에서 혈중 PRL 발현은 산란개시부터 대조군, INH immunized 계군, 그리고 VIP immunized 계군 모두에서 증가하는 경향을 보였으며, 산란 peak시기에 최대 발현을 나타내었다. 이후 PRL의 발현 양상은 감소하였으나, 대조군의 경우 54주령에서 PRL이 다시 상승하였으며, 62주령에서는 감소하였다. 하지만 INH immunized 계군과 VIP immunized 계군의 경우 52주령에서 PRL이 각각 증가하였으나, 60주령 이후 VIP immunized 계군에서는 PRL이 감소한 반면 INH immunized 계군은 다시 증가하는 양상을 보였다. 이는 4차례에 걸친 VIP active immunization의 효과로 인해 PRL의 발현이 억제되었기 때문인 것으로 사료된다.

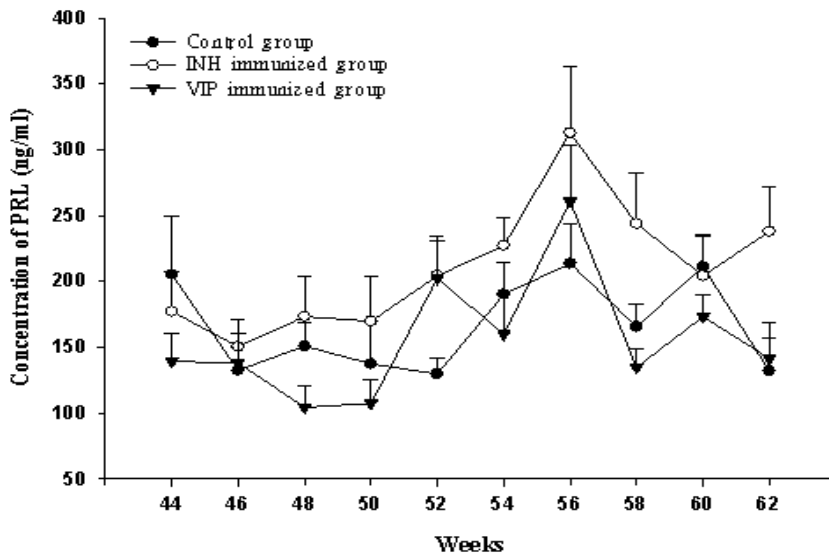


Fig. 32. Comparison of serum PRL concentrations between VIP immunized group , INH immunized group and control group

나. 혈중 FSH 농도 분석

Fig. 33에서 혈중 FSH의 발현은 산란개시 이후 증가하는 경향을 보여주었으며, 산란 peak에서 최대로 발현하는 경향을 보였다. 이후 산란의 감소와 더불어 FSH의 발현도 감소하는 경향을 보였으며, 50주령 이후 대조군에서는 FSH 발현의 변화가 있었던 반면 INH immunized 계군과 VIP immunized 계군에서는 발현의 차이가 없었다.

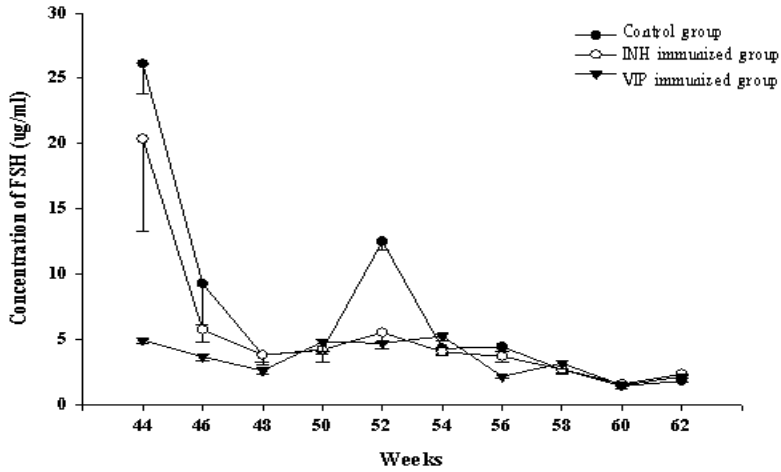


Fig. 33. Comparison of serum FSH concentrations between VIP immunized group, INH immunized group and control group

다. 혈중 LH 농도 분석

Fig. 34에서 혈중 LH 발현은 44주령과 48주령에서 높은 발현을 보인 후 감소하는 양상을 나타내었다. 하지만 대조군과 INH immunized 계군 58주령 이후 62주령까지 각각의 계군에서 LH의 발현이 증가하는 양상을 보였다. 이에 반하여 VIP immunized 계군은 60주령까지 발현이 증가된 후 다시 감소하는 양상을 나타내었다. 이는 VIP active immunization에 의해 60주령 이후 FSH의 발현이 조절되어 다른 계군과 다른 결과를 나타낸 것으로 사료된다. 일반적으로 VIP에 의해 PRL의 분비가 증가되면 LH의 분비는 감소되는 것으로 알려져 있으며(Sharp 등, 1998), 본 실험에서도 60주령 이후 LH의 감소는 PRL의 발현 증가가 그 원인인 것으로 사료된다.

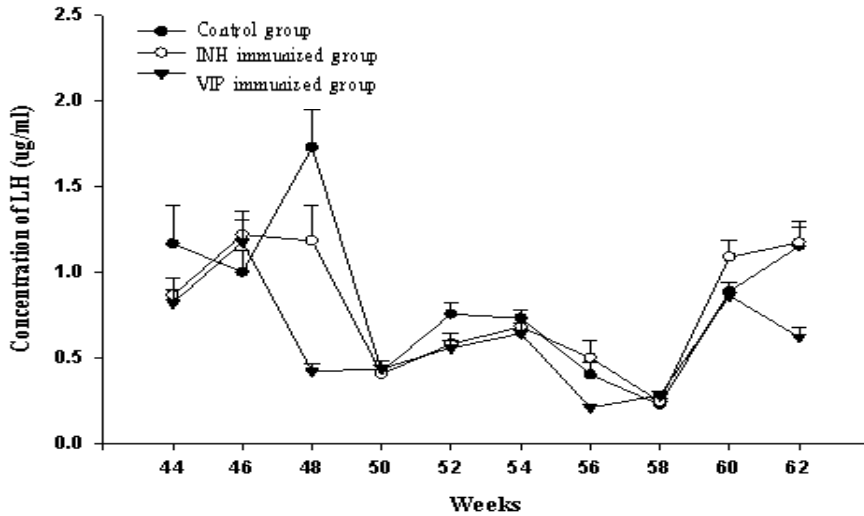


Fig. 34. Comparison of serum LH concentrations between VIP immunized group, INH immunized group and control group

라. 혈중 IGF-I 농도 분석

Fig. 35에서 혈중 IGF-I 발현은 각계군 모두에서 산란 peak시기에서 높은 발현을 나타낸 이후 점차 감소하는 경향을 나타내었으며, VIP immunized 계군과 대조군 사이의 차이는 나타나지 않았다. 하지만 60주령대 INH immunized group에서 증가 후 감소하는 경향을 보였다. 이는 IGF-I의 발현이 산란초기에 집중되어 초기 산란형질을 조절하고 상대적으로 산란 후기에는 그 영향이 미약하기 때문인 것으로 생각된다.

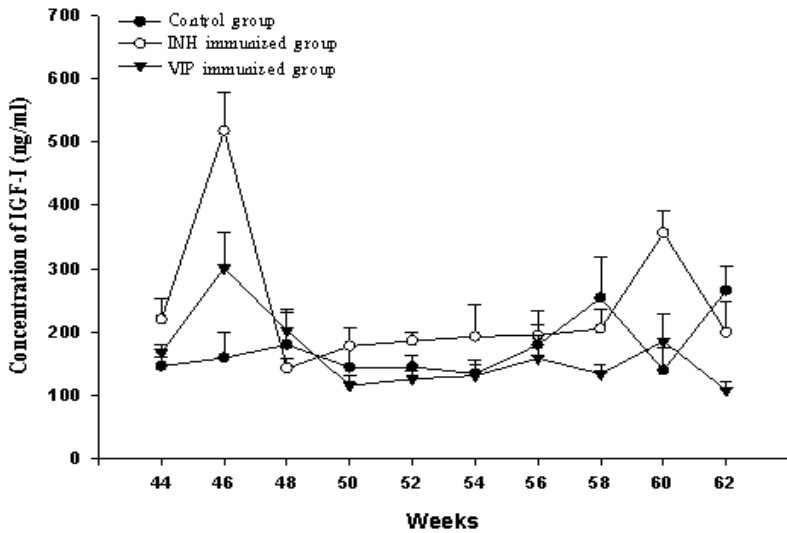


Fig. 35. Comparison of serum IGF-I concentrations between VIP immunized group, INH immunized group and control group

5. 조직(뇌하수체, 난포)내 내분비인자 mRNA 발현 비교

가. 뇌하수체에서의 내분비인자 mRNA 발현 분석

Fig. 36은 뇌하수체에서 VIP mRNA의 발현을 분석한 결과 대조군, INH immunized 계군, 그리고 VIP immunized 계군 모두 차이를 발견할 수 없었다. 또한 다른 내분비인자 역시 발현에 차이를 보이지 않았다. 이와 같은 결과는 VIP/INH active immunization이 개체사육으로 인해서 내분비인자의 발현조절 효과를 보이지 않는 것으로 사료된다.

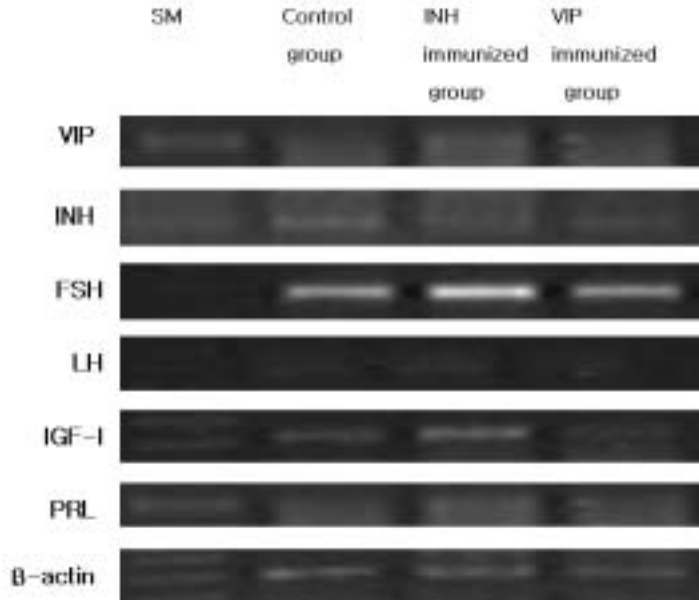


Fig. 36. Messenger RNA expression in pituitary

나. 난포에서의 내분비인자 mRNA 발현 분석

Fig. 37은 난포내 mRNA의 발현을 분석한 것이다. IGF-I의 발현은 각 계군간 차이를 보이지 않았으며, 혈중 IGF-I의 발현이 산란초기에는 많이 관여하였으나 이후에는 큰 차이를 보이지 않는다는 경향과 유사하게 62주령 이후 도계를 통한 조직내 IGF-I의 발현 차이를 발견하지 못하였다. 또한 PRL의 발현에 있어서도 차이점이 없었다.

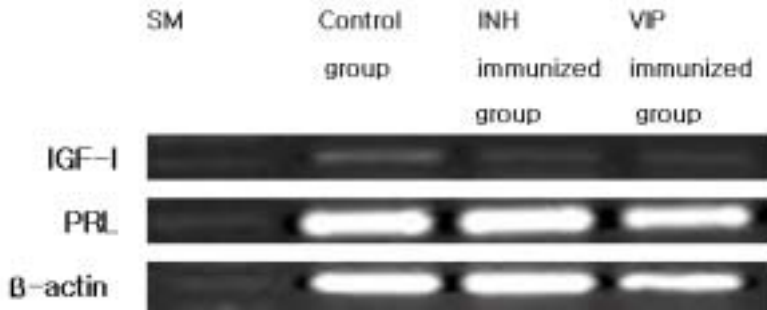


Fig. 37. IGF-I messenger RNA expression in Ovary

6. VIP and/or INH active immunization 계군에서의 유전능력 분석

가. 공시동물 및 기초계군에 대한 산란 성적

충남 논산군 연산면 화악리에서 확보된 한국재래오골계 20주령의 암컷 120마리를 기초로 2주마다 체중을 기록하였으며, 28주령에서 성성숙 이후 매일 일정시간에 채란하여 난중과 산란수를 기록하였다. 오골계의 취소성에 의한 내분비인자의 발현을 분석하기 위하여 자연방사의 사육조건을 확립하였으며, 20주령부터 28주령까지는 광주기를 8L:16D로 하고 28주령 이후에는 광주기를 16L:8D로 하여 성성숙을 유도하였다.

Table 2은 한국재래오골계 기초계군에 대한 산란수, 난중, 체중을 나타낸 표이다. 주령별 평균 산란 수는 34주령까지 증가 후 감소하는 경향을 보여주었으며, 난중에서는 주령이 증가할수록 점차 증가하다가 40주령에서 최고치를 보인 후 50주령까지 유지되는 경향을 보였다. 또한 체중은 주령에 따라 점차적으로 증가하는 경향을 보여주었다. 성성숙은 체성숙이 완전히 이루어진 28주령에서 광주기를 이용하여 일제히 이루어져 동일한 시점에서 모든 개체의 성성숙이 이루어질 것으로 사료되었으나 개체간의 차이로 인해 성성숙일령의 동기화를 유도하지 못하였다. 또한 자연방사형태의 사육형태로 인해 개체별 초산일령과 산란수를 확인하지 못하였다. 강 등(2000년)이 보고한 한국재래오골계의 산란능력과 비교했을 난중과 체중에서는 유사한 결과를 보였으나 산란수에서는 기존의 보고에서 연간 146개의 산란수를 보인 반면 본 실험에서는 연간 185개로 추정되었다. 이는 오골계가 현재까지 선발이나 인공수정에 의해 개량되지 않은 야생종으로 자연방사형태의 사육환경에서 더 높은 산란수를 보이며, 야생성의 사육환경에 더 잘 적응하는 것으로 사료된다. 또한 기존의 보고에서는 주령이 증가함에 따라 산란수도 증가하였으나, 본 실험에서는 감소하는 경향을 보였으며, 이는 계절적으로 하절기의 heat stress 때문인 것으로 사료된다.

Table 2. General performances in KNOC

Weeks	KNOC		
	Egg weight(g)	Egg production(ea)	Body weight(g)
20	-	-	982.75
22	-	-	1047.28
24	-	-	1130.66
26	-	-	1176.00
28	-	-	1234.59
30	41.66	6.16	1250.95
32	42.84	7.08	1277.62
34	44.39	7.94	1299.25
36	44.74	7.73	1338.57
38	45.96	6.79	1372.05
40	47.17	6.41	1373.43
42	46.33	5.39	1395.02
44	47.31	3.65	1399.90
46	46.56	3.07	1441.12
48	46.93	2.55	-
50	47.43	2.68	-

나. 계군간 평균 산란수 비교

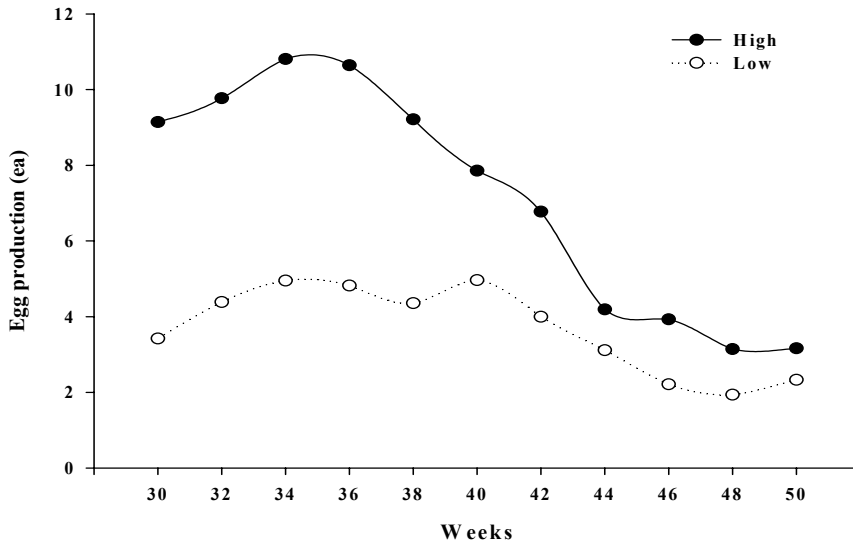


Fig. 38. Comparison of egg production between high and low group with incubation behavior.

Fig. 38은 28주령에서 30주령까지 취소성을 기준으로 선발한 계군간의 평균 산란수를 주령별로 나타낸 그림이다. 초기에 높은 취소성을 나타낸 계군에서는 다른 계군에 비해 산란수가 높게 나타났으며, 34주령에서 최고를 보인 후 감소하였다. 취소성이 낮은 계군에서도 34주령까지 산란수가 증가하였으며 40주령이후 감소하는 경향을 보여주었다. 취소성이 높은 계군임에도 산란수가 높은 것은 매일 일정시간에 알을 치워 줌으로써 다음 산란이 개시될 수 있는 환경을 만들어주었기 때문이며 취소성이 낮은 계군에서도 동일한 사육환경을 조성하였으나, 개체별 초산일령에 따른 변이차로 인해 초기 산란수에서 큰 차이를 보인 것으로 사료된다.

다. 계군간 평균난중 비교

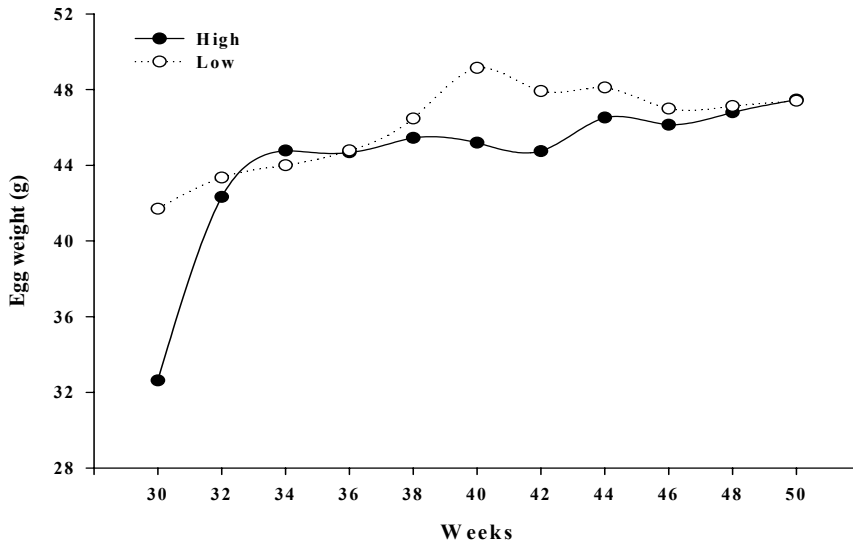


Fig. 39. Comparison of egg weight between high and low group with incubation behavior.

Fig. 39는 28주령에서 30주령까지 취소성을 기준으로 선발한 계군간의 평균 난중을 주령별로 나타낸 그림이다. 산란수에서는 계군간의 유의적인 차이를 보인 반면 난중에서는 계군 간 차이를 확인할 수 없었다. 이는 오폭계가 산란계로 개량되지 않은 난육겸용종이며, 개체에 따른 산란수의 차이는 있으나 난중에서는 그 차이를 보이지 않는 것으로 사료되며, 본 연구에서 산란능력 향상에 능동면역법을 이용하였을 때 산란수의 변화에 따른 난중의 변화는 크지 않을 것으로 사료된다.

라. 계군간 평균체중 비교

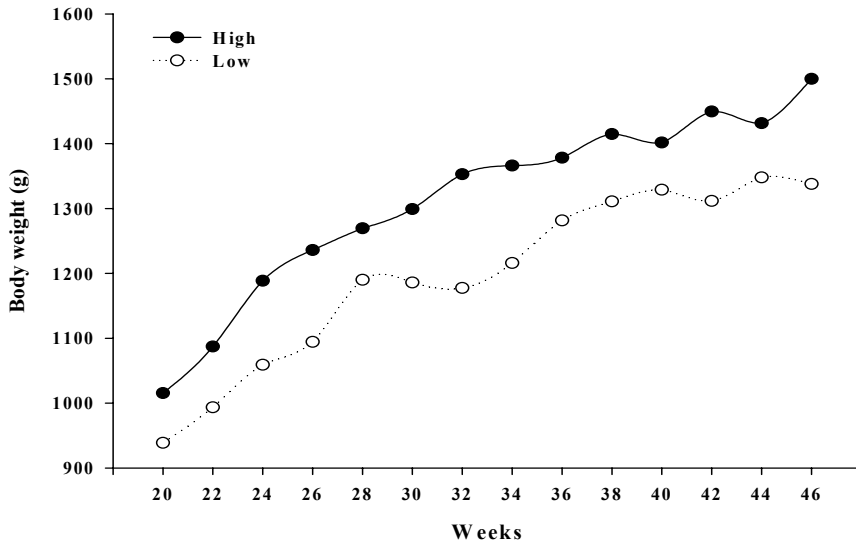


Fig. 40. Comparison of body weight between high and low group with incubation behavior.

Fig. 40은 28주령에서 30주령까지 취소성을 기준으로 선발한 계군간의 평균 체중을 주령별로 나타낸 그림이다. 모든 계군에서 주령이 증가 할수록 체중도 증가하는 경향을 보였으며, 취소성이 높은 계군이 낮은 계군에 비해 높은 평균체중을 나타내었다. 또한 취소성이 낮은 계군에서는 산란수의 peak를 보이는 32주령부터 34주령까지 평균체중이 약간 감소하였으나, 취소성이 높은 계군에서는 이러한 경향을 확인 할 수 없었다. 이는 자연방사형태의 사육환경으로 인해 개체간의 경쟁에서 형질이 우수한 개체가 더 높은 체중을 나타내는 것으로 사료된다.

마. 계군간 혈중 PRL 발현 분석

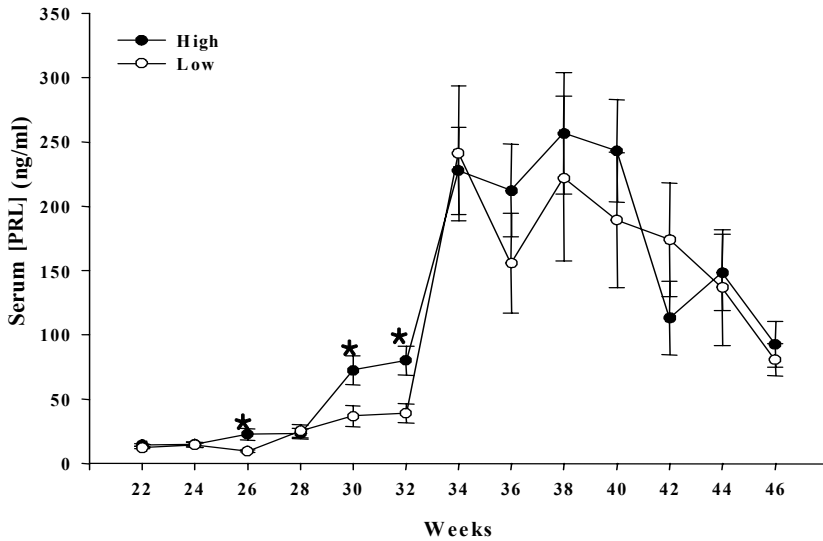


Fig. 41. Comparison of serum PRL concentrations between high and low group with incubation behavior.

* Indicates the mean differed ($P < 0.05$)

Fig. 41은 28주령에서 30주령까지 취소성을 기준으로 선발한 계군간의 평균 PRL 농도를 주령별로 나타낸 그림이다. 혈중 PRL 농도는 모든 계군에서 유사하게 28주령 이후 증가하였으며 34주령에서는 성성숙 이전에 비해 10배 이상 증가하여, 이후 38주령까지 높은 발현을 보인 후 감소하였다. 계군간의 비교에서는 32주령까지 높은 취소성을 보인 계군에서 혈중 PRL 농도가 더 높았으며, 각각 26주령, 30주령 32주령에서 유의적인 차이를 나타내었다($P < 0.05$). 그러나 34주령 이후에서는 특이적인 경향을 발견할 수 없었으며 유의적 차이 또한 발견되지 않았다. 이는 기존의 보고(Sharp 등, 1998)와 마찬가지로 본 실험에서도 취소성에 의한 선발을 통해 혈중 PRL과 취소성이 직접적으로 연관되어 있음을 확인한 것이며, 34주령 이후에서는 초산일령이 낮은 개체들이 산란을 개시함으로써 유의적인 차이를 나타내지 않은 것으로 사료된다.

바. 계군간 혈중 FSH 발현 분석

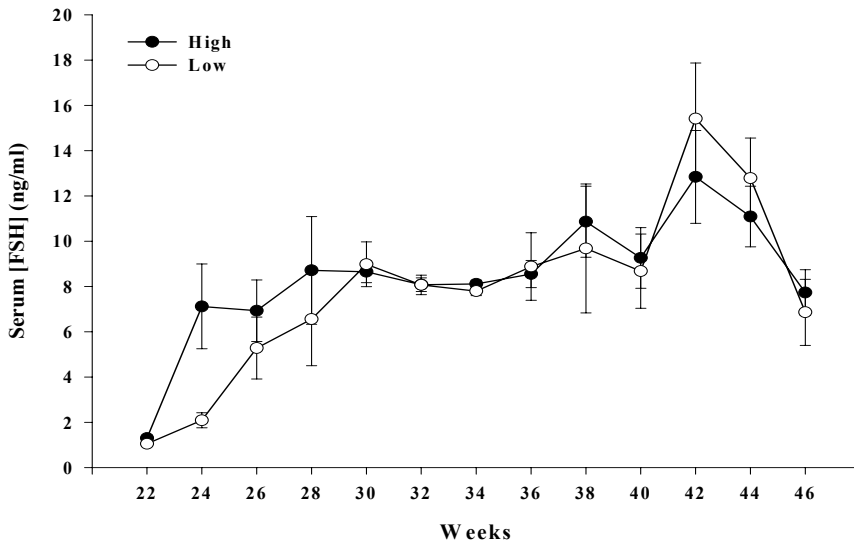


Fig. 42. Comparison of serum FSH concentration between high and low group with incubation behavior.

Fig. 42는 28주령에서 30주령까지 취소성을 기준으로 선발한 계군간의 평균 FSH 농도를 주령별로 나타낸 그림이다. 성성숙 이전인 28주령까지는 높은 취소성을 보인 계군이 상대적으로 높은 발현을 보였으나 성성숙 이후에는 특이적 경향이나 차이를 발견할 수 없었다. 또한 PRL과의 비교에서도 혈중 PRL 발현에 따른 FSH의 특이적 경향을 발견하지 못하였으며(Ohkawa, 1990), 이는 광주기 조절을 통한 성성숙 이후 초산일령이 빠른 개체에서 더 높은 취소성을 보이게 되고, 혈중 FSH의 발현이 상대적으로 많았던 개체들이 높은 취소성을 보이는 high group으로 선발되었기 때문으로 사료된다.

사. 계군간 혈중 LH 발현 분석

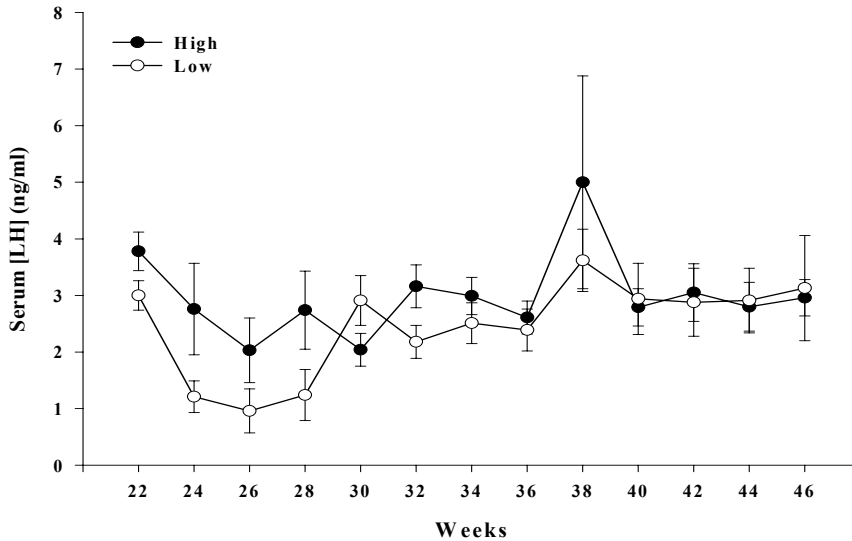


Fig. 43. Comparison of serum LH concentration between high and low group with incubation behavior.

Fig. 43은 28주령에서 30주령까지 취소성을 기준으로 선발한 계군간의 평균 LH 농도를 주령별로 나타낸 그림이다. 거의 모든 주령에서 높은 취소성을 나타낸 계군이 낮은 취소성을 보인 계군에 비해 높은 발현을 보여주었으며, 특히 28주령 이전에서 큰 차이를 보여주었다. 그러나 성성숙 이후에서는 FSH와 유사하게 PRL과 비교하여 특이적 경향이나 유의적 차이를 발견하지 못하였으며, 이는 기존의 보고와 같이 생리 주기에 있어 배란을 유도하는 LH surge를 제외한 시점에서는 별다른 차이를 보이지 않는 것으로 사료된다(Vanmontfort 등, 1994; Muttukrishna 등, 1994).

아. 계군간 혈중 IGF-I 발현 분석

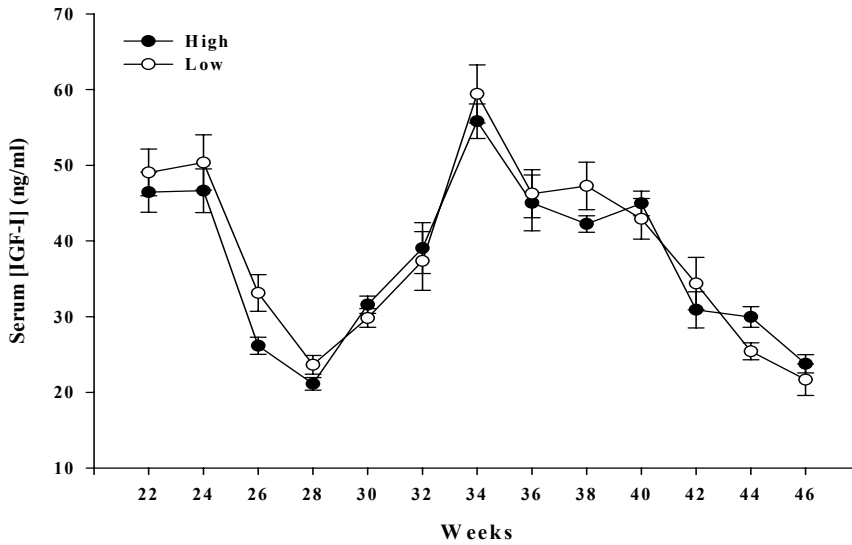


Fig. 44. Comparison of IGF-I concentration between high and low group with incubation behavior.

Fig. 44는 28주령에서 30주령까지 취소성을 기준으로 선발한 계군간의 평균 IGF-I 농도를 주령별로 나타낸 그림이다. 전체계군에서 혈중 IGF-I 농도는 초기에 높은 발현을 보이다가 28주령까지 감소하였으며, 광주기에 의한 산란개시 이후 다시 증가하여 산란 peak인 34주령에서 최고로 증가 후 감소하였다. 이러한 경향은 산란수와 동일한 것이었으나, 산란 수 에서는 계군간의 차이가 나타난 반면, 혈중 IGF-I 농도에서는 계군간의 차이가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 혈중 IGF-I 농도가 산란수와 유의적인 관계에 있으나 이는 상대적 농도 차에 의한 발현과 관련이 있는 것일 뿐 혈중 농도의 절대 값과는 관련성이 없는 것으로 사료된다.

자. 계군간 난소 및 뇌하수체 비교

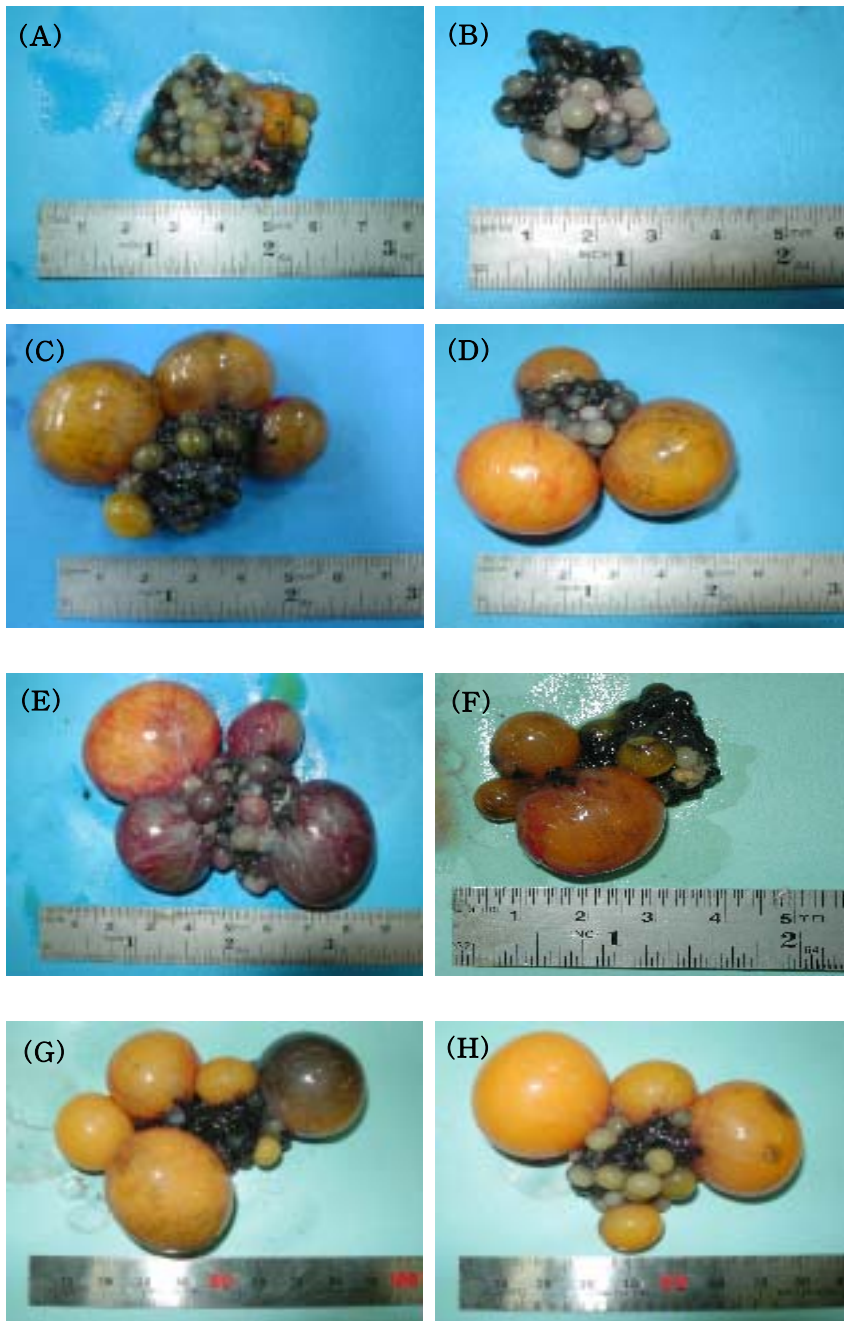


Fig. 45. Comparison of follicular morphology between high and low group. (A) high group (32 wks), (B) low group(32 wks), (C) high group (36 wks), (D) low group(36 wks), (E) high group (40 wks), (F) low group(40 wks), (G) high group

(44 wks), (H) low group(44 wks)

Fig. 45는 각 주령별로 계군 간 난소의 형태를 비교한 그림이다. 성성숙 개시 후 8주령까지는 초기 취소성을 보인 계군에서 난포의 성장이 빨랐으며, 36주령 이후에서는 개체간의 차이는 있었으나 계군 간에 큰 차이를 확인할 수 없었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표의 달성도

구 분	연구개발 목표의 평가 착안점, 척도 및 달성도		
	착 안 사 항	척 도 (점수)	달성도 (%)
1차년도(2002-2003)	○ VIP peptide 및 recombinant VIP 제작 및 산란능력 변화분석	40	100
	○ 산란능력관련 내분비인자 발현 분석	30	100
	○ VIP active immunization 계군/기초계군 내의 산란형질과의 연관성 분석	30	100
2차년도(2003-2004)	○ INH peptide 및 recombinant INH 제작	40	100
	○ VIP 및 INH active immunization을 통한 산란능력 관련 내분비인자 변화 및 발현분석	30	100
	○ INH active immunization의 계군/기초계군 내의 산란형질과의 연관성 분석	30	100
3차년도(2004-2005)	○ recombinant VIP + INH 제작	40	100
	○ VIP + INH active immunization을 통한 산란능력 관련 내분비인자 변화 및 발현분석	30	100
	○ VIP + INH active immunization의 계군/기초계군 내의 산란형질과의 연관성 분석	30	90
최종평가	○ recombinant VIP and/or INH 제작 및 산란능력 변화 비교 분석	40	80
	○ VIP and/or INH active immunization을 통한 산란능력 관련 내분비인자 변화 발현 분석	30	80
	○ VIP and/or INH active immunization을 통한 유전능력 분석	30	80

제 2절 관련분야에의 기여도

1. 기술적 측면

- 가. 능동면역법(active immunizaiton)을 위한 recombinant VIP and/or INH 의 대량 생산 방법을 확립함으로써 향후 재조합 단백질 생산 분야에 기여할 것으로 사료된다.
- 나. 능동면역법(active immunizaiton)을 통한 자가 항체 단백질 생산을 위한 기술적 측면을 완성함으로써 이를 통한 한국재래오골계의 산란능력향상
- 다. 한국재래오골계 산란능력 향상을 위한 기술적 방법을 확립함으로써 향후 자가 면역을 통한 새로운 인자를 쉽게 적용할 수 있을 것으로 사료된다.
- 라. 내분비조절 관련 기술에서 국제경쟁력의 우위적 선점
- 마. 산란능력 관련 내분비인자의 분석법에 대한 기초자료 제시
- 바. 한국재래오골계의 산란능력 관련 내분비인자 발현 분석을 통한 내분비적 기초자료 제시
- 사. 한국재래오골계의 산란능력 관련 내분비인자의 생리작용 구명
- 아. 유전능력 분석에 의한 오골계 산란능력 관련 기초자료 제시
- 자. 자연 방사식 및 근친교배로 인한 산란능력 감소의 한계극복 방안 제시
- 차. 난 생산성에 있어 가금류의 유전적 한계를 극복하기 위한 방안 제시
- 카. 가금류 전반에 걸쳐 난 생산성 향상방안 제시

2. 경제·산업적 측면

- 가. 능동면역법을 위한 peptide를 대량 생산함으로써 산란능력향상을 위한 약품생산 가능성 제시
- 나. 난 생산성 향상을 통한 농가 수익증대
- 다. 난 생산성 향상 기술의 제시를 통한 가금 산업 경쟁력 제고
- 라. 오골계란의 수출물량 확보를 통한 국내·외 시장경쟁력 확보
- 마. 고부가가치 식품의 대량생산을 위한 기반 확보
- 바. 최신 기술력 확보에 의한 국내 양계산업의 부가가치 제고
- 사. 산란 수 증대에 따른 생산비 절감 및 수익성 증대
- 아. 경쟁력 향상에 의한 양계산업의 활성화

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

제 1절 활용계획

1. 오골계의 산란능력관련 내분비인자의 변화를 분석함으로써 이후 오골계 및 기타 가금에서 경제형질에 미치는 여러 내분비적 요인들의 작용기전을 밝히는데 그 기초를 제공할 것이다.

2. 본 연구를 통해 축적된 정보과 기술은 오골계 뿐 아니라 가금류 전반에 이용될 수 있는 것으로 난 생산성을 가지는 가금류의 생산성 향상에 구체적인 방안을 제시할 것이다.

3. 최신 기술인 능동면역법(active immunization)을 통해 오골계의 산란능력과 관련하여 내분비인자를 조절함으로써, 기타의 주요한 경제형질과 관련된 내분비 인자를 조절하는데 있어 이 기술이 활용될 것이다.

4. 능동면역법을 이용하여 얻어지는 산란능력의 변화를 유전 및 내분비에서 다각적으로 분석함으로써 산란형질을 개량하는데 있어 그 기틀을 마련할 것이다.

5. 능동면역법을 위한 약품의 대량생산을 통해 직접적으로 산란능력을 향상시키는 데 필요한 약품생산의 가능성을 제시할 것이다.

제 2절 산업화 추진 방향

1. 특허 및 실용실안 출원 가능성 타진
2. 가금산업 전반으로 활용범위 확대 타진
3. 오골계란 및 고부가가치 식품 관련 기업의 탄생 가능성 타진
4. 산란능력 향상 기술의 확립을 통한 기술경쟁력 타진
5. 건강보조식품으로서의 오골계란의 수출 가능성 타진

제 3절 연구목표 달성을 위한 연구수행에 따른 문제점 및 향후 활용계획

1. 제1세부과제에서 시작하게 되는 active immunization이 8월부터 시작하게 됨에 따라 active immunization을 통한 데이터의 분석이 제3세부과제에서 유기적으로 연계되어 있었으나 제 1 차년도서부터 시작된 본 과제는 이에 대한 데이터가 마련되지 않은 관계로 이에 대한 해결책으로는 다음과 같이 설정하여 해결하고자 하였다.

VIP immunization을 위한 recombinant VIP peptide의 제작을 위한 gene cloning, sequence analysis, bacterial expression vector construction 및 synthetic peptide 제작기간으로 인해 VIP immunization은 8월 1일부터 실행되고 있다. 이를 위한 기초계군의 분류는 제2세부과제와 제3세부과제에서 분석한 산란능력에 따른 계군의 분류를 통해 산란능력이 높은 그룹과 산란능력이 낮은 그룹을 기초계군으로 조성하여 VIP active immunization을 수행하고 있다.

2. 제 1 차년도에서는 PRL과 FSH 및 LH 호르몬의 농도 분석이 오골계의 산란능력 분석에 있어서 중요한 parameter가 되며 이에 따라 오골계의 산란능력과 호르몬의 농도간의 상관관계는 이미 1차년도 제3세부과제로부터 확립되었다. 그러나 혈중 VIP와 INH의 농도는 VIP와 INH immunization에 따라 혈중 농도가 크게 변화될 수 있으나 현재로는 immunization이 완료되지 않은 상황으로 혈중 VIP와 INH의 분석은 오골계의 immunization을 통한 immunization group과 대조군간의 비교에 VIP 농도분석이 수행될 예정이다.

또한 자체 제작하고자 하였던 오골계의 VIP 및 INH의 antibody 제작은 연구비의 대폭 삭감에 따라 자체 제작을 통한 혈중 VIP 및 INH 농도의 분석은 본 과제에서는 어려운 상황이다. 따라서 혈중 VIP 및 INH의 혈중 발현 분석은, VIP 및 INH의 immunization을 통한 PRL 및 FSH의 발현을 조절하는 것이 본 실험에서의 주요한 목표로서, 기초계군에서의 혈중 VIP 및 INH의 발현은 immunization에 따라 변화할 것을 감안하여 VIP 및 INH의 발현은 immunization 시에 antibody titer를 측정함으로써 상기의 내용을 보완코자 하였다.

3. 제1세부과제에서 시작하게 되는 active immunization이 8월부터 시작하게 됨에 따라 active immunization을 통한 데이터의 분석이 제3세부과제에서 유기적으로 연계되어 있었으나 제 1차년도에서는 이에 대한 데이터가 마련되지 않은 관계로 이에 대한 해결책으로는 다음과 같이 설정하였다.

제 3세부과제에서의 immunization group과 non-immunization과의 비교는 VIP와 INH의 active immunization이 1-2차년도에 걸쳐 이루어지고 있으며, 현재 1차년에서는 최소성과 산란능력을 기준으로 grouping한 오골계 계군에서 산란 수 high group

과 low group으로 나뉘어져 이에 대한 오골계 기초계균에서 산란능력과 내분비인자의 발현을 비교 분석하였다.

4. 3차년도에 수행된 active immunization에서는 결과 보고서와 같이 INH active immunization 그룹에서는 INH의 antibody titer가 전혀 나타나지 않았다. 이러한 결과는 3차년도 전반에 걸쳐 산란 수, 내분비인자와 관련된 유의적인 연구결과를 보여주지 못하는 결과를 초래하게 되었다. 이러한 원인으로는 우선 active immunization시 나타날 수 있는 오골계의 자가 면역 후유증과 이에 따른 산란 성적의 저조를 보여줄 수 있을 것으로 사료된다. 또 다른 가능성으로는 VIP와 INH의 fusion 재조합 단백질의 생산은 가능하지만 이러한 fusion 재조합 단백질로 인하여 항체 생산 능력이 떨어질 수 있는 가능성을 찾게 되었다. 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 fusion 단백질의 생산 보다는 각각의 단백질을 생산하고 이를 혼합하여 active immunization을 시도하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

본 과제를 수행하면서 많은 해외 과학기술 정보를 접할 수 있었다. 특히 본 연구의 주된 주제인 산란관련 내분비인자에 대해서 많은 정보를 수집할 수 있었다.

조류에서 vasoactive intestinal peptide에 대한 보고는 1995년 “Increased Egg Production by Active Immunization against Vasoactive Intestinal Peptide in the Turkey”란 제목으로 보고되었다. 이 논문은 VIP active immunization을 통하여 산란율의 증가와 산란능력과 관련된 내분비인자들의 비교를 실시하였으며, 이 이외에도 2000년 Liu등과 2002년 Quesada 등은 번식기관에서 번식관련 steroid hormone들과의 관계를 구명하기 위한 연구를 수행하였다. 또한 본 연구를 수행하면서 Insulin-like growth factors와 같은 내분비인자에 대한 정보를 수집할 수 있었다. 특히 IGF의 경우 가금류에서 1997년 Mcmurty 등에 의해 발표되었으며, IGF의 발현과 생물학적 기능이 가금류의 중요한 경제형질인 산란능력과 관계를 확인하려는 연구가 시도되었다. 이러한 연구들은 본 과제를 수행하는데 있어서 이론적 바탕이 되었다.

따라서 본 연구팀은 전술한 많은 논문을 이론적 바탕으로 하여 혈중 내분비인자와 호르몬을 분석하기 위해 1980년 Daughaday 등이 보고한 방사선면역측정법 (radioimmunoassay)을 이용하여 본 실험에 알맞은 antibody와 반응조건을 결정하여 사용하였다.

아래의 논문은 이번 연구개발과정에서 수집한 학술 정보의 목록이다.

1. Vessey KA, Rushforth DA, Stell WK. 2005..
Glucagon- and secretin-related peptides differentially alter ocular growth and the development of form-deprivation myopia in chicks.
Invest Ophthalmol Vis Sci. 46(11):3932-42.
2. Porter TE, Lopez ME, Mike R, Huberty AF. 2005..
The increase in prolactin-secreting cells in incubating chicken hens can be mimicked by extended treatment of pituitary cells in vitro with vasoactive intestinal polypeptide (VIP).
Domest Anim Endocrinol. 2005 Sep 2
3. Zawilska JB, Gendek-Kubiak H, Woldan-Tambor A, Wiktorowska-Owczarek A, Nowak JZ. 2005.

Histamine-induced cyclic AMP formation in the chick hypothalamus: interaction with vasoactive intestinal peptide.

Pharmacol Rep. 2005 57(2):188-94

4. Zawilska JB, Dejda A, Niewiadomski P, Gozes I, Nowak JZ. 2005.

Receptors for VIP and PACAP in guinea pig cerebral cortex: effects on cyclic AMP synthesis and characterization by ¹²⁵I-VIP binding.

J Mol Neurosci. 25(3):215-24.

5. Jakab B, Reglodi D, Jozsa R, Hollosy T, Tamas A, Lubics A, Lengvari I, Oroszi G, Szilvassy Z, Szolcsanyi J, Nemeth J.2004.

Distribution of PACAP-38 in the central nervous system of various species determined by a novel radioimmunoassay.

J Biochem Biophys Methods.61(1-2):189-98.

6. Dejda A, Gendek-Kubiak H, Nowak JZ. 2004.

Effect of different forms of vasoactive intestinal peptide on cAMP formation in the mammalian cerebral cortex.

Pol J Pharmacol. 56(4):421-5.

7. Costagliola A, De Man JG, Majewski M, Lakomy M, Cecio A, Robberecht P, Pelckmans PA, Adriaensen D, Timmermans JP. 2004

Coexistence of non-adrenergic non-cholinergic inhibitory and excitatory neurotransmitters in a large neuronal subpopulation in the vaginal segment of the chicken oviduct.

Auton Neurosci. 112(1-2):37-48.

8. Zawilska JB, Niewiadomski P, Nowak JZ. 2004.

Receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in turkey cerebral cortex: characterization by [¹²⁵I]-VIP binding and effects on cyclic AMP synthesis.

Gen Comp Endocrinol. 137(2):187-95.

9. Zawilska JB, Niewiadomski P, Nowak JZ. 2004.

Receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the goose cerebral cortex.

Pol J Pharmacol. 56(2):203-11.

10. Dejda A, Matczak I, Nowak JZ. 2004.
[Peptide histidine-iso-leucine and its human analogue peptide histidine-methionine: localization, receptors and biological function]
Postepy Hig Med Dosw (Online). 26;58:18-26.
11. Csernus V, Jozsa R, Reglodi D, Hollosy T, Somogyvari-Vigh A, Arimura A. 2004.
The effect of PACAP on rhythmic melatonin release of avian pineals.
Gen Comp Endocrinol. 135(1):62-9.
12. Chaiseha Y, Youngren OM, El Halawani ME. 2004.
Expression of vasoactive intestinal peptide receptor messenger RNA in the hypothalamus and pituitary throughout the turkey reproductive cycle.
Biol Reprod. 70(3):593-9.
13. Tachibana T, Tomonaga S, Oikawa D, Saito S, Takagi T, Saito ES, Boswell T, Furuse M. 2003.
Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide inhibit feeding in the chick brain by different mechanisms.
Neurosci Lett. 348(1):25-8.
14. Nowak JZ, Sedkowska P, Zawilska JB, Gozes I, Brenneman DE. 2003.
Antagonism of VIP-stimulated cyclic AMP formation in chick brain.
J Mol Neurosci. 20(2):163-72.
15. Zawilska JB, Niewiadomski P, Nowak JZ. 2003.
Characterization of vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors in chick cerebral cortex.
J Mol Neurosci. 20(2):153-62.
16. Tachibana T, Saito S, Tomonaga S, Takagi T, Saito ES, Boswell T, Furuse M. 2003.
Intracerebroventricular injection of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibits feeding in chicks.
Neurosci Lett. 339(3):203-6.

17. Zawilska JB, Niewiadomski P, Nowak JZ.2003.

PAC1 receptors in chick cerebral cortex: characterization by binding of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, [125I]-PACAP27.

Neurosci Lett. 338(2):155-8.

제 7 장 참고 문헌

- El Halawani, M.E., Silsby, J.L. and Rozenboim, I. 1993.
Increased egg production by active immunization against vasoactive intestinal peptide in the turkey. *Poultry Sci.* 72(Suppl. 1):94
- El Halawani, M. E., You, S. 1998.
Turkey incubation behavior: From molecular biology to field biology. *Euro. Poul. Con.* p151-155
- Ishibashi, G., Nakanishi, M. *New food industry.* (1997) J. P. N. 91:845-847
- Jaeyong Ahn, Seungkwon You, Hyunggee Kim, Yupaporn Chaiseha and El Halawani. 2001.
Effects of Active Immunization with Inhibin α Subunit on Reproductive Characteristics of Turkey Hens. *Biology of Reproduction.* 65, 1594-1600
- Macnamee, M.C., Sharp, P.J., Lea, R.W, Sterling, R.J. and Harvey, S. 1986.
Evidence that vasoactive intestinal polypeptide is a physiological prolactin-releasing factor in the bantam hen. *Gen. Comp. Endocrinol.* 62:470
- You S, Silsby JL, Farris J, Foster DN, El Halawani ME. 1995.
Tissue-specific alternative splicing of turkey preprovasoactive intestinal peptide messenger ribonucleic acid, its regulation, and correlation with prolactin secretion. *Endocrinology.* Jun;136(6):2602-10
- You, S, Kim, I. J, Ahn, J, Sharma, J. M, El Halawani, M. E. 1998.
Potential application of recombinant turkey interferon- γ into turkey industry. *Gobbles.* V 55 p17-25
- 강우진, 윤준수, 서동삼, 이철영, 홍기창, 고 용. 2000.
한국 재래 오골계의 초기산란능력과 혈중 Insulin-like Growth Factor-I 간의 연관성. *동물자원학회지.* 42(6)767-776

권순형 (1989) 오골계의 영양성분에 관한연구. 석사학위논문

서동삼, 홍영호, 최강덕, 양무희, 신영수, 한재용. 1995.

배반엽성세포를 이용한 카이메라 닭 (화이트레그혼 《=》 오골계) 생산. 한국축산학회지 37:27-32

서동삼, 강우진, 윤준수, 이재현, 홍기창, 고용. (2001)

한국 재래 오골계의 성장호르몬 유전자 다형현상과 혈중 Insulin-like Growth Factor의 함량 및 산란능력간의 관련성. 한국동물자원과학회지. 43:303-314

백승복, 한성욱, 김홍기 (1989)

한국 재래 오골계의 자형질에 대한 유전모수 추정에 관한 연구. II. 난구 성분에 대한 유전력 및 유전 상관 추정. 한국가금학회지. 16:193-199

이성진, 황규춘, 최강덕, 이학교, 신영수, 한재용. 1995.

DNA 지문을 이용한 한국 오골계의 유전 분석. 한국축산학회지. 37:207-215.

한성욱, 오봉국, 김상호. 1986.

한국재래오골계의 유전 및 경제형질에 관한 연구. II. 수정율, 부화율, 산란능력과 체중. 한국가금학회지. 13:179-186

한성욱, 상병찬, 김홍기. 1989.

한국재래오골계의 체형질에 관한 유전모수추정에 관한 연구. I. 주요 경제형질의 유전력 및 유전상과추정. 가금학회지. 16:129-137

한성욱. 1996. 한국재래오골계의 생산기술과 현황. 23:145-151.

황규춘, 홍영호, 이학교, 손시환, 조병욱, 한재용. 1997.

한국 오골계의 유전특성 분석을 위한 임의 염기 서열의 Short Oligonucleotide Primer를 이용한 Polymerase Chain Reaction 기법의 적용. 한국축산학회지.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.