

최 종
연구보고서

한우 수정란의 조기유산에 대한
원인규명과 수태율 향상 연구

Large scale production of Korean cattle
following evaluation of
early embryonic loss and embryo transfer

주관연구기관 : 경상대학교
세부(협동)연구기관 : 한국생명공학연구원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “한우 수정란의 조기유산에 대한 원인규명과 수태율 향상 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007 년 05 월 23 일

주관연구기관명 : 경상대학교

총괄연구책임자 : 노 규 진

세부연구책임자 : 노 규 진

연 구 원 : 손 우 진

연 구 원 : 안 현 철

연 구 원 : 김 정 곤

연 구 원 : 송 혜 진

연 구 원 : 정 연 지

연 구 원 : 김 명 수

연 구 원 : 이 상 래

협동연구기관명 : 한국생명공학연구원

협동연구책임자 : 장 규 태

요 약 문

I. 제 목

한우 수정란의 조기유산에 대한 원인규명과 수태율 향상 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

현재 종축 개량과 한우농가의 수입증진을 위하여 고능력 젖소와 한우에서 과배란을 유도한 후, 수정란을 회수하고 동결 보존하여 수란우에 이식하는 방법이 대학, 농촌진흥청 축산기술연구소, 축협중앙회, 한우 및 유우 개량사업소 및 일반 목장 등에서 이루어지고 있다. 그러나 이 방법은 과배란 유기 후의 수정란 채란에 많은 시간이 소요되며, 1개의 이식 가능한 수정란을 생산하는 비용이 대략 20만원으로 경제적으로 많은 제약점이 따른다. 또한 채란하는 과정에서 난소낭종 등의 번식 질병을 초래할 수 있고, 공시축의 사양조건과 투여하는 호르몬의 종류 등에 따라 이식가능한 수정란의 생산에 변이가 심하기 때문에 실용적으로 산업화에 적용하기에는 여러 가지 어려움이 있다. 따라서 저비용 생산과 안정적인 공급이 가능한 체외수정란의 필요성이 커지고 있다.

국내에서도 여러 연구진에 의해서 이미 도축장유래의 소 난포란을 이용해서 생산된 체외수정란을 이식하여 송아지를 생산한 바 있으며, 1980년대 초부터 대학 및 연구소에서 많은 연구가 진행되어 난포란의 체외성숙, 체외수정 및 체외배양에 대한 성적은 거의 국제적인 수준에 도달하였다. 그러나 체외수정란 이식에 따른 산자생산 효율은 너무 낮아서 산업화 하기는 어려운 실정이다. 국내의 여러 보고에 의하면 초기 임신율은 약 60% 그리고 분만율은 약 20% 수준이다. 이것은 체외수정란 이식 후 임신된 수란우 중에서 약 67%가 조기 유산이 된다는 것을 알려준다. 이런 효율성을 가지고 일반 농가에 접목시키기는 극히 어려우며, 오히려 농가에 조기유산을 초래하여 공태 기간이 장기화됨으로써 장기적인 적자를 초래하는 결과가 될 것이다. 따라서 체외수정란 이식을 산업화하기 위해서는 수태 증진에 대한 연구 및 조기유산의 원인을 파악하여 그에 대한 적절한 대처를 하는 연구가 절실히 요구된다.

따라서 본 과제에서는 이러한 사실들을 바탕으로 한우 수정란의 조기유산에 대한 원인 규명과 수태율 향상에 대하여 연구하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 한우 수정란의 조기유산에 대한 원인규명과 수태율을 향상시키기 위하여 다음과 같은 내용과 범위로 진행되었다.

1차 년도 (2004)

(1) 체외수정란 생산체계 확립

가. 도축장 유래 미성숙난포란을 여러 배양 체계에 따라 체외성숙시킨 후 미세구조를 조사함으로써 적정 체외성숙 배양조건 설정

- 핵 성숙 상태 분석
- 난세포질의 microtubule, microfilament 및 mitochondria 분석

나. 체외성숙 및 수정 조건확립을 위한 hormones, serum 및 antioxidant 등 각종 첨가물의 영향

다. 체외배양조건 설정

- serum 및 antioxidant 등 첨가물과 저산소 배양 조건이 배발달에 미치는 영향 규명

(2) 체내수정란 회수 방법 확립

가. 한우 및 유우의 발정동기화 및 과배란 유기 기법 확립

나. 체내수정란 다량 회수

(3) 생산된 체내 및 체외수정란 발달능 및 유전 발현조사

가. 체외배양 체계에 따라 생산된 수정란과 체내수정란의 염색체의 이상 분석

나. apoptosis 발현 빈도 분석

다. telomerase activity 분석

라. DD-PCR을 이용한 신규유전자 탐색

2차 년도 (2005)

(1) 체외수정란 다량 생산 및 생산된 체외수정란 분석

가. Comet assay에 의한 DNA damage 분석

나. Xist 발현 비교 분석

(2) 이식 및 수태율 향상

가. 수태율 향상을 위한 trophoblast 공이식 및 GnRH의 효과 비교 조사

나. 이식 후 조기유산율 및 수태율 조사

- 초음파 및 혈청학적 진단

(3) 태아 적출 및 분석

가. 체외 및 체내 수정란 유래 태아를 인공 유산 후 비교 분석

- 인공유산에 대한 PGF_{2α}와 PGE₂ 및 oxytocin의 효과를 비교 조사
- 태아 기형 조사 및 염색체 분석
- 태반 크기 및 수

(4) 각 임신기별 태아의 유전자 발현분석

가. 수정란 및 태아로부터 H-β 58 gene 발현비교

나. 태아의 각 장기 유전자 발현 분석

다. 조기유산 및 거대 태아조직으로부터 apoptosis 조사

라. 거대태아 관련 유전자 탐색 및 IGF 발현량 측정

3차년도 (2006)

(1) 한우 송아지 생산 및 분석

가. 체외 및 체내 수정란 유래 산자의 비교 분석

- 태아 기형 및 염색체 분석
- 태반 크기 및 수
- 체세포 및 태반의 유전자 발현 비교 분석

(2) 한우 체외수정란 대량 이식

가. 산학 농가에 한우 체외수정란 대량 이식

(3) 한우 체외수정란 이식 후 송아지 대량 생산 및 분석

가. 한우 체외수정란 이식 후 송아지 대량 생산 및 분석

(4) 한우 송아지 분석

가. 한우 송아지의 혈액화학치 분석

나. 한우송아지의 염색체 및 형태학적 특징 분석

다. 체외수정란의 mRNA 추적으로 인한 거대태아와 관련된 marker 탐색

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

연구개발 결과

(1) 체외수정란 생산 체계 확립

① 체외성숙 환경

기본적인 배양 조건인 TCM-199에 sodium pyruvate (56 $\mu\text{g}/\text{ml}$), streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), penicillin G (100 units/ml)와 hormones으로는 LH (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), FSH (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 사용하였으며, Cysteine (0.6 mM)이 첨가된 군이 17 β -Estradiol (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 넣은 군보다 유의적으로 높은 핵발달율과 정상적인 미세소관, 미토콘드리아 분포를 보였다. 또한 수정 후 전핵형성에 있어서도 향상된 결과를 보였다.

② 수정란의 체외배양

complex-media인 TCM199 배양액과 simple media인 SOFaa에서 유의적으로 높은 배발달율을 확인하였다.

③ 산소농도

농도(5% or 20% O₂) 및 antioxidant (cysteine)에 따른 수정란의 발달율 및 세포수를 조사한 결과, 분할율 및 배반포 형성을 모두 20% O₂에 비해 5% O₂에서 유의적으로(P<0.05) 높게 나타났다. Cysteine 첨가군이 무첨가군보다 다소 높은 분할율과 배반포율을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

(2) 체내수정란 회수 방법 확립

① 공란우의 처리 및 회수 방법

발정주기 9일에서 13일사이의 공란우를 이용하여, 4가지 다른 방법의 과배란처리를 하여 그 효율을 알아보았다. 첫 번째 방법은 FSH 50mg을 4일간 8회 투여하는 것이며, 두 번째 방법은 FSH 400mg을 4일간 1회 투여하는 것이며, 세 번째 방법은 FSH 200mg을 4일간 1회 투여하는 것이다. 마지막 방법은 이와 다르게 공란우의 발정주기와 상관없이 CIDR를 삽입하고 7일째 FSH 200mg을 1회 투여하는 것이다. 처리 후 모든 군에서 FSH를 처리한 후 3일째 발정유기 호르몬인 PGF2a를 투여하여 발정을 유지하고 발정이 왔을 때 인공수정을 2회 실시하여 7일째 수정란을 회수하였다.

② 수정란의 회수방법 조사

검진된 황체수와 회수된 난자수를 확인하고 미수정란의 수, 퇴행란의 수, 이식 가능한란의 수를 알아보았다. 또한 임신율도 확인하였다.

모든 검사항목은 유의적인 차이를 보이지 않았다. 따라서 과배란 처리시 400 mg에 비하여 경제적으로 저렴한 200mg을 사용하는 방법이 경제적으로 우수하며, CIDR를 전처리하여 동시에 여러 마리의 공란우의 과배란 처리가 가능한 CIDR 방법이 가장 효율적인 과배란 유기 방법이라 할 수 있다.

(3) 생산된 체내 및 체외수정란 발달능 및 유전자 발현조사

체내수정란이 체외수정란에 비하여 유의적으로 높은 정상 염색체형과 총세포수를 보였고, 자가사멸빈도 (tunnel, comet assay)에 있어서는 낮은 수준을 보였다. 배반포의 telomerase activity를 살펴본 결과 체외수정란이 체내수정란에 비하여 적은 발현 양상을 보였으나 유의적인 차이를 보이지 않았고, 착상에 직접적으로 관련되어지는 유전자 H β -58 유전자의 발현 역시 유의적인 차이는 보이지 않았다.

체내유래 female embryo 와 male embryo, 체외유래 female embryo와 male embryo에서 각각 Xist 발현양상을 알아보았다. 모든 군에서 female embryo가 male embryo에 비해 유의적으로($P < 0.05$) 높은 발현 정도를 보이고 있으며, 체내유래 female embryo가 체외 유래 female embryo에 비해 유의적으로($P < 0.05$) 낮은 발현 양상을 보였지만 male embryo간에는 체내수정란과 체외수정란사이의 유의적인 차이는 보이지 않았다.

(4) 이식 및 수태율 향상과 태아 적출 및 한우 송아지 생산 및 분석

수정란 기원에 따른 분만율을 비교한 결과, 체외 수정란의 유산율이 인공수정에 비해서 유의적으로 높게 나타났지만 기존보고들과 비교하여 개선된 결과를 보였다. 수정란 이식 시, 체내수정란과 체외수정란에 상관없이 trophoblast 공이식이 유의적으로 임신율을 향상시킨다는 것을 알 수 있었다. 또한 경산우와 미경산우를 비교하였을 때 미경산우에서 높은 임신율을 보였다. 하지만 임신기간과 생시 체중, 쌍태 분만율, 염색체 이상율, 태아의 정상 표현형에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 태어난 산자의 성비를 조사한 결과 암컷보다 수컷의 비율이 높게 나타났다. 그리고 체외수정란의 경우 저체중과 과체중 비율이 높게 나타났으나 비정상적인 형태의 꼬리를 가진 기형도 1건 관찰되었다. 체외수정과 체내수정란을 이식한 후 태어난 신생송아지의 건강상태를 확인하기 위하여 혈액화학치를 조사해 본 결과 total protein, albumin, globulin의 경우 포유

후가 포유전보다 증가하였다. 다른 혈액화학치에서는 큰 변화가 관찰되지 않았다. 따라서 체내수정란 이식 산자와 체외수정란 이식 산자간의 건강상태의 차이는 없음을 확인할 수 있었다.

(5) 각 임신기별 태아의 유전자 발현분석

Apoptosis와 관련된 Bax와 Bcl2 유전자, stress와 관련된 Sox, Hsp, G6PDH 유전자, implantation과 관련된 VEGF, IFN- τ , compaction과 관련된 Cx43, oxidation과 관련된 PRDX5, NADH, MnSOD, metabolism과 관련된 Glut1, Glut5를 수정란의 발달단계별로 발현양상을 비교하였다. 그 결과, Glut-1, Glut-5, Bcl2, Cx43, PRDX5, NADH, MnSOD의 경우 체내수정란이 체외수정란에 비하여 대체로 낮았으며, 5% 산소에서 배양한 수정란이 20% 산소에서 배양한 수정란보다 낮은 발현량을 나타내어 체내수정란과 유사한 발현패턴을 보였다. 그리고 SOX, G6PDH, Hsp 70, Bax의 경우 체내수정란이 체외수정란에 비하여 낮은 발현율을 대체로 보였으며 5% 산소에서 배양한 수정란이 20% 산소에서 배양한 수정란에 비하여 낮은 발현량을 나타내어 역시 체내수정란과 더욱 유사한 발현양상을 보였다.

VEGF의 경우 체내수정란에 비하여 체외수정란이 유의적으로 높은 VEGF 발현양을 보였다. 그리고 5% 산소 농도에서 배양한 수정란이 20% 산소 농도에서 배양한 수정란에 비하여 낮은 발현율을 나타내었다. IFN- τ 는 체내수정란이 유의적으로 가장 낮은 발현양상을 보였으며, 5% 산소에서 배양한 수정란이 20% 산소에서 배양한 수정란에 비하여 낮은 발현양을 보였다.

배반포에서의 H- β 58의 발현정도를 나타내는 결과로서 체내수정란과 체외수정란사이의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 하지만 발달이 진행됨에 따라 증가하는 양상을 보였다. 체내 및 체외 수정란 이식 후, 90일 제에 유산된 태아의 각 조직 샘플을 채취하여 apoptosis 관련 유전자인 Bcl-2와 imprinting 관련 유전자인 IGF2의 발현양상에 대한 결과로서, 모든 장기에 있어 수정란의 기원에 따른 유의적인 차이를 보이지는 않았다.

연구개발 결과 활용에 대한 건의

국내 한우 사육 두수의 절대 부족으로 인해 한우 및 소고기의 가격은 가히 기형적이라고 할 수 있다. 따라서 한우 산업의 안정화를 위해서는 우선 사육 두수를 증가가 필수적이다. 그러나 이는 많은 시간이 요구되어지므로, 그 대안으로써 젖소를 대리모로 하여 검정된 한우 체외수정란을 이식하여 송아지를 생산하는 것이다. 현재 국내 일부 대학 및 연

구진에 의해서 한우 체외 수정란을 젖소에 이식을 하고 있으나, 농가에 도움을 주는 단계에 도달하기는 아직 미흡한 실정이다. 또한 검정되지 않은 하우 체외수정란을 사용함으로써 종개량에 역행하고 있다. 따라서 우선적으로 종이 검정된 소에서 난자를 회수 후 검정된 정액을 사용하여 체외수정란을 생산 한 후 젖소대리모에 이식한다면 종개량 측면에서도 도움이 될 수 있을 것이다. 그 이유는 임신된 수란우 중에서 약 67%가 염색체 및 유전자의 발현에 이상이 있어서 조기유산이 되기 때문이다.

따라서 본 연구가 성공적으로 수행되어져서 임신우에서 조기유산율을 줄인다면, 한우 산업의 안정화를 극대화할 수 있다. 또한 우수의 종축의 품종개량을 효율적으로 진행해 나갈수 있을것이다. 그뿐만아니라 여러 가지 생명공학적 기술발전의 기초를 구축하는데 이용될 수 있을것이다. 이러한 결과를 바탕으로 저명한 저널에 투고하여 번식관련 국내 연구력을 높일 수 있을것으로 사료된다.

SUMMARY

(영문 요약문)

I. Title

Large scale production of Korean cattle following evaluation of early embryonic loss and embryo transfer

II. Purpose and Necessity of the Research

Korean cattle, Hanwoo, has become an area of concern in respect with species conservation and economic values. However, low efficiency of reproduction in Hanwoo has become a severe problem being inconsistent with the current demand. Thus, there is a need to enhance the efficiency of reproductive technique, such as embryo transfer, recipient synchronization and in vitro culture system.

There are many advantages of embryo transfer in Cattle. Firstly, embryo transfer increases the reproductive capacity of a superior heifer or a cow. Secondly, old superior cows, that are unable to maintain pregnancy can still donate ovules for embryo transfer. Thirdly, it is easy to use frozen embryo instead of cows and grow them in surrogate mothers. In vivo embryo transfer has many disadvantages as it takes long time and costs a great deal to obtain an in vivo embryo. And the cow is bruised by the transfer. However, in vitro hanwoo embryo transfer to dairy cow is an increasingly popular choice for increasing the efficiency of reproductive technique because the production cost and efforts for producing hanwoo embryos are low. Most technical problems associated with in vitro embryo production could be overcome through research. Among the requirements for a successful research program would be renewed emphasis on conducting embryo transfer trials to determine effects of modifications to embryo production protocols on pregnancy rates and fetal development. Since 1980s, embryo transfers have been taking effect in Korea. The efficiency of embryo transfer is same as international. But, offspring rate is still low all around the world. With this background, the present investigation has made an attempt to enhance the production efficiency of embryo transfer in Korean cattle by evaluating early embryonic losses.

III. Contents and Scope of the Research

The contents of the present study were 1) the production of in vitro embryos with high quality and consistency 2) collection of in vivo embryos at high recovery rates with less efforts, 3) analyzing the differences between in vitro and in vivo embryo, 4) improving the efficiency of embryo transfer technique, and 6) investigations on the characteristics of offspring following embryo transfer.

IV. Result and Application of the Research

1) Result of the Research

1. Supplementation of cysteine at 0.6 mM concentration with bovine in vitro maturation media (TCM) improved the MII rate, showed normal microtubule and mitochondrial distribution. Furthermore, normal pro-nuclear (PN) formation was observed following in vitro fertilization.
2. For in vitro culture of bovine embryos, SOF media resulted in higher developmental rate in terms of cleavage and blastocyst, and total cell number when compared to those of TCM and CR1aa media.
3. In vitro culture of bovine embryos under 5% oxygen concentration along with supplementation of cysteine with 0.6 mM resulted in higher development to blastocysts with increased cell number.
4. For superovulation treatments, FSH at 200 mg with single injection reduced the labor and was cost effective. Further, the use of CIDR with FSH was found to be a more practicable method for increasing the number of treated cow at a time.
5. Comparative study between in vitro produced embryos and in vivo derived embryos revealed the normal chromosome number (karyotyping), high total cell number, and less apoptotic cells as analyzed by TUNEL and Comet assays. In vitro produced blastocysts had shorter telomere lengths than in vivo counterparts, but no significant differences were observed between two groups. Further, no significant difference in the expression of H β -58, which is related to implantation was observed between groups. Female embryos expressed the higher levels of Xist than male embryos in both in vitro and

in vivo groups. In addition, among in vitro and in vivo groups, in vivo derived female embryos expressed the higher levels of Xist than in vitro produced female and male embryos. However, no difference in the expression of Xist was observed for male embryos between in vitro and in vivo groups.

6. Parturition in recipients from different origin of embryo sources such as in vivo and in vitro showed no differences in the number of abortions, number of stillbirth and number of calving.
7. Conceptions at different days of pregnancy following fresh embryo transfer in heifer and lactating cows with trophoblasts resulted in high rates, and further demonstrated that heifers are more suitable for embryo transfer.
8. Embryos were collected at 2-, 4-, 8-, 16-cell, morula and blastocyst stages at specific time points for gene expression analysis. Using real time PCR, for the set of target transcripts (Glut1, Glut5, Sox, G6PD, MnSOD, PRDX5, NADH and Hsp 70.1) analyzed, there were differences in the mRNA expression pattern at 2-, 4-, 8-, 16-cell, morula and day 7 blastocyst stages between the two embryo sources. It can be concluded that, although in vitro bovine embryo culture in SOF medium under low (5%) O₂ concentration provided a conducive environment in terms of blastocyst formation, differences in the total cell number and gene expression pattern between the In vivo embryo and In vitro embryos reflected the effect of O₂ concentration.

2) Application of the Research

Hanwoo, the Korean native cattle form the most beef cattle in Korea. Hanwoo beef has been typically marketed as a high quality and obviously a high price product. Korean consumers view domestic Hanwoo beef as the highest quality, and the shortage of Hanwoo has helped sustain more demand inspite of it's high prices. Thus, ever increasing demand for Hanwoo beef even at higher prices has prompted the Korean cattle farms to increase productivity, improve beef quality and reduce production costs through the development and application of improved technology.

The productivity of Korean cattle can be improved using technologies such as multiple ovulation and embryo transfer (ET), and selection can be based on more scientific procedures. The main objective of these technologies in cattle reproduction is to increase reproductive efficiency and the quality of the young that cows produce, whether in terms of milking ability or in the carcass quality of the beef animals that are born. In addition, today's commercial use of in vitro embryo production has enabled to obtain young from cows, other than by conventional ET means. However, various factors are known to influence the survival and development of in vitro produced (IVP) embryos, including the inherent potential of the embryo to undergo early cell divisions and differentiation leading to embryonic cell lineages. Although the culture system used for IVP embryos mimic the in vivo conditions and generally support the development of viable embryos, the differences between the two systems point to the sub-optimal nature of the in vitro system. Following ET, significant differences in developmental potential have been reported for both IVP and in vivo embryos and apparently, lower pregnancy and birth rates have been associated with the transfer of IVP embryos compared to in vivo counterparts. Hence, the present investigation examined the effects of supplement and culture conditions (under different oxygen concentrations) on in vitro embryo development, embryo quality and gene expression in bovine embryos derived in vitro and in vivo. Furthermore, the developmental ability of IVP and in vivo embryos following ET to recipient heifers and lactating cows of natural and synchronized estrus was evaluated by the conception and twinning rates, pregnancy, parturition and calf characteristics.

Results of the present investigation would greatly help in understanding the most technical problems associated with in vitro production of bovine embryos and effects of modification to embryo production protocols on pregnancy rates and fetal development. Furthermore, the present findings would also facilitate in employing various methods to reduce early embryonic mortality in order to enhance and sustain the production of Hanwoo cattle in Korea.

CONTENTS

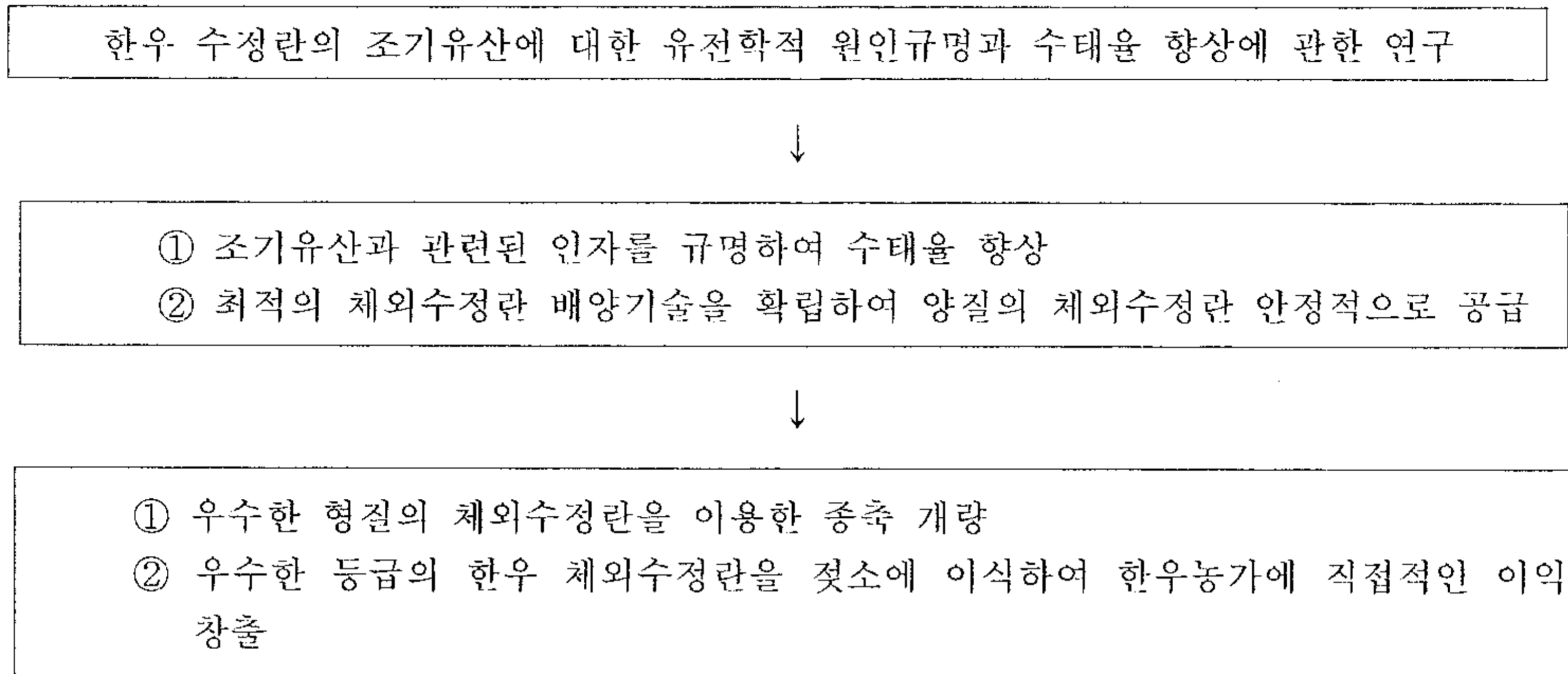
Chapter 1. Outline of the subject	15
1) Purposes of this research	15
2) Necessities of this research	15
3) Subjects this research	16
Chapter 2. The present condition of internal and external technique	18
1) The present condition of internal technique	18
2) The present condition of external technique	18
Chapter 3. Research achievement and result	21
1) Protocol of this research	21
1 In vitro embryo production	21
2 In vitro embryo production	23
3 Analysis of in vitro embryo and in vivo embryo	25
4 Investigates of embryo transfer and offspring	28
5. Quantitative analysis of different stage embro	30
2) Research achievement and result	32
1 In vitro embryo production	32
2 In vitro embryo production	37
3 Analysis of in vitro embryo and in vivo embryo	39
4 Investigates of embryo transfer and offspring	45
5. Quantitative analysis of different stage embro	56
Chapter 4. Goal of completion and contribution rate of the objective	68
1) Goal of completion	68
2) contribution rate of the objective	69
Chapter 5. Application of research achievement and result	71
Chapter 6. Achievements of this study	72
Chapter 7. Reference	74

목 차

제 1 장. 연구개발과제의 개요	15
1 절 연구개발의 목적	15
2 절 연구개발의 필요성	15
3 절 연구개발의 범위	16
제 2 장. 국내외 기술개발 현황	18
1 절 국내 기술개발 현황	18
2 절 국외 기술개발 현황	18
제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과	21
1 절 연구방법	21
1 체외수정란 생산 체계 확립	21
2 체내수정란 회수 방법 확립	23
3 생산된 체내 및 체외수정란 발달능 및 유전자 발현조사	25
4 이식 및 수태율 향상과 태아 적출 및 한우 송아지 생산 및 분석	28
5. 각 임신기별 태아의 유전자 발현분석	30
2 절 연구내용 및 결과	32
1 체외수정란 생산 체계 확립	32
2 체내수정란 회수 방법 확립	37
3 생산된 체내 및 체외수정란 발달능 및 유전자 발현조사	39
4 이식 및 수태율 향상과 태아 적출 및 한우 송아지 생산 및 분석	45
5. 각 임신기별 태아의 유전자 발현분석	56
제 4 장. 목표달성도 및 관련 분야에의 기여도	68
1 절 목표달성도	68
2 절 관련분야에의 기여도	69
제 5 장. 연구개발 결과의 활용계획	71
제 6 장. 연구개발 과정에서 획득한 결과	72
제 7 장. 참고문헌	74

제 1 장 연구개발과제의 개요

1 절 연구개발의 목적



2 절 연구개발의 필요성

현재 종축 개량과 한우농가의 수입증진을 위하여 고능력 젖소와 한우에서 과배란을 유도한 후, 수정란을 회수하고 동결 보존하여 수란우에 이식하는 방법이 대학, 농촌진흥청 축산기술연구소, 축협중앙회, 한우 및 유우 개량사업소 및 일반 목장 등에서 이루어지고 있다. 그러나 이 방법은 과배란 유기 후의 수정란 채란에 많은 시간이 소요되며, 1개의 이식 가능한 수정란을 생산하는 비용이 대략 20만원으로 경제적으로 많은 제약점이 따른다. 또한 채란하는 과정에서 난소낭종 등의 번식질병을 초래할 수 있고, 공시축의 사양조건과 투여하는 호르몬의 종류 등에 따라 이식가능한 수정란의 생산에 변이가 심하기 때문에 실용적으로 산업화에 적용하기에는 여러 가지 어려움이 있다. 따라서 저비용 생산과 안정적인 공급이 가능한 체외수정란의 필요성이 커지고 있다.

국내에서도 여러 연구진에 의해서 이미 도축장의 소 난포란을 이용해서 생산된 체외수정란을 이식하여 송아지를 생산한 바 있으며, 1980년대 초부터 대학 및 연구소에서 많은 연구가 진행되어 난포란의 체외성숙, 체외수정 및 체외배양에 대한 성적은 거의 국제적인 수준에 도달하였다. 그러나 체외수정란 이식에 따른 산자생산 효율은 너무 낮아서 산업화하기는 어려운 실정이다. 국내의 여러 보고에 의하면 초기 임신율은 약 60% 그리고 분만율은 약 20% 수준이다. 이것은 체외수정란 이식 후 임신된 수란우 중에서 약 67%가 조기

유산이 된다는 것을 알려준다. 이런 효율성을 가지고 일반 농가에 접목시키기는 극히 어려우며, 오히려 농가에 조기유산을 초래하여 공태 기간이 장기화됨으로써 장기적인 적자를 제공하는 결과가 될 것이다. 따라서 체외수정란 이식을 산업화하기 위해서는 수태 증진에 대한 연구 및 조기유산의 원인을 파악하여 그에 대한 적절한 대처를 하는 연구가 절실히 요구된다.

3 절 연구개발의 범위

1차 년도 (2004)

(1) 체외수정란 생산체계 확립

가. 도축장 유래 미성숙난포란을 여러 배양 체계에 따라 체외성숙시킨 후 미세구조를 조사함으로써 적정 체외성숙 배양조건 설정

- 핵 성숙 상태 분석
- 난세포질의 microtubule, microfilament 및 mitochondria 분석

나. 체외성숙 및 수정 조건확립을 위한 hormones, serum 및 antioxidant 등 각종 첨가물의 영향

다. 체외배양조건 설정

- serum 및 antioxidant 등 첨가물과 저산소 배양 조건이 배발달에 미치는 영향 규명

(2) 체내수정란 회수 방법 확립

가. 한우 및 유우의 발정동기화 및 과배란 유기 기법 확립

나. 체내수정란 다량 회수

(3) 생산된 체내 및 체외수정란 발달능 및 유전 발현조사

가. 체외배양 체계에 따라 생산된 수정란과 체내수정란의 염색체의 이상 분석

나. apoptosis 발현 빈도 분석

다. telomerase activity 분석

라. DD-PCR을 이용한 신규유전자 탐색

2차 년도 (2005)

(1) 체외수정란 다량 생산 및 생산된 체외수정란 분석

가. Comet assay에 의한 DNA damage 분석

나. Xist 발현 비교 분석

(2) 이식 및 수태율 향상

가. 수태율 향상을 위한 trophoblast 공이식 및 GnRH의 효과 비교 조사

나. 이식 후 조기유산을 및 수태율 조사

- 초음파 및 혈청학적 진단

(3) 태아 적출 및 분석

가. 체외 및 체내 수정란 유래 태아를 인공 유산 후 비교 분석

- 인공유산에 대한 PGF_{2α}와 PGE₂ 및 oxytocin의 효과를 비교 조사
- 태아 기형 조사 및 염색체 분석
- 태반 크기 및 수

(4) 각 임신기별 태아의 유전자 발현분석

가. 수정란 및 태아로부터 H-β 58 gene 발현비교

나. 태아의 각 장기 유전자 발현 분석

다. 조기유산 및 거대 태아조직으로부터 apoptosis 조사

라. 거대태아 관련 유전자 탐색 및 IGF 발현량 측정

3차 년도 (2006)

(1) 한우 송아지 생산 및 분석

가. 체외 및 체내 수정란 유래 산자의 비교 분석

- 태아 기형 및 염색체 분석
- 태반 크기 및 수
- 체세포 및 태반의 유전자 발현 비교 분석

(2) 한우 체외수정란 대량 이식

가. 산학 농가에 한우 체외수정란 대량 이식

(3) 한우 체외수정란 이식 후 송아지 대량 생산 및 분석

가. 한우 체외수정란 이식 후 송아지 대량 생산 및 분석

(4) 한우 송아지 분석

가. 한우 송아지의 혈액화학치 분석

나. 한우송아지의 염색체 및 형태학적 특징 분석

다. 체외수정란의 mRNA 추적으로 인한 거대태아와 관련된 marker 탐색

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1 절 국내 기술개발 현황

국내에서도 여러 연구진에 의해서 이미 도축장의 소 난포란을 이용해서 생산된 체외수정란을 이식하여 송아지를 생산한 바 있으며, 1980년대 초부터 대학 및 연구소에서 많은 연구가 진행되어 난포란의 체외성숙, 체외수정 및 체외배양에 대한 성적은 거의 국제적인 수준에 도달하였다. 그러나 체외수정란 이식에 따른 산자생산 효율은 너무 낮아서 산업화하기는 어려운 실정이다. 국내의 여러 보고에 의하면 초기 임신율은 약 60% 그리고 분만율은 약 20% 수준이다. 이러한 결과를 체외수정란 이식 후 임신된 수란우 중에서 약 67%가 조기 유산이 된다는 볼 수 있다. 따라서 이런 성적으로는 농가에 접목시키기 극히 어려운 상황이며, 오히려 농가에 조기유산 때문에 공태 기간이 장기화됨으로써 장기적인 적자를 제공하는 결과가 될 것이다. 따라서 체외수정란 이식을 산업화하기 위해서는 수태 증진에 대한 연구 및 조기유산의 원인을 파악하여 그에 대한 적절한 대처를 하는 연구가 절실히 요구된다.

2 절 국외 기술개발 현황

체내수정란 이식기술이나 도축 후 난소에서 채취한 난포란을 이용한 체외수정란의 이식기술에 관한 국외 연구보고는 많이 있으며, 이식 후 분만율은 약 50%를 상회하고 있어서 이미 실용화된 수준이다. 그러나 도축 후 난소에서 채취한 난포란으로 생산된 수정란의 이식에 관한 연구는 그다지 많지 않다. 또한 조기유산에 관한 보고는 많이 있지만, 심층 연구는 진행되지 않고 있는 실정이다.

체외성숙된 난포란을 이용한 체외수정은 1970년 Sreenan이 체외성숙 난포란을 발정우의 난관에서 채취수정시켜 전핵형성을 관찰함으로써 정상을 확인한 후 Newcomb 등 (1978)은 최초로 체외성숙 난포란을 체외수정시켜 배발달을 시킴으로써 체외성숙 난포란을 체외수정에 이용할 수 있음을 입증하였다. 이 후 Hanada 등 (1986)은 체외성숙된 난포란을 체외수정시킨 후 이식하여 최초로 송아지 생산에 성공하였으나, 이 연구는 토끼 난관에서 수정란을 배반포로까지 배양한 후 동결하여 융해하였기 때문에 완전한 체외수정란 생산 기법에 의한 결과는 아니었다. Lu 등 (1988)과 Goto 등 (1988)이 체외성숙된 난포란을 체외수정시킨 후 체외배양하는 연구를 실시하여 최초로 완전한 체외수정란생산 기법을 이용하여 송아지를 생산하는데 성공하였다.

그러나 수정란을 이용하여 산자를 생산하기 위해서는 여러 가지 요인이 영향을 미친다고 보고하였다. 수정란이식 시 수태율을 좌우하는 요인으로 Sreenan과 Diskin (1987)은 수정란의 자체 요인으로 수정란의 염색체 이상, 수정란의 일령 및 질, 동결 유무 및 미세조작 유무 등이 있으며, 모체요인으로는 수란우의 황체크기나 혈중 progesterone 수준, 수정란 이식 부위와 방법 그리고 수란우의 영양상태 등이 있으며 이외에도 수정란의 배양 등이 작용한다고 보고하였다. 또한 Hasler 등(1987)은 수태율을 좌우하는 요인으로 이식 시기, 수정란의 질과 발육단계, 발정동기화 정도와 방법 등에 따라 수태율에 차이가 있다고 보고하였다.

최근 체외수정란 이식 시 조기 배아사멸의 원인에 대한 연구가 많이 이루어지고 있는데 그 원인으로서는 크게 염색체 이상과 apoptosis와 Xist의 비정상적인 발현과 telomerase activity의 비정상적인 발현 등으로 볼 수 있다. 체외수정란의 염색체 이상에 대해 McCauleya 등(2003)은 돼지에서 정상적인 형태를 가지는 체외수정란의 배반포(day-6)에서 haploid, polyploidy, mixoploid 등의 염색체 이상을 보이는 경우가 39%에 달한다고 보고하였으며, Simopoulou 등(2003)은 사람에서 수정 후 유산이 반복적으로 일어나는 이유를 Chromosomal rearrangement에 의한다고 보고 체외 수정 후 3일 경과 후 수정란의 할구를 biopsy하여 fluorescent in situ hybridization (FISH)로 preimplantation genetic diagnosis (PGD)를 조사였다. 그 결과 초기배에서부터 염색체 이상이 나타나며 염색체 이상인 초기 배도 배반포까지 정상적으로 발달이 가능하다고 보고하였다. Viuff 등(2000)도 소 체외수정란의 6, 7- chromosome을 FISH를 이용하여 염색체 이상을 조사한 결과 수정 후 2, 3, 4 그리고 5일에 정상적인 diploid chromosome을 가지는 경우는 각각 73, 72, 81 그리고 58%로 소 체외수정란은 초기 배 발달단계인 수정 후 2일 쯤부터 chromosome의 이상이 나타난다고 보고하였다.

또한 최근 보고들에 따르면 체내, 외 수정란이 정상적으로 발달하였을 때 각기 다른 apoptosis 양상을 나타내는 경향이 있다고 하며, 특히 체내 수정란에 비해 체외수정란에서 비정상인 양상을 보이는 apoptosis 에 의해서 후기배의 발달 저해와 착상 시 조기 유산을 일으키는 경향이 있다고 보고하고 있다. 이러한 apoptosis는 정상적인 세포가 프로그램된 자가 사멸에 의해 나타나는 죽음 방식으로 분자 수준에서는 세포가 무엇인가로 부터 어떤 죽음 시그널을 받으면 특정 유전자가 작용하여 일어나게 되며 이렇게 정상적으로 발생된 apoptosis는 수정란의 발달과정에서 전체 세포수와 내부세포피의 비율을 조절하게 된다.

배아의 조기 사멸의 원인으로 제기되고 있는 원인 중에는 X chromosome inactivation 이 정상적으로 일어나지 않아서 임신은 하지만 결국 조기에 배아사에 의해 유산이 일어난다는 것이다. 포유동물의 경우 암컷이 물려받은 두 개의 X 염색체 가운데 하나는 유전

자 활성이 억제된다. 왜냐하면 두 개 모두 유전자 활성을 나타낼 경우 발현되는 단백질의 양이 두 배가 되면서 위험한 결과를 초래할 수 있기 때문이다. 이때 X 염색체 활성을 억제하는 유전자가 바로 Xist라는 것이다 (Zuccotti 등, 2002; De La Fuente 등, 1999). 암컷이나 수컷 모두 하나의 X 염색체가 활성을 나타내야만 하므로 암컷의 경우에는 하나의 X 염색체에서, 수컷의 경우에는 하나밖에 없는 X 염색체에서 Xist의 기능이 억제되어야만 한다. X chromosome inactivation이 정상적으로 일어나지 않으면 임신 중 하역도 태반에 영향을 미쳐서 결국은 유산이 되게 된다.

또 다른 한편, 최근 Keyio 대학 산부인과 팀 (2003)에서는 이러한 원인에 대하여 조사하기 위하여, 체외수정란 수정란에 대하여 조사한 결과 태어난 자손에 있어서 Duchenne's 형 근 dystrophia가 나타날 확률이 높으며, 이와 관련하여 초기 발생단계에서는 cortissterone의 과부족으로 인한 조기 배아 사망, 반면 임신 말기에서는 17-hydroxylase deficiency의 과잉분비로 인하여 부신피질 또는 난소기능이상으로 인한 조기 유산이 빈발한다고 보고하였다. 특정유전자의 기능이상으로서는 H- β 58 유전자가 knockout mice에서 착상 및 조기 유산에 관여하는 것으로 보고 되고 있고, IGF-II의 과잉발현, Mash2 및 Interferon tau등이 분만시 거대태아가 생산된다고 보고하였다 (Nagaoka 등, 2003).

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1 절 연구방법

1 체외수정란 생산 체계 확립

체외 수정란 생산 체계 확립을 위하여 hormone 및 antioxidant를 첨가하고 성숙 후 난세포질의 핵 상태, microtubule, microfilament 및 mitochondria를 분석하였다. 또한 수정 후 핵 상태를 조사하였고, 배양 시 각기 다른 배양 조건에서 serum 유무에 따른 배발달을 살펴보고 저산소 상태의 배양 조건의 영향을 다음과 같은 방법으로 규명해보았다.

기본적인 배양 조건은 TCM-199에 sodium pyruvate (56 $\mu\text{g}/\text{ml}$), streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), penicillin G (100 units/ml)와 hormones으로는 LH (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), FSH (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 사용하였으며, 17 β -Estradiol (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 Cysteine (0.6 mM)이 각각 첨가되거나 되지 않은 군으로 나누어 실험을 실시한다.

가. 체외성숙시 hormones, antioxidant첨가에 대한 난세포질의 핵 상태, microtubule, microfilament 및 mitochondria 분석

1) 난자의 핵 성숙을

- ㉠ 22시간 체외배양 후 3% sodium citrate에서 vortexing하여 난구세포를 제거하였다.
- ㉡ 2.5% glutaraldehyde를 사용하여 15분간 고정
- ㉢ 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI)를 사용 염색하였다.
- ㉣ epifluorescence microscopy 사용 405 nm의 파장 아래에서 분석하였다.
- ㉤ Germinal vesicle (GV), Metapase I (MI), Metapase II (MII)와 염색질 spots 및 aberration으로 구분하였다.

2) 난자의 microtubule 조사

- ㉠ 난구세포가 제거된 난자를 0.3% Triton X-100 사용 4% formaldehyde에 1시간 동안 고정 후 PPB (10 ml PBS/PVA, 0.1 g BSA, 1% (v/v) sodium azide)로 수세하였다.
- ㉡ 10% goat serum (GIBCO) 첨가된 PPB에 10분간 실온에서 침전하고, PPB에 mouse anti-chicken α -tubulin (1:100)에서 48 $^{\circ}\text{C}$ 에서 overnight하였다.

㉔ FITC-conjugated goat anti-mouse IgG antibody에 1시간 동안 암실의 실온에서 보관후 10 mg/ml propidium iodide (PI)로 염색하였다.

㉕ microtubules의 염색을 위한 FITC와 염색체 염색을 위한 PI를 위하여 excitation은 a krypton-argon ion laser 사용하였다. (excitation 494 nm, barrier 518 nm for FITC; excitation 536 nm, barrier 617 nm for PI)

3) 난자의 mitochondria 조사

㉖ 난구세포가 제거된 난자를 10 mg/ml of Rhodamine-123 (R-123; Molecular Probes, Eugene, OR)에서 39℃, 5% CO₂ 에서 15분간 배양하였다.

㉗ epifluorescence microscope 사용하여 (excitation 507 nm, barrier 529 nm) mitochondria의 수와 정상인지 비정상인지를 조사하였다.

나. 체외수정 후 핵상태 조사

Percoll 방법에 의해 정자를 분리하고, 22시간 동안 각기 다른 배양 조건에서 성숙된 난자와 체외수정을 시킨다. 난자 및 정자의 처리 배양액으로는 Sp-Talp를 이용하고, 수정용으로는 IVF-Talp를 이용한다. 수정 시 정자는 1~2 × 10⁶ sperms/ml이 되도록 농도를 조절하여 16-20시간 동안 39℃, 5% CO₂ incubator에서 체외수정을 유도한다.

1) Pronuclei Formation (PN) 조사

정상적인 수정 여부를 확인하기 위한 PN의 조사는 수정 후 16시간에 실시한다. 난구세포와 정자를 제거 한 후 4% formaldehyde 에 4시간 고정하고 10 mg/ml PI로 염색한다. Epifluorescence microscope를 사용하여 620nm의 파장을 사용하여 PN의 상태를 조사하고, PN의 상태는 1PN(female pronuclei), 2PN(female pronuclei + male pronuclei), 1PN+ intact chromosome (female pronuclei +intact sperm), MII+ 1PN (female MII+male pronuclei), MII+ intact chromosome (female MII+intact sperm)로 나누어서 분석한다.

다. 체외 배양시 serum 첨가에 따른 배발달 영향 규명

체외 배양의 효율을 높이기 위해 각종 배양 조건 및 serum의 유무에 따른 배발달 양상을 알아본다.

1) TCM-199에 난관상피세포의 공배양 (Rieger 등, 1995)

㉘ 배양 처음 2일간은 TCM-199 배양액에 10% FBS를 첨가하여 50ul 배

양소적에 15개의 수정란을 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

- ㉠ 배양 2일 후 TCM-199 배양액에 10% FBS와 난관상피 세포를 공배양 하고 5일째에 배양액을 첨가하였다.

2) CR1aa 배양

- ㉠ 배양 처음 3일간은 CR1aa 배양액에서 15-20개의 수정란을 50ul 배양 소적에 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

- ㉡ 배양 3일, 5일 후 배양액 5ul를 첨가하거나 배양액을 교체하였다.

3) CR1aa배양액에 10% FBS첨가

- ㉠ 배양 처음 3일간은 CR1aa 배양액에서 15-20개의 수정란을 50ul 배양 소적에 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

- ㉡ 배양 3일, 5일 후 CR1aa배양액에 10% FBS를 첨가하여 배양액을 교체하였다.

4) SOF 배양액

- ㉠ 배양 첫날은 SOF 배양액에 BSA와 EDTA를 첨가하여 30개의 수정란을 30ul 배양소적에 5% CO₂ , 5% O₂ incubator에서 배양하였다.

- ㉡ 배양 3일 후 SOF배양액에 BSA와 MEM amino acid를 첨가하여 배양액을 교체하고 5일후 5ul를 첨가하였다.

라. 체외 배양시 20% O₂와 5% O₂의 배양조건 및 antioxidant의 유무에 따른 배 발달 영향 규명

- 1) 배양 첫날은 SOF 배양액에 BSA와 EDTA를 첨가하고 30개의 수정란을 30ul 배양소적에 cysteine을 넣은 군과 넣지 않은 군 및 서로다른 산소 농도, 즉 20% O₂와 5% O₂의 배양조건에서 배양하였다.

- 2) 배양 3일 후 SOF배양액에 BSA와 MEM amino acid를 첨가하여 배양액을 교체하고 5일후 5ul를 첨가하였다.

2 체내수정란 회수 방법 확립

가. 효율적인 과배란처리 방법 연구

- 1) 공란우 발정동기화를 위한 호르몬 처리 방법은 아래와 같다

A : FSH 50mg을 4일간 8회 투여한 군이,

B : FSH 400mg을 4일간 1회 투여하였고, 여

C : FSH 200mg을 4일간 1회 투였고.

D : CIDR 삽입 후 7일째 FSH 200 mg 1회 투여

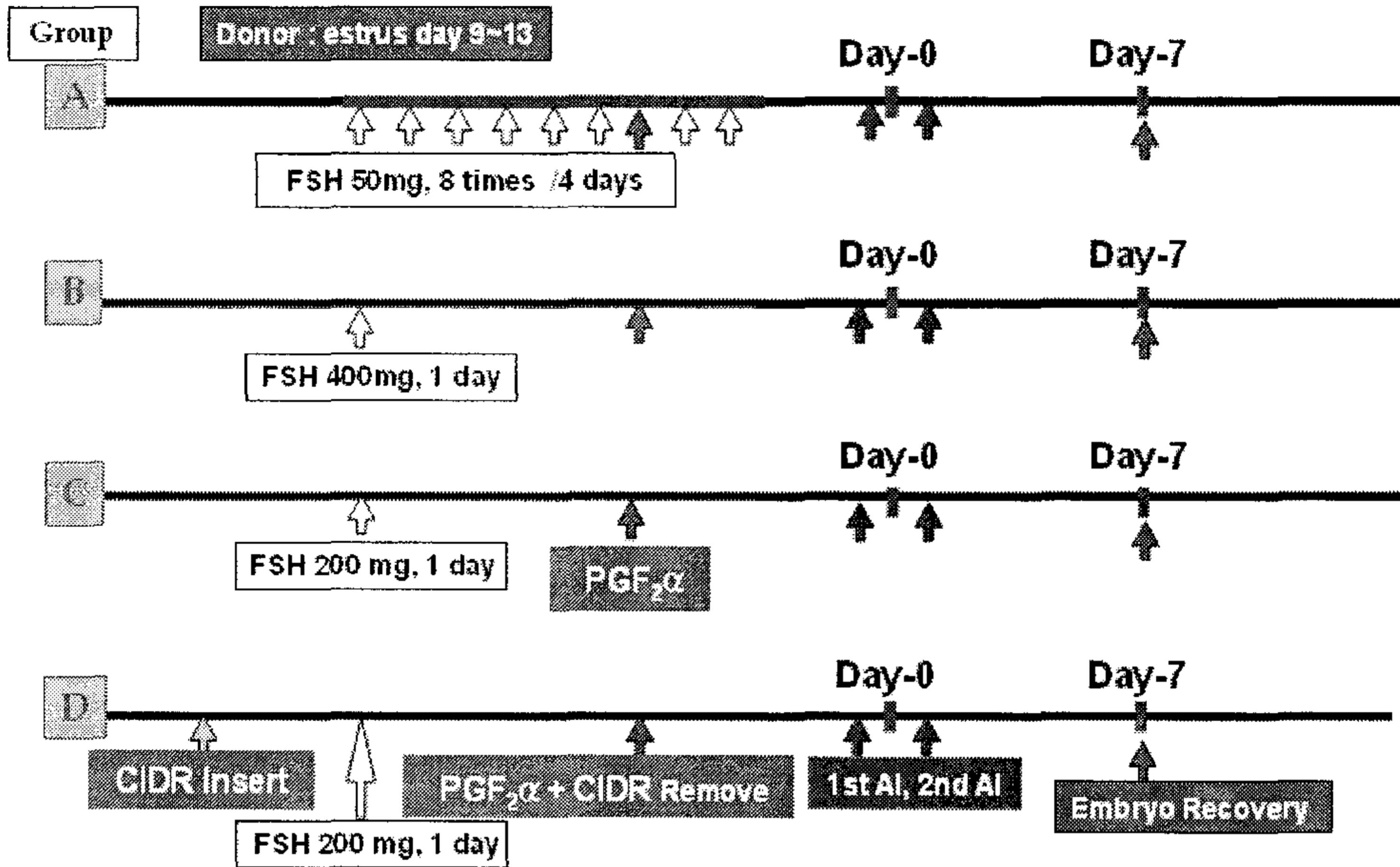


Fig.1. Estrus synchronization methods of donor cow

2) 인공 수정 및 수정란 회수 :

모든 군에서 FSH를 처리한 후 3일째 발정유기 호르몬인 PG를 투여하여 발정을 유도하고 발정이 왔을 때 인공수정을 2회 실시하여 7일째 수정란을 회수하였다.

3) 과배란 처리방법의 효율성 비교 :

수정란의 회수율, 황체수, 이식후 임신율을 관찰하였다.

(공란우는 발정주기 9일에서 13일사이의 공란우를 이용)

나. 수정란 검사

수정란의 등급은 다음과 같이 분류하였다.

- non-fertility ovum : 수정되지 않아 분열이 일어나지 않은 난자
- non-fertility ovum : 수정이 되어 분열이 일어났지만 세포질과 세포막의 상태가 좋지 않은 난자, 중간정도의 불규칙적 변형이 일어났거나 정상적인

할구가 거의 없는 변성란

- transferable embryo : 발육이 정상적이고 결손이 보이지 않는 것, 위란강 (perivitelline space)내에 약간 변성된 할구(blastomeres)를 가진 것

다. 임신감정

7.5 MHz trans-rectal probe가 연결된 초음파 (Sonovet-600, Medison, Korea)를 이용하여 30 일, 60일, 90일에 각각 임신 유무를 확인하였다.

3 생산된 체내 및 체외수정란 발달능 및 유전자 발현조사

가. 체내 및 체외에서 생산된 7일째 배반포의 염색체 이상빈도분석

1) 염색체 분석

- ㉠ 0.05 ug/ml colcemide 용액에서 3시간 처리하여 수정란 각 할구의 cell cycle을 metaphase 로 arrest 시킨다.
- ㉡ 저장액인 1% sodium citrate 용액에서 swelling을 유도한다.
- ㉢ 수정란을 slide위에 올리고acetic acid : methanol (1:1, v/v)을 dropping 한다.
- ㉣ spread 하고, acetic acid : methanol (1:3, v/v)에 24시간 고정한다.
- ㉤ 고정된 slide를 건조 후 4% Giemsa 용액으로 염색한다.
- ㉥ 400-1000x에서 염색체 분석을 실시한다. 염색체의 분석은 haploid, diploid, polyploid 및 mixoploid로 구분한다.

나. 발생된 배반포에서 apoptosis, telomerase activity발현 비교 분석

1) Telomerase activity 분석

TRAPezea Telomerase Detection 의 원리는 다음과 같다.

step 1 : 세포나 조직의 extract에 있는 telomerase에 의해서 substrate로 사용되는 oligonucleotide (TS)의 3' 말단에 수많은 telomeric repeats (GGTTAG)가 첨가

step 2 : telomerase에 의해 길어진 TS에 RP(reverse) primer가 결합하여 PCR 방법에 의해 6개의 base만큼 증가된 product들이 규칙적으로 생성됨

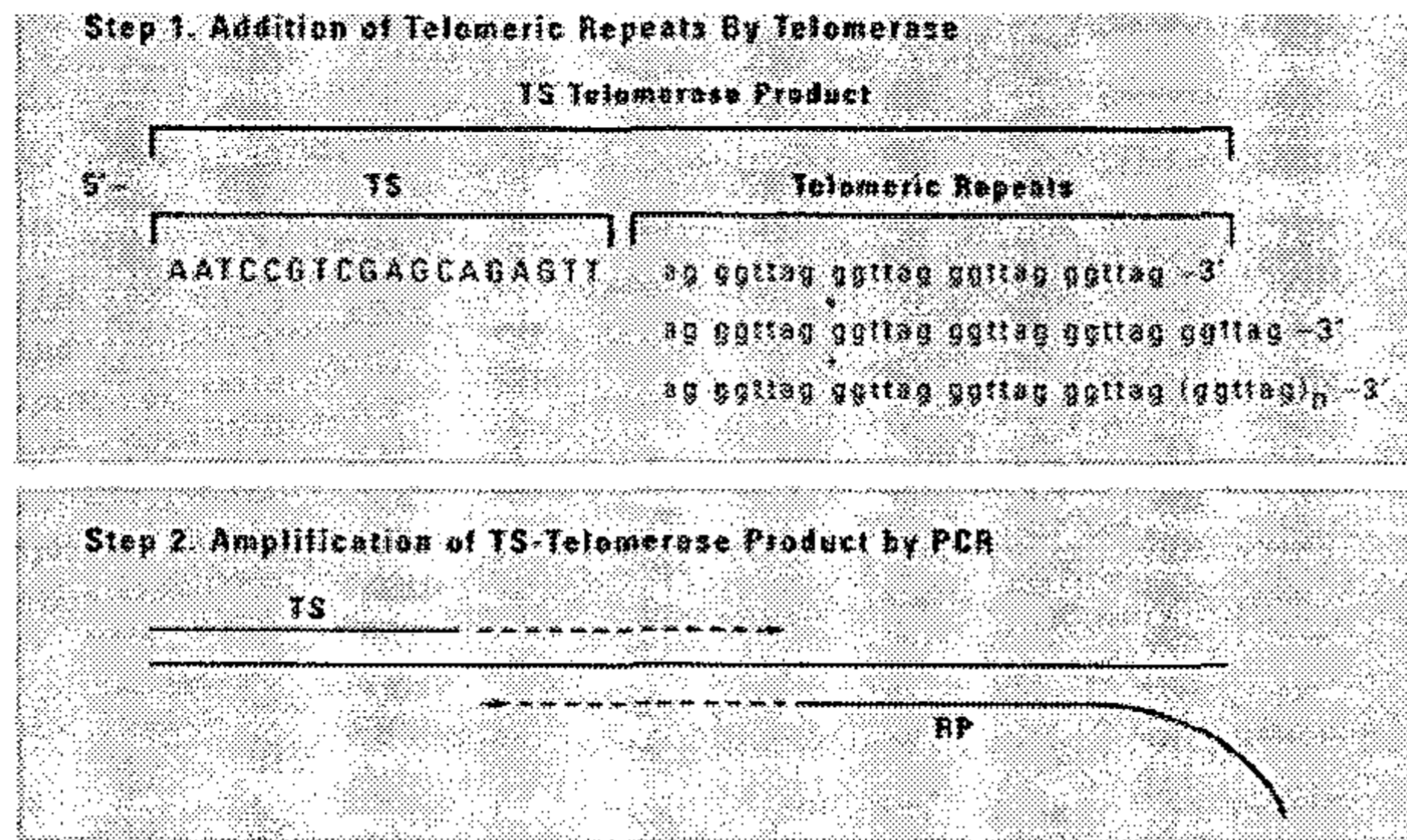


Fig.2. TRAPeze Telomerase Detection Kit Assay Scheme

2) Apoptosis 발현 분석

수정란에서 apoptosis를 확인 할 수 있는 방법 중 하나로 TUNEL 염색 방법이 있는데 세포 내에 apoptosis가 일어나면 endogenous endonucleases에 의해 chromosomal DNA가 절단되어 180-220 bp fragments를 형성하게 된다. Apoptosis detection system, Fluorescein은 이러한 절단 DNA의 3-OH 말단에 fluorescein-12-dUTP를 incorporation하는 것이다. TUNEL 염색방법은 다음과 같이 실시한다.

- ㉠ 수정란을 PBS (1 mg/ml PVP)로 washing 한 후 4% paraformaldehyde 용액으로 실온에서 1시간 동안 고정 한다.
- ㉡ PBS/PVP에 washing 하고 poly-L-lysine으로 coating된 slide에 얹고 실온에서 24시간 동안 dry 시킨 후, PBS/PVP가 든 Coplin jar에 slide을 2분씩 담가서 수세한다.
- ㉢ Permeabilisation 용액 (0.5% Triton X-100, 0.1% sodium citrate)에서 실온에서 1시간 동안 처리한 후, 다시 세척한다.
- ㉣ DNase (50U/ml)에서 negative control 수정란을 37℃에서 1시간 동안 incubation 시키고, 다시 세척한다.
- ㉤ 건조시킨 다음 TUNEL reaction mixture를 첨가하고 암실에서 37℃에서 1시간 incubation 시킨다. Negative control은 enzyme terminal transferase가 없이 incubation 시키고 세척한다.
- ㉥ RNase A (50ug/ml) 용액에서 1시간동안 slide을 incubation 시킨다.
- ㉦ 건조시킨 다음 propidium iodide (20 ug/ml)을 첨가하여 실온에서 1시간 동안 방치한다.

- ⑤ Antifade를 slide 위에 첨가하고 coverslip를 sample 위에 얹은 후, 형광현미경 하에서 fluorescent nuclei의 숫자를 센다. Total cell 수는 red color로 확인하고, apoptotic cell은 green 혹은 yellow color로 확인한다. 확인 후 apoptosis의 발현율을 total cell 수에 비례해서 백분율로 표기한다.

다. Comet assay에 의한 DNA damage 분석

- ① Comet assay 를 이용한 단일 수정란의 DNA damage 분석
- ② 수정란을 PBS+PVP (4mg/ml) 에 씻는다
- ③ 200 μ l의 37°C, 1% low melting temperature agarose (Bio-Rad o., CA) in PBS 에 수정란을 넣는다
- ④ agarose를 35 mm 디쉬에 넣은후 tereodissecting icroscopeto를 이용하여 수정란을 보이게 한 후 부드럽게 섞는다.
- ⑤ 10 μ l를 microscope slide glass (Matsunami Co., Japan)에 뿌린 후, 1% high-melting temperature agarose (Bio-Rad)에 넣는다.
- ⑥ slides의 agarose를 굳게 하기 위하여 5분동안 얼음에 둔다.
- ⑦ 할구를 용해한 후, 2시간동안 lysing buffer (10 mM Tris, pH 10, containing 1% sodium sarcosinate, 2.5 mM NaCl, 100 mM Na₂-EDTA, and 1% Triton X-100)에 넣어 DNA를 denature시키고 RNA를 degrad 시킨다.
- ⑧ Slide를 lysing solution에서 빼낸후, horizontal gel electrophoresis unit (Atto Co. Tokyo, Japan)에 둔다.
- ⑨ unit에는 electrophoresis buffer (1mMNa₂-EDTA, 300mMNaOH)를 0.25 cm 높이까지 채우고 20분동안 equilibrat 시킨다.
- ⑩ 20 분, 25 V에서 Electrophoresis를 실시한다.
- ⑪ 5분동안 실온에서 슬라이드를 중화한다.(0.4M Tris-HCl (pH 7.5))
- ⑫ DNA를 확인하기 위하여 20 μ l의 ethidium bromide (20 μ g/ml)를 슬라이드에 넣고 cover slide를 덮는다.
- ⑬ excitation filter는 510 - 60 nm, barrier filter는 590 nm로 하여 관찰한다.

라. Xist 발현 비교 분석

- ① 체내수정란과, 5 %, 20 % CO₂에서 생산한 수정란에서 poly (A) RNA를 Dynabeads mRNA DIRECT kit (Dyna, A.S, Oslo, Norway)를 이용하여 추출한다.
- ② oligo (dT)20 primers and superscriptTM III reverse transcriptase (Invitrogen Corporation, CA, USA)를 이용하여 Poly RNA를 cDNA로 전환한다.
- ③ LightCycler[®] using FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)을 이용하여 real time pcr을 실시한다.

Xist gene과 성감별에 사용된 Y chromosome specific gene에 대한 내용은 다음과 같다.

Table 12. Y chromosome specific gene profile

	Sequence	Anealing temp.	Frag. size(bp)
Xist	5' GCATAGCACCTCGCTACCGTCTCT 3' AACGATCATCTGCGATCCATTCTG	63	358
Y chromosome	5' CCTCCCCTTGTTCAAACGCCCGGAATCATT 3' TGCTTGACTGCAGGGACCGAGAGGTTTGGG	60	210

4 이식 및 수태율 향상과 태아 적출 및 한우 송아지 생산 및 분석

수태율 향상을 위하여 수정란의 기원과 공란우의 상태가 수태율에 어떠한 영향을 미치는지에 대하여 알아보았다.

가. 수정란 이식

- ① 0.25 ml straw 에 HEPES-TALP 에 10% (v/v) FCS, 0.2 mM sodium pyruvate, 0.025 mg/ml gentamicin sulfate , 100 µM β-mercaptoethanol을 넣은 후 수정란을 로딩함

나. 수태율 향상을 위해 trophoblast 공이식 및 GnRH의 효과 비교 조사

- ① 발정기의 한우 및 유우에 GnRH 200ug을 정맥주사 함 (day 0)

- ② 새로운 난포 cycle 및 우세 난포가 형성이 되기 시작하면 Day 7일째에 황체 퇴행을 위해 PGF₂a 25mg을 근육주사함
- ③ PGF₂a 투여 후, 2일째에 GnRH를 추가로 200ug 정맥주사 함
- ④ GnRH 주사후, 24~32시간에 배란이 동기화되며 이때 인공수정 (AI) 을 시행
- ⑤ Day 7일째에 flushing을 하여 수정란을 회수
- ⑥ Day 17일째 수정란 이식을 시행하며 이때 trophoblast를 함께 이식 함
- ⑦ 수란우로는 자연발정우와 발정동기화우를 사용하였으며, 자연발정우는 처녀우와 착유우를 사용하였음

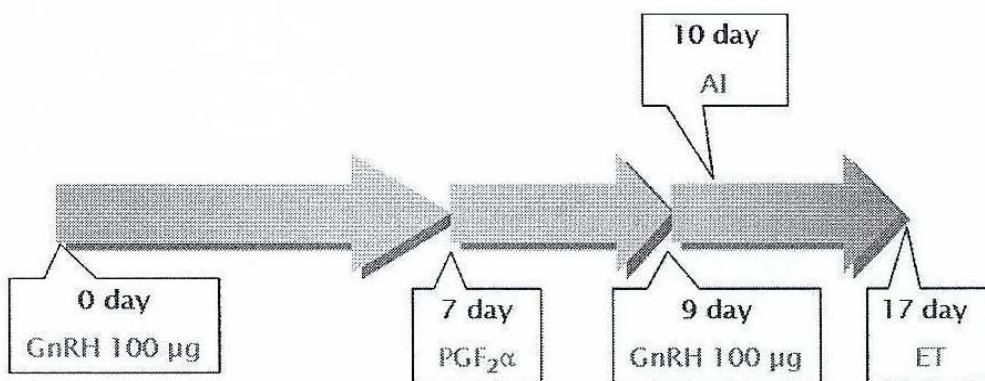


Fig 3. Recipient preparation

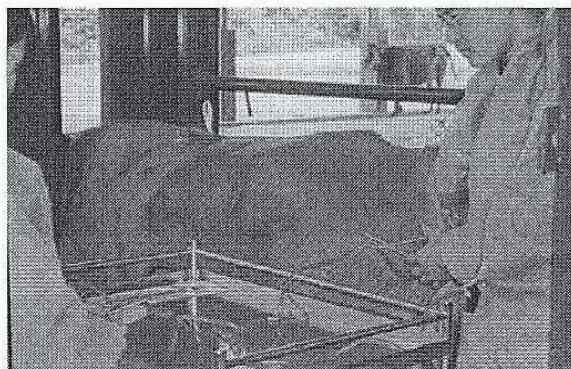


Fig 4. In vivo embryo collection

다. 임신감정

7.5 MHz trans-rectal probe가 연결된 초음파 (Sonovet-600, Medison, Korea)를 이용하여 30 일, 60일, 90일에 각각 임신을 측정하였다.

5. 각 임신기별 태아의 유전자 발현분석

가. RNA 추출과 역전사

2~4 세포기, 8~16 세포기, 상실배기, 배반포기 수정란 5개에서 각각 Poly (A) RNA 를 Dynabeads mRNA DIRECT kit (Dyna, A.S, Oslo, Norway)를 이용하여 추출한다.

Poly (A) RNA 를 oligo (dT)20 primers and superscriptTM III reverse transcriptase (Invitrogen Corporation, CA, USA)를 20 μ l 넣은 후 50°C에서 50분간 반응 시켜 cDNA로 전환한다.

나. Real-Time PCR

MgCl₂, dNTP, FastStart Taq DNA polymerase가 포함되어 있는 FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)을 사용하여 LightCycler®에서 real time pcr을 실시한다. DNase I을 처리한 cDNA 2.0 μ l와 11.6 μ l 의 H₂O PCR grade, 2.4 μ l MgCl₂ stock, 2 μ l SYBR Green mix 2 μ l의 프라이머 each of forward and reverse bovine specific primers를 포함한 18 μ l의 master mix 에 넣은 후 아래와 같은 조건으로 real time PCR을 실행한다. Melt curve analysis를 확인 한 후, agarose gel에서 밴드 크기를 확인한다.

- denaturing cycle : 10 min at 95°C; 45-50 cycles

(95°C for 10 sec, 57°C for 5 sec, and 72°C for 10 sec)

- melting cycle : at 95°C 0 sec, 70°C 15 sec

- step cycle : at 70°C until 95°C with a 0.1°C/sec transition rate

- cooling cycle : at 40°C for 30 sec

Table 1. Primer sequence and gene bank accession numbersReal time PCR

Gene	Primer sequence	Accession No.
<i>Glut-1</i>	Sense	ctgatcctgggtcgcttcat
	Antisense	acgtacatgggcacaaaacca
<i>Glut-5</i>	Sense	catctccatcatcgtcctca
	Antisense	gtagatggtggtgaggagac
<i>MnSOD</i>	Sense	cccatgaagcctttctaactctg
	Antisense	ttcagaggcgctaactttcctcc
<i>Sox</i>	Sense	aagcgattggagatgaact
	Antisense	ctggacttccttcgagatcg
<i>Hsp70</i>	Sense	aaggtgctggacaagtccaggaggatga
	Antisense	acttgaagtaaacagaaacgggtgaaaa
<i>G6PDH</i>	Sense	cgctgggacggggtgcccttcac
	Antisense	cgccaggcctcccgcagttcatca
<i>Cx43</i>	Sense	tggaatgcaagagaggtgaaagagg
	Antisense	aacactctccagaacacatgatcg
<i>PRDX5</i>	Sense	agccatggccccgattaagg
	Antisense	aagtgtttattgcagaaatttg
<i>NADH</i>	Sense	atggataggagagtggaagaatt
	Antisense	aaccaccataacattgctaac
<i>Bax</i>	Sense	aaaccctagtgccatc
	Antisense	gacgtcaggctactggtgcc
<i>Bcl2</i>	Sense	ctacctccaccatgccaagt
	Antisense	gggacgtcaggctactgaa
<i>VEGF</i>	Sense	cgaagctggacaaggagaag
	Antisense	aaagtgagccccacatcg
<i>IFN-τ</i>	Sense	cccgtacctgaagaccaagt
	Antisense	ggttcagcagcttaccatt

2 절 연구내용 및 결과

1 체외수정란 생산 체계 확립

체외수정란의 질을 높이고 안정적인 공급을 하기 위하여 최상의 체외배양 조건을 알아 보았다.

Table 1. Effect of estradiol and cysteine during IVM on nuclear maturation

Group	No. oocytes examined	No. (%) of oocytes ^a			
		Abberations	GV	MI	MII
Control	35	1 (3)	1 (4) ^a	8 (23) ^b	25 (70) ^a
(+) Estradiol	40	3 (7)	10 (27) ^b	17 (42) ^a	10 (24) ^c
(+) Cysteine	37	2 (4)	2 (6) ^a	10 (27) ^b	23 (73) ^a
(+) Est + Cys	46	2 (5)	6 (13) ^a	17 (36) ^a	21 (56) ^b

*GV, germinal vesicle; MI, metaphase I; MII, metaphase II

^{a,b,c} Values within column with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$), 3 replicates

표 1은 체외성숙 시 hormone (estradiol)과 antioxidant (cysteine)에 의한 핵 상태의 변화를 조사한 결과이다. Control군과 cysteine 첨가군 사이에는 유의적인 차이가 없었지만, estradiol 첨가군 및 estradiol + cysteine 첨가군 간에는 유의적으로($P < 0.05$) 차이가 있었다.

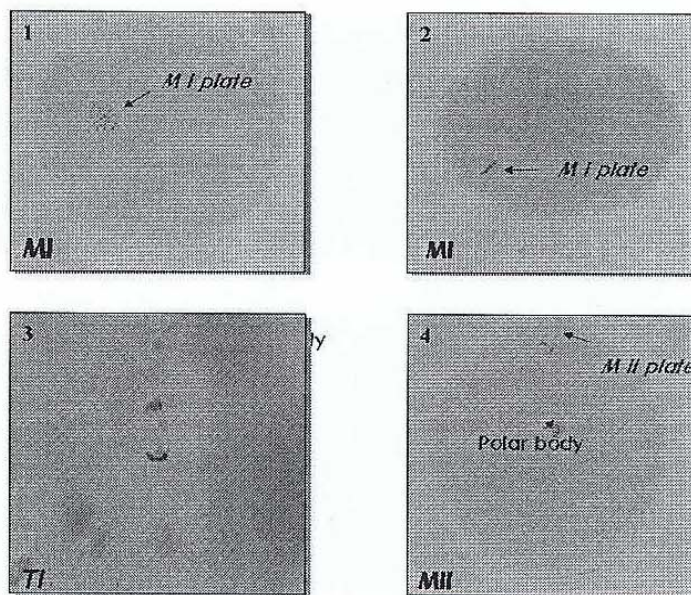


Fig 1. The status of nuclear of bovine oocyte

Table 2. Effect of estradiol and cysteine during IVM on microtubule pattern

Group	No. oocytes examined	No. (%) of oocytes	
		Normal	Reduced/Disrupted
Control	40	27 (68) ^a	13 (32)
(+) Estradiol	35	13 (37) ^b	22 (63)
(+) Cysteine	31	22 (71) ^a	9 (29)
(+) Est + Cys	33	20 (62) ^a	13 (38)

^{a,b} Values within column with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$), 4 replicates

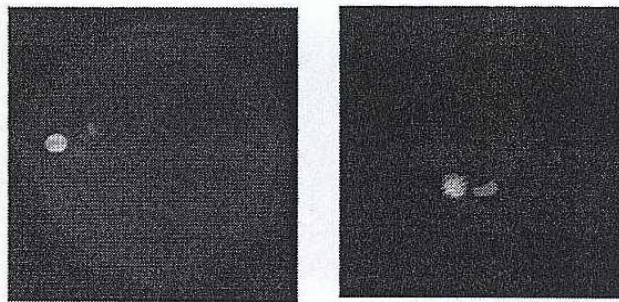


Fig. 2. The status of microtubule at MII stage bovine oocyte

표 2는 체외성숙시 hormone(estradiol)과 antioxidant(cysteine)에 의한 microtubule의 변화를 조사한 결과이다. Estradiol 첨가군에서의 정상적인 microtubule의 양상은 control 및 cysteine첨가군, estradiol + cysteine 첨가군보다 유의적으로($P < 0.05$) 낮게 나타났다. 그림 2는 감수분열 제2 증기의 미세소관의 모습이다. 빨간색은 핵이며 노란색은 미세소관을 나타낸다.

Table 3. Effect of estradiol and cysteine during IVM on mitochondria pattern

Group	No. oocytes examined	No. (%) of oocytes	
		Normal	Reduced
Control	29	1 (75) ^{ab}	1 (24)
(+) Estradiol	32	3 (52) ^c	10 (48)
(+) Cysteine	33	2 (80) ^a	2 (20)
(+) Est + Cys	31	2 (72) ^b	6 (28)

^{ab,c} Values within column with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$), 4 replicates

표 3은 체외성숙 시 hormone(estradiol)과 antioxidant(cysteine)에 의한 mitochondria의 변화를 조사한 결과이다. 정상적인 mitochondria양상은 cysteine 첨가군이 다른 군보다 유의적으로($P < 0.05$) 높게 나타났으며, estradiol 첨가군은 다른 군보다 유의적으로($P < 0.05$) 낮은 결과를 보였다.

Table 4. Effect of estradiol and cysteine after IVF on pronuclear formation

Group	No. oocytes examined	No. (%) of oocytes*				
		1PN	2PN	1PN+IS	MII+1PN	MII+IS
Control	57	9 (16) ^{ab}	32 (56) ^a	5 (9) ^b	5 (8)	6 (11)
(+) Estradiol	64	15 (23) ^a	22 (35) ^b	17 (26) ^a	4 (6)	6 (10)
(+) Cysteine	52	7 (13) ^b	28 (53) ^a	6 (12) ^b	5 (9)	6 (13)
(+) Est + Cys	68	12 (18) ^{ab}	32 (47) ^b	8 (12) ^b	6 (8)	10 (15)

*1PN, unfertilized(female nucleus);2PN, normal fertilized;1PN+IS, female pronuclei + intact sperm;MII + 1PN, female MII+male pronuclei;MII + IS, female MII+ intact sperm

^{ab} Values within column with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$), 5 replicates

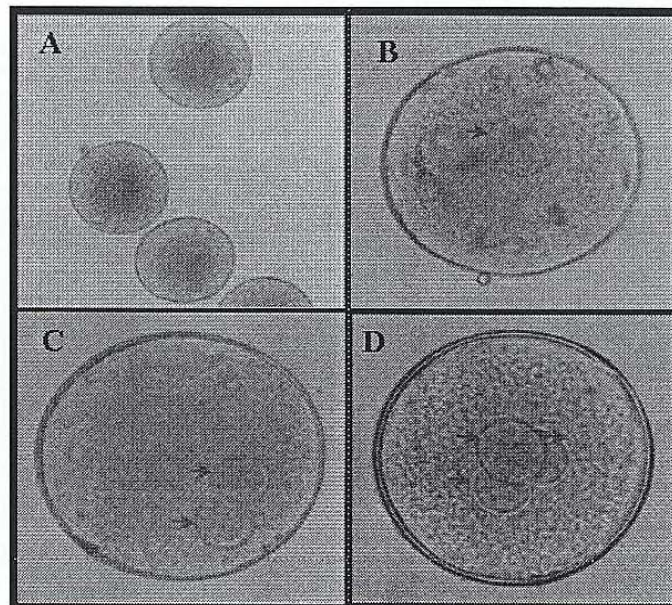


Fig. 3. PN formation of oocyte at 17 h post fertilization (A, 100 ; B-D, 400)

A. Oocytes B. 1 PN oocyte C. 2 PN oocyte D. 3 PN oocyte

표 4는 체외성숙 시 첨가한 hormone(estradiol)과 antioxidant(cysteine)에 의한 체외수정 후의 전핵 형성 변화를 조사한 결과이다. 2PN 형성은 control군과 cysteine첨가군이 estradiol 첨가군과 estradiol + cysteine 첨가군보다 유의적으로($P<0.05$) 높게 나타났다. 1PN+IS의 경우, estradiol 첨가군이 다른 군보다 유의적으로($P<0.05$) 높게 나타났다. 그림 3은 수정후 17 시간 후의 전핵형성의 모습이다.

Table 5. Effect of serum on development of bovine zygotes in different culture media

Group	No. oocytes examined	Development to (%)		Cell number mean±SEM
		Cleaved	Blastocysts	
TCM199 + FBS	35	26 (74)	6 (16) ^b	91±7
CR1aa + BSA	46	31 (68)	6 (14) ^b	82±7
CR1aa + FBS	42	31 (74)	8 (19) ^{ab}	86±4
SOFaa + BSA	37	26 (70)	9 (24) ^a	94±8

^{ab} Values within column with different superscripts differ significantly ($P<0.05$), 3 replicates

표 5는 각각 배양조건에 따른 수정란의 발달을 및 세포수를 조사한 결과이다. 각 군간 분할율에는 유의적인 차이가 없었으나, 배반포 형성율에 있어 SOF 배양액이 다른 군에 비해 유의적으로($P<0.05$) 높은 결과를 보였다.

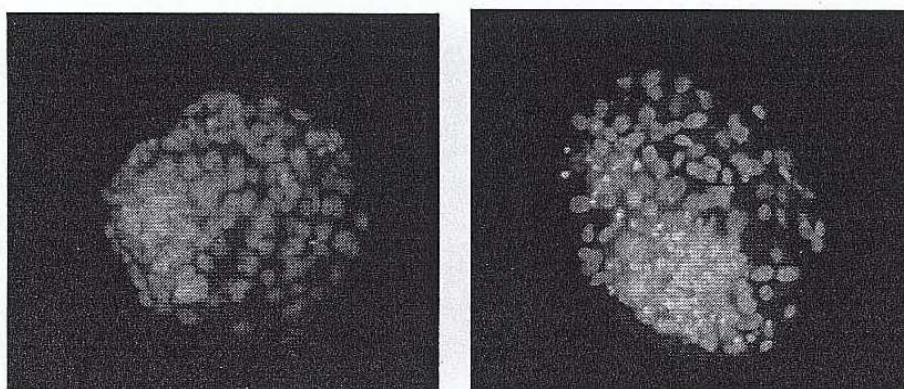


Fig. 4. Cell number of embryos on day 7

Left, in vitro blastocyst; right in vivo blastocyst

Table 6. Effect of cysteine on development of bovine zygotes in SOFaa under 5% or 20% oxygen

Group	No. oocytes examined	Development to (%)		Cell number mean±SEM
		Cleaved	Blastocysts	
5% O ₂				
(+) Cysteine	68	52 (76) ^a	16 (24) ^a	94±7
(-) Cysteine	62	45 (74) ^a	14 (20) ^a	95±7
20% O ₂				
(+) Cysteine	64	45 (68) ^b	10 (15) ^b	96±6
(-) Cysteine	71	46 (65) ^b	9 (13) ^b	86±4

^{a,b} Values within column with different superscripts differ significantly (P < 0.05), 4 replicates

표 6은 산소 농도(5% or 20% O₂) 및 antioxidant(cysteine)에 따른 수정란의 발달을 및 세포수를 조사한 결과이다. 분할율 및 배반포 형성을 모두, 20% O₂에 비해 5% O₂에서 유의적으로(P<0.05) 높게 나타났다. Cysteine 첨가군이 비 첨가군보다 분할율과 배반포 형성에 있어 높은 경향을 보였다. 그림 4는 7일째 배반포의 총 세포수를 나타낸 사진이다.

➔ ① 체외성숙 환경

기본적인 배양 조건인 TCM-199에 sodium pyruvate (56 µg/ml), streptomycin (100 µg/ml), penicillin G (100 units/ml)와 hormones으로는 LH (10 µg/ml), FSH (10 µg/ml)를 사용하였으며, Cysteine (0.6 mM)이 첨가된 군이 7β-Estradiol (1 µg/ml)을 넣은 군보다 유의적으로 높은 핵발달율과 정상적인 미세소관, 미토콘드리아 분포를 보였다. 또한 수정후 전핵형성에 있어서도 향상된 결과를 보였다.

② 수정란의 체외배양

complex-media인 TCM199 배양액과 simple media인 SFaa에서 유의적으로 높은 체외 배발달율을 확인하였다.

③ 산소농도

농도(5% or 20% O₂) 및 antioxidant(cysteine)에 따른 수정란의 발달을 및 세포수를 조사한 결과, 분할율 및 배반포 형성을 모두, 20% O₂에 비해 5% O₂에서 유의적으로(P<0.05) 높게 나타났다. Cysteine 첨가군이 무첨가군보다 다소 높은 분할율과 배반포유임을 확인할 수 있었다.

2 체내수정란 회수 방법 확립

기존에 적용되어지고 있는 발정동기화 방법의 문제점을 보완하고 공란우의 발정동기화 및 과배란 유기 기법 개발에 꾸준한 연구를 수행하여 체내 수정란 대량 생산의 효율을 높일 수 있었다.

Table. 7. Ovary response and embryo production by different superovulation treatments

Group	Treatment	No. of cows	Mean \pm S.D.	
			No. of corpus luteum	No. of recovered ova/embryos
A	FSH 400 mg - Multiple	23	11.2 \pm 5.1	8.5 \pm 5.0
B	FSH 400 mg - Single	10	18.5 \pm 7.5	10.4 \pm 7.2
C	FSH 200 mg - Single	23	13.1 \pm 5.1	8.7 \pm 5.1
D	FSH 200 mg - CIDR + Single	32	13.9 \pm 6.4	7.9 \pm 6.0

표 7은 각기 다른 과배란 처리방법에 따른 황체수와 수정란 생산에 관한 결과이다. 과배란 처리는 400mg와 200mg을 multiple dose와 single dose로 처리하였으며 각각을 A,B,C,D 로 나누어 확인하였다. 황체수에 비하여 회수되어진 난소의 수는 작았다 하지만 과배란 처리 방법에 따른 차이는 보이지 않았다.

Table. 8. Embryo quality by different superovulation treatments

Group	Treatment	No. of non-fertility ovum	No. of degeneration	No. of transferable embryo
A	FSH 400 mg - Multiple	2.7 \pm 4.2	1.9 \pm 2.0	3.9 \pm 3.1
B	FSH 400 mg - Single	2.6 \pm 3.6	3.5 \pm 4.1	4.3 \pm 4.0
C	FSH 200 mg - Single	1.8 \pm 2.8	2.2 \pm 2.2	4.7 \pm 3.9
D	FSH 200 mg - CIDR + Single	2.4 \pm 4.2	1.9 \pm 1.6	3.7 \pm 3.8

표 8은 과배란 처리 방법에 따라 생산된 수정란의 퀄리티를 조사한 결과이다. 각 처리방법에 따라 회수된 수정란은 미수정란, 변성란, 이식가능한 수정란으로 분류하였으며, 각 군과의 유의적 차이는 보이지 않았다.

Table. 9. Pregnancy rate by different superovulation treatments

Group	Treatment	No. of transferred recipients	No. of pregnant recipients	Pregnancy rate (%)
A	FSH 400 mg - Multiple	8	4	50.0
B	FSH 400 mg - Single	11	4	36.4
C	FSH 200 mg - Single	26	12	46.2
D	FSH 200 mg - CIDR + Single	25	9	36.0

표9에서는 각기 다른 과배란 처리방법에서 생산된 수정란의 이식후 수태율에 관한 결과이다. 수태율은 400mg multiple injection이 다른 처리구에 비해서 다소 높았으나 유의적 인 차이는 없었습니다 앞서 결과에서 말씀 드렸듯이 FSH 200mg의 1회투여가 수정란의 회수율과 이식가능한 수정란의 생산량, 이식수 수태율에 관한 성적이 50mg씩 다회투여와 400mg 1회투여한것과 비교하여 유의적인 차이가 없으므로 200mg 1회 투여법이 처리방법을 간소화하고 처리비용을 줄일 수 있는 방법이라고 사료된다. 또한 200mg 1회 투여시 자연발정 주기중에 처리한 군과 CIDR를 전처리한 군의 수정란의 회수율과 이식가능한 수정란의 생산량 역시 유의적인 차이를 나타내지 않아서 CIDR를 전처리 함으로써 동시에 여러마리 공란우의 과배란 처리가 가능하여 수정란을 대량 확보할 수 있는 방법이라 사료된다.

➡ 발정주기 9일에서 13일사이의 공란우를 이용하여, 4가지 다른 방법의 과배란처리를 하여 그 효율을 알아보았다. 첫 번째 방법은 FSH 50mg을 4일간 8회 투여하는 것이며, 두 번째 방법은 FSH 400mg을 4일간 1회 투여하는 것이며, 세 번째 방법은 FSH 200mg을 4일간 1회 투여하는 것이다. 마지막 방법은 이와 다르게 공란우의 발정주기와 상관없이 CIDR를 삽입하고 7일째 FSH 200mg을 1회 투여하는 것이다. 처리

후 모든 군에서 FSH를 처리한 후 3일째 발정유기 호르몬인 PG를 투여하여 발정을 유도하고 발정이 왔을 때 인공수정을 2회 실시하여 7일째 수정란을 회수하였다.

검진된 황체수와 회수된 난자수를 확인하고 미수정란의 수, 퇴행란의 수, 이식가능한란의 수를 알아보았다. 또한 임신율도 확인하였다. 모든 검사항목은 유의적인 차이를 보이지 않았다. 따라서 과배란 처리시 400 mg에 비하여 경제적으로 저렴한 200mg을 사용하는 방법이 경제적으로 우수하며, CIDR를 전처리하여 동시에 여러마리의 공란우의 과배란 처리가 가능한 DIDR 방법이 가장 효율적인 과배란 유도 방법이라 할 수 있다.

3 생산된 체내 및 체외수정란 발달능 및 유전자 발현조사

생산되어진 체내 및 체외생산 수정란의 분석을 진행하였다.

Table 10. Comparisons of chromosomal composition of D-7 blastocysts produced in vitro and in vivo

Group	No. oocytes examined	No. (%) Ploidy			
		Haploid	Diploid	Polyploid	Mixoploid
In vitro	33	0 (0)	28 (85) ^b	2 (6)	3 (9) ^a
In vivo	28	0 (0)	25 (91) ^a	1 (3)	2 (4) ^b

^{a,b} Values within column with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$), 5 replicates

표 10은 D7일째의 체내,외 수정란에서 염색체 이상을 조사한 결과로서, 체내유래 수정란이 체외 수정란에 비해 유의적으로($P < 0.05$) 높은 정상적인 염색체형을 보였다. 그림 5와 6은 karyotyping한 염색체의 모습이다.

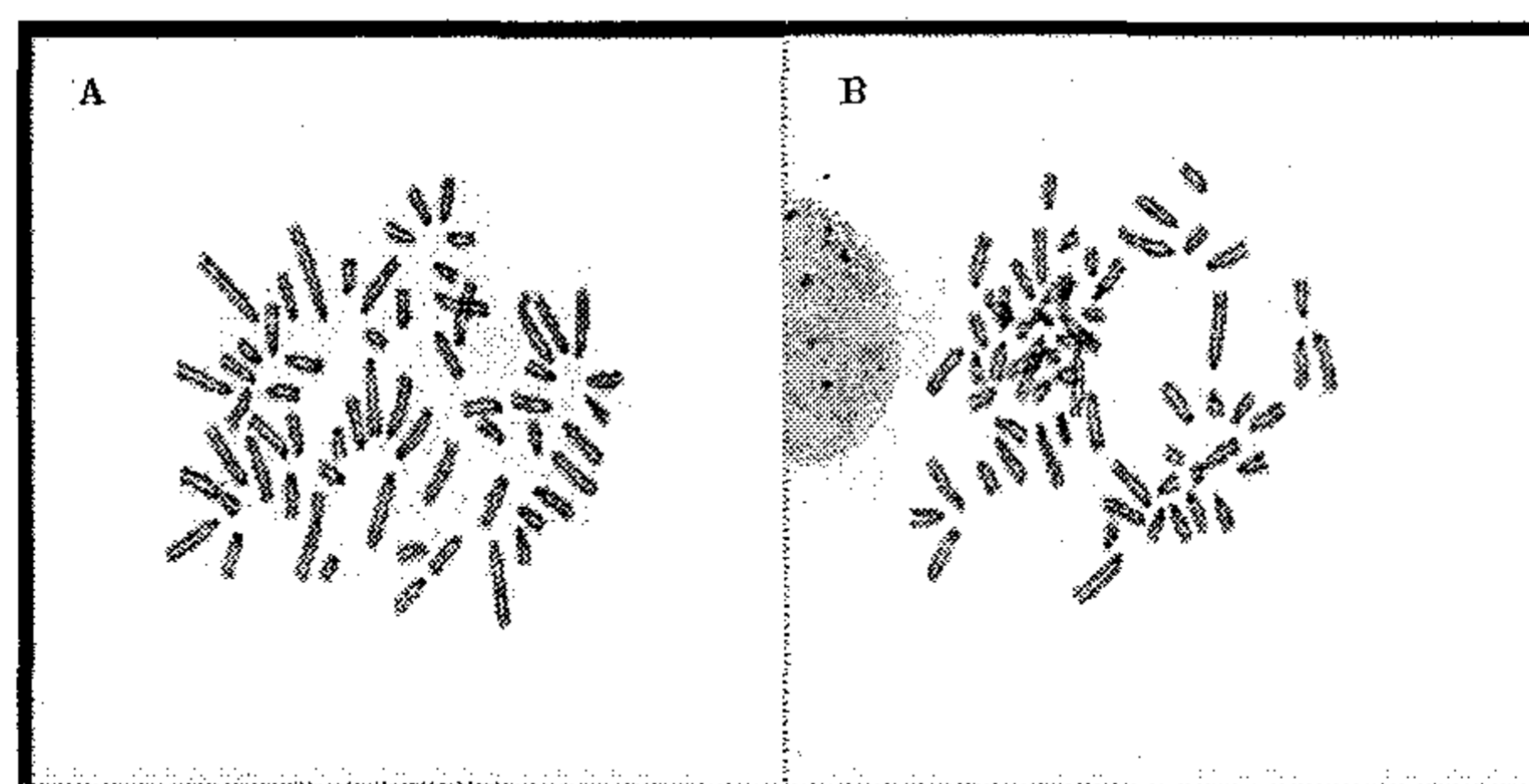


Fig. 5. Ploidy of embryos injected with sperm (X1000)

A. Diploid, XX . B. Diploid, XY .

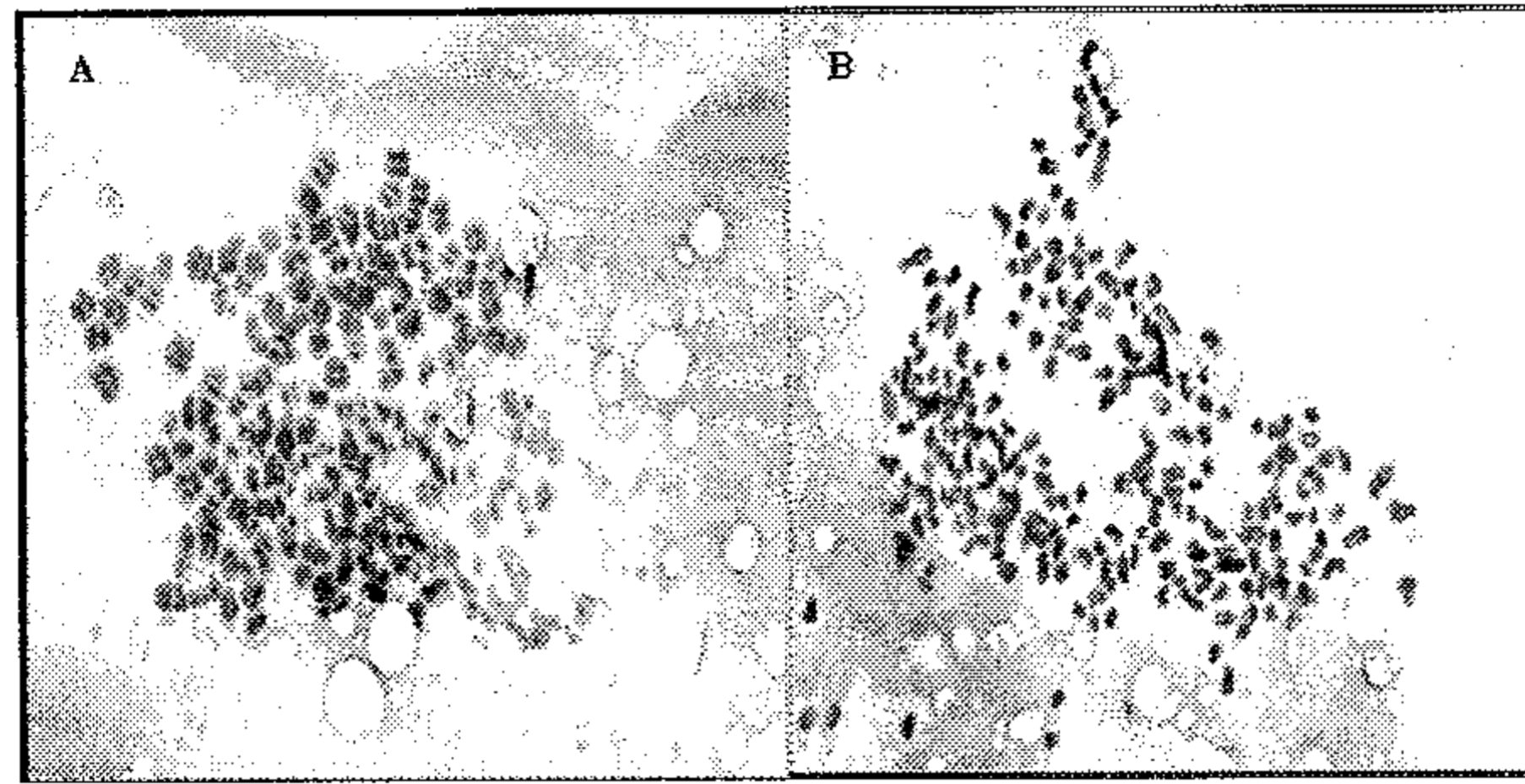


Fig. 6 Ploidy of embryos injected with sperm (X1000)
 A. Tetraploid, XY. B. Hexaploid, XY

Table 11. Comparison of total cell number, ICM ratio and apoptosis of in vitro and in vivo derived bovine blastocysts

Embryo source	Gas phase	Blastocyst used	Blastocyst		
			Total cell number	ICM ratio (%)	Apoptosis (%)
In vivo		15	220±32 ^a	25±3 ^a	6±1 ^a
In vitro	5% O ₂	44	140±11 ^b	32±6 ^b	10±2 ^b
	20% O ₂	39	122±9 ^b	34±6 ^b	15±2 ^c

Values with different superscripts within the same column differ significantly (P<0.05).

표12는 체외 수정란 생산시, 우수한 능력의 수정란 선택을 위하여, 각기 다른 산소 분압에서 배양된 체외수정란의 세포 수, ICM ratio 및 자가 사멸 비율을 체내수정란과 비교 조사한 것이다. 체내수정란의 세포 수는 220±32개로서 체외 수정란 140±11개 (5%)와 122±9(20%)개보다는 유의적 (P<0.05)인 차이를 나타내었다. 수정란의 질적 평가에 직결되는 세포 수는 체내 수정란이 체외수정란보다 유의적(P<0.05)으로 높았다. ICM ratio는 체내 수정란에서는 25±3%로서 체외수정란 32±6(5%)와 34±6(20%)보다는 유의적 (P<0.05)인 차이를 나타내었다. 자가 사멸 빈도에 있어서도 체외 수정란이 10-15%의 수준을 보여 체내수정란의 6%보다 유의적(P<0.05)으로 높게 나타났다. 산소 분압에 따른 체외수정란 간의 비교 분석에 있어서 5% 산소분압에서 배양된 체외 수정란이 20% 산소분압에서 배양된 수정란보다 세포 수 (140±11 vs. 122± 9)는 유의적(P<0.05)으로 높게 나타났고, 자가 사멸 발현율 (10±2 vs 15±2)은 유의적으로 낮게 나타났으나, ICM율 (32±6 vs. 34±6)은 두 군간 유의적 차이를 보이지 않았다. 이상의 결과를 조합하여 볼때 수정란 이식 시, 5% O₂에서 배양한 수정란을 사용하였다.

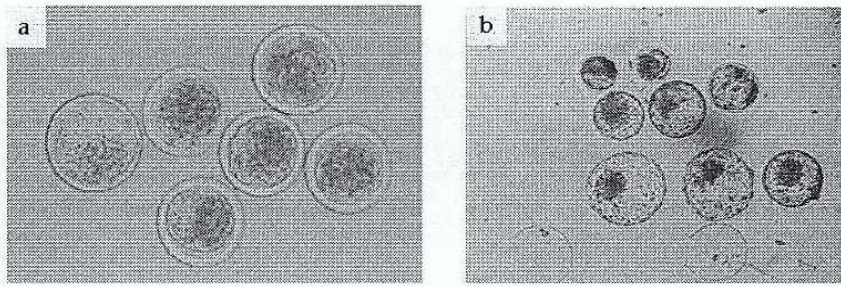


Fig 7. Day 7 blastocysts produced in vivo and in vitro
a, in vivo blastocysts; b, in vitro blastocysts

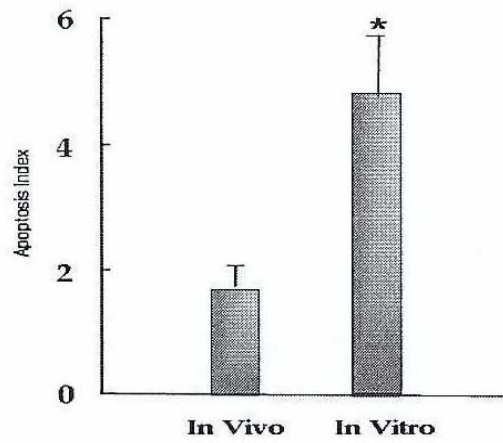


Fig. 9. Apoptosis index of D-7 blastocysts produced in vivo and in vitro

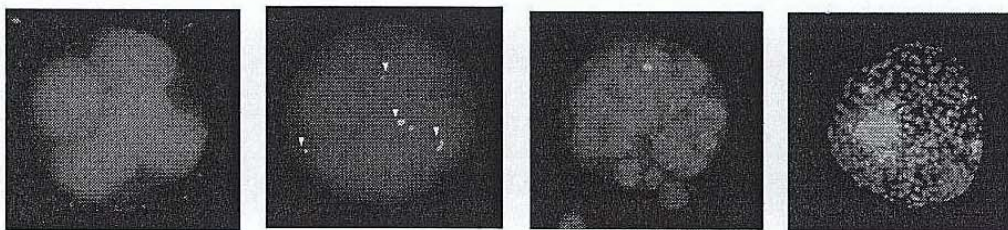


Fig. 10. Detection of apoptosis in IVF embryos by TUNEL.
A, 6-cell stage; B, 8-cell stage; C, morula stage; D, blastocyst

그림 9와 10은 D7일째의 체내,외 수정란에서 apoptosis 발생율을 조사한 결과이다. 체내 수정란(n=24)의 apoptosis 발현율이 체외 수정란(n=19)에 비해 유의적으로(P<0.05) 낮은 결과를 보이고 있다.

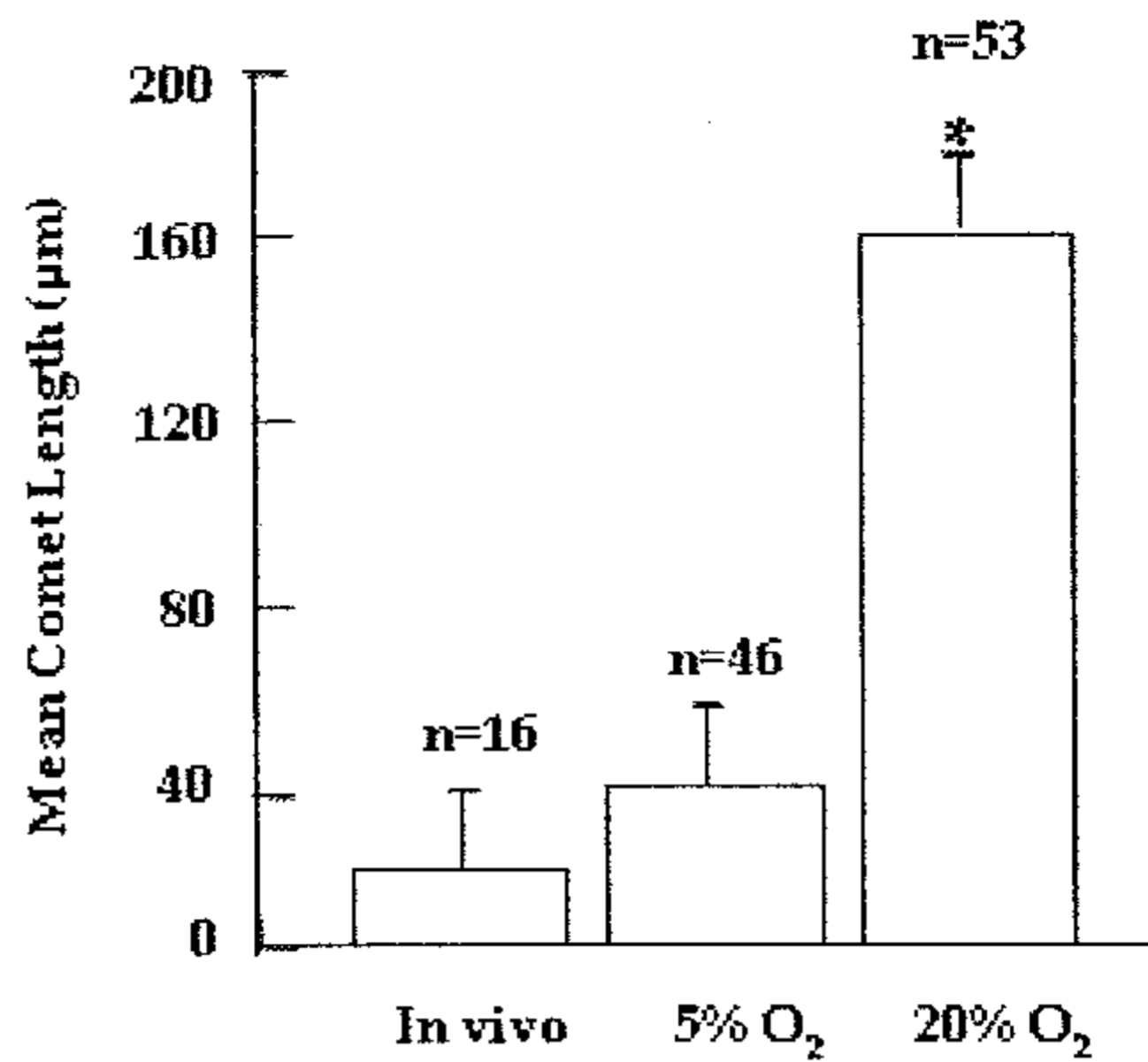


Fig. 11. Effect of oxygen concentration on DNA damage in individual bovine embryos.

Data show means standard error, n: number of embryos used after 4 replications.

*: significant difference ($P < 0.001$) compared to control group.

그림 11은 Comet assay를 이용하여 각 배반포에서의 DNA 손상 정도를 살펴본것이다. 체내 수정란 회수는 다음과 같이 시행하였다. 우선, 발정기의 한우 및 유우에 GnRH 200ug을 정맥주사 한 뒤(day 0)한다. 이 때부터, 새로운 난포 cycle 및 우세 난포가 형성 이 되기 시작하고, Day 7일째, 황체 퇴행을 위해 PGF2a 25mg을 근육주사한다. PGF2a 투여 후, 2일째에 GnRH를 추가로 200ug 정맥주사하였다. GnRH 주사후, 24~32시간에 배란 이 동기화되며 이때 artificial insemination을 시행한다. Day 7일째, flushing을 하여 수정란을 회수한다. 서로 다른 산소 농도하에서 배양한 배반포의 경우, 체내 수정란과 비교하여 5% 산소 농도에서 배양한 수정란이 체내 수정란과 유사한 결과를 보였으나, 20% 산소 농도에서 배양한 수정란은 유의적으로 낮은 ($P < 0.001$) 배반포율을 보였다.



Fig. 8. Telomerase activity of bovine blastocyst produced in vitro

BL, 5 % in vitro blastocyst; N, negative control; P, in vivo blastocyst

그림 8의 BL은 5% O₂에서 배양한 7일째 배반포의 telomerase activity이다. in vivo blastocyst에 비하여 짧은 activity를 확인할 수 있었다. 하지만 유의적인 차이는 보이지 않는다.

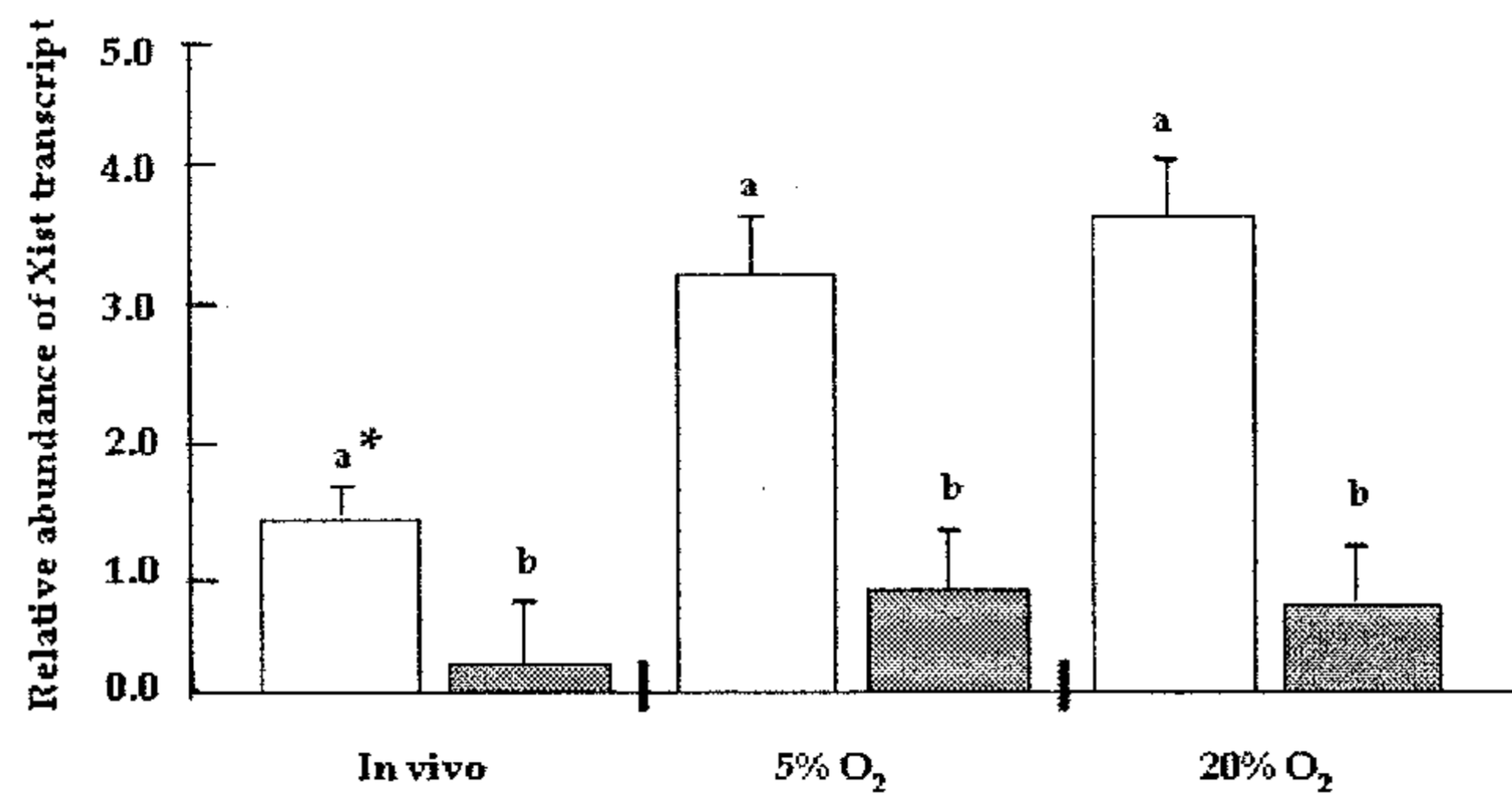


Fig. 12. Expression pattern of Xist transcripts in female (open) and male (closed) in vivo-generated and vitro-produced blastocysts. Bars with different superscripts within each treatment group differ significantly (a:b; *;P<0.05)

그림 12는 수정란 회수 시, 할구 분할법을 이용하여 성감별을 시행한 후, RT-PCR을 이용하여 기원 및 성에 따른 7일째 배반포에서의 Xist gene 발현 양상을 분석한 것이다. 모든 군에서 female embryo가 male embryo에 비해 유의적으로(P<0.05) 높은 발현 정도를 보이고 있으며, 체내 유래 female embryo가 체외 유래 embryo에 비해 유의적으로(P<0.05) 낮은 발현 양상을 보였지만 male embryo 들에서 기원에 따른 (체내, 체외) 각 군간 유의적인 차이를 보이지 않았다.

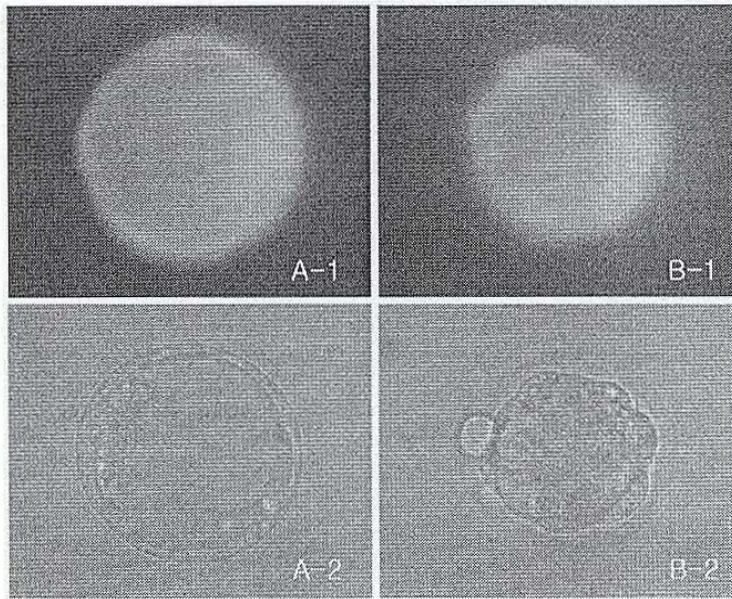


Fig. 13 Expression pattern of Hβ-58 after fertilization.

A-1/A-2 체내 수정후 Hβ-58유전자 발현 pattern

B-1/b-2 체외 수정후 Hβ-58유전자 발현 pattern

그림 13은 체외수정란의 발달시 발현되어지는 신규 유전자를 탐색하기 위하여 체내/외 수정란을 구별하여 착상에 직접적으로 관련되어지는 유전자 Hβ-58 유전자의 3'에 eGFP를 construction하여 micro-injection 한 후 체외 발달시킨 수정란의 모습이다.

➔ 체내수정란이 체외수정란에 비하여 유의적으로 높은 정상 염색체형과 총세포수를 보였고, 자가사멸빈도 (tunnel, comet assay)에 있어서는 낮은 수준을 보였다. 배반포의 telomerase activity를 살펴본 결과 체외수정란이 체내수정란에 비하여 적은 발현 양상을 보였으나 유의적인 차이를 보이지 않았고, 착상에 직접적으로 관련되어지는 유전자 Hβ-58 유전자의 발현 역시 유의적인 차이는 보이지 않았다. 체내유래 female embryo 와 male embryo, 체외유래 female embryo와 male embryo에서 각각 Xist 발현양상을 알아보았다. 모든 군에서 female embryo가 male embryo에 비해 유의적으로($P < 0.05$) 높은 발현 정도를 보이고 있으며, 체내유래 female embryo가 체외 유래 female embryo에 비해 유의적으로($P < 0.05$) 낮은 발현 양상을 보였지만 male embryo 간에는 체내수정란과 체외수정란사이의 유의적인 차이를 보이지 않았다.

4 이식 및 수태율 향상과 태아 적출 및 한우 송아지 생산 및 분석

수태율 향상을 위하여 수정란의 기원과 공란우의 상태가 수태율에 어떠한 영향을 미치는지에 대하여 알아보았다.

Table. 13. Parturition in recipients from different origins

Origins	No. of pregnant [†]	Results of parturition (%)		
		No. of abortion	No. of stillbirth	No. of calving
In vivo	20	2 (10.0)ab	1 (5.0)	17 (85.0)ab
In vitro*	52	9 (17.3)a	3 (5.8)	40 (76.9)a
AI**	72	2 (2.8)b	1 (1.4)	69 (95.8)b

[†] Recipient of heifer and cow

^{ab} P, 0.01,

표13은 수정란 기원에 따른 분만 결과를 나타내는 표로서, 체외 수정란의 경우 유산율이 인공수정 산자에 비해서 유의적으로 높게 나타났지만 기존보고들에 비하여 개선된 결과를 얻었다.

Table.14. Conception rate at different days of pregnancy following fresh embryo transfer in natural and synchronized bovine recipients with trophoblasts

Oestrus group	Recipient	treatment with trophoblasts	n	Conception (%) at different days			
				28	35	42	49
Natural	Heifer	No	7	6 (85.0) ^{Ba}	6 (85.0) ^{Ba}	6 (85.0) ^{Aa}	5 (71.0) ^{Ab}
		Yes	6	5 (83.0) ^{Ba}	5 (83.0) ^{Ba}	5 (83.0) ^{Aa}	4 (66.0) ^{Ab}
	Lactating cows	No	9	6 (66.0) ^{Ba}	6 (66.0) ^{Ca}	5 (55.0) ^{Cb}	4 (44.0) ^{Cc}
		Yes	8	8 (100.0) ^{Aa}	8 (100.0) ^{Aa}	7 (87.0) ^{Ab}	5 (62.0) ^{Bc}
Synchronized	Lactating cows	No	15	9 (66.0) ^{Ca}	8 (53.0) ^{Db}	8 (53.0) ^{Cb}	6 (40.0) ^{Cc}
		Yes	18	13 (72.0) ^{Ca}	13 (72.0) ^{Ca}	13 (72.0) ^{Ba}	12 (66.0) ^{Ab}

Values with different superscripts within the same column (A-C) and row (a-c)

differ significantly (P < 0.05).

체외수정란 이식 시, trophoblast 공이식에 유무에 따라, 임신 일령에 따른 자연 발정우와 발정 동기화우 간의 임신율을 조사한 결과는 표 14에서 보는 바와 같다. 자연 발정우군에서 임신 28일령에 처녀우는 trophoblast 공이식 여부에 따라 각각 85%, 83% 경산우는 66%, 100%의 임신율을 보여 trophoblast 공이식한 경산우에서 유의적으로($P < 0.05$) 높은 결과를 보였으며, 임신 일령이 진행되면서 처녀우는 49일령에 71%, 35일령에 66%로서 감소하기 시작하였고, 경산우는 trophoblast 공이식 하지 않은 군에서, 42일령에 55%로 감소하여 임신일령 28일과 비교해서 유의적 ($P < 0.05$) 감소를 보였으며, 공이식군에서는 42일령에 87%, 49일령에 62%로 유의적인 ($P < 0.05$) 감소를 보였다. 발정 동기화우군에서 trophoblast 공이식하지 않은 군에서 임신 28일령의 임신율은 66%, 35일령은 53%로서 유의적인($P < 0.05$) 차이가 나타났으며, 49일에도 40%로서 임신 일령 간에 유의성($P < 0.05$)을 나타내었다. Trophoblast공이식군에서는 28일령부터 42일령까지 유의적인 차이가 나타나지 않았으나, 49일령에 66%로 유의적인 ($P < 0.05$) 차이가 나타났다. 이로써 수정란 이식시, trophoblast 공이식의 임신율이 유의적으로 증가됨을 확인할 수 있었고, 수란우의 선정에 따라 임신율이 개선됨을 알 수가 있었다.

Table. 15. Conception rate at different days of pregnancy following fresh embryo transfer in natural and synchronized bovine recipients

Oestrus group	Recipient	n	Conception (%) at different days					
			28	35	42	49	60	90
Natural	Heifer	22	18 (82.0) ^{Aa}	17 (77.0) ^{Aa}	17 (77.0) ^{Aa}	14 (64.0) ^{Ab}	13 (59.0) ^{Ab}	13 (59.0) ^{Ab}
	Lactating cows	39	30 (77.0) ^{Aa}	28 (72.0) ^{Aa}	26 (67.0) ^{Bb}	22 (56.0) ^{Bc}	20 (51.0) ^{Bc}	19 (49.0) ^{Bc}
Synchronized	Lactating cows	50	31 (62.0) ^{Bb}	28 (56.0) ^{Ba}	27 (54.0) ^{Ca}	20 (40.0) ^{Cb}	18 (36.0) ^{Cb}	16 (32.0) ^{Cb}

Values with different superscripts within the same column (A-C) and row (a-c) differ significantly ($P < 0.05$).

체외수정란 이식 후 임신 일령에 따른 자연 발정우와 발정 동기화우 간의 임신율을 조사한 결과는 표 15에서 보는 바와 같다. 자연 발정우군에서 임신 28일령에 처녀우는 82%, 경산우는 77%의 임신율을 보여 두 군간 유의적 차이를 나타내지 않았으나, 임신 일령이 진행되면서 처녀우는 49일령부터는 64%로서 감소하기 시작하였고, 경산우는 42일령부터 67%로 서서히 감소하기 시작하여 임신일령 28일과 비교해서 유의적 ($P < 0.05$) 감소를 보

였다. 임신 90일령에서의 임신율은 처녀우군 59%과 경산우군 49%로서 60일령과 비슷한 경향을 나타내었다. 발정 동기화우군에서 임신 28일령의 경산우 임신율은 62%, 42일령은 54%로서 유의성을 나타내지 않았으나 49일령 이후부터는 40%로서 임신 일령 간에 유의성($P<0.05$)을 나타내었다. 그리고 자연 발정우군과 발정 동기화우군 간의 임신 일령별 임신율은 임신 28일령은 자연 발정우군은 79%, 발정 동기화우군은 62%, 임신 35일령의 자연 발정우군은 74%, 발정 동기화우군은 56%로 자연발정우군이 발정동기화우군 보다 유의적($P<0.05$)으로 높은 임신율을 보였다.

Table 16. Twinning rate at different days of pregnancy following fresh embryo transfer in natural and synchronized bovine recipients

Oestrus group	Recipient	n	Twining (%) at different days					
			28	35	42	49	60	90
Natural	Heifer	22	12 (55.0) ^{Aa}	11 (50.0) ^{Aa}	9 (41.0) ^{Ab}	6 (27.0) ^{Ac}	5 (23.0) ^{Ac}	4 (18.0) ^{Ac}
	Lactating cows	39	24 (62.0) ^{Aa}	23 (59.0) ^{Aa}	19 (49.0) ^{Ab}	12 (31.0) ^{Ac}	10 (26.0) ^{Ac}	8 (21.0) ^{Ac}
Synchronized	Lactating cows	50	20 (40.0) ^{Ba}	15 (30.0) ^{Bb}	15 (30.0) ^{Bb}	7 (14.0) ^{Bc}	7 (14.0) ^{Bc}	4 (8.0) ^{Bd}

Values with different superscripts within the same column (A-C) and row (a-c) differ significantly ($P < 0.05$).

체외수정란 이식 후 임신 일령에 따른 자연 발정우와 발정 동기화우간의 쌍태율을 조사한 결과는 표 16에서 보는 바와 같다. 자연 발정우군에서 임신 28일령에 처녀우는 55%, 경산우는 62%의 쌍태율을 보여 두 군간 유의적 차이를 나타내지 않았으나, 임신 일령 42일째 두 군 공히 유의적 ($P<0.05$) 감소를 보였다. 임신 90일령에서의 쌍태율은 처녀우군과 경산우군(18% vs. 21%)이 평균 20%의 쌍태율을 보였다. 그리고 임신 28일령 (59% vs. 40%), 임신 35일령 (56% vs. 30%), 임신 42일령 (46% vs. 30%), 임신 49일령 (30% vs. 14%), 임신 60일령 (25% vs. 14%), 임신 90일령 (20% vs. 8%)에 자연발정우군이 발정동기화우군 보다 유의적 ($P<0.05$)으로 높은 쌍태율을 보였다.

Table 17. Duration of gestation, birth weight and sex of offspring produced by the transfer of in vitro produced embryos

Recipient	No. of recipients	No. of calves	Gestation length (Days)	Birth weight (kg)	Sex (%)	
					Male	Female
Natural	28	36	280.1±4.4	26.4±3.8	23 (63.8)	13 (36.2)
Synchronized	15	18	280.5±3.9	26.9±3.0	12 (66.7)	6 (33.3)
Total	43	54	280.2±1.9	26.6±5.2	35 (64.8)*	19 (35.2)

*:P<0.05

체외수정란 이식을 하여 생산된 산자의 자연 발정우군과 발정 동기화우군간에 임신기간, 산자의 체중, 성비를 비교 조사한 결과는 표 17과 같다. 자연 발정우군과 발정동기화우군에서 평균 임신기간은 280.1±4.4일과 280.5±3.9일, 산자의 평균체중은 26.4±3.8 kg과 26.9±3.0 kg로서 유의적 차이를 보이지 않았다. 산자의 성비는 자연 발정우군과 발정 동기화우군간의 유의적인 차이는 없었으나 전체 산자의 성비는 숫송아지는 65%, 암송아지는 35%로서 체외수정란의 경우 숫송아지의 생산비율이 유의적으로 증가됨을 확인 할수 있었다.



Fig 14. Calf derived embryos produced in vitro

Table 18. Characteristics of offspring produced by the transfer of in vitro produced embryos

Reci- pient	reci- pients	calves	No. of					gestation length		
			twin calves			still birth	birth weigh 30 kg>	im- mature	(Day)	
			F/F	M/M	F/M				< 275	285 <
Natural	28	36	3	3	2	1	2	1	1	2
Synchron ized	15	18		2	1	1	1	-	1	1
Total	43	54	3	5	3	2	3	1	2	3

체외수정란 이식 후 생산된 산자의 특성을 조사한 결과는 표 18과 같다. 자연발정 28두의 임신우에서 생산된 산자는 총 36두이며, 쌍태 분만은 암송아지 쌍태가 3쌍, 숫송아지 쌍태가 3쌍, 암·숫송아지 쌍태가 2쌍이었으며, 암·숫송아지 2쌍의 암송아지는 모두 프리마틴이었다. 산자의 이상유무로는 사산 및 미숙산자 각 1두, 거대 태아 2두를 관찰 하였으며, 이는 각각 임신기간의 단축 및 쌍태 임신, 임신기간의 연장으로 발생하였다.

발정 동기화우군 15두의 임신우에서 생산된 산자는 총 18두이며, 쌍태 분만은 숫송아지 2쌍, 암·숫송아지 각 1쌍이었으나 암송아지는 프리마틴이었다. 산자의 이상유무로는 사산 및 거대태아 각 1두를 분만하였으며, 이는 각각 조산 및 임신 기간 연장으로 발생하였다.

Table 19. Comparison of fetal phenotype derived from in vitro and in vivo produced embryos

Group	n	normal (total) at different days		
		90	130	240
In vitro	6	3 (3)	2 (2)	1 (1)
In vivo	6	2 (2)	2 (2)	2 (2)

체외 및 체내수정란 이식 후 각 일령별로 유산시킨 태아의 기형 상태를 조사한 결과는 표 19와 같다. 각 일령별로 관찰한 체외 및 체내 수정란 유래의 태아의 표현형은 정상이었다.

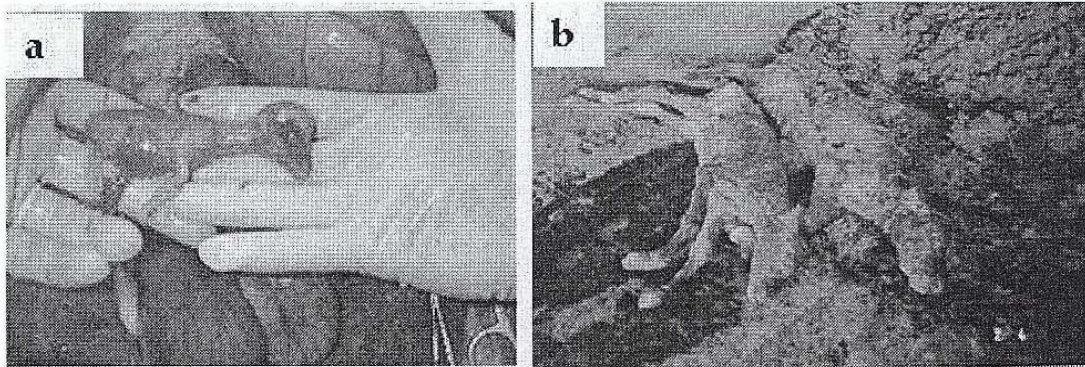


Fig. 15. Aborted fetus at Day 90 (a), Day 240 (b)

Table 20. Comparison of chromosomal composition of fetus derived from in vitro and in vivo produced embryos

Group	No. fetus examined	different days	total cell number	No. sample (%) Ploidy			
				Haploid	Diploid	Polyploid	Mixoploid
In vitro	3	90	132	0 (0)	129 (98)	3 (2)	0 (0)
	2	130	105	0 (0)	105 (100)	0 (0)	0 (0)
	1	240	171	0 (0)	156 (91)	9 (5)	6 (4)
In vivo	2	90	81	0 (0)	75 (92)	3 (4)	3 (4)
	2	130	132	0 (0)	129 (97)	3 (2)	0 (0)
	2	240	120	0 (0)	111 (93)	6 (5)	3 (2)

표 20은 체외 및 체내 수정란유래 태아를 각 임신 연령별로 회수한 뒤, 피부세포를 채취하여 염색체 분석을 실시하였다. 체외 및 체내 유래에 따라, 각 임신 연령별 유의적인 차이는 없었다.

Table 21. Comparison of cotyledon derived from in vitro and in vivo produced embryos

Group	No. placenta examined	No. of cotyledon at different days		
		90	130	240
In vitro	6	93.5±11.5	95±6	112
In vivo	6	97.5±3.5	100.5±5.5	106±7

표 21은 체외 및 체내 수정란 유래 태아의 태반을 각 임신 연령별로 회수한 뒤, 그 수를 세어본 결과로 각 연령별 유의적인 차이는 없었으나, 체외 수정란의 경우 체내 수정란에 비해 빈약한 결과를 보였다. 그림 16은 이상태반의 모습이다. 태반엽의 수가 비정상적으로 작으며 크기는 커진것을 볼수 있다.

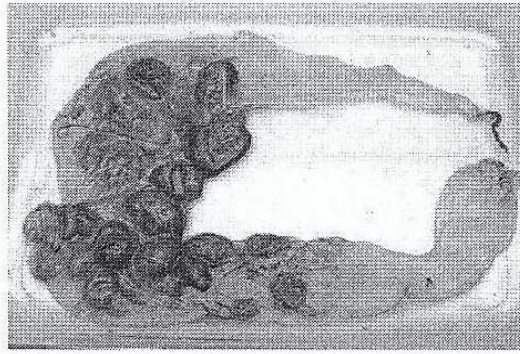


Fig. 16. Cotyledon (In vitro produced embryo derived fetus, aborted at Day 130)

Table. 22. Normal calving rate in recipients from different origins

Origins	No. of calving	No. of normal calf	Results of parturition (%)		
			No. of small calf (<20%)	No. of large calf (>20%)	No. of malformation
In vivo	17	15 (88.2)ab	1 (5.9)	1 (5.9)	0
In vitro*	40	29 (72.5)a	4 (10.0)	6 (15.0)	1 (2.5) ***
AI**	69	62 (89.9)b	3 (4.3)	4 (5.8)	0

* Day 6 blastocysts produced by IVMD (+5% FBS)

** Production of Gyeongbuk Livestock Research Institute

*** Tail abnormality

^{a b} P<0.05

표22는 체내수정란과 체외수정란 이식 그리고 인공수정 후, 정상 산자율을 나타낸 결과로서, 체외 수정란유래 산자의 경우 체내수정란 산자와 인공수정 산자에 비해서 저체중과 과체중 비율이 높게 나타났고, 비정상적인 형태의 꼬리를 가진 기형도 1건 관찰되었다.

Table. 23. Parturition period and birth weight in recipients from different origins

Origins	No. of recipient	Pregnancy period [¶]	Birth weight (kg)
In vivo	17	289.9±6.2	23.4±2.0
In vitro	40	289.5±8.6	29.2±4.8*
AI	69	289.8±7.0	24.0±2.8

[¶] Day 0 : estrus day

*P<0.05, Mean ± S.D

표23은 체내수정란과 체외수정란 이식 그리고 인공수정 후, 임신 기간 및 산자의 생시 체중을 나타낸 결과로서, 각 군간 임신 기간에는 차이가 없었고, 생시체중에 있어서는 체외 수정란 산자가 체내수정란과 인공수정산자에 비해 생시체중이 29.2kg으로 유의적으로 증가 되었다.

Table. 24. Biochemistry of newborn calves

Blood sample [¶]	Origin					
	Embryo transfer				Artificial insemination	
	In vitro		In vivo		Before	After
	Before	After	Before	After	Before	After
Total Protein (g/dL)	4.4±0.3ab	5.1±0.9a	2.9±1.2b	5.0±1.2a	3.7±0.2ab	5.3±1.3a
Albumin (g/dL)	2.7±0.3a	2.3±0.3ab	1.8±0.6b	2.1±0.3b	2.3±0.1ab	2.3±0.2ab
Globulin (g/dL)	1.6±0.2bc	2.9±0.8ab	1.1±0.6cd	2.8±0.9ab	1.4±0.1c	3.1±1.1a
GPT (IU/dL)	11.5±6.1	13.5±6.2	9.3±9.4	10.5±3.7	6.6±2.5	12.6±5.4
Creatinine (mg/dL)	2.1±1.5ab	1.9±0.8ab	2.6±1.1ab	1.0±0.4b	3.7±1.3a	1.4±0.3b
Total Cholesterol (mg/dL)	82±53.2a	35.3±9.0b	10.8±6.9b	25.5±8.1b	23.6±3.9b	47.8±7.3ab
Urea (g/dL)	1.3±0.1a	0.5±0.1c	0.7±0.4bc	0.7±0.2bc	1.1±0.5ab	0.6±0.1bc

No. of supplement : 5, ¶ Indicates at colostrum intake

^{a b} P <0.05, Mean ± S.D

표 24는 신생송아지의 혈중 혈액화학치 분석 결과이다. Total protein, Albumin, Globulin의 경우 origin에 상관없이 포유 전보다는 포유 후에 증가하였다. 다른 혈액화학치에서는 큰 변화가 관찰되지 않았다. 그리고 전반적으로 인공수정 산자와 체외수정란산자, 체내수정란 산자 간에는 혈액화학치의 차이를 보이지 않았다. 늑 수정란 기원에 따른 송아지의 건강상태는 다름이 없음을 확인할 수 있었다.

Table 25. Pregnancy at different gestation period and birth rates in recipients following the transfer of in vitro produced embryos

Recipient groups	No. of recipients	No. (%) of pregnancy			No. (%) of birth recipients
		Day 30	Day 60	Day 90	
Heifers	92	77 (77.1) ^{aA}	54 (58.6) ^{aB}	54 (58.6) ^{aB}	52 (56.5) ^a
Cows	89	56 (62.9) ^{bA}	38 (42.6) ^{bB}	36 (40.4) ^{bB}	33 (37.1) ^b
Total	181	133 (73.4) ^A	92 (50.8) ^B	90 (49.7) ^B	85 (47.0)

Embryo, two sets of in vitro produced Hanwoo Day-7 embryos

Recipient, Holstein, synchronized with twice 25 mg PGF2 α injection 11 days apart

Percentage in the same column, b and row A, B indicate significant differences (P<0.05).

표 25는 7일째 한우 체외수정란 2개를 비외과적인 방법으로 황체가 있는 난관에 이식하였을 때 임신율과 산자율을 나타낸 표이다. 임신 진단은 30일 60일 90일에 각각 하였다. 30일의 평균 임신율은 73.4% 였으며, 처녀우는 77.1%, 경산우는 62.9%를 나타내었다. 60일의 평균 임신율은 50.8%로써, 처녀우는 58.6%, 경산우는 42.6%였다. 90일의 임신율은 49.7% 였으며 처녀우는 58.6%, 경산우는 40.4%였다. 분만율은 처녀우보다 경산우에서 유의적으로 높았다. 그리고 두군의 평균은 47.0%였다. 임신기간이 후반으로 갈수록 수태율의 감소한 것으로 보아 착상 태아의 손실이 후기에 증가한다는 것을 알수 있었다.

Table 26. Twin and sex of offspring following the transfer of in vitro produced embryos

Recipient groups	No. R/P [†]	No. of offspring (twins)	Twin		Sex ratio (%)		
			Female	Male	Female/male	Female Male	
Heifers	92/52	65 (11)	2	6	3	23 (35.4) ^a	42 (64.6) ^b
Cows	89/33	44 (8)	2	4	2	17 (38.6) ^a	27 (61.4) ^b
Total	181/85	109 (19)	4	10	5	40 (36.7) ^a	69 (63.3) ^b

[†] R, recipients; P, pregnancy

Embryo, two sets of in vitro produced Hanwoo Day-7 embryos

Recipient, Holstein, synchronized with twice 25 mg PGF2 α injection 11 days apart

Percentage in the same row, a, b indicate significant differences (P<0.05).

표26은 처녀우와 경산우에 수정란을 이식하였을 경우 쌍태울과 성비에 관한 결과이다. 181마리의 수란우에서 85마리가 분만을 하였다 (처녀우는 52마리, 경산우는 33마리). 85마리 중 19마리가 쌍태우를 낳았으며, 4쌍은 암컷이었으며, 10 쌍은 숫컷이었으며, 5쌍은 암수였으며 프리마틴 이었다. 처녀우와 경산우사이의 쌍태아분만에는 유릿거인 차이는 없었다. 암수 비율은 암컷이 36.7%였으며, 숫컷이 63.3% 였다. 처녀우와 경산우에서 모두 숫송아지의 비율이 유의적으로 높게 나타남을 확인할 수 있었다.

Table 27. Offspring characteristics following the transfer of in vitro produced embryos

Recipient groups	No. R/P/O [†]	Gestation (days)	Weight (kg)	Offspring characteristics			
				Premature birth	Delayed birth (> 290 d)	Large offspring syndrome (> 35 kg)	Freemartin
Heifers	92/52/65	281.2 \pm 4.2	26.6 \pm 6.2	2 (3.1)	2 (3.1)	1 (1.5)	3 (4.6)
Cows	89/33/44	280.3 \pm 3.4	27.5 \pm 4.7	1 (2.3)	3 (6.8)	2 (4.5)	2 (4.5)
Total	181/85/109	280.7 \pm 3.6	27.1 \pm 5.3	3 (2.8)	5 (4.6)	3 (2.8)	5 (4.6)

[†] R, recipients; P, pregnancy; O, offspring

Embryo, two sets of in vitro produced Hanwoo Day-7 embryos.

Recipient, Holstein, synchronized with twice 25 mg PGF2 α injection 11 days apart

표27은 처녀우와 경산우에 수정란을 이식하였을 경우 조기분만과 290일 이상의 분만일인 경우를 알아보았다. 또한 거대태아와 freemartin을 조사하였다. 처녀우의 경우 조기 분만과 290일 이상의 분만일을 3.1 %에서 보였으며, 거대태아는 1.5 %, 그리고 freemartin은 4.6 %를 나타내었다. 한우의 경우 조기 분만은 2.3 %, 290일 이상의 분만일은 6.8 % 보였으며, 거대태아와 freemartin을 각각 4.5 % 보였다. 처녀우와 경산우 그리고 두군의 평균에서 모두 신생우의 특성에 차이는 없었다.



수정란 기원에 따른 분만율을 비교한 결과, 체외 수정란의 유산율이 인공수정에 비해서 유의적으로 높게 나타났지만 기존보고들과 비교하여 개선된 결과를 보였다. 수정란 이식 시, 체내수정란과 체외수정란에 상관없이 trophoblast 공이식이 유의적으로 임신율을 향상시킨다는 것을 알 수 있었다. 또한 경산우와 미경산우를 비교하였을 때 미경산우에서 높은 임신율을 보였다. 하지만 임신기간과 생시 체중, 쌍태분만율, 염색체 이상율, 태아의 정상 표현형에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 태어난 산자의 성비를 조사한 결과 암컷보다 수컷의 비율이 높게 나타났다. 그리고 체외수정란의 경우 저체중과 과체중 비율이 높게 나타났으나 비정상적인 형태의 꼬리를 가진 기형도 1건 관찰되었다. 신생 체외수정과 체내수정란을 이식한 후 태어난 신생송아지의 건강 상태를 확인하기 위하여 혈액화학치를 조사해 본 결과에 있어서는 total protein, albumin, globulin의 경우 포유 후가 포유전보다 증가하였다. 다른 혈액화학치에서는 큰 변화가 관찰되지 않았다. 따라서 수정란의 기원에 따라 신생송아지의 건강 상태는 차이가 없음을 확언할 수 있었다.

5 각 임신기별 태아의 유전자 발현분석

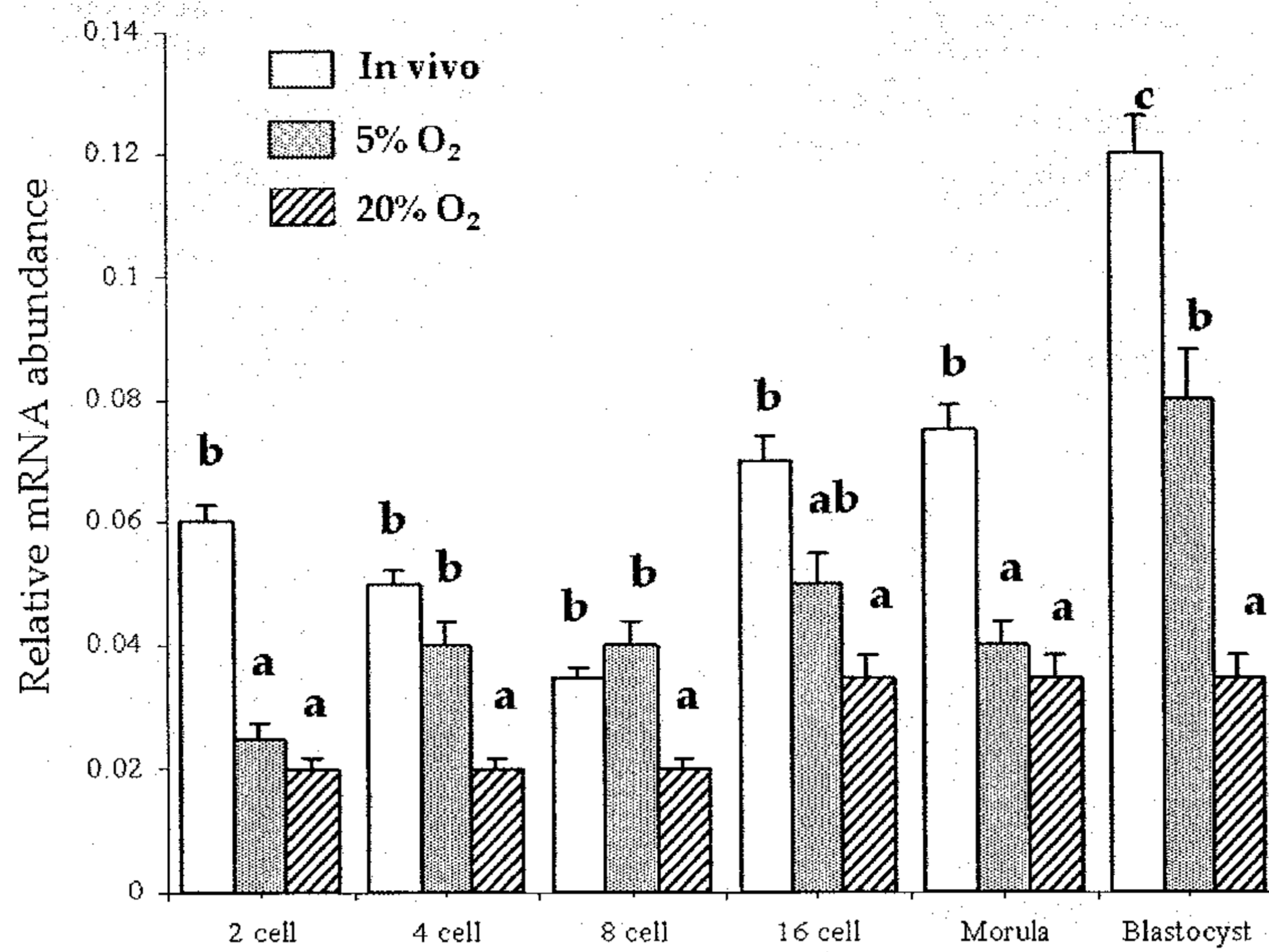
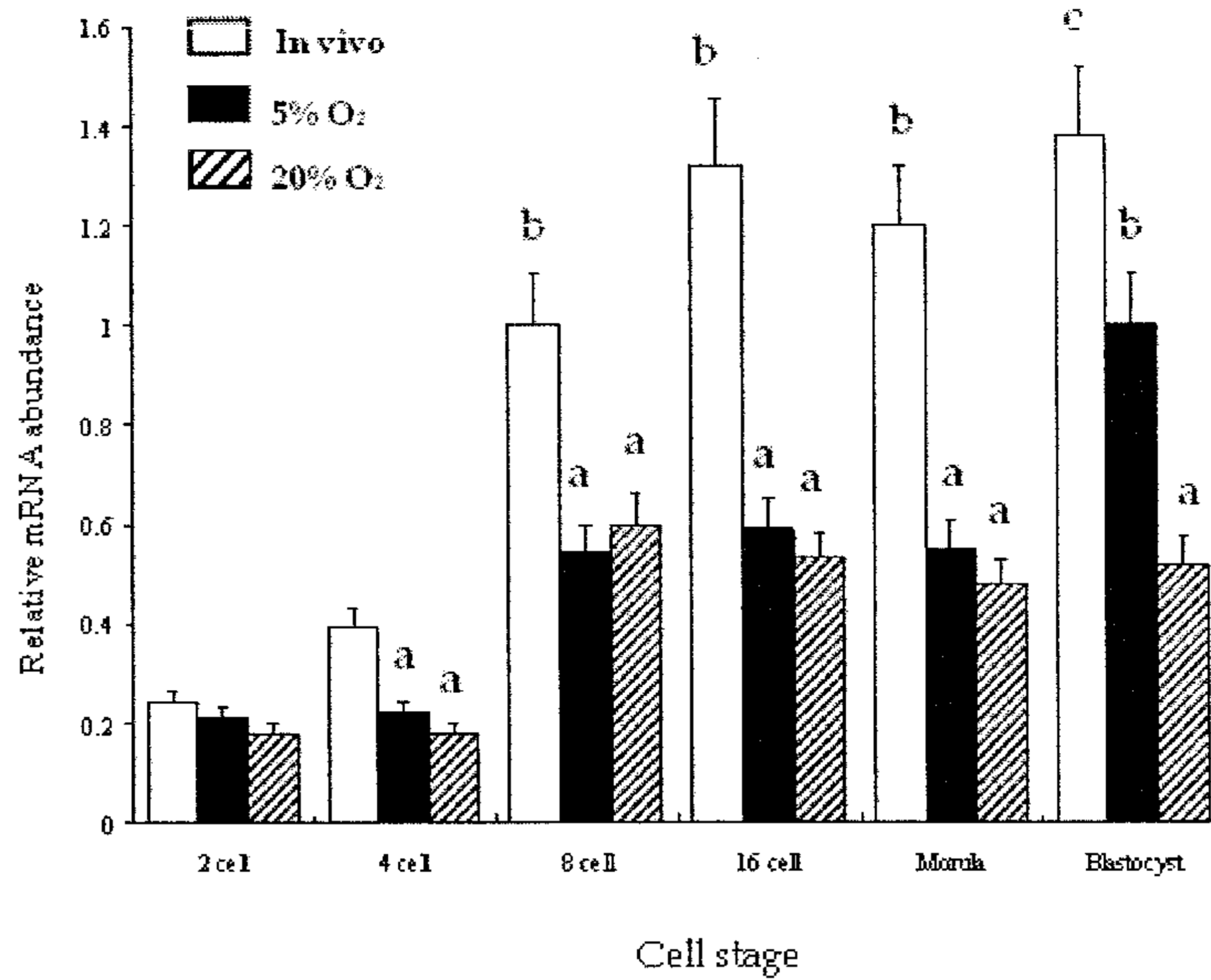


Fig. 17. Relative abundance of Glut-1 at different developmental stages

그림 17은 Glut-1의 발현양을 나타낸 것이다. 5% 와 20% 산소에서 키운 수정란의 발달단계에 따른 Glut-1과 Glut-5의 mRNA 발현양을 real time PCR을 통하여 알아보았다. 모든 단계에서 체내수정란이 높게 발현되었고, 4세포기와 8세포기에는 체내수정란과 유사한 발현양상을 % 체외수정란이 보였으나, 후기 단계로 갈수록 체내수정란과 비교하여 체외 수정란의 발현량이 유의적으로 적었으며 산소분압간에는 5% 보다 20%에서 배양된 수정란이 더 낮은 발현양상을 보였다.

Fig.



18. Relative abundance of Glut-5 at different developmental stages

그림 18은 Glut-5의 발현양을 나타낸 것이다. Glut-5는 기원에 상관없이 8세포기부터 모두 증가하는 양상을 보였고, 체내와 체외 수정란을 비교하였을 때 체내수정란이 체외수정란 보다 높은 발현 양상을 보였고, 체외수정란 중, 산소분압간에 발현 양상의 차이는 배반포 단계를 제외하고는 관찰 되지 않았다. 그러나 배반포 단계에서는 5% 체외수정란이 20% 체외수정란 보다 유의적으로 발현량이 증가함이 확인 되었지만 여전히 체내 수정란 보다는 유의적으로 낮은 발현 양상을 보임을 확인 할 수 있었다.

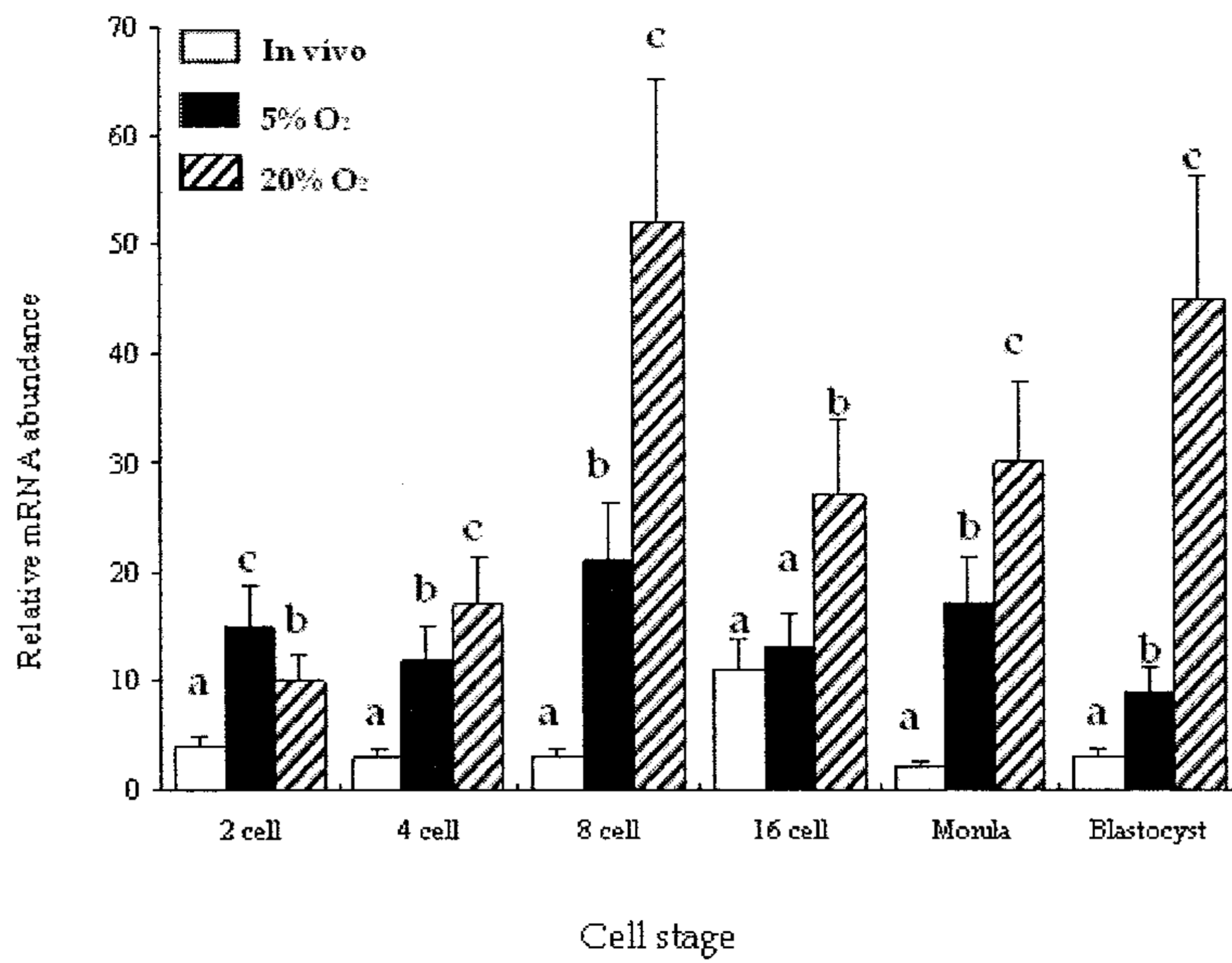


Fig. 19. Relative abundance of Sox at different developmental stages

그림 19는 SOX 의 발현량을 나타낸것이다. Sox 발현량의 경우 모든 발달 단계에서 체내수정란이 체외수정란보다 유의적으로 낮은 발현량을 나타내었다. 체외수정란의 경우 2세포기를 제외하고 5%에서 키운 수정란이 유의적으로 낮은 발현을 보였다.

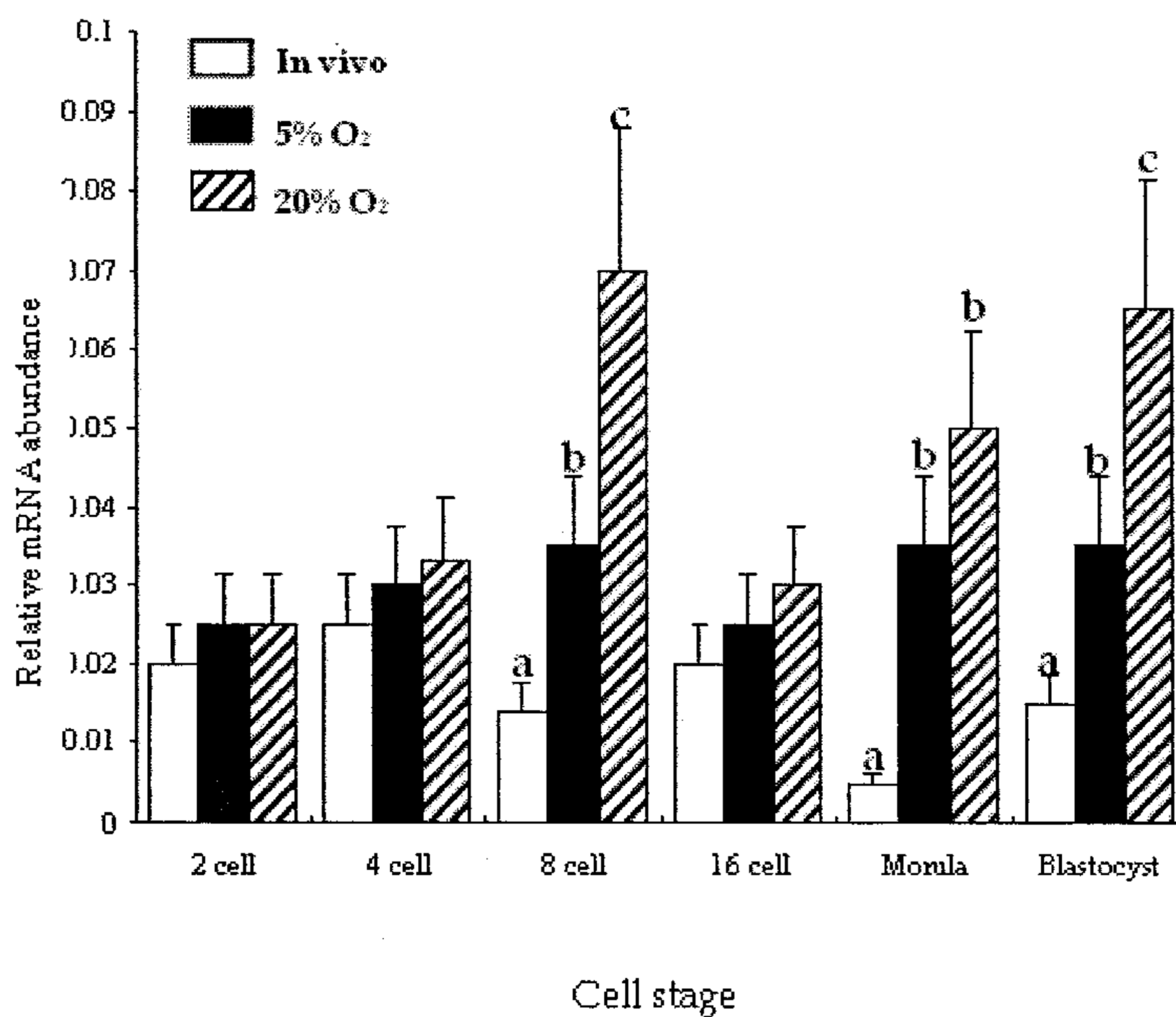


Fig. 20. Relative abundance of G6PDH at different developmental

그림 20 은 G6PDH의 발현양을 나타낸것이다. 체내 수정란이 체외수정란보다 낮은 발현양을 보였고, 체외수정란에서 산소 분압간에는 2 세포기를 제외하고 5% 산소농도에서 유의적으로 낮게 나타났다.

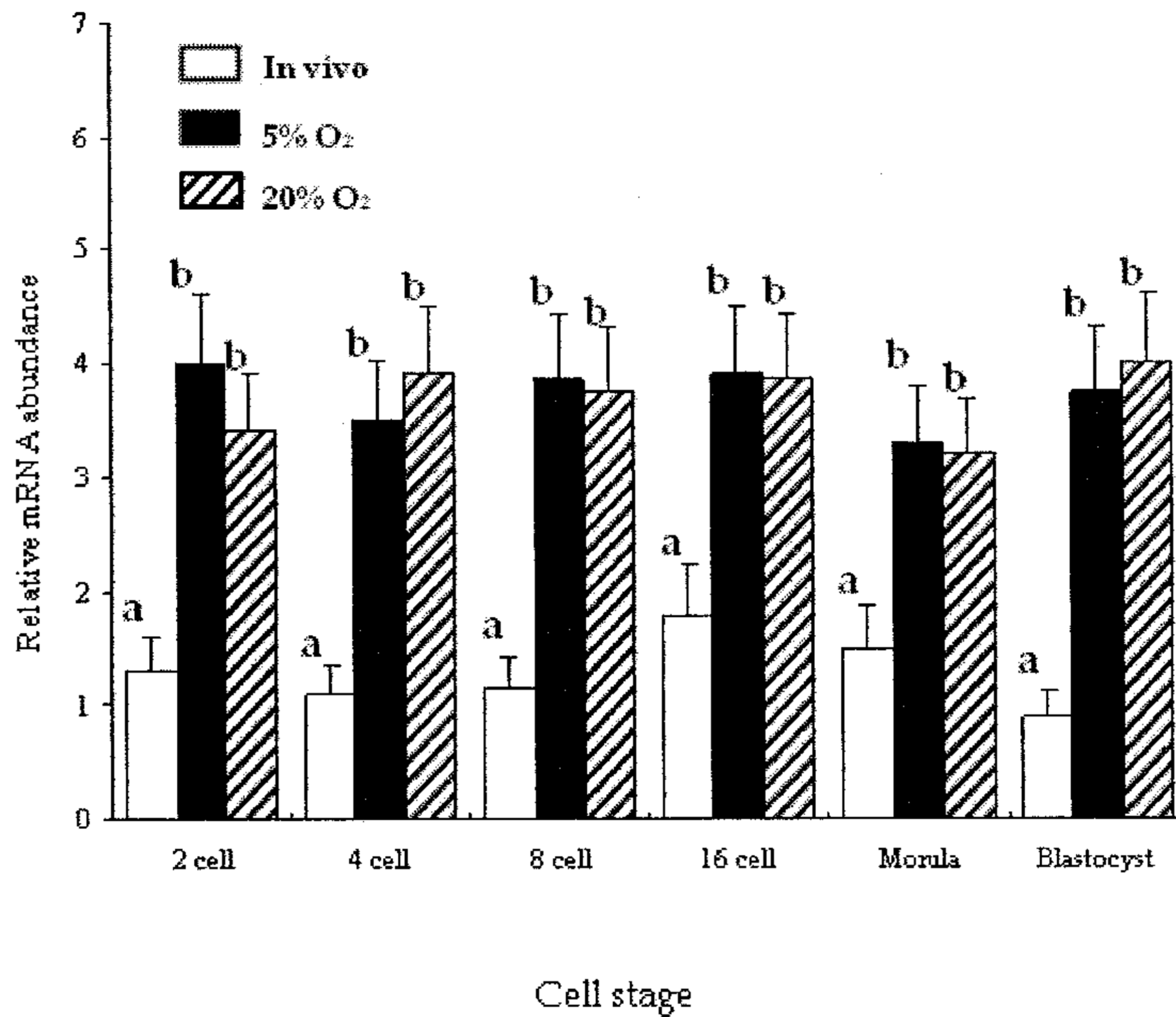


Fig. 21. Relative abundance of Hsp70 at different developmental stages

그림 21은 Hsp70의 발현양을 나타낸 것이다. 모든 발달단계에서 체내수정란이 체외수정란에 비하여 유의적으로 낮은 발현양을 나타내었으며 산소에 따른 차이와 발달단계에 따른 차이는 보이지 않았다.

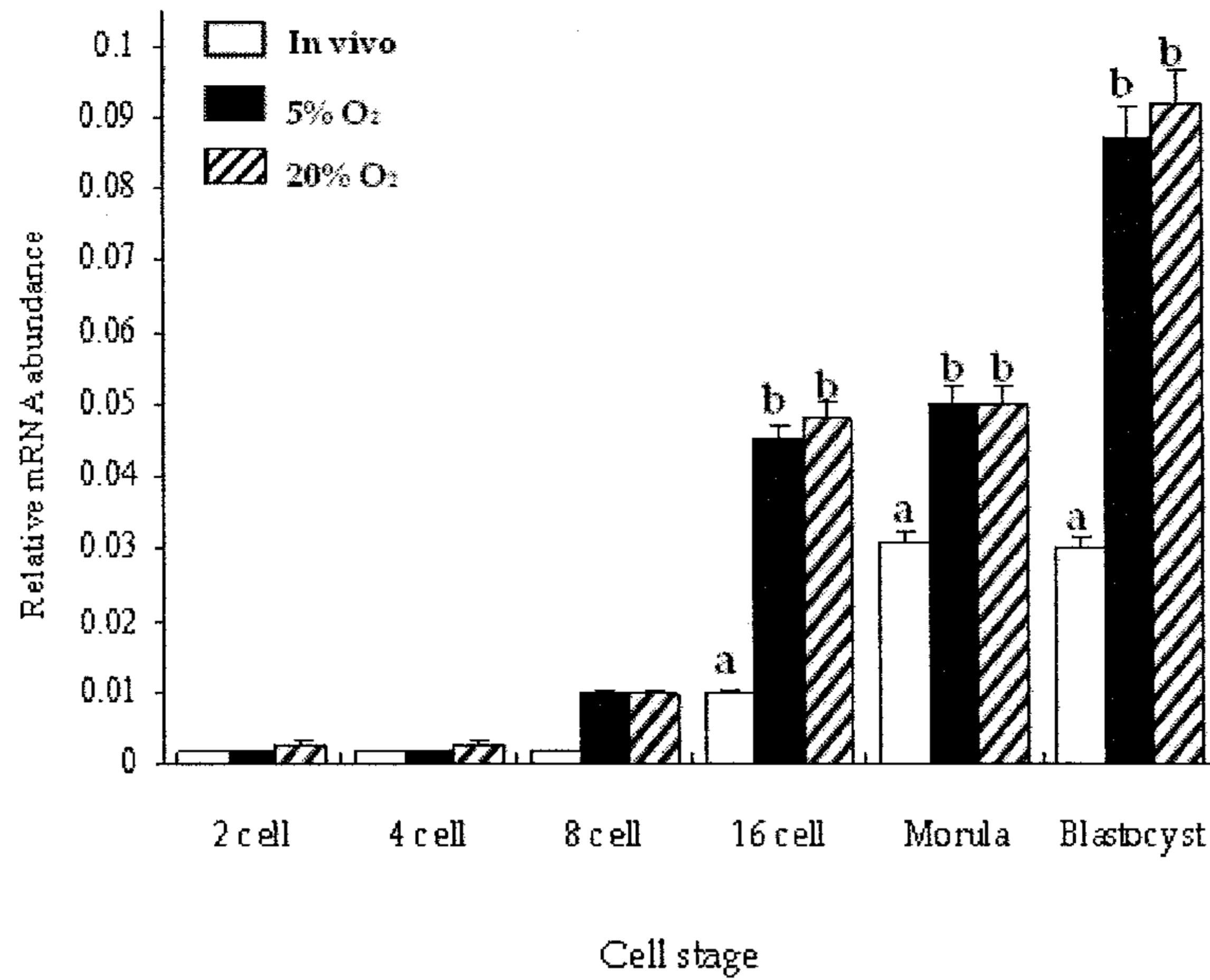


Fig. 22. Relative abundance of Bax at different developmental stages

그림 22는 Bax 발현양을 나타낸 것이다. 수정란이 발달할 수록 Bax의 발현량이 기원에 상관없이 점차 증가하였고, 8세포기부터 체외수정란이 체내 수정란보다 유의적으로 높은 발현량을 보였고, 체외수정란의 산소분압간에는 차이를 보이지 않았다.

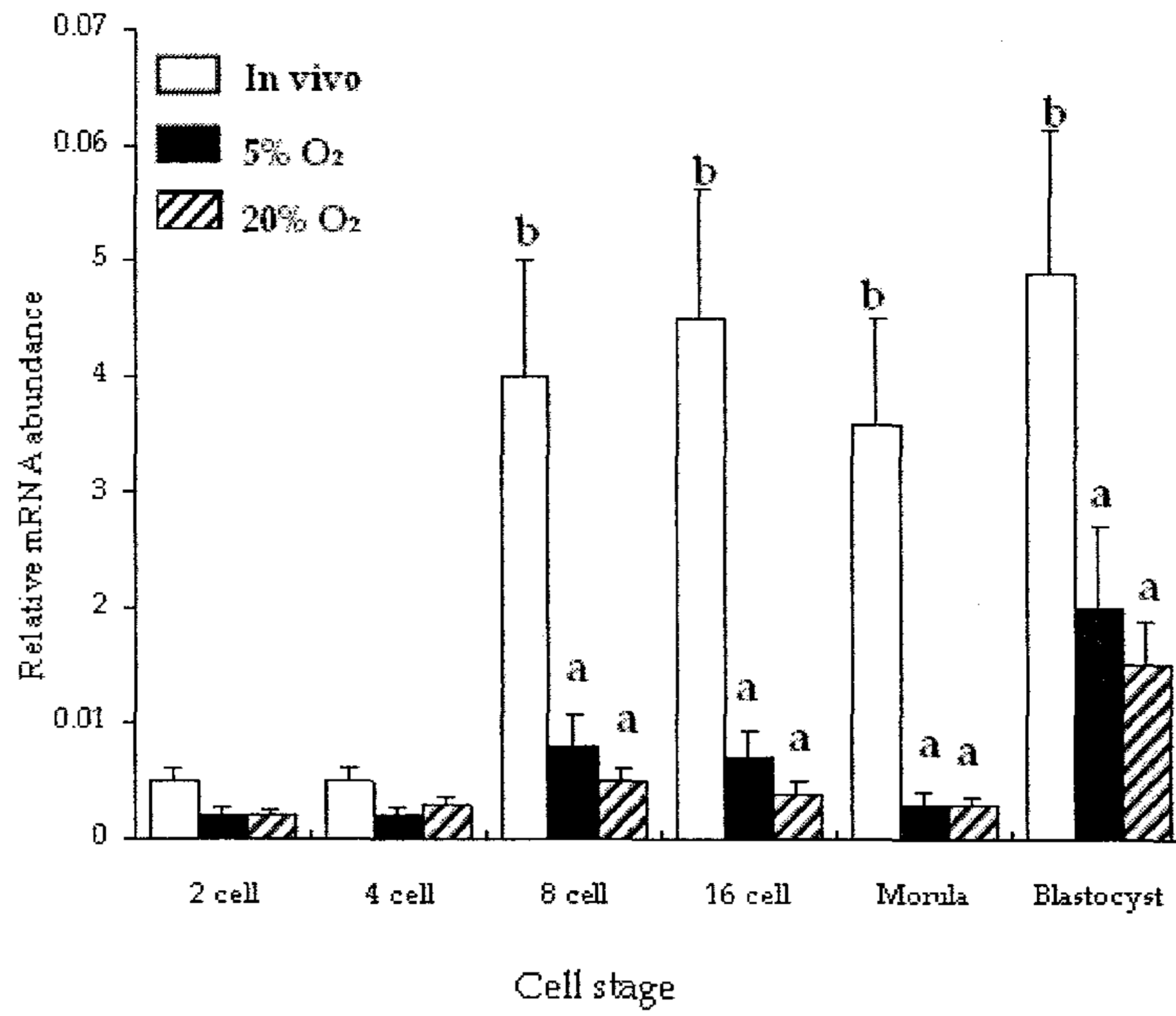


Fig. 23. Relative abundance of Bcl2 at different developmental stages

그림 23은 Bcl2의 발현양을 나타낸 것이다. Bcl2의 경우 체내수정란은 4세포기까지는 낮은 발현량을 보이다 8 세포기부터 급격히 증가하는 양상을 보였다. 그러나 체내수정란의 경우 산소농도와 상관없이 8세포기부터 체내수정란 보다 유의적으로 낮은 발현율을 보였다.

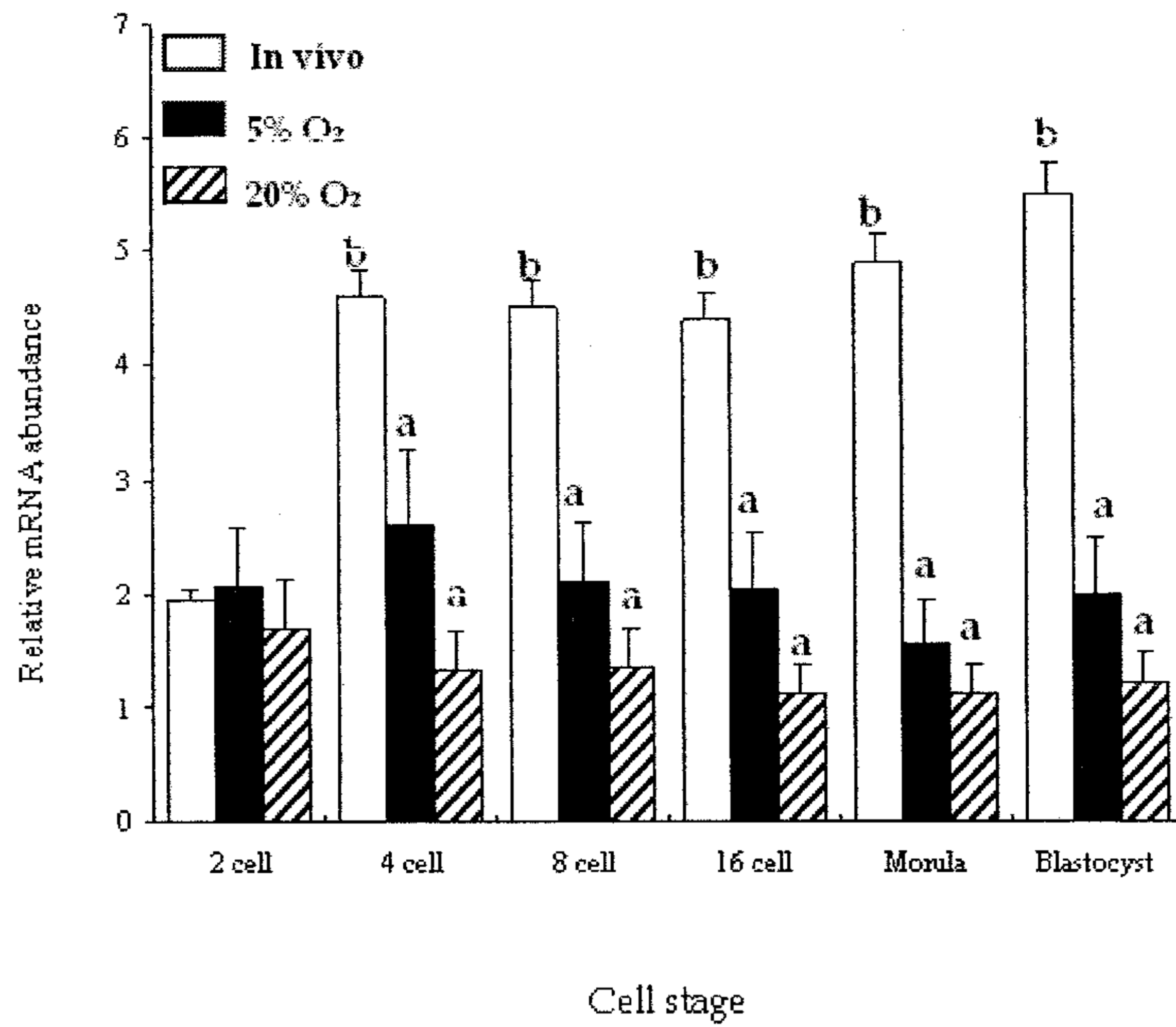


Fig. 24. Relative abundance of Cx43 at different developmental stages

그림 24는 Cx43 mRNA의 발현양을 나타낸 것이다. 2세포기에서는 체내수정란과 체외수정란사이의 차이는 보이지 않았지만, 4세포기에서부터 체내수정란이 체외수정란에 비하여 유의적으로 높은 발현율을 나타내었다. 발달단계에 따른 차이는 보이지 않았다.

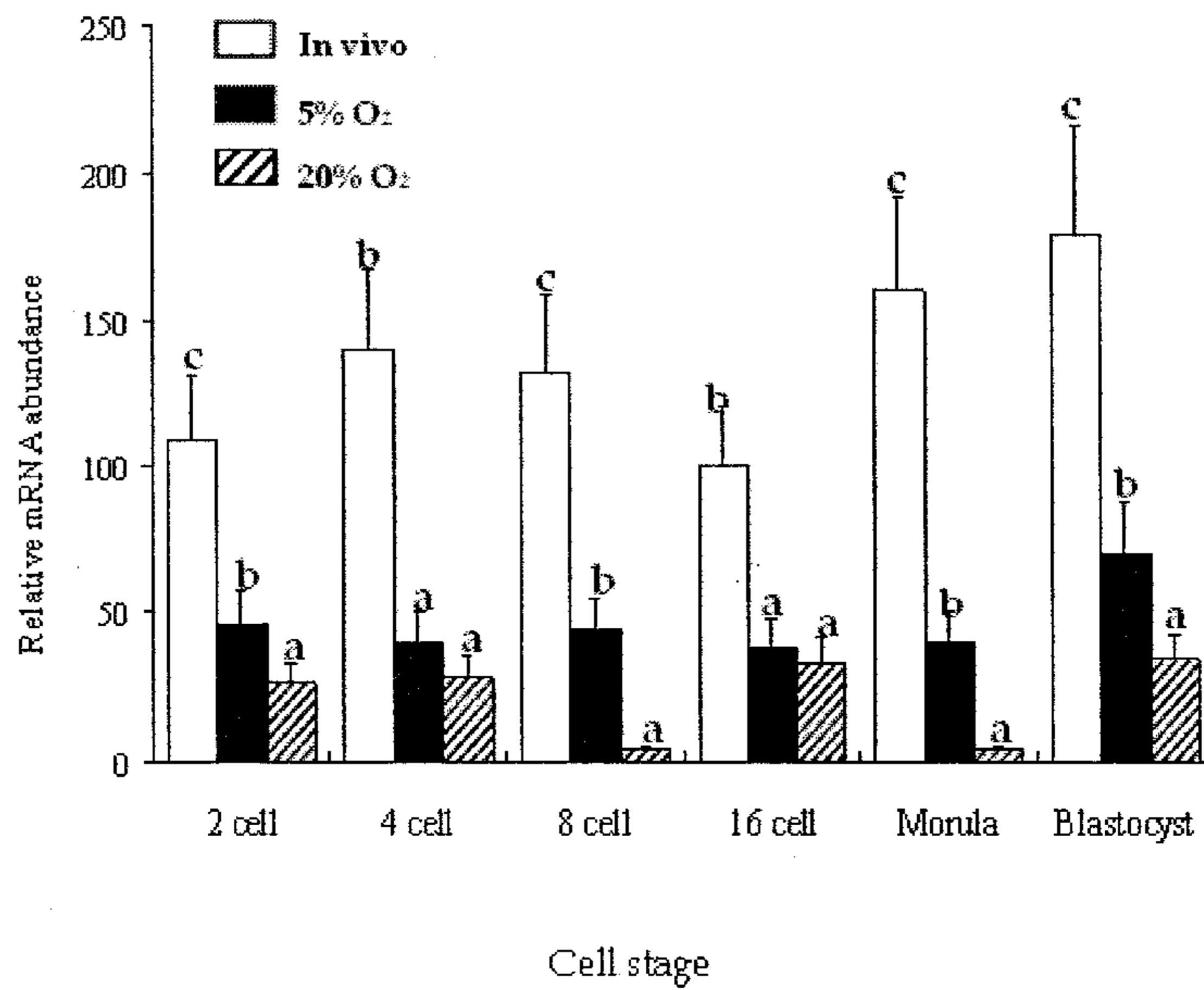
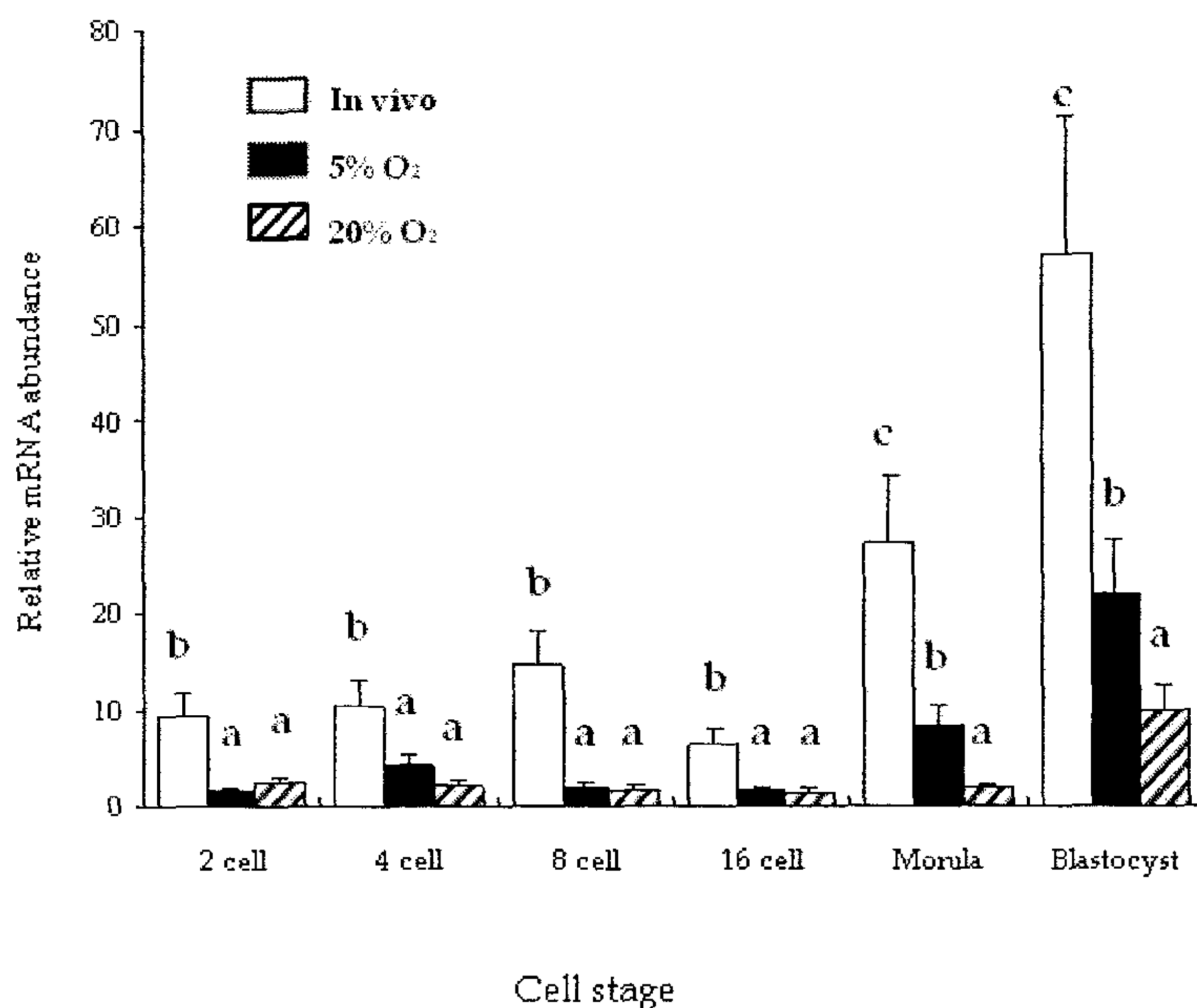


Fig. 25. Relative abundance of PRDX5 at different developmental stages

그림 25는 PRDX5 mRNA를 나타낸 것이다. 모든 발달단계에서 체내수정란이 체외수정란과 비교하여 유의적으로 높게 나타났다. 체외수정란의 경우 4세포기 16 세포기를 제외하고 모든 발달 단계에서 5% 산소에서 배양한 수정란이 20% 산소에서 배양한 수정란에 비하여 유의적으로 높은 발현양상을 보였다.



ig. 26. Relative abundance of NADH at different developmental

그림 26은 NADH mRNA 발현양을 나타낸 것이다. NADH의 경우 체내수정란이 체외수정란에 비하여 유의적으로 높게 발현되었으며 16세포기를 제외하고는 발달이 진행될수록 증가하는 양상을 보였다. 체외수정란의 경우 발달 후기를 제외하고는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 상실배기와 배반포의 경우 5% 산소에서 배양한 수정란이 20% 산소에서 배양한 수정란에 비하여 높은 발현량을 나타내었다.

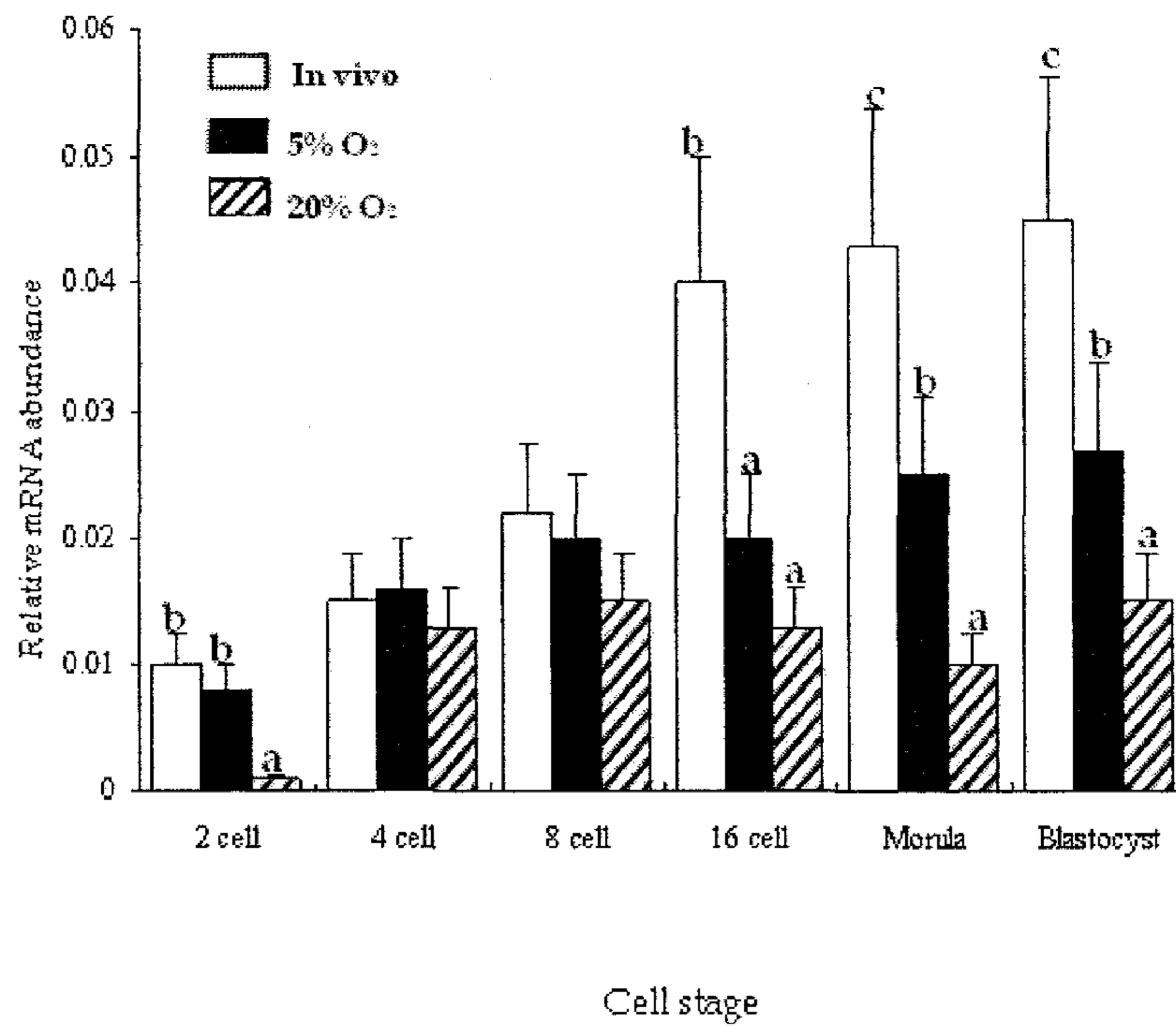


Fig. 27. Relative abundance of MnSOD at different developmental stages

그림 27은 MnSOD 발현양을 나타낸 것이다. 2세포기, 4세포기, 8세포기의 경우 체내수정란과 체외수정란사이의 발현율의 차이는 보이지 않았지만, 체내수정란의 경우 발달 후기로 갈수록 유의적으로 높은 발현율을 나타내었다. 체외수정란의 경우 5% 산소에서 배양한 수정란이 20% 산소에서 배양한 산소에 비하여 높은 발현율을 나타내었다.

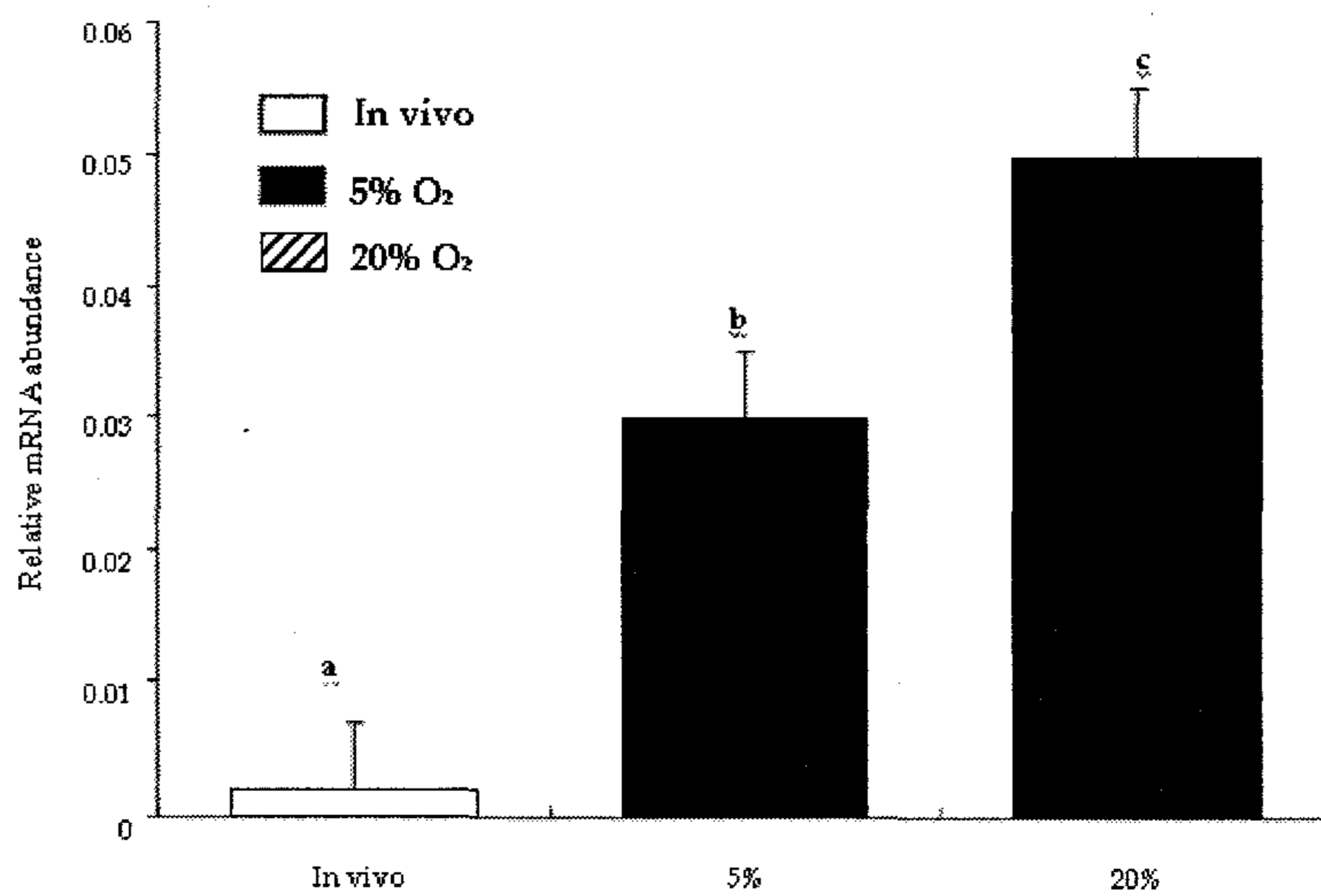


Fig. 28. Relative abundance of VEGF at blastocyst stages

그림 28은 배반포에서의 VEGF 발현양을 나타낸 것이다. 체내수정란에 비하여 체외수정란이 유의적으로 높은 VEGF 발현양을 보였다. 그리고 5 % 산소 농도에서 배양한 수정란이 20% 산소 농도에서 배양한 수정란에 비하여 낮은 발현율을 나타내었다.

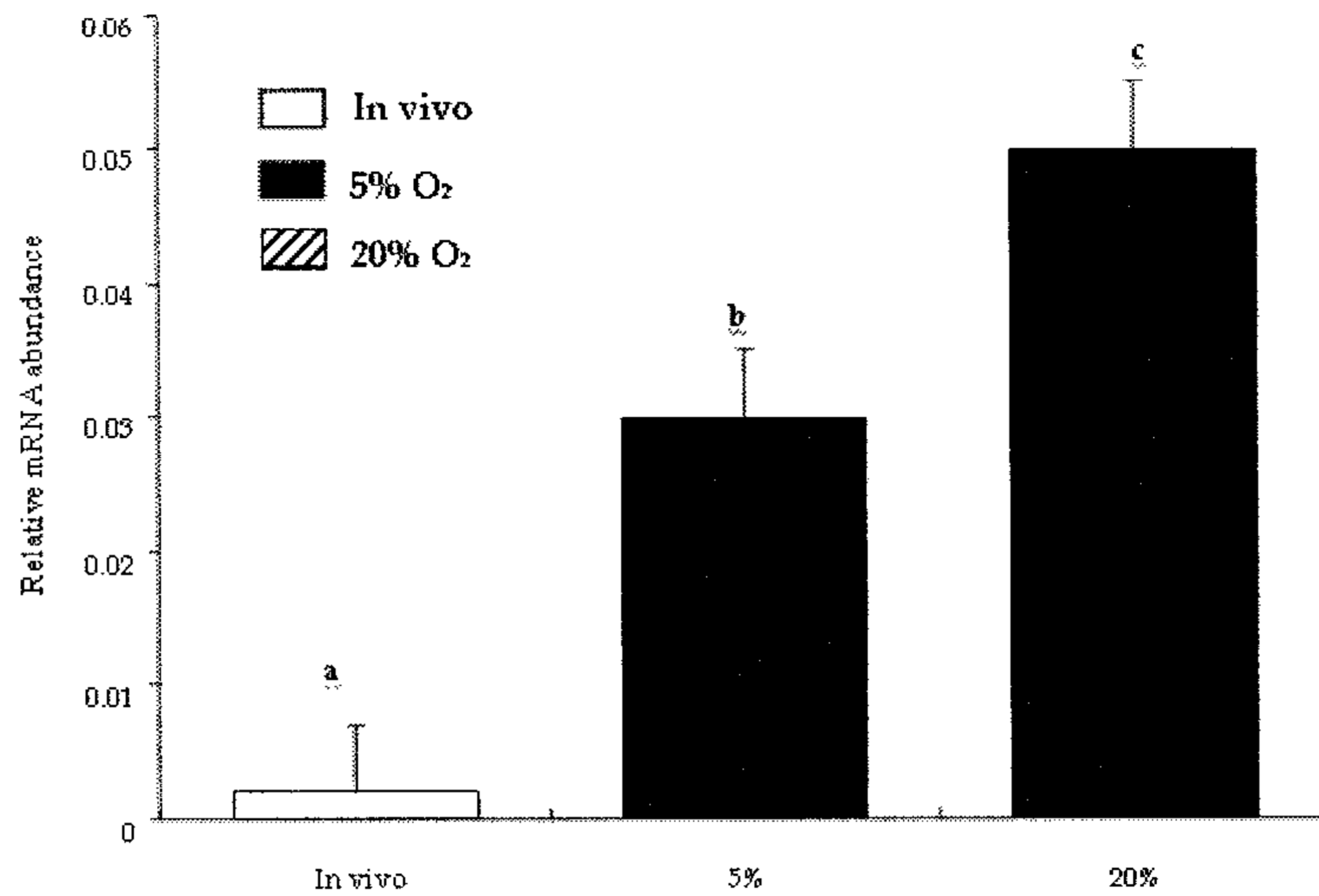


Fig. 29. Relative abundance of IFN- τ at blastocyst stages

그림 29는 배반포에서의 수정란 기원에 따른 IFN- τ 의 발현양을 나타낸 것이다. 체내 수정란이 유의적으로 가장 낮은 발현양상을 보였으며, 5% 산소에서 배양한 수정란이 20 % 산소에서 배양한 수정란에 비하여 낮은 발현양을 보였다.

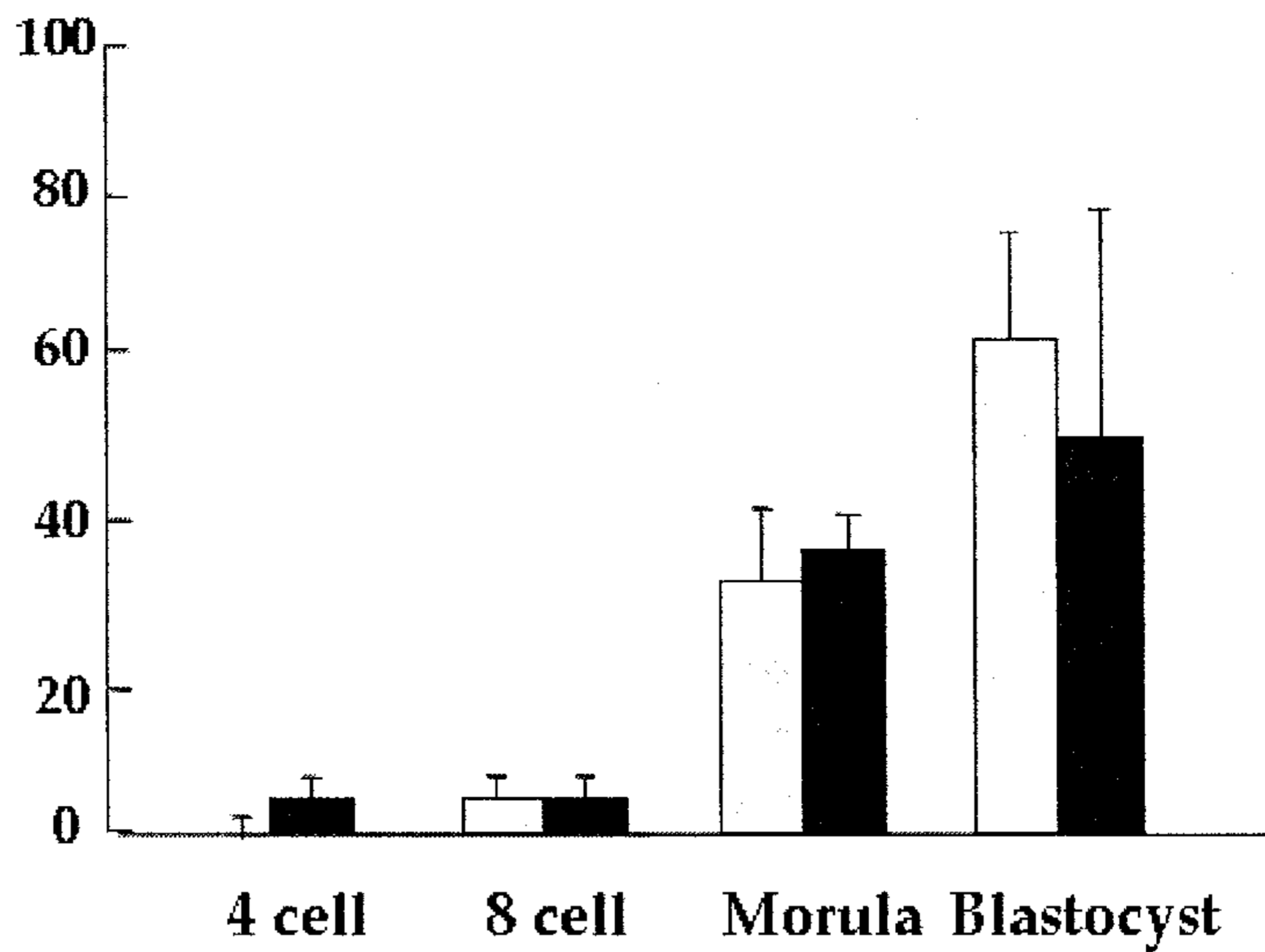


Fig. 30. Gene expression of H-β 58 in bovine embryos derived from in vitro and in vivo. Open bar means in vitro produced embryos and closed bar means in vivo produced embryos.

그림 30은 배반포에서의 H-β 58의 발현정도를 나타내는 결과로서 체내수정란과 체외수정란사이의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 하지만 발달이 진행됨에 따라 증가하는 양상을 보였다.

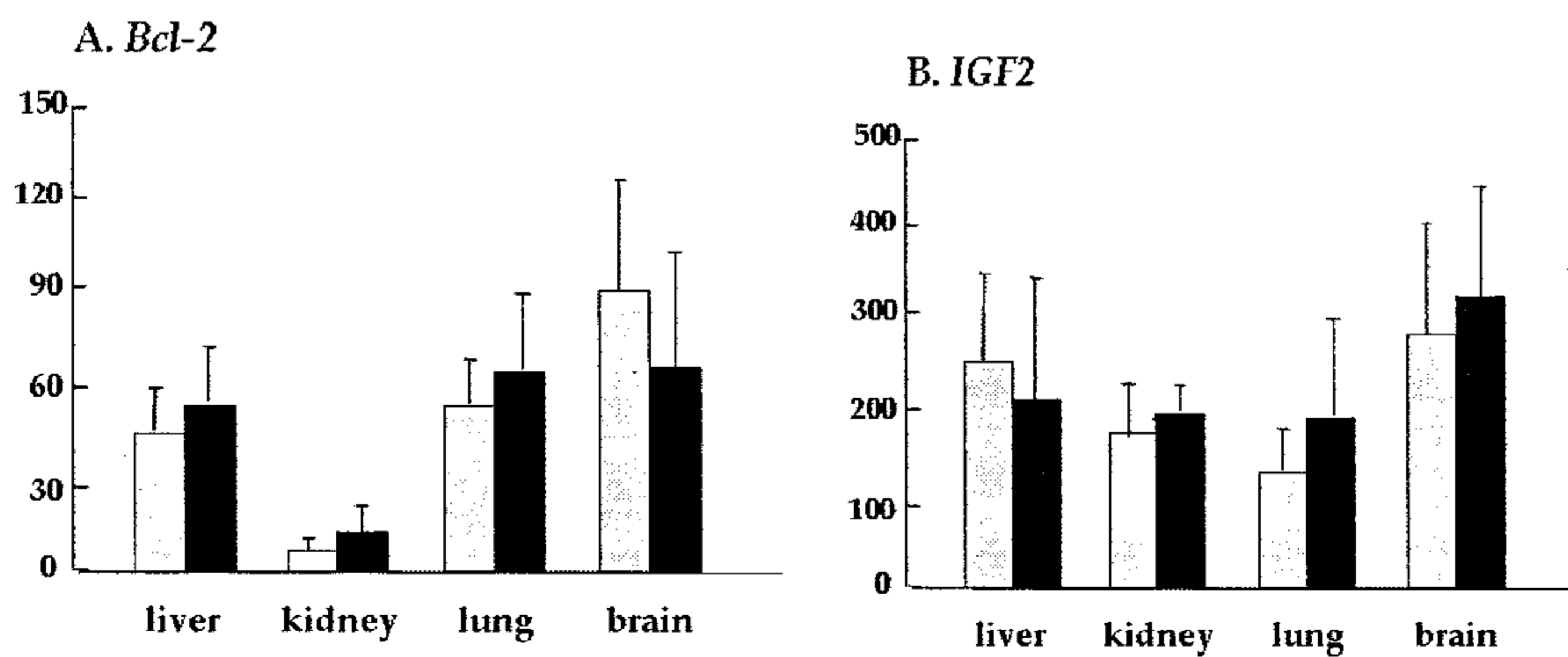


Fig. 31. Gene expression in the organ of bovine fetus (Day 90) derived from in vitro and in vivo embryos. Open bar means in vitro produced embryos and closed bar means in vivo produced embryos. A, Bcl-2; B, IGF2

그림 31은 체내 및 체외 수정란 이식 후, 90일 째에 유산된 태아의 각 조직 샘플을 채취하여 apoptosis 관련 유전자인 Bcl-2와 imprinting 관련 유전자인 IGF2의 발현양상에 대한 결과로서, 모든 장기에 있어 수정란의 기원에 따른 유의적인 차이를 보이지는 않았다.

➔ apoptosis와 관련된 Bax와 Bcl2 유전자, stress와 관련된 Sox, Hsp, G6PDH 유전자, implatation과 관련된 VEGF, IFN- τ , compaction과 관련된 Cx43, oxidation과 관련된 PRDX5, NADH, MnSOD, metabolism과 관련된 Glut1,Glut5를 수정란의 발달 단계별로 발현양상을 비교하였다. 그 결과, Glut-1, Glut-5, Bcl2, Cx43, PRDX5, NADH,MnSOD의 경우 체내수정란이 체외수정란에 비하여 대체로 낮았으며, 5% 산소에서 배양한 수정란이 20% 산소에서 배양한 수정란보다 낮은 발현량을 나타내어 체내 수정란과 유사한 발현패턴을 보였다. 그리고 SOX, G6PDH, Hsp 70, Bax의 경우 체내 수정란이 체외수정란에 비하여 낮은 발현율을 대체로 보였으며 5% 산소에서 배양한 수정란이 20 %에서 배양한 수정란에 비하여 낮은 발현량을 나타내어 역시 체내수정란과 더욱 유사한 발현양상을 보였다.

VEGF의 경우 체내수정란에 비하여 체외수정란이 유의적으로 높은 VEGF 발현양을 보였다. 그리고 5 % 산소 농도에서 배양한 수정란이 20% 산소 농도에서 배양한 수정란에 비하여 낮은 발현율을 나타내었다. IFN- τ 는 체내수정란이 유의적으로 가장 낮은 발현양상을 보였으며, 5% 산소에서 배양한 수정란이 20 % 산소에서 배양한 수정란에 비하여 낮은 발현양을 보였다.

배반포에서의 H- β 58의 발현정도를 나타내는 결과로서 체내수정란과 체외수정란사이의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 하지만 발달이 진행됨에 따라 증가하는 양상을 보였다. 체내 및 체외 수정란 이식 후, 90일 째에 유산된 태아의 각 조직 샘플을 채취하여 apoptosis 관련 유전자인 Bcl-2와 imprinting 관련 유전자인 IGF2의 발현양상에 대한 결과로서, 모든 장기에 있어 수정란의 기원에 따른 유의적인 차이를 보이지는 않았다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1 절 목표달성도

수행 연도	연구개발 목표 및 내용	달성도 (%)
1차년도 (2004)	(1) 체외수정란 생산체계 확립 가. 도축장 유래 미성숙난포란을 여러 배양 체계에 따라 체외성숙시킨 후 미세구조를 조사함으로써 적정 체외성숙 배양조건 설정 - 핵 성숙 상태 분석 - 난세포질의 microtubule, microfilament 및 mitochondria 분석	100 %
	나. 체외성숙 및 수정 조건확립을 위한 hormones, serum 및 antioxiide 등 각종 첨가물의 영향	100 %
	다. 체외배양조건 설정 - serum 및 antioxiide 등 첨가물과 저산소 배양 조건이 배발달에 미치는 영향 규명	100 %
	(2) 체내수정란 회수 방법 확립 가. 한우 및 유우의 발정동기화 및 과배란 유기 기법 확립	100 %
	나. 체내수정란 다량 회수	100 %
	(3) 생산된 체내 및 체외수정란 발달능 및 유전 발현조사 가. 체외배양 체계에 따라 생산된 수정란과 체내수정란의 염색체의 이상 분석	100 %
	나. apoptosis 발현 빈도 분석	100 %
	다. telomerase activity 분석	100 %
	라. DD-PCR을 이용한 신규유전자 탐색	100 %
	2차년도 (2005)	(1) 체외수정란 다량 생산 및 생산된 체외수정란 분석 가. Comet assay에 의한 DNA damage 분석
나. Xist 발현 비교 분석		100 %
(2) 이식 및 수태율 향상 가. 수태율 향상을 위한 trophoblast 공이식 및 GnRH의 효과 비교 조사		100 %
나. 이식 후 조기유산율 및 수태율 조사 - 초음파 및 혈청학적 진단		100 %
(3) 태아 적출 및 분석 가. 체외 및 체내 수정란 유래 태아를 인공 유산 후 비교 분석 - 인공유산에 대한 PGF2a와 PGE2 및 oxytoxin의 효과를 비교 조사 - 태아 기형 조사 및 염색체 분석 - 태반 크기 및 수		100 %

수행 연도	연구개발 목표 및 내용	달성도 (%)
	(4) 각 임신기별 태아의 유전자 발현분석 가. 수정란 및 태아로부터 H-β 58 gene 발현비교 나. 태아의 각 장기 유전자 발현 분석 다. 조기유산 및 거대 태아조직으로부터 apoptosis 조사 라. 거대태아 관련 유전자 탐색 및 IGF 발현량 측정	100 % 100 % 100 % 100 %
3차년도 (2006)	(1) 한우 송아지 생산 및 분석 가. 체외 및 체내 수정란 유래 산자의 비교 분석 - 태아 기형 및 염색체 분석 - 태반 크기 및 수 - 체세포 및 태반의 유전자 발현 비교 분석 (2) 한우 체외수정란 대량 이식 가. 산학 농가에 한우 체외수정란 대량 이식 (3) 한우 체외수정란 이식 후 송아지 대량 생산 및 분석 가. 한우 체외수정란 이식 후 송아지 대량 생산 및 분석 (4) 한우 송아지 분석 가. 한우 송아지의 혈액화학치 분석 나. 한우송아지의 염색체 및 형태학적 특징 분석 다. 체외수정란의 mRNA 추적으로 인한 거대태아와 관련된 marker 탐색	100 % 100 % 100 % 100 % 100 % 100 % 100 %

2 절 관련분야에의 기여도

가. 기술적 측면

- 난자의 세포 사멸과 조기 유산의 원인을 규명
- 한우 난포란의 체외성숙, 수정 및 배양체계 구축
- 체외수정란의 세포 사멸, 염색체 이상 및 유전자 발현을 비교 조사함으로써 최적의 체외배양 체계를 구축
- 체외수정란 이식에 있어서 조기유산의 원인이 되는 특정 유전자 규명함으로써 체외수정란 이식 효율을 상승
- 현재의 분만율 약 30%에서 50% 이상으로 상승
- 연구 수행에 따라 밝혀지는 유전자는 특허화 함으로써 국내 타 연구진과 학문적 교류 가능
- 한우 체외수정란 이식기술의 보급으로 산업화 및 실용화에 이바지하여 국내 축산 낙농

업의 발전과 생산성에 기여

- 체외수정란의 저렴한 가격으로 최대의 송아지 생산 효율을 기대
- 스트로우 당 두개 수정란을 약 30,000원에 농가에 보급 가능
- 축산 낙농에 관한 생명공학기술발전을 위한 기반 기술 제공

나. 경제 · 산업적 측면

- 고 부가 가치의 축산물을 생산함으로써 농민의 소득원인 생산성을 향상 및 축산업 발전에 도모
- 종축 개량에 있어서 종래의 인공수정에서 수정란이식 기술로 전환됨으로 값비싼 종축의 수입비용이 줄어들어 국가 경쟁력을 향상
- 종축, 정액 및 수정란 수입비용 절감효과
- 수정란 이식기술이 산업화됨으로써 고용 창출 효과
- 미래에 대해서 불안해하고 있는 낙농 축산인의 종축개량에 대한 희망고취
- 한우의 대량 생산으로 인한 생산성 및 경제성 향상
- 한우 값의 안정화로 농가나 일반 서민 생활의 안정화
- 소고기의 수입비용 절감
- 우리나라 한우 고기의 소모증가 및 식생활 기호가 비슷한 인근 국가로 수출함으로써 고부가 가치 창출
- 국민의 정신적 육체적 건강효과 상승
- 소고기의 수입절감에 따라 현재 유럽이나 미국 등지에서 발생한 광우병 등과 같은 질병 전파 우려감소
- 일반 서민들의 경제와 건강에도 도움이 되며 결과적으로 국가 경쟁력 향상

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 우량 체외수정란 생산 기술 보급 및 지도
 - 경남도 축산기술연구소, 수정란이식 연구회, 도 수의사회에서 점차적으로 전국적 보급 및 지도
 - 특히 농가에 수정란이식 시술 지도
 - 개발된 기술은 점진적으로 축협, 대한수의사회, 가축인공수정사협회 등 민간단체로 기술이전 (농림부와 상의하여 차후 결정)
- 생산된 한우 체외수정란을 농가에 보급, 이식하여 다량의 한우 송아지를 생산함으로써 지역 경쟁력 강화와 농가의 영농의욕 강화
 - 우량 한우 체외수정란의 무상공급 및 초저가 공급에 대해서는 차후 결정
- 개발된 기술은 특허 출원을 하여 재산권 확보
 - 조기유산 방지에 작용하는 특정 유전자 및 체외수정란 배양 기술
- 논문은 국외 저명한 학술잡지 (SCI에 등재된 학술 잡지)와 국내 학회지에 투고

제 6 장 연구개발과정에서 획득한 결과

- 국외 (SCI) 논문 발표

- ① Balasubramanian S, Son WJ , Mohana kumar B, Ock SA, Yoo JG, Im GS, Choe SY, Rho GJ. 2007. Expression pattern of oxygen and stress responsive gene transcripts at different developmental stages of in vitro and in vivo preimplantation bovine embryos. *Theryogenology* (submitted, Dec 7)
- ② SL Lee, B. Mohana kumar, JG Kim, SA Ock, BG Jeon, S. Balasubramanian, SY Choe, GJ Rho. 2007. Cellular composition and viability of cloned bovine embryos using exogene-transfected somatic cells. *Reprod Domest Anim.* 42(1)44-52
- ③ Balasubramanian S, Rho GJ. 2007. Effect of cysteamine supplementation of in vitro matured bovine oocytes on chilling sensitivity and development of embryos. *Anim Reprod Sci.* 98 282 - 292
- ④ Balasubramanian S, Rho GJ. 2006. Effect of chilling on the development of in vitro produced bovine embryos at various cleavage stages. *J Assist Reprod Genet.* Vol. 23, No. 2, February
- ⑤ GJ Rho, Balasubramanian S, DS Kim, WJ Son, SR Cho, JG Kim, Mohana kumar B, SY Choe. 2006. Influence of in vitro oxygen concentrations on preimplantation embryo development, gene expression and production of Hanwoo calves following embryo transfer. *Mol Rep Dev* 74:486-496.
- ⑥ Choe CY, Kim JG, Cho SR, Son DS, Kim YK, Balasubramanian S, Choe SY, Rho GJ. 2006. Influence of seasons, extenders, slow and rapid freezing on seminal characters in Korean native bucks. *Reprod Domest Anim.* Feb;41(1):55-60

- 국내/국외 포스터 발표

- ① SA Ock, LY Shi, HF Jin, WJ Son, SY Choe, GJ Rho. 2005. Comparison of development and quality of porcine embryos cultured in different oxygen concentration. *Reprod Fertil Dev.* 17(1,2) 2005
- ② HF Song, SH Lee, GH Maeng, JG Kim, S. Balasubramanian, GJ Rho. 2006. Effects of epidermal growth factor supplementation on in vitro maturation and gene expression of canine oocytes. *Reprod Fertil Dev.*18(1,2) 2006
- ③ Song HJ, DJ Hah, YJ Jeong, JG Kim, GJ Rho, SY Choe. 2005. Influence of

Oxygen Tension on In Vitro Development of Bovine Embryos. *Reprod Dev Bio*, 29(2)

- ④ Kim DS, JG Kim, WJ Son, SH Choi, SH Song, GJ Rho, and SY Choe. 2005 .
Pregnancy rates in dairy cows following transfer of beef embryos produced in vitro. *Reprod Dev Bio*, 29(2)
- ⑤ YJ Jeon, B. Mohana kumar, S. Balasubramanian, GJ Rho, SY Choe. 2006 .
Effects of oxygen concentration on the in vitro development and gene expression in in vitro produced bovine embryos. *Reprod Dev Bio*, 30(2)
- ⑥ WJ Son, DS Kim, S. Balasubramanian, HH Seong, SY Choe, GJ Rho. 2006
Post-implantation development following embryo transfer in cattle. *Reprod Dev Bio*, 30(2)
- ⑦ WJ Son, S. Balasubramanian, Mohana Kumar B, SA Ock, SY Choe, GJ Rho. 2006.
Gene expression patterns and developmental competence of pre-implantation embryos in cattle. *Reprod Dev Bio*, 30(2)

제 7 장 참고문헌

- Belloc F, Dumain P, Boisseau MR, Jalloustre C, Reiffers J, Bernard P. and Lacombe F. 1994. A flow cytometric method using Hoechst 33342 and Propidium Iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells. *Cytometry*. 17: 59-65.
- Betts DH, Bordignon V, Hill JR, Winger Q, Westhusin ME, Smith LC, and King WA. 2001. Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomere length in cloned cattle.. *PNAS* 3:1077-1082
- Betts DH and King DWA. 1999. Telomerase Activity and Telomere Detection During Early Bovine Development. *Developmental Genetics* 25:397-403
- Booth PJ, Viuff D, Tan S, Holm P, Greve T, Callesen H. 2003. Numerical chromosome errors in day 7 somatic nuclear transfer bovine blastocysts. *Biol Reprod*. 68:922-928.
- Chang KT, Yun SI, Hyun BH. and Seong HH. 2003. The Ovarian IGF System. *Korean J. Emb. Trans.* 18:163-169
- Darzynkiewicz, Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T. and Traganos F. 1997. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry*. 27: 1-20.
- Darzynkiewicz Z, Traganos F, Staiano-Coico L, Kapuscinski J, and Melamed MR. 1982. Interactions of rhodamine 123 with living cells studied by flow cytometry. *Cancer Res*. 42:799-806,
- Dive C, Gregory CD, Phipps DJ, Evans DL, Milner AE and Wyllie AH. 1992. Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biolchim. Biophys. Acta*. 1133:275-285.
- Gavrieli Y, Sherman Y and Ben-Sasson SA. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell. Biol.* 199:493-501.
- Hardy K. 1999. Apoptosis in the human embryo. *Reviews of Reproduction* 4:125-134
- Haughland RP. 1992-1994. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*. Molecular Probes, Eugene, OR.
- Idziorek T, Estaquier J, De Bels F and Ameisen JC. 1995. YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without

- interfering with cell viability. *Journal of Immunological Methods* 185:249-258.
- Johnson LV, Walsh ML, and Chen LB. 1980. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:990-994.
- Kerr JFR, Willie AH and Currie, AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 26:239-257.
- Koopman G, Reutelingsperger CPM, Kuijten GAM, Keehnen RMJ, Pals ST, and van Oers MHJ. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression of B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84:1415-1420,
- Li X, Melamed MR, and Darzynkiewicz Z. 1996. Detection of apoptosis and DNA replication by differential labeling of DNA strand breaks with fluorochromes of different color. *Exp. Cell. Res.* 222:28-37.
- Liu L and Keefe DL. 2000. Cytoplasm Mediates Both Development and Oxidation-Induced Apoptotic Cell Death in Mouse Zygotes. *Biol Reprod.* 62: 1828-1834.
- Maddox-Hyttell P, Gjørret JO, Vajta G, Alexopoulos NI, Lewis I, Trounson A, Viuff D, Laurincik J, Muller M, Tveden-Nyborg P, and Thomsen PD. 2003. Morphological assessment of preimplantation embryo quality in cattle. *Reprod Suppl.* 61:103-116.
- Majno G, and Joris I. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146:316.
- Moore T and Woolf R. 1996. Genetic conflict in early development: parental imprinting in normal and abnormal growth. *Reviews of Reproduction* 1:73-77.
- Nagaoka K, Nojima H, Watanabae F, Chang KT, Christenson RK, Sakai S. and Imakawa K. 2003. Regulation of blastocyst migration, apposition, and initial adhesion by a chemokine, interferone r-inducible protein 10 kDa (IP-10) during early gestation. *J. Biological Chemistry.* 278:29048-29056.
- Ogonuki N, Inoue K, Yamamoto Y, Noguchi Y, Tanemura K, Suzuki O, Nakayama H, Doi K, Ohtomo Y, Satoh M, Nishida A and Ogura A. 2002. Early death of mice cloned from somatic cells. *nature genetics* 30:253-254
- Ormerod MG, Sun XM, Snowden RT, Davies R, Fearnhead H and Cohen GM. 1993. Increased membrane permeability of apoptotic thymocytes: a flow cytometric

- study. *Cytometry*. 14:595-600.
- Raff MC. 1992. Social control on cell survival and cell death. *Nature*. 356:397-400.
- Raziel A, Friedler S, Schachter M, Kasterstein E, Strassburger D, and Ron-El R. 2002. Increased frequency of female partner chromosomal abnormalities in patients with high-order implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 78:515-519.
- Rieger D, Grisart B, Semple E, Van Langendonck A, Betteridge KJ, Dessy F. 1995. Comparison of effects of oviductal cell co-culture and oviductal cell conditioned medium on the development and metabolic activity of cattle embryos. *J. Reprod. Fertil*. 105:91-98
- Roos G and Hultdin M. 2001. Flow cytometric determination of telomere length. *Cytometry*. 45:79.
- Schwartz LM and Osborne BA. 1993. Programmed cell death, apoptosis and killer genes. *Immunol. Today*. 14:582-590.
- Simopoulou M, Harper JC, Fragouli E, Mantzouratou A, Speyer BE, Serhal P, Ranieri DM, Doshi A, Henderson J, Rodeck CH, and Delhanty JD. 2003. Preimplantation genetic diagnosis of chromosome abnormalities: implications from the outcome for couples with chromosomal rearrangements. *Prenat Diagn*. 23:652-662.
- Slimane-Bureau WC and King WA. 2002. Chromosomal abnormalities: a potential quality issue for cloned cattle embryos. *Cloning Stem Cells*. 4:319-329.
- Strebel A, Harr T, Bachmann F, Wernli M and Erb P. 2001. Green fluorescent protein as a novel tool to measure apoptosis and necrosis. *Cytometry*. 43:126-133.
- Telford WG, King LE and Fraker PJ. 1992. Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry. *Cytometry*. 13:137-143.
- van Engeland M, Luc JW, Nieland F, Ramaekers CS, Schutte B and Chris PM. 1998. Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure. *Cytometry* 31:19.
- Williams GT. 1994. Programmed cell death: a fundamental protective response to pathogens. *Trends Microbiol*. 2:463-464.
- Winger QA, De la Fuente R, King WA, Armstrong DT and Watson AJ. 1997. Bovine

Parthenogenesis Is Characterized by Abnormal Chromosomal Complements: Implications for Maternal and Paternal Co-dependence During Early Bovine Development. *Developmental genetics* 21:160-166.

Masashi Takahashi, Norie Saka, Hitomi Takahashi, Yukio Kana, Richard M. Schultz, Akira Okano. 1999. Assessment of DNA Damage in Individual Hamster Embryos by Comet Assay. *Reproduction and development* 54:1-7 (1999)