

발간등록번호

11-1543000-000173-01

제주흑우의 대량증식 기술개발 및 산업화

(Industrialization and mass production of Jeju Black Cattle)

제주대학교 산학협력단

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “생명산업기술개발사업연구 (308008-5)” 과제 (세부과제 “제주흑우의 대량증식 기술개발 및 산업화”) 의 최종보고서로 제출합니다.

2013 년 9월 30일

주관연구기관명 : 제주대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 박 세 필

세부연구책임자 : 박 세 필

제1협동연구기관명 : 충북대학교 산학협력단

협동연구책임자 : 김 남 형

제2협동연구기관명 : 제주특별자치도 축산진흥원

협동연구책임자 : 김 영 훈

제3협동연구기관명 : 국립축산과학원 난지출장소

협동연구책임자 : 고 문 석

제4협동연구기관명 : (주)미래생명공학연구소

협동연구책임자 : 김 은 영

요 약 문

I. 제 목;

제주흑우의 대량증식기술개발 및 산업화

II. 연구개발의 목적 및 필요성;

연구개발의 목적 및 필요성은 멸종위기 제주흑우를 첨단 생명공학 기술로 대량 번식 시키는데 있음. 제주흑우는 한우 4 품종 중의 한 종으로 세계자연유산 제주특별자치도에서만 서식하고 있음. 고려 왕조시대 이래 임금님의 진상품으로 촉촉한 마아블링과 유연성 및 질감이 있고 불포화지방산인 올레익산과 리놀레익산이 풍부하여 웰빙식품으로도 최근에 관심을 끄. 따라서 1990년대 초반부터 제주흑우 보존프로그램 하에 멸종동물로 간주되어 보호돼 오고 있음. 이런 관점에서 생명공학기법을 이용한 대량증식은 고급브랜드육 생산으로 이어져 한·미 FTA 타결로 침체된 농가의 위기극복 뿐만 아니라 국제적으로 경쟁력 있는 상품을 생산하여 국가에 일익이 될 것임.

III. 연구개발 내용 및 범위

연구개발 내용 및 범위는 i) 체내·외 수정란 생산 및 이식기술 개발 ii) 생식세포 (정자와 난자) 성 감별 iii) 수정란 동결기술 최적화 iv) 제주흑우유전 형질 탐색 및 v) 우량 제주흑우보존과 관련 보조생식기술 개발임.

IV. 연구개발결과

연구개발로서 얻어진 결과는 다음과 같음. i) 제주흑우 친자감별 및 등록에 필요한 24개 마커를 선정하고 활용함. ii) 2013년 현재, 제주흑우 등록우 460두, 등록대기 150두로 연구시작 2008년 96두에서 610두로의 증식효과에 기여함. iii) 우수 흑우정액 선별을 위한 데이터베이스 구축용 정액분석기와 정액스트로제조 자동화 시스템을 두 기관 (제주도 축산진흥원과 국립축산과학원 난지축산시험장) 내에 설비하여 가동되게 함. iv) 체외수정란 생산 효율을 높인 새로운 수정기법과 배양기술 개발하여 3건 특허 등록함. v) 본 연구진에의해 개발된 초자화동결기술은 농장에서 one-step 용해 후 바로 이식하는 동결방법임. vi) 현존하거나 죽은 우량 제주흑우 종모우 (복제씨수소 ‘흑영돌이’, 현존하는 체세포이용; ‘흑을돌이’, 죽은 씨수소 체세포 동결 2년 뒤 녹여 이용) 체세포와 종빈우 (‘흑우순이’, 죽은 씨암소 체세포 동결 2년 뒤 녹여 만든 복제수정란을 초자화동결기술로 세계처음으로 복제성공) 체세포 확보 후 체세포 핵이식기법으로 복제씨수소 2두와 씨암소 1두를 생산함. vii) 복제소 성과 (3두) 와 논문 성과 (19편) 을 언론 매체를 통해 홍보함 (총 257건). viii) 2010년 농림수산식품 우수과제 선정 및 일본 동물생식학회 (JRD) 우수논문으로 선정됨. ix) 제주흑우 천연기념물 제546호 지정에 기여함. x) 관련 기술을 교육·홍보 (20건) 하고 우수인력을 양성함 (5건; 석사 5명).

V. 연구 성과 활용계획

연구 성과 활용계획은 다음과 같음. i) 확립된 유전자 marker 체계를 활용한 친자감별확인 과 도체 형질분석 통한 우수유전능력 제주흑우 발굴. ii) 제주흑우 전용 홈페이지를 통한 제주 흑우 전수 공개로 소비자 니즈 충족. iii) 구축된 기반·설비를 이용한 수정란이식사업의 활성화유도. iv) 제주흑우 대량증식을 통한 제주흑우 판매유통 산업화 기반 활성화. v) 제주흑우 천연기념물 제546호 지정에 따른 제주특별자치도와 제주대학교 줄기세포연구센터 간 “우량 제주 흑우 체외수정란 이식사업협약” 으로 활성화.

SUMMARY

Subject;

Industrialization and mass production of Jeju Black Cattle

The purpose and need for research and development;

The purpose of this research and development is for mass production of the endangered Jeju Black Cattle. Jeju Black Cattle, one of 4 native Korean cattle species, lived in the World Natural Heritage in the Jeju Special Self-Governing Province only. Their beef had been delivered to the Korean royal family regularly since the Goryeo Kingdom era. It had the excellent elasticity and chewy meat fillet in a thin marbling, and tightly lodged unsaturated fatty acids such as oleic acid, linoleic acid content, is getting increased attention as a wellness food. Jeju Black Cattle are regarded as an endangered breed, which fostered the Jeju Black Cattle Conservation Program in the early 1990s. In the viewpoint, mass production of the Jeju Black Cattle using biotechnology can produce high-quality brand meat. Also, recession mood of the field of livestock caused by Korea-U.S.A FTA can be overcome and will be able to have a beneficial effect to produce International competitive products.

Content and scope of research and development

Content and scope of research and development of this study were to investigate i) Establishment of embryo production and embryo transfer of Jeju Black Cattle ii) Sex control of sperm and egg iii) Optimization of embryo freezing technique iv) Genotype analysis related in Jeju Black Cattle and v) Conservation of elite Jeju Black Cattle and development of assisted reproductive technology.

Results of research and development

Results obtained in this research and development were as follows: i) Selection of 24 markers required for paternity analysis of Jeju Black Cattle ii) As of year 2013, 460 Jeju black cattles are registered and 150 Jeju black cattle are ready to be register. This research was started with only 96 Jeju Black Cattle in 2008, but now they increased to 610 Jeju Black Cattle. iii) For excellent database screening of Jeju Black Cattle semen, Computer Assisted Sperm Analyser (CASA), sperm freezer and automated sperm distributor installed

in Institution for Livestock Promotion and the National Institute of Subtropical Agriculture in Jeju as a request of this project will produce elite Jeju Black Cattle embryo. iv) Three patent are registered for in vitro embryo production efficiency and new IVF techniques. v) Newly developed vitrification and one-step dilution technique applied effectively on field trial for cloned Jeju Black Cattle production. vi) We producted two elite Jeju Black Cattle cloned bulls (Heuk Young Dolee and Heuk Oll Dolee) and one elite Jeju Black Cattle cloned cow (Heuk Woo Sunee). Two out of three of these animals (Heuk Oll Dolee and Heuk Woo Sunee) were post-death cloned and produced by somatic cell nuclear transfer (SCNT) approximately 2 years after their nuclear donors were slaughtered. vii) Successfully produced 3 cloned Jeju Black Cattles, total of 19 submitted research papers, and total of 257 events are publicized throughout the media. viii) Our team has been selected for excellent project from the IPET in 2010and received the honorable paper award from Japan Society of Animal Reproduction (JRD) ix) Contributed the designation of Jeju Black Cattle as No. 546 natural monument of national cultural property. x) Promoted total of 20 educational and related techniques and were able to train and educate 5 masters degree students.

Utilization plan of research product

Utilization plan of research product was as follows: i) Selection of elite Jeju Black Cattle by newly developed paternity test and carcass traits analysis. ii) Satisfaction of customers needs through the information about total number of Jeju Black Cattle in website. iii) Activation of business plan of embryo transfer using established equipment and system: -Excellent database screening of Jeju Black Cattle semen by Computer Assisted Sperm Analyser (CASA), sperm freezer and automated sperm distributor, -From organization sector to private sector, and -Use of simple ultra-rapid freezing-thawing technique. iv) Activation of infra-structure in sales distribution through the mass production of Jeju Black Cattle. v) Contract for the embryo transfer plan of elite Jeju Black Cattle between Jeju National University Stem Cell Research Center and Jeju Special Self-Governing Province by designation of Jeju Black Cattle as No. 546 natural monument of national cultural property.

CONTENTS

1. Summary of research development	13
1.1 Purpose of research development	13
1.2 Necessity of research development	14
1.3 Scope of research development	18
2. Status of technique development at domestic and foreign countries	19
2.1 Status of research and development at domestic and foreign in the technique	19
2.1.1 International level	19
2.1.2 National level	19
2.2 Domestic and foreign-related technique trends	20
3. Information and results of research performed	22
3.1 Culture condition development and optimization of in vitro embryo culture	22
3.1.1 In vitro culture condition technique development	22
3.1.1.1 Effect on the development of embryos in vitro antioxidant anti-apoptotic effects by adding flavonoids	22
3.1.1.2 Flavonoid-treated SCNT embryos in vitro development and production of cloned calves Jeju black cattle	30
3.1.1.3 Development of culture condition utilizing stem cell derived bioactive material	42
3.1.2 Production of excellent embryo through in vitro fertilization (IVF)	55
3.1.2.1 Improvement of IVF utilizing swim-up step (technique invented)	55
3.1.2.2 Effect of GAG-treated sperm IVF of bovine oocytes	64
3.2 Establishment of Jeju Black Cattle embryo production and embryo transfer system	71
3.2.1 Embryo production	71
3.2.2 Embryo transfer	78
3.2.3 Obtaining of super bull Jeju Black Cattle	80
3.2.4 Sperm characteristics analysis of candidate for super bull Jeju Black Cattle	82
3.2.5 Registration of Jeju Black Cattle	82
3.3 Technique invented for sperm sex control, and embryo utilization	86
3.3.1 Sperm sex control	86
3.3.1.1 Sperm analysis	86
3.3.1.2 IVF potential treated with diluent of sperm sex control	88
3.3.1.3 Sperm sex control (sperm separation by Flow cytometer)	89
3.3.2 Embryo sex control	101
3.3.2.1 Embryo sex control by using PCR and LAMP	101
3.3.2.2 Sexual Dimorphism-utilized embryo sex control	106

3.4	Embryo freezing technique development and transplantation of Jeju Black Cattle	113
3.4.1	Technique development of embryo freezing	113
3.4.1.1	Effect of the anti-oxidant flavonoid on frozen-thawed embryo	115
3.4.1.2	Optimization of unfertilized egg freezing technique	118
3.4.2	Utilization of freezing technique	120
3.4.2.1	Slow freezing	120
3.4.2.2	Production of cloned Jeju Black Cattle (Korean cattle) from SCNT embryo using vitrification, one-step dilution and direct transfer technique	121
3.5	Genetic detection and analysis of Jeju Black Cattle	128
3.5.1	Jeju Black Cattle markers for paternity analysis and system	128
3.5.1.1	Microsatellite (MS) Genotyping of Jeju Black Cattle	128
3.5.1.1.1	MS selection marker of Jeju Black Cattle	132
3.5.1.1.2	Practical application of MS marker in Jeju Black Cattle farmer groups	137
3.5.1.1.3	Jeju Black Cattle pedigree management and breeding system of individual identification system using paternity analysis	141
3.5.1.1.4	Creation of Jeju Black Cattle genetic family tree	142
3.5.1.2	Insertion-deletion polymorphisms (Indel) Genotyping of Jeju Black Cattle	144
3.5.1.2.1	Selection and analysis of Indel marker	144
3.5.1.2.2	Indel marker selection and optimal system for individual identification and paternity analysis	150
3.5.1.3	Genetic analysis in the coat color patterns of Jeju Black Cattle	159
3.5.1.3.1	Gene analysis of the coat color patterns related to Jeju Black Cattle	159
3.5.1.3.2	Genotype distribution of MC1R, and ASIP in the coat color patterns of Jeju Black Cattle	161
3.5.1.3.3	Genetic analysis of Jeju Black Cattle F1-related the coat color patterns	163
3.5.2	Genetic analysis between Jeju Black Cattle and other breeding animals	164
3.5.2.1	Genealogy analysis of Jeju Black Cattle revealed by mitochondrial DNA (mtDNA)	164
3.5.2.1.1	Jeju Black Cattle NJ & network analysis	164
3.5.2.1.2	Korean cattle breeds NJ & network	165
3.5.2.1.3	Japanese Wagyu NJ & network analysis	166
3.5.2.1.4	NJ & network analysis between Jeju Black Cattle and Japanese Wagyu	167
3.5.2.1.5	KN4 (super bull Jeju Black Cattle) mtDNA analysis and NJ & network	168
3.5.2.1.6	Genealogy analysis between Jeju Black Cattle and other breeding animals based on mtDNA-D loop	170
3.5.2.2	SNP chip analysis and specific gene detection of Jeju Black Cattle	172
3.5.2.3	Carcass traits analysis of Jeju Black Cattle	174
3.5.2.3.1	Beef carcass grade from Jeju island	175
3.5.2.3.2	GHR polymorphism and correlation analysis of carcass traits of Hanwoo and Jeju Black Cattle	176

3.5.2.3.3	GH1 and POU1F1 polymorphism and correlation analysis of carcass traits of Hanwoo and Jeju Black Cattle	178
3.5.2.3.4	IGFBP3 polymorphism and correlation analysis of carcass traits of Hanwoo and Jeju Black Cattle	179
3.5.2.3.5	Distribution of SNP and carcass traits grade of slaughtered Jeju Black Cattle	179
3.6.	Preservation of elite Jeju Black Cattle and development of applied technology	183
3.6.1	Optimization of Somatic cell nuclear transfer (SCNT) technique and efficient production of cloned embryos	183
3.6.1.1	Efficient production of cloned embryos using Oosight imaging system	183
3.6.2	Production of cloned Jeju Black Cattle	188
3.6.2.1	Production of cloned breeding bull ‘Heuk Young Dolee’	190
3.6.2.2	Production of cloned breeding bull ‘Heuk Oll Dolee’	193
3.6.2.3	Production of cloned breeding cow ‘Heuk Woo Sunee’	195
3.6.3	Sperm analysis and IVF potential of somatic cell nuclear transfer (SCNT) cloned cattle	197
3.6.3.1	Sperm analysis and IVF of cloned cattle ‘Heuk Young Dolee’	197
3.6.3.2	Sperm analysis and IVF of cloned cattle ‘Heuk Oll Dolee’	201
3.6.4	Establishment of bovine embryonic stem cell lines	203
4.	Goal achievements and the contribution of related fields	205
4.1	Achievement of research goals	205
4.2	The contribution of technique to the development of related fields	210
5.	Achievement of research development and utilization plan	212
5.1	Goal and achievements of research product	212
5.1.1	Patent result	212
5.1.2	Published paper result	216
5.1.3	Academical presentation	222
5.1.4	Utilization of educational instruction	239
5.1.5	Awards	243
5.1.6	Education and training	244
5.1.7	PR (press and visual media)	245
5.2	Utilization plan of research product	266
5.2.1	Selection of elite Jeju Black Cattle by newly developed paternity test and carcass traits analysis	266
5.2.2	Satisfaction of customers needs through the information about total number of Jeju Black Cattle in website	267
5.2.3	Activation of business plan of embryo transfer using established equipment and system	269

5.2.3.1 Excellent database screening of Jeju Black Cattle semen by Computer Assisted Sperm Analyser (CASA), sperm freezer and automated sperm distributor -----	269
5.2.3.2 From organization sector to private sector -----	270
5.2.3.3 Use of vitrification, one-step dilution and direct transfer technique -----	271
5.2.4 Activation of infra-structure in sales distribution through the mass production of Jeju Black Cattle -----	272
5.4.5 Contract for the embryo transfer plan of elite Jeju Black Cattle between Jeju National University Stem Cell Research Center and Jeju Special Self-Governing Province by designation of Jeju Black Cattle as No.546 natural monument of national cultural property -----	273
6. International scientific and technical information obtained during research period -----	277
6.1 Establishment of Jeju Black Cattle embryo production and transplantation system ---	277
6.2 Technical development for sex control -----	279
6.3 Freezing technique development and transplantation of Jeju Black Cattle embryo ---	283
6.4 Genetic detection and analysis of Jeju Black Cattle -----	284
6.5 Preservation of elite Jeju Black Cattle and development of applied technology -----	288
7. Research equipments and facility -----	290
8. References -----	292

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	13
제1절	연구개발의 목적	13
제2절	연구개발의 필요성	14
제3절	연구개발의 범위	18
제 2 장	국내외 기술개발 현황	19
제1절	연구개발 대상 기술의 국내·외 현황	19
1.	세계적 수준	19
2.	국내수준	19
제2절	관련기술 국내·외의 연구동향	20
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	22
제1절	체외 수정란 배양 환경 기술 개발 및 최적화	22
1.	체외배양환경 기술 개발	22
가.	체외수정란 발달에서 플라보노이드 첨가가 미치는 항산화·항사멸 작용	22
나.	플라보노이드 처리된 체세포 핵이식 배아의 체외 발달 및 제주흑우 복제소 생산	30
다.	줄기세포 생리활성 물질을 이용한 배양환경 개발	42
2.	체외수정 기술 개발을 통한 우수 수정란 생산	55
가.	2단계 스윙업(swim-up) 방법을 이용한 가축의 체외수정능 향상방법	55
나.	GAG 처리된 정자가 소 난자의 체외발달에 미치는 영향	64
제2절	흑우 수정란 생산 및 이식 체계 확립	71
1.	수정란 생산	71
2.	수정란 이식	78
3.	제주흑우 씨수소 확보	80
4.	제주흑우 후보씨수소 정액성상 분석	82
5.	제주흑우 등록관리	82
제3절	성감별 정자 및 수정란 활용 기술 개발	86
1.	정자 성감별	86
가.	정액 분석	86
나.	정자 성감별에 사용되는 정액 희석액의 체외수정능에 미치는 영향 검토	88
다.	정자 성감별 (Flow cytometer에 의한 정자분리)	89
2.	수정란 성감별	101
가.	PCR방법과 LAMP법을 이용한 수정란 성감별	101
나.	Sexual Dimorphism (성별 이형성)을 활용한 수정란 성 감별	106
제4절	제주흑우 수정란 동결 기술 개발 및 이식	113
1.	수정란 동결 기술 개발	113
가.	동결-융해 수정란에 대한 항산화제 플라보노이드 처리효과	115

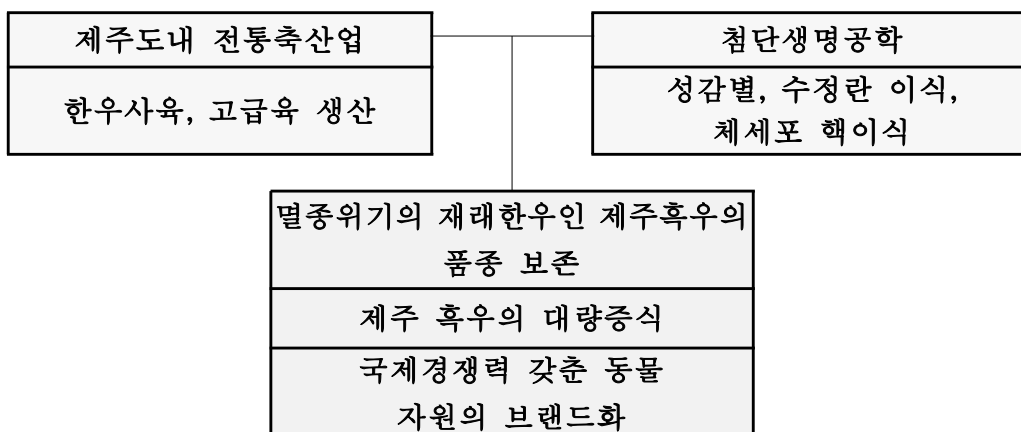
나. 미수정란 동결 기술의 적정화-----	118
2. 동결 기술 활용-----	120
가. 완만동결-----	120
나. 초자화동결과 1-단계 용해된 체세포핵이식란의 직접이식기술로 제주흑우 복제소 생산-----	121
제5절 제주흑우 유전형질 검출 및 분석-----	128
1. 제주흑우 친자확인을 위한 표지인자 분석 및 시스템 구축-----	128
가. 제주흑우 Microsatellite (MS) 유전자형 분석-----	128
(1) 제주흑우 MS 표지인자 선정-----	132
(2) 농가 제주흑우 집단에서의 MS marker 실제 적용-----	137
(3) 제주흑우 혈통관리 및 육종체계에서의 개체식별·친자감별 시스템의 이용-----	141
(4) 유전형질에 따른 제주흑우 가계도 작성-----	142
나. 제주흑우 Insertion-deletion polymorphisms (Indel) 유전자형 분석-----	144
(1) Indel 마커 선정 및 조사-----	144
(2) Indel 마커 선발과 최적의 개체식별 및 친자감별 시스템 구축-----	150
다. 제주흑우 특이 모색 유전자 분석-----	159
(1) 제주흑우와 실용화 축군에서 모색 관련 유전자 분석-----	159
(2) 제주흑우 실용화축군의 모색과 <i>MC1R</i> , <i>ASIP</i> 유전자형의 분포-----	161
(3) 제주흑우 실용화축군에서 발견되는 특이모색 관련 유전자 분석-----	163
2. 제주흑우의 타 품종과의 유전적 특이성 분석-----	164
가. 미토콘드리아 DNA 분석을 통한 제주흑우 계통유전학적 분석-----	164
(1) 제주흑우 NJ & network 분석-----	164
(2) 한국 소 품종들 간 NJ & network-----	165
(3) 일본 화우 NJ & network 분석-----	166
(4) 제주흑우와 일본화우의 NJ & network 분석-----	167
(5) KN4 개체의 mt DNA 분석 및 NJ & network-----	168
(6) 전 세계 소 품종의 D-loop 유전자에 대한 계통유전학적 분석과 제주흑우의 위치-----	170
나. 제주흑우 Bovine SNP chip 분석 및 특이 SNP 탐색-----	172
다. 제주흑우의 도체형질 분석-----	174
(1) 제주지역에서 출하된 소의 도체성적-----	175
(2) <i>GHR</i> 유전자형의 다형성과 한우 및 제주흑우의 도체형질의 상관 분석-----	176
(3) <i>GHI</i> 과 <i>POUIF1</i> 유전자형의 다형성과 한우 및 제주흑우의 도체형질의 상관 분석-----	178
(4) <i>IGFBP3</i> 유전자형의 다형성과 한우 및 제주흑우의 도체형질의 상관 분석-----	179
(5) 제주흑우 도축우 집단에서 유전자의 SNP 분포와 도체형질의 성적-----	179
제6절 제주흑우 우수 유전형질 보존 및 응용기술 개발-----	183
1. 체세포핵이식 기술 최적화 및 복제수정란 생산 효율 개선-----	183
가. Oosight imaging system을 이용한 복제 수정란 생산 효율 개선-----	183
2. 제주흑우 복제소 생산-----	188
가. 복제씨수소 ‘흑영돌이’ 생산-----	190
나. 복제씨수소 ‘흑울돌이’ 생산-----	193
다. 복제씨암소 ‘흑우순이’ 생산-----	195

3. 체세포복제소의 정액 분석 및 체외수정능 검정-----	197
가. 복제소 흑영돌이 정액 분석 및 체외수정-----	197
나. 복제소 흑올돌이 정액 분석 및 체외수정-----	201
4. 소 배아줄기세포주 확립 기술 개발-----	203
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여-----	205
제1절 연구개발 목표의 달성도-----	205
제2절 관련분야의 기술발전예의 기여도-----	210
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획-----	212
제1절 연구성과 목표 및 달성-----	212
1. 특허 성과-----	212
2. 논문발표 성과-----	216
3. 학술발표-----	222
4. 교육·지도활용-----	239
5. 수상실적-----	243
6. 연구인력 활용/양성 성과-----	244
7. 홍보 (언론 및 영상 매체)-----	245
제2절 성과활용 계획-----	266
1. 확립된 유전자 marker 체계를 활용한 친자감별확인과 도체 형질분석 통한 우수유전 능력 제주흑우 발굴-----	266
2. 제주흑우 전용 홈페이지를 통한 제주흑우 전수 공개로 소비자 니즈 충족-----	267
3. 구축된 기반·설비를 이용한 수정란이식사업의 활성화유도-----	269
가. 자동화 기계 이용으로 정액데이터베이스구축을 통한 우수 정액 스트로 제조-----	269
나. 기관주도형에서 민간주도형-----	270
다. 초급속 간편 동결 용해 기술이용-----	271
4. 제주흑우 대량증식을 통한 제주흑우 판매유통 산업화 기반 활성화-----	272
5. 제주흑우 천연기념물 제546호 지정에 따른 제주특별자치도와 제주대학교 줄기세포 연구센터 간 “우량 제주흑우 체외수정란 이식사업협약” 으로 활성화-----	273
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보-----	277
1. 제주흑우 수정란 생산 및 이식 체계 확립-----	277
2. 성감별 정자 및 수정란 활용 기술 개발-----	279
3. 제주흑우 수정란 동결 기술 개발 및 이식-----	283
4. 제주흑우 유전형질 검출 및 분석-----	284
5. 제주흑우 우수 유전형질 보존 및 응용기술개발-----	288
제 7 장 연구시설·장비 현황-----	290
제 8 장 참고문헌-----	292

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 목적

- 세계적인 자유무역주의의 확산에 따라 국내 농축산물 시장도 완전히 열린 시장으로 이행하게 될 것임(대외경제연구원, FTA대응전략연구, 2008년). WTO/DDA 농업협상에 따라 2020년 이전에 개도국 수준의 관세감축을 종료하게 될 것이며, 이후에는 선진국 수준의 의무를 담당하게 될 것으로 전망됨.
- 한·미 FTA 체결이 이루어져 경쟁력이 심화되고 있는 가운데 국내산 쇠고기의 가격은 주수입국인 미국에 비해 4.1 배나 비싸 가격 경쟁력이 미약한 현실임.
- 최근 국민소득의 증가로 육류의 소비가 증가하고 있으며 고급육에 대한 수요도 증가하는 실정이며, 우리 국민의 기호를 충족시킬 뿐만 아니라 외국산 쇠고기와 경쟁력을 갖출 수 있는 고유 한우의 품종개발과 특성화 및 브랜드화가 필요함.
- 한우 사육농가 및 쇠고기 시장보호를 위해 국제 경쟁력을 갖춘 고품질 한우의 대량 생산이 시급한 실정임. 이러한 의미에서 한우가 경쟁력을 갖는데 중요한 요소인 “고유한, 차별화된 맛”을 지니는 고유 전통의 한우인 **제주흑우 품종 개발**은 축산농가의 소득 및 수입육에 대한 한우육의 국제경쟁력을 개선할 수 있는 계기가 될 것임.
- 제주흑우는 갈색한우와는 달리 육질이 아주 단백하고 특별한 맛을 가지고 있어 임금님에게 진상품으로 공출되었으나, 잦은 공출과 일제시기의 멸종정책으로 현재 겨우 제주에 370여 마리(친자감별을 통한 유전자원 등록이전) 로 그 명맥이 유지되고 있는 실정임.



- 따라서 멸종위기에 있는 제주흑우를 수정란 이식 기술에 의해 대량 번식시키고, 첨단 생명공학기술인 핵이식 기법에 의해 복제 생산함으로써 그 품종을 유지 시키고 나아가 고품질 브랜드육 대량생산 체계를 갖춰 국제 경쟁력 있는 상품으로 개발하는데 목적을 둬.
- 더불어 세계 7개 자연경관인 제주특별자치도에만 존재하는 멸종 위기 제주흑우의 우량 유전자원 보존, 등록 및 연구성과 보고 등을 통해 지속적으로 그 의미와 중요성을 알려 제주흑우는 우리가 보존하고 관리해야 할 유산임을 알리고자 함.

제2절 연구개발의 필요성

- 2030년까지 1인당 국민소득(GNI) 4~5만 달러로 증가하면서 고소득 시대를 살아가는 생활양식과 국민의식의 전환이 뚜렷해질 것임(대외경제연구원). 고소득 시대에 따른 농산물 소비의 다양화로 제품차별화가 가속화되고, 외식 산업의 지속적인 성장이 예상됨.
- 농산물의 신 수요와 신 시장이 지속적으로 확대·정착될 것임. 소득증대에 따라 소비자의 의식변화가 급진전되면서 소비선택기준에 근본적인 변화가 진행 중에 있음. 가격, 양, 모양 중심에서 안전성, 품질, 편의성, 건강성, 기능성, 나아가 감성이 농식품 소비에서 소비자 선택의 중요한 기준이 되고 있음.
- 최근 국민소득의 증가로 육류의 소비가 증가하고 있으며 고급육에 대한 수요도도 증가하는 실정임. 그래서 우리 국민의 기호도를 충족시킬 뿐만 아니라 외국산 쇠고기와 경쟁력을 갖출 수 있는 우리 고유 한우의 품종개발과 특성화 및 브랜드화가 필요함.
- 제주흑우는 갈색한우와는 달리 육질이 아주 단백하고 고기맛 (특히 상강육이 발달) 이 우수하여 고려시대 및 이조시대 삼명일 (임금님생신날, 동지, 정원초하루) 에 정규진상품으로 공출되었음.
- 제주흑우는 세계 7대 자연 경관인 제주의 청정 이미지를 기초로 안전성, 품질면에서 국내의 다른 축산물은 물론 세계의 그 어떤 축산물과도 확실히 차별화되어 있어 국내 소비자는 물론 전 세계인이 없어서 먹지 못하는, 한번 먹어보는 것이 소원인 최고의 농산물로 개발이 가능함.
- 제주흑우는 도외 반출이 엄격히 제한되고 있으며 위생안전에 민감한 소비자의 심리에 긍정적으로 작용할 수 있는 가축전염병 청정지대 (Free zone) 제주에서 생산 되는 국내 유일의 품종임.
- 이런 관점에서 대량증식 기반만 마련된다면 제주흑우는 국제 경쟁력 있는 상품으로 개발 가능함.

○ 따라서 제주흑우 (그림 1) 의 품종개발과 특성화 및 브랜드화는 매우 시의 적절함.



그림 1. 제주 축산진흥원에서 보유하고 있는 제주흑우 씨숫소(♂, 왼쪽, 시가 2억 호가) 와 암소 (♀, 오른쪽)

○ 제주흑우는 등심내의 Marbling이 한우 등심보다 가늘면서 촘촘하게 박혀있고, 고기의 탄력성 및 먹었을 경우 씹은 후 은은하게 퍼지는 달콤한 향기가 일품이며, 도축 후 등급 판정 결과 1등급이상이 84.6% (한우, 66.2%) 이었으며, 뒷다리부분까지 Marbling이 우수함 (표 1과 2, 그림 2 참조).

표 1. 제주흑우 도체성적요약

(제주축산진흥원 2007 자료 참조)

구 분	도체중 (kg)	등 지방 두께(mm)	등심면적 (cm ²)	근 내 지방도	육량지수	1등급 출현율	비 고
제주흑우	346.7	13.0	78.9	4.9	67.0	84.6%	
한 우	382.0	11.6	83.2	4.7	65.8	66.2%	

※ 제주흑우 도체성적은 축산진흥원 비육시험 결과이며, 한우는 '06년 출하된 거세비육우 도체 성적 전국평균



그림 2. 도축 제주흑우등심 (왼쪽) 과 한우등심 (오른쪽)

표 2. 제주흑우 고기 지방산 성분분석 결과

지 방 산(%)	한우거세우	흑우
Oleic acid(C18:1n9)	48.30	49.61
Linoleic acid(C18:2n6)	1.69	1.99
Y-Linoleic acid((C18:3n6)	0.095	0.13
Linolenic acid(C18:3n6)	0.105	0.15
Eicosatrienoic acid(C20:3n3)	0.11	0.25
포 화 지 방 산	44.06	40.84
불 포 화 지 방 산	55.94	59.17

(축산과학원 축산물이용과 2007 자료 참조)

- 제주흑우는 일본 소 화우 (와규)에 버금가는 고급육으로서 명품브랜드화로 고부가가치를 얻을 수 있는 강점을 보유하고 있음.
- 제주흑우 번식과 관련하여 제주축산진흥원에서 '92~'93년 제주도 전역을 수소문하여 늙은 제주흑우(연령 15~20세 이상) 10마리를 수집하여 사육하기 시작하였으며 그 당시 난지농업연구소를 포함하여 23마리의 제주흑우가 사육되었고 사육 두수는 370여 마리에 불과함.
- 제주흑우를 보호하고 증식하기 위한 일환으로 제주도에서는 정책적으로 축산법에 근거하여 '제주흑우 보호 및 육성에 관한 조례' 제정 (2006) 으로 생축 및 정액과 수정란 등의 도외 반출을 엄격히 제한하여 증식과 보호에 힘쓰고 있음.
- 2002년 8월에는 제주흑우를 우리나라 고유의 품종으로 인정하는 등록에 관한 규정이 마련 되어 2008년 10월에 등록우 96마리에 대한 등록 및 유전자원 조사가 이루어지는 등 고유 품종으로 인정받고 있고, 동물유전자원관련 국제기구인 FAO에 제주흑우가 우리나라 한우 품종 4종 중 한개 품종으로 등록 신청됨 (농림축산식품부 보도자료, 2010. 6. 16).
- 하지만 제주흑우 전 두수에 대한 유전분석체계가 이루어져 있지 않아 다른 한우와 구별할 유전검정 체계가 요구되며 증식된 개체 관리를 위해 유전등록시스템 구축이 시급함.
- 제주도 축산진흥원에서 2010년까지 1,000두, 2015년까지 2,500두로 증산 계획하고 있으나, 제주흑우의 명품 브랜드화 사업의 시급성에 비추어 절대적으로 부족한 실정임.
- 또한 위 목표도, 첨단 생명공학기술과 체내·외 수정란 이식 사업을 대대적으로 했을 경우 달성 가능한 수치임.

- 제주흑우를 우수한 품종으로 개량하기 위해서는 종모우와 종빈우로 사용가능한 후보 선발이 시급하나, 보유 개체 수가 적어 근친을 피하면서 대량 증식할 수 있는 시스템 구축에 애로가 있음.
- 제주흑우 사업은 중앙 정부의 농림부 차원에서 지원하고 산·학·연 사업으로 추진하여 체외 수정, 수정란 이식 기술 개선, 체세포 핵이식 기술 도입, 수정란 및 정자의 성 감별기술, 수정란 동결 기술 개발 등의 첨단 생명공학기술 접목 및 산업화 브랜드화로 추진하는 것이 절실히 요구됨.
- 따라서 이러한 연구 사업의 성과로 체계적인 관리와 증식 기반이 마련된다면, 제주흑우는 국내 유일의 품종으로 청정지역에서 생산된 고급육으로 black color 먹거리 웰빙고급육으로 대한민국을 대표하는 상품이 될 수 있을 것으로 기대됨.

제3절 연구개발의 범위

1. 제주흑우 수정란 생산 및 이식 체계 확립
 - 체외수정란 생산 및 배양환경 기술 개발
 - 체내수정란 생산 및 효율 조사
 - 수정란 이식 및 임신 결과 분석
 - 우수정액 생산 및 분석
 - 제주흑우등록 및 관리

2. 성감별 정자 및 수정란 활용 기술 개발
 - 제주흑우 정액의 성감별 및 인공 수정
 - 제주흑우 수정란 성감별 기술 개발 및 도입
 - 성감별 효율 조사

3. 제주흑우 수정란 동결 기술 개발 및 이식
 - 체내·외 수정란 동결 기술의 최적화
 - 복제수정란 동결 기술개발
 - 현장이식 가능한 동결법 개발

4. 제주흑우 유전형질 검출 및 분석
 - 제주흑우 고유 표지인자를 이용한 선발 체계 확립
 - 제주흑우의 친자 감별 시스템 구축
 - 제주흑우의 등록 및 계통도 조사
 - 한우 및 타 품종과의 유전적 특이성 분석

5. 제주흑우 우수 유전형질 보존 및 응용기술개발
 - 체세포핵이식 기술 최적화 및 복제수정란 생산 효율 개선
 - 체세포복제수정란 이식 및 제주흑우 복제소 생산
 - 줄기세포주 확립 기술 개발

제 2 장 국내·외 기술 개발 현황

제1절 연구개발 대상 기술의 국내·외 현황

1. 세계적 수준

개념정립 단계		기업화 단계	◎	기술 안정화 단계	
---------	--	--------	---	-----------	--

- 일본의 토종 소 화우 (와규) 는 서양종과의 교배 100년 개량 역사를 통해 우수한 맛의 육질을 개발함. 지방이 근육조직 내부까지 침착되어 표면에 균등하게 서리와 같이 덮여 있는 상강육과 육질의 섬세함은 다른 고기소의 추종을 불허해 세계적으로 널리 알려짐.
- 또한, 일본은 30년 전부터 명품 소 브랜드화 (3대 유명 브랜드: 요네자와, 고베, 마쓰사카) 를 위해 체계적 육질 관리로 품질을 높이고 농가출하량을 조절해 가격을 유지하며 혈통과 유전자 관리로 명성을 유지하고자 노력함.
- 소 (와규) 고유의 품질 유지 및 육종을 지속하기 위해 수정란이식 기술과 핵 이식기술을 적극 활용함. 일본 농림수산성 통계에 의하면 2002년 기준으로 수정란 공란우 2만두, 수란우 5만 마리가 넘고, 수태율이 50-55%, 500억 원의 시장이 형성됨.
- 미국은 일본 화우를 이용하여 육우를 개량하고자 1997년과 1998년도 화우 송아지와 정액을 수입하였고, 그 일부가 호주로 재수출되었음. 이를 통해 뛰어난 육질을 자랑하는 와규브랜드가 미국에서 4개 이상, 호주에서 11개 이상 등록됨. 그 중 일부는 일본과 한국으로 수출됨. 따라서 일본 내 화우 산업에 큰 영향을 미침.
- 현재 일본은 방사능 유출로 인한 방사능 오염소가 유통된 것이 밝혀짐에 따라 일본산 사육소의 소비가 위축되고 역으로 호주산 와규가 유통되고 있는 실정임.

2. 국내수준

- 제주흑우는 '80년대 육량위주의 소 산업정책으로 멸종위기에 달하였으나 1992년부터 제주 유전자원수집과 혈통관리를 통한 흑우 집단 증식과 함께 국제식량농업기구 (FAO) 에 재래가축으로 등록하였고 (2004), 제주특별자치도 특별법에 2차례에 걸친 제주흑우 보호 육성에 관한 조항 (제207조) 과 관련 조례 재정(1993, 2006) 등 제도적인 제주흑우 보호 육성 체계를 구축해왔음.
- 국내 소 수정란 이식 기관은 56 개소이며, 그 중 대부분은 한우 체외 수정란을 젖소에 이식하는 사업을 하고 있음.

- 현재 각 도종축원 등에서 체외 수정에 의한 수정란 사업에 의한 분만 성공률이 35-45%로, 외국 (일본) 의 50-55%에 비추어 저조함.
- 또한 구제역으로 인한 피해를 줄이기 위한 노력으로 2010년부터 시작된 구제역 백신 투여는 더욱더 임신 및 분만을 저조를 가져옴
- 수정란의 체외 배양, 성관별, 동결 등의 기술은 전국 축산 관련 몇 몇 대학 등에서 지난 10여 년간 추진하여 확보되고 있으나, 국내 축산업의 영세성으로 산업적 응용에는 도달하지 못하고 있음.
- 특히 선진국에서 산업화 된 수정란 이식 기술은 더욱 빈약한 상태로서 단지 육종 기술로서 우수개체 선발 방법만이 실용화 되고 있는 실정임 (2004년 STEPI 자료).
- 2012년 문화재청 주관 “천연기념물 지정 방안 연구 용역”에서 제주흑우는 다른 축종에 비해 관리가 잘 돼 천연기념물 지정 가능성이 제시됨. 2차례의 현장 조사 및 심의를 통해 천연기념물 지정 신청 (2013년 3월 13일) 이 이루어지고 가결 (2013년 4월 17일)되어 천연기념물 지정 예고 (2013년 5월 7일) 가 이루어졌으며, 마침내 2013년 6월 26일 최종 심의를 통해 천연기념물로 지정되기로 결의되고 2013년 7월 22일 천연기념물 제546호로 지정되어 제주흑우 보호 및 육성에 박차를 가할 수 있는 계기가 마련됨.

제2절 관련기술 국내·외의 연구동향

1) 국내 동향

- 이태훈 외, 제주 흑우에서 다배란 처리 후 호르몬 수준과 혈액생화학치의 변화, 한국수정란이식학회지 제21권 제3호.
- 제주발전연구원, 일본 와규(和牛) 성공사례와 제주흑우 명품화 방안, 제주발전포럼. 제26호 (2008년).
- 김영훈, 제주흑우 및 한우의 개량증식과 혈통보존, 종축개량 제11권 제11호. 통권69호 (2006. 11).
- 조용일 외, 제주 흑우 능력정보 수집 및 D/B 구축, 농촌진흥청, 2006년.
- 이성수 외, 제주흑우 체내수정란 농가보급 실증연구, 농촌진흥청, 2008년
- 문성호, 제주흑우의 역사적 고찰과 현재, 종축개량 제13권 제10호 통권92호
- 제주축산진흥원, 재래흑우 육성시험(1993~1997)
- 제주축산진흥원, 유전자 분석에 의한 한우와 흑우의 모색유전 연구(1997~)
- 제주축산진흥원, 제주흑우의 번식특성 및 증식연구(1997~)
- 제주축산진흥원, 흑우 생식세포 동결 및 이식연구(2000~)
- 제주축산진흥원, 흑우 판별을 위한 모색 유전자형 설정(1999)

- 제주축산진흥원, 흑우 유전자원 보존은행 설치(2000)
- 제주축산진흥원, 생명공학 기법을 이용한 흑우 증식기술 확립(2001)
- 제주대학교 농과대학 동물과학연구소, 한우의 개량체계와 제주흑우의 개량여건, 동물과학논
총 15(2000.12)
- 이성수, 제주축산진흥원, 제주흑우 육질특성 분석 및 평가에 관한 연구
- 김영훈 외, CIDR를 이용한 제주 한우 및 흑우의 체내 수정란 생산과 이식, 한국수정란이식
학회
- 한상현, 제주흑우 육질관련 유전자 탐색에 관한 연구

2) 국외관련

* 제주흑우는 국내 제주에만 서식하는 유일한 자원이고 관련기술 연구 전무함.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제1절 체외 수정란 배양 환경 기술 개발 및 최적화

1. 체외 배양환경 기술 개발

소 수정란의 체외배양 환경을 개선하기 위한 목적으로 체외 발달율을 높이고 질적 향상을 도모하기 위해 체외 배양 시 배양 첨가제 개발 및 처리 효과를 조사함.

- i) 체외수정란 및 체세포핵이식 수정란배양에서 항산화제 Flavonoid 처리 효과를 조사함.
- ii) 새로운 단백질 첨가제로서 배아줄기세포 생리활성물질의 이용 가능성을 조사함.

가. 체외수정란 발달에서 플라보노이드 첨가가 미치는 항산화·항사멸 작용

3,4-Hydroxyflavone Acts as an Antioxidant and Antiapoptotic Agent to Support Bovine Embryo Development In Vitro

; 앞서 체세포핵이식배아 발달 시 플라보노이드 첨가 효과를 바탕으로 플라보노이드 처리가 체외수정 배아의 발달에 미치는 영향을 조사함.

Abstract

The effects of two antioxidants, superoxide dismutase (SOD) and the flavonoid 3,4-dihydroxyflavone (DHF), on bovine embryo development *in vitro* were examined. Blastocyst development, total cell and inner cell mass (ICM) numbers, intracellular levels of reactive oxygen species (ROS), apoptotic indices and gene expression levels were examined before and after treatment of day 2 bovine embryos (\geq 2-4 cells) with various concentrations of 3,4-DHF or SOD for 6 d. Statistical analysis was performed using analysis of variance, with significance defined at the $P < 0.05$ level. SOD had no significant effect on bovine embryo development at any tested concentration (control, 32.8%; 300U/ml, 33.9%; 600U/ml, 24.2%). In contrast, 10mM 3,4-DHF promoted higher blastocyst development (39.3%) than any other concentration (control, 26.7%; 1 mM, 30.3%; 50 mM, 29.5%; 100 mM, 20.5%). Compared with 300 U/ml SOD, 10 mM 3,4-DHF resulted in significantly higher blastocyst development (44.2%) (control, 31.5%; SOD 300 U/ml, 33.6%). Treatment with 3,4-DHF increased the ICM cell number and reduced intracellular ROS production and apoptotic cell numbers. When O_2 tension was decreased from 20% (high tension) to 5% (low tension), embryo development rates were doubled regardless of 3,4-DHF treatment. Under high O_2 tension, 10 μ M 3,4-DHF treatment may render bovine embryo development similar to a low O_2 tension environment. The best blastocyst development was obtained under low O_2 tension plus 10 mM 3,4-DHF

treatment. The relative expression levels of antioxidant (MnSOD), antiapoptotic (Survivin, Bax inhibitor) and growth-related genes (IFN- τ , Glut-5) were significantly increased after 3,4-DHF treatment, while the expression levels of oxidant (Sox) and apoptotic genes (Caspase-3 and Bax) were reduced. These results suggest that 3,4-DHF may promote the *invitro* development of bovine embryos through its antioxidant and antiapoptotic effects.

Key words: bovine embryos, antiapoptotic, antioxidant, 3,4-dihydroxyflavone, SOD

목적

소 체외수정 배아의 체외 배양 환경을 개선시켜 건강한 배아발생으로 임신율을 제고하기 위해 배양첨가제로서 강력한 항산화제인 플라보노이드의 이용가능성을 알아보려고 함.

실험 내용 및 결과

○ 체외수정 후 배양 2일째부터 2~4 세포기 배아의 체외배양액에 항산화 물질인 플라보노이드 처리 효과를 조사하였음. 그리고 플라보노이드의 농도를 선별하고 그 영향을 조사하였음.

Table 3. Effect of 3,4-DHF on bovine embryo development in vitro (r=4)

Treatment	Day 2 ≥ 2-4 cell	No. (%) [*] of embryos developed to		
		Day 4 ≥ 8 cell	Day 6 ≥ morula	Day 8 ≥ blastocyst
Control	120	95 (79.2)	52 (43.3) ^{ab}	32 (26.7) ^a
1 uM 3,4-DHF	122	95 (77.9)	57 (46.7) ^{ab}	37 (30.3) ^{ab}
10 uM 3,4-DHF	122	99 (81.1)	64 (52.5) ^b	48 (39.3) ^b
50 uM 3,4-DHF	122	89 (73.0)	53 (43.4) ^{ab}	36 (29.5) ^{ab}
100 uM 3,4-DHF	122	90 (73.8)	50 (41.0) ^a	25 (20.5) ^a

^{*}Means in the column without common superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

표 3에서 나타난 바와 같이, 배양 8일째 배반포기배 발달율에서 10 uM 3,4-DHF 처리군의 결과가 1 uM 이나 50 uM 3,4-DHF 처리군의 결과와는 유의한 차이를 나타내지 않았지만 대조군에 비해 유의하게 높게 나타났으며 특히 100 uM 3,4-DHF 처리군과도 유의한 차이를 나타내어 용량 과다가 오히려 발달에 좋지 않다는 다른 연구자의 결과와 유사하게 나타났음 (Wang 등, 2007). 이러한 결과는 배양 6일째 상실배 발달율에서도 나타났는데, 10 uM 3,4-DHF 처리군의 결과가 가장 높은 발달율을 나타낸 반면 100 uM 3,4-DHF 처리군에서는 유의하게 낮은 발달율을 나타냄.

○ 대조군과 실험군의 체외 배양 8일째 발달된 배반포기배의 질적인 차이를 조사하기 위해

영양배엽세포와 내부세포괴 수를 동시에 검토할 수 있는 이중 염색을 실시하였음.

배반포기배의 세포수 조사는 다음과 같은 간편 이중염색방법을 통해 실시하였음. 1% triton X-100 (Sigma) 과 100 ug/ml propidium iodide (PI, Sigma)가 첨가된 TL-HEPES 용액에서 30초간 처리한 후 바로 25 mg/ml Hoechst 33258 (Sigma)가 첨가된 100% ethanol 용액에 넣어 4°C 에서 다음날까지 정치시킴. 염색된 배반포기배는 glycerol로 세척하여 여분의 형광물질을 제거한 다음 슬라이드글라스에 올려 형광 현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)의 blue 필터 (excitation, 330~385 nm; emission, ≥ 420 nm) 하에서 관찰하여 내부세포괴와 영양외배엽 세포수를 분석하였음. 이때에 배반포의 내부세포괴는 과랴게 영양배엽세포는 빨강게 염색되어 구분됨.

Table 4. Effect of SOD or 3,4-DHF on bovine embryo development *in vitro* (r=4)

Treatment	Day 2 $\geq 2-4$ cell	No. (%) [*] of embryos developed to			Cell number of [*] blastocyst (Mean \pm SD)	
		Day 4 ≥ 8 cell	Day 6 \geq morula	Day 8 \geq blastocysts	Total	ICM
Control	130	96 (73.8)	54 (41.5) ^a	41 (31.5) ^a	90.0 \pm 17.7	17.5 \pm 4.7 ^a
300U SOD	128	95 (74.2)	51 (39.8) ^a	43 (33.6) ^a	94.6 \pm 10.3	21.1 \pm 5.0 ^a
10 uM 3,4-DHF	129	103 (79.8)	83 (64.3) ^b	57 (44.2) ^b	104.2 \pm 13.9	33.5 \pm 4.3 ^b

*Means in the column without common superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

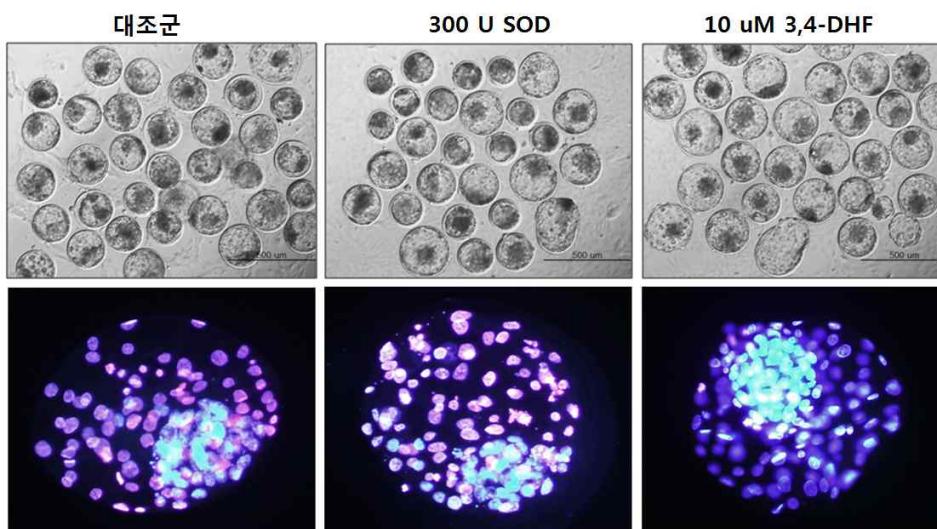


그림 3. 체외발달 배아의 이중염색 결과; 대조군, 300U SOD처리군, 10 uM 3,4-DHF 처리군

각각의 처리군에서 발달된 배양 8일째 배반포기배의 이중염색을 통한 세포수 조사 (그림 3 참조) 에서 10 μ M 3,4-DHF 처리군의 세포수가 대조군과 300U SOD 처리군의 결과와 비교해 볼 때 유의한 증가 (표 3 참조) 를 나타냄. 특히 내부세포외 수에서 유의한 증가를 나타냄.

- 대조군과 실험군의 체외 배양 8일째 발달된 배반포기배의 질적인 차이를 조사하기 위해 화-감작 형광 프루브를 이용하여 세포내 ROS (reactive oxygen species; 활성 산소종) 발현 유무와 H_2O_2 생성 정도를 조사함.

각 군에서 생성된 배반포기 배아를 5mM DCHFDA (dichlorodihydrofluorescein diacetate) 에 20분간 반응시킨 다음 세척하여 형광현미경 필터 (excitation, 488nm; emission, 520 nm) 하에서 조사하였음.

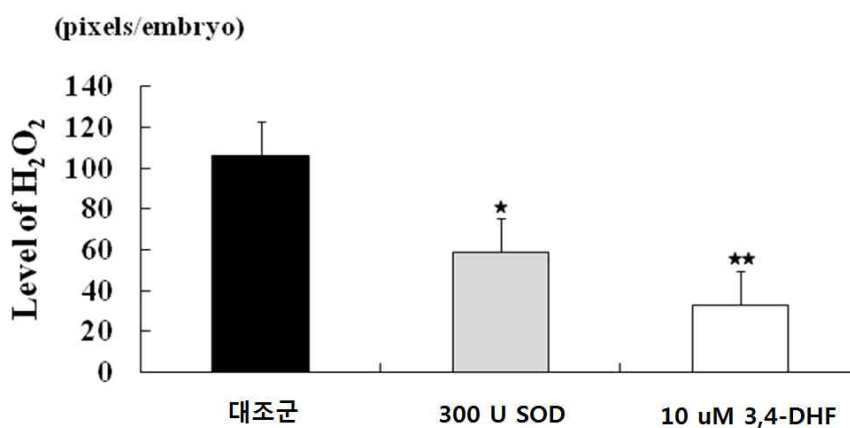
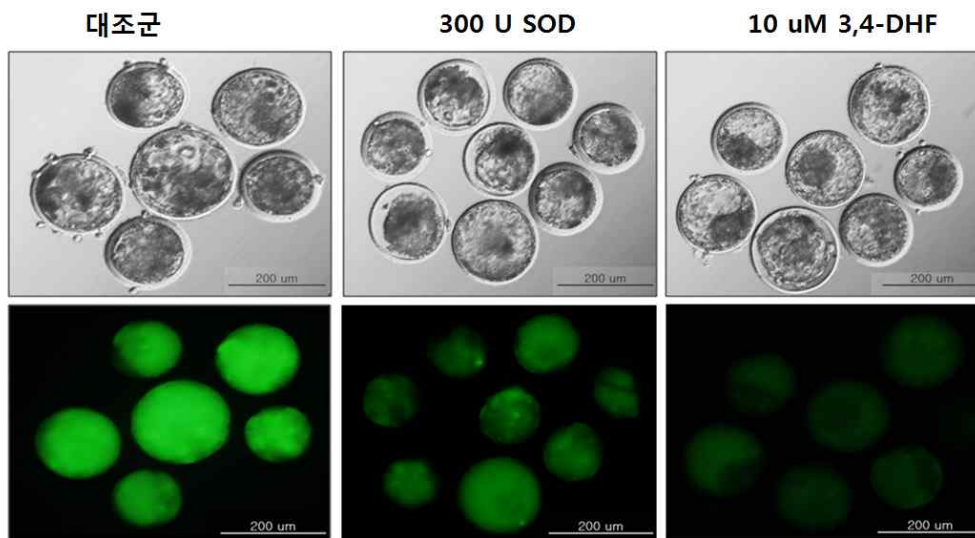


그림 4. 체외발달 배아의 ROS 분석 결과; 대조군, 300 U SOD처리군, 10 μ M 3,4-DHF 처리군, H_2O_2 생성을 ($p < 0.05$)

각각의 처리군에서 발달된 배양 8일째 배반포기배의 ROS 발현을 조사 (그림 4 참조)

에서 10 uM 3,4-DHF 처리군에서 배양된 배반포기배의 ROS 생성율이 대조군과 300U SOD 처리군의 결과와 비교해 볼 때 유의하게 감소하는 것으로 확인됨. 따라서 플라보노이드 처리는 강력한 항산화제로서 ROS 감소에 효과가 있음을 확인하였음.

○ 플라보노이드 처리가 배아의 세포사멸에 미치는 영향을 조사하기 위하여 TUNEL 분석을 실시하였음.

분석을 위해 회수된 대조군과 실험군의 배반포기배는 1mg/ml polyvinylpyrrolidone가 들어 있는 PBS (처리용액) 에 3번 세척하고 3.7% paraformaldehyde 에 1시간 동안 실온에서 고정을 실시함. 고정된 배아는 처리용액으로 다시 세척하고 0.3% Triton X-100 용액으로 실온에서 1시간동안 침투시킴. 배아는 다시 처리용액으로 2회 세척한 다음, 광을 차단시킨 채로 37°C 배양기에서 형광물질이 부착된 dUTP 와 terminal deoxynucleo tidyl 전환 효소 (Roche, Mannheim, Germany) 에 1시간 동안 반응을 유도하고, 40 mg/ml propidium iodide (PI, Sigma) 와 50 mg/ml RNase A 용액에 넣어 1시간동안 핵 염색함.

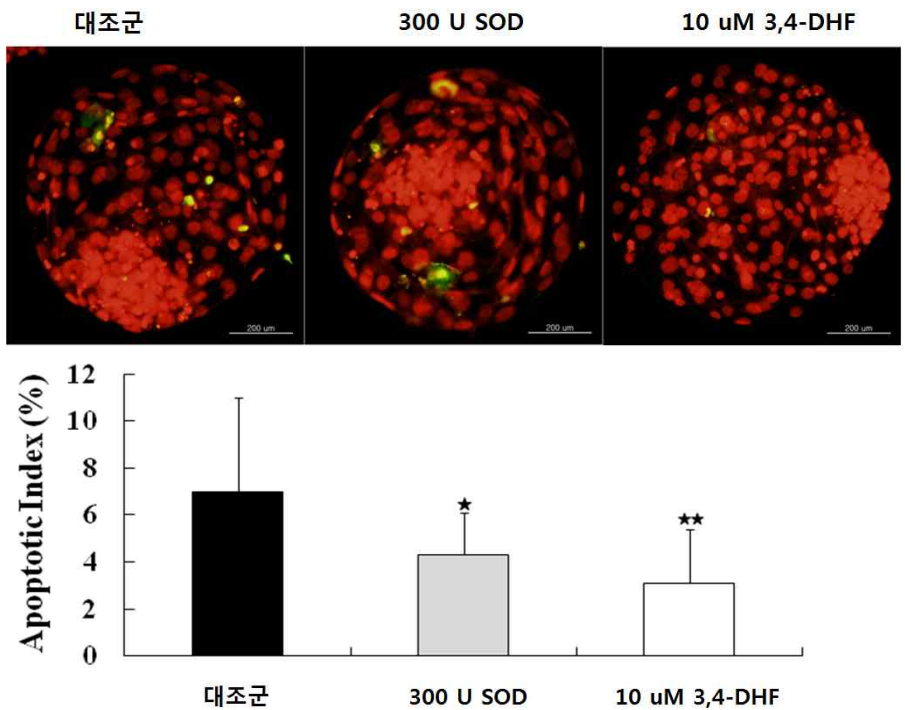


그림 5. 체외발달 배아의 TUNEL분석 결과; 대조군, 300 U SOD처리군, 10 uM 3,4-DHF 처리군, 총세포수에 대한 세포 사멸율 (p<0.05)

체외배양 환경이 배아의 사멸에 미치는 영향을 조사하기 위해 각 군의 배양 8일째 발달된 배반포기 배를 각각 TUNEL 분석을 실시하였던 바, 세포 사멸율 (apoptotic index) 은 대조군 (6.87±4.3%) 에 비하여 10 uM 플라보노이드 처리군 (2.96±2.4%) 에서 현저히 감소하

는 것을 알 수 있었음 (그림 5 참조). 이러한 결과는 체외배양 환경에 플라보노이드 처리가 세포 사멸을 유의하게 감소시킴을 나타냄. 이는 SOD 처리보다 효과가 있음을 확인함.

○ Real-time PCR (polymerase chain reaction) 을 이용하여 체외발달 배아의 유전자 발현을 조사함.

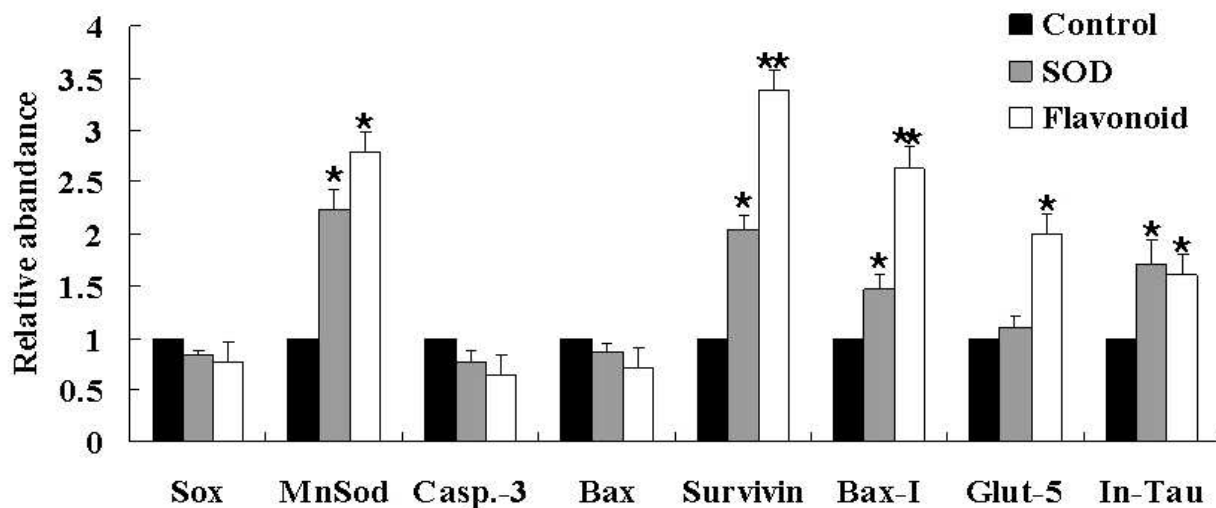


그림 6. Real-time RT-PCR을 이용한 항산화제 처리 후 체외발달 배아의 유전자 발현 조사

항산화제가 첨가된 체외 배양 환경이 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였던바, 대조군에 비하여 항산화 효과 (SOX ↓, Mn-SOD ↑), 세포사멸 감소 (Caspase-3 ↓, Bax ↓, Survivin ↑, Bax inhibitor ↑), 대사율 증가 (Glut-5 ↑), 착상을 증가(In-tau ↑) 와 관련된 유전자들의 발현이 10 uM 플라보노이드 처리군에서 가장 유의하게 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었음 (그림 6 참조).

○ 배양기내 조절된 산소농도와 플라보노이드 처리가 소 체외 수정란 발달에 미치는 영향

일반적으로 배양기내의 산소농도는 대략 20% 정도인데, 질소농도를 높여 산소농도를 5%로 줄였을 때와 여기에 10 uM 플라보노이드 처리에 따른 ROS 감소효과가 배발달에 미치는 영향을 더불어 조사하였음.

Table 5. Effect of 3,4-DHF treatment under conditions of high or low oxygen tension on bovine embryo development *in vitro* (r=4)

Treatment		No. (%) [*] of embryos developed to				No. of total cells (ICM) [*] Mean ± SD
O ₂	3,4-DHF	Day 2 ≥2-4 cell	Day 4 ≥8 cell	Day 6 ≥morula	Day 8 ≥blastocyst	
High (~20%)	-	126	94 (74.6)	56 (44.4) ^a	36 (28.6) ^a	92.7 ± 17.3 ^a (20.9 ± 7.7) ^a
	+	126	98 (77.7)	66 (52.4) ^{ab}	54 (42.9) ^b	107.6 ± 13.4 ^a (35.5 ± 10.3) ^{ab}
Low (~5%)	-	123	98 (79.7)	73 (59.3) ^b	60 (48.8) ^{bc}	129.3 ± 13.1 ^b (39.5 ± 13.5) ^b
	+	123	102 (82.9)	78 (63.4) ^b	66 (53.7) ^c	159.2 ± 15.5 ^c (42.8 ± 12.0) ^b

^{*}Means in the column without common superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

산소농도가 높은 (20%) 배양기 환경 보다 산소농도가 낮은 (5%) 배양기 환경에서 성장한 배아가 유의하게 높은 배반포기배 형성율을 나타냈으며, 여기에 플라보노이드를 처리하였을 때 더욱 더 좋은 배아 발생을 유도할 수 있음을 확인하였음. 또한 이러한 효과는 세포수 조사에서도 확인되었던 바, 총세포수 증가 뿐만 아니라 내부세포괴수 증가로 이어져 건강한 배아 생성에 낮은 산소농도환경 및 산소종 형성 억제가 효과가 있음을 확인하였음 (표 5 참조).

따라서, 5% 산소농도 배양환경 조건하에서 배양액내에 10 uM 플라보노이드 첨가하는 배양조건은 소 체외수정란 유래 배반포기배 발달을 증가, 총 세포수 및 내부세포괴 수 증가, 활성 산소종 생성 감소, 세포사멸을 감소, 발달 유용유전자 발현을 증가등의 효과를 나타내어 흑우 체외수정란 생산 및 체세포핵이식 복제수정란 발생에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대됨.

*이상의 내용은 Journal of Reproduction and Development 2011 Vol. 57 127~134에 게재됨.

—Original Article—

3,4-Dihydroxyflavone Acts as an Antioxidant and Antiapoptotic Agent to Support Bovine Embryo Development *In Vitro*

Keum Sil LEE^{1,2*}, Eun Young KIM^{1*}, Kilsoo JEON^{1,2}, Ssang Gu CHO², Young Joon HAN¹, Byoung Chul YANG³, Sung Soo LEE⁴, Mon Suck KO⁴, Key Jung RIU⁵, Hoon Taek LEE² and Se Pill PARK^{1,5}

¹Mirae Biotech/Jeju National University Stem Cell Research Center, Seoul 143-854, ²Department of Animal Biotechnology, Konkuk University, Seoul 143-702, ³National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, ⁴National Institute of Subtropical Agriculture, Jeju 690-150 and ⁵Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

Abstract. The effects of two antioxidants, superoxide dismutase (SOD) and the flavonoid 3,4-dihydroxyflavone (DHF), on bovine embryo development *in vitro* were examined. Blastocyst development, total cell and inner cell mass (ICM) numbers, intracellular levels of reactive oxygen species (ROS), apoptotic indices and gene expression levels were examined before and after treatment of day 2 bovine embryos (≥ 2 -4 cells) with various concentrations of 3,4-DHF or SOD for 6 days. Statistical analysis was performed using analysis of variance, with significance defined at the $P < 0.05$ level. SOD had no significant effect on bovine embryo development at any tested concentration (control, 32.8%; 300 U/ml, 33.9%; 600 U/ml, 24.2%). In contrast, 10 μ M 3,4-DHF promoted higher blastocyst development (39.3%) than any other concentration (control, 26.7%; 1 μ M, 30.3%; 50 μ M, 29.5%; 100 μ M, 20.5%). Compared with 300 U/ml SOD, 10 μ M 3,4-DHF resulted in significantly higher blastocyst development (44.2%) (control, 31.5%; SOD 300 U/ml, 33.6%). Treatment with 3,4-DHF increased the ICM cell number and reduced intracellular ROS production and apoptotic cell numbers. When O₂ tension was decreased from 20% (high tension) to 5% (low tension), embryo development rates were doubled regardless of 3,4-DHF treatment. Under high O₂ tension, 10 μ M 3,4-DHF treatment may render bovine embryo development similar to a low O₂ tension environment. The best blastocyst development was obtained under low O₂ tension plus 10 μ M 3,4-DHF treatment. The relative expression levels of antioxidant (MnSOD), antiapoptotic (Survivin, Bax inhibitor) and growth-related genes (IFN- τ , Glut-5) were significantly increased after 3,4-DHF treatment, while the expression levels of oxidant (Sox) and apoptotic genes (Caspase-3 and Bax) were reduced. These results suggest that 3,4-DHF may promote the *in vitro* development of bovine embryos through its antioxidant and antiapoptotic effects.

Key words: Antiapoptotic, Antioxidant, Bovine embryos, 3,4-Dihydroxyflavone, Superoxide dismutase (SOD)
(J. Reprod. Dev. 57: 127–134, 2011)

In *in vitro* bovine embryo production generally involves oocyte maturation, fertilization and zygote culture. For *in vitro* culture of mammalian embryos, an environment consisting of 5% CO₂ and 95% air (~ 20% O₂ total) is widely used [1]. However, a high O₂ concentration during *in vitro* culture impedes embryonic development, perhaps due to the increased accumulation of reactive oxygen species (ROS) in the cytoplasm of developing embryos [2]. These ROS are highly reactive with intracellular macromolecules, including proteins, lipids and DNA, and may cause significant dysfunction such as enzyme inactivation, mitochondrial abnormalities or DNA fragmentation [2, 3]. Living organisms possess natural protective equivalents/ROS scavengers, which are intracellular antioxidants that counteract the negative effects of ROS [4]. However, antioxidant levels *in vitro* are lower than those *in vivo*; thus,

antioxidant supplementation of the medium may support improved developmental capacity [5, 6]. Antioxidants include enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase and glutathione peroxidase, as well as cysteine and ascorbic acids and alpha-tocopherol. In the antioxidant system, SODs are the initial enzymes that promote the conversion of an anion superoxide to H₂O₂, which in turn is removed by catalase or glutathione peroxidase. SODs are characterized by their metal cofactor requirements and subcellular localizations.

The structures and functions of flavonoids have evoked considerable interest because of their antioxidant properties. The flavonoid structure is shared by the monomeric flavonols, flavones and flavanones. Some flavonoids exhibit potent antitumor properties and can modulate apoptosis, differentiation and the cell cycle, probably by virtue of their antioxidant functions [7]. Flavonoids may inhibit the generation of primary oxygen radicals and subsequent oxidation chains, since they are effective chelators of transition metal ions [8]. The number of hydroxyl substitutions in a flavonoid is thought to be a critical factor in its ROS-scavenging ability [9].

The present study examined the use of a flavonoid as an antioxi-

Received: February 18, 2010

Accepted: October 5, 2010

Published online in J-STAGE: November 6, 2010

©2011 by the Society for Reproduction and Development

Correspondence: EY Kim (e-mail: jlokey@paran.com), SP Park (e-mail: sppark@jejunu.ac.kr)

*KS Lee and EY Kim contributed equally to this work.

나. 플라보노이드 처리된 체세포 핵이식 배아의 체외 발달 및 제주흑우 복제소 생산

In Vitro Development of Somatic Cell Nuclear Transfer Embryo Treated with Flavonoid and Production of Cloned Jeju Black Cattle

Abstract

This study was to investigate the effect of flavonoid treatment on in vitro development of bovine somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos, and their pregnancy and delivery rate after embryo transfer into recipient. In Exp.1, to optimize the flavonoid concentration, parthenogenetic day2 (\geq 2-cell) embryos were cultured in 0 (control), 1, 10 and 20 μ M flavonoid for 6 days. In the result, in vitro development rate was the highest in 10 μ M flavonoid group among treatment groups (control, 49.5%; 1 μ M, 54.2%; 10 μ M, 57.1%; 20 μ M, 37.5%), and total cell and ICM cell numbers were significantly higher in 10 μ M flavonoid group than other groups ($p < 0.05$). We found that 10 μ M flavonoid treatment can significantly decrease the apoptotic index and derive high expression of anti-oxidant, anti-apoptotic, cell growth and development marker genes such as Mn-SOD, Survivin, Bax inhibitor, Glut-5, In-tau, compared to control group ($p < 0.05$). In Exp. 2, to produce the cloned Jeju Black Cattle, ranking number 1 bull somatic cells were transferred into enucleated bovine MII oocytes and reconstructed embryos were cultured in 10 μ M flavonoid added medium. When the in vitro produced day 7 or 8 SCNT blastocysts were transferred into a number of recipients, 10 μ M flavonoid group was indicated higher pregnancy rate (10.2%, 6/59) than control group (5.9%, 2/34). Also, in 10 μ M flavonoid group, two cloned calves of Jeju Black Cattle were born (Mar. 11. 2009 and Sep. 09. 2009) and both of them were all healthy at present, while the one cloned calf born in control group was dead one month after birth. In addition, the result of short tandem repeat marker analysis of each cloned calf was indicated microsatellite loci of 11 numbers were agreed genotype between donor cell and cloned calf tissue, while surrogate mother tissue was different. These results demonstrated that the flavonoid addition in culture medium may have beneficial effects on in vitro and in vivo developmental capacity of SCNT embryos and their pregnancy rate.

Key words: bovine, SCNT, flavonoid, Jeju Black Cattle, pregnancy

요약

본 연구는 플라보노이드 처리가 체세포 핵이식 배아의 체외 발달에 미치는 영향을 조사함과 아울러 이들 배아의 대리모 이식 후 임신율 및 분만율을 조사하기 위해 실시하였음. 실험 1에서는 플라보노이드의 적정농도를 알아보기 위해 단위발생으로 생산된 2일째 배아 (\geq 2세포기)를 0 (대조군), 1, 10과 20 μ M 의 플라보노이드 처리군으로 나누어 6일동안 배양하였음.

그 결과 10 uM 플라보노이드 처리군에서 가장 높은 배발달율을 나타냈고 (대조군, 49.5%; 1 uM, 54.2%; 10 uM, 57.1%; 20 uM, 37.5%), 총세포수와 내부세포피수도 유의하게 높게 나타났음 ($p < 0.05$). 또한 10 uM 플라보노이드 처리군은 대조군에 비해 세포사멸지수를 유의하게 감소시켰으며, Mn-SOD, Survivin, Bax inhibitor, Glut-5과 In-tau 같은 항산화, 항사멸, 세포성장 및 발달표지 유전자의 발현을 유의하게 높이는 것을 확인하였음 ($p < 0.05$). 실험 2에서는, 최우량 제주흑우 종모우의 체세포를 이용하여 체세포 핵이식배아를 생산한 다음 10 uM 플라보노이드가 첨가된 배양액에서 체외 배양하여 대리모에 이식하였던 바, 대조군(5.9%, 2/34) 에 비해 임신율이 (10.2%, 6/59) 높은 것을 확인하였음. 또한 대조군에서는 복제송아지가 생 후 한달 쯤 죽은 반면 플라보노이드 처리군에서는 두마리가 정상적으로 태어나 (Mar. 11. 2009 and Sep. 09. 2009) 지금까지 건강을 유지하고 있음. 더불어 STR분석에서도, 태어난 복제소는 대리모조직과 다르며 11개 마커가 모두 체세포와 동일한 것으로 확인되었음. 본 연구 결과는 배양액 내 플라보노이드 첨가가 체세포 핵이식 배아의 체외, 체내 발달 및 임신율 제고에 효과가 있음을 나타냄.

서 론

체세포 핵이식 기술은 포유동물의 여러 종에서 성공적으로 이루어져 왔음. 1997년 영국의 Wimut 등이 면양에서 최초로 체세포 핵이식에 의한 복제동물 생산에 성공한 이후 쥐 (Wakayama 등, 1998), 염소 (Baguisi 등, 1999), 돼지 (Polejaeva 등, 2000) 와 고양이 (Shin 등, 2002) 등 다양한 종의 연구결과가 보고되었으며, 복제 소 생산의 경우 1998년 Kato 등과 Cibelli 등에 의해 연구 결과가 보고된 바 있고, 우리나라에서도 Im 등 (2001) 이 한우 복제 소 생산에 대하여 보고한 바 있음. 그러나 체세포 핵이식에 의한 복제 소 생산 효율은 인공수정이나 체외 수정란에 비해 매우 낮아 분만율이 7% 미만 정도인 것으로 보고되고 있음 (Heyman 등, 2002; Yang 등, 2008).

복제 소의 생산효율이 낮은 이유는 체외에서의 장시간 동안 기계적 화학적 여러 과정을 거치는 데에 따른 스트레스, 불안정한 체외 배양 환경, 발생된 배아의 이식 후 착상실패 또는 불완전한 착상으로 인해 분만까지의 비율이 낮은 데서 찾을 수 있음. 따라서, 체외수정 배아보다 핵이식 배아의 생산과정이 불안정한 배 발생을 유도할 가능성이 더 높으므로 핵이식으로 생산된 체세포 복제 배아는 체외 수정 배아보다 더 나은 체외 배양 환경이 요구됨.

일반적인 체외 배양 환경에서는 산소농도 포화도가 매우 높아 (>20%) 배아의 세포질내에 활성 산소종 (Reactive oxygen species; ROS) 이 체내환경보다 많이 축적됨으로써 배 발달 저해의 원인이 됨. 활성산소종은 세포질내의 단백질, 지질과 DNA와 같은 거대분자와 반응하여 효소 활성 저해, 미토콘드리아 기능 이상과 같은 중요한 기능 이상을 일으키고 DNA 과편화를 야기함 (Halliwell 등, 1989; Guerin 등, 2001). 살아있는 유기체는 이러한 ROS를 청소하는 항산화 물질이 세포질 내에 존재하나 체외 배양 환경에 노출된 난자나 배아는 과도한 산소농도를 막아낼 방법이 없으므로 항산화제를 배양액에 첨가하여 사용하게 되면 배 발달능을 개선시킬 수 있다는 연구 보고가 있음. 그 예로 superoxide dismutases 나 catalase 는 생쥐와 소 배아에서, cysteine이나 b-mercaptoethanol 은 소 배아 배양에서 glutathione 합성을 증가시켜 환원환경을 조절하여 배 발달을 개선시키는 것으로 알려져 있고, Vitamins E는 활성산소종에 의해 야기된

세포막 상해를 억제할 수 있는 것으로 알려져 있음 (Takahashi 등, 1993; Lim 등, 1996; Caamano 등, 1998). 결과적으로 체외 배양환경에서 배양액 내에 항산화제의 첨가는 매우 중요하다. 따라서, 난자나 수정란 배양을 위한 새로운 항산화제 개발이 계속적으로 이루어지고 있음.

새로이 개발된 항산화제인 플라보노이드는 플라보놀, 플라본, 플라바놀과 플라바논과 같은 단량체가 공유구조로 이루어져 있으며 일부의 플라보노이드는 강력한 항종양 기능도 있는 것으로 알려져 있고, 세포사멸, 세포주기와 분화등을 조절하는 항산화 기능을 나타낸다고 알려져 있음. 또한, 플라보노이드의 직접적인 역할로는 산소라디칼 초기 발생을 막아 산화연쇄반응을 차단하고 전이금속이온 등과 염을 형성하여 산화를 억제하는 것으로 알려져 있음 (Afanas' ev 등, 1989).

본 연구에서는 멸종위기 제주흑우의 대량증식을 위한 연구 목적으로 우량 종모우의 체세포를 이용하여 핵이식을 실시하고 여기에서 발생된 배아를 합성 플라보노이드 (3,4-dihydroxy flavone) 가 첨가된 배양액에서 배양하여, 플라보노이드가 체외 배 발달에 미치는 영향 및 여기에서 생산된 7~8일째 배아를 이식 한 후 임신과 분만율에 미치는 영향을 조사하였음. 또한 플라보노이드의 농도적정화를 위해 단위발생 배아에서 그 효과를 분석하였음.

재료 및 방법

소 난자의 회수 및 체외성숙

본 실험에 공시될 소 난자는, 도축장에서 채취한 난소를 2~4 시간 이내에 32~37°C 생리 식염수에 유지하여 실험실로 운반한 뒤 직경이 2~6mm의 난포로부터 채취하여 사용하였음. 실험현미경하에서 획득된 미성숙난자는 난구세포가 부착되어있고 세포질이 균일한 난자만을 선별하였고 TL-HEPES로 세척하여 10% FBS (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) 가 첨가된 TCM-199 (Gibco-BRL) 배양액에 0.2 mM Na-pyruvate (Sigma, St. Louis, MO, USA), 1 mg/ml FSH (Sigma), 1 mg/ml estradiol-17b (Sigma) 와 50 mg/ml gentamycin (Sigma) 를 넣어 38.8°C, 5% 조건하에서 20 시간 동안 체외 배양하여 성숙을 유도하였음.

단위발생유도와 체외 배양

단위발생을 위해, 체외 성숙된 난자를 1 mg/ml hyaluronidase (Sigma) 를 이용하여 난구세포를 제거하고 충분히 세척한 다음 5 uM Ca-ionophore (Sigma) 에 5분 노출시키고 이어서 2.0 mM 6-dimethylaminopurine (DMAP) 에 3시간 배양하여 활성화를 유도하였으며 3 mg/ml FAF-BSA (Sigma) 가 들어있는 CR1aa 배양액에 넣어 배양하고 배양 4일 째에 10% FBS가 들어있는 CR1aa 배양액에 옮겨 4일간 추가 배양하였음. 이때에 실험군은 대조군과 플라보노이드 [3 '4' -dihydroxyflavone (ICC, INDOFINE Chemical Company, Inc, NJ, USA)] 를 1, 10 과 20 uM 처리한 군으로 나누어 배 발달을 조사하였고 플라보노이드는 2일 간격으로 배양액에 첨가하였음.

이중형광염색

배반포기배의 세포수 조사는 다음과 같은 간편 이중염색방법을 통해 실시하였음. 1%

triton X-100 (Sigma) 과 100 ug/ml propidium iodide (PI, Sigma)가 첨가된 TL-HEPES 용액에서 30초간 처리한 후 바로 25 mg/ml Hoechst 33258 (Sigma)가 첨가된 100% ethanol 용액에 넣어 4°C 에서 다음날까지 정치시킴. 염색된 배반포기배는 glycerol로 세척하여 여분의 형광물질을 제거한 다음 슬라이드글라스에 올려 형광 현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)의 blue 필터 (excitation, 330~385 nm; emission, \geq 420 nm) 하에서 관찰하여 내부세포괴와 영양외배엽 세포수를 분석하였음. 이때에 배반포의 내부세포괴는 과량계 영양배엽세포는 빨강계 염색되어 구분됨.

세포사멸 (Terminal deoxynucleotide transferase-mediated dUTP Nick End Labeling; TUNEL) 분석

배반포기배는 3.7% paraformaldehyde (Sigma) 에 1시간 고정을 실시하고 PBS 로 세척하여 0.3% Triton X-100으로 1시간 침투를 유도함. 배아는 다시 세척한 다음, 광이 차단된 37°C 배양기에서 형광물질이 부착된 dUTP 와 terminal deoxynucleo tidyl 전환 효소 (Roche, Mannheim, Germany) 에 1시간 반응시키고, 40 mg/ml PI와 50 mg/ml RNase A (Takara, Shiga, Japan) 용액에 넣어 1시간 핵 염색을 실시함. 반응이 끝난 배아는 충분히 세척하고 슬라이드글라스에 옮겨 형광현미경의 green 필터(excitation, 460~495 nm; emission, 510~550 nm) 와 red 필터 (excitation, 510~550 nm; emission, \geq 590 nm) 하에서 관찰함. 배아 내 살아있는 세포 핵은 붉게 염색되는 반면 사멸 핵은 녹색으로 염색되면서 파편화되는 양상을 나타내므로 두 가지 색을 합쳐 조사함으로써 총세포핵수에서 사멸핵수를 백분율로 나타내어 세포사멸정도를 계산함.

Real time -PCR을 이용한 유전자 발현 분석

mRNA는 마그네틱 비드 (Dynabeads mRNA purification kit; Dynal, Oslo, Norway) 를 이용하여 추출함. 동일한 수의 배아를 (대략 15개) 100 ul 용해/결합 용 버퍼 [100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM LiCl, 10 mM EDTA (pH 8.0), 1% LiDS, 5 mM DTT] 에 넣어 실온에서 5분간 교반하면서 반응을 유도하고, 여기에 50ul oligo (dT)25 마그네틱 비드 용액을 넣어 다시 5분간 반응시킴. 마그네틱 비드에 결합된 mRNA는 세척용 버퍼 A [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.15 M LiCl, 1 mM EDTA, 1% LiD] 로 2회 세척하고, 버퍼 B [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.15 M LiCl and 1 mM EDTA]로 1회 세척한 다음 DEPC water 15ul에 pellet을 녹여 마그네틱 비드로부터 mRNA시료를 획득함. cDNA 합성은 추출한 mRNA로 부터 oligo (dT) 12-18 프라이머와 superscript reverse transcriptase (Invitrogen) 를 이용하여 이루어짐. Real-time PCR (Bio-Rad, Chromo4) 에 사용된 프라이머는 표 3에 나타낸 바와 같음. 모든 실험에서 히스톤 2a mRNA를 기준으로 사용함. 결과는 DyNAmo SYBR green qPCR 키트를 사용함. PCR과정은 95°C 에서 15분간 변성과정을 거친 다음, 증폭과 정량을 위해 94°C 에서 30초간, 50~56°C 1분간, 72°C 1분으로 40회수를 반복하였고 형광측정을 함. 이때의 melting curve는 65~95°C, heating rate는 0.2°C /sec 임. SYBR green 형광 결과는 PCR 과정의 extension 단계 후에 측정함.

Table 6. Primer sequences and cycling conditions used in real-time PCR

Genes	Primer sequence (5'-3')	Annealing Temp.	Product Size
H2A	F-GTCTTGGAGTACCTGACCGC R-ACAACGAGGGCTTCTTCTGA	56°C	201 bp
Sox	F-GCTGCTCTGGACTGTGCTGA R-ATCCAGTAATCTCCTCCAGC	56°C	247 bp
MnSOD	F-AGCACGAGCAGGAGACTGGT R-GTCCAGAAGATGCTGTGA	56°C	287 bp
Caspase-3	F-CGATCTGGTACAGACGTG R-GCCATGTCATCCTCA	50°C	359 bp
Survivin	F- CCTGGCAGCTCTACCTCAAG' R- TAAGTAGGCCAACACGAAAG	56°C	233 bp
Bax	F- GCTCTGAGCAGATCAAG' R- AGCCGCTCTCGAAGGAAGTC	56°C	400 bp
Bax inhibitor	F- GCTCTGGACTTGTGCATT R- GCCAAGATCATCATGAGC	56°C	374 bp
Glut-5	F- TTGGAGAGCCAGTGAACAGT R- TGCTGATAACTGTCTGCGCT	60°C	292 bp
Interferon-tau	F- ATGGCCTTCGTGCTCTCTCT R- AGGTCCTCCAGCTGCTGTTG	55°C	356 bp

소 체세포 핵이식배아의 생산 및 체외 배양

체외성숙된 소 수핵 난자는 0.1% hyaluronidase가 첨가된 TL-HEPES 배양액에서 난구세포를 제거한 뒤 제 1극체가 방출된 난자만을 선별하여 사용함. 탈핵할 난자는 0.5 ug/ml Hoechst 33258 과 7.5 mg/ml cytochalasin B (Sigma)가 첨가된 TCM-HEPES용액에서 10분간 염색한 뒤 형광현미경 하에서 제 1극체와 핵을 제거함. 공여 체세포는 2008년 제주특별자치도 축산진흥원 소재 제주흑우 종모우 (BK01-10과 BK94-13)의 귀세포를 채취하여 체외에서 배양하여 동결 보관하였던 것으로 필요 시 용해하여 5~15 계대의 세포를 사용함. 핵이식 시 공여 체세포는 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 처리하여 단일세포로 분리한 후 10% FBS가 첨가된 체세포 배양액으로 한번 세척한 후 다시 PBS로 세척하여 준비하였고 10~15 mm 크기만을 골라 체세포 주입용 피펫으로 핵이 제거된 수핵난자의 투명대와 세포질 사이의 공간으로 주입함. 체세포가 주입된 난자는 0.3M mannitol (Sigma) 용액내에서 LF101 Electro Cell Fusion Generator (NEPA GENE, Shioyaki, Japan) 을 사용하여 직류 (DC) 로 20 volt에서 1pulse로 세포 융합을 실시하였으며 세포융합 여부는 30분 후에 관찰함. 융합이 확인된 핵이식란은 5 uM Ca-ionophore에 5분 노출시키고 2.0 mM DMAP에서 3시간 동안 배양하여 난활성을 유도함. 핵이식 후 활성화 처리된 난자는 3 mg/ml FAF-BSA가 들어 있는 CR1aa 용액에 옮겨 배양하고 배양 24시간 쯤 분열된 분할구가 보이는 핵이식 배아는 10% FBS가 들어 있는 CR1aa 배양액으로 체세포와 공동 배양을 실시하였으며 배양 2일째부터 플라보노이드 처리군과 무처리군으로 나누어 배양함.

핵이식배아의 이식 및 체세포 복제소 생산

수란우는 CIDR-PLUS를 질내 7일간 삽입하고 제거하는 당일 PGF2 α 25mg을 투여하는 방법으로 발정동기화를 유도함. 플라보노이드 처리군 또는 무처리군으로 부터 발달된 체외 배양 8일 째 복제 배반포기 배아는 발정 동기화 처리된 수란 대상우중 정상적인 발정을 보이고 수정란 이식 당일 (발정 발현 7~8일째) 직장 검사를 통하여 황체 상태가 양호한 개체를 선발하여 황체가 존재하는 자궁각에 각각 1~2개 이식함. 수란우의 임신 진단은 수정란 이식 후 2개월에 직장 검사법에 의하여 임신 여부를 진단함. 분만시기가 가까이 올 10일~20일 전부터 수란우의 분만 징후를 관찰하고 적절한 시기에 정상적인 분만이 이루어지도록 유도함.

친자감별 마커를 이용한 복제유무 검정

체세포 핵이식으로 복제되고 이식되어 태어난 소의 복제 유무를 검정하기 위해 핵이식에 이용된 체세포, 수란우의 근육세포와 복제송아지의 귀세포의 유전자 검정을 실시함. 각각의 검사 샘플에서 유전물질인 DNA를 추출하고, 특정 유전자를 동시에 증폭하여, 여러 유전자 좌위에서 체세포와 복제송아지가 일치하는지와 대리모소와 복제송아지가 일치하지 않은지의 여부를 조사함. ISAG (International Society of Animal Genetics, 국제동물유전학회) 11개의 친자 감별 표지인자들을 사용하여 TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225, BM1824) 각 primer 의 forwad에 형광 dye를 labeling하고 pcr을 실시함. 검체의 PCR 산물은 형광을 분석하는 3100 genetic analyzer 기기를 이용하여 샘플별로 peak 크기를 계산하여 각각의 표지인자들의 반복성을 조사함. 검사 결과는 검사한 모든 유전자 좌위에서 일치 할 경우 친자라고 판명하고 3개이상의 유전자 좌위에서 불일치 할 경우 친자가 아니라고 판명함.

통계처리

단위발생률과 핵이식 배아의 체외 배발달율, 세포수 조사, apoptotic index와 유전자 발현을 비교에 대한 결과는 SAS program을 이용하여 분석하였으며, 처리간 유의성은 Duncan's multiple range test를 이용하여 검정함.

결 과

플라보노이드 처리가 소 단위발생률의 체외발달에 미치는 영향

체외 배양 2일째부터 소 단위발생 2~4 세포기 배아의 체외배양액에 플라보노이드의 농도별 처리 결과는 표 4와 같음. 체외배양액에 플라보노이드를 0, 1 uM, 10 uM과 20 uM을 첨가하였을 때 배양 8일 째 배반포기 발달율이 각각 49.5%, 54.2%, 57.1% 및 37.5%로 대조군과 비해 10 uM 플라보노이드 처리군의 배반포기배 발달율이 유의하지는 않으나 개선되는 것을 확인함. 한편, 10 uM 처리군과 비교하여 1 uM 처리군에서는 유사한 발달율을 나타낸 반면 20 uM 처리군은 유의하게 낮은 발달율을 나타냄. 또한, 이중형광염색을 통한 세포수 조사에서도 대조군, 1 uM과 20 uM 처리군의 총세포수와 내부세포피수는 유의한 차이가 없었던 반면 10 uM 처리군의 총세포수와 내부세포피수는 대조군과 다른 처리군에 비해 유의적으로 높게 나타남 (표 5). 따라서, 체외발달율과 세포수 조사 결과를 바탕으로 플라보노이드 처리의 최적농도로 10 uM을 선택함.

Table 7. Effect of flavonoid treatment on in vitro development of bovine parthenogenetic embryos

Flavonoid treatment (μ M)	No.(%)* of embryos developed to				No. of total cells (ICM)*
	Day2 \geq 2-4 cell	Day4 \geq 4-8 cell	Day6 \geq morula	Day8 \geq blastocysts	
0	107	98 (91.5)	89 (83.1)	53 (49.5) ^{ab}	112.3 \pm 13.7 ^a (29.3 \pm 2.5) ^a
1	103	91 (88.3)	75 (72.8)	56 (54.2) ^a	117.0 \pm 14.2 ^a (34.3 \pm 7.6) ^a
10	112	105 (93.7)	98 (87.5)	64 (57.1) ^a	139.2 \pm 9.0 ^b (47.8 \pm 7.8) ^b
20	112	102 (91.0)	96 (85.7)	42 (37.5) ^b	133.2 \pm 10.5 ^{ab} (26.8 \pm 11.0) ^a

* (p<0.05)

플라보노이드 처리가 소 단위발생배아의 세포사멸에 미치는 영향

10 μ M 플라보노이드 처리 유무에 따른 체외배양 환경이 배아의 사멸에 미치는 영향을 조사하기 위해 각 군의 배반포기 배를 TUNEL 분석을 실시한 결과는 그림 3과 같음. 대조군과 처리군간의 총세포수는 유의한 차이를 나타내지 않으나 세포 사멸율 (apoptotic index)은 대조군 (12 \pm 3.2)에 비해 10 μ M 플라보노이드 처리군 (4 \pm 2.5) 에서 유의하게 감소되는 것을 확인함.

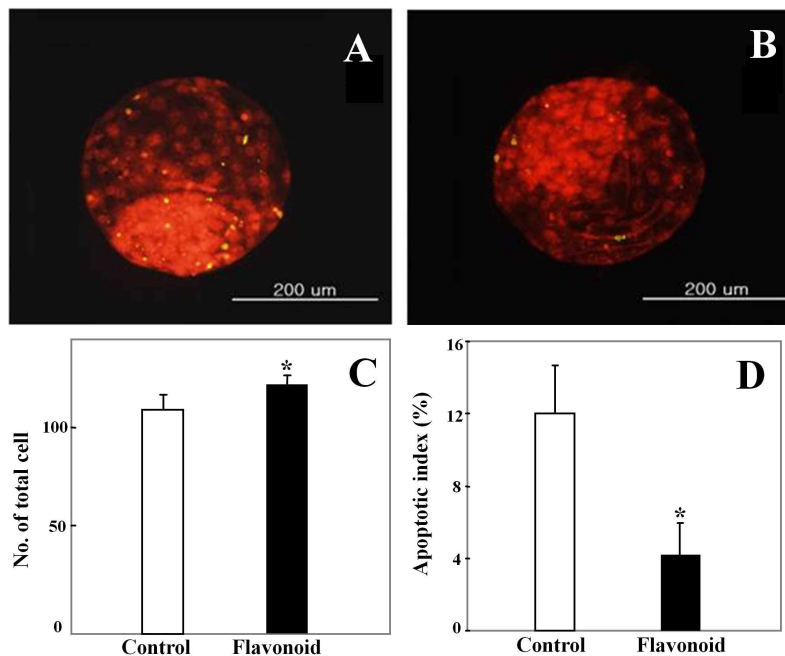


Fig. 7. Fluorescence microscopy images of nuclei of bovine parthenogenetic day 8 blastocysts

by TUNEL staining. A) Control group; B) 10uM flavonoid treatment group; Green: fragmented DNA, red: chromatin. The total cell number of cells (C) and apoptotic index (D) of bovine day 8 blastocysts cells. Star indicate statistically significant differences between two groups ($p < 0.05$).

플라보노이드 처리가 소 단위발생 배아의 유전자 발현에 미치는 영향

플라보노이드 처리가 소 단위발생란의 체외 배양 시 유전자 발현에 미치는 영향을 real-time PCR 분석을 통해 조사함. 대조군과 비교하여 10 uM 플라보노이드 처리군에서 산화 유전자인 Sox 발현의 감소와 항산화유전자인 Mn-SOD 발현이 증가되어 항산화 효과가 있음을 알 수 있었고, 사멸유전자인 Caspase-3와 Bax의 발현을 감소 항사멸유전자인 Survivin과 Bax inhibitor의 발현이 유의하게 증가되어 세포사멸감소 효과가 있음을 예측할 수 있었음. 또한 대사와 관련된 Glut-5와 착상유전자인 In-tau의 발현이 플라보노이드 처리군에서 유의하게 증가하는 것을 확인하였음 (그림 8 참조).

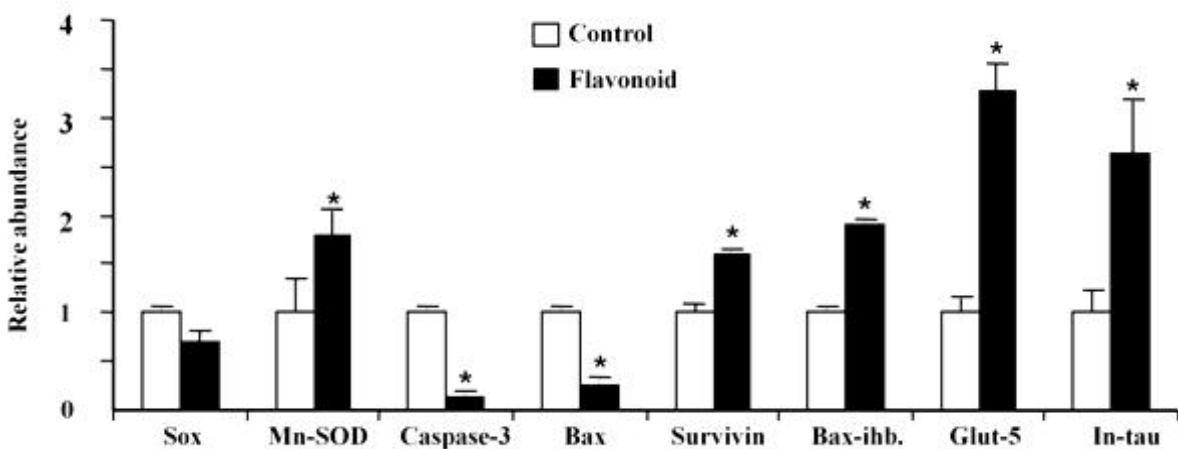


Fig. 8. Relative abundance of oxidant, apoptotic and growth mRNA expression in control or 10uM flavonoid treated bovine parthenogenetic day 8 blastocysts. Significant differences are indicated by *($p < 0.05$). Values are mean \pm SEM of three separate experiments.

소 체세포복제 배아의 체외발달에 플라보노이드 처리가 미치는 영향

체세포 핵이식 후 난할된 복제 배아를 배양 2일째부터 나누어 10 uM 플라보노이드 처리 후 체외 배 발달율과 이중형광 염색을 이용한 세포수 분석을 실시함. 표 5에 나타난 바와 같이, 체외 배양 8일 째 배반포기배 발달율은 플라보노이드 처리군이 30.7%로 대조군 26.0% 보다 더 높았으며 총 세포수 (164.3 ± 13.5)와 내부세포피수 (50.0 ± 5.8)도 대조군의 결과 (135.6 ± 6.3 , 35.6 ± 6.9)와 비교하여 유의적으로 높은 것을 확인함 ($p < 0.05$).

Table 8. Effect of flavonoid treatment on in vitro development of Jeju Black Cattle SCNT embryo

Flavonoid treatment (μ M)	No.(%)* of embryos developed to				No. of total cells (ICM)*
	Day2 $\geq 2-4$ cell	Day4 $\geq 4-8$ cell	Day6 \geq morula	Day8 \geq blastocysts	
0	119	82 (68.9)	69 (57.9)	31 (26.0)	135.6 \pm 6.3 ^a (35.6 \pm 6.9) ^a
10	114	80 (70.1)	59 (51.7)	35 (30.7)	164.3 \pm 13.5 ^b (50.0 \pm 5.8) ^b

*(p<0.05)

플라보노이드 처리 환경으로부터 생산된 체세포 복제 배아의 임신 결과

소 체세포 핵이식배아를 플라보노이드 첨가 유무에 따라 나누어 배양 한 후 체외배양 8일째 생산된 배반포기배를 대리모에 이식함. 표 7에 나타낸 바와 같이, 대조군 의 경우 34두에서 2두 (5.9%)가 임신된 반면 플라보노이드 처리군의 경우 59두에서 6두 (10.2%)가 임신됨. 이식 후 10개월 짜 대조군에서는 2두 중 1두가 분만되었으나 생후 30일경에 죽어 살아있는 복제 소를 기대하기 어려웠던 반면, 플라보노이드 처리군의 경우 임신 소 6두 중 4두는 임신 6개월에 유산되고 나머지 2두에서 2두의 복제 소 (♂) 가 태어남 [2009. 3. 11 (28kg, BK01-10, Fig. 5) 과 2009. 9. 9 (27kg, BK94-13)].

Table 9. Jeju Black Cattle SCNT embryo transfer and their pregnancy

Flavonoid treatment (μ M)	No. of transfer. surrogate mother	No. of Pregnancy	No. of Birth calf	No. of Living calf
0	34	2 (5.9%)	1	-
10	59	6 (10.2%)	2	2

*(p<0.05)

고 찰

본 연구는 제주 흑우 체세포 핵이식 배아를 체외배양 함에 있어서 배양액 내에 항산화제인 합성 플라보노이드 (3,4-dihydroxyflavone) 를 처리하였을 때, 체외 배발달율의 개선과 배반포기배의 총 세포수 및 내부세포괴수가 증가하였고 핵이식배아의 이식 후 임신을 및 산자 생산율도 유의하게 개선되었던 바, 플라보노이드는 체세포 핵이식 배아의 배양첨가제로 유용하게 이용될 수 있음을 나타냄. 또한 본 실험에서는 플라보노이드의 적정 농도와 처리 효과를 조사하기 위하여 체세포 핵이식 배아에 적용하기 앞서 단위발생 배아에 그 사용 여부를 조사함. 플

라보노이드를 1 uM, 10 uM과 20 uM 농도로 나누어 대조군과 비교 조사하였던 바, 10 uM 농도에서 발달을 및 총 세포수 증가를 확인하였으며 특히 내부세포피수 증가를 확인함.

또한, 플라보노이드 처리는 체세포 핵이식 배아의 항산화, 항사멸 효과와 더불어 대사관련 유전자 발현의 증가 그리고 착상 유전자의 발현 증가를 유의하게 가져올 수 있음. 항사멸 효과는 수정란의 세포분열을 돕고 발달을 도움. 그 결과 본 연구에서 체세포 핵이식으로 발달된 배아의 세포수를 보면 총 세포수뿐만 아니라 내부세포피수에서도 대조군에 비해 유의하게 높은 것으로 나타남. 이와 더불어 플라보노이드를 처리한 배양 환경에서 자란 체세포 복제 배아는 이식 후 10개월 후에 형태 이상이나 신체 기관 이상 없이 정상적으로 태어났으며, 병적 소인 없이 잘 성장하였음.

본 연구에서 임신율은 대조군과 플라보노이드 처리군에서 각각 5.9% (2/34) 와 10.2% (6/59)로 나타났고, 대조군에서 2두 중 1두가 분만되어 생 후 30일만에 죽는 안타까운 일이 발생했으나, 플라보노이드 처리군에서는 임신 소 6두 중 2두의 복제소 (33.3%) 는 임신 282 일(7일 배아 + 이식 후 275일, BK01-10) 과 292일 (7일 배아 + 이식 후 285일, BK94-13) 에 각각 태어나 건강하게 성장하였음. 플라보노이드는 착상전 소 배아의 발달에 매우 유용한 항산화 보호제로 작용하였을 것으로 사료됨.

본 연구에서 분만된 소 중 2009년 3월 11일에 태어난 첫번째 제주흑우 복제 소 흑영돌이 (♂, 2009년 8월 31일 공개, Fig. 4) 는 현존하는 흑우 중 육량형질이 제일 우수한 종모우 (BK 01-10) 를 복제한 것이며, 2009년 9월 9일에 태어난 두번째 복제 소 흑제돌이 (♂, 2010년 6월 16일 공개) 는 육질형질이 우수하여 근내 지방도가 높고 1등급 이상이 95% 이상 출현율을 보이는 종모우 (BK 94-13) 를 복제한 것임. 특히 두번째 소는 2008년 도축이 된 우량 소를 다시 복원한 것으로 복제 본래의 의미를 더해줌과 동시에 숫 적으로 열세인 제주흑우의 증식에 도움이 될 것으로 보여짐. 공시된 체세포와 핵이식 배아의 유전자가 일치하는지의 여부는 STR (short tandem repeat) 분석으로 조사하여 11개의 국제 공인 마커와 성별까지 모두 일치하는 것으로 2두의 복제소에서 각각 확인되었음.

복제 배아의 건강도는 앞서 언급한대로, 장시간 동안 다수의 기계적 처리과정과 화학물 노출에 의해 약해져 있으므로 핵이식 후 기능을 빠르게 회복할 수 있는 체외배양 환경을 제공하는 것이 바람직할 것임. 따라서, 적정농도의 플라보노이드 첨가는 항산화와 항사멸효과로 체세포 핵이식 배아의 발달능을 증진시켜 제주흑우 복제배아의 임신 및 산자 발생율을 높일 수 있을 것으로 기대됨.

*이상의 내용은 국내특허 출원 (출원번호 10-2009-0035112) 및 특허 등록 (제 10-1010156) 하였
고, Reproduction Development and Biology 2010년 34권 127-134에 게재됨.



특 허 증

CERTIFICATE OF PATENT

특 허 제 10-1010156 호 (PATENT NUMBER)	출원번호 (APPLICATION NUMBER)	제 2009-0035112 호
	출원일 (FILING DATE: YYMMDD)	2009년 04월 22일
	등록일 (REGISTRATION DATE: YYMMDD)	2011년 01월 14일

발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)
배양액 및 동물 복제를 위한 체외 배양 방법

특허권자 (PATENTEE)
등록사항관에 기재



발명자 (INVENTOR)
등록사항관에 기재

위의 발명은 「특허법」에 의하여 특허등록원부에 등록
되었음을 증명합니다.

(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN
INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)

2011년 01월 14일



특 허 청

COMMISSIONER, THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE



연자등록료 납부일은 실정등록일 이후 4년차부터 매년 01월 14일까지이며 등록원부로 권리관계를 확인바랍니다.

플라보노이드 처리된 체세포 핵이식 배아의 체외 발달 및 제주흑우 복제 소 생산

김은영^{1,2} · 김연옥¹ · 김재연^{1,2} · 박민지^{1,2,3} · 박효영^{1,2} · 한영준^{2,3} · 문성호² · 오창언² ·
김영훈⁴ · 이상수⁵ · 고문석⁵ · 박세필^{1,2,3,*}

¹미래생명공학연구소, ²제주대학교 줄기세포연구센터, ³제주대학교, ⁴제주특별자치도 축산진흥원, ⁵국립축산과학원 난지축산시험장

In Vitro Development of Somatic Cell Nuclear Transfer Embryo Treated with Flavonoid and Production of Cloned Jeju Black Cattle

Eun Young Kim^{1,2}, Yeon Ok Kim¹, Jae Youn Kim^{1,2}, Min Jee Park^{1,2,3}, Hyo Young Park^{1,2},
Young Joon Han^{2,3}, Seong Ho Mun², Chang Eon Oh², Young Hoon Kim⁴,
Sung Soo Lee⁵, Moon Suck Ko⁵ and Se Pill Park^{1,2,3,*}

¹Mirae Biotech, Seoul 143-854, Korea, ²Jeju National University Stem Cell Research Center, Seoul 143-854, Korea,

³Jeju National University, Jeju 690-756, Korea,

⁴Jeju Special Self-Governing Province, Institute for Livestock Promotion, Jeju 690-180, Korea

⁵National Institute of Subtropical Agriculture, Jeju 690-130, Korea

ABSTRACT

This study was to investigate the effect of flavonoid treatment on *in vitro* development of bovine somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos, and their pregnancy and delivery rate after embryo transfer into recipient. In experiment 1, to optimize the flavonoid concentration, parthenogenetic day 2 (\geq 2-cell) embryos were cultured in 0 (control), 1, 10 and 20 μ M flavonoid for 6 days. In the results, *in vitro* development rate was the highest in 10 μ M flavonoid group (57.1%) among treatment groups (control, 49.5%; 1 μ M, 54.2%; 20 μ M, 37.5%), and numbers of total and ICM cells were significantly ($p < 0.05$) higher in 10 μ M flavonoid group than other groups. We found that 10 μ M flavonoid treatment can significantly ($p < 0.05$) decrease the apoptotic index and derive high expression of anti-oxidant, anti-apoptotic, cell growth and development marker genes such as Mn-SOD, Survivin, Bax inhibitor, Glut-5, In-tau, compared to control group. In experiment 2, to produce the cloned Jeju Black Cattle, beef quality index grade 1 bull somatic cells were transferred into enucleated bovine MII oocytes and reconstructed embryos were cultured in 10 μ M flavonoid added medium. When the *in vitro* produced day 7 or 8 SCNT blastocysts were transferred into a number of recipients, 10 μ M flavonoid treatment group presented higher pregnancy rate (10.2%, 6/59) than control group (5.9%, 2/34). Total three cloned Jeju Black calves were born. Also, two cloned calves in 10 μ M flavonoid group were born and both were all healthy at present, while the one cloned calf born in control group was dead one month after birth. In addition, when the result of short tandem repeat marker analysis of each cloned calf was investigated, microsatellite loci of 11 numbers matched genotype between donor cell and cloned calf tissue. These results demonstrated that the flavonoid addition in culture medium may have beneficial effects on *in vitro* and *in vivo* developmental capacity of SCNT embryos and pregnancy rate.

(Key words : Bovine, SCNT, Flavonoid, Jeju Black Cattle, Pregnancy)

서론

체세포 핵이식 기술은 포유동물의 여러 종에서 성공적으로 이루어져 왔다. 1997년 영국의 Wilmut 등이绵양에서 최초로 체세포 핵이식에 의한 복제동물 생산에 성공한 이후 귀(Wakayama 등, 1998), 염소(Baguisi 등, 1999), 돼지

(Polejaeva 등, 2000)와 고양이(Shin 등, 2002) 등 다양한 종의 연구 결과가 보고되었으며, 복제 소 생산의 경우 1998년 Kato 등과 Cibelli 등에 의해 연구 결과가 보고된 바 있고, 우리나라에서도 Im 등(2001)이 한우 복제 소 생산에 대하여 보고한 바 있다. 그러나 체세포 핵이식에 의한 복제 소 생산 효율은 인공수정이나 체외수정란에 비해 매우 낮아 분만율이 7% 미만 정도인 것으로 보고되고 있다(Heyman

* 본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업(과제번호: 308008-5)의 지원에 의해 이루어진 것임.

* Corresponding author : Phone: +82-2-457-8758, E-mail: sppark@jejunu.ac.kr

다. 줄기세포 생리활성 물질을 이용한 배양환경 개발

The Use of Embryonic Stem Cell Derived Bioactive Material as a New Protein Supplement for the *In Vitro* Culture of Bovine Embryos

Abstract

Embryonic stem (ES) cells are expanded version of the inner cell mass cells that compose the early mammalian blastocyst. Components derived from ES cells may contain various bioactive materials (BM) helpful for the early preimplantation embryo growth. In this study, we examined the effect of human ES cell derived BM (hES-BM) on *in vitro* culture of bovine embryos. When bovine parthenogenetic day 2 embryos were cultured in 10% hES-BM, a significantly higher embryo development rate (44.3%) and increased cell numbers were observed relative to control medium containing 3mg/ml BSA(19.5%) ($p < 0.01$). Among the various concentration (5%, 10% and 15%) and days of treatment (2 or 4 days) tested, 10% hES-BM treatment for 4 days provided the best culture environment to support of the growth of bovine embryos *in vitro* ($p < 0.05$). Little difference was observed between 10% hES-BM and 10% FBS treatment in examined parthenogenetic or *in vitro* fertilized embryos, although the hES-BM group developed at a slightly better rate. However, the ICM cell numbers were significantly higher in the hES-BM group in irrespective of embryo origin ($p < 0.05$). In addition, the relative levels of pluripotency (Oct4, x1.8 fold; Nanog, x3.3 fold), embryogenesis (Stat3, x2.8 fold; FGF4, x18.8 fold; E-cad, x2.0 fold), and growth (Glut5, x2.6 fold) genes were significantly higher in the 10% hES-BM group than the 10% FBS group ($p < 0.05$), while the levels of other genes (Bax, Bcl2, MnSOD and Connexin 43) were not different. This is the first report examining the positive effects of hES-BM on bovine embryo development *in vitro*. Based on our results, we conclude that hES-BM can be used as a new protein supplement for bovine preimplantation embryo development.

Key words: bovine embryo / hES-BM / differential staining / real time RT-PCR

서 론

배아줄기세포는 남성의 생식세포인 정자와 여성의 생식세포인 난자가 결합하여 생성된 수정란에서 유래함. 그리고 배아줄기세포는 착상 전 배반포기배의 내부세포괴로부터 획득되며 모든 조직의 세포로 분화할 수 있는 능력을 지녔으나 배양조건만 주어진다면 분화되지 않은 상태로 무한대로 증식이 가능한 아직 분화되지 않은 세포를 말함. 다시 말해서 특수 분화 배양 환경에서는 원하는 방향으로 세포 분화가 유도되어 신경, 당뇨, 혈액과 같은 질환의 세포 치료제로 이용될 수 있어서 한 개의 배아줄기세포주만으로도 수많은 환자의 치료에 이용될 수 있다고 기대되는 만능세포임.

수정란의 체외 배양은 체내 배양에 비해서 배양효율이 떨어짐. 체외 배양 환경을 개선 시키기 위해서 배양용 배지의 조성과 알부민 또는 우태아혈청 같은 단백질 첨가제 그리고 항산

화제와 성장인자 등과 같은 다양한 물질에 대한 연구가 이루어지고 있음. 그러한 예로써, 일반적으로 배양환경에서 생성되는 활성산소종 (reactive oxygen species; ROS) 감소에 베타 메르캅토 에탄올과 비타민 E (Kitagawa 등, 2004), 알파토코페롤과 아스코르비산 (Hossein 등, 2007), 플라보노이드 (Ohshima 등, 1998; Williams 등, 2004) 같은 항산화제 첨가가 유효하게 작용하여 체외 수정란 발달효율이 향상된다고 보고된 바 있음. 우태아 혈청 및 화학적으로 정제된 합성 혈청 대사물과 상피세포 성장인자를 같이 넣은 배양액을 이용하여 소 난자의 배 발달을 증가와 성장관련 유전자 증가 등 긍정적인 영향을 얻었다고 보고한 바 있음 (Sagirkaya 등, 2006).

또한 소 복제수정란을 체외배양 할 때 배양액에 생쥐의 상피세포 성장 인자 (EGF; epidermal growth factor)와 생쥐의 과립세포-대립세포 집락자극인자 (GM-CSF: granulocyte macrophage-colony stimulating factor) 를 첨가 하였을 경우 세포 수 증가 등 발달에 있어서 긍정적인 영향을 주었다고 보고된 바 있음. 이러한 체외 배양 환경 개선에 대한 최종 연구 목적은 최대한 체내 환경과 유사한 환경을 제공함으로써 건강한 배아 즉 정상적인 생명체 발생이 용이한 배양 환경을 만들고자 함에 있음.

배아줄기세포는 착상전 배반포기배의 내부세포괴가 분화되지 않은 상태로 존재하면서 무한히 증식된 차원의 특정 세포임. 배반포기배 중 내부세포괴는 태아로 발생될 부위로 무한 증식된 배아줄기세포의 배양 조성물은 태아발생에 유용한 성분들이 다수 포함되어 있을 것으로 기대됨. 본 연구에서는 이와 같이 재생능력이 탁월한 배아줄기세포의 배양 조성물을 획득하여 소 난자의 체외 배양에 이용함으로써 배양첨가제로써의 이용가능성을 검토하고, 착상전 배아의 발달을 및 질적 수준을 향상시킬 수 있는지의 여부를 검토하였음.

연구재료 및 방법

미분화 인간배아줄기세포배양 유래 조성물의 준비

미분화 인간배아줄기세포 유래 조성물은 5% 매트릭셀이 코팅된 배양 용기내에 90% 이상 증식된 인간 배아줄기세포 콜로니를 줄기세포 배양액으로 2일 동안 배양하여 획득함. 줄기세포 배양액은 DMEM/F12 (Gibco) 에 1% non-essential amino acid, 0.1 mM β -mercaptoethanol, 1% Penicillin/streptomycin, 20% serum replacement 와 8ng/ml fibroblast growth factor II 가 첨가된 것을 사용함.

소 난자의 채취 및 성숙배양

소 난소의 표면에 육안으로 보이는 3-6 mm크기 다수의 난포로부터 난구세포-난자 복합체 (cumulus-oocyte complexes) 를 18 gauge 주사기를 이용하여 채취함. 회수된 난구세포-난자 복합체는 1mg/ml 소혈청 알부민이 들어있는 TL-HEPES 버퍼로 3회이상 충분히 세척하고 우태아 혈청 10%와 0.2mM 피루브산 나트륨, 1 μ g/ml 난포자극 호르몬, 1 μ g/ml 에스트라디올, 25 μ g/ml 젠타마이신이 들어간 TCM-199 체외성숙용 배양액에 넣어 38.8 $^{\circ}$ C 온도와 5% 이산화탄소 조건의 배양기내에서 24시간 동안 성숙 배양함.

소 난자의 단위발생 및 체외 배양

소 난자의 단위발생을 위해 체외 성숙 배양된 난구세포-난자 복합체는 1 mg/ml 의 히알루로니다제를 이용해서 먼저 난구세포를 제거하고 TL-HEPES버퍼로 충분히 세척한 다음 10 μ M 칼슘아이오마이신이 들어있는 CR1 aa 배양액에서 5분 동안 활성화를 유도하고 2 μ M 6-dimethylaminopurine이 들어있는 CR1 aa 배양액에서 3시간 동안 배양함. 이때에 사용된 CR1aa 배양액 내에는 3mg/ml 지방산이 제거된 (fatty acid free) 소혈청 알부민이 함유되어 있고 본 실험의 기본 배양액으로 이용됨.

활성화시킨 난자는 CR1aa 기본 배양액에 넣어 2일간 배양시키고 4-8세포로 분열된 난자를 다시 CR1aa 기본 배양액 (대조군)과 10% 미분화 배아줄기세포 유래 조성물이 들어있는 배양액 (실험군) 으로 나누어 38.8 $^{\circ}$ C 온도와 5% 이산화탄소 조건의 배양기내에서 6일간 추가 배양하여 체외 배양 8일 째 배반포기배까지의 배 발달상태를 비교 조사함.

이중염색

대조군과 실험군의 체외 배양 8일째 발달된 배반포기배의 질적인 차이를 조사하기 위해 영양배엽세포와 내부세포피 수를 동시에 검토했 수 있는 이중 염색을 실시함. 2중염색은 2단계로 실시됨. 각 군의 배반포기배는 1% triton X-100과 100 μ g/ml 프로피디움 요오드화물이 포함된 TL-HEPES 용액에서 30초간 처리하고 (1단계) 25 μ g/ml 비스벤자마이드 (Hoechst 33258)가 포함된 TL-HEPES 용액에 넣어 4 $^{\circ}$ C 에서 다음날까지 반응시킴 (2단계). 염색된 배반포기배는 글리세롤로 세척한 다음 슬라이드 그라스에 올려 놓고 커버슬립으로 덮어 형광 현미경의 blue 필터 (excitation field-350 nm, emission field-461 nm) 하에서 관찰하여 세포 수를 셈.

Real time -PCR을 이용한 유전자 발현 분석

mRNA는 마그네틱 비드 (Dynabeads mRNA purification kit; Dynal, Oslo, Norway) 를 이용하여 추출함. 동일한 수의 배아를 (대략 15개) 100 ul 용해/결합 용 버퍼 [100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM LiCl, 10 mM EDTA (pH 8.0), 1% LiDS, 5 mM DTT] 에 넣어 실온에서 5분간 교반하면서 반응을 유도하고, 여기에 50ul oligo (dT)25 마그네틱 비드 용액을 넣어 다시 5분간 반응시킴. 마그네틱 비드에 결합된 mRNA는 세척용 버퍼 A [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.15 M LiCl, 1 mM EDTA, 1% LiD] 로 2회 세척하고, 버퍼 B [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.15 M LiCl and 1 mM EDTA]로 1회 세척한 다음 DEPC water 15ul에 pellet을 녹여 마그네틱 비드로부터 mRNA시료를 획득함. cDNA 합성은 추출한 mRNA로 부터 oligo (dT) 12-18 프라이머와 superscript reverse transcriptase (Invitrogen) 를 이용하여 이루어짐. Real-time PCR (Bio-Rad, Chromo4) 에 사용된 프라이머는 표 15에 나타난 바와 같음. 모든 실험에서 히스톤 2a mRNA를 기준으로 사용함. 결과는 DyNAmo SYBR green qPCR 키트를 사용함. PCR과정은 95 $^{\circ}$ C 에서 15분간 변성과정을 거친 다음, 증폭과 정량을 위해 94 $^{\circ}$ C 에서 30초간, 50~56 $^{\circ}$ C 1분간, 72 $^{\circ}$ C 1분으로 40회수를 반복하였고 형광측정을 함. 이때의 melting curve는 65~95 $^{\circ}$ C, heating rate는 0.2 $^{\circ}$ C /sec 이다. SYBR green 형광 결과는 PCR 과정의 extension 단계 후에 측정함.

결 과

○ 배아줄기세포 생리활성물질이 소 단위발생란의 체외발달율에 미치는 영향을 조사함.

Table 10. Effect of hES-BM on bovine parthenogenetic embryo development in vitro

Treatment*	Day 2 ≥2-4 cell	No. (%)** of embryos developed to			No. of cells (Mean±SD)	
		Day 4 ≥8cell	Day 6 ≥morula	Day 8 ≥blastocyst	Total	ICM
Control	113	78 (69.6) ^a	50 (44.2) ^x	22 (19.5) ^x	58.3±11.5 ^x	12.3±6.4 ^a
10% hES-BM	115	95 (82.6) ^b	81 (70.4) ^y	51 (44.3) ^y	132.2±14.7 ^y	30.0±12.7 ^b

*Control: culture in CR1aa medium containing 3 mg/ml FAF-BSA from day 2 until day 8.

hES-BM 10%: culture in CR1 aa medium containing 10% hES-BM from day 2 until day 8.

** (p<0.01)^{x-y}(p<0.05)^{a-b}.

소 단위발생란의 발달에 배아줄기세포 생리활성물질을 10% 첨가하여 그 영향을 조사하였던 바, 체외 배양 4일, 6일과 8일로 진전됨에 따라 3mg/ml FAF-BSA 처리한 대조군과 실험군 간에 배 발달율이 현저하게 차이가 있음을 알 수 있었음 (표 10과 그림 9 참조). 발달율에서 배양 4일 째부터 유의한 차이가 나타났으며 배양 8일째 배반포기배형성율은 대조군 19.5%에 비해 처리군의 경우 44.3% 로서 유의하게 높았음 (p<0.01).

또한, 세포수 조사에서도 줄기세포 생리활성물질 처리군의 배반포기 배아 총세포수 및 내부세포피수가 대조군에 비해 유의하게 높게 나타나 소 수정란의 후기배 발달 시 소 혈청을 대체할 수 있는 또 다른 단백질 첨가제로서 이용 가능할 것으로 기대됨.

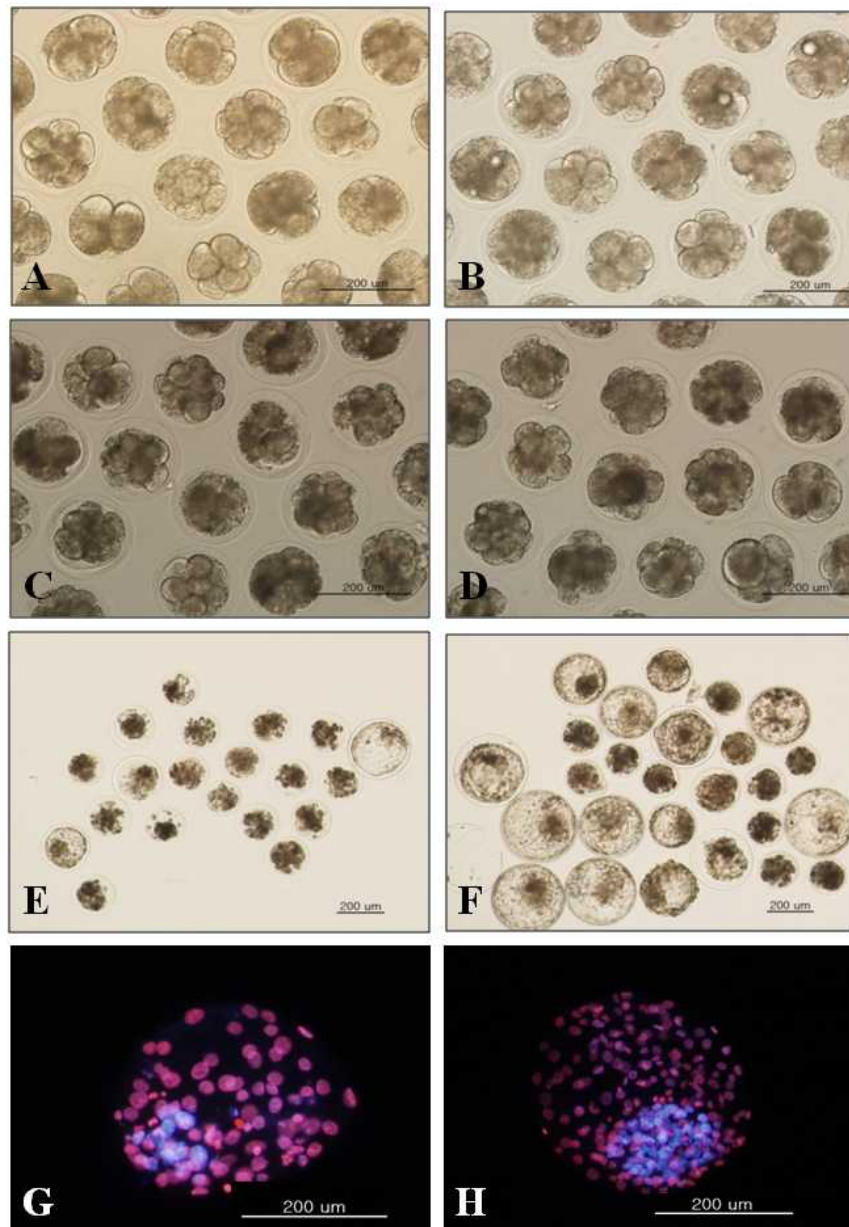


Fig. 9. Morphology of the in vitro development of bovine parthenogenetic embryos cultured in control CR1aa medium or medium containing 10% hES BM. Embryos were cultured in CR1aa containing 3 mg/ml FAF-BSA (control group, C, E and G) or 10% hES-BM(10% hES-BM group, B, D, F and H) from embryonic day 2 (A and B) to day 4 (C and D) or day 8 (E and F). G and H show representative day 8 blastocysts in the control and 10% hES-BM treatment groups, respectively, stained by a differential labeling method.

○ 배아줄기세포 생리활성물질의 처리 시기와 처리 농도가 소 단위발생란의 체외발달에 미치는 영향을 조사함.

Table 11. Effect of hES-BM treatment days on bovine parthenogenetic embryo development *in vitro*

Treatment*	Day 2 ≥2-4 cell	No (%)** of embryos developed to			No. of cells (Mean±SD)	
		Day 4 ≥8cell	Day 6 ≥morula	Day 8 ≥blastocyst	Total	ICM
Control	120	88 (73.3)	58 (48.3) ^x	25 (20.8) ^x	53.2±11.5 ^x	13.1±5.3 ^a
hES-BM-1	124	102 (82.3)	77 (62.1) ^y	53 (42.7) ^y	126.3±15.2 ^y	30.0±11.4 ^b
hES-BM-2	125	108 (86.4)	92 (73.6) ^y	64 (51.2) ^y	133.2±17.3 ^y	33.9±13.7 ^b

*Control: culture in CR1aa medium containing 3 mg/ml FAF-BSA from day 2 until day 8.

hES-BM-1: in CR1aa medium containing 10% hES-BM from day 2 until day 8.

hES-BM-2: culture in control medium at embryonic day 2 and then in CR1aa medium containing 10% hES-BM from day 4 until day 8.

** (p<0.01)^{x-y}(p<0.05)^{a-b}.

Table 12. Effect of hES-BM concentration on bovine parthenogenetic embryo development *in vitro*

Treatment*	Day 4 ≥8 cell	No (%)** of embryos developed to		No. of cells (Mean±SD)	
		Day 6 ≥morula	Day 8 ≥blastocysts	Total	ICM
Control	92	44 (47.8) ^a	21 (22.8) ^a	55.8±10.1 ^a	13.1±5.3 ^a
5% hES-BM	90	42 (46.7) ^a	42 (46.7) ^b	89.4±10.2 ^b	16.2±10.1 ^a
10% hES-BM	90	72 (80.0) ^b	57 (63.3) ^c	125.3±12.3 ^c	32.0±13.6 ^b
15% hES-BM	90	48 (53.3) ^a	45 (50.0) ^b	90.0±12.0 ^b	19.0±14.5 ^a

*Control: culture in CR1aa medium containing 3 mg/ml FAF-BSA from day 2 until day 8.

hES-BM 5, 10 or 15%: culture in control medium at embryonic day 2 and then in CR1aa medium containing 5, 10 or 15% hES-BM from embryonic day 4 until day 8.

** (p<0.05)^{a-c}.

배아줄기세포 생리활성물질의 처리시기와 농도가 소 단위발생란의 발달에 미치는 영향을 조사하였던 바, 체외 배양 2일 째부터 처리하는 것 보다 배양 4일째부터 배아줄기세포 생리활성물질을 처리하는 것이 배발생율 및 세포수 증가에 효과가 있는 것을 확인하였음 (표 11 참조).

또한 배양 4일 째부터 배아줄기세포 생리활성물질을 처리함에 있어서, 처리 농도가 소 단위발생란의 발달에 미치는 영향을 조사하였던 바, 배양 6일 째 상실배 발달율 결과에서 10% 처리군이 대조군이나 5%, 15% 처리군보다 유의하게 나은 발달율을 나타냄을 확인하였음 (표 12 참조). 그리고 배양 8일 째 배반포기배 발달율은 무처리군보다는 처리군의 결과가 유의하게 좋았으며, 10% 처리군이 5% 와 15% 처리군의 결과와 비교할 때 유의하게 높은 발달율을 나타냄을 확인하였음. 이러한 차이는 세포수 조사에서도 나타나 배아줄기세포 생리활성물질 처리군의 배반포기 배아 총세포수 및 내부세포괴수가 대조군에 비해 유의하게 높게 나타나며 처리 농도중에서도 10% 처리군의 결과가 유의하게 높은 세포수 증가를 나타냄을 확인하였음.

*따라서, 배아줄기세포 생리활성물질은 체외수정란 배양 시 배양첨가제로 사용함에 있어서 10% 농도로 사용함이 적정하며 체외배양 4일 째부터 첨가하는 것이 유효함을 확인함.

○ 배아줄기세포 생리활성물질과 우 혈청의 소 단위발생란 및 체외수정란 발달율에 미치는 영향 비교

Table 13. Comparison of FBS or hES-BM effect on bovine parthenogenetic embryo development *in vitro*

Treatment*	Day 4 ≥8 cell	No (%) of embryos developed to		No. ** of cells (Mean±SD)	
		Day 6 ≥morula	Day 8 ≥blastocysts	Total	ICM
10% FBS	93	83 (89.2)	52 (55.9)	103.7±13.6	18.2±7.6 ^a
10% hES-BM	93	84 (90.3)	56 (60.2)	125.0±22.0	37.0±12.5 ^b

*10% FBS: culture in CR1aa medium containing 3 mg/ml FAF-BSA at day 2 and then in CR1aa medium supplemented with 10% FBS from day 4 until day 8.

10% hES-BM: culture in CR1aa medium containing 3 mg/ml FAF-BSA at day 2 and then in CR1aa medium supplemented with 10% hES-BM from day 4 until day 8.

** p<0.05)^{a-b}.

Table 14. Effect of hES-BM on bovine *in vitro* fertilized embryo development

Treatment*	Day 4 ≥8 cell	No (%) of embryos developed to		No.** of cells (Mean±SD)	
		Day 6 ≥morula	Day 8 ≥blastocysts	Total	ICM
10% FBS	125	102 (81.6)	68 (54.4)	128.3±10.1	25.2±10.4 ^a
10% hES-BM	126	110 (87.3)	73 (57.9)	143.0±15.5	45.0±8.6 ^b

*10% FBS: culture in CR1aa medium containing 3 mg/ml FAF-BSA at day 2 and then in CR1aa medium supplemented with 10% FBS from embryonic day 4 until day 8.

10% hES-BM: culture in CR1aa medium containing 3 mg/ml FAF-BSA at day 2 and then in CR1aa supplemented with 10% hES-BM from embryonic day 4 until day 8.

** (p<0.05)^{a-b}.

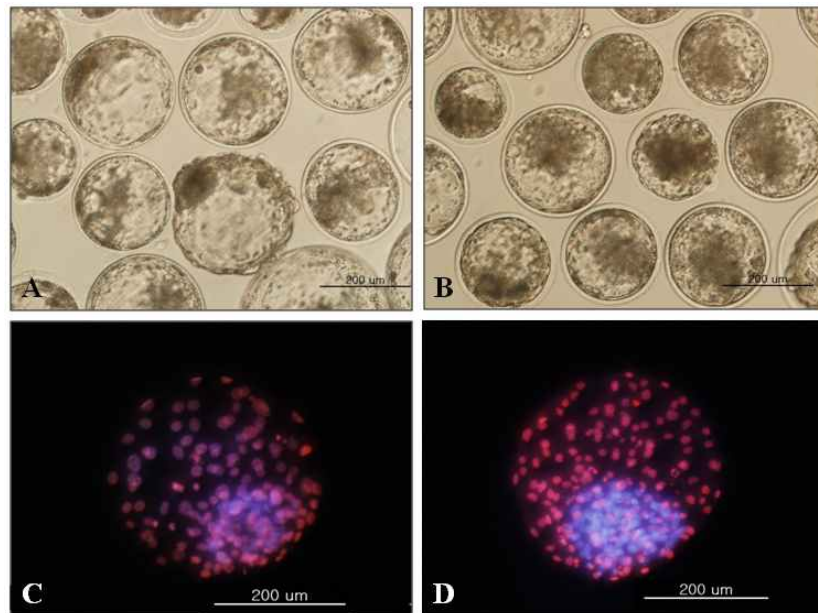


Fig. 10. Morphology of *in vitro* produced bovine parthenogenetic day 8 embryos cultured in 10% FBS (A) and 10% hES-BM (B). The cell number was examined by differential labeling of 10% FBS and 10% hES-BM treated embryos (C and D), respectively.

일반적으로 가장 많이 사용되고 있는 우 혈청과 배아줄기세포 생리활성물질이 소 단위 발생란 및 체외수정란 발달에 미치는 영향을 비교 조사하였던 바 (표 14와 그림 10 참조), 배양 4일 이후 처리하였을 때, 체외 배양 6일과 8일 째 상실배와 배반포기배 발달율이 유의한 차이 없이 높은 발달율을 나타냈으며, 배반포기배의 세포수 조사에서도 총세포수에서 차이가 나타나지 않았으며, 내부세포피수 조사에서는 오히려 배아줄기세포 생리활성물질 첨가군이 높게 나와, 소 체외수정란 생산 시 단백질 첨가제로서 우 혈청을 대신할 수 있을 뿐만 아니라 배아줄기세포의 배양 유래 획득된 성분이라 태아발생에 유용한 성분이 들어 있는 것으로 사료되어

건강한 수정란을 생산하는데에 더 유익할 것으로 기대됨.

○ 배아줄기세포 생리활성물질과 우혈청이 소 단위발생란의 유전자발현에 미치는 영향 비교

표 15에 나타낸 프라이머를 이용하여 10% 우혈청과 10% 배아줄기세포 생리활성물질 처리환경으로부터 획득된 배반포기의 유전자발현 특성을 real-time RT PCR 분석을 통해 조사하였던바, 배아줄기세포 생리활성물질 처리군에서 만능성 유전자 (Oct4, x1.8배 증가; Nanog, x3.3 배 증가), 배발생 유전자 (Stat3, x2.8배 증가; FGF4, x18.8배 증가; E-cad, x2.0배 증가), 성장유전자 (Glut5, x2.6배 증가) 발현이 우혈청 처리군보다 유의하게 높은 것으로 확인됨 (p<0.05) (그림 11 참조).

Table 15. Details of the primers and probes used for real-time RT PCR

Primer	Sequence (5'-3')	Product size	Function	Accession No.
bOct4-F	CTCTTTGGAAAGGTGTTTCAG	155 bp	ICM and TE	AF022987
bOct4-R	GTCTCTGCCTTGCATATCTC			
bNanog-F	TGGAACAATCAGTTCAACAA	157 bp	ICM	NM001025344
bNanog-R	GCTGGGAATTGAAATACTTG			
bStat3-F	ATCTGAATGGAAACAACCAG	155 bp	Cavitation	AJ620655
bStat3-R	TTCATCCGTGAGAGTTTTCT			
bFGF4-F	GAGTGCAGGTTTCAGAGAGAT	150 bp	Implantation	NM001040605
bFGF4-R	GAGGAAGTGGGTGACCTT			
bConnexin 43-F	TTCAAGTCTGTCTTCGAGGT	151 bp	Compaction	NM174068
bConnexin 43-R	TGATGAAGATGGTTTTCTCC			
bE-cad-F	CCGGGACAATGTGTATTACT	148 bp	Biogenesis of trophectoderm	AB037667
bE-cad-R	GTACTIONGGGCACACTCAT			
bBcl-2-F	ATGACCGAGTACCTGAACC	122 bp	Anti-apoptotic	U92434
bBcl-2-R	AGAGACAGCCAGGAGAAAATC			
bBax-F	GCTCTGAGCAGATCAAG	400 bp	Apoptotic	XM001253643.2
bBax-R	AGCCGCTCTCGAAGGAAGTC			
bMnSOD-F	AGCACGAGCAGGAGACTGGT'	287 bp	Oxidative stress	BT020988
bMnSOD-R	GTCCAGAAGATGCTGTGA			
bGlut-5-F	TTGGAGAGCCAGTGAACAGT	292 bp	Metabolism	NM001101042
bGlut-5-R	TGCTGATAACTGTCTGCGCT			

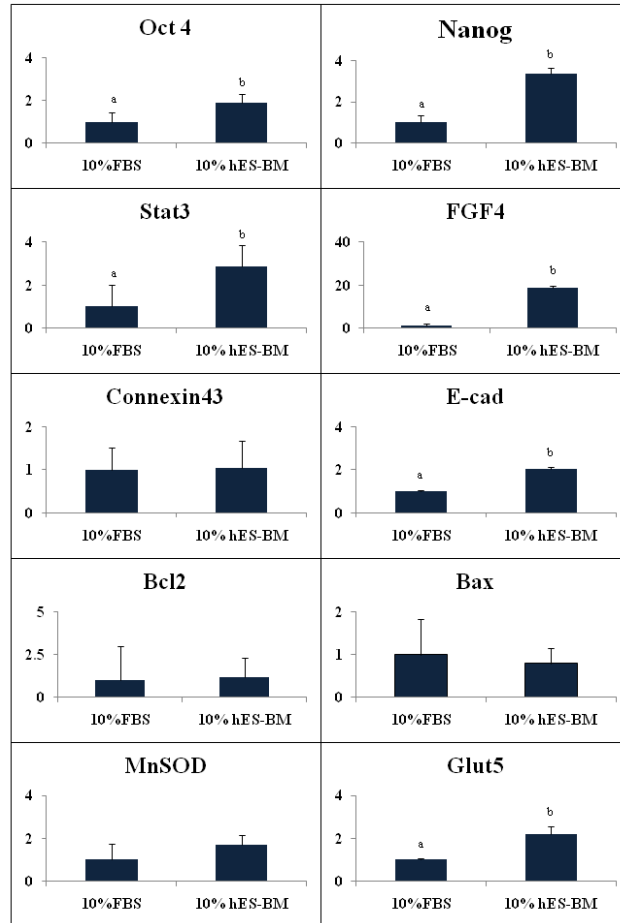


Fig. 11. Relative mRNA expression of candidate genes in bovine day 8 blastocysts. The bars with different superscripts within a panel differ significantly from each other ($p < 0.05$). Error bars indicate the standard deviation. In the control treatment group, day 2 embryos were cultured in CR1aa medium supplemented with 3 mg/ml FAF-BSA and then in CR1aa containing 10% FBS from embryonic day 4 until day 8. In the 10% hES-BM treatment group, day 2 embryos were cultured in CR1aa medium supplemented with 3 mg/ml FAF-BSA and then CR1aa containing 10% hES-BM from embryonic day 4 until day 8.

따라서, 미분화 인간배아줄기세포 유래 생리활성물질은 배반포기배 중 태아로 발생될 부위의 내부세포피로부터 무한 증식된 배아줄기세포의 배양 산물로 태아발생에 유용한 성장인자, 사이토카인, 아미노산 및 미지성분들이 다수 포함되어 있을 것으로 기대되어 이러한 성분들이 체외에서 생산된 소 단위발생란 및 체외수정란의 배반포기형성을, 총세포수와 내부세포피의 세포수 및 발생유용유전자 발현에 유의한 영향을 미치는 것으로 확인되어 소 수정란 배양 시 새로운 단백질 첨가제로서 이용 가능성을 확인하였음.

*이상의 내용은 국내특허 출원 (출원번호 10-2008-0138099) 및 특허 등록 (제 10-1010077) 하였고, Journal of Reproduction and Development 2011년 57권 346-354에 게재됨. 또한 관련 기술의 우수성을 평가받아 일본 The Society of Reproduction and Development 으로부터 2011 우수논문상을 수상함.



특 허 증

CERTIFICATE OF PATENT

특 허 제 10-1010077 호 (PATENT NUMBER)	출원번호 (APPLICATION NUMBER)	제 2008-0138099 호
	출원일 (FILING DATE, YY/MM/DD)	2008년 12월 31일
	등록일 (REGISTRATION DATE, YY/MM/DD)	2011년 01월 14일

발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)
미분화 인간배아줄기세포 유래 배양 조성물을 이용한 소 난자의 체외 배양 방법

특허권자 (PATENTEE)
등록사항란에 기재



발명자 (INVENTOR)
등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 의하여 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.

(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)

2011년 01월 14일



특 허 청
COMMISSIONER, THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE



연차료납부: 납부일은 실정등록일 이후 4년차부터 매년 01월 14일까지이며 등록원부로 권리관계를 확인하십시오.

—Original Article—

The Use of Embryonic Stem Cell Derived Bioactive Material as a New Protein Supplement for the *In Vitro* Culture of Bovine Embryos

Eun Young KIM¹⁾, Jun Beom LEE²⁾, Hyo Young PARK¹⁾, Chang Jin JEONG²⁾,
Key Zung RIU³⁾ and Se Pill PARK^{1,3)}

¹⁾Mirae Biotech/Jeju National University Stem Cell Research Center, Seoul 143-854, ²⁾Shin Woman's Hospital, Uijeongbu 480-848 and ³⁾Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

Abstract. Embryonic stem (ES) cells are expanded versions of the inner cell mass cells that compose the early mammalian blastocyst. Components derived from ES cells may contain various bioactive materials (BM) helpful for early preimplantation embryo growth. In this study, we examined the effect of human ES cell derived BM (hES-BM) on *in vitro* culture of bovine embryos. When bovine parthenogenetic day 2 embryos were cultured in 10% hES-BM, a significantly higher embryo development rate (44.3%) and increased cell numbers were observed relative to control medium containing 3 mg/ml BSA (19.5%; $P < 0.01$). Among the various concentrations (5, 10 and 15%) and days of treatment (2 or 4 days) tested, 10% hES-BM treatment for 4 days provided the best culture environment to support the growth of bovine embryos *in vitro* ($P < 0.05$). Little difference was observed between 10% hES-BM and 10% FBS treatment in the examined parthenogenetic or *in vitro* fertilized embryos, although the hES-BM group developed at a slightly better rate. However, the ICM cell numbers were significantly higher in the hES-BM group in irrespective of embryo origin ($P < 0.05$). In addition, the relative levels of pluripotency (Oct4, $\times 1.8$ fold; Nanog, $\times 3.3$ fold), embryogenesis (Stat3, $\times 2.8$ fold; FGF4, $\times 18.8$ fold; E-cad, $\times 2.0$ fold) and growth (Glut5, $\times 2.6$ fold) genes were significantly higher in the 10% hES-BM group than in the 10% FBS group ($P < 0.05$), while the levels of other genes (Bax, Bcl2, MnSOD and Connexin43) were not different. This is the first report examining the positive effects of hES-BM on bovine embryo development *in vitro*. Based on our results, we conclude that hES-BM can be used as a new protein supplement for bovine preimplantation embryo development.

Key words: Bovine embryo, Differential staining, Human ES cell derived BM (hES-BM), Real time RT-PCR
(J. Reprod. Dev. 57: 346–354, 2011)

Successful preimplantation embryo development *in vitro* requires a culture environment comparable to *in vivo* conditions; specifically, this entails using an effective basic culture medium, various protein supplements and a coculture system with a somatic cell feeder layer [1, 2]. Almost all media used for bovine embryo development *in vitro* contain bovine serum albumin (BSA) and fetal bovine serum (FBS) as a source of protein, and recently, serum replacement (SR) or a synthetic serum substitute have also been used [3, 4]. Serum provides energy substrates, amino acids, vitamins, growth factors and heavy metal chelators [5]. Serum also has a biphasic effect, inhibiting early cleavage divisions and accelerating the development of morula and blastocysts [6]. However, the undefined mixture in serum may result in highly variable developmental rates *in vitro* and affect the high incidence of apoptosis observed in *in vitro* produced embryos. Moreover, the presence of serum over a prolonged period of time has been shown to alter the expression patterns of various genes [7, 8]. Nevertheless, while serum is an important protein supplement for bovine embryo development *in vitro*, a finding for the better protein supplement is

needed to support *in vitro* culture and provide conditions more similar to the *in vivo* environment.

Embryonic stem (ES) cells are expanded from the inner cell mass (ICM) cells that compose the early mammalian blastocyst. These cells are pluripotent, retain long-term proliferative potential in an undifferentiated state and can differentiate into derivatives of all three embryonic germ layers under *in vitro* differentiation culture conditions or in an *in vivo* environment [9]. Thus, bioactive material derived from robust, young ES cells (ES cell derived bioactive material, ES-BM) may supply more reliable and supportive factors for the growth of preimplantation embryonic cells. However, stable bovine embryonic stem cells have yet to be established.

Production of reconstructed embryos by somatic cell nuclear transfer depends on successful oocyte activation and a culture environment enhancing their developmental potential. Our team [10] reported a surviving clone of an endangered Black Cattle species native to Jeju Island last year, and thus we have an stable activation technique capable of producing a reconstructed embryo (>80%).

To find better culture conditions for reconstructed embryos, in this study, as a new trial, we tested the effect of ES-BM prepared from an undifferentiated hES cell line (JNU-hES-01, established at Jeju National University) on the development of bovine parthenogenetic embryos *in vitro*. Bovine parthenogenetic embryos were grown either in the presence of hES-BM, BSA or FBS, and the embryo development rate, total cell number and ICM cell number

Received: August 1, 2010

Accepted: December 23, 2010

Published online in J-STAGE: January 28, 2011

©2011 by the Society for Reproduction and Development

Correspondence: EY Kim (e-mail: jlokey@paran.com) and SP Park (e-mail: sppark@jejunu.ac.kr)



**CERTIFICATE
OF
COMMENDATION**

The Society of Reproduction and Development has approved

Eun Young KIM

to be the awardee of “Journal of Reproduction and Development
Outstanding Paper Award” in 2011 for his exceptionally
outstanding paper entitled

**“The Use of Embryonic Stem Cell Derived
Bioactive Material as a New Protein Supplement
for the *In Vitro* Culture of Bovine Embryos”**

April 1st, 2012



Hiroshi Nagashima
JRD Editor-in-Chief



Kei-ichiro Maeda
SRD Chief Director

2. 체외수정 기술 개발을 통한 우수 수정란 생산

; 체외수정란 생산 및 우수수정란 발생 효율은 수정 시 정자의 활력과 수정능에 의해 영향을 많이 받는다. i) 새로운 정자 처리법을 개발하여 동결정액 정자의 활력을 오래 유지시키고 ii) 수정능획득을 높이기 위해 GAG 처리하여 그 효과를 검토하였음.

가. 2단계 스웜업(swim-up) 방법을 이용한 가축의 체외수정능 향상방법 (기술발명)

Method for treatment of spermatozoa in external fertilization of domestic animal

(1) 요약

본 발명은 정자 동결에 사용되는 정액 희석액을 체외수정 시 정자처리용 용액으로 변용하여 사용함으로써 정자의 활력이 오랫동안 유지되면서 다수의 정자를 회수할 수 있는 새로운 정자처리방법 개발에 대한 내용임. 본 연구에서 개발한 희석액을 이용한 2단계 스웜업 방법으로 처리된 정자는 활력이 5시간 이상 유지되었으며, 이를 체외수정에 이용하였을 때 체외수정율, 발달율, 세포수 조사, 전핵 형성율에서 기존에 주로 사용하고 있는 Percoll 방법보다 유의하게 증가되는 것을 확인하였던 바, 본 연구에서 개발된 희석액을 이용한 2단계 스웜업 방법은 새로운 정자처리법으로서 소 난자의 체외수정에 효율적으로 이용될 수 있다고 사료됨.

(2) 발명이 속하는 기술 분야 및 그 분야의 종래 기술

본 발명은 수정능 개선에 관한 것으로 기존에 정자처리법으로 사용되고 있는 i) 정자처리용 배양액(Bracket Oliphant; BO)을 이용한 swim-up 방법이나 ii) percoll 농도 구배를 이용한 원심분리 방법 등이 갖고 있는 단점을 보완하는 정자처리의 새로운 방법임.

배양액을 이용한 swim-up 방법에 의한 정자처리는 활력이 좋은 정자의 운동성을 이용하여 펠렛화된 정자군집에 정자처리용 배양액을 넣은 후 30분이상 정체된 상태로 배양하였을 때 부유되어 나온 정자를 회수하는 원리인데, 이때의 결과는 원래의 정액의 질에 따라서 회수된 정자의 질에 차이가 나타나게 된다. 또한 부유시간이 길어질수록 사멸정자의 수가 늘어나는 단점이 있음. 따라서 질 좋은 정자가 많이 들어 있는 정액의 경우 부유할 수 있는 정자 수가 많아 많은 양이 회수되지만 질이 나쁜 정자가 많이 섞여 있는 샘플의 경우 회수량이 현저히 떨어짐. 그러나 정자의 상태가 좋지 않은 샘플의 경우라도 아주 적은 양이라도 정자를 회수할 수 있는 가장 고전적인 정자처리 방법이다. 이때, 배양되는 과정 중 배양액의 성분이 정자의 질 개선에 영향을 미칠 수 있음.

Percoll을 이용한 정자 처리는 콜로이드 성질을 가진 농도 구배의 밀도 차이를 이용하여 정자를 분리하는 방법임. 정액을 Percoll로 분리하면 정액 내에 존재하는 사멸정자의 제거와 세포 파편 및 세균을 분리 하는 장점이 있어 사람의 정액뿐만 아니라 가축 산업에도 많이 이용되었음.

그 예로써 사람의 정자를 불연속 Percoll 원심분리하여 활동성정자와 X 정자를 94% 이상 회수하였다는 보고(Iizuka 등, 1987)와 분리된 정자를 체외수정하였을 경우 성숙율이 높았다는 보고가 있음(Grant 등, 1994). 돼지 정액을 Percoll로 분리하면 정액 내에 존재하는 정액 성분, 사멸정자, 체세포, 세포단면 및 백혈구 등의 이물질이 제거되며, 정자의 운동성이 증가하고 체외수정시 수정율이 증가한다는 보고가 있음(Shim 등, 2001). 또한 Park 등(2008)은 Percoll이 돼지 정액 내의 세균 분리에 효과적이라고 보고한 바 있고, 미니돼지 정액을 분리할 때 65% 이상의 Percoll에서는 세균이 완전히 제거된다고 보고하였음. 하지만 Percoll을 정자 분리에 사용할 경우, 독소에 의한 오염이나 정자 형태 변화를 유발하기 때문에 수정에 좋지 못한 영향을 미칠 수 있다는 보고들이 있음 (Andersen과 Grinstead, 1997; De Vos 등, 1997; Scott와 Smith, 1997; Strehler 등, 1998).

Percoll방법에 의한 정자 처리는 생존 정자 수가 많을 때 유리함. 사멸정자수가 많으면 Percoll층에 모두 걸리게 되므로 살아있는 정자의 이동 진로가 막히게 되어 원심을 하더라도 다수의 정자가 회수되지 못하는 단점이 있고 처리 과정 중에는 활력이 떨어지지 않으나, 처리 후 사멸정자 수가 급격하게 증가되는 양상을 나타내므로 정자의 질이 나쁜 경우에는 권장하지 않는 방법임. 또한 Percoll양이나, 농도, 처리시간을 조절하여 이용할 수 있으나, Percoll의 잔존물이 완벽히 제거되지 않는 단점이 있어 독성 요소는 배제할 수가 없음.

본 연구에서 사용한 정자 처리용 용액은 정액 동결에 사용되는 정액 희석액을 증류수로 희석하여 (1:4~1:3)이용하였음. 이때의 삼투압은 대략 800 ~ 950mOsm. 정액 희석액에는 TRIS, citric acid, sugar, buffers, glycerol 과 항생제 (Tylosin, Gentamycin, Spectinomycin, Lincomycin) 가 들어 있음. 그 종류로는 Triladyl® (Minitüb, Tiefenbach, Germany), Bioxell® (IMV, Aigle, France) Andromed® (Minitüb, Tiefenbach, Germany) 등이 있음. 이들 제품은 정자의 운동성, 전진운동, 생존성 등에 약간씩 차이를 나타내고 있으며 특히 Triladyl은 1974년부터 소 정액 동결에 가장 보편하게 이용되고 있는 제품임.

본 실험의 아이디어는 반영구적으로 또는 장기간 정자를 동결 보존하는 데에 이용되고 있는 최적의 희석액 조성이 아마도 용해 후 정자의 생존능 및 운동성을 연장시키는 데에 기여할 것이라는 것에 착안하여 사용 여부를 검토하였고, 실제 유효하였음을 알 수 있음. 정자 활력이 기존 방법과 비교하여 유의하게 개선되었고 오랫동안 유지되었으며 체외수정능에서도 유의하게 좋은 배발달율을 나타냄.

분석을 위해 1) 컴퓨터 정액분석기 (CASA) 를 이용한 정자 처리 후 5시간 까지 운동성 분석 결과 2) 체외수정율 및 체외발달율 3) 세포수 조사 4) 전핵형성을 등을 조사하였음.

(3) 실험방법

(가) 정자 처리

I. 정액 희석액을 이용하는 2단계 스웜업 (swim-up) 방법

- ① 소 동결 정액 스트로를 용해 (상온에서 10초, 38℃에서 20초간 침지하여)
 - ② 용해된 정액을 2 ml 정액 희석액이 들어있는 튜브에 조심스럽게 주입
 - ③ 2000 rpm에서 1분간 원심하고 상층액 제거
--- 동결액내에 들어 있는 난황을 제거하는 단계
 - ④ 펠렛화된 정액 덩어리가 변형되지 않게 1ml 희석액을 조심스럽게 상층에 주입
 - ⑤ 15분간 배양하여 스웜업
 - ⑥ SP-TL 정자 처리용 배양액을 1ml을 추가로 넣고 5분간 더 배양
--- 희석액에서 정자처리용 배양액으로 바꾸는 적응 과정
 - ⑦ 2000 rpm에서 1분간 원심
 - ⑧ 상층액 제거
 - ⑨ SP-TL배양액을 넣어 20 ~ 30분간 배양하여 스웜업
 - ⑩ 상층의 정자부유액을 회수하여 농도 조사
- * 총 정자 처리 시간은 1시간 정도 소요되며 이 과정에서 최소 20분에서 25분 정도 정자가 희석액에 노출됨.

II. Percoll 처리 방법

- ① 소 동결 정액 스트로를 용해
 - ② 용해된 정액을 90%와 45% Percoll 각 1ml씩 들어 있는 튜브에 조심스럽게 주입
 - ③ 2000 rpm에서 15분간 원심
 - ④ 하단에 모인 정액을 제외한 상층액을 모두 제거
 - ⑤ 정자 농도 조사
- * 총 정자 처리 시간은 20 분 정도 소요됨.

(나) 정액 분석기를 이용한 정자의 운동성 조사

각 처리군에서 회수된 정자는 처리 후 즉시와 5시간까지 1시간 간격으로 정자의 상태를 컴퓨터 정액분석기의 CASA Program(SAIS ALPHA version 1.2, Medicalsupply, Co, Korea)을 사용하여 분석하였음. 비교 항목은 운동성(Total motility), 곡선 운동속도 (Curvilinear Velocity, VCL), 직선 운동 속도(Straight Line Velocity, VSL), 평균 진행 속도(Average Path Velocity, VAP) 등 4가지를 3회 반복 측정하였음.

(다) 체외수정

도축장에서 도축된 소의 난소에서 10 ml 주사기에 18G 주사침을 이용하여 직경 3~6 mm 난포로부터 난구세포-난자 복합체 (cumulus-oocyte complexes) 를 채취함. 채취된 난자는 실체 현미경 하에서 난구세포가 치밀하게 부착되고 세포질이 균일한 난자만을 선별하여 체외성숙에 공시함. 회수된 난구세포-난자 복합체는 1 mg/ml 소혈청 알부민이 들어있는 TL-HEPES 버퍼로 3회이상 충분히 세척하고 10% 우태아혈청 (FBS, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 와

0.2mM 피루브산 나트륨, 10 μ g/ml 난포자극 호르몬, 1 μ g/ml 에스트라디올, 25 μ g/ml 젠타마이신이 들어간 TCM-199 (Gibco-BRL) 체외성숙용 배양액에 넣어 38.8 $^{\circ}$ C 온도와 5% 이산화탄소 조건의 배양기내에서 22~24시간 동안 성숙 배양함.

체외수정은 0.6% BSA, 2 μ g/ml Heparin, 4% PHE (0.372 mg/ml penicillamine, 0.11 mg/ml hypotaurine, 0.018 mg/ml epinephrine)가 함유된 수정용 배양액 (Fertilization TALP) 을 사용함. Mineral oil이 도포된 50 μ l 수정용 소적에 난구세포를 제거하지 않은 성숙된 난자 10개씩을 침적, 각 소적당 1 \times 10⁶개씩의 정자를 첨가 후 5% CO₂, 39 $^{\circ}$ C 배양액에 48시간 배양함. 수정란은 난구세포를 완전히 제거한 후 0.3% fatty acid free-BSA (Sigma)가 함유된 CR1aa 배양액 50 μ l에 넣어 2일간 배양하였고, 그 후 10% FBS가 함유된 50 μ l 소적에 옮긴 후 다시 4일간 배양하여 배양 4일(8세포), 6일 (상실배), 8일 (배반포배) 제 발달율을 조사함.

(라) 전핵 형성 유무 조사

Percoll처리군과 희석액 처리군의 정자로 체외수정 후 18 ~ 20 시간째에 전핵형성 특성을 비교함. 난자의 투명대에 붙어있는 난구세포와 정자를 제거하고 충분히 세척한 후에 슬라이드 글라스에 올려 놓고 커버슬립으로 덮은 다음 10 μ g/ml 비스벤자마이드 (Hoechst 33258)가 포함된 글리세롤 용액을 넣어 다음날까지 반응시키고 형광 현미경의 blue 필터 (excitation field-350 nm, emission field-461 nm) 하에서 관찰하여 전핵 유무와 다정자 침입 여부를 조사함.

(마) 배반포기배의 세포수 조사

Percoll처리군과 희석액 처리군의 정자로 체외수정 후 체외 배양 8일째 발달된 배반포기배의 질적인 차이를 비교하기 위해 영양배엽세포와 내부세포피 수를 동시에 검토할 수 있는 이중 염색을 실시함. 이중 염색은 2단계로 실시됨. 각 군의 배반포기배는 1% triton X-100과 100 μ g/ml 프로피디움 이오다이드 화합물이 포함된 TL-HEPES 용액에서 30초간 처리하고 (1단계) 25 μ g/ml 비스벤자마이드 (Hoechst 33258)가 포함된 TL-HEPES 용액에 넣어 4 $^{\circ}$ C에서 다음날까지 반응시킴 (2단계). 염색된 배반포기배는 글리세롤에 넣어 여분의 형광물질을 제거한 다음 슬라이드 글라스에 올려 놓고 커버슬립으로 덮어 형광 현미경의 blue 필터 (excitation field-350 nm, emission field-461 nm) 하에서 관찰하여 세포 수를 셈. 결과는 영양배엽세포가 붉게 염색되고 내부세포피는 푸르게 염색되어 염색된 세포수를 각각 계수하여 조사함.

(4) 결과

(가) 정자 처리 후 운동성 조사

표 16과 표 17에 나타난 바와 같이 희석액을 이용한 2단계 스윙업 방법 처리군의 정액은 처리 후 5시간 쯤에도 상당수의 정자가 생존능을 보유하는 것으로 확인된 반면, 대조군인 Percoll 처리군의 정자는 처리 후 급격하게 사멸정자가 늘어나는 양상을 나타냈으며 (그림 12), 곡선운동속도, 직선운동속도, 평균진행속도에 뚜렷한 차이가 나타남을 알 수 있었음.

표 16. 희석액을 이용한 2단계 스윙업 방법으로 정자 처리 후 정액의 운동성 조사

처리 후 시간	0	1	2	3	4	5
Total Motility	75.3 %	73.4%	72.7%	69.7%	60.9%	58.2%
VCL	32.9	29.6	31.7	31.1	24.4	27.1
VSL	12.5	13.1	15.5	13.2	11.3	11.0
VAP	18.0	17.3	20.8	19.7	16.1	15.0

표 17. Percoll을 이용한 정자 처리 후 정액의 운동성 조사

처리 후 시간	0	1	2	3	4	5
Total Motility	72.1 %	20.3%	10.8%	5.5%	5.7%	6.3%
VCL	31.5	29.6	21.1	15.5	14.4	11.1
VSL	11.6	10.4	10.5	10.2	9.3	9.1
VAP	17.0	15.6	11.2	10.0	10.4	10.7

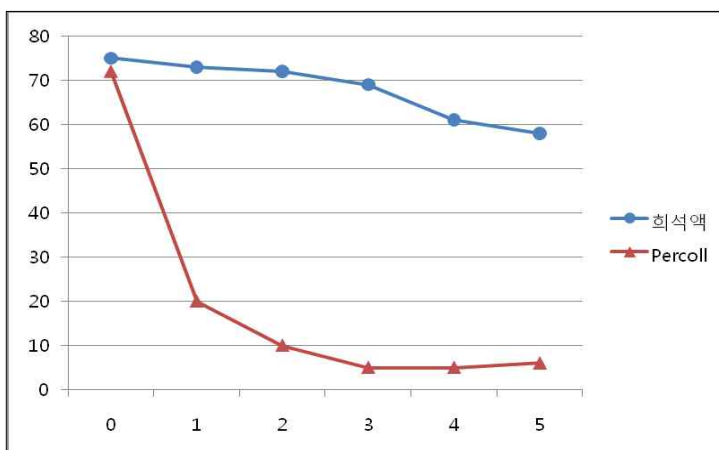


그림 12. 희석액을 이용한 2단계 스윙업 정자처리와 Percoll처리 후 정자의 운동성 조사

(나) 체외수정을 및 체외발달을 비교

두 가지 방법으로 처리된 정자로 체외수정을 실시하였을 때, 대조군인 Percoll처리군의 수정율은 70.0%인 반면 희석액을 이용한 2단계 스웍업 처리군은 84.3%를 나타내어 유의한 차이를 알 수 있었고($p < 0.05$), 배양 6일째 상실배 이상 발달, 그리고 배양 8일째 배반포기배 이상 발달에서도 유의한 차이를 나타내어 ($p < 0.05$) 희석액을 이용한 2단계 스웍업에 의한 새로운 정자처리방법이 배발달에도 유효함을 알 수 있음 (표 18 참조).

표 18. 정자처리방법에 따른 체외수정율 및 체외발달율 비교

정자처리방법	수정율 (%) [*]	체외발달율(%)*		
		4일 ≥8세포기	6일 ≥상실배	8일 ≥배반포기배
Percoll	98/140 (70.0) ^a	57 (58.2)	31 (31.6) ^a	25 (25.5) ^a
희석액	118/140 (84.3) ^b	74 (62.7)	50 (42.4) ^b	50 (42.4) ^b

* $P < 0.05$

(다) 세포수 조사에 의한 결과 비교

체외수정 및 체외배양으로 생산된 두 처리군의 배반포기배를 이중염색을 통하여 염색을 실시하고 총 세포수, 내부세포괴수, 내부세포괴 비율을 조사함. 그 결과 총 세포수가 대조군인 Percoll 처리군에서 98.5 ± 17.8 인 반면, 희석액을 이용한 2단계 스웍업 처리군은 168.7 ± 13.7 로 나타나 유의한 차이를 확인하였으며, 내부세포괴수 또한 11.5 ± 10.7 , 36.1 ± 12.7 로 각각 나타나 희석액을 이용한 2단계 스웍업 처리군의 세포수가 Percoll 처리군 보다 충실함을 알 수 있음 ($p < 0.05$) (표 19 참조). 또한 이러한 차이는 그림 13-14에서 확인할 수 있음.

표 19. 정자처리방법에 따라 체외 발달된 배반포기배의 세포수 조사

정자처리방법	배반포기배 발달율(%)*	총 세포수*	내부세포괴수*	내부세포괴비율 (%)
Percoll	25 (25.5) ^a	98.5 ± 17.8^a	11.5 ± 10.7^a	11.67%
희석액	50 (42.4) ^b	168.7 ± 13.7^b	36.1 ± 12.7^b	21.40%

* $p < 0.05$

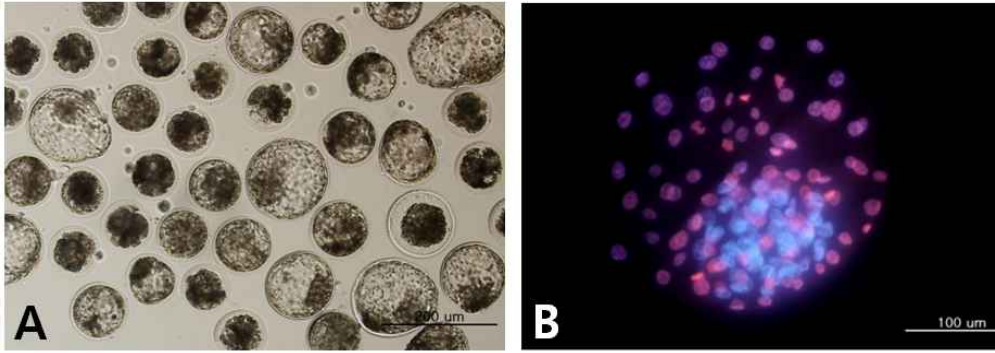


그림 13. Percoll방법으로 처리된 정자로 체외수정된 소 난자의 체외발달. A. 수정 후 8일째 배아 B. 이중염색된 배반포기 배

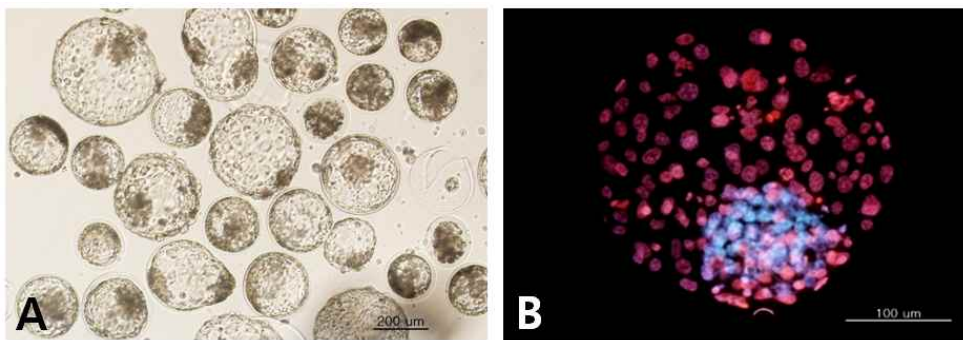


그림 14. 희석액을 이용한 2단계 스윙업 방법으로 처리된 정자로 체외수정된 소 난자의 체외발달. A. 수정 후 8일째 배아 B. 이중염색된 배반포기 배

(라) 전핵형성을 비교

또한 두 정자처리 방법에 의해 처리된 정자로 수정을 실시했을 때 체외수정 후 전핵 형성에 미치는 영향을 조사함. 표 20에 나타난 바와 같이 희석액을 이용한 2단계 스윙업 방법에 의한 정자처리가 대조군인 Percoll 방법과 비교하여 전핵 형성율이 (그림 15 참조) 높은 것을 알 수 있음. 이는 체외 발달율의 유의한 차이를 가져올 수 있는 수정능 차이의 근거를 나타내는 결과임.

표 20. 정자처리방법이 체외 수정 후 전핵형성율에 미치는 영향

정자처리방법	난자수	전핵 형성율 (%) [*]	다정자침입율 (%)	미수정율
Percoll	60	38/60 (63.3) ^a	7 (11.7)	15 (25.0)
희석액	60	47/60 (78.3) ^b	4 (6.7)	9 (15.0)

^{*}p<0.05

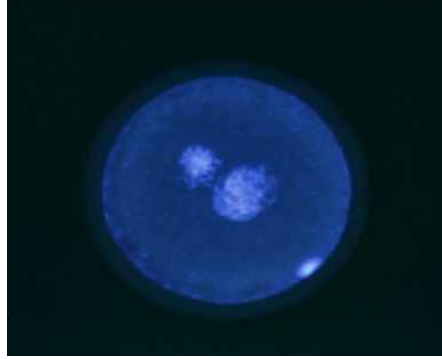


그림 15. 희석액을 이용한 2단계 스윙업 방법으로 처리된 정자로 수정 후 18시간째에 염색된 수정란의 진행 형성 상태 (자성 진행과 응성 진행이 형성된 후 모이는 형태)

*따라서, 정액희석액을 이용한 2단계 스윙업 방법은 새로운 정자처리법으로서 소 난자의 체외수정에 효율적으로 이용될 수 있다고 사료됨.

**이상의 내용은 국내특허 출원 (출원번호 2011-0018668) 및 등록 (제10-1064415호) 하였음.



특 허 증

CERTIFICATE OF PATENT

특 허 제 10-1064415 호 (PATENT NUMBER)	출원번호 (APPLICATION NUMBER)	제 2011-0018668 호
	출원일 (FILING DATE:YY/MM/DD)	2011년 03월 02일
	등록일 (REGISTRATION DATE:YY/MM/DD)	2011년 09월 05일

발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)
가축의 체외 수정용 정자 처리방법

특허권자 (PATENTEE)
등록사항란에 기재

발명자 (INVENTOR)
등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 의하여 특허등록원부에 등록
되었음을 증명합니다.

(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN
INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)

2011년 09월 05일



특 허 청

COMMISSIONER, THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE



연차등록료 납부일은 설정등록일 이후 4년차부터 매년 09월 05일까지이며 등록원부로 권리관계를 확인바랍니다.

나. GAG 처리된 정자가 소 난자의 체외발달에 미치는 영향

Effect of Glycosaminoglycan Treated Sperm on the *In Vitro* Developmental Capacity of Bovine Embryos

Glycosaminoglycan (GAG) 는 세포외기질 (extracellular matrix, ECM) 의 필수 구성 성분으로 cell recognition, cellular adhesion, growth regulation에 관여하고, 자성 생식기액 내에 존재하여 정자의 수정능획득을 촉진하는 물질임. 본 실험에서는 수정전 정자에 GAG 처리가 수정능 획득 및 수정율과 체외발달능에 미치는 영향을 조사하였음.

Abstract

The glycosaminoglycan (GAG) presents in female reproductive tract fluid as promoting factor of sperm capacitation. When the same concentrations (10 mg/ml) of four different GAGs (Chondroitin sulfate, CS; Dermatan sulfate, DS; Hyaluronic acid, HA; Heparin, HP) were exposed to bovine sperm for 5 h, the values of total motility, VSL and VCL were higher in HP or HA treatment group than in control and other GAG treatment groups (CS or DS). Also, HP or HA treatment effects on the increase of the rates of capacitated- and acrosome reacted sperm compared to other treatment groups. In addition, HP or HA exposed sperm for 1 h before IVF improved significantly the fertilizing ability including of 2 PN formation rates and cleavage rates at day 2, and it subsequently effects on in vitro embryo development rate and embryo quality plus ICM and total cell number at day 8 after IVF ($P<0.05$). In real-time PCR analysis, the relative mRNA expression levels of pluripotency (Oct4), cell growth(Glut5) and anti-apoptosis (Baxinhibitor) genes were significantly higher in HA or HP treatment groups than in control or other treatment groups, while the pro-apoptotic gene Caspase-3 expression was significantly low in all GAG treatment groups ($P<0.05$). These results demonstrated that HP or HA exposed bovine sperm have positive effects on *in vitro* fertilizing ability, *in vitro* embryo developmental potential and their gene expression.

Key words; bovine, glycosaminoglycan, capacitation, embryo development, gene expression

본 실험에서는 4개의 서로 다른 GAG들 (Chondroitin sulfate, CS; Dermatan sulfate, DS; Hyaluronic acid, HA; Heparin, HP)을 10ug/ml 같은 농도로 소 정자에 5시간 동안 노출시켰을 때, HP 나 HA를 처리한 군에서 정자의 total motility, VSL 그리고 VCL 수치가 대조군이나 다른 GAG 처리군 (DS 혹은 CS) 에 비하여 높게 나타났음. 또한 HP 혹은 HA 처리군의 정자 수정능획득과 침체반응율이 다른 처리군에 비하여 증가하였음. 게다가 체외수정 전 1시간 동안 HP 혹은 HA에 노출된 정자는 유의하게 높은 수정 능력을 나타내어, 진행형성율과 수정 후 2일 째 난할율, 그 이후 배반포 발달율을 증가시키는 효과를 보였으며 그와 더불어 내부세포괴를 포함한 전체적인 세포수 증가를 유도하였음 ($P<0.05$). 그리고 HP와 HA를 처리한 군에서 발달된 배아를 real-time PCR을 시행하였던 바, pluripotency 유전자 Oct4, cell growth 유

전자 Glut 5 그리고 anti-apoptosis 유전자 Bax inhibitor 발현이 대조군이나 다른 GAG 처리군에 비하여 유의하게 높게 발현되며, pro-apoptotic 유전자인 caspase-3는 GAG를 처리한 모든 군에서 현저히 낮음을 확인하였음 ($P<0.05$). 본 연구에서 수정 전 소 정자에 HP 또는 HA처리가 체외 수정능력과 난자의 체외 발달능을 높이고 유전자 발현에 효과적으로 작용할 수 있음을 나타냄.

Table 21. Pronuclear status of bovine zygotes at 18 h after IVF using GAG treated sperm

Treatment*	No. of examined	Fertilization (%)				Total
		2 PN (%)**	polyspermy		SUM	
			Multi PN	2PN+ sperm		
Control	64	38 (59.4) ^a	6 (9.4)	5 (7.8)	11 (17.2)	49 (76.6)
DS	64	37 (57.8) ^a	8 (12.5)	2 (3.1)	10 (15.6)	47 (73.4)
CS	64	40 (62.5) ^a	3 (4.7)	2 (3.1)	5 (7.8)	45 (70.3)
HA	64	46 (71.9) ^{ab}	5 (7.8)	-	5 (7.8)	51 (79.7)
HP	64	52 (81.3) ^b	4 (6.3)	-	4 (6.3)	56 (87.6)

*DS: dermatan sulphate, CS: chondroitin sulphate, HA: hyaluronic acid, and HP: heparin

** ($p<0.05$)^{a-b}

수정 전 정자에 GAG 1시간 처리 후 수정하여 전핵 형성과 다정자침입을 조사하였던 바, HP 처리군의 2 PN 형성율이 대조군이나 다른 GAG 처리군의 결과에 비해 유의하게 높은 것을 확인하였음 (표 21 참조).

Table 22. Effect of GAG treated sperm on *in vitro* developmental capacity of bovine embryos

Treatment*	No. of examined	No.(%)** of embryos developed		Cell Number Total (ICM) M±SEM**	ICM Proportion %
		Day 2 ≥ 2-4 cell	Day 8 ≥ blastocyst		
Control	109	82 (75.2) ^a	28 (34.1) ^a	116.6±13.3 ^a (31.2±12.9) ^a	26.8
DS	110	81 (73.6) ^a	29 (35.8) ^a	126.2±16.2 ^{ab} (32.4±8.1) ^a	25.7
CS	110	82 (74.5) ^a	36 (43.9) ^{ab}	128.2±14.6 ^{ab} (37.5±11.3) ^{ab}	29.3
HA	110	90 (81.8) ^{ab}	44 (53.0) ^b	130.0±18.3 ^{ab} (40.0±10.8) ^{ab}	30.8
HP	110	95 (87.3) ^b	46 (54.1) ^b	137.6±14.6 ^b (45.6±13.3) ^b	33.1

DS: dermatan sulphate, CS: chondroitin sulphate, HA: hyaluronic acid, and HP: heparin

** (p<0.05) ^{a-b}

수정 전 정자에 GAG 1시간 처리 후 수정하여 체외수정을 및 발달율을 확인하였던 바, 수정율은 HP 처리군의 결과가 전핵 형성의 결과와 마찬가지로 대조군이나 다른 GAG 처리군에 비해 유의하게 높았으며, 체외발달율은 HA 와 HP 처리군에서 유의하게 높은 발달율을 나타내었음. 또한 배양 8일 째 획득된 대조군 및 각 처리군의 배반포기배의 총 세포수 및 내부세포수를 조사하였던 바, HP 처리군의 세포수 결과가 유의하게 차이나는 것을 확인하였으며 총세포 수 대비 내부세포비 비율도 가장 높은 것으로 확인되어, GAG 처리가 체외수정란 생산에 효과가 있으며, 특히 HA 및 HP 처리가 효과 있음을 확인하였음 (표 22 참조).

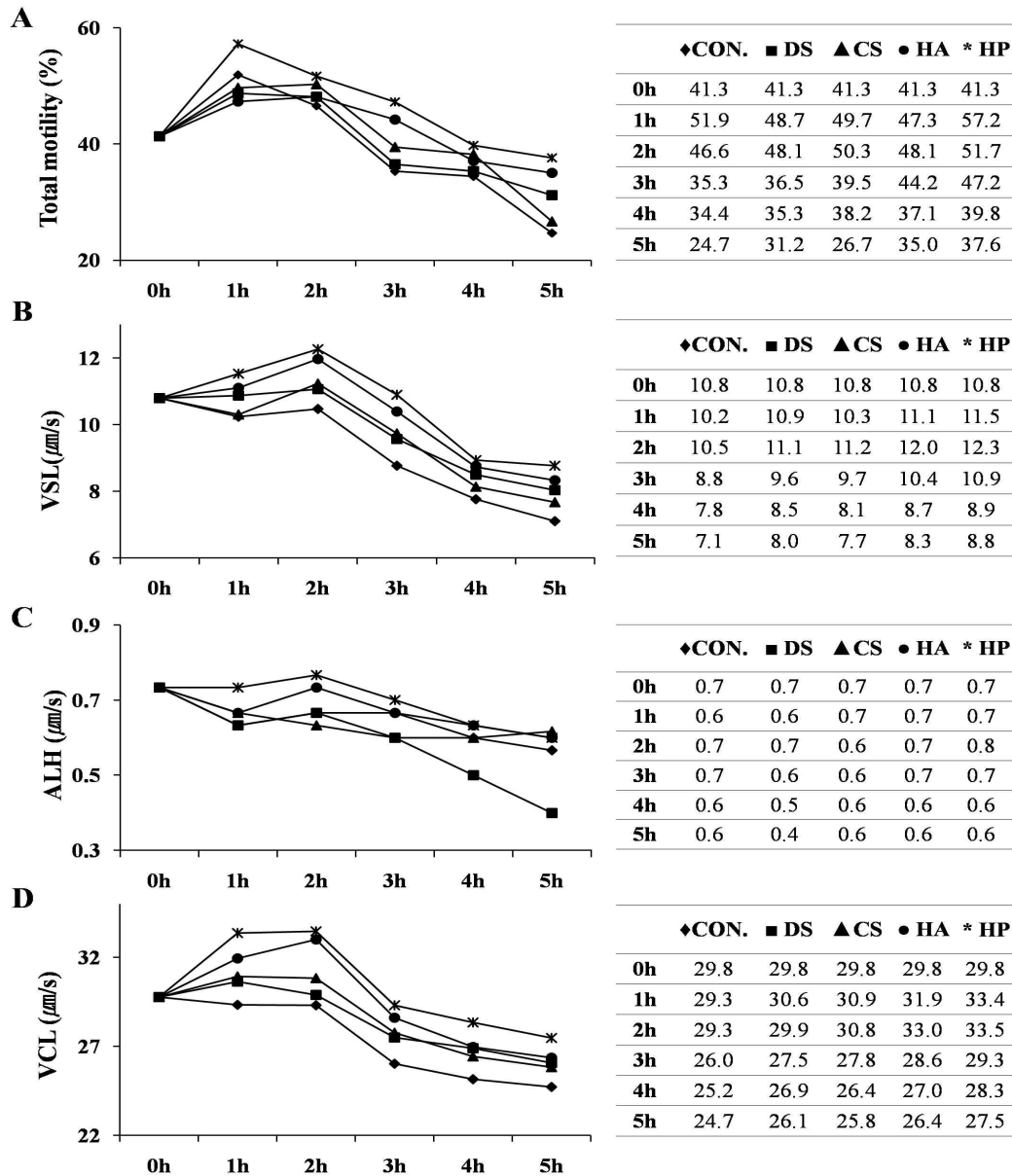


Fig. 16. The effect of various GAGs on the bovine sperm motility. Sperm was incubated in the absence or presence of each GAGs (DS; dermatan sulphate, CS; chondroitin sulphate, HA: hyaluronic acid or HP; heparin) for 5 hours, 38.8 °C, in 5% CO₂ respectively. Every hour, total motility (A), VSL (straight-line velocity, B), ALH (amplitude of lateral head displacement, C) and VCL (curvilinear velocity, D) were assessed using a computer-assisted sperm motility analysis system, respectively.

정자에 GAG를 처리하여 5시간동안의 활력을 조사하였던 바, 무처리군에 비해 처리군 정자의 활력이 좋았고, GAG 처리군 간 비교에서는 HP>HA>DS=CS 특성을 나타내었음 (그림 16 참조).

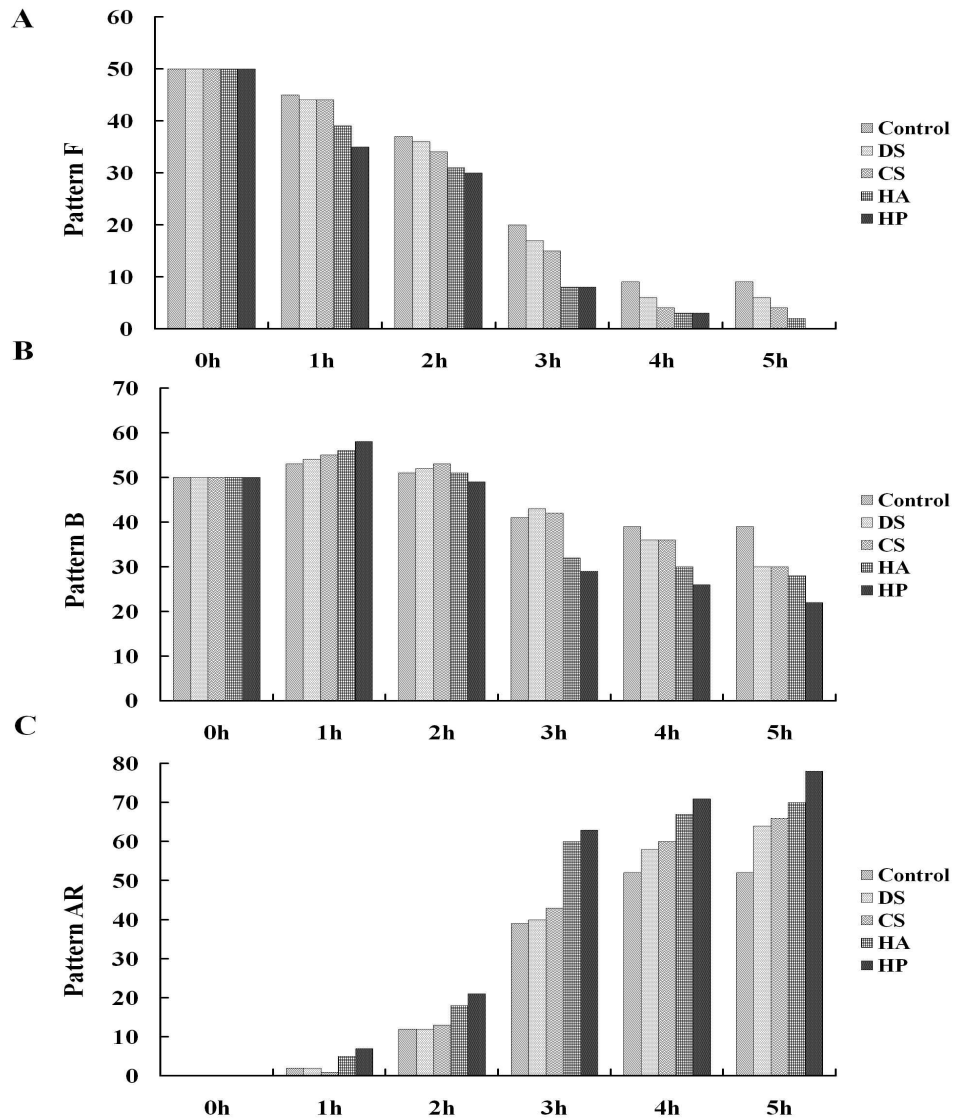


Fig. 17. Chlortetracycline (CTC) fluorescence pattern of various GAGs treated bovine sperm. The sperm was incubated in the absence or presence of each GAGs (DS; dermatan sulphate, CS; chondroitin sulphate, HA: hyaluronic acid or HP; heparin) for 5 hours and the binding sites were labelled using PSA-FITC. Every hour, the number of sperm exhibiting CTC pattern F (A, uncapacitated sperm), pattern B (B, capacitating and capacitated sperm) and pattern AR (C, acrosome-reacted sperm) was determined, respectively. Data are shown as mean \pm S.E.M. ($p < 0.05$).

소 정자에 GAG를 처리하여 5시간 동안의 수정능 획득 정도를 조사하였던 바, 처리 2시간 이후 무처리군에 비해 처리군 정자의 수정능 획득율에 차이가 있었으며, 두부의 침체반응도 유의하게 높아져 GAG 처리군 간 비교에서는 HP>HA>DS>CS 특성을 나타내었음 (그림 17참조). 5시간 짜 HP 처리군의 정자는 80% 정도가 수정능 획득된 침체반응을 보이는 것으로 확인됨.

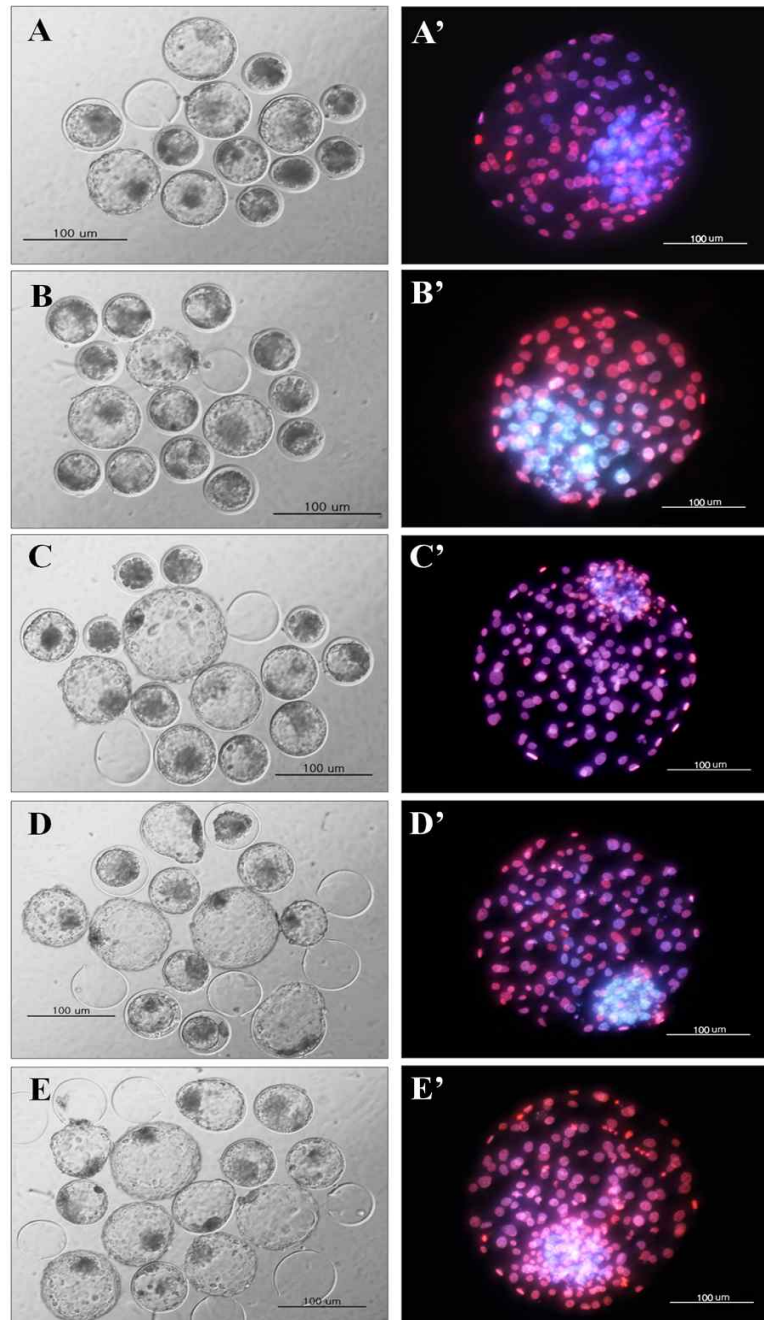


Fig. 18. Developmental morphology of bovine day 8 blastocysts produced in vitro in various GAGs treatment groups. For in vitro fertilization, sperm was incubated in the absence or presence of each GAGs (DS; dermatan sulphate, CS; chondroitin sulphate, HA: hyaluronic acid or HP; heparin) for 1 h before insemination. The cell number was examined by differential labelling of various GAGs treatment groups, respectively. No treatment: A-A'. DS: B-B'. CS: C-C'. HA: D-D'. HP: E-E'.

대조군이나 CS DS 처리군에 비해 HA와 HP 처리군의 8일 째 배반포기배의 발달 상태가 더 양호한 것을 확인할 수 있었으며, 이중 염색을 통한 세포수 조사에 의해 세포수 증가를 확인할 수 있었음 (그림 18 참조).

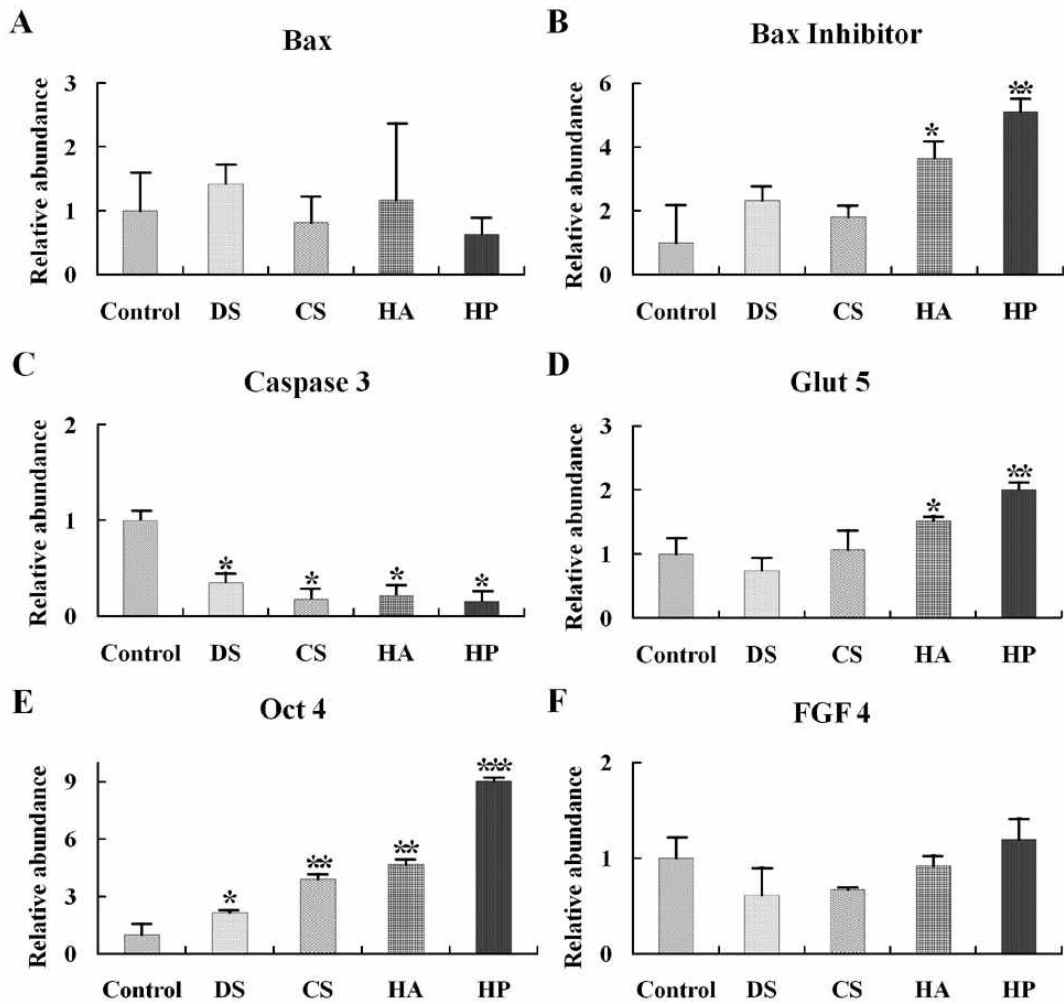


Fig. 19. Relative mRNA expression of candidate genes of bovine day 8 blastocysts produced in various GAGs treatment groups was examined in apoptosis (Bax, Bax inhibitor and Caspase-3), Growth (Glut-5), pluripotency (Oct4) and implantation (bFGF). The bars with different superscripts within a panel differ significantly from each other ($P < .05$).

대조군과 GAG 각 처리군의 체외 발달된 배반포기배의 유전자 발현을 조사하였던 바, anti-apoptotic 유전자인 bax-inhibitor와 caspase-3가 처리군에서 유의하게 낮게 나타났으며, 성장과 관련된 Glut-5 발현은 HA 와 HP 처리군에서 높게 나타났고 만능성 유전자 Oct-4발현이 처리군에서 유의하게 높게 나타나 체외 발달 양상과 유사하였음 (그림 19 참조)

따라서, 수정 전 정자의 GAG 처리는 정자 활력 개선과 운동성 증가를 유발하고, 수정능 획득 및 침체반응을 증가시켜, 수정 후 2PN 형성을 증가, 난할율과 체외 발달율 및 세포수 증가로 체외 수정란 생산에 유용하게 이용될 수 있을것으로 사료됨.

제2절 흑우 수정란 생산 및 이식 체계 확립

1. 수정란 생산

<공란우 과배란 처리에 따른 난소반응>

농가 및 축산진흥원 보유 제주흑우 암소에 과배란 처리를 하여 호르몬 처리에 따른 난소 반응을 조사한 결과 총 153마리에서 평균 11.7개의 황체 형성이 확인되었으며, 좌측난소 5.6개, 우측 난소 6.1개로 좌측보다는 우측난소의 황체수가 많은 결과를 보였음.

과배란 처리 공란우의 산차 및 번식경력에 따른 난소 반응을 비교한 결과 초산우가 10.7개, 2산이 9.8개 3산이 13.5개, 4산이 9.3개, 5산이 13.4개, 6산이 13.5개 그리고 7산 이상이 9.2개로 3산 공란우가 가장 양호한 반응을 보였고 4산과 7산 이상 공란우의 난소 반응이 가장 낮은 결과를 보여(표 23 참조), 난소반응의 차이는 산차에 따른 차이 라기보다는 공란우 개체별 번식능력 차이에 따른 차이라고 사료됨.

표 23. 제주흑우 공란우 난소반응

구 분	처리두수 (마리)	난 소 반 응(개)		
		계	좌	우
초산	45	10.7±5.8	5.0±2.9	5.7±3.3
2산	31	9.8±4.7	4.8±2.7	5.0±2.6
3산	22	13.5±6.3	6.2±3.3	7.4±3.2
4산	6	9.3±5.8	4.7±3.1	4.7±2.9
5산	21	13.4±7.0	6.5±3.8	6.9±3.8
6산	19	13.5±7.1	6.6±3.3	6.9±4.2
7산 이상	9	9.2±4.6	3.4±2.2	5.8±2.8
계(평균)	153	11.7±6.3	5.6±3.2	6.1±3.5

<제주흑우 수정란 생산 결과>

공란우 과배란 처리 후 7일째 자궁각 관류법을 이용 수정란을 채란하고 생산성을 비교한 결과 전체 평균 7.2개의 난자를 채취하였으며 그중 이식가능 수정란이 4.8개로 양호한 결과를 보였는데, 산차 및 번식경력에 따른 수정란 생산 결과는 총 난자 생산수에서 7산 이상 공란우가 5.8개로 가장 낮았고, 초산이 6.4개, 2산이 6.9개, 3산이 7.3개, 4산이 7.5개, 5산이 7.7개, 6산이 9.1개 그리고 7산 이상이 5.8개로 6산 공란우가 가장 양호한 결과를 보였음.

이식가능 수정란 생산수는 5산 공란우가 5.6개로 가장 양호한 결과를 보였으며, 초산우가 4.0개로 가장 낮은 결과를 보였음(표 24 참조).

표 24. 제주흑우 공란우 수정란 생산결과

구 분	처리두수 (마리)	수 정 란 생 산(개)			
		계	이식가능란	미수정란	퇴 행 란
초산	45	6.4±6.0	4.0±4.2	1.1±1.8	1.3±3.0
2산	31	6.9±4.4	4.8±3.6	1.1±1.5	1.0±1.3
3산	22	7.3±5.9	5.0±5.1	1.2±2.5	1.2±1.6
4산	6	7.5±6.1	5.3±5.6	0.5±0.5	2.0±1.8
5산	21	7.7±6.1	5.6±5.8	1.0±1.0	1.0±1.4
6산	19	9.1±6.6	5.5±4.2	2.1±3.5	1.4±2.9
7산 이상	9	5.8±4.6	4.6±3.2	0.7±0.7	0.6±1.3
계(평균)	153	7.2±5.9	4.8±4.6	1.2±2.4	1.2±1.9

생산된 난자의 등급별 분포를 보면 전체 1,091개중 가장 양호한 Excellent급이 561개로 51.4%이고, 다음 등급인 Good급이 13.4%를 보였으며, 이식용으로 활용이 불가능한 Poor급도 360개로 33.0%나 차지하여, 총 생산난자 중 이식 불가능 미수정란과 퇴행란의 비율이 비교적 높게 나타나 이식가능 수정란 비율을 높이기 위한 최적 인공수정시기 파악, 공란우 발정 모니터링으로 수정란 생산성을 높일 수 있도록 차년도 연구과제 수행을 통해 개선이 필요할 것으로 사료됨(표 25 참조).

표 25. 공란우 생산 제주흑우 수정란 등급별 내역

구 분	등급별 수정란 생산 내역(개)				
	계	Excellent	Good	Fair	Poor
초산	287	136	36	6	109
2산	214	116	28	4	66
3산	160	84	21	4	51
4산	45	22	8	2	13
5산	161	93	19	6	43
6산	172	75	28	2	67
7산 이상	52	35	6	0	11
계(%)	1,091	561(51.4)	146(13.4)	24(2.2)	360(33.0)

※ 생산 난자 중 퇴행란과 미수정란은 Poor로 구분하고, 이식가능란은 Excellent ~ Fair로 구분하였음.

그리고 생산 수정란의 발육단계별 분포를 살펴보면 상실배기 난자가 582개로 53.3%를 차지하여 가장 높은 비율을 차지하였으며, 초기배반포기 난자를 포함 배반포기 난자는 146개로 13.3%를 보였음(표 26 참조).

표 26. 공란우 생산 제주흑우 수정란 발육단계별 내역

구 분	발육단계별 수정란 생산 내역						
	계	배반포기	초기배반포기	상실배기	초기상실배기	미수정란	퇴행란
난자수(개)	1,091	54	92	582	3	183	177
비 율(%)	100	4.9	8.4	53.3	0.3	16.8	16.3

같은 시기에 수정란을 생산한 한우 공란우와 난소 반응 및 수정란 생산성을 비교한 결과 공란우 난소반응에서는 제주흑우가 14.7개이고 일반한우가 10.9개로 제주흑우 공란우가 양호한 반응을 보였으며, 수정란 생산에서는 총난자수와 이식가능 수정란수에서 제주흑우가 9.4개 및 5.8개이고, 일반한우가 7.3개 및 5.4개로 일반한우가 양호한 체란 성적을 보여주었는데 이는 앞서 기술한 산차별 결과에서와 같이 수정란 생산과정에서의 기술적인 요인과 공란우 영양상태 등에 의한 차이라고 사료됨(표 27 참조).

표 27. 제주흑우와 한우 공란우 난소반응 및 수정란 생산 비교

구 분	처리 두수	난소반응(개)				수정란 생산(개)		
		계	좌	우	계	이식가능란	미수정	퇴행란
제주흑우	32	14.7±8.4	7.3±4.1	7.4±4.8	9.4±7.7	5.8±5.2	2.0±3.7	1.6±2.9
한 우	29	10.9±4.4	5.1±2.8	5.8±2.2	7.3±4.9	5.4±4.7	1.2±1.9	0.7±0.7

<공란우 혈액 생화학치 분석결과>

공란우의 혈액화학치와 수정란 생산성과의 관련성을 파악하기 위해서 공란우 선발조건을 마련하는데 활용하고 공란우를 대상으로 GPT와 GOT를 포함 총 12개 항목의 혈액 생화학 분석을 실시한 결과 수정란 생산에 직접적으로 영향을 미치는 공란우 난소반응에 따른 황체수와는 뚜렷한 차별성이거나 상관관계가 없게 나타나고 있음(표 28).

표 28. 제주흑우 공란우 난소반응(황체수)과 혈액화학치 비교

황체 수	GPT (U/L)	GOT (U/L)	ALP (U/L)	GLU (mg/L)	TP (g/dL)	TCHO (mg/dl)	TBIL (ng/dL)	LDH (U/L)	CPK (U/L)	BUN (mg/dL)	CRE (mg/dL)	HDLC (mg/dl)
9>=	14.8	51.2	152.7	39.3	5.9	67.7	0.6	451	80.8	8.8	0.8	53.9
15~10	11.9	39.2	120.5	39.4	4.9	51.9	0.1	374.7	67.6	8.3	0.7	45.6
16<=	11.8	42.8	123.8	41.2	4.9	52.0	0.2	404.8	56.8	8.3	0.7	43.7

공란우의 혈청을 이용하여 총 콜레스테롤 함량과 고밀도 총콜레스테롤 함량을 수정란 생산 공란우이 난소반응과 연관성을 찾기 위하여 분포를 조사한 결과에서 총콜레스테롤 함량이 낮은 경우에 난소 반응이 좋았지만 뚜렷한 경향을 보인다고 할 수가 없으며 (그림 20 참조), 고밀도 콜레스테롤 함량 분석 결과도 유사한 결과를 보여 (그림 21 참조) 혈액 생화학 분석 결과를 활용한 공란우 선발에 활용하기는 적절하지 않다고 사료됨.

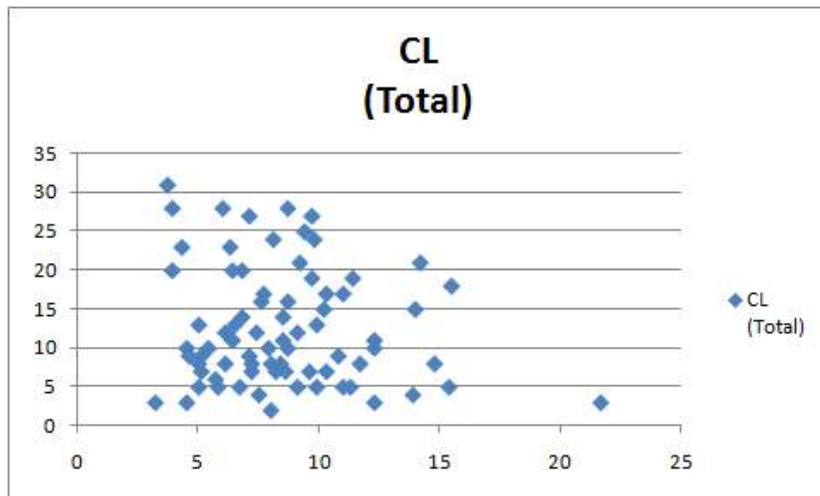


그림 20. 총 콜레스테롤값에 따른 난소반응별 분포 현황

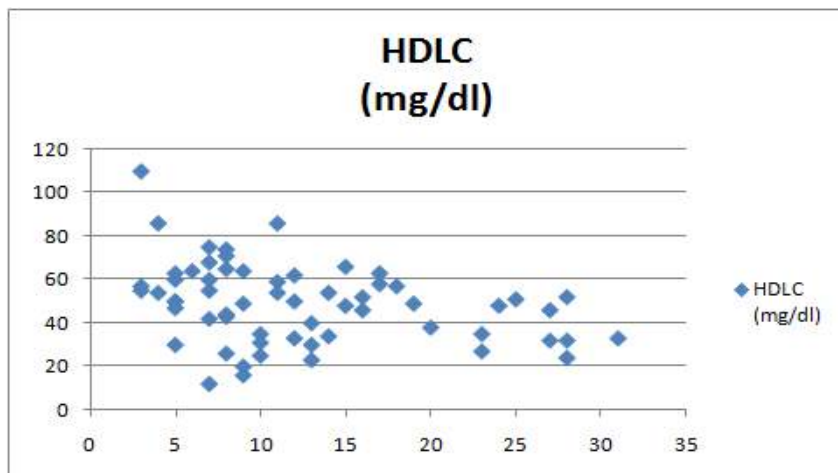


그림 21. 공란우 황체수와 고밀도콜레스테롤과의 분포비율 조사 결과

금회 연구과제 수행을 위하여 68마리에서 153회로 평균 1마리당 2.25회 채란을 실시하였으며, 공란우 개체별 이식가능 수정란 생산수는 최고 74개부터 1개로 나타나 개체별 편차를 보였으며, 1마리당 평균 10.7개의 수정란을 생산하였음(표 29 참조).

표 29. 공란우 별 수정란 생산 내역

연번	개체번호	산 차	채란 회수	수정란생산		비 고
				계	정상란 비정상란	
1	B000025	5	2	10	10 0	
2	B000040	5	1	5	0 5	
3	B000024	9	1	1	1 0	
4	B0148	7	1	2	1 1	
5	B0303	6	1	3	1 2	
6	B0345	1	1	2	1 1	
7	B204002	2	1	2	2 0	
8	B0403	5	3	9	7 2	
9	B0415	3	2	5	5 0	
10	B0428	1	1	25	8 17	
11	B0429	3	2	16	5 11	
12	B0431	3	3	16	14 2	
13	B0440	2	4	30	22 8	
14	B0443	2	2	14	10 4	
15	B0501	2	1	1	0 1	
16	B0504	2	2	19	8 11	
17	B0510	2	2	17	4 13	
18	B0828	4	1	1	1 0	
19	B198023	6	4	30	20 10	
20	B198038	6	2	26	24 2	
21	B200026	5	2	7	6 1	
22	B201002	6	3	58	16 42	
23	B201005	6	6	40	37 3	
24	B201008	4	2	19	10 9	
25	B201014	8	3	18	16 2	
26	B201020	7	1	7	6 1	
27	B202006	4	6	35	18 17	
28	B202020	3	2	20	13 7	
29	B202022	3	1	20	20 0	
30	B203009	5	1	2	2 0	
31	B204005	5	7	91	74 17	
32	B204015	5	2	12	7 5	
33	B206003	3	3	41	17 24	

34	B206004	1	3	11	9	2
35	B206008	1	3	30	17	13
36	B206015	1	3	21	19	2
37	B206017	2	4	38	30	8
38	B206022	1	3	20	17	3
39	B207006	1	4	10	10	0
40	B207016	3	3	7	6	1
41	B208001	1	4	18	13	5
42	B208010	2	1	7	7	0
43	B208020	2	2	5	0	5
44	B208022	2	3	14	11	3
45	B208029	1	1	3	2	1
46	B208033	1	1	5	4	1
47	B209004	1	2	7	0	7
48	B209005	1	1	27	20	7
49	B209013	1	1	0	0	0
50	B209016	1	1	4	2	2
51	B209022	1	4	13	8	5
52	B209026	1	4	24	20	4
53	B209033	1	1	1	0	1
54	B210026	1	1	5	3	2
55	B3127	1	1	13	12	1
56	B3128	1	3	45	35	10
57	B000038	5	1	1	0	1
58	B3987	2	1	10	10	0
59	B4225	2	1	6	3	3
60	B5138	7	2	22	16	6
61	B5531	1	2	16	1	15
62	B5831	3	1	16	15	1
63	B5963	5	1	7	6	1
64	B6339	1	3	39	19	20
65	B6340	1	5	26	20	6
66	B7374	3	1	1	1	0
67	B9035	2	2	7	5	2

68	B9060	2	3	8	4	4
계			153	1,091	731	360

<수정란 생산성 향상을 위한 공란우 조건 확립 방안>

공란우에서 체내 수정란의 생성성 향상을 위해서는 일반적으로 거론되는 공란우의 영양상태(BCS)를 기본으로 하는 비만도와 난소의 건강상태등이 결정적으로 작용하는것 같으며, 이를 해소하고 공란우 수정란 생산성을 높이기위 위해서는 성장단계에서부터 적정 사영관리를 통해 대상축의 적절한 난소발달을 유도하는 것이 바람직하다고 사료되며, 수정란 생산에 직접 활용하고자 한다면, 수정란 생산 2개월 이전부터 특별관리를 통해 적정 BCS의 유지, 공란우의 자궁내 염증의 치료 및 난소기능 활성화를 위한 비타민 및 미네랄 제제의 급여 등의 다양한 공란우 처방 및 관리가 수반이 되어야할 것으로 사료됨.

표 30. 수정란 생산 씨수소 혈통

연번	개체명호	관리번호	개체명호	생년월일	혈통		소유자
					부명호	모명호	
1	JBPN003	94013	JBPN003	1994-05-09	B191	B6	축산진흥원
2	JBPN004	9815	JBPN004	1998-05-10	B4	B328	난지축산시험장
3	JBPN007	01010	JBPN007	2001-12-10	B191	B98038	축산진흥원
4	JBPN008	01011	JBPN008	2001-12-16	B4-13	B94008	축산진흥원
5	JBPN009	0202	JBPN009	2002-03-04	B4-13	B9742	난지축산시험장
6	JBPN010	02004	JBPN010	2002-05-20	B4-13	B24	축산진흥원
7	JBPN016	0351	JBPN016	2003-12-05	B4-13	B345	난지축산시험장

2. 수정란 이식

<수정란이식 현황>

수정란이식을 통한 제주흑우 송아지 증식을 위하여 도내 농가에 사육되고 있는 한우, 교잡우 및 젃소 대리모에 체내 수정란을 생산 이식하였고 총 5년동안 총 678마리의 대리모에 수정란을 이식하였으며 (제주특별자치도 정책자금 포함), 수정란이식 누적 농가수는 65농가 이지만 실제 농가수는 42농가였음 (표 31-32 참조).

표 31. 연도별 체내수정란 이식 현황

(단위 : 마리)

연도별	목표두수	이식두수	농가수(호)
2008	75	75	15
2009	75	84	8
2010	125	132	13
2011	150	183	8
2012	200	204	21
계	625	678	65

표 32. 농가별 수정란이식 내역

연번	성명	주소	이식두수	연번	성명	주소	이식두수
1	강 * *	서귀포시 안덕	1	23	박 * *	서귀포시 남원	1
2	강 * *	서귀포시 남원	9	24	박 * *	서귀포시 안덕	29
3	강 * *	제주시 애월	15	25	백 * *	제주시 조천	44
4	고 * *	서귀포시 남원	9	26	손 * *	제주시 애월	1
5	고 * *	제주시 애월	3	27	송 * *	서귀포시 안덕	1
6	고 * *	서귀포시 중문	3	28	양 * *	서귀포시 남원	11
7	고 * *	서귀포시 남원	37	29	오 * *	서귀포시 남원	19
8	김 * *	서귀포시 대정	12	30	오 * *	서귀포시 남원	19
9	김 * *	제주시 조천	4	31	오 * *	서귀포시 남원	5
10	김 * *	서귀포시 남원	159	32	오 * *	서귀포시 남원	8
11	김 * *	서귀포시 남원	20	33	오 * *	서귀포시 남원	4
12	김 * *	서귀포시 표선	16	34	이 * *	서귀포시 안덕	1
13	김 * *	제주시 구좌	2	35	이 * *	제주시 애월	13
14	김 * *	서귀포시 남원	1	36	장 * *	서귀포시 남원	36
15	김 * *	서귀포시 색달	28	37	전 * *	제주시 해안	4
16	김 * *	제주시 애월	17	38	지 * *	서귀포시 안덕	2
17	김 * *	서귀포시 남원	2	39	한 * *	서귀포시 성산	14
18	김 * *	서귀포시 남원	38	40	한 * *	제주시 오등	1

19	김 * *	서귀포시 예레	2	41	현 * *	서귀포시 남원	17
20	김 * *	제주시 애월	8	42	현 * *	서귀포시 남원	4
21	남 * *	제주시 조천	8	43	현 * *	서귀포시 보목	23
22	박 * *	제주시 오등	17	44	홍 * *	제주시 애월	11

농가에 이식된 제주흑우 수정란은 대부분 동결란을 사용하였으며 수태율 조사가 이루어진 2011년까지의 수태율과 분만성적을 집계한 결과, 수태율이 39.3%이었으며, 송아지 분만율이 34.4%로 집계되었음 (표 33 참조).

표 33. 수정란이식 수태율 조사 결과

구 분	연도별	이식두수	임신현황		분만현황	
			두 수	비율(%)	두수	비율(%)
체내 수정란	2008	75	25	33.3	21	28.0
	2009	84	38	45.2	30	35.7
	2010	132	59	44.7	51	38.6
	2011	183	63	34.4	61	33.3
	계(평균)	474	185	39.3	163	34.4
체외수정란 (복제수정란)		4(64)	7	10.9	3	4.7

수정란이식 수태율이 당초 목표한 수준보다는 약간 떨어지기는 하였지만 동결수정란을 이용한 수정란이식에 주력하게 된 이유는 수정란이식 기술이 산업화를 이루기 위해서는 신선란으로 보급하는 한계를 극복하고 산업화를 달성하려면 동결란 이식체제로 바뀌어야 하기 때문에 수태율 저하를 감수하여 수행하였음.

당초 과제를 시작하는 해의 2008년 수태율 33.3%에서 2009년 45.2%, 그리고 2010년 44.7%로 수태율이 개선되어오다가 2011년 수태율이 34.4%로 하락한 결과를 보였는데, 이는 구제역 백신에 의한 유사산 발생 피해가 가장 크게 작용한 것으로 사료되며, 수태율 대비 분만율이 다소 떨어지고 있는 것은 제주지역의 소 사육 형태가 수정란 이식을 실시할 때는 축사에서 사육하지만 수정란이식 후 2~3회 발정관찰후 인근 목장에 방목을 실시하게 되고 자연적으로 방목지 진드기에 대리모가 노출되게 되어 진드기매개 질병인 타이에리아에 의한 대리모 건강상태 악화로 유사산 발생율이 높아짐에 기인한 것으로 사료되어 향후 수정란이식에 의한 제주흑우 증식시스템이 정착되기 위해서 발전적인 개선방안 마련이 필요함 (5차년도 결과는 추후 보고 예정임).

3. 제주흑우 씨수소 확보

제주흑우는 그 집단 규모가 한우에 비하여 매우 작은 멸종위종으로 분류되고 있을 만큼 그 사육두수 뿐만 아니라 가계수가 적어서 근친을 피하면서 교배체계를 만들어나가는 것이 쉽지 않은 현실이어서 가능한 씨수소 두수를 늘여서 교배에 활용하려고 현재 정액으로 확보해둔 씨수소와 능력검정을 마친 후보씨수소를 합쳐 총 36마리를 확보해서 교배용으로 활용해 나가고 있음 (표 34와 그림 22 참조).

앞으로는 농가에 있는 제주흑우 등록우에서 생산된 수송아지 중 능력검정과 혈연관계를 고려하여 다양한 씨수소 및 동결정액을 확보하여 제주흑우 집단이 근친을 최소화하면서 건전한 집단을 구성해 나갈 수 있도록 시스템을 운영해 나갈 계획으로 있으며, 위생적인 정액생산 처리를 위하여 정액성상분석기, 정액 자동흡입봉인장치 및 정액스트로 프린터를 확보하여 정액 처리를 원활히 할 수 있는 체계를 갖추었음.

표 34. 제주흑우 씨수소 및 후보씨수소 내역

연번	개체명호	관리번호	생년월일	혈	통	소유자
				부명호	모명호	
1	JBPN001	0191	1987-04-14	B87	B178	난지축산시험장
2	JBPN002	0313	1994-03-21	B4	B158	난지축산시험장
3	JBPN003	94013	1994-05-09	B191	B6	축산진흥원
4	JBPN004	9815	1998-05-10	B4	B328	난지축산시험장
5	JBPN005	99095	1999-12-15	B191	B97030	축산진흥원
6	JBPN006	01001	2001-01-01	B04-13	B97030	축산진흥원
7	JBPN007	01010	2001-12-10	B191	B98038	축산진흥원
8	JBPN008	01011	2001-12-16	B04-13	B94008	축산진흥원
9	JBPN009	0202	2002-03-04	B04-13	B9742	난지축산시험장
10	JBPN010	02004	2002-05-20	B04-13	B24	축산진흥원
11	JBPN011	02005	2002-06-24	B04-13	B98023	축산진흥원
12	JBPN012	02008	2002-07-15	B04-13	B25	축산진흥원
13	JBPN013	0302	2003-02-03	B04-13	B9737	난지축산시험장
14	JBPN014	03004	2003-10-09	B04-13	B98038	축산진흥원
15	JBPN015	0349	2003-11-28	B04-13	B9914	난지축산시험장
16	JBPN016	0351	2003-12-05	B04-13	B345	난지축산시험장
17	JBPN017	0354	2003-12-21	B04-13	B0019	난지축산시험장
18	B210002	10-2	2010-01-06	B01-11	B01-08	축산진흥원
19	B210003	10-3	2010-03-01	B01-11	B01-02	축산진흥원
20	B210005	10-5	2010-03-11	B01-11	B07-16	축산진흥원
21	B210006	10-6	2010-04-05	B01-11	B01-05	축산진흥원
22	B210007	10-7	2010-04-24	B01-11	B02-06	축산진흥원

23	B42	B42	2011-01-18	B01-11	B00317	축산진흥원
24	B43	B43	2011-01-25	B9815	B206015	축산진흥원
25	B44	B44	2011-01-28	B9815	B206004	축산진흥원
26	B45	B45	2011-02-05	B9815	B003127	축산진흥원
27	B46	B46	2011-02-05	B01-11	B5816	축산진흥원
28	B47	B47	201102-07	B9815	B003127	축산진흥원
29	B48	B48	2011-03-05	B9815	B198038	축산진흥원
30	B49	B49	2011-03-09	B9815	B005138	축산진흥원
31	B211003	11-3	2011-03-29	B01-11	B201005	축산진흥원
32	B50	B50	2011-04-03	B9815	B198038	축산진흥원
33	B51	B51	2011-05-12	B9815	B005491	축산진흥원
34	B211010	11-10	2011-06-08	B01-11	B207012	축산진흥원
35	B211011	11-11	2011-06-09	B01-11	B201002	축산진흥원
36	B211012	11-12	2011-06-24	B01-11	B40	축산진흥원

◆제주특별자치도 축산진흥원 씨수소 일부 4개체



◆국립 축산과학원 난지 축산시험장 씨수소 일부 4개체



◆제주특별자치도 축산진흥원 후보 씨수소 일부 4개체



그림 22. 제주흑우 씨수소 및 후보씨수소 36두 중 대표 예

4. 제주흑우 후보씨수소 정액성상 분석

제주흑우 능력검정우에 대하여 정액성상분석을 실시하고 개체별 성적을 조사한 결과, 평균 정액량 5.4ml, 정액농도 1499.9×10^6 cells/ml, 정자 운동성 87.7, 정자 생존율 91.6% 였음 (표 35 참조).

표 35. 제주흑우 후보씨수소 정액성상 분석 결과

No.	I.D	Vol	Con	Motil	VCL	VSL	VAP	LIN	ALH	STR	BCF	MAD	WOB	Fast Sp	Slow. SP	Slow. SP	Dead Sp
1	B210005	5.5	1,230	96.2	234.6	59.8	127.1	26.1	5.2	46.4	11.3	57	54.4	93	0	0	6.6
2	B211010	7	1,254	82	228.9	59	118.3	26.6	4.9	48.6	10.7	61.7	52.2	75.4	0	0	24.6
3	B210005	6.5	2,742	89.9	217.9	54.1	111.3	25.2	4.8	47.5	10.9	60.3	51.1	84.5	0	0	15.5
4	B210007	11	2,126	80.7	111.6	26.8	58.4	29.5	2.7	46	6.9	37.7	53	52.5	23.2	6.5	18.1
5	B210007	2	1,122	87.3	127.3	31.9	67	28.3	3	47.4	7.2	39.5	52.6	98.4	0.8	0.2	0.6
6	B000045	7	2,126	77.6	313.4	80	161.9	25.7	6.4	49.4	12.9	78.7	51.7	98.3	0	0	1.7
7	B211012	4.2	1,309	91.9	201	52.4	105	27	4.4	49.1	10.6	58.5	52.5	96.4	0.9	0.1	2.6
8	B46	3.5	1,670	90.8	220.3	58.9	115.5	27.6	4.8	50.8	11.2	67.4	52.6	87.9	4.3	0.1	7.8
9	B211012	5	1,034	85.2	130	36.6	69.5	32.2	3	53.1	7.3	41.9	53.4	70.3	13.2	2.8	13.7
10	B51	7	2,374	68.1	250.3	67.2	130.6	27.3	5.4	51.1	11.3	71.3	52.5	48.9	1.1	0.3	6.4
11	B50	3	1,310	94.5	171.4	45.5	92	28	3.9	49.3	9.5	57.4	53.8	84.8	7.5	1.3	
12	B42	2	1,307	95.2	192.3	47.9	71.6	26	4.3	48.2	10.4	58	51.4	90.7	6.1	1	2.2
13	B47	10.5	170	88	232.8	58.6	120	25.6	5.1	48.5	11.3	63.5	51.5	91.8	1.2	0	7.1
14	B43	4	1,607	92.8	206.5	53.5	107.8	27.7	4.5	50	10.7	63	52.6	98.5	1.6	0.3	0.2
15	B48	3	1,002	94.8	160.2	41.3	85.9	28.5	3.6	48.5	9.1	53.8	53.9	81	8.4	2.3	10.5
	평균	5.4	1492.2	87.7	199.9	51.6	102.8	27.4	4.4	48.9	10.1	58.0	52.6	83.5	4.6	1.0	8.4

5. 제주흑우 등록관리

제주흑우가 재래한우중에는 처음으로 별도의 등록규정을 제정하여, 본 연구과제를 추진할 당시 등록우 96두 였으며 2008년 등록규정이 개정되고 2009년까지 증식된 개체에 대해 등록을 실시하여 2009년 12월 기준 등록우 217마리로 증가되었고, 2011년 기준으로 335마리까지 증가 되었으며, 2012년부터 2013년 6월까지 총 125마리가 등록 관리되고 있으며, 등록우에서 생산 되어 등록심사대상축 150마리를 포함 등록우 및 등록우 혈통 제주흑우를 합치면 610여 마리의 제주흑우가 있으며 (표 36과 그림 23 참조), 다만 사육관리 과정에서 비육출하나 도태로 자연 감소된 개체도 상당수 존재하지만 본 연구과제 사업을 통해 순수 제주흑우 두수 증식에 많은 기여를 하였다고 사료됨.

표 36. 제주흑우 현황

(단위 : 마리)

구 분	'11년 기준 등록우 두수	'13년 등록우	등록우 합계	생존 등록우 두수	등록대기	생존 제주흑우
마 리	335	125	460	336	150	486



제주흑우혈통등록증명서

등록번호 621000004	개체식별번호 KOR002005954235	성별 암소	모색유전자형 WW
명 호 흑06-04	생년월일 2006 년 06 월 12 일	계대 1	산차
특 징 : 모색	면선종	미선좌	배선 전
변 식 자 : 축산진흥 제주 제주시 노형동 315-7			
소 유 자 : 축산진흥 제주 제주시 노형동 315-7			
이 동 일 :			

개 체 혈 통 내 역

621000004 KOR002005954235	부 JBPN012 (기) 611000014 KOR000175544880 모 흑 0-26 (기) 611000024 KOR000175544828	조부 조모 외조부 외조모
------------------------------	--	----------------------------

개 체 유 전 능 력 (평가일 :)

구 분	냉도체중(kg)	배최장근단면적(cm ²)	등지방두께(mm)	근내지방도(점)
유전능력(EPD)				

위와 같이 본회 등록규정에 의하여 등록하였음을 증명함.

2009 년 09 월 02 일

사단법인 **한국종축개량협회** 

www.aiak.or.kr

그림 23. 제주흑우 등록증 견본 사진

(고찰)

수정란이식을 통한 제주흑우의 증식 효율을 높이기 위해서는 수정란 이식 성공의 중요한 3요소 중의 하나인 대리모의 선발조건을 개선하는 것이 가장 중요하다고 생각되어지는데, 이것을 개선해나가기 위해서는 일반적으로 수정란이식 시술자가 이식전 대리모의 황체상태를 검사하여 최종 대리모를 선발하고 이식에 사용하는 일반적인 매뉴얼에 추가하여 수정란이식 후 대리모의 사양관리 및 사육체계 유지 등도 매우 중요한 요인으로 작용하고 있다는 것이 본 연구과제를 수행하면서 깨달은 사항이었는데, 예를 들면 제주지역의 경우는 수정란 이식용 대리모의 별도관리와 수정란이식 후 방목 등의 저해요인을 줄일 수 있는 수란우 사육체계를 세우는 것이 매우 중요하다고 사료되어, 대리모 방목을 희망하는 농가의 경우는 수정란의 집중 이식시기를 정하여 대리모가 방목지에 나가기 전에 최소 5개월 이전에 수정란 이식이 완료될 수 있도록 수정란 생산이식 시스템을 만들고, 축사 내 연중 사육을 하는 농가 대리모의 경우는 신선란과 동결란을 적절하게 확보하여 수정란이식 성공률을 높일 수 있도록 매뉴얼을 만들어나가는 것이 앞으로 제주흑우 증식을 위한 수정란이식기술의 산업화를 조기에 달성할 수 있는 길이라고 사료된다, 금번 연구과제에서 찾아보고자 하였던 혈액 생화학 분석결과는 수정란이식 효율을 결정하는데 전혀 관련성이 없는 것은 아니지만 수많은 관련 요소들에 대한 검증과 과학적인 선발 방법의 설정도 앞으로 풀어 나가야 할 과제로 남게 되었음.

<참고>

<제주흑우 천연기념물 지정 추진상황>

- '92~90년 : 제주흑우 유전자원 수집과 혈통관리를 통한 흑우 집단 증식 체계 토대 마련
- '04년 : 국제식량농업기구(FAO) 제주흑우 지역 재래가축 등재
- '06년 : 제주특별자치도특별법에 제주흑우 보호·육성에 관한 조항(제207조) 및 관련 조례 제정으로 제도 개선 구축
- '12년 : 문화재청 주관 “천연기념물 지정 방안 연구 용역” 에서 제주흑우의 천연기념물 지정 가능성 제시
- '13.1월, 3월 : 문화재청 관계자 및 심의위원 현장 방문 조사
- '13.1월, 4월 : 문화재청 방문 상반기내 최종 심의토록 업무 협의
- '13.3.12일 : 도 문화재위원회 제주흑우 천연기념물 지정 심의 통과
- '13.3.13일 : 문화재청에 제주흑우 천연기념물 지정 신청
 - “천연기념물 지정 신청 취지문” 지사님 서명 및 총 9개 제목·479page 구성(제주흑우 기원과 역사, 관련 제도, 품종 표준 등)
- '13.4.17일 : 문화재청 제주흑우 천연기념물 지정 타당성 검토 가결
- '13.5.7일 : 제주흑우 천연기념물 지정예고(5.7일~6.5일 : 30일간)
 - 기원과 역사, 혈통 고유성, 품종 표준 확립, 제주흑우 등록 및 제도개선, 사양관리 기준, 제주흑우 관리규정 등에서 높은 평가

- '13.6.26 : 제주흑우 천연기념물 지정 최종심의 원안 가결
- '13.7.22 : 제주흑우 천연기념물 제546호로 지정, 안전행정부 관보에 공고 (그림 24 참조)

제주 흑우 천연기념물 됐다

제주흑우가 천연기념물 제546호로 22일 지정됐다.

제주도 축산진흥원은 문화재청이 제주흑우를 국가지정문화재 천연기념물 제546호로 지정, 이날 안전행정부 관보에 공고했다고 밝혔다. 제주도는 이에 따라 1986년 제주마 천연기념물 지정에 이어 전국 최초로 2개 축종의 천연기념물을 보유하게 됐다.

축산진흥원은 1992년부터 제주 흑우 유전자원을 수집하고 혈통관리를 통한 흑우집단 증식을 추진해왔다. 또 국제식량농업기구에 제주흑우를 지역 재래가축으로 등재했으며, 제주흑우 보호 육성에 관한 조례도 제정했다.



천연기념물 제546호로 지정된 제주 흑우. | 제주도 축산진흥원 제공

축산진흥원은 앞으로 제주대 줄기세포연구센터 박세필 교수팀과 업무 공조를 통해 제주흑우 대량 증식을 위한 유전자 확보, 체외 수정란 생산보급 등 흑한우 수정란의 안정적 공급과 증식을 위한 기반을 마련할 계획이다. 축산진흥원은 천연기념물 지정에 따라 제주흑우 종 보존 대책을 수립하고, 지역특화산업의 토대를 마련해 제주흑우 글로벌 명품화 블루오션 산업 진출을 추진할 방침이다.

축양동물중 천연기념물로 지정된 동물은 진도 진도개, 연산 오계, 제주 제주마, 경산 삽살개, 경주 개 동경이 등 5종이다.

<김홍균 기자 khk5056@kyunghyang.com>

입력 : 2013-07-22 15:28:53 | 수정 : 2013-07-22 15:28:53

Copyright©The Kyunghyang Shinmun, All rights reserved.

그림 24. 제주흑우 천연기념물 제546호 지정

제3절 성감별 정자 및 수정란 활용 기술 개발

생식세포 성감별 및 수정란 성감별 기술 개발

- 제주 흑우 정액의 특성 분석
- 제주 흑우 생식세포 성감별
- 성감별 정자를 이용한 체외수정 및 인공수정
- 제주흑우 수정란 성감별 기술 개발 및 도입

1. 정자 성감별

가. 정액 분석

정자의 농도, 운동성 및 형태를 자동으로 분석할 수 있는 컴퓨터 자동정자분석기 (CASA, computer aided semen analyzer)를 이용하여 한우와 흑우 정액을 분석 비교함.

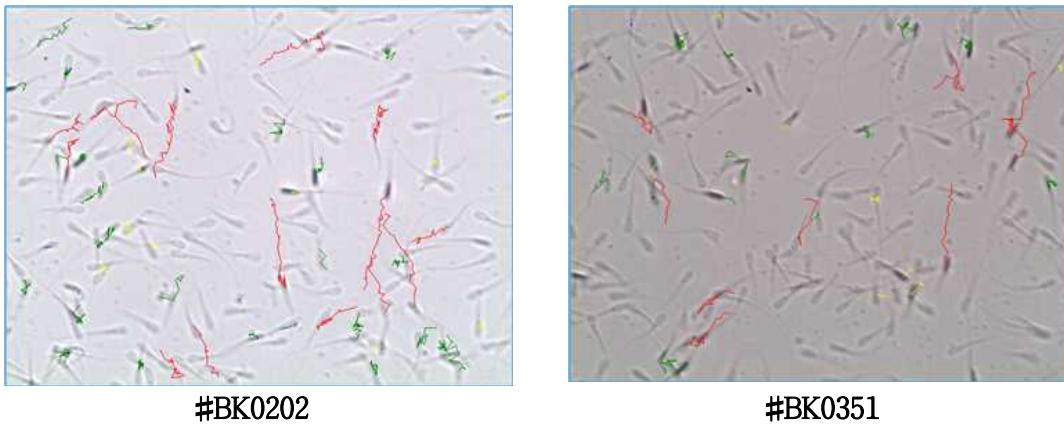


그림 25. 제주 흑우 정자를 CASA를 이용한 분석

표 37. SAIS advanced version 2009를 이용한 한우와 흑우정액 분석 비교

Parameter	Unit	한우		흑우			Reference
		KPN511	KPN525	BK0111	BK0202	BK0351	
총 분석필드	Field (s)	5	5	5	5	5	
총 정자의 갯수	Cell (s)	48.6	93.6	53.2	59.8	56.8	>> 100
총 정액의 농도	Million	32.4	63.6	35.6	39.8	38.0	
1ml당 정액의 농도	Million/ml	16.2	31.8	17.8	19.9	19.0	>> 20
운동성	(%)	83.4	95.8	89.8	83.7	75.0	>> 50
VCL	μm/s	149.3	194.4	174.7	142.0	131.0	>> 46
VSL	μm/s	64.3	73.9	68.2	54.0	50.6	>> 26
VAP	μm/s	97.6	123.5	108.8	92.4	75.0	

LIN		44.8	40.0	40.3	37.2	40.4	>> 58
ALH	μm	2.9	3.8	3.7	2.9	2.7	>> 2.4
HYP	(%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
STR		65.8	59.9	62.6	62.1	67.3	
BCF	HZ	10.5	11.6	9.7	6.5	7.8	
MAD	Degree	60.6	74.5	49.4	37.4	49.2	
WOB		65.6	63.6	62.4	53.6	57.2	

KPN (Hanwoo, 한우), BK (Jeju Black cattle, 제주흑우)

VCL (curvilinear velocity) VSL (straight-line velocity) VAP (average-path velocity)

Lin (linearity) ALH (amplitude of lateral head displacement) HYP (hyperactivated)

STR (straightness) BCF (beat-cross frequency) MAD (mean angular displacement)

WOB (wobble)

컴퓨터 정액검사 (CASA) 는 정액 1ml당 정자수와 정자의 운동성을 순식간에 보여 주며, 정자 활동성을 나타내는 곡선거리 (VCL), 평균거리(VAP), 직선거리(VSL), 그리고 선형성 (LIN), 측두 거리(ALH), 특활성(HYP) 등과 같은 정자 유형의 척도를 정확하게 계산함. 선형성은 직선 속도와 곡선 속도의 비율이며 직선성이 강할수록 “1”에 가까워짐. 직선 속도는 1초당 추적된 정자 경로의 처음과 마지막 위치 사이의 직선 거리를 말하며 20um/초 보다 작은 정자는 운동성이 없는 것으로 분석함. 곡선 속도는 1초당 추적된 정자의 경로를 따라 이동한 거리를 말하며, 운동성은 전체 정자수에 대한 활동 정자의 비율이며 백분율(%) 로 표시함.

한우와 제주 흑우 동결 정액을 컴퓨터 정액분석기를 이용하여 분석하였던 바, 정자 수는 한우가 32.4~63.6 x 10⁶cell/ml, 흑우가 35.6~39.8 x 10⁶ cell/ml 이었으며 운동성은 83.4~95.8% 와 75.0~89.8%로 차이가 없었고 정자활동성은 곡선성, 직선성, 평균거리 등, 약간씩 차이를 나타내어 평균적으로 KPN525>BK01-11>KPN-511>BK0202>BK0351의 성향을 나타내었고 전반적으로 우수하였으며 특별히 차이는 없었음(그림 25와 표 37참조).

*본 연구에 사용된 동결 정액은 현재 본 연구팀이 보유하고 있는 우수 한우 정액 두종류 (KPN511, KPN525) 와 우수 제주흑우 정액 세종류 (BK01-11, BK0202, BK0351) 임. 정액의 질적 차이는 제조 당시의 회수된 정액의 상태와 제조 조건에 따라 약간씩 차이가 있을 수 있으므로, 전체적인 비교 평가가 아님.

나. 정자 성감별에 사용되는 정액 희석액의 체외수정능에 미치는 영향 검토

정자 성감별에 따른 처리시간의 지체로 정자 활력이 감소될 것을 우려하여 처리용액에 하룻밤 재운 뒤 정자를 다음날 수정에 이용하였을 때 수정능이 유지되는지의 여부를 알아보고자 함.

희석액 원액을 1:4 비율로 희석한다음 이를 이용하여 동결 정액 스트로로부터 회수된 정액을 1회 세척하고 swim up을 유도한 후 회수된 고효율 정자를 모아 하룻밤 실온에서 정치시킨 후 다음날 18시간 째에 수정을 실시하였음.

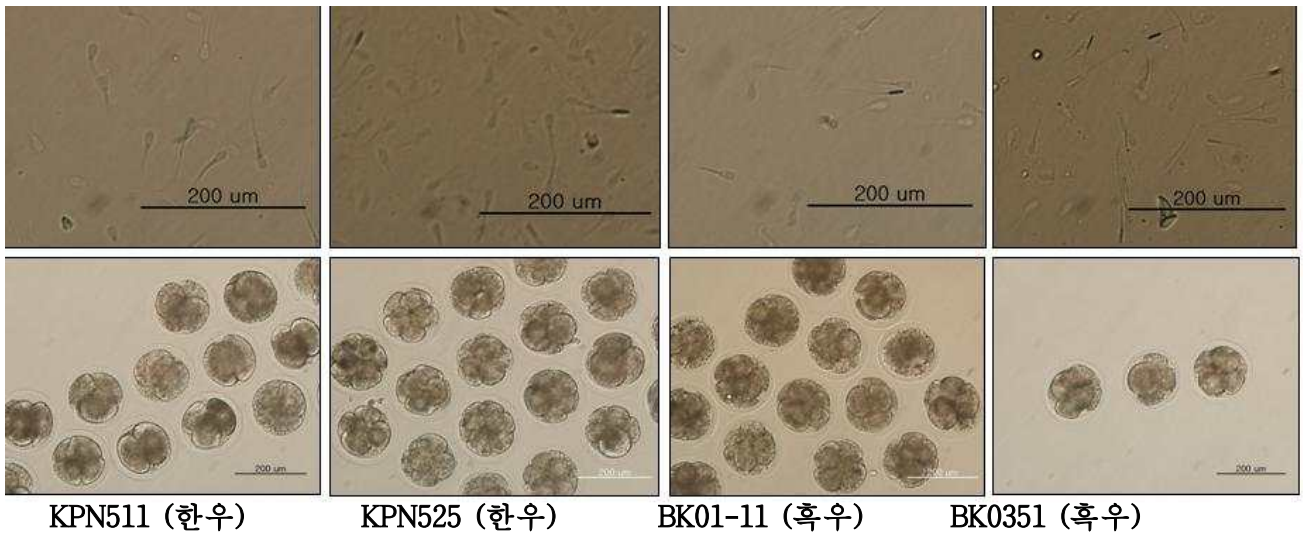


그림 26. 한우와 제주흑우 정액의 희석액을 이용한 정자처리에 따른 체외수정 결과

체외수정 2일째 배발생율을 조사하였던바 (그림 26), KPN511의 경우 (20/40, 50%), KPN525의 경우 (36/40, 90%), 제주 BK01-11의 경우 (34/41, 82.9%), 제주 BK0351의 경우 (5/39, 12.8%)의 결과를 나타내어 개체 간 차이가 큼을 알 수 있었음.

또한 하룻밤 실온 보관뒤에도 수정능을 유지하였던 바, 성감별에 사용될 희석액이 무해하고 장시간의 처리에도 수정능 유지에 도움을 줄 수 있음을 알 수 있었음.

다. 정자 성감별 (Flow cytometer에 의한 정자분리)

(가) 예비연구 (제주흑우 동결스트로를 이용한 성감별)

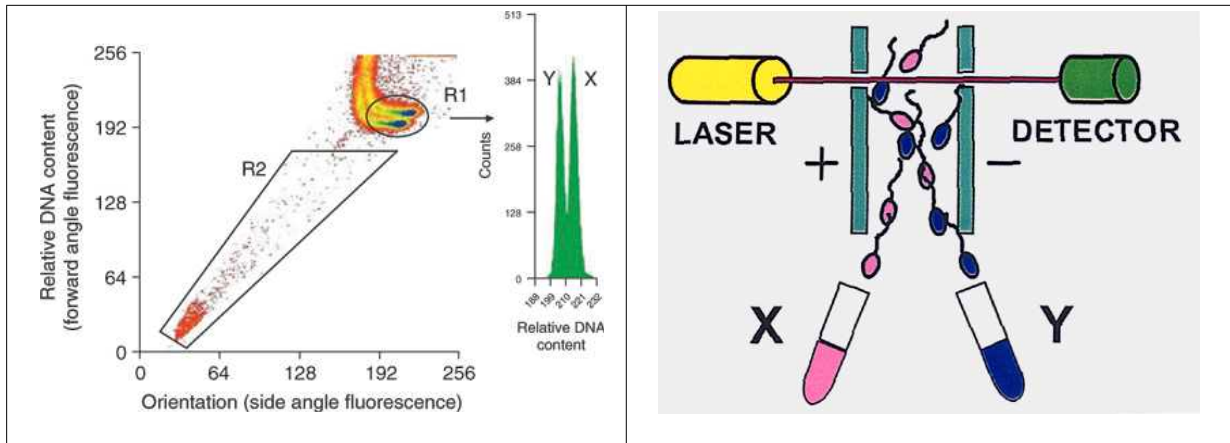


그림 27. Flow cytometer에 의한 정자분리

정자의 머리에 들어있는 염색체들을 형광염료로 한시간 염색하여 Flow Cytometer라는 세포분리기를 통과시키면서 레이저를 비추면 DNA함량이 많은, 즉 더 많은 염색체가 결합된 X염색체가 DNA함량이 상대적으로 적은 Y염색체에 비해 더욱 강한 빛을 발광하게 됨 (그림 27 참조).

각 정자에 의해 발광되는 빛의 강도를 세포분리기에 장착된 감지기가 컴퓨터로 전달하면서 각 정자를 빛이 밝다, 흐리다로 판별하고 이 정보는 전기신호로 바뀌게 됨. 동시에 컴퓨터는 전기신호로 바뀐 빛의 강도에 따라 정자를 암수로 분리인식하며, 모니터에는 전기신호가 암정자와 숫정자가 그룹으로 분리되어 나타남. 이때 다시 컴퓨터에 원하는 성별의 정자를 모으라고 명령하면 그 이후는 기계적인 작동에 의해 정자가 암 또는 숫 정자만으로 정자의 성분리가 이루어짐 (그림 28-30 참조).

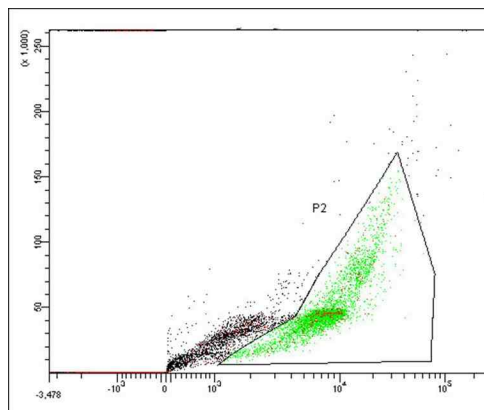


그림 28. Flow cytometer에 의해 감지된 동결정액 Sperm 군락. y-bearing sperm (녹색줄기의 왼쪽무리) 과 x-bearing sperm (녹색줄기의 오른쪽 무리) 군이 구분됨.

Tube: Tube_001			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	50,000		100.0
P1	2,138	4.3	4.3
P3	28	1.3	0.1
P4	17	0.8	0.0
P2	4,632	9.3	9.3
P5	1,133	24.5	2.3
P6	480	10.4	1.0

그림 29. 분류된 동결정액 정자의 비율 P5는 X-bearing, P6는 Y-bearing sperm

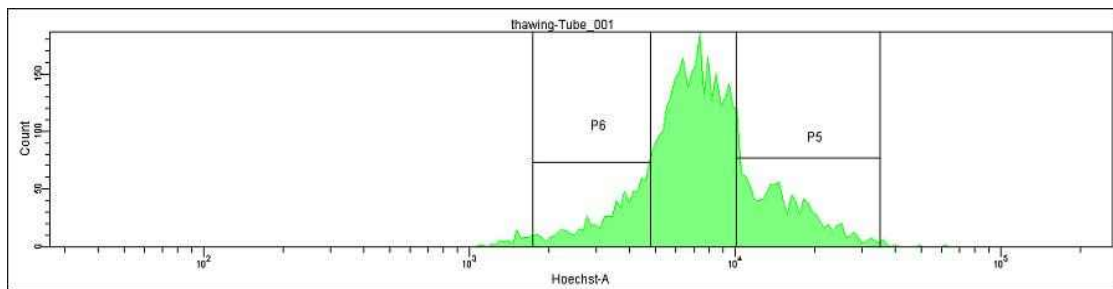
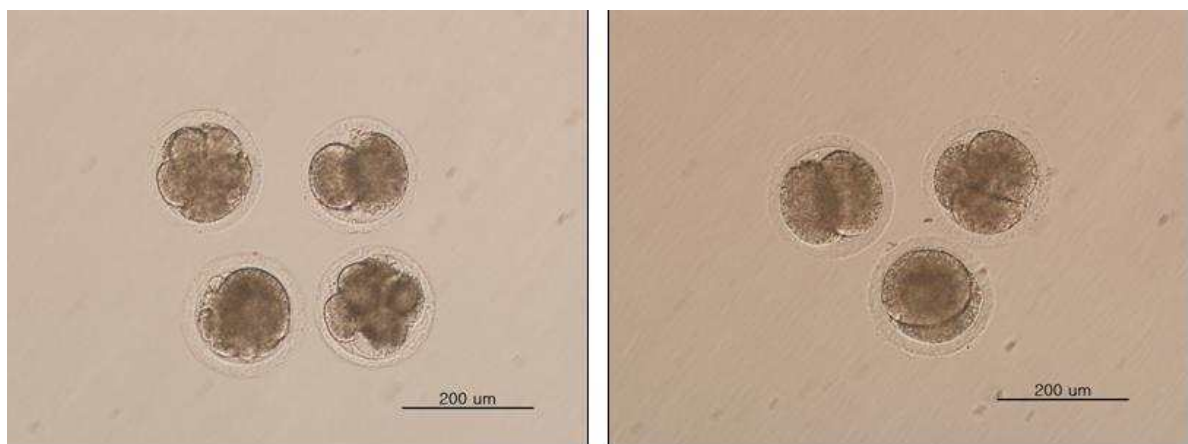


그림 30. X-bearing (P5) 과 y-bearing (P6) sperm이 겹치지 않은 부위로 선정하여 정자 회수

10개의 제주흑우 동결 스트로 (BK0351) 를 이용하여 5시간 동안 성감별을 실시하였던바, 대략 X, Y 각각 3 백만개의 분리된 정자를 회수할 수 있었음. 초당 250~300개의 정자가 분리되었으며 회수된 정자를 하룻밤 실온에서 방치한 뒤 체외수정을 실시하였음 (그림 31 참조). 회수된 정자 수가 작고 생존율도 낮아 배발달율은 저조하였음 (<10%).



X-frozen-thawed sperm

Y-frozen-thawed sperm

그림 31. 제주흑우 동결정액을 성감별 실시 후 체외수정하여 획득된 배양 2일째 수정란

이러한 문제는 동결정액 사용에 따른 생존 정자 수와 활력 변이에 따른 것으로 소 정액 성감별법 적정화와 원정액 사용으로 극복될 수 있을 것으로 예측됨.

(나) 제주 흑우 원정액을 이용한 성감별

① 1차 정자 성감별 및 이용 가능성 검토

㉓ 성감별

국립축산과학원 제주난지축산시험장에서 보유하고 있는 제주 흑우 종모우 (BK#0351) 로 부터 회수된 원정액의 성감별 분리를 시도하였음. 8.5 cc 원정액을 획득하여 희석액으로 1:1 로 희석하고 Hoechst 염색을 1시간 동안 실시하였으며 Flow cytometer에 장착하여 성구분을 실시 하고 패턴에서 겹쳐지는 부위를 제외한 암·수로 구분되는 부위의 구획을 획득하였음 (그림 32-34 참조).

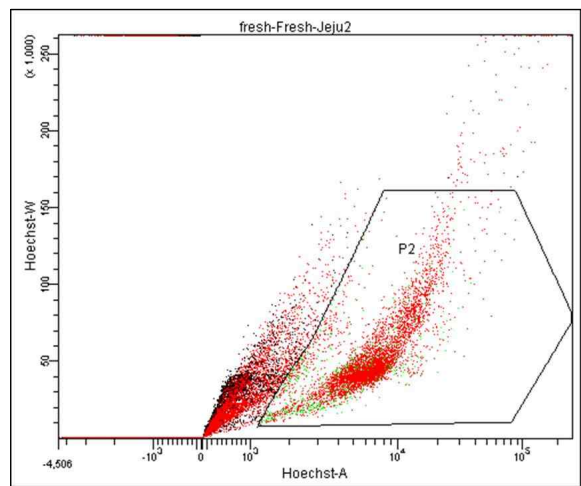


그림 32. Flow cytometer에 의해 감지된 원정액 sperm 군락. Y-bearing sperm (왼쪽무리) 과 X-bearing sperm (오른쪽 무리) 군이 구분됨.

Tube: Fresh-Jeju2			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	51,677		100.0
■ P1	26,260	50.8	50.8
□ P3	360	1.4	0.7
□ P4	232	0.9	0.4
■ P2	6,220	12.0	12.0
□ P5	1,390	22.3	2.7
□ P6	1,478	23.8	2.9

그림 33. 분류된 원정액 정자의 비율 P5는 X-bearing, P6는 Y-bearing sperm

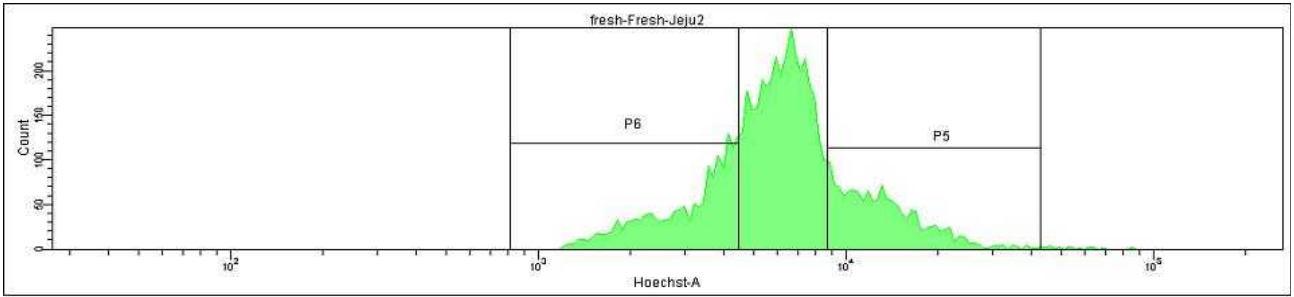
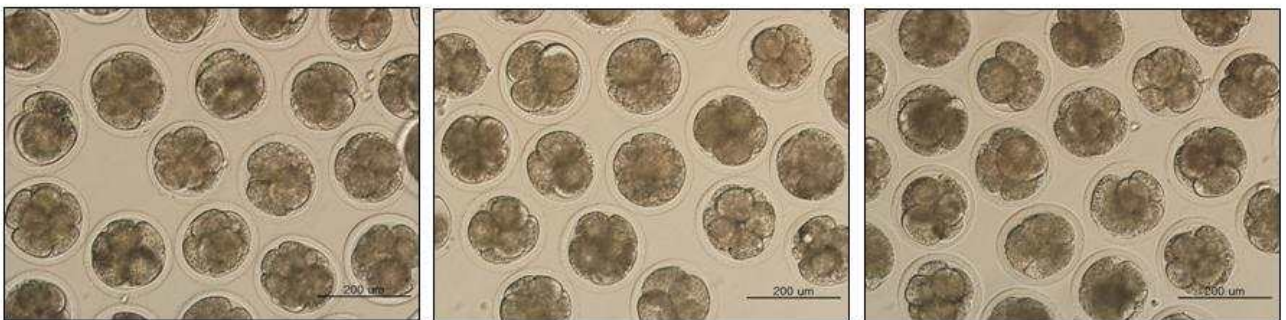


그림 34. X-bearing (P5) 과 y-bearing (P6) sperm이 겹치지 않은 부위로 선정하여 정자 회수

초당 대략 ≈ 560 개의 정자가 분리되어 시간당 200만개의 웅성과 자성 정자를 획득할 수 있었으며 (동결 정액 대비 3배) 동결정액을 실시했을 때와 비교하였을 때 원정액으로부터 성감별된 정자는 정자수와 활력 모두 양호한 편이었음. 따라서 성감별된 암·수정자로 자연 발정이 유기된 암소에 인공수정을 각 1마리씩 실시하였음.

㉠ **성감별 제주 흑우 정자를 이용한 체외수정란 생산**

제주 흑우 원정액을 이용한 성감별로부터 획득된 일부의 성감별정자를 이용하여 체외수정을 실시하였음. 성감별후 획득된 정자는 난황이 함유된 희석액내에서 하룻밤 정치시킨 상태로 방치하였고 수정 당일 SP-TL처리용액으로 세척한 후 swim-up시켜 고효력 정자만을 모은 뒤 수정을 실시하였음.



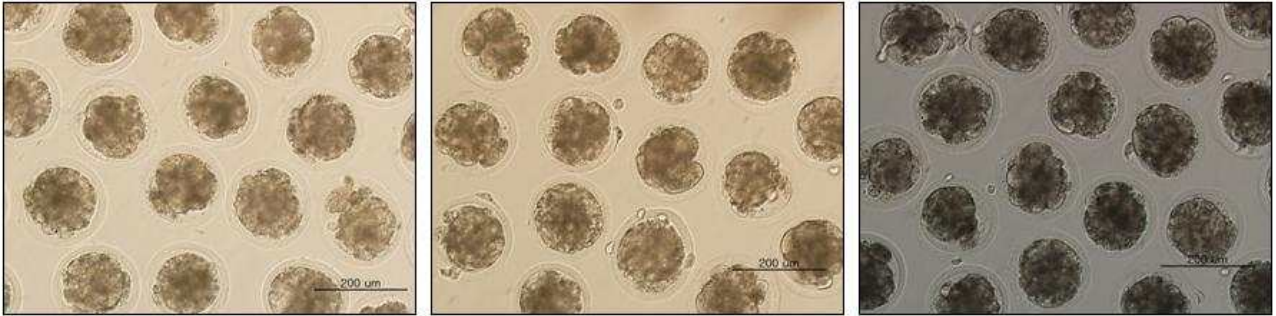
원정액 (BK0351)

BK0351-X-sperm

BK0351-Y-sperm

그림 35. 성감별된 제주흑우 정자를 이용한 체외수정후 배양 2일 제 수정란

국립축산과학원 제주난지시험장에서 보유하고 있는 제주 흑우 종모우 Bk0351을 성감별한 후 체외수정을 실시하였던 바, 원정액의 경우 91.4% (74/81), BK0351-X-sperm의 경우 82.4% (61/74) 와 BK-0351-Y-sperm 의 경우 80.0% (60/75) 의 체외수정율을 나타내었음(그림 35 참조).



원정액 (BK0351)

BK0351-X-sperm

BK0351-Y-sperm

그림 36. 성감별된 제주흑우 정자를 이용한 체외수정 후 배양 6일 제 상실배

또한, 성감별 정자를 이용하여 체외수정 후 배양 6일 제 상실배 이상 발달을 조사하였을 때, 원정액의 경우 42.0% (34/81), BK0351-X-sperm의 경우 37.7% (23/61) 와 BK0351-Y-sperm 의 경우 50.0% (30/60)을 나타내어 성감별정자의 체외발달이 대조군과 차이 없이 정상적으로 이루어질 수 있음을 확인하였음 (그림 36 참조).

*체외 배양 후 획득된 배아는 성감별이 제대로 이루어졌는지의 여부를 알아보기 위하여 배양 6일 제 각 군의 수정란은 제 1협동 연구기관 (충북대학교) 으로 보내 성감별의 정도를 재확인함.



원정액 (BK0351)

BK0351-X-sperm

BK0351-Y-sperm

그림 37. 성감별된 제주흑우 정자를 이용한 체외수정 후 배양 7일 제 배반포기 배

성감별 정자의 체외수정 후 배양 7일 제 배반포기배로의 발달을 조사하였을 때, 원정액의 경우 37.0% (30/81), BK0351-X-sperm의 경우 29.5% (18/61) 와 BK0351-Y-sperm 의 경우 40.0% (24/60)을 나타내어 성감별정자의 체외발달이 대조군과 차이 없이 정상적으로 이루어질 수 있음을 알 수 있었음. 특이하게도 Y-정자를 이용한 체외배아 발달율이 X-정자를 이용한 체외배아 발달율보다 높음은 앞으로 재차 조사해 봐야 할 내용이라 사료됨 (그림 37 참조).

② 2차 정자 성감별 및 이용 가능성 검토

㉠ 성감별

국립축산과학원 제주난지시험장에서 보유하고 있는 제주 흑우 종모우 (BK#0202와 BK#0351)로부터 회수된 원정액의 성감별 분리를 시도하였음. 제주흑우 정액의 성감별을 2차례 실시하였음 (표 38 참조). 1차 성감별에서, 정액 희석액의 안정화 부족으로 다수의 정자 획득이 어려웠고, 용해 후 생존율 또한 현저히 떨어지는 것을 확인하였음. 원정액을 획득하여 희석액으로 1:1로 희석하고 Hoechst 염색을 1시간 동안 실시하였으며 Flow cytometer에 장착하여 성구분을 실시하고 패턴에서 겹쳐지는 부위를 제외한 암·수로 구분되는 부위의 구획을 획득하였음.

표 38. 제주흑우정액 성감별 결과

	BK0202	BK0351
Motility of extended semen	55%	50%
Sort rate (sperm/sec)	2,500~4,000	1,500~2,500
Event rate (sperm/sec)	20,000~30,000	15,000~20,000
Freezing dose	2.5M/straw	2.5M/straw
Post-thaw motility	40%	20%
X-purity	93%	87%

초당 대략 1,500 ~ 4,000개의 정자가 분리되었으며, 스트로당 2.5×10^6 자성정자를 넣어 동결하였고, 용해 후 운동성은 20~40% 이었음. 또한 성감별된 정액을 다시 조사하였을 때, 자성 순도는 87~93%로 나타났음.

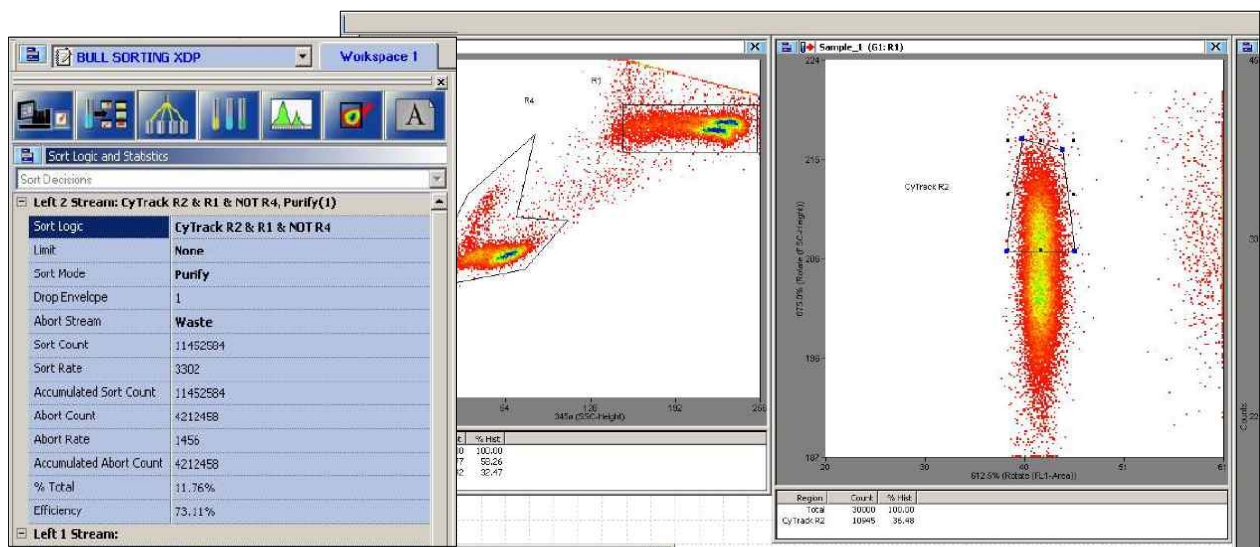


그림 38. Flow cytometer를 이용한 성분리 결과

2차 성감별 (BK0202) 에서 성감별 효율은 73.11%로 매우 안정적이었음 (그림 38 참조). 또한 자성정자의 분리는 58.26% (R1) 의 히스토그램과 그 중 36.48%의 Cytrack R2에서 획득되었음. 이때의 최고 분리속도는 초당 4,475마리였음. 분리된 자성 정자는 0.5cc 스트로당 5×10^6 농도로 동결되었으며, 용해 후 생존율은 40%, 성감별율은 92%로 확인되었음.

㉞ 성감별 제주흑우정자 동결스트로를 이용한 체외수정란 생산

성감별 정자를 이용한 체외수정란 생산 효율은 다음과 같음. 체외수정 후 2일 째 조사된 체외수정율은 70.4~78.2%로 대조군 81.7%보다 약간 낮았고 체외수정 4일째 발달율은 41.8~44.7%를 나타내었으며 수정란 성감별을 배양 4일 째 조사하였음.

표 39. 성감별 제주흑우정자를 이용한 체외수정란 생산

Treatment	No (%). of oocyte	No (%). of embryos		No. of examined embryos for sexing
		≥2-cell at day 2	≥8~16cell at day 4	
대조군	60	49 (81.7)	24 (49.0)	11
BK0202-X	55	43 (78.2)	18 (41.8)	12
BK0351-X	54	38 (70.4)	17 (44.7)	9



그림 39. 성분리된 자성 정자로 체외수정 실시 후 배양 4일째 생산된 배아

성 분리된 정자로 체외수정 실시 후 발달된 4일 째 배아는 대조군과 비교하여 형태학적인 발달상의 차이는 없었음 (그림 39 참조).

㊤ 성감별 정자로부터 생산된 체외수정란의 성감별 실시

체외수정란 성감별은 LAMP법을 이용하여 실시하였음 (그림 40 참조).

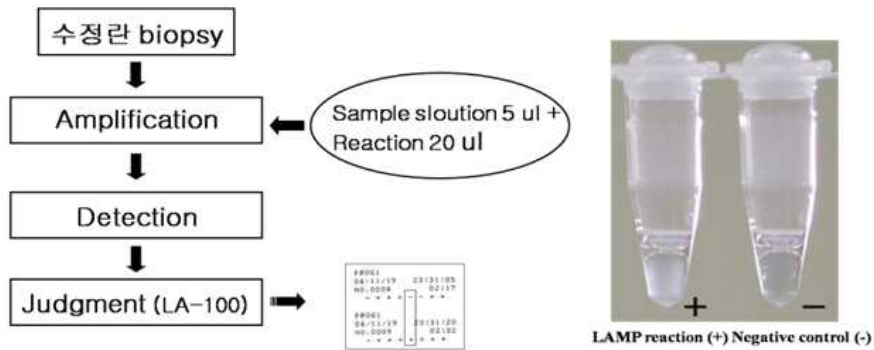


그림 40. LAMP(Loop-mediated Isothermal Amplification) 법을 이용한 염기서열 분석 방법

일시	대조군	처리군
2009.12.21	PROG1 09/12/21 14:00:03 NO.0003 - - + - - -	PROG1 09/12/21 14:49:18 00:09 - + - - -
2010.11.2	PROG1 10/01/12 23:38:59 NO.0007 07:45 QC NOTE CH4 (81) - + - - - - +	PROG1 10/01/12 23:38:22 NO.0006 07:08 QC NOTE CH3 (84) - - - - - + + PROG1 10/01/12 23:37:18 NO.0004 06:06 - - - - - +

그림 41. 성감별 정액으로 생산된 수정란의 성감별 분석 결과 내용

2차례 성감별을 실시하였던 바, BK0202-X 정자로 수정된 체외수정란의 경우 성감별율은 12개에서 10개로 **83.3%**, BK0351-X 정자로 수정된 체외수정란의 경우 9개에서 7개로 **77.8%**로 높은 성감별율을 확인할 수 있었음.

한편, 대조군의 11개 배아 중 9개 수정란이 X-수정란으로 나타나, 체외수정 시 사용했던 본 연구팀에서 새로이 개발한 정자처리 방법이 성감별에 효과가 있는 것으로 사료됨 (그림 41 과 표 40 참조).

표 40. LAMP법에 의한 성감별 결과

처리군		공시수정란 수	X-수정란 수	Y-수정란 수
대조군	1차	5	4	1
	2차	6	5	1
	계	11	9 (81.8%)	2 (18.2%)
BK0202-X	1차	6	5	1
	2차	6	5	1
	계	12	10 (83.3%)	2 (16.7%)
BK0351-X	1차	3	2	1
	2차	6	5	1
	계	9	7 (77.8%)	2 (22.2%)

조사된 수정란 수가 적지만 자성 수정란의 비율이 상당히 높아 성감별 동결 정액의 인공 수정 및 체외수정란 이식이 용이할 것으로 기대됨.

③ 3차 정자 성감별 및 이용 가능성 검토

㉞ 생식세포 성감별

국립축산과학원 제주출장소에서 보유하고 있는 제주 흑우 종모우 BK#0202 원정액의 성감별 분리를 시도하였음. 원정액을 획득하여 희석액으로 1:1 로 희석하고 Hoechst 염색을 1시간 동안 실시하였으며 Flow cytometer에 장착하여 성구분을 실시하고 패턴에서 겹쳐지는 부위를 제외한 암·수로 구분되는 부위의 구획을 획득하였음 (그림 42 참조).

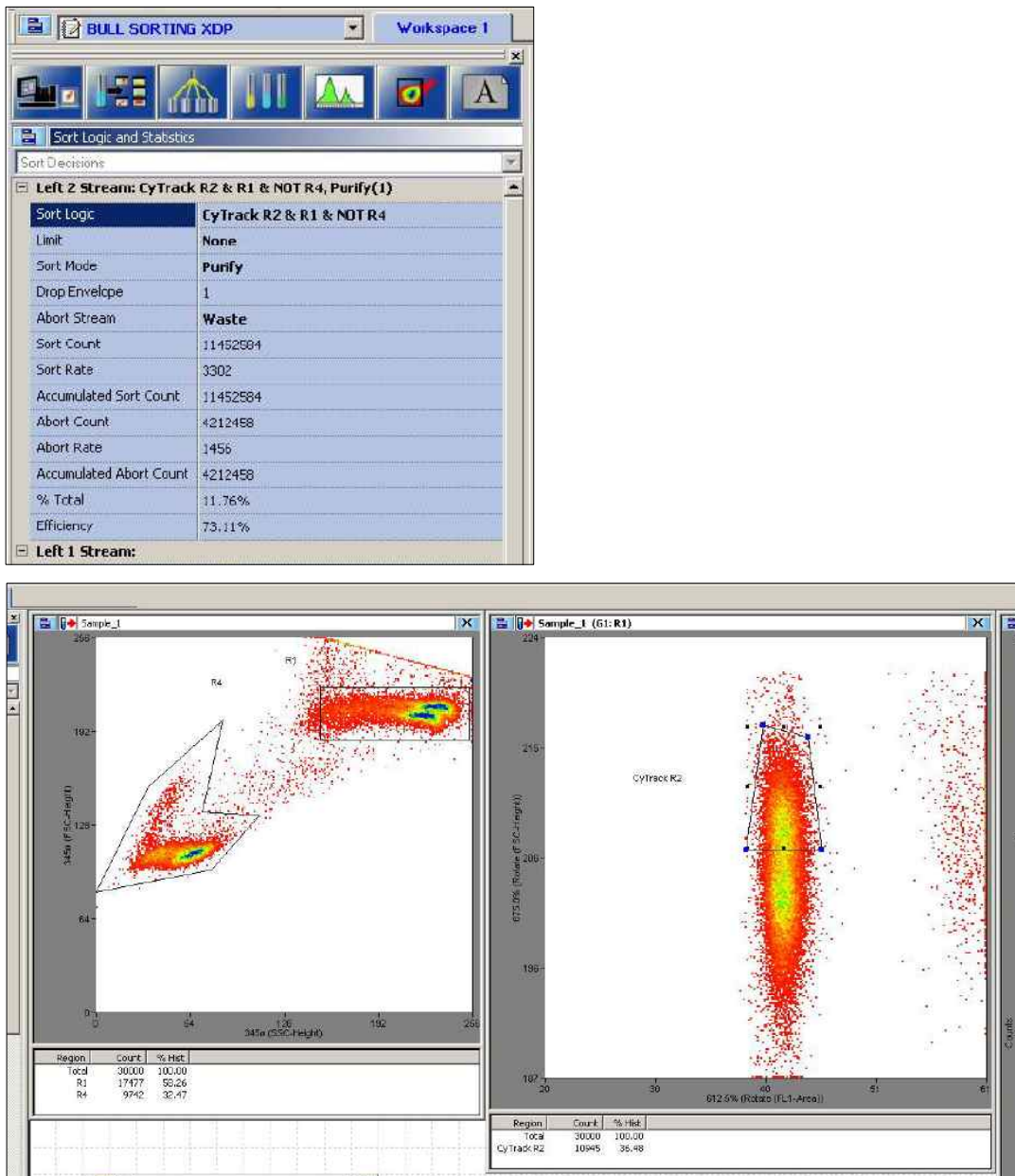


그림 42. Flow cytometer를 이용한 성분리 결과

자성정자의 분리는 58.26% (R1) 의 히스토그램과 그 중 36.48%의 Cytrack R2에서 획득되었음. 이때의 최고 분리속도는 초당 4,475마리였음.

표 41. 제주흑우정액 성감별 결과

Bull		BK0202
Raw Semen	Volume	8 ml
	Concentration	868 x 10 ⁶ /ml
Sort	Sort Rate	3000 sperm/sec
	Live Sperm*	58%
	Post Thaw Motility	X, 35% / Y, 35%

* Live and intact sperm before sorting

초당 대략 3,000개의 정자가 분리되었으며, 스트로당 2.5 x 10⁶ 자성정자를 넣어 동결하였고, 용해 후 운동성은 대략 35% 이었음. 또한 성감별된 정액을 다시 조사하였을 때, 자성 순도는 87~93%로 나타났음 (표 41 참조).

- 정액 희석액의 안정화로 성감별은 이루어졌으나 용해 후 생존율은 크게 개선되지 못함.

* 종모우 정액의 향상을 위해 사육 환경 개선이 요구되어지는 것으로 보임.

㉠ 성감별 제주흑우정자를 이용한 체외수정란 생산

흑우정액 BK0202 성감별 정자를 이용한 체외수정란 생산 효율은 다음과 같음. 체외수정 후 2일 째 조사된 체외수정율은 54.7~68.1% 였으며, 체외배양 8일 째 매우 낮은 배반포 형성율을 나타냄 (표 42 참조).

표 42. 성감별 제주흑우정자를 이용한 체외수정란 생산

Trial	No. of oocyte	No.(%) of embryos developed to			Remark
		Day2 ≥ 2-4 cell	Day 6 ≥ morula	Day 8 ≥blastocyst	
1st	53	28 (62.8%)	-	--	
2nd	96	43 (54.7%)	5	1	freezing
3rd	43	25 (68.1%)	13	3	
4th	82	41 (60.0%)	8	1	

(고찰)

제주도 내에 정자 성감별용 Flow cytometer를 설치하여 정자 활력을 최대한 유지하면서 성감별을 실시하는 것이 바람직하나, 장비 미비관계로 육지부로 정액을 반출하여 생식세포 성감별을 실시했음. 원정액이 성감별 실시를 위해 원거리로 이동해서 실험분석실(제주→육지)분석 되는 시간이 최소 5시간 최대 8시간이상이 소요되어 질적 저하를 야기했음.

지리적 여건에 따른 이유로 실험 횟수가 적어 비교 조사가 어려웠으며, 이에 따라 성감별 활용이 제대로 이루어지지 못했음. 특히 2010년은 구제역 발병이 오랫동안 지속되어 해당지역을 벗어나 실험을 하는 일이 용이하지 못했음.

성감별 처리 비용과 인공수정에 필요한 정자 수를 고려하면 성감별 정자를 이용한 인공수정은 현실성이 없어 보이며, 체외수정란을 생산하여 이식하는 것이 더 효율적일 것으로 사료되나, 성감별 정액을 동결하지 않고 바로 체외수정에 적용하면 체외수정율이나 체외발달율에서 의미있는 결과를 획득할 수 있었지만, 성감별 동결정액을 이용하면 용해 후 정자의 생존이나 운동성이 감소되어 수정란을 획득하는 데에 어려움이 있었음. 이러한 연구결과는 다른 연구자의 내용과 유사함.

Bermejo-alvarez (2010)에 의하면 flow cytometer를 활용하여 X-sorted sperm를 가지고 IVF를 하여 7일후 blastocyst의 발달율은 10.1%이고 Y-sorted sperm의 경우는 13.5%였음. 이들의 배반포의 발달율은 control (semen; 51.6%)와 비교하였을 때 각각 19.5%와 26%로 매우 저조한 값을 나타냈음. 그 이유는 대략 85% 이상 X-sperm 혹은 Y-sperm 분리가 가능하지만, thawing후 sorted sperm를 가지고 체외수정을 할 경우 정자의 운동성 및 capacitation이 원활하지 않아 수정능이 매우 저조함.

특히, 멸종위기 흑우 씨수소는 그동안 각 정액의 데이터베이스 구축이 제대로 구축되어 있지 않아 정액의 질적·양적 상태를 제대로 파악할 수가 없어 연구에 적용하기 어려워 체계적인 관리시스템 도입과 데이터베이스 구축이 요구되어오던 바, 다행스럽게도 연구 진행 5년차 제주특별자치도 축산진흥원과 국립 축산과학원 제주난지시험장내에 정액분석기 및 동결 자동화시스템이 구축되어 앞서 표 34-35에서 제시되고 있듯이 흑우 씨수소 및 씨수소후보군 정액 관리가 본격적으로 진행되고 있음.

따라서, 생식세포 성감별 기술을 현장에 유용하게 도입하기 위해서는 성감별 장비가 구축된 환경하에서 선별된 우량 종모우 정액을 이용해서 성감별을 실시한 다음, 적정수를 동결하여 사용하거나 바로 체외수정을 실시하는 것이 성감별 정자의 활력을 유지하면서 필요 정자수를 컨트롤할 수 있게 되어 바람직한 성과를 획득할 수 있게 될 것으로 기대됨.

2. 수정란 성감별

- 수정란 성감별 기술 도입
- 수정란 성감별용 프라이머 제작
- 수정란 성감별 적정화

가. PCR방법과 LAMP법을 이용한 수정란 성감별

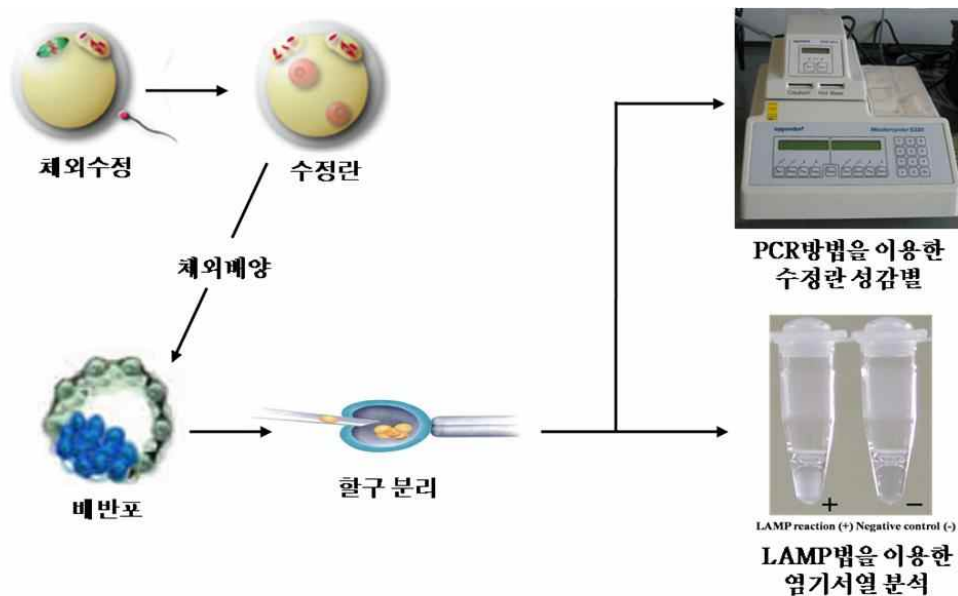


그림 43. 연구 추진 방법

(가) 연구방법

○ 소 수정란의 체외생산

- 미성숙난자의 체외성숙은 TCM-199 (Sigma) 배양액에 10% FBS와 FSH(1ug/ml)를 첨가하여 39 °C, 5% CO₂ 배양조건에서 22시간 동안 성숙시켰음. 체외 수정에서 정자의 농도는 2.5X10⁶spermatozoa/ml로 하여 체외수정 배양액에 Heparin (2ug/ml)과 PHE (18.2M penicillamine, 9.1M hypotaurine, 1.8M epinephrine) 를 첨가하여 48시간 동안 체외 수정을 실시하였음. 체외 배양은 CR1aa에 3mg/ml FAF를 첨가하여 48시간 동안 배양 후, 10% FBS 가 첨가된 CR1aa 배양액에 3-4일간 더 추가 배양하였음.

○ 소 수정란 할구 분리 및 성감별법 구축

- 성감별을 위해 수정란을 체외에서 생산하여 할구를 분리한 후, Y-chromosome specific primer로 PCR 증폭을 실시하고 PCR 산물을 분석함으로써 성감별을 실시하였음. 또한 정소

와 난소로부터 DNA를 분리해 대조구로 사용하여 성감별의 신뢰도를 높이며, 일부의 할구는 염색체를 분석함으로써, 성감별 유무를 재확인하였음 (그림 43 참조).

- Primer들을 각각 소의 male-specific DNA염기서열에서 conserved region의 sequence에 제한 효소 자리를 규명한 다음 repeated sequence를 피하여 복수로 작성하고, 예상되는 PCR산물의 길이는 1,000bp 이하로 실시하였음.
- PCR을 이용하여 성공적인 성감별을 위해 대조구로 사용될 정소와 난소로부터 체세포 DNA의 분리는 nonionic detergent와 proteinase K를 이용하여 Y chromosome이 함유된 DNA (positive control)는 정소조직에서, Y chromosome이 함유되지 않은 DNA (negative control)는 난소조직에서 추출하였음.
- 체외에서 배양된 수정란을 microblade가 부착된 micromanipulator로 분리하거나 또는 pronase를 이용해 투명대를 제거한 후 노출된 할구를 미세초자봉으로 분리하였음. 분리된 할구는 PCR 증폭을 위해 Peura 등 (1991) 이 보고 한 방법을 이용하여 전처리를 실시한 다음 PCR에서 DNA를 증폭시켰음.
- PCR 증폭은 Saiki 등(1988) 에 의해 보고된 방법과 소의 수정란에서 실시한 Peura 등 (1991)의 방법을 보완하여 95°C 에서 1분, 55°C 에서 2분, 72°C 에서 3분으로 총 30 cycles를 실시하며, 마지막 cycle에서는 72°C 에서 10분간 extension을 실시함. 대조구로 사용될 체세포 DNA의 증폭은 수정란 DNA를 증폭시키는 방법과 동일한 조건에서 실시하였음.
- 성감별의 신뢰도를 높이기 위하여 성감별에 사용된 배아 일부의 할구는 염색체 분석을 실시하였음. 염색체 분석은 Xian 등 (1992)이 보고한 방법을 보완한 것으로서 colcemid를 2시간 처리후 1% sodium citrate + 20% FBS의 저장액에서 1시간동안 처리하고 그 후 고정액 (acetic acid : methanol = 1 : 3)에 3회 고정시킨 후 Giemsa 염색액(5%)을 이용하여 염색 후 관찰하였음.
- 기존에 보고된 Y-encoded 된 testes specific gene (S4) 및 상동 유전자의 primer를 (5-CAAGTGCTGCAGAGGATGTGGAG-3 5-GAGTGAGATTTCTGGATCATATGGCTACT-3) 자체 제작하여 사용하며, 자체 개발된 성감별 기술을 검증하여 새로운 y-link 된 유전자의 좌위를 분리 분석하여 이들 유전자의 primer를 제작하고, 새로운 음성 혹은 자성 유전자의 발현을 수정란 내에서 확인하기 위해 RT-PCR 방법을 사용하였음.

(나) 연구결과

① PCR방법을 이용한 수정란 성감별

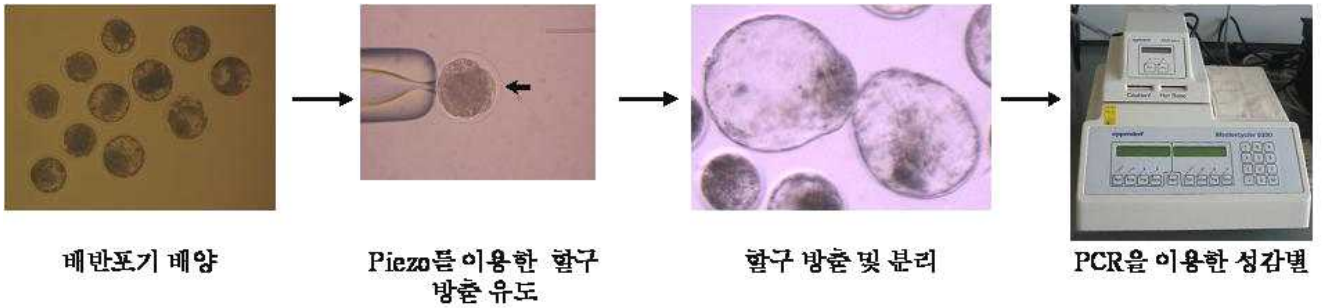


그림 44. PCR방법을 이용한 수정란 성 감별

② 웅성과 자성 대조군 성감별

- 성감별 대조구로 정소와 난소를 이용하여 실시하였음 (그림 45 참조). 그림에서 보이는 것과 같이 난소 샘플에서는 하나의 밴드가 발견되고 정소에서는 두개의 밴드가 발견되었음.

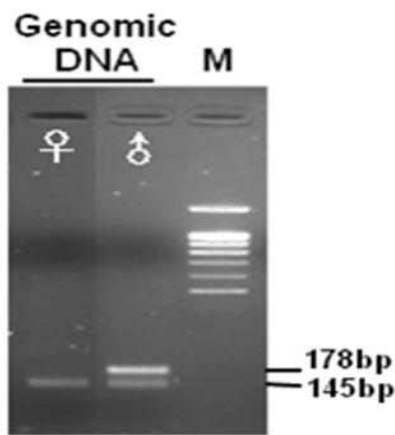


그림 45. 소의 웅성과 자성 샘플에서의 발견

③ PCR 방법을 이용한 수정란 성감별

- 예비 실험의 결과를 바탕으로 제 1세부 연구팀인 제주대학교 줄기세포 연구센터에서 제공된 배아를 이용하여 동일한 조건에서 PCR을 실시하고 증폭된 산물을 2.5% agarose gel 전기영동을 실시하여 EtBr로 염색을 한 다음 UV하에서 예상된 길이의 DNA band 유무로 판별을 하였음. 수정란에서 할구를 분리하여 샘플링한 결과 각각 자성 5, 웅성 6이 판정 되었음(그림 46 참조).

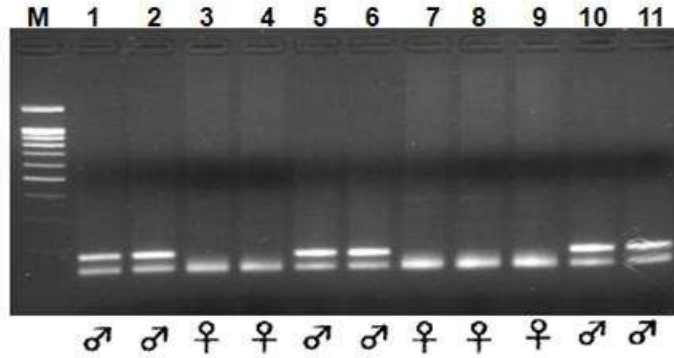


그림 46. PCR방법을 이용한 수정란 성 감별 확인

- 할구를 떼어낸 난자 중 양성(2번, 3번)과 자성으로 판정된 난자(2번, 3번)를 가지고 염기서열을 확인한 결과 PCR 결과와 동일한 염색체 분석 결과로 나타났음 (그림 47 참조).

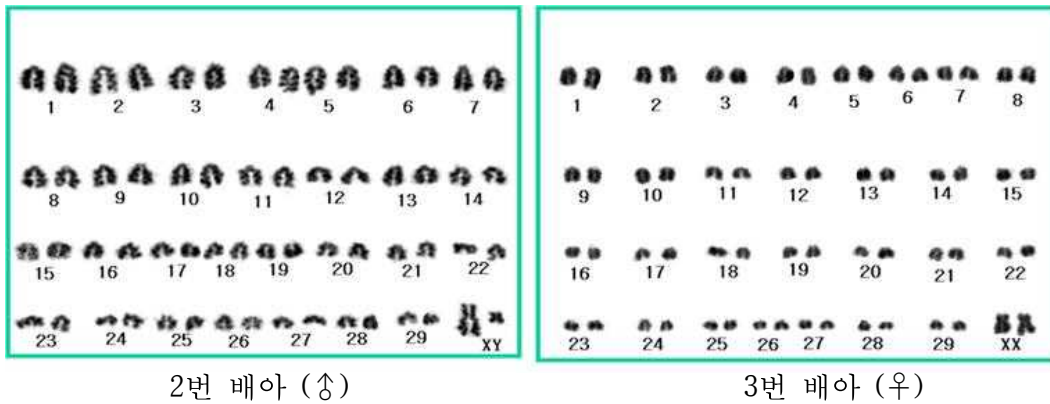


그림47. 소 수정란의 염색체 분석 결과

② Lamp법을 이용한 수정란 성감별

- 그러나, 동일한 수정란의 배아할구를 이용하여 Lamp법으로 염기서열을 분석한 결과 (그림 48 참조) 총 11개의 수정란 중 염색체 이상으로 판정불가가 2개가 나타나고 양성 5, 자성 4개가 일치하여 자성은 약 83%, 양성(음성)은 80%가 일치하는 결과를 얻었음 (표 43 참조).

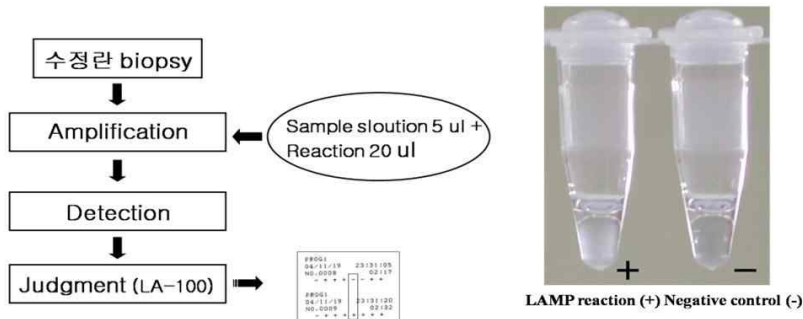


그림 48. LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 법을 이용한 염기서열 분석방법

㉔ PCR법과 Lamp법을 이용한 성감별 비교

표 43. PCR법과 Lamp법을 이용한 성감별 비교

방 법	수정란 수	♀	♂	판정 불가
PCR	11	5	6	0
Lamp	11	5	4	2
일 치	11	5	4	2

*따라서, 소 체외수정란의 성감별은 Lamp법보다는 PCR법을 이용하는 것이 결과 분석에 효과적임을 알 수 있었음.

**이상의 내용은 국내특허 출원하였음 (출원번호 10-2009-0035113).

나. Sexual Dimorphism (성별 이형성) 을 활용한 수정란 성 감별

체외수정으로 생산된 배반포기배를 Y-specific primer를 활용하여 genomic DNA로 부터 PCR 혹은 LAMP 시스템을 이용하여 수정란 성감별을 실시할 수 있으나, 이 분석과정에서 일부의 할구가 훼손되어 자궁에 이식후 임신율에 영향을 줄 수 있을 것으로 사료됨.

체외수정 후 임신율까지 난자의 성공률이 대략 25%라고 할 때, 흑우는 한우나 다른 소에 비교하여 난자의 공급이 원활하지 않고 매우 희소하다는 특수성으로 flow cytometer를 활용한 sorted sperm의 사용 그리고 PCR 또는 LAMP를 활용한 sexing 방법은 많은 난자가 필요하고 임신율도 낮다는 점을 고려할 때 임신율을 높일 수 있는 새로운 sexing 방법이 절실하게 필요함.

따라서, 1차 년도에 개발한 LAMP 방법보다 간단하고 임신율도 향상된 sexing 방법을 개발하였음. 그 방법은 sexual dimorphism을 활용하여 육안으로 sexing하는 것임.

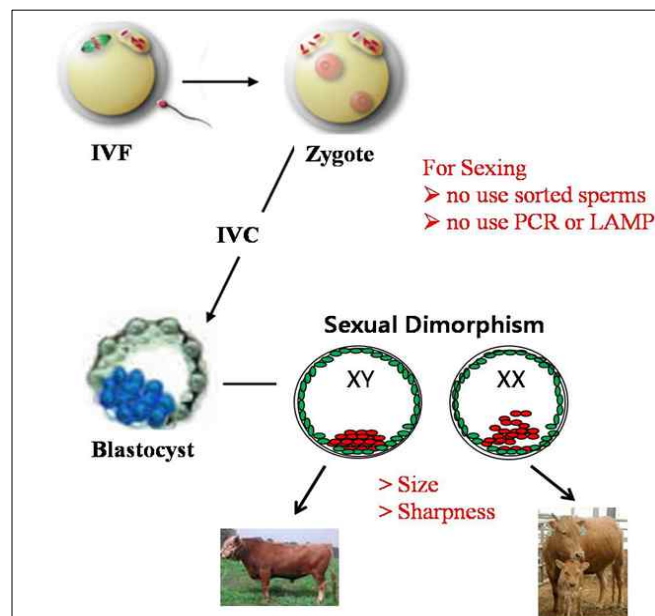


Fig. 49. A accurate method for sexing the bovine embryo using sexual dimorphism. The sexing method by sexual dimorphism is easy and accurate as compared to PCR sexing method or LAMP system

수정란 성별간 형태 차이를 조사하였던 바, 체외수정 7일후 male-blastocyst는 female-blastocyst와 비교하였을 때 크기와 투명도에 뚜렷한 차이가 발견되었음. Male-blastocyst는 female-blastocyst에 비해 크기가 크고 ICM과 TE의 구분이 뚜렷한 것에 비해 female-blastocyst는 male-blastocyst에 비해 크기가 작고 ICM이 cytoplasm에 흩어져 있는 형태를 보임. 이러한 사실은 Bermejo-alvarex 등 (2010) 연구진들에 의해 보고되었던 것과 일치하는 결과임.

Male-blastocyst와 female-blastocyst간에 sexual dimorphism을 나타내는 이유는 epigenetic difference(후성학 발달의 차이)에 기인하는 것으로 특히, male-blastocyst는 female-blastocyst에 비해 mitochondrial DNA number는 15% 많았으며, telomere length에서는 38% 적었고, methylation-related gene들의 발현량에서는 39.8% 높게 나타났음. 또한, blastocyst의 developmental speed, metabolism, 그리고 이들 간에 유전자 발현의 차이가 전체 전사량의 30% 이상이라는 것이 PNAS 저널 (Bermejo-alvarez 등, 2010)에 발표되었음.

이러한 sexual dimorphism 방법은 수정란 이식전에 blastocyst에 손상을 주지 않고 임신율을 높인다는 것과 고가의 flow cytometer나 sexing을 위한 PCR 기기 및 LAMP 시스템이 필요 없다는 장점이 있음.

실제 sexual dimorphism에 의한 sexing 방법이 얼마나 신뢰성이 있는지 알아보기 위해 우선 IVF로 수정된 난자를 IVC에서 키운 후 7일후 blastocyst 단계의 난자들을 sexual dimorphism(size and sharpness)으로 구분하여 각각의 tube에 넣고 genomic DNA를 분리한 후 amelogenin PCR에 의해 정확한 sex typing 하였고 이들 sexing 값과 sexual dimorphism에 의한 expected sexing 값 사이에 얼마나 일치하는지를 비교 분석하였음. 또한 sexual dimorphism으로 구분된 수정란을 대리모에 이식하여 임신율을 알아보았음 (그림 50 참조).

(가) 연구방법

○ 체외 성숙 (IVM)

- 도축 한우의 난소를 0.075 g/L penicilline (sigma G3035, U.S.A.)이 첨가된 0.9% NaCl solution (24~27°C)이 들어있는 보온병에 담아 도축 후 6시간 내에 실험실로 운반함. 운반된 난소는 0.9% NaCl solution으로 3회 세척하여 혈액과 이물질을 제거함. 형태적으로 이상이 없는 난소에서 18G 주사 바늘이 부착된 20 ml 주사기를 이용 직경 2~8 mm의 가시난포에서 난포액을 흡입하여 난포란을 회수함. 회수된 난포란은 HEPES가 함유된 TCM-199 용액으로 2~3회 세척한 후 난포세포가 부착된 세포질이 치밀한 난포란만을 선발하여 실험에 공시하였음. 난포란의 체외 성숙은 IVMD101(IFP, Japan) 배양액 220 μ l가 들어 있는 6-well plate(IFP, Japan)에 난포란 20~25개를 넣고 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 22~24 시간 동안 실시함.

○ 체외 수정 (IVF)

- 한우 동결 정액 1개를 실온에서 10초간 방치한 후 38°C 온수에서 20초간 용해함. 15 ml 원심 분리관 (Corning, U.S.A.)의 상층에 2 ml 90% percoll (Sigma, U.S.A.), 하층에 2 ml 45% percoll을 분주하고 90% percoll 상층부에 용해된 정자를 조심스럽게 첨가하여 700 g에서 20분간 원심 분리함. 하층부의 정자만을 분리하여 2 ml 체외 수정용 배양액인 IVF-100 (IFP,)에 각 20~25개씩 난포란을 넣고, 정자 농도가 1~2X10⁶ sperms/ml로 조정하여 39°C, 5% CO₂ 배양기에 6시간 동안 배양하여 체외 수정을 유도함.

○ 체외 배양 (IVC)

- 체외 수정된 수정란 (배양 1일째)을 IVMD101로 2~3회 세척한 후 6-well plate에 20~25개씩 넣고 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양함. 배양액은 배양 후 48시간마다 50%의 신선한 배양액으로 교체하며, 배양 2일째 분할율과 배양 7일째에 배반포 수정란 발달율을 조사함. 본 실험에 사용된 체외 배양용 배양액은 TCM-199 (5% FBS), IVMD101 (5% FBS) 및 IVMD101(10% FBS)임.

○ 수정란 동결 보존 및 용해

- 수정란의 동결 보존을 위해서 채란된 수정란은 10%의 FBS가 첨가된 D-PBS로 3~4회 세척한 다음, 1.8 M의 ethylene glycol에서 10분 동안 정치함. 수정란이 장착된 스트로는 -7°C의 동결기에 장착하여 10분 동안 식빙을 실시한 다음 0.5°C/분의 속도로 -32°C까지 수정란을 동결함. 동결된 수정란은 수정란을 이식할 때까지 액체 질소통에 보관함. 동결 수정란은 공기 중에 5초 동안 용해한 후 온수에서 용해함. 용해 후, 수정란은 SOF 배양액에서 24시간 동안 배양하여 생존이 확인된 수정란만을 수정란 이식에 이용함.

○ 수정란 이식 및 임신 진단

- 수란우는 충청북도 지역에서 사육중인 미경산우와 경산우를 각각 사용함. 수란우의 발정은 자연 발정 또는 발정 유도를 하였고, 발정이 확인된 수란우는 이식 전에 직장 검사를 통하여 황체가 형성된 것만을 사용하였음. 실험 조건에 따라 생산된 수정란은 10% FBS 첨가 TCM-199가 들어있는 0.25 ml 스트로에 정착하여 37~39°C 상태로 3시간 내에 운반하여 이식에 제공하였음. 수정란 이식은 황체가 있는 자궁각 선단부에 비외과적으로 이식하였음. 수정란 이식 후 15일경에 발정이 재귀되지 않은 소를 1차적으로 확인한 다음, 이식 후 60일경에 직장 검사를 통하여 임신 여부를 확인하였음.

○ Amelogenin PCR 방법을 이용한 성감별법 구축

- 소의 amelogenin sequence로부터 specific primer는 AMELX (Genbank accession no: NM_001014984)와 AMELY (GenBank accession no: NM_174240)를 ClustalW 프로그램으로 alignment하여 Y-chromosome의 amelogenin에서 63 bp가 deletion된 부위를 활용하여 forward primer (5'-CAG CAA CCA ATG ATG CCA GTT C-3')과 reverse primer (5'-GTC TTG TCT GTT GCT GGC CA-3')를 디자인함. 이들 primer로 PCR하게 되면 367 bp X-amplicons와 304 bp Y-amplicons를 얻을 수 있음. Blastocyst로부터 genomic DNA의 분리는 DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, USA)를 활용하여 분리함. Kit에 제공된 100 ul lysis buffer는 blastocyst가 들어 있는 각각의 1.5 ml tube 에서 10분 동안 incubation하여 blastocyst를 lysis 시킴. Lysis buffer를 neutralization한 후, PCR 증폭은 Saiki 등(1988) 의해 보고된 방법과 소의 수정란에서 실시한 Peura 등 (1991)의 방법을 보완하여 95°C에서 10분간을 cycle하였고 그 다음 95°C에서 30초, 62°C에서 30초, 그리고 72°C에서 30초로 총 30 cycles를 실시하였고 마지막 cycle에서는 72°C에서 10분간 extension을 실시함. 대조구로 사용될 수컷과 암컷의 체세포 DNA의 증폭은 수정란 DNA를 증폭시키는 방법과 동일한 조건에서 실시함. 증폭된 산물은 2.5% agarose gel 전기영동을 실시하여 EsBr로 염색을 하여 UV 빛 하에서 예상된 길이의 DNA band 유무로 성판별을 함. 또한 이들 PCR 산물이 예견된 염

기배열을 갖고 있는지를 알기 위하여 pGEM T-easy vector에 cloning한 후 T7 혹은 SP6 sequencing primer를 활용하여 sequencing을 수행하여 일치 여부를 확인하였음.

(나) 연구결과

① Sexual Dimorphism을 활용한 수정란 성 감별

일반적으로 IVF 7일후 배반포 난자들은 크게 두 가지 그룹으로 구분됨. 크기, inner cell mass의 위치 그리고 세포질 투명도의 차이로 구분할 수 있는데, 본 실험에서는 XX-blastocyst 그룹 (크기가 평균보다 작고, inner cell mass가 균질하지 않으며 세포질에 흩어져 있는 모습으로 투명도가 낮음) 과 XY-blastocyst 그룹 (발달율이 좋아 크기가 평균보다 높고, inner cell mass가 TE와 뚜렷이 구분되며 세포질의 투명도가 뛰어남)으로 나누어 구분하였으며, 이러한 형태적 차이는 sexual dimorphism에 기인하는 것으로 사료됨 (그림 50 참조).

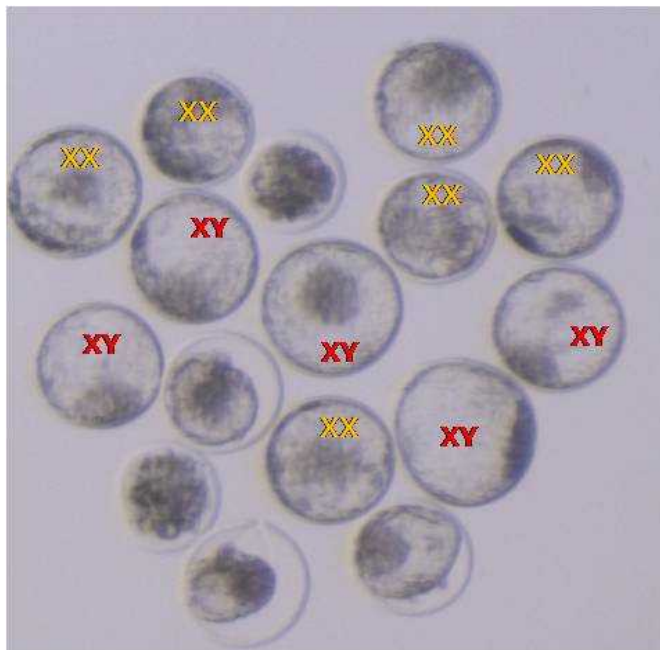


Fig. 50. Sexual dimorphism between bovine embryos. The differences of size and sharpness between male-embryo and female-embryo in blastocyst in vitro on day 7 are derived from sexual dimorphism. XX indicates female-blastocyst candidate and XY indicates male-blastocyst candidate.

Sexual dimorphism으로 분류된 두 그룹이 실제 PCR sexing을 했을 때 기대치와 얼마나 차이를 보이고 정확한지를 알아보기 위해 형태적으로 차이를 보이는 두 그룹인 XX-blastocyst candidate 그리고 XY-blastocyst candidate로부터 genomic DNA를 분리하였음 (그림 51 참조). 좀 더 정확한 PCR sexing을 위해 Amelogenin PCR 방법을 이용한 성감별법 구축하였음 (그림 52 B 참조).

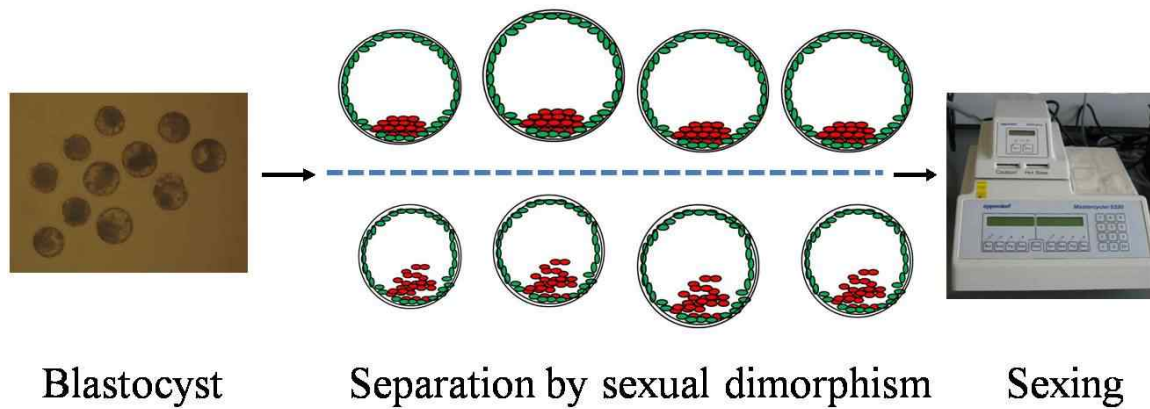


Fig. 51. Verification of sexing by PCR technique with bovine blastocysts separated using sexual dimorphism.

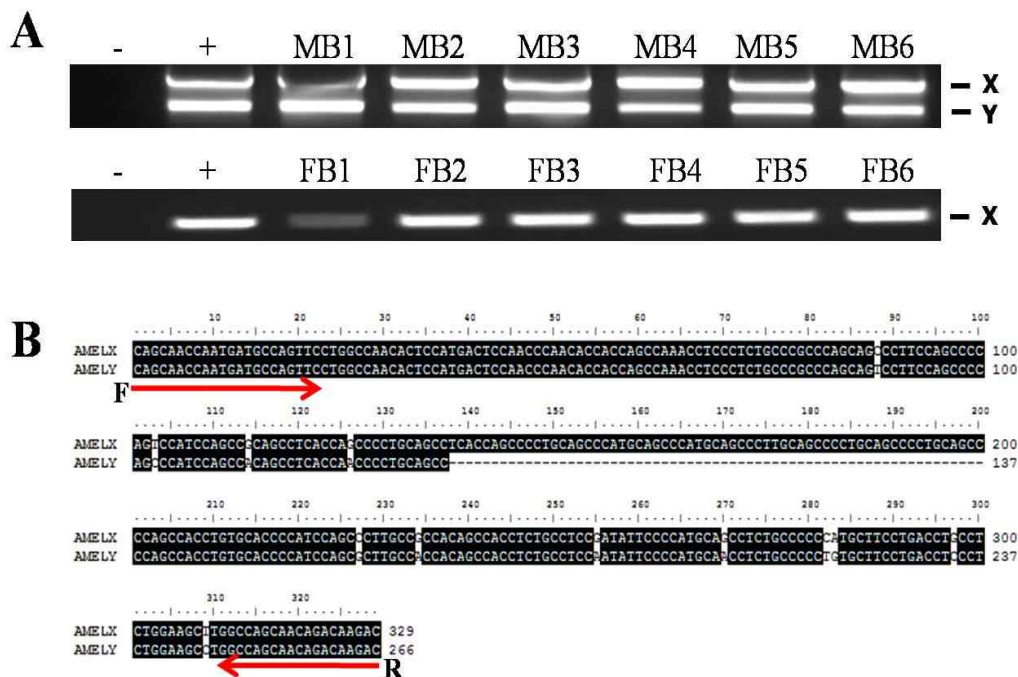


Fig. 52. Representative amelogenin PCR product from genomic DNA of male-blastocyst candidates (MB1~MB6) or female-blastocyst candidates (FB1~FB6). A, Male genomic DNA produces a 329 bp X-amplicon and a 266 bp Y-amplicon. Female genomic DNA produced only the 329 bp X-amplicon. - indicates negative control, water instead of genomic DNA and + indicates positive control (genomic DNA of bull or cow). B, The bovine amelogenin sequences (AMELX, GenBank accession no: NM_001014984; AMELY, GenBank accession no: NM_174240) were aligned using ClustalW program to identify the 63 bp deletion to which flanking PCR primers were designed. F indicates forward primer of amelogenins (AMELX or AMELY; 5'-CAG CAA CCA ATG ATG CCA GTT C-3') and R indicates reverse primer of amelogenins (AMELX or AMELY; 5'-GTC TTG TCT GTT GCT GGC CA-3').

본 연구에서 체외 성숙 (IVM), 체외 수정 (IVF) 그리고 체외 배양 (IVC)이 배반포 난자 이식에 적합하도록 발달하였는지 알아보기 위해 난할율과 배반포발달율을 조사하였음. 체외수정 7일후 배반포의 발달율은 53.7%로 나타났음 (표 44 참조).

Table 44. Cleavage rate and blastocyst formation after IVF

COCs, n	Cleaved, n (%)	Blastocysts on Day 7, n	
		Total* (%)	Cleaved# (%)
132	109 (82.5)	71/132 (53.7)	67/109 (61.4)

*Number of blastocysts from the total number of cumulus oocytes complexes (COCs); #number of blastocysts from the cleaved oocytes.

IVF 후 blastocyst 단계에 있는 난자들의 크기와 투명도 및 형태에 따라 male-blastocyst 혹은 female-blastocyst로 구분하였음. 그 기준은 여러 배반포 난자들중 크기가 크고 ICM의 형태가 뚜렷하며 세포질의 투명도가 뛰어난 것을 male-blastocyst 그룹으로 분류하였으며, 크기가 작고 ICM의 형태가 뚜렷하지 않으면서 흩어져 있는 형태와 세포질의 투명도가 낮은 것을 female-blastocyst 그룹으로 나누었음.

또한, 발달율이 낮고 형태적으로 구분할 수 없는 난자들은 제외하였음. 첫 번째 21개의 배반포 난자들중 sexual dimorphism으로 female-blastocyst는 7개 그리고 male-blastocyst는 9개로 구분하였으나, 5개는 제외 하였음. 실제 PCR sexing으로 확인 된 것은 기대했던 7개의 female-blastocyst중 5개 (71.4%) 19개의 male-blastocyst중 8개 (88.9%)가 확인되었음.

두 번째 23개의 배반포 난자는 7개의 female-blastocyst를 기대하였으나, 실제 5개 (71.4%)였고 male-blastocyst인 경우 10개를 기대하였으나 실제 8 (80%)였고. 마지막으로 27개의 배반포 난자는 9개의 female-blastocyst를 기대하였으나, 실제 7개 (77.8%)였고 male-blastocyst는 12개를 기대하였으나 실제 10개 (83.3%) 확인되었음. 평균적으로 볼 때, female-blastocyst는 23개를 기대하였으나 실제 17개 (73.9%)였고, male-blastocyst 31개를 기대하였으나 실제 26개 (83.9%) 확인되었음.

실제 실험에 사용된 배반포 난자의 수가 부족하고 sexual dimorphism으로 sexing 방법에 신뢰성을 주는 더 많은 확인 실험이 필요하다 할지라도, male-blastocyst 확인율이 female-blastocyst보다 13.5% 높게 확인되었음. 그 이유는 male-blastocyst와 female-blastocyst간에 mitochondrial DNA copy 수를 정량하였을 때 male-blastocyst이 female-blastocyst보다 15% 높게 나타났고 그 만큼 크기와 형태에서 female-blastocyst보다 구분하기 용이하였다는 것에서 그 이유를 찾을 수 있다고 사료됨.

Table 45. Measured XX vs XY ratio as determined by amelogenin PCR, as compared to the expected values by sexual dimorphism

Blastocyst on Day 7, n	Expected sexing number by sexual dimorphism		Sexing determination by PCR		
	XX	XY	0	XX* (%)	XY# (%)
21	7	9		5/7 (71.4)	8/9 (88.9)
23	7	10		5/7 (71.4)	8/10 (80)
27	9	12		7/9 (77.8)	10/12 (83.3)

* Number of blastocysts from the total number of expected XX sexing; #number of blastocysts from the total number of expected XY sexing.

또한, IVF 7일후 배반포 난자들을 sexual dimorphism을 활용하여 XX-embryo candidate와 XY-embryo candidate로 나누어 수정란 이식을 수행하였음. 이식을 진행한 결과 현재 expected XX-embryo에서는 52두중 12두가 확인되어 23.1%의 임신율이 확인되었고 expected XY-embryo에서는 64두중 25두가 확인되어 39%의 높은 임신율을 확인하였음 (표 46 참조).

Table 46. Pregnancy rate after transferring in vitro produced bovine blastocysts using sexual dimorphism

Grouping by sexual dimorphsim	No. of transferred recipient	Pregnancy (n)	Pregnant rate(%)	Parturition (n)	Parturition rate(%)
Expected XX-embryos	52	12	23.1	0	0
Expected XY-embryos	64	25	39.0	0	0

(고찰)

*흑우 수정란 성감별은 흑우 암소 도축 수량이 적어 기술적으로 활용하기 어려운 한계가 있음.
흑우 대량증식을 통한 기반이 마련된 이후에 적용할 기술로 사료됨.

따라서, 과제 2년차 2010년 년차보고서 제출에 따른 보완 요구사항 지시 내용 (“수정란 성감별 보다는 정자 성감별을 활용한 수정란 생산으로 이식 실시가 바람직하다”) 으로 양질의 흑우정액을 생산하여 정자 성감별을 실시하는 방향으로 연구를 전환하여 현재 Flow cytometer 로 성감별된 정액으로 과배란 후 인공수정을 실시함으로서 수정란 이식을 진행 중에 있음.

제4절 제주흑우 수정란 동결 기술 개발 및 이식

1. 수정란 동결 기술 개발

체내·체외에서 생산된 상실배 또는 배반포기배 동결은 상황에 따라 완만동결, 급속 동결과 초자화동결, 직접이식용 동결을 실시함.

- i) 완만동결은 과배란유기와 인공수정으로 생산된 체내수정란 동결에 사용함.
- ii) 급속동결과 초자화동결은 체외수정란 동결에 사용함.
- iii) 직접이식용 급속동결은 필드에서 직접이식 목적으로 동결 스트로 제작할 때 사용함.

완만동결 (slow freezing)

체내에서 생산된 상실배 혹은 배반포기배는 각 1개씩 동결액 (1.8M 에틸렌글리콜과 0.5M 스크로스) 이 충전된 스트로에 넣어 미리 프로그램화된 동결기에 장착하고 0℃에서 -7℃ 까지 분당 1℃씩 온도가 강하되게, -7℃에서 -35℃까지는 분당 -0.3℃씩 온도가 강하되게 하였고 -35℃에서 -196℃ 액체질소통에 옮겨 보관함.

급속동결 (rapid freezing)

체외에서 생산된 배반포기배를 필드에서 직접이식할 목적으로 동결할 때에는 10% (v/v) glycerol (G) 에서 5 min 동안 그리고 10% G 와 20% ethylene glycol (EG) (v/v) 에서 5 min 동안 전 처리한 다음 25% G 와 25% EG (v/v) 가 들어있는 동결액에 노출 시킨 후 0.25 ml French mini straw에 장착하여 heat sealing한 뒤 3분간 기화 질소 가스에 노출시킨 뒤 액체 질소에 넣어 보관함.

☞ 이 방법은 2007년 우량 한우 난소를 이용한 엘리트 송아지 생산 예비실험에서 사용된 것으로 제주시 두 군데 농가 10마리에 이식하여 4 (40.0%) 마리 임신되는 결과를 얻었고 2008년 4마리 분만되는 결과를 얻었음 (2008년 제출한 연구개발계획서 자료 참조).

초자화동결 (vitrification)

고농도의 동해제 (30~40%) 를 사용하여 결빙없이 배아를 초급속으로 동결하는 방법으로 체외에서 생산된 우량 한우 배반포기배를 유리화동결하기 위해 10% EG가 들어있는 전처리 용액에서 5분간 처리한 뒤 30% EG가 들어있는 동결액에 노출하여 자체 제작된 straw에 장착한 뒤 액체질소에 바로 담금.

☞ 이 방법을 사용하여 엘리트 제주 한우 송아지 생산목적으로 2008년 7월 제주도내에 6마리 대리모에 이식해서 2마리 임신되는 결과를 얻었음.

직접이식용 급속 동결 (Direct one-step thawing)

이식 현장에서 융해하여 바로 이식하는 초자화동결-One-step융해 방법을 개발하였음.

동결 (vitrification)

Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS, Gibco) 에 10% FBS를 첨가하여 기본 용액으로 사용하였으며, 초자화동결 용액은 glycerol (G, Sigma)과 ethylene glycol (EG, Sigma) 을 혼합하여 사용함. 체세포핵이식 배반포기배를 동결하기 전에 10% G가 첨가된 D-PBS (+10% FBS) 에서 5분, 10% G (v/v) 와 20% EG (v/v)가 첨가된 D-PBS (+10% FBS) 에서 5분씩 순서대로 처리하여 탈수화평형을 유도한 후 피펫을 사용하여 25% G와 25% EG가 혼합된 D-PBS (+FBS)에 20 ~ 30초간 노출 시킨 후 0.25 ml French 미니 스트로에 장착하고 열 봉입함. 제작된 스트로는 LN₂ vapor에 3분간 노출하여 냉각시킨 후 -196°C LN₂ 에 바로 침지함. 1-단계 용해를 위한 스트로 내의 구성층은 자체 제작 (Kim 등, 1999) 하였으며 다음과 같이 준비함. 7.5 cm (0.5몰 슈크로스층) - 0.5 cm (공기층) - 1.0 cm (G25EG25 초자화동결액층, 난자가 들어가는 층) - 0.5 cm (공기층) - 1.5 cm (0.5몰 슈크로스층) 으로 슈크로스와 초자화동결액이 9:1 비율로 희석될 수 있게 준비함.

1-단계 용해 간편법 (one-step dilution)

동결 스트로는 25°C 물에서 수직상태로 놓아 30초 다시 뒤집어서 수직상태로 30초간 방치하여 스트로 내의 내용물이 완전히 섞이도록 함. 1-단계 용해 후 체외 발달율을 조사하기 위한 대조군은 LN₂ vapor 노출을 제외한 초자화동결 전-처리용액과 1-단계 용해액에 순차적으로 처리한 후 배양액으로 최종 세척한 다음 공-배양함으로써 동결-용해 처리용액의 독성 유무를 조사함.

가. 동결-융해 수정란에 대한 항산화제 플라보노이드 처리효과

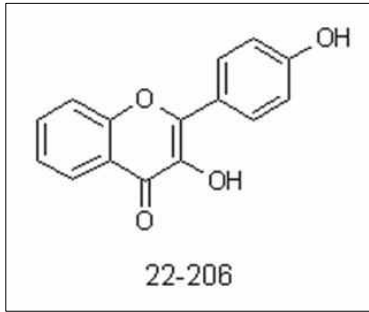


그림 53. 3 ‘4’ -dihydroxyflavone

본 연구에 사용된 합성 플라보노이드는 3 ‘4’ -dihydroxyflavone (ICC, INDOFINE Chemical Company, Inc, NJ, USA) 을 사용하였고, DMSO (dimethyl sulfoxide) 에 용해하여 이용하였다.

항산화제인 플라보노이드는 이미 체외수정 배아의 체외 발달 시 첨가제로서 배발달을 증가, 세포수 증가, 세포사멸을 감소 등으로 효과가 있음을 이미 확인한 바 있음.

플라보노이드 처리가 동결배아의 생존율에 미치는 영향

위의 내용을 바탕으로 플라보노이드를 배반포기배 동결 전후에 처리한 후 생존율에 미치는 영향을 조사하였다. 단위발생으로 생산된 4~8세포기 배아의 체외 배양액 내에 그리고/또는 동결 전/후 배양액내에 플라보노이드 10uM을 처리하여 융해 후 생존율에 미치는 영향을 조사하였음.

표 47. 플라보노이드 처리가 동결 배반포기배의 생존율에 미치는 영향

Treatment of flavonoid			No. of embryos	No. (%) [*] of survived embryos
	Before freezing	After thawing		24h later after thawing (≥ Re-expanded Bla.)
Control	-	-	79	45(57.0) ^a
	-	+	73	50(68.5) ^{a,b}
Flavonoid 10uM	+	-	73	47(64.4) ^{a,b}
	+	+	75	57(76.0) ^b

* p<0.05

표 47에 제시된 바와 같이, 플라보노이드 무처리군(-/-) 의 융해 후 생존율은 57.0% (45/79)인 반면 동결전과 융해 후 처리군 (+/+) 의 경우 생존율이 76.0% (57/75) 로 나타나 플라보노이드 처리 효과가 유의하게 있음을 확인하였다. 또한, 동결전 (+/-) 이나 융해 후 (-/+) 플라보노이드 처리군의 경우 융해 후 처리군이 더 높은 생존율을 나타내어 융해 후 플라보노이드 처리가 동결배아의 생존에 더 좋은 영향을 미친다는 것을 알 수 있었음.

플라보노이드 처리된 동결 배아의 세포 사멸을 조사

용해 후 각군에서 생존한 배아의 세포 사멸을 조사하기 위해 TUNEL (terminal deoxynucleotide transferase-mediated dUTP nick end labeling) 염색을 실시하였음. 분석을 위해 회수된 실험군의 배반포기배는 1mg/ml polyvinylpyrrolidone가 들어 있는 PBS (처리용액)에 3번 세척하고 3.7% paraformaldehyde 에 1시간 동안 실온에서 고정을 실시하였음. 고정된 배아는 처리용액으로 다시 세척하고 0.3% Triton X-100 용액으로 실온에서 1시간동안 침투를 유기하였음. 배아는 다시 처리용액으로 2회 세척한 다음, 광을 차단시킨 채로 37°C 배양기에서 형광물질이 부착된 dUTP 와 terminal deoxynucleotidyl 전환 효소 (Roche, Mannheim, Germany) 에 1시간 동안 반응을 유도하고, 40 mg/ml propidium iodide (PI, Sigma) 와 50 mg/ml RNase A 용액에 넣어 1시간동안 핵 염색을 실시하였음. 반응이 끝난 배아는 처리용액으로 충분히 세척하고 슬라이드글라스에 옮겨 커버슬립으로 누른 후 형광 현미경하에서 관찰하였음 (Olympus, Tokyo, Japan). 세포사멸 판정은 다음과 같음. 배아 내 전체 세포핵은 붉게 염색되나 그 중 사멸 핵은 푸르게 녹색으로 염색되고 파편화 되어 있는 양상을 볼 수 있음. 세포사멸율은 염색결과를 이머징하여 총세포핵수에서 사멸핵수를 백분율로 조사하여 나타내었음.

$$\text{아폽토시스 지수 (apoptotic index, \%)} = \frac{\text{아폽토 핵수 (No. of apoptotic body)}}{\text{총세포 핵수 (No. of total nucleus)}} \times 100$$

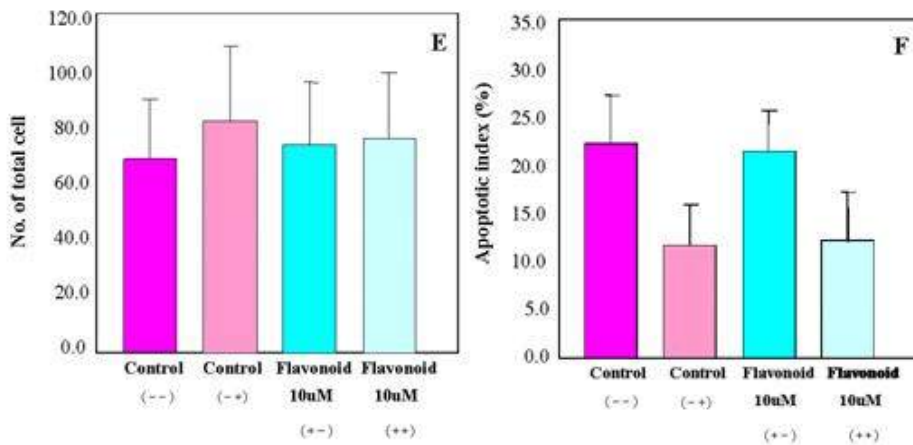
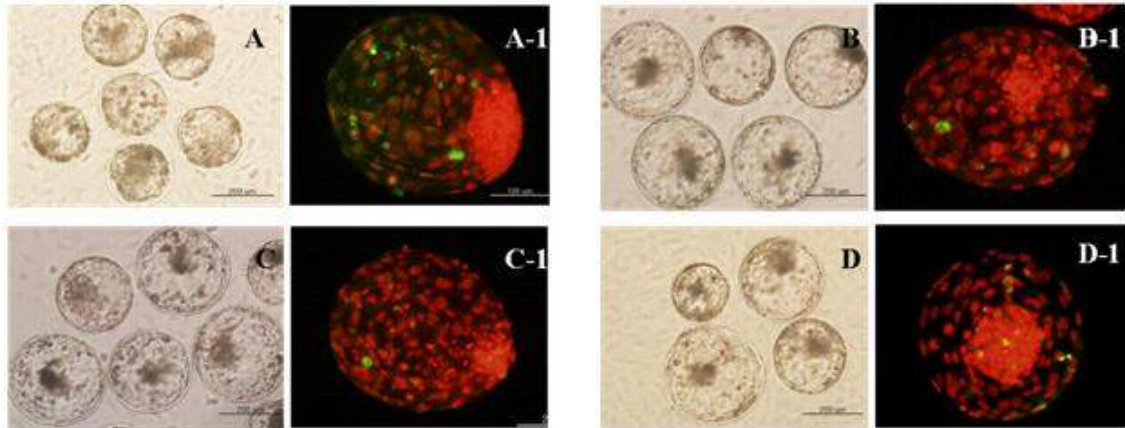


그림 54. 플라보노이드 처리에 따른 동결 배아의 세포사멸을 조사. A) 동결 전-융해후 무처리군 (-/-). B) 융해 후 처리군 (-/+). C) 동결 전 처리군 (+/-). D) 동결 전-융해 후 처리군 (+/+). E) 총세포수 조사 F) 세포사멸율 조사.

그림 54에 제시된 바와 같이, 융해 후 (-/+) 혹은 동결 전/융해 후 (+/+) 플라보노이드 처리군의 세포 사멸율이 (≒10%) 무처리군 (-/-) 또는 동결 전 처리군 (+/-)의 세포 사멸율 (>20%) 에 비해 유의하게 감소되는 경향을 나타내었음.

*따라서, 동결배아의 플라보노이드 처리는 a) 동결배아의 세포사멸율을 감소시켜 생존율을 증진시키며 b) 특히 융해 후 첨가가 생존에 효과적임을 알 수 있었음.

**이상의 내용은 국내특허 출원하였음 (국내특허 10-2009-0035114).

나. 미수정란 동결 기술의 적정화

외부환경 변화 가능성에 따른 난자 확보 (구제역 발생 등.) 및 우수 미수정란을 보관하고 활용하기 위하여 그 이용 가능성을 조사함. 우수 유전자원 보존 및 활용에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대됨.

(1) 미수정란 동결 시 CCB/Taxol 처리 효과

; 동결 시 동해로부터 난자를 보호하기 위해 Cytochalasin-b (CCB)와 TAXOL의 처리 효과를 조사하였음.

표 48. 동결 미수정란의 융해 후 체외 발달

Treatment		No. of embryos				No. of total cells (ICM)
		Day2 (≥ 2cell)	Day4 (≥ 4cell)	Day6 (≥ morular)	Day8 (≥ blastocyst)	
Control	40	30 (75%)	22 (73.3%)	5 (16.7%)	4 (13.3%)	148.3±50 (39.8±21.9)
CCB	33	22 (66.7%)	17 (77.3%)	6 (27.3%)	6 (27.3%)	153±77 (27.8±7.8)
TAXOL	43	26 (60.5%)	20 (76.9%)	7 (26.9%)	6 (23.1%)	94.4±32.4 (19±8.6)

융해 후 생존율은 70~85%였으며, 수정율은 60.5~66.7%로 대조군의 75%에 비해 낮았음. 배양 8일 째 배반포 형성율은 23.1~27.3%를 나타내었으며, 세포수 조사에서 CCB처리군은 대조군과 유사한 총 세포수와 내부세포피수를 나타내어 세포질보호에 효과가 있음을 알 수 있었음 (표 48과 그림 55 참조).

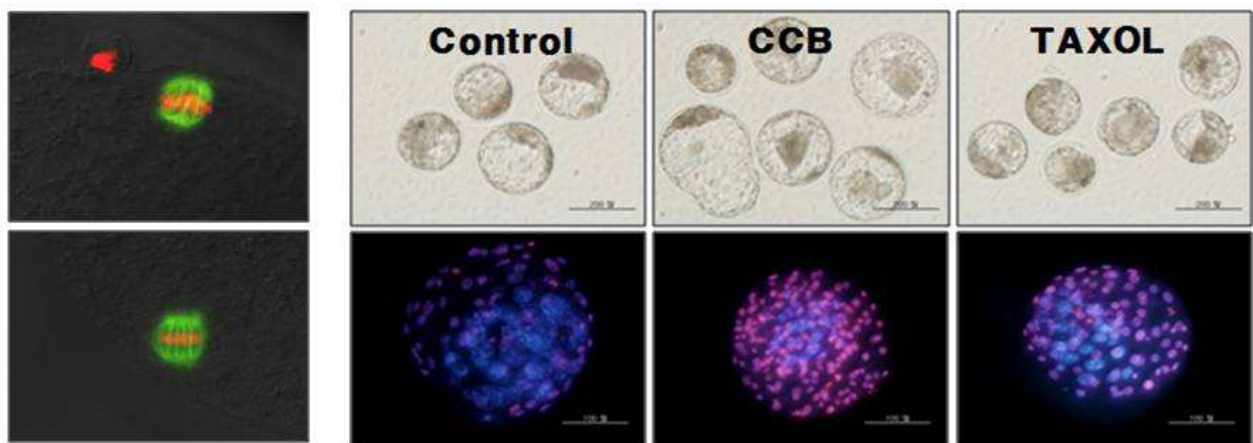


그림 55. 동결-융해후 생존한 미수정란의 염색 중기상태 (좌) 와 동결 미수정란의 융해 후 체외수정으로 생산된 배양 8일째 배반포기 배아 (우)

미수정란 동결 후 용해하여 동결에 따른 미수정난자의 세포골격 이상 유무를 조사하였던 바, CCB와 TAXOL처리가 무처리군에 비해 세포골격과 염색체 증기상 유지에 효과가 있음을 알 수 있었음.

(2) 동결 미수정란을 이용한 복제수정란 생산기술

동결 보관된 미수정란을 급속 용해 → 1시간 배양하여 평형을 유지 → 생존 미수정란만을 골라 히알루로니다제를 이용하여 난구세포를 제거 → Oosight imaging system을 이용하여 탈핵 → 핵치환 → 1시간 배양하여 평형을 유지 → 세포 융합 → 난활성유도 → 8일간 배양

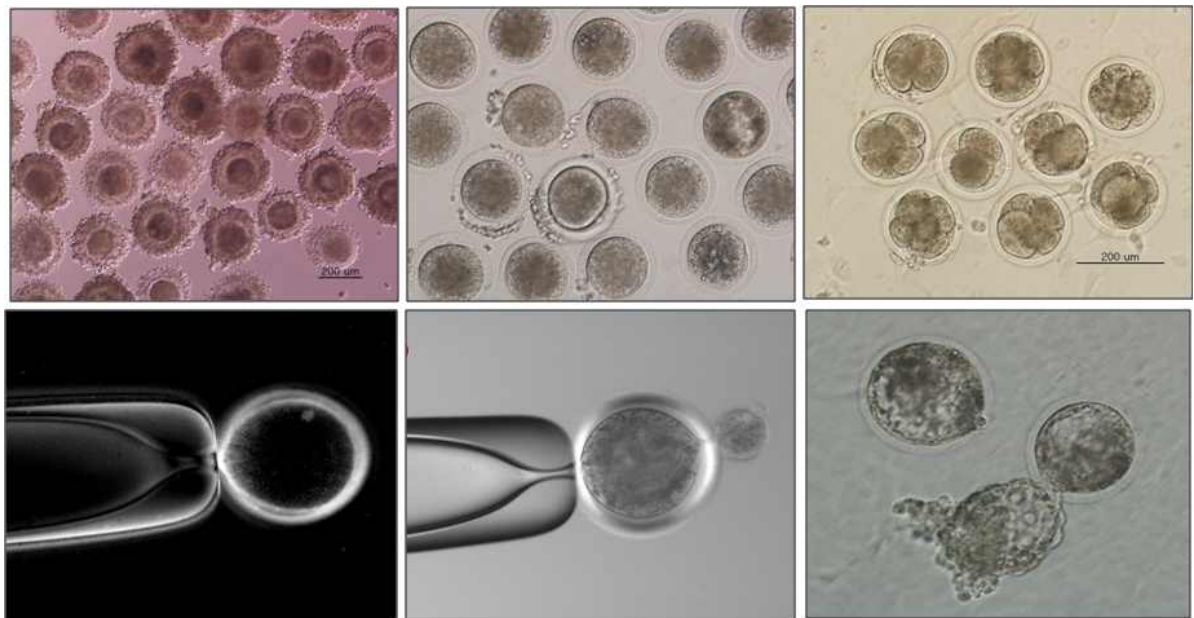


그림 56. 동결 미수정란을 이용한 체세포 복제

표 49. 동결 미수정란을 이용한 복제수정란 생산

Survival rate	Fusion rate	Cleavage rate	No.(%)* of embryos developed to		
			Day 4 ≥ 8cell	Day 6 ≥ morula	Day 8 ≥ blastocysts
82/123 (66.6)	40/62 (64.5)	24/40 (60.0)	18 (75.0)	10 (41.6)	2 (8.3%)

(고찰)

*우량 유전 미수정 난자를 동결 보존하여 체외수정 및 체세포 복제에 활용할 수 있음. 또한, 미수정난자의 동결이 충분히 이루어지면 구체역에 따른 우수 유전자원 손실을 회복하는 데에 이용될 수 있음 (난자은행 가능).

2. 동결 기술 활용

가. 완만동결

- 제주축산진흥원 소유의 15년 이상되어 폐기될 도축 제주흑우 종빈우의 난소를 채취하여 흑우 체외수정란 생산을 시도하였음. 이 연구는 제주축산진흥원 내 연구실에서 제주대학교 줄기세포 연구센터 및 미래생명공학연구소의 기술지원으로 체외수정란 발생 실험이 진행됨.

표 50. 제주흑우 체외수정란 생산 및 이식

일련번호 (도축번호)	회수난자	배아 발달 비율 (%)			비고
		2일째 ≥ 8세포	4일째 ≥ 상실배	6일째 ≥ 배반포	
1 (94-14)	22	19 (82.2)	9 (47.4)	4 (21.1)	동결 및 이식
2 (23)	11	11 (100.0)	5 (45.5)	0 (0.0)	-

두 마리의 난소로부터 33개 (22개, 11개) 의 미성숙난자를 회수하였고, 우수 흑우 정액 (BK01-11) 으로 수정하여 30개 (90.9%) 의 수정란을 획득하였으며, 배양 7일에 한 군의 소로부터 4개의 초기 배반포기배 및 상실배를 획득하였음 (표 50과 그림 57 참조).



그림 57. 제주흑우 난자와 정자의 체외수정으로 생산된 배양 2일째(좌)와 배양 6일째(우)배아

15년 이상된 제주 흑우 종빈우의 난소로부터 획득된 것으로 체외수정은 잘 이루어졌으나(90.9%) 난자의 건강도가 약하여 체외발달은 원활하게 되지 않아 이식 가능한 수정란 수 (4개) 는 적었음.

4개의 수정란은 제주축산진흥원 소재 동결기를 이용하여 완만동결을 실시하였고, 융해 후 대리모에 각각 1개씩 이식하였음.

*흑우 수정란 이식을 위해 생산된 체내수정란은 대부분 완만동결을 실시하여 보관하였다가 대리모를 선정하여 이식을 실시함.

나. 초자화동결과 1-단계 용해된 체세포핵이식란의 직접이식기술로 제주흑우 복제소 생산 ; Production of Cloned Jeju Black Cattle (Korean Cattle) from SCNT Embryo Using Vitrification, One-Step Dilution and Direct Transfer Technique

제주흑우 복제수정란을 초급속으로 동결해 두었다가 대리모가 선발되었을 때 필드에서 1-단계 용해 한 후 직접이식하는 방법으로 제주 흑우 씨암소를 생산하는 쾌거를 이루었음.

Abstract

One-step dilution and direct transfer would be a practical technique for the field application of frozen embryo. This study was to examine whether Jeju Black Cattle (JBC, Korean Cattle) can be successfully cloned from vitrified and one-step diluted somatic cell nuclear transfer (SCNT) blastocyst after direct transfer. For vitrification, JBC-SCNT blastocysts were serially exposed in glycerol (G) and ethylene glycol (EG) mixtures [10% (v/v) G for 5 min., 10% G plus 20% EG (v/v) for 5 min., and 25% G plus 25% EG (v/v) for 30 sec.] which is diluted in 10% FBS added D-PBS. And then SCNT blastocysts were loaded in 0.25 ml mini straw, placed in cold nitrogen vapor for 3 min. and then plunged into LN₂. One-step dilution in straw was done in 25°C water for 1 min, by placing vertically in the state of plugged-end up and down for 0.5 min, respectively. When *in vitro* developmental capacity of vitrified SCNT blastocyst was examined at 48 h after one-step dilution, hatched rate (56.4%) was slightly lower than that of control group (62.5%). In field trial, when the vitrified-thawed SCNT blastocysts were transferred into uterus of synchronized 5 recipients, a cloned female JBC was delivered by natural birth on day 299 and healthy at present. In addition, when the short tandem repeat marker analysis of the cloned JBC was evaluated, microsatellite loci of 11 numbers was perfectly matched genotype with donor cell (BK94-14). This study suggested that our developed vitrification and one-step dilution technique can be applied effectively on field trial for cloned animal production, which is even no longer in existence.

(Key words : Jeju Black Cattle, SCNT blastocyst, Vitrification, One-step dilution, Direct Transfer)

서 론

체세포핵이식 배반포기배의 체외발달율이 체외수정란의 배반포기배 발생율과 유사한 30-50% 로 보고되고 있는 반면 (Lonergan 등, 2007), 복제소 생산 효율이 낮은 이유는 체외에서의 장시간 동안 기계적·화학적 여러 과정을 거치는 데에 따른 스트레스, 불안정한 체외 배양 환경, 발생된 배아의 이식 후 착상 실패 또는 불완전한 착상으로 인해 분만까지의 비율이 낮은 데서 찾을 수 있음. 한편, 우량 유전자원 또는 멸종위기 동물 복제수정란의 유용성을 높이기 위해서는 생산된 체세포핵이식 배반포기배의 동결보존기술이 선행 확립되어야함.

일반적으로 복제수정란은 다수의 환경요인에 의한 질적 저하가 우려되므로 동결하지 않고 바로 이식하는 것이 대부분이나 복제수정란의 임신과 산자 발생율을 높이기 위해서는 우수한 자궁상태를 보유한 수란우 선정과 더불어 적절한 시기에 언제든지 이식할 수 있는 안정된 복제수정란 동결 기술개발이 필요함. 지금까지, 복제소 생산에 대한 많은 보고가 이루어져 왔으나 대부분 신선 복제수정란 이식에 의한 결과로 체세포핵이식 유래 동결배반포기배 이식을 통한 복제소 생산은 극소수에 불과하며 (Tecirlioglu 등, 2003; Gong 등, 2004) 더욱이 필드에서 바로 적용할 수 있는 초간편법을 이용한 결과는 없는 실정임.

따라서 본 연구는 제주에서만 서식하는 토종자원인 제주흑우의 귀세포를 이용하여 생산된 체세포핵이식 배반포기배를 자체 개발된 초자화 동결방법으로 -196°C 에 냉동보존하고 일정시간이 경과한 다음 초간편 1-단계 방법으로 용해하여 곧 바로 수란우 자궁에 이식한 후 체내발생율을 검토함으로써 체세포핵이식 동결배반포기배를 이용한 제주흑우 복제소 생산 가능성 및 동결-용해 방법의 유용성을 조사하고자 실시하였음.

재료 및 방법

소 난자의 회수 및 체외성숙

본 실험에 공시될 도축된 소 난소로부터 난자의 회수 및 체외성숙은 Kim 등 (2010)의 방법에 준하여 실시하였음. 도축장에서 채취한 난소를 2-4 시간 이내에 $32-37^{\circ}\text{C}$ 생리 식염수에 유지하여 실험실로 운반한 뒤 직경 2-6mm의 난포로부터 채취하여 사용하였음. 실체현미경하에서 획득된 미성숙난자는 난구세포가 부착되어있고 세포질이 균일한 난자만을 선별하였고 TL-HEPES로 세척하여 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)가 첨가된 TCM-199 (Gibco-BRL) 배양액에 0.2 mM Na-pyruvate (Sigma, St. Louis, MO, USA), 1 $\mu\text{g/ml}$ FSH (Sigma), 1 $\mu\text{g/ml}$ estradiol-17 (Sigma)와 50 $\mu\text{g/ml}$ gentamycin (Sigma)를 넣어 38.8°C , 5% CO_2 조건하에서 20 시간 동안 체외 배양하여 성숙을 유도하였음.

제주흑우 체세포핵이식배아의 생산 및 체외 배양

체외성숙된 소 수핵 난자는 0.1% hyaluronidase (Sigma)가 첨가된 TL-HEPES 배양액에서 난구세포를 제거한 뒤 제 1극체가 방출된 난자만을 선별하여 사용하였음. 탈핵될 난자는 7.5 $\mu\text{g/ml}$ cytochalasin B (Sigma)가 첨가된 TCM-HEPES 배양액 소적으로 옮겨 Oocyte Imaging System (CRi) 카메라를 blinking 옵션으로 지정한 후 핵의 위치를 확인하여 탈핵 하였음. 공여 체세포는 2007년 제주특별자치도 축산진흥원 소재 제주흑우 우수혈통 종빈우 (BK94-14, 우)의 귀세포를 채취하여 체외에서 배양하여 동결 보관하였던 것으로 4-8 계대의 세포를 사용하였음. 핵이식 시 공여 체세포는 Tryple 용액 (Gibco)으로 처리하여 단일세포로 분리한 후 3% proteinase (Sigma) 용액에 50 초간 처리하고 TCM-HEPES 배양액으로 3번 세척한 후 10 μm 크기의 체세포를 골라 핵이 제거된 수핵 난자의 투명대와 세포질 사이의 공간에 이식하였음. 체세포가 주입된 난자는 0.3 M mannitol (Sigma) 용액 내에서 LF101 Electro Cell Fusion Generator (NEPA GENE, Shioyaki, Japan)을 사용하여 직류 22 volt에서 1pulse로 세포 융합을 실시하였으며 세포융합 여부는 30분 후에 관찰하였음. 융합이 확인된 핵이식란은 5 μM Ca-ionophore (Sigma)에 5분 노출시키고 2.0 mM DMAP (Sigma)에서 3시간 동안 배양하여 난

활성을 유도하였음. 핵이식 후 활성화 처리된 난자는 3 mg/ml FAF-BSA (Sigma) 가 들어 있는 CR1aa 배양액에 옮겨 배양하고 배양 48시간 째 분열된 핵이식 배아는 동일 개체의 체세포로 단층배양이 유도된 10 ul 소적에서 1 ug/1mL Epidermal growth factor (Bio-Research Product, Inc, North Liberty, Iowa), 1 ug/1mL Insulin-like growth factor (Bio-Research Product), 10 uM flavonoid (3,4' -Dihydroxyflavone; INDOFINE Chemical Co., Inc, Hillsborough, NJ) 와 10% FBS 가 들어있는 CR1aa 배양액으로 공동 배양함으로써 배 발생을 유도하였음.

체세포핵이식 배반포기배의 초자화동결

Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS, Gibco) 에 10% FBS를 첨가하여 기본 용액으로 사용하였으며, 초자화동결 용액은 glycerol (G, Sigma)과 ethylene glycol (EG, Sigma) 을 혼합하여 사용하였음. 체세포핵이식 배반포기배를 동결하기 전에 10% G가 첨가된 D-PBS (+10% FBS) 에서 5분, 10% G (v/v) 와 20% EG (v/v)가 첨가된 D-PBS (+10% FBS) 에서 5분씩 순서대로 처리하여 탈수화평형을 유도한 후 피펫을 사용하여 25% G와 25% EG가 혼합된 D-PBS (+FBS)에 20 ~ 30초간 노출 시킨 후 0.25 ml French 미니 스트로에 장착하고 열 봉입하였음. 제작된 스트로는 LN₂ vapor에 3분간 노출하여 냉각시킨 후 -196°C LN₂ 에 바로 침지하였음. 1-단계 용해를 위한 스트로 내의 구성층은 자체 제작 (Kim 등, 1999) 하였으며 다음과 같이 준비되었음. 7.5 cm (0.5몰 슈크로즈층) - 0.5 cm (공기층) - 1.0 cm (G25EG25 초자화동결액층, 난자가 들어가는 층) - 0.5 cm (공기층) - 1.5 cm (0.5몰 슈크로즈층) 으로 슈크로즈와 초자화동결액이 9:1 비율로 희석될 수 있게 준비하였음. 각 스트로 당 넣는 체세포핵이식 배아 수는 2 개였음.

1-단계 용해 간편법 (one-step dilution)

동결 스트로는 25°C 물에서 수직상태로 놓아 30초 다시 뒤집어서 수직상태로 30초간 방치하여 스트로 내의 내용물이 완전히 섞이도록 하였음. 1-단계 용해 후 체외 발달율을 조사하기 위한 대조군은 LN₂ vapor 노출을 제외한 초자화동결 전-처리용액과 1-단계 용해액에 순차적으로 처리한 후 배양액으로 최종 세척한 다음 공-배양함으로써 동결-용해 처리용액의 독성 여부를 조사하였음.

수란우 발정동기화, 1-단계 용해 체세포핵이식 배반포기배 이식 및 복제소 생산

수란우 준비는 CIDR-PLUS를 질 내 7일간 삽입하고 제거하는 당일 PGF₂ α 25mg을 투여하는 방법으로 발정동기화를 유도하였음. 스트로 내에서 1-단계로 용해된 체세포핵이식 배반포기배는 발정 동기화 처리된 대상우 중 정상적인 발정을 보이고 이식 당일 (발정 발현 7~8일째) 직장 검사를 통하여 황체 상태가 양호한 개체를 선발하여 황체가 존재하는 자궁각에 곧 바로 이식되었으며, 700회 이상 수정란이식 경험을 가진 전문기술자 2명에 의해 수행되었음. 수란우의 임신 진단은 동결-용해된 복제수정란 이식 후 45일째에 직장 검사법에 의하여 임신 여부를 진단하였음. 분만시기가 가까이 올 10일 ~ 20일 전부터 수란우의 분만 징후를 관찰하고 적절한 시기에 정상적인 분만이 이루어지도록 유도하였음.

통계처리

초자화동결 후 1-단계 용해된 체세포핵이식 배반포기배의 생존율에 대한 결과는 SAS program을 이용하여 분석하였으며, 처리군 간 유의성은 Duncan's multiple range test를 이용하여 검정하였음.

결 과

○ 초자화동결 체세포핵이식 제주흑우 배반포기배의 1-단계 용해 후 체외발달율 조사

초자화동결 체세포핵이식 제주흑우 배반포기배의 1-단계 용해 후 체외발달율의 결과는 표 51과 그림 58에 제시된 바와 같음. 액체질소에 노출 없이 초자화동결 전-처리용액과 1-단계 용해액 [슈크로스와 초자화동결액 (9:1) 혼합액] 에만 단계적으로 처리한 대조군과 초자화 동결/1-단계용해 처리군에서 회수된 복제수정란을 체외배양 환경에서 48 시간 동안 배양 하였을 때, 처리군에서 용해 후 생존율은 84.6% (33/39) 였으며, 생존 배반포기배 (그림 58 A) 중 부화 배반포기배 (그림 59B) 로의 발달율은 56.4% (22/39) 로 대조군 62.5% (25/40) 에 비해 약간 낮았으나 유의차는 인정되지 않았음. 본 실험은 5회에 걸쳐서 조사되었음.

Table 51. *In vitro* survival of vitrified and one-step diluted bovine SCNT blastocyst

Treatment	No. of SCNT blastocyst	No. (%) of recovery	No. (%) of survived after 48 h	
			≥Hatching blastocyst	Hatched blastocyst
Control*	40	40 (100.0)	40 (100.0)	25 (62.5)
Vitrification & One-step dilution	39	39 (100.0)	33 (84.6)	22 (56.4)

*Fresh SCNT blastocysts were treated sequentially in vitrification solution and then in one-step dilution solution except LN₂ exposure, respectively.

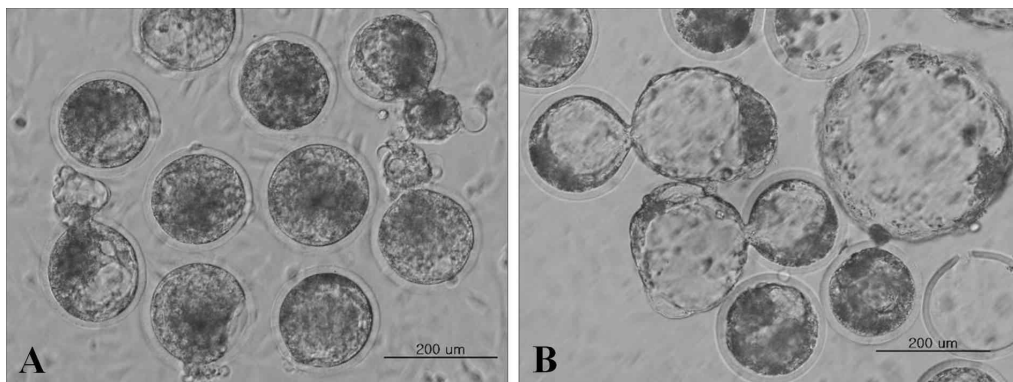


Fig. 58. *In vitro* survival morphology of vitrified Jeju Black Cattle SCNT blastocysts after one-step dilution. After co-culture with monolayered ear cell for 24 h (A) and 48 h (B), survived embryos were normally developed into hatching and hatched stages, respectively.

○ 초자화동결 체세포핵이식 제주흑우 배반포기배의 1-단계 용해 후 직접이식에 따른 임신결

과

초자화동결 체세포핵이식 배반포기를 1-단계 용해 방법으로 녹인 후 곧 바로 발정동기화가 유도된 5 마리의 수란우 자궁에 이식한 결과, 한 마리의 수란우에서 이식 후 45일째 정상임신이 확인되었음. 이후 정상 임신기간 보다 2주가량 경과하여 299일 째에 제주흑우 씨암소 체세포핵이식 복제 송아지가 성공적으로 자연분만 되었고 생시체중은 36 kg 이었음. 또한, 복제 송아지 “흑우순이“ 는 101일 째 (2011년 2월 9일 현재) 체중은 85 kg으로 건강하게 성장하고 있음.

Table 52. Production of cloned Jeju Black Cattle from vitrified-thawed SCNT embryo

No. of transferred embryo	No. of recipient	No. of pregnancy	No. of birth calf	No. of living calf
10	5	1	1	1

*Vitrified SCNT embryos were one-step diluted in 25°C water for 1 min. and then directly transferred into surrogate mother in field.

**A healthy and apparently normal cloned Jeju Black calf was born on day 299.

고 찰

본 연구는 우수 혈통 제주흑우 복제소를 생산함에 있어서 체세포핵이식 배반포기 배아를 초자화동결 보존해 두었다가 수란우가 준비되는 시점에 맞추어서 초간편 1-단계 용해방법으로 녹이고 수란우 자궁에 곧 바로 이식하는 전형적인 필드용 동결-용해 방법으로 복제송아지 생산이 가능함을 보여줌.

초자화동결은 고농도의 동해방지제를 이용하여 동결 시 세포 상해의 주된 원인이 되는 결빙이 형성되지 않게 하면서 난자를 수분 내에 동결하는 방법으로 (Rall 과 Fahy, 1985), 고가의 장비가 필요하지 않고 효율이 높아 실험동물을 포함 인간배아 동결에서도 두루 적용되고 있는 실용적인 동결 방법임. 그리고 동결란의 용해는 일반적으로 36°C 물에서 급속 용해되고 동해방지제 제거를 위해 여러 단계의 세척과정을 실시하는 것이 보통임. 실험동물을 포함한 인간의 시험관아기 기술에서도 동결란의 용해는 실험실에서 이루어져 이식이 실시되므로 반드시 필드를 고려하는 용해방법에 대한 연구가 필요하지 않음. 한편, 1-단계 용해는 가축 생산의 산업화를 위해 필드 적용 목적으로 개발된 초간편법으로 전문적인 기술 없이도 누구나 쉽게 할 수 있는 유용한 방법임 (Massip 등, 1984; Voelkel 과 Hu, 1992).

하지만, 체내수정란 및 체외수정란에 대한 연구 보고는 있으나 (Suzuki 등, 1990; Dochi 등, 1998) 복제수정란을 초자화동결하고 초간편법으로 용해하여 산자를 획득한 보고는 드뭄. Tecirlioglu 등 (2003) 은 복제수정란을 OPS (open pulled straw) 방법을 이용하여 초자화동결을

실시하였고, 용해는 OPS 스트로에서 희석용 스트로로 다시 옮겨 담은 2-단계로 실시하여 이식함으로써 이식 14두 중 복제소 1두를 획득하였음. Gong 등 (2004) 은 복제수정란을 EFS40 용액에 노출하는 2-단계 방법으로 동결하였고 용해 시 배양접시에 쏟아내어 2-단계로 세척한 후 다시 이식용 스트로에 장착하여 이식함으로써 이식 9두 중 복제소 1두를 생산하였음. 그러나 앞서 소개한 두 방법 모두 필드에서 바로 적용하기는 어려운 실정이어서 본 연구에서 보고한 내용이야말로 처음으로 필드 적용 동결방법에 의한 복제소 생산 예라고 할 수 있음. 본 연구의 차별성은 이식용 스트로를 이용해서 초자화동결을 실시하고 1-단계 용해하여 (1분 소요) 바로 이식하는 최 단시간 이식 간편법으로 필드 어디에서나 환경의 제약 없이 이용할 수 있는 유용한 방법임.

이번에 개발된 초자화동결/1-단계 용해 후 직접이식기술 방법의 유용성 및 안전성은 이미 본 연구팀이 체외수정란을 이용한 선행연구로서 제주도 일부 농장에서 시행한 한우 엘리트 송아지 생산 시도에서 40% 분만을 (4/10) 을 획득하여 그 가능성을 확인한 바 있음 (Park 등, 2008). 이러한 안정된 동결-용해 기술을 바탕으로 본 연구에서는 2007년에 냉동 보관해둔 제주특별자치도 축산진흥원 보유의 제주흑우 암소 (BK94-14, 우, 1994년 7월 25일 출생, 2008년 12월 5일 도축) 의 귀 체세포를 이용해 핵이식 배반포기배를 생산하고 2개씩을 각 스트로에 장착하여 초자화동결 방법으로 보관해 두었다가, 그 중 일부를 초간편 용해법으로 녹인 후 이식하여 '현존하지 않는 최우량 혈통 제주흑우 씨암소 종을 복원'하는데 성공하였음.

따라서, 본 연구에서 개발된 초자화동결과 1-단계 용해 및 직접 이식 기술은 체세포핵이식 배반포기배 뿐만 아니라 체내·외 수정란 활용에 효과적으로 이용될 수 있을 것이며 제주흑우의 대량 증식 기술 개발 및 산업화의 기반 기술구축뿐만 아니라 구제역등 예견되지 않는 자연환경질환으로 인해 사라지는 우수 종 보존과 멸종위기의 우수 혈통 복원에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대됨.

*이상의 내용은 *Reproduction Development and Biology* 2011년 35권 77-83에 게재됨.

초자화 동결과 1-단계 용해된 체세포 핵이식란의 직접 이식 기술로 제주흑우 복제소 생산

김은영^{1,2}, 박민지^{1,2,5}, 김재연^{1,2}, 박효영^{1,2}, 노은지^{1,2,5}, 노은형^{1,2,5}, 송동환^{2,5}, 오창언²,
김영훈³, 문성호², 이동선⁵, 고분석⁴, 류기중⁵, 박세필^{1,2,5*}

¹미래생명공학연구소, ²제주대학교 줄기세포연구센터, ³제주특별자치도 축산진흥원,
⁴국립축산과학원 난자축산시험장, ⁵제주대학교 생명자원과학대학 생명공학부

Production of Cloned Jeju Black Cattle (Korean Cattle) from SCNT Embryo using Vitrification, One-Step Dilution and Direct Transfer Technique

Eun Young Kim^{1,2}, Min Jee Park^{1,2,5}, Jae Youn Kim^{1,2}, Hyo Young Park^{1,2}, Eun Ji Noh^{1,2,5},
Eun Hyung Noh^{1,2,5}, Dong Hwan Song^{2,5}, Chang Eon Oh², Young Hoon Kim³, Seong Ho Mun²,
Dong Sun Lee⁵, Moon Suck Ko⁴, Key Zung Riu⁵ and Se Pill Park^{1,2,5,*}

¹Mirae Biotech, Seoul 143-854, Korea, ²Jeju National University Stem Cell Research Center, Seoul 143-854, Korea
³Jeju Special Self-Governing Province, Institute for Livestock Promotion, Jeju 690-180, Korea
⁴National Institute of Subtropical Agriculture, Jeju 690-150, Korea, ⁵Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

ABSTRACT

One-step dilution and direct transfer would be a practical technique for the field application of frozen embryo. This study was to examine whether Jeju Black Cattle (JBC, Korean Cattle) can be successfully cloned from vitrified and one-step diluted somatic cell nuclear transfer (SCNT) blastocyst after direct transfer. For vitrification, JBC-SCNT blastocysts were serially exposed in glycerol (G) and ethylene glycol (EG) mixtures [10% (v/v) G for 5 min, 10% G plus 20% EG (v/v) for 5 min, and 25% G plus 25% EG (v/v) for 30 sec.] which is diluted in 10% FBS added D-PBS. And then SCNT blastocysts were loaded in 0.25 ml mini straw, placed in cold nitrogen vapor for 3 min, and then plunged into LN₂. One-step dilution in straw was done in 25°C water for 1 min, by placing vertically in the state of plugged-end up and down for 0.5 min, respectively. When *in vitro* developmental capacity of vitrified SCNT blastocyst was examined at 48 h after one-step dilution, hatched rate (56.4%) was slightly lower than that of control group (62.5%). In field trial, when the vitrified-thawed SCNT blastocysts were transferred into uterus of synchronized 5 recipients, a cloned female JBC was delivered by natural birth on day 299 and healthy at present. In addition, when the short tandem repeat marker analysis of the cloned JBC was evaluated, microsatellite loci of 11 numbers was perfectly matched genotype with donor cell (BK94-14). This study suggested that our developed vitrification and one-step dilution technique can be applied effectively on field trial for cloned animal production, which is even no longer in existence.

(Key words : Jeju Black Cattle, SCNT blastocyst, Vitrification, One-step dilution, Direct transfer)

서 론

체세포 핵이식 기술에 의한 포유동물 생산은 1997년 영국의 Wilmut 등이 미양에서 최초로 보고한 이래 생쥐 (Wakayama 등, 1998), 염소 (Baguisi 등, 1999), 돼지 (Polejaeva 등, 2000), 토끼 (Chesne 등, 2002), 고양이 (Shin 등, 2002) 등 다양한 종에서 연구 결과가 보고되었

으며, 복제소 생산의 경우 1998년 Kato 등과 Cibelli 등에 의해 연구 결과가 보고된 바 있고, 우리나라에서도 Im 등 (2001)과 Kim 등 (2010)이 한우 복제소 생산에 대하여 보고한 바 있다. 그러나, 체세포 핵이식에 의한 복제소 생산 효율은 인공수정이나 체외수정란에 비해 매우 낮아 분만율이 7% 미만 정도인 것으로 보고되고 있다 (Heyman 등, 2002; Yang 등, 2008).

체세포 핵이식 배란포기배의 체외발달율이 체외수정란

* 본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업(과제번호 308008-5)의 지원에 의해 이루어진 것임.

* Corresponding author : Phone: +82-2-457-8758, E-mail: sppark@jejunu.ac.kr

제5절 제주흑우 유전형질 검출 및 분석

- 제주흑우 고유 표지인자를 이용한 선발 체계 확립
- 제주흑우의 친자 감별 시스템 구축
- 제주흑우의 등록 및 계통도 조사
- 한우 및 타 품종과의 유전적 특이성 분석

1. 제주흑우 친자확인을 위한 표지인자 분석 및 시스템 구축

가. 제주흑우 Microsatellite (MS) 유전자형 분석

최근 인간의 법의학적 검증에서 DNA 분석기법, 특히 microsatellite (MS)의 반복양상에 따른 유전자형 분석이 공식 활용되면서 그 활용영역이 점차 확대되어 가축 품종들의 유연관계, 혈통 증명, 집단 식별 및 개체추적과 친자확인 등에 광범위하게 이용되고 있음.

이와 함께 한우의 황모색처럼 품종의 특성을 반영하는 특정 유전자의 단일염기변이(single nucleotide polymorphism, SNP)와 부계(Y 염색체)나 모계(mtDNA) 유전을 통해 자손으로 전달되는 유전자의 다형성들은 검증 대상에서 특이적으로 중요한 정보의 보유여부를 판독할 수 있는 자료로써 활용 가능성이 제기되었음.

제주흑우는 외형상 한우와 비슷하지만, 체형이 다소 작고 체모가 전반적으로 흑색을 나타내는 우리나라의 재래 소 중 한 품종임. 1980년대까지 유전자원의 중요성 보다 산업적 활용을 위한 개량을 지향하면서 한 때 심각한 멸종위기에 놓였던 적도 있으나, 재래가축유전자원의 중요성에 대한 인식이 전환되면서 1990년대 원종 수집과 축군 증식을 위한 연구 및 관리체계가 마련되었음.

제주흑우의 품종 식별 및 혈통관리에서 가장 중요한 선결과제 중 하나는 타 품종 교배에 의해 생산된 흑색 교잡우와의 구분에 있음.

우리나라에 도입된 외래 소 품종 중 Holstein과 Angus 등은 우성 흑모색을 지니고 있으며, 이들 품종과 한우의 교잡 1세(F₁, 일명 먹통, 먹우로 불림)는 전신 흑색을 나타내어 모색만으로는 제주흑우 명확히 구분되지 않음. 또한 초지가 풍부한 제주도에서는 유입된 외래 소와의 교잡에서 다양한 형태의 교잡우들과 하절기에 공동 방목되고 있어 이들과의 명확한 식별을 위한 유전자 분석 자료체계가 요구되고 있는 실정임.

현재 제주도에서 가장 높은 빈도로 사육되고 있는 한우 등과 명확한 구분을 위해서는 *MC1R* 뿐만 아니라 다양한 유전자 marker에서 수집한 정보의 조합이 필요함.

이에 본 연구는 MS 유전자형과 *MC1R*, *ASIP* 유전자형 분석결과들의 조합을 통해, 그 동안

제주흑우를 수정란이식이나 인공수정을 통해 공급 받은 농가에서 수집한 흑모색 후보 축군을 대상으로 수정란이식, 인공수정에 의해 생산된 제주흑우 후대들을 추적하고자 수행하였음.

○ 공시동물과 DNA 추출

본 연구에 이용된 시료는 i)농촌진흥청 국립축산과학원 제주난지시험장(Jeju Sub-station, National Institute of Animal Science, RDA; NIASJ)과 제주특별자치도 축산진흥원(Livestock Promotion Institute, Jeju-do)에서 수정란 생산과 인공수정에 이용되었던 종모우, ii) 채란을 위해 호르몬 처리에 이용된 종빈우, iii) 수정란을 공급받은 농가와 육성우 단계에서 이를 구입한 농가에서 외형상 흑모색을 나타내거나 인공수정이나 수정란이식에 의해 생산된 것으로 관리되고 있는 소와 iv) 해당 소를 생산한 대리모, v) 인공수정에 활용된 종빈우들을 대상으로 말초혈액을 채취하여 이용하였음.

제주흑우 DNA는 해당 기관에서 보관 중인 DNA를 분양받았으며, 농가 소는 각 농가에서 채혈하여 DNA 분리에 이용하였다. 전혈에서 DNA 분리는 Sambrook 등 (1989)의 방법을 변형하여 수행하였음. 준비한 DNA 시료는 NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technology, USA)로 흡광도를 측정 후 A_{260}/A_{280} 와 A_{230}/A_{280} 이 모두 1.8 이상인 DNA들을 50-60 ng/ μ l로 희석하여 PCR 반응의 주형으로 이용하였음.

○ Microsatellite 유전자형의 결정

분석에 이용한 MS marker는 국제동물유전학회(International Society of Animal Genetics, ISAG)에서 소의 유전적 다양성 연구와 친자검정 등에 활용을 권장하고 있는 ISAG MS marker 11 종(TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225, BM1824)과 제주흑우 다양성 분석과 친자검정을 위해 사전 연구에 의해 선발된 NIASJ MS marker 11종(BMS1907, BMS4028, BMS1580, BMS2060, DIK4591, DIK4460, DIK3027, BL1134, DIK4224, IDVGA-37, MNS-2)을 추가 선정하였음.

MS primer 쌍 중 하나를 FAM, HEX, NED, TAMRA 등으로 5'-형광 표지하였다. MS 증폭은 먼저 부모집단을 이용하여 개별적인 MS 증폭과 다형성 조사를 수행한 후 multiplex PCR 조합을 구성하여 수행하였음.

PCR 반응은 50 ng의 genomic DNA 용액에 1× PCR buffer, 125 mM dNTP, 0.3 Unit HotStart *Taq* DNA polymerase(Bioneer, Korea)에 초기 실험에서 선정한 각각의 MS marker에 대한 primer들을 첨가하고, 멸균 증류수를 첨가하여 최종 10 μ l가 되게 하여 준비하였음.

준비된 반응액에 대한 PCR 증폭은 PTC-200 thermal cycler(Bio-Rad, USA) 상에서 95°C에서 5분간 초기변성, 94°C 45초-annealing 온도에서 75초-72°C 90초로 구성된 cycle을 35회 반복 수행하고 72°C에서 10분간 최종 신장하였음.

증폭산물은 5배 또는 10배 희석 후 ET-400R size standard(Amersham Biosciences, USA)와 혼합하여 MegaBase1000 automated DNA Sequencer (Amersham Biosciences, USA) 상에서 분리하고, Genetic Profiler(Amersham Biosciences, USA)를 이용하여 marker의 유전자형을 결정하였음.

실험과정 상의 오차를 줄이기 위해 모든 종모우, 수정란 생산용 공란우들을 96 well plate에 3회 이상 탑재하여 유전자형의 동일한 출현 여부를 점검하였음. MS 유전자형 분석은 준비한 시료들을 2회 반복 수행하였으며, 동일한 결과를 나타내지 않는 시료에 대해서는 단일 MS 분석을 통해 data를 보정하였음.

○ MC1R, ASIP 유전자형의 결정

모색과 관련된 유전자형의 결정을 위해 *MC1R*은 한 등 (2008), *ASIP*는 Girardot 등 (2006)이 보고한 primer의 서열과 분석 방법에 준하여 수행하였음. 기존에 보고에 따라 증폭한 PCR 산물에 대해 *ASIP*는 바로 1.5% agarose gel 상에서 전개하여 유전자형을 결정하였고, *MC1R* PCR 산물은 *AluI*, *MspI* 제한효소를 처리하여 37°C에서 overnight 반응한 후 2.5% agarose gel 상에서 전기영동 확인하였음.

○ 대립인자형의 결정 및 친자검정

MS 대립인자형과 *MC1R*, *ASIP* 유전자형 분석에서 산출된 모든 좌위에 대한 대립인자 출현 빈도와 이형접합성(heterozygosity; He), 다형정보량(polymorphic information contents; PIC), 부권부정율(exclusion probability, PE)을 산출하였음.

부권부정율은 부모에 대한 정보가 전혀없는 경우(NE-1P), 한쪽 부모를 알고 있을 때 다른 한쪽의 부권부정율(NE-2P)는 경우, 양친과 자손을 모두 알고 있는 경우(NE-PP)의 부권부정율을 산출하였음. 좌위별 유전자형에 대한 정보의 산출과 친자검정은 CERVUS 3.0.3(Kalinowski 등, 2007)을 이용하였다. 조사된 개체들 중 유전자형이 동일한 개체의 확인은 CERVUS package 내 동일성검사(Identity Analysis) program을 이용하였음.

수정란이식과정에서 공란우로 이용된 모든 종빈우를 후보 모(candidate mother)로 선정하고, 수정란이식과 인공수정을 위해 정액채취에 이용된 모든 종모우를 후보 부(candidate father)로 선정하고 친자검정(Parentage Analysis) program을 이용하여 95% 신뢰수준에서 검출되는 모든 후보 부모를 찾아낸 후 수정란 이식 및 인공수정의 관독에 이용하였음.

○ 농가 제주흑우 집단 기초조사 및 기록부 작성

제주흑우 사육실태조사 기록부(암)

조사일: 2007년 6월 18일

농가명	김권호	주소				연락처			
개체번호	5529	바코드번호	005155294	생년월일					
생산자			구입일자			재혈번호	31		
외모특징	면선	미선	배선	끝	혈동	부	모		
	결	과	중	상향					


계 위 조 사 (cm)

계 고	십자부고	계 강	흉 심	흉 폭	고 강	요 각 폭	곤 폭	좌 골 폭	흉 위	전 관 위
121	122	146	65	41	48	47	40	23	183	17


번 식 상 황

산차	최근분만일	송아지 번호	부혈동	성별	최근수정일	정액혈동


개 제 식 별 사 진




전



후



과



우

그림 59. 제주흑우 사육실태조사 기록부 자료 (♀)

표 53. 제주흑우 시료확보 현황

구 분	제주출장소	축진원	농가	계
사육두수	105	110	302	517

- 농가에 보급된 제주흑우 수정란 이식 및 인공수정 생산축의 확인을 위하여 분자유전학적 실험기법을 이용한 개체 추적을 수행하였음.

(1) 제주흑우 MS 표지인자 선정

- 한우 MS marker : 11종 (International Society of Animal Genetics 권장, ISAG)
(TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225, BM1824)
- 자체선정 : 11종
(BMS1907, BMS4028, BMS1580, DIK4591, MNS-2, BMS2060, DIK3027, DK4460, IDVGA-37, DIK4224, BL1134)
- * SNP marker : 2종 (*MC1R*, *ASIP*)

표 54. 제주흑우 집단 MS 표지인자별 대립인자 빈도 및 이형접합성, 다형정보량

Locus	candidate fathers (n=10)				candidate mothers (n=84)				overall (n=394)				
	k	Ho	He	PIC	k	Ho	He	PIC	k	Ho	He	PIC	HW ¹
BL1134	4	0.800	0.658	0.578	5	0.707	0.727	0.687	6	0.726	0.728	0.685	NS
BM1824	3	0.100	0.353	0.303	5	0.512	0.587	0.525	7	0.401	0.446	0.414	NS
BM2113	5	0.600	0.568	0.508	8	0.774	0.694	0.655	9	0.688	0.646	0.612	NS
BMS1580	2	0.200	0.209	0.178	4	0.333	0.316	0.286	9	0.487	0.511	0.433	NS
BMS1907	4	0.700	0.563	0.498	5	0.506	0.558	0.474	8	0.534	0.542	0.487	NS
BMS2060	4	0.900	0.658	0.578	5	0.59	0.557	0.518	7	0.599	0.586	0.523	NS
BMS4028	5	0.800	0.752	0.668	7	0.765	0.736	0.697	11	0.734	0.703	0.671	NS
ETH10	4	0.800	0.689	0.603	6	0.714	0.64	0.582	8	0.721	0.712	0.665	NS
ETH225	4	0.500	0.489	0.420	5	0.619	0.635	0.579	8	0.622	0.579	0.535	**
ETH3	5	0.700	0.795	0.713	7	0.81	0.782	0.743	8	0.749	0.745	0.712	NS
IDVGA-37	3	1.000	0.668	0.559	5	0.544	0.625	0.550	7	0.657	0.649	0.578	NS
INRA23	6	0.900	0.858	0.789	6	0.702	0.77	0.728	10	0.802	0.804	0.778	NS
DIK3027	4	0.700	0.684	0.584	6	0.693	0.743	0.698	7	0.642	0.7	0.655	***
DIK4460	4	0.500	0.647	0.544	7	0.74	0.734	0.688	7	0.761	0.759	0.722	NS
DIK4224	5	0.700	0.626	0.561	9	0.646	0.608	0.581	10	0.694	0.687	0.653	NS
DIK4591	3	0.500	0.468	0.381	5	0.524	0.49	0.443	6	0.582	0.562	0.509	NS
MNS-2	3	0.800	0.653	0.548	4	0.642	0.635	0.557	4	0.59	0.563	0.501	NS
SPS115	5	0.700	0.616	0.544	6	0.762	0.708	0.656	8	0.756	0.736	0.699	NS
TGLA122	7	0.800	0.726	0.658	7	0.845	0.827	0.800	17	0.809	0.8	0.777	NS
TGLA126	5	0.700	0.805	0.729	5	0.714	0.731	0.685	7	0.774	0.779	0.741	*
TGLA227	4	0.600	0.574	0.476	6	0.655	0.631	0.566	12	0.688	0.695	0.656	NS
TGLA53	7	0.900	0.858	0.791	12	0.893	0.865	0.845	17	0.886	0.854	0.840	NS
overall mean	4.36	0.677	0.633	0.555	6.13	0.668	0.664	0.616	8.77	0.677	0.672	0.629	

k, number of allele found; Ho, observed heterozygosity; He, expected heterozygosity; PIC, polymorphic information content; HW, Hardy-Weinberg equilibrium.

1, * <0.05 ; ** <0.01 ; *** <0.001 ; NS, not significant.

- 분석에 이용한 MS marker 22종과 *MC1R*, *ASIP* 유전자 모두 집단 내에서 다형현상을 나타내었음.

표54는 22종의 MS marker에 대한 분석에서 발견된 대립인자의 수와 이형접합성의 빈도 (Ho, He), 다형정보량(PIC) 등을 종모우로 구성된 후보 부 집단, 종빈우들로 이루어진 후보 모 집단과 전체집단으로 구분하여 나타낸 것임.

각각의 MS 유전자 좌위에서 평균 대립인자의 수는 8.77개이고, 관찰 이형접합성(Ho)의 평균은 0.677, 기대 이형접합성(He)의 평균은 0.672, 다형정보량의 평균은 0.629로 조사되었음. TGLA53 marker는 17개 대립인자가 발견되었고, MNS-2는 대립인자가 4개로 가장 적었음. 분석된 22종의 marker 중 ETH225, TGLA126, DIK3027 등은 Hardy-Weinberg 평형을 나타내었음.

유전자 marker별로 다형성 정보량을 보여주는 PIC의 경우 전체 22종의 MS 분석에서 후보 부는 0.555로 후보 모집단의 0.616이나 전체집단의 0.629에 비해 다소 낮은 결과를 보여주었음.

정액생산에 이용되었던 종모우 10 두에 대한 분석결과에서 MS marker 중 BM1824, ETH225, TGLA227, BMS1907, BMS1580, DIK4591 등 6 종은 PIC의 값이 0.5 이하로 나타나 marker로서의 정보력이 다소 떨어지는 경향을 보였으며, 이 중 BM1824, BMS1907, BMS1580 등은 공란우 집단과 전체 조사 축군에서도 PIC가 0.5 이하로 확인되었음.

ETH3, INRA23, TGLA53 등의 PIC는 후보 부, 모, 전체 축군에서 모두 PIC가 0.7 이상으로 확인되었고, TGLA122는 후보 모와 전체 축군, TGLA126은 후보 부와 전체축군에서, DIK4460은 전체 축군에서 0.7 이상으로 확인되었음.

표 55. 제주흑우 집단에서의 한우 MS marker 누적 친자감별효율성

구분	부모선별지수			
	Excl(1) ¹		Excl(2) ²	
	Marker 당	누적	Marker 당	누적
BM1824	0.11	0.11004624	0.252	0.2519824
BM2113	0.2135	0.30004373	0.3934	0.546249
ETH10	0.2735	0.49145037	0.4424	0.74699147
ETH225	0.1714	0.57863912	0.3311	0.83076098
ETH3	0.3524	0.72710742	0.5352	0.92134388
INRA23	0.428	0.84391486	0.607	0.9690866
SPS115	0.3028	0.89117007	0.4808	0.98394932
TGLA122	0.4345	0.93846128	0.6142	0.99380746
TGLA126	0.3524	0.96014767	0.5314	0.99709831
TGLA227	0.2452	0.96992051	0.4102	0.99828863
TGLA53	0.5179	0.98549943	0.6861	0.99946285

¹Excl(1): The combined power of the set of loci to exclude a randomly-selected unrelated candidate parent from parentage of an arbitrary offspring, given only the genotype of the offspring

²Excl(2): The combined power of the set of loci to exclude a randomly-selected unrelated candidate parent from parentage of an arbitrary offspring, given the genotype of the offspring and of a known parent of the opposite sex

표 56. 제주흑우 집단에서의 친자감별효율성(한우 MS marker + 자체선정 MS marker)

구분	부모선별지수			
	Excl(1)		Excl(2)	
	Marker 당	누적	Marker 당	누적
BM1824	0.11	0.11004624	0.252	0.2519824
BM2113	0.2135	0.30004373	0.3934	0.546249
ETH10	0.2735	0.49145037	0.4424	0.74699147
ETH225	0.1714	0.57863912	0.3311	0.83076098
ETH3	0.3524	0.72710742	0.5352	0.92134388
INRA23	0.428	0.84391486	0.607	0.9690866
SPS115	0.3028	0.89117007	0.4808	0.98394932
TGLA122	0.4345	0.93846128	0.6142	0.99380746
TGLA126	0.3524	0.96014767	0.5314	0.99709831
TGLA227	0.2452	0.96992051	0.4102	0.99828863
TGLA53	0.5179	0.98549943	0.6861	0.99946285
BMS1907	0.1804	0.98811579	0.326	0.99963795
BMS4028	0.2842	0.99149324	0.4672	0.99980711
BMS1580	0.1	0.99234369	0.2136	0.99984831
BMS2060	0.2006	0.99387932	0.365	0.99990368
DIK4591	0.1272	0.99465783	0.2683	0.99992952
MNS-2	0.1902	0.9956739	0.3378	0.99995333
DIK4460	0.3188	0.99705314	0.4923	0.9999763
DIK3027	0.3116	0.99797145	0.4909	0.99998794
BL1134	0.3231	0.99862695	0.5023	0.999994
DIK4224	0.2589	0.99898243	0.442	0.99999665
IDVGA-37	0.2016	0.99918756	0.3444	0.9999978

표 57. MS 표지인자 별 친자감별효율성 및 동일개체출현율

Molecular marker	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI
ISAG markers	0.9902701	0.9996973	0.9999991	7.6×10^{-12}	0.9999234
NISA markers	0.9505602	0.9965295	0.9999338	4.4×10^{-10}	0.9997092
ISAG+NISA MSs	0.9995189	0.9999989	3.63×10^{-12}	8.58×10^{-20}	0.9999999
<i>ASIP</i>	0.0150162	0.0791412	0.1396615	0.3015486	0.1620365
<i>MCIR</i>	0.1812402	0.3201026	0.4682533	0.7675028	0.4929075
combined all markers	0.9996120	0.9999993	7.13×10^{-12}	7.69×10^{-21}	5.30×10^{-10}

NE-1P: Average non-exclusion probability for one candidate parent

NE-2P: Average non-exclusion probability for one candidate parent given the genotype of a known parent of the opposite sex

NE-PP: Average non-exclusion probability for a candidate parent pair

NE-I: Average non-exclusion probability for identity of two unrelated individuals

NE-SI: Average non-exclusion probability for identity of two siblings

ISAG marker와 NIASJ marker, *ASIP*, *MCIR* 등을 분석했을 때 전체 집단에 대한 친자검정 시 marker 조합의 친자검정능력을 나타내는 부권부정률(PE)과 동일개체부정율(NE-I) 등을 조사 하였음.

국제유전학회에서 권장하는 ISAG MS 11 종에서 산출된 data를 조합한 경우 PE 중 부모에 대한 정보가 없는 상태에서의 부권부정율인 NE-1P는 0.99027 정도로 확인되었음. 이는 NIASJ MS 11 종에서 얻어진 NE-1P 0.95056 보다 높은 수치이나, 국제권장 수준인 0.9995 PE보다 다소 낮은 수준을 보였음. ISAG marker와 INSA marker를 조합한 경우 NE-1P가 국제권장 수준보다 높아졌고, 여기에 제주흑우 품종 확인에 있어 핵심요건인 모색관련 유전자 2종, *MCIR*과 *ASIP*의 결과를 조합하면 NE-1P의 수준은 0.9996 이상으로 매우 좋은 marker set이 구성됨을 보여주었음.

조사된 전체 축군 중 제주흑우 종모우와 종빈우의 대립인자는 4(BMS1580, MNS-2) ~ 12개 (TGLA53)로 marker당 평균 6.23개가 관찰되었고, 평균 PIC는 0.613, He는 0.666으로 확인되었음.

즉, 한우에 비해 출현 대립인자의 수가 적고, PIC, He 모두 낮은 수치를 보이는데, 제주흑우는 대략 400두 정도의 소규모 축군이며 핵심 종모우는 2 혈통을 중심으로 육성되었음을 감안할 때 제주흑우의 유전적 다양성이 한우에 비해 낮은 수준을 보이는 것은 당연한 결과임.

(2) 농가 제주흑우 집단에서의 MS marker 실제 적용

총 24종의 유전자 marker들 (MS 22종, *MCIR*, *ASIP*)에 대한 분석에서 얻어진 모든 정보를 이용하여 유전자 친자검정을 수행하였음.

95%의 신뢰수준에 대한 후보축군에 대한 부모확인 과정에서 후보 모가 확인된 경우는 DNA가 확보된 298 두 중 163두 (54.6%), 후보 부가 확인되는 경우가 233두 (78.2%)였으며, 부모가 동시에 확인되는 경우는 127두 (42.6%)로 확인되었음.

자손의 유전자형이 모두 후보 부모의 유전자형 내에 분포하는 멘델 유전 상에 위치하는 삼자불일치 (trio-mismatch)가 0인 후보축은 수정란이식 생산축으로, 후보 부와 자손간의 부자 불일치는 0이지만, 중빈우인 후보 모가 농장 보유축에서 발견되는 삼자불일치 = 0 이거나, 제주흑우 보존기관인 국립축산과학원 제주난지축산시험장과 제주도 축산진흥원 집단에서 근연인 개체가 발견되는 경우만 인공수정 생산축으로 판독하였음.

22종의 MS 유전자형을 이용한 친자감정에서 제1 후보 모와 제 1 후보 부가 상기 두 기관의 공란우와 중모우에 해당하면서 mismatch가 전혀 없는 trio-mismatch = 0인 개체들은 총 25두가 발견되었으나, 이들 중 2두는 *MCIR*, 1두는 *ASIP* 유전자형에서 부모의 유전자형과 일치하지 않아 수정란이식 축군에서 탈락되어 최종 22두를 수정란이식 자손으로 판정하였음 (표 58 참조).

이는 전체 분석 대상에서 7.4%에 해당하는 낮은 수치였으나, 2004년부터 2006년까지 공급된 수정란의 수가 150개로 확인되어 공급수정란 대비 송아지 확인 비율은 14.7%의 성적을 보여 주었음.

표 58. 친자감별 결과에 따른 농가 제주흑우 관리방안

구분	유전자형 불일치도			3자 불일치	두수	빈도	판정	향후 관리 방안
	부자	모자	모의 유래					
수정란이식 개체	0	0	보존집단	0	22	7.4	ET	제주흑우 등록
수정란이식 유력	0	0	보존집단	≠1	16	5.3	(ET)	정밀 재확인 후 결정
인공수정 개체	0	0	농가집단	0	78	25.8	AI	실용화 축군 등록
인공수정 유력	<1 or 2	<4	보존집단 농가집단	1-5	11	3.6	(AI)	정밀 재확인 후 결정
부모 확인 불가	*	*		n.s.	171	56.6	육우	제외
DNA 미확보					4	1.3		시료확보 후 분석
합계					302	100		

*, had not candidate parents under 95% threshold. n.s. not significant.

후보 부와 자손의 유전자형 비교에서 mismatch가 전혀 없고, 모가 농가집단에서 확인되거나, 축산진흥원이나 국립축산과학원 제주난지 축산시험장 등 제주흑우 보존진단에서 유래된 것이 유력한 89두는 인공수정에 의한 생산 자손으로 판명하였음 (표 58 참조).

반면 본 연구에서는 후보 모를 제외한 상태에서 후보 부의 유전자형과 후손의 유전자형이 완전히 일치하는 경우 (data not shown) 가 후보 부와 모를 동시에 적용하여 친자추적을 수행할 때보다 후보 부와 자손의 유전자형 일치도는 더 높았음.

하지만, 후보 부와 후손의 불일치가 없더라도 후보 모가 확인되지 않거나 유연관계가 먼 경우는 인공수정 생산축으로 판정하지 않았음.

이는 후보 부에 대한 추적에서 후손은 부모로부터 물려받은 유전체 정보를 모두 보유하고 있기 때문에 둘 중 하나만 후보 부에 일치하더라도 해당 좌위에서 불일치가 없는 것으로 판독되는 데서 오는 오류를 차단하기 위해서였음.

하지만 제주흑우 정액을 이용한 인공수정이 개시된 2000년대 초반이며 당시에 인공수정에 활용된 종빈우 중 일부가 현재는 남아있지 않아 시료채취에서 누락되었을 가능성이 있기 때문에, 실제 인공수정에 의해 생산된 후손의 수는 더 많은 것으로 추정되며, 이들을 정확한 판독을 위해서는 부, 모계에 의해 유전되는 성염색체와 mtDNA에 대한 유전자 정보가 추가되어야 할 것으로 사료됨.

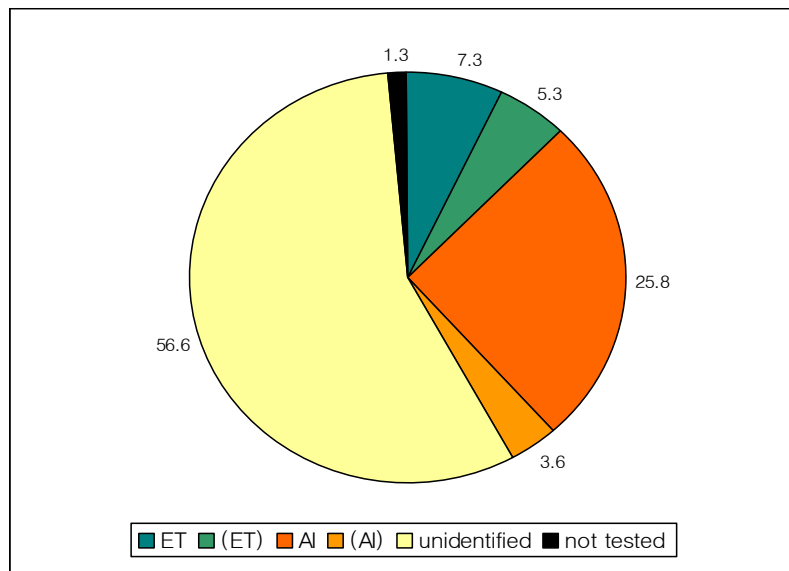


그림 60. MS 유전자형에 근거한 제주흑우 후보축에 대한 혈통분석 결과

유전자 친자검정에 있어 ISAG 11종의 marker만을 이용한 분석에서는 총 41두가 수정란이식으로 판정되는 (trio-mismatch = 0) 결과를 얻었음 (data not shown).

반면 NIASJ MS 11종을 추가했을 때 수정란이식 개체는 25두, *MC1R*과 *ASIP*까지 추가한 경

우 최종 22두가 수정란이식에 의해 생산된 개체들로 최종 확인되었음.

이상의 결과들은 표 57에 나타난 바와 같이 NE-1P에 해당하는 부권부정율이 국제권장기준인 0.9995보다 낮은 경우 친자검정에서 오류가 발생할 수 있다는 기존의 연구보고 (Dimsoski, 2003; 조, 2004; 조 등, 2004)와 유사한 결과라 하겠음.

본 연구에서 유전자 친자검정을 통해 수정란이식 개체들과 인공수정 개체들을 성공적으로 구분해냄으로써 외형상 제주흑우와 혼란을 일으키는 교잡우 개체들로부터 제주흑우의 보호와 혈통보존에 기여할 것임.

아울러 사육이나 인공수정을 통한 증식을 희망하는 농가 집단에 대한 사전 DNA 확보가 매우 중대한 사안이 될 것이며, 현재 보유하고 있는 축군 전체를 대상으로 보다 많은 수의 MS marker의 정보, 모색관련 유전자의 특이 SNP, 성염색체와 mtDNA 등 부계, 모계 특이 marker에 대한 자료를 적절하게 조합한 유전자분석 체계가 구축된다면, 친자검정, 개체식별 등 혈통정립 사업뿐만 아니라, 제주흑우 생산이력 추적제나 품종인증을 위한 기틀을 마련하는데 크게 기여할 것으로 사료됨.

*이상의 결과는 한국생명과학회지, 2009, 19(3), 384-9에 게재됨. (논문 제목; 한우와 제주흑우, 홀스타인에서 MC1R 유전자형에 따른 Melanin 생합성 유전자들의 발현수준과 모색 출현양상의 관계)

한우와 제주흑우, 홀스타인에서 *MC1R* 유전자형에 따른 melanin 생합성 유전자들의 발현수준과 모색 출현양상의 관계

이성수 · 양영훈¹ · 조인철 · 김남영 · 고문석 · 정히연 · 한상현*

농촌진흥청 국립축산과학원, ¹제주대학교 동물자원학과

Received December 22, 2008 / Accepted March 12, 2009

Relation of Expression Levels of Melanin Synthesis Genes according to the *MC1R* Genotypes with the Coat Color Patterns in Hanwoo, Jeju Black Cattle and Holstein. Sung-Soo Lee, Young-Hoon Yang¹, In-Cheol Cho, Nam-Young Kim, Moon-Suck Ko, Ha-Yeon Jung and Sang-Hyun Han*. *National Institute of Animal Science, RDA, ¹Department of Animal Biotechnology, Cheju National University* - This study was carried out to elucidate the relation between expression levels of three melanin synthesis genes (*Tyrosinase*, *Tyrosinase-related protein 1* and *Dopachrome tautomerase*) according to the *Melanocortin-1 receptor* genotypes with coat color patterns in Hanwoo cattle, Jeju black cattle and Holsteins. Using real-time semiquantitative reverse transcription-PCR assay (RT-PCR), the expression levels of these three genes were analyzed in skin tissues from four representative coat colored areas: yellowish-brown from *MC1R e/e* Hanwoo, wild type black from *E⁺E⁺* Jeju black cattle (JBC), and dominant black and white pied regions from *E^D/E^D* Holstein. The *TYR*, *TYRP1* and *DCT* genes showed higher expression levels of 4.5, 2.3 and 2.5 times higher in the black skin area of Holsteins than those of from JBC, respectively ($p < 0.001$). In addition, the expression levels of these three genes from JBC were significantly higher than those from Hanwoo cattle ($p < 0.001$). These results show that coat color phenotypes in Hanwoo cattle, JBC and Holsteins is directly correlated with *TYR*, *TYRP1* and *DCT* transcription levels, which probably reflected involvement with *MC1R* genotypes; *e/e* in Hanwoo, *E⁺E⁺* in JBC and *E^D/E^D* in Holsteins. Consequently, this study suggested that the status of *MC1R* protein may not only induce the transcription activities of a series of *TYR* and its related genes responsible for melanin synthesis, but also determine the levels of total melanin contents in bovine skin.

Key words : Melanin, *TYR*, *MC1R*, coat color, cattle

서 론

전 세계적으로 광범위하게 분포, 사육되고 있는 다양한 소 품종들은 대부분 품종형성과정에서 고정된 특유의 모색을 나타내고, 모색은 해당 품종의 특성을 설명하는 중요한 표현형 질로 간주되며, 품종 식별을 위한 대표적인 질적형질로 취급되고 있다. 우리나라에서 소의 가축화 역사가 명확히 밝혀지지 않았으나, 현재까지 남아 있는 재래 소 품종들 역시 모색을 중심으로 황갈색의 한우, 황색바탕에 흑색 호반무늬를 나타내는 귀소, 흑색의 흑우 등으로 구분되고 있다.

포유동물의 모색은 neural crest로부터 발생과정에서 색소 세포(melanocyte)의 이주(*KIT*, *KITLG*, *EDNRB* 등)와, melanin 생합성을 조절하는 외부 신호전달자와 수용체(*MC1R*, *ASIP*, *MITF* 등), 세포 내 melanin 생합성 대사(*TYR*, *TYRP1*, *DCT* 등), melanosome의 생성(*SILV*, *AP3* 등)과 이동(*MYO5A*, *RAB27A* 등) 등 복잡한 여러 단계와 관련 유전자들의 작용에 의해 표현된다[17,18]. 특히, melanin 생합성에 관여하는 *TYR*, *TYRP1*, *DCT*는 색소세포 특이 효소 유전자로서

두 종류의 melanin 즉, eumelanin (black/brown)과 pheomelanin (red/ yellow) 합성을 담당한다. *TYR*은 melanin 합성의 핵심효소로서 tyrosine을 DOPAquinone으로 전환시키는 대사 개시와 그 후 5,6-dihydroxyindole (DHI)를 indole-5,6-quinone으로 산화하는 적어도 두 단계에 작용하고, *DCT*는 DOPAquinone을 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)으로 전환하며, 생성물인 DHICA는 다시 *TYRP1*에 의해 eumelanin으로 전환되는 것으로 알려져 있다 [25,19]. 마우스를 포함한 여러 포유동물 중에서 melanin 생합성에 관여하는 이들 *TYR*, *TYRP1*과 *DCT* 유전자와 그 기능에 대해 연구가 진행되었는데, 특히 소에서 Guibert 등[5]은 이들 유전자의 cDNA 서열과 여러 품종과 모색에서 발현 수준을 측정하여 보고하고 있다.

현재까지 우리나라 소 품종의 모색에 관한 분자유전학적 설명은 색소형성 신호전달자인 *αMSH*의 수용체로 알려진 *MC1R* 유전자의 다형성에 의해 이루어지고 있다. 황색 한우의 대부분은 *MC1R* 유전자형에서 결실돌연변이에 의한 frame shift mutation이 나타나는 열성동형접합자 *e/e*인 상태이며, 진한 흑색인 Angus, Holstein 등의 흑모색은 우성 대립인자인 *E^D* 유전자형의 보유에 의해 결정된다. 비슷한 흑모색인 제주 흑우의 경우는 *E^D*가 아닌 야생형 대립인자 *E⁺*에 의해 결정되

*Corresponding author

Tel : +82-64-754-5714, Fax : +82-64-754-5713

E-mail: hans04@korea.com

(3) 제주흑우 혈통관리 및 육종체계에서의 개체식별·친자감별 시스템의 이용

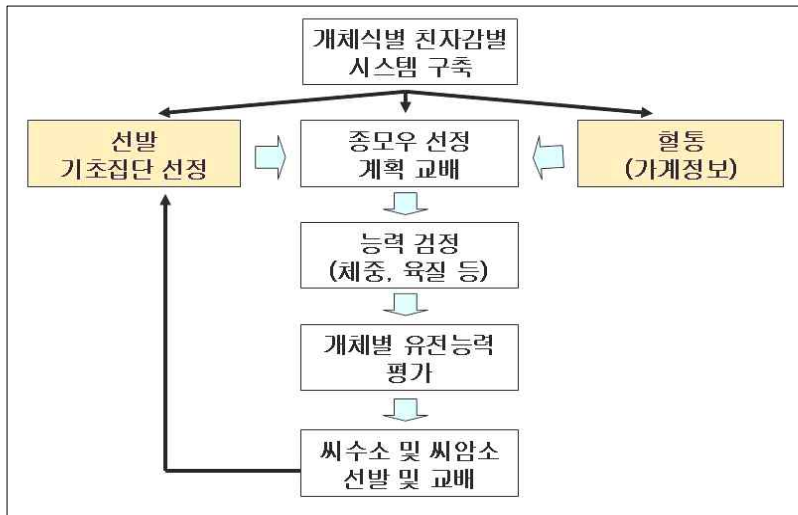


그림 61. 제주흑우 육종 개량 개요

제주흑우 산업화를 위해서는 한우 정도의 육량과 육질이 보장되어야 하나, 제주흑우의 육량은 한우대비 70~80% 수준이며, 육질은 개체별로 균일하지 않음 (1++ ~ 2등급).

현재 제주흑우는 반출제한 가축으로 지정되어 제주도 이외 지역으로의 반출이 엄격히 제한되고 있는데 제주흑우의 역사성과 제주도의 청정 자연환경에서 사육된다는 장점들을 상품화에 부각시키고 장기적이고 지속적인 증식과 개량이 이루어진다면 장래에 우리나라의 대표적인 명품 쇠고기 브랜드로 재탄생할 수 있으리라 기대됨. 하지만 제주흑우 산업화에는 그 만한 어려움과 해결해야 하는 과제들이 많은데 그 중 하나가 혈통관리임.

농가에서 사육되는 소들의 부모가 어떤 소인지, 생산된 소들은 또한 어떻게 번식에 이용되었는지 파악하는 것이 제주흑우에서 가장 필요한 개량의 첫걸음이고, 또한 젖소 혹은 젖소교잡종 등의 외부 유입도 사전에 차단할 수 있는 장치도 마련되어야만 함. 이를 위해 유전자 분석 시스템을 도입하여 제주흑우 개체식별 및 친자감별 시스템을 구축하는 것은 필수적임.

그간 제주흑우 산업화를 위하여 지자체와 공동으로 모색 유전자형이 고정된 제주흑우 종모우를 선정(4두) 하여 정액을 공급하고 수정란을 생산 공급하여 왔음. 그러나 이렇게 생산된 제주흑우 개체들은 이후 농가에서 기록관리 없이 다소 방만하게 번식되어 개량을 위해 필수적인 혈통관리가 미흡한 실정임. 이에 따라 제주흑우의 개체식별·친자감별을 위한 과학적 분석 방법의 필요성이 대두되었고, 본 연구에서는 23개의 유전적 표지인자를 이용하여 분석함으로써 개체 구별뿐만 아니라 개체의 부모를 정확하게 추적할 수 있는 시스템을 구축하였음.

보통 한우에서는 11개의 분자 표지인자를 이용하여 분석하지만 제주흑우는 근친집단이므로 더 많은 표지인자를 분석에 이용하여 국제유전학회 권장 판별효율성에 부합하도록 하였음.

(4) 유전형질에 따른 제주흑우 가계도 작성

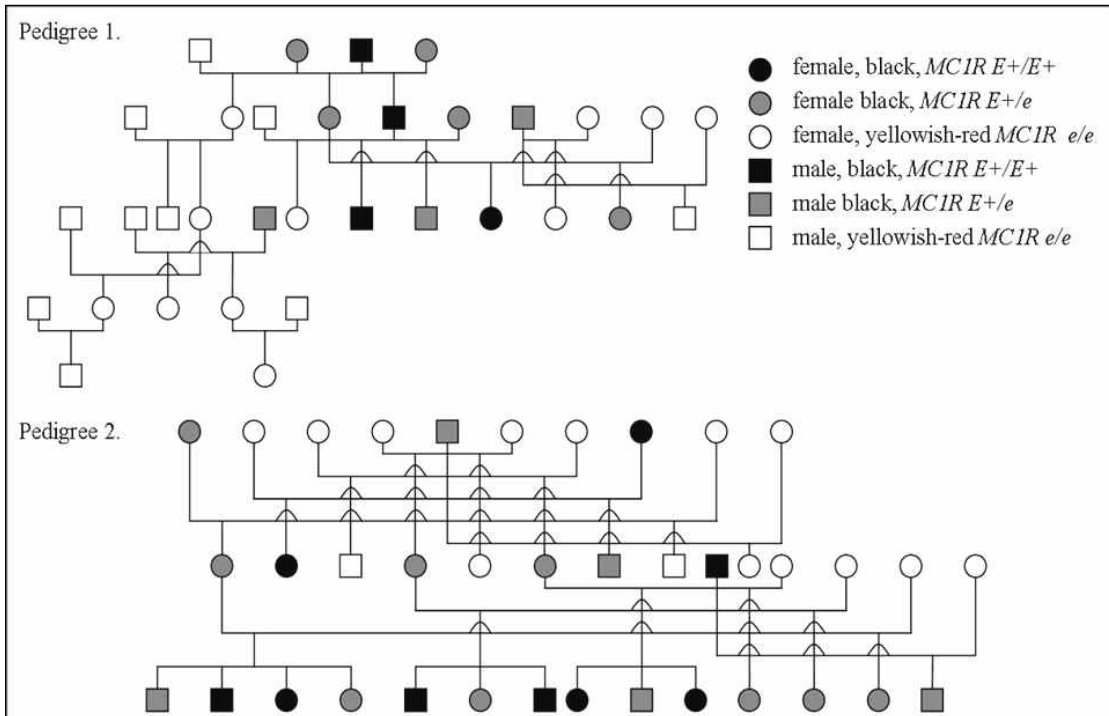


그림 62. 제주흑우에서 MS와 *MCIR* 유전자형에 따른 흑모색 유전 양상을 나타내는 가계도

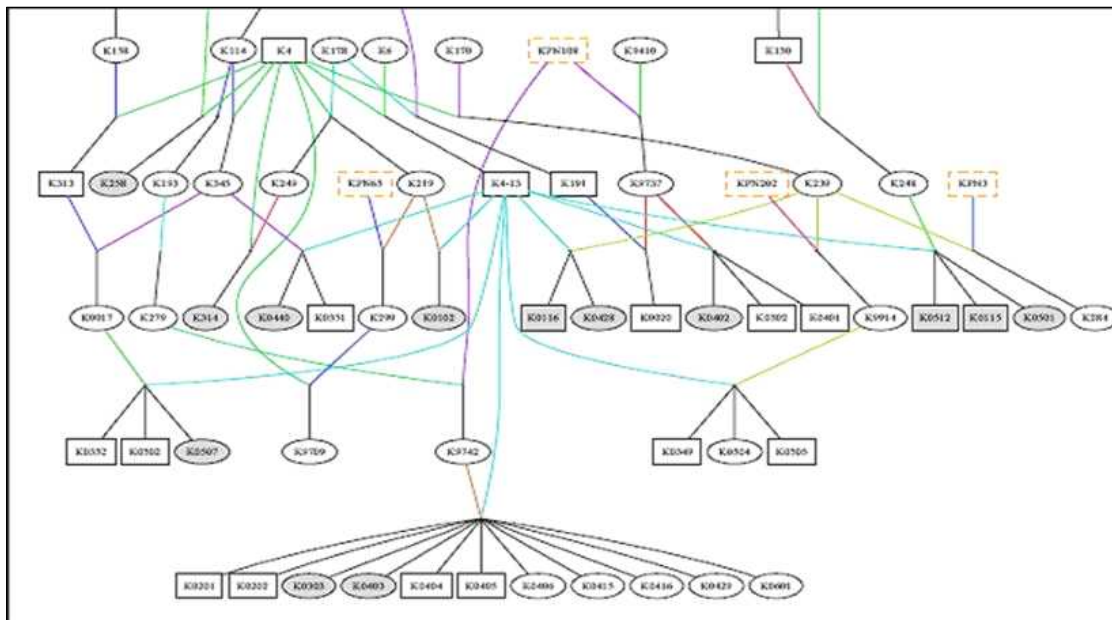


그림 63. 제주흑우 복부백반 발현 유전양상 분석을 위해 작성된 가계도

- 상기 가계도들은 친자감별 및 개체식별 시스템 결과를 이용하여 모색 유전양상 분석을 위해 작성된 가계도로서 MS 등 유전자형 분석에 의해 정확한 친자, 부모의 확인은 금후 제주 흑우 집단에서의 여러 형질별 유전양상 분석 및 원인 유전자 탐색에 유용할 것임.

(고찰)

- 농가에 보급된 제주흑우 수정란 이식 및 인공수정 생산축의 확인을 위하여 분자유전학적 실험기법을 이용한 개체 추적을 수행하였음.
- 유전자 marker 체계는 ISAG 권장 MS marker 11 중, 예비시험 후 선발된 NISA marker 11 중, 흑모색 관련 *MC1R*과 *ASIP* 유전자들을 조합하여 분석하였음.
- 분석결과 부모 정보가 없는 상태에서의 부권부정율이 국제권장기준보다 높은 수준을 보였으며, 형매간 동일개체출현률은 5.3×10^{-10} 으로 조사되었음.
- 친자검정 결과 후보축에 대한 후보 부, 부모 모두가 확인되는 경우는 각각 38.5, 7.4% 였음.
- 부-모-자간 trio-mismatch가 전혀 없는 수정란이식 개체는 공급 수정란 대비 14.7%로 확인되었고, 전체 후보축군 중 25.8%는 후보 부와의 mismatch가 없는 인공수정에 의해 생산된 개체들로 판정하였음.
- 분석과정에서 ISAG marker 분석에서 7 두 동일 3 가지 유전자형 조합, ISAG/NISA 조합 시 2 두가 동일 유전자형 조합을 나타내었음. MS와 모색유전자 분석자료를 모두 조합했을 때는 조사된 모든 개체들이 서로 구분되었다. 현재의 제주흑우집단이 소수 핵군에서 인공수정과 수정란이식 등 생명공학 기법으로 육성된 집단이기에 제주흑우집단의 유전적 다양성은 낮게 나타났음.
- 본 연구는 유전자 개체식별과 혈통관리 체계의 구축을 위해서는 적어도 20 개 이상의 MS marker와 모색유전자들이 이용되어야함을 제안하였음. 향후 제주흑우의 유전형질 개발과 평가를 위해 활용하게 될 가계도는 MS 유전자형과 흑모색 결정에 핵심적인 유전자인 *MC1R*의 유전자형에 따라 작성하였음.

나. 제주흑우 Insertion-deletion polymorphisms (Indel) 유전자형 분석

(1) Indel 마커 선정 및 조사

MS 분석은 대립인자의 수가 많고 다형정보량 (polymorphism information content, PIC)이 다른 마커 시스템에 비해 높아 적은 수의 마커와 비교적 저렴한 실험 비용으로도 개체식별 및 친자감별 등에 이용 가능함. 또한 SNP 마커 시스템은 MS에 비해 마커의 수가 많고 자동화된 방법으로 분석될 수 있는 장점을 가지고 있음.

그러나 MS 마커 시스템은 변이의 복잡성과 기술적인 문제 (stutter bands, allelic dropouts, null alleles, false alleles, size homoplasmy) 등으로 추가 분석이 요구될 때가 많이 발생하고 이에 따른 정확성이 문제가 제기됨.

제주흑우의 품종 식별 및 혈통관리에서 가장 중요한 부분은 분석의 정확성인데 특히, MS 유전자형 분석 에러는 1~5% 정도로 보고 (Bonin 등, 2004; Weller 등, 2004) 되고 있으며 본 연구과제의 1차 년도에 수행된 제주흑우 개체식별 및 친자감별용 MS marker 시스템 구축에서도 몇몇 MS 마커에서 정확한 결과를 얻기 위해서는 추가의 반복 실험이 필요하였고, 조건 설정에 많은 시간이 소요됨에 따라 새로운 marker 시스템의 구축 필요성이 제기되었음.

최근 이러한 문제를 해소하기 위하여 염기 삽입과 결실 다형 (**Insertion-deletion polymorphisms; indels**) 마커를 개체식별 및 친자감별에 이용하려는 시도가 있었고 정확성과 비용 측면에서 효율적임을 보고하고 있음 (Vali 등, 2008).

지금까지 소에서 이용 가능한 Indel 마커 수는 MS 보다 적지만 최근 축종별 genome project 결과물이 집적됨으로써 그 수가 증가하고 있으며 기술적으로도 MS 분석 시스템을 거의 그대로 이용함으로써 기존의 실험장비로도 분석 가능함.

이에 본 연구는 제주흑우 집단에서의 개체식별 및 친자감별을 위해 indel 마커 시스템을 구축하고 효율성을 파악하여 기존에 구축된 MS 마커 시스템의 대체 혹은 보완함으로써 정확한 혈통관리를 도모하고자 수행하였음.

본 연구에 이용된 시료는 농촌진흥청 국립축산과학원 난지축산시험장에서 사육되고 있는 제주흑우 16두에서 채혈하여 DNA 분리에 이용하였음. 전혈에서 DNA 분리는 Sambrook 등 (1989)의 방법을 변형하여 수행하였음. 준비한 DNA 시료는 NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technology, USA)로 흡광도를 측정 한 후 A_{260}/A_{280} 와 A_{230}/A_{280} 이 모두 1.8 이상인 DNA들을 50-60 ng/ μ l로 희석하여 PCR 반응의 주형으로 이용하였음.

Indel 대립인자형 분석에서 산출된 모든 좌위에 대한 대립인자 출현빈도와 이형접합성 (heterozygosity; He), 다형정보량 (polymorphic information contents; PIC), 부권부정율 (exclusion probability, PE)을 산출하였음.

부권부정율은 부모에 대한 정보가 전혀 없는 경우 (NE-1P), 한쪽 부모를 알고 있을 때 다른 한쪽의 부권부정율 (NE-2P)는 경우, 양친과 자손을 모두 알고 있는 경우 (NE-PP)의 부권부정율을 산출하였음. 좌위별 유전자형에 대한 정보의 산출과 친자검정은 CERVUS 3.0.3 (Kalinowski 등, 2007)을 이용하였음. 조사된 개체들 중 유전자형이 동일한 개체의 확인은 CERVUS package 내 동일성검사 (Identity Analysis) program을 이용하였음.

처음 선정된 indel 마커 중 blast 검색에서 여러 염색체에 산재되어 있는 것으로 나타난 것과 PCR 결과가 불량한 마커 primer 그리고 분석에 이용된 제주흑우 16두에서 다형형이 나타나지 않는 마커를 제외한 결과 제주흑우 집단에서 최종적으로 선정된 indel 마커는 총 23종이었음 (표 59 참조). 선정된 마커 중 4bp indel 3개, 5bp indel은 1개이고 나머지는 6~15bp indel로 추후 분석에 최적인 4~6bp indel의 추가 선정이 요구됨.

표 59. 제주흑우 선정 indel 마커

마커명	Indel	Primer F	Primer R	Fragment length
G_1	-/gaacgggctagtgt	agactcttgggcctactcc	caagccacatgaggacagtg	155
G_4	-/tttgtggtgtttt	ttgcaagatctgaaggaattga	tgaacctgtgctattgttcca	269
G_7	-/ctat	tcagcaataactcatttcagtcc	cacctgtatttatgtcatgaagg	227
G_10	-/caaa	gatgcbgggtcaaaaacagat	tgcatgctagagatggaagaa	298
G_14	-/actgcttac	ttgcatgaccaatctccaaa	tgaactggaaggtgagaacag	317
G_15	-/taagaagcgtgtata	gcatgacaccaggacaaatg	cgtcaggtagccgaaagaag	270
G_22	-/kgggctcct	ccaccagcaaggaggtagag	atggttctggccaacacttc	203
G_23	-/gcaa	tgccctcctagagctcatgt	cacacatgctgtccctctg	246
Indel_4	-/agtttag	aaaccacagtagcctgaaaaga	tggccagagacagaaacaga	273
Indel_5	-/gggcaggggaaagt	gccccagttgggattagtct	tgcggttgcattacaggaa	206
Indel_6	-/ggctgctgtc	gggtcacaaagtggcatttc	cctgaggctgttgaactca	182
Indel_7	-/taacc	atccaagcttcccctaagga	caaagtggggcagttaaga	236
Indel_8	-/ttatcagc	atacacccaaggcacaga	ccgggcattacagtcagatt	335
Indel_11	-/attagga	tccccaaagtattctaaccaa	gccatgatagtggcactgaa	181
Indel_13	-/gcatgaa	ctgaccggcggtatagtgt	tcactgttcaatctttgcttttc	260
Indel_15	-/tcaggatgtgtaa	cccccaaccctactccttta	cacaaatagccaaggcaag	194
Indel_16	-/cttttaacgc	tggcctctcctttttgtgt	taacaccatgggaggagaa	242
Indel_21	-/caattt	cgttttgtcctgttctttcg	caaaccaactgcttccaat	257
Indel_22	-/gacagtgc	agggtccttcaccctaggaa	gatatgatgggacctgcac	256
Indel_29	-/natgtcaata	cttgagcaggggaagtgaag	ggaggctgaaaagcaccata	203
Indel_30	-/aatgac	agggatttgacagaggaatga	ctgccctcctgttgatgag	268
Indel_32	-/agcattaag	tcacagtgggctttgtctg	tttctccttggtcctt	345
Indel_38	-/gcccctg	cagccctagcttttctcct	aagcttggcgctaatcagtc	197

표 60. 제주흑우 집단 indel 표지인자별 이형접합성 및 다형정보량

Locus	Ho	He	PIC
G_1	0.688	0.498	0.366
G_4	0.6	0.508	0.371
G_7	0.267	0.239	0.204
G_10	0.6	0.508	0.371
G_14	0.429	0.476	0.354
G_15	0.333	0.287	0.239
G_22	0.313	0.272	0.229
G_23	0.2	0.191	0.175
Indel_4	0.467	0.37	0.294
Indel_5	0.188	0.175	0.155
Indel_6	0.5	0.387	0.305
Indel_7	0.667	0.46	0.346
Indel_8	0.067	0.067	0.062
Indel_11	0.4	0.331	0.269
Indel_13	0.563	0.417	0.323
Indel_15	0.5	0.444	0.337
Indel_16	0.625	0.484	0.359
Indel_21	0.063	0.063	0.059
Indel_22	0.25	0.508	0.371
Indel_29	0.75	0.484	0.359
Indel_30	0.25	0.444	0.337
Indel_32	0.688	0.466	0.349
Indel_38	0.313	0.272	0.229
overall mean	0.422652	0.363087	0.281

Ho, observed heterozygosity; He, expected heterozygosity; PIC, polymorphic information content.

표 60은 23종의 indel marker에서 분석된 이형접합성의 빈도(Ho, He)와 다형정보량(PIC) 등을 나타낸 것임. 각각의 indel 유전자 좌위에서 관찰 이형접합성(Ho)의 평균은 0.423, 기대 이형접합성(He)의 평균은 0.363, 다형정보량의 평균은 0.281로 조사되었음.

유전자 marker별로 다형성 정보량을 보여주는 PIC의 경우 전체 23종의 indel 분석에서 Indel_8과 Indel_21 등 2 종은 PIC의 값이 0.1 이하로 나타나 marker로서의 정보력이 다소 떨어지는 경향을 보였으며, G_1, G_4, G_10, G_14, Indel_6, Indel_7, Indel_13, Indel_15, Indel_16, Indel_29은 0.3 이상의 PIC를 나타냈음.

MS 마커의 경우는 PIC가 0.7이상인 경우 유전자 분석에 의한 친자검정 및 개체식별 뿐만 아니라 유전질환모델 동물의 개발이나 분자유종 marker로서의 개발 등에도 유용하게 이용될 수 있을 것으로 보고한 바 있으나, indel 마커의 경우 2개의 allele인 점을 감안하면 0.3 이상의 PIC를 보이는 마커들은 제주흑우 집단의 개체식별 및 친자감별에 유용한 것임.

표 61. 제주흑우 집단에서의 indel 마커 누적 친자감별효율성

구분	부모선별지수			
	Excl(1) ¹		Excl(2) ²	
	Marker 당	누적	Marker 당	누적
G_1	0.116	0.116365	0.183	0.183028
G_4	0.121	0.222927	0.185	0.334379
G_7	0.027	0.24368	0.102	0.402407
G_10	0.121	0.334888	0.185	0.513116
G_14	0.105	0.405008	0.177	0.599235
G_15	0.039	0.427963	0.12	0.647166
G_22	0.035	0.447848	0.114	0.68755
G_23	0.016	0.456792	0.082	0.71314
Indel_4	0.064	0.491559	0.147	0.755276
Indel_5	0.014	0.498899	0.078	0.774301
Indel_6	0.07	0.534133	0.152	0.808685
Indel_7	0.099	0.580145	0.173	0.841752
Indel_8	0.002	0.581016	0.031	0.846687
Indel_11	0.051	0.602468	0.134	0.867292
Indel_15	0.092	0.639167	0.169	0.889678
Indel_16	0.11	0.678809	0.179	0.909475
Indel_21	0.002	0.679398	0.029	0.912132
Indel_22	0.121	0.71823	0.186	0.928434
Indel_29	0.11	0.749187	0.179	0.941276
Indel_30	0.092	0.772341	0.169	0.951182
Indel_32	0.102	0.795511	0.175	0.959711
Indel_38	0.035	0.80262	0.114	0.964322
Indel_13	0.082	0.818751	0.161	0.970076

¹Excl(1): The combined power of the set of loci to exclude a randomly-selected unrelated candidate parent from parentage of an arbitrary offspring, given only the genotype of the offspring

²Excl(2): The combined power of the set of loci to exclude a randomly-selected unrelated candidate parent from parentage of an arbitrary offspring, given the genotype of the offspring and of a known parent of the opposite sex

표 62. Indel 표지인자 부권부정률 및 동일개체출현율

구 분	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI
Indel marker	0.18124886	0.02992379	0.00307781	0.00000008	0.00022935

NE-1P: Average non-exclusion probability for one candidate parent

NE-2P: Average non-exclusion probability for one candidate parent given the genotype of a known parent of the opposite sex

NE-PP: Average non-exclusion probability for a candidate parent pair

NE-I: Average non-exclusion probability for identity of two unrelated individuals

NE-SI: Average non-exclusion probability for identity of two siblings

표 61과 표 62에서 본 실험에 이용된 indel 마커 조합의 친자감정능력을 나타내는 친자감별효율성, 부권부정률 (PE)과 동일개체부정율 (NE-I) 등을 조사하였음. 친자감별효율성 측면에서는 1차 년도 22종의 MS 마커 구성으로 분석된 것과 비교 시 indel 마커가 떨어지는 경향을 나타내고 있었는데 이는 allele 수와 PIC가 낮은 원인으로 판단됨.

Indel 마커는 정확성과 분석의 용이성 측면에서는 MS 마커 보다 우수하기 때문에 추가의 indel 마커를 선정 확보함으로써 분석의 효율성은 높아질 것임. 최근 한우에서도 유전체 분석이 완료되어 분석 중에 있어 앞으로 추가의 indel 마커 선정에 도움이 될 것임.

Baruch 등 (2008)은 친자감별에 적용하기 위한 SNP 마커의 수를 추정 한 결과를 보면 minor allele 빈도가 0.1일 경우 단일 부모 추정하기 위해서는 54~79개의 마커가 필요하고, 0.2일 경우 45~62, 0.3일 경우 39~57개의 마커가 필요한 것으로 보고하고 있음. 제주흑우의 경우 소규모 축군이고 근친의 정도가 비교적 높아 추가의 indel 마커 선정은 필수적으로 수행되어야 할 것임.

하지만 본 실험에서 제시하는 indel 마커는 친자감별효율성에서 0.81~0.97로 나타나고 있어 제주흑우 집단에서 간이 친자감별 시스템으로 이용이나 MS 마커 분석에서 추가의 분석이 요구되어질 때도 이용 가능하리라 판단되고, 특히 NE-I의 경우 0.00000008로 나타나고 있어 개체식별에 유용한 것으로 확인되었음.

*이상의 결과 중 일부는 한국생명과학회지, 2010, 20권 3-7에 게재되었음. (논문제목: 제주흑우 집단에서 모색 관련 유전자와 microsatellite marker의 다형현상을 이용한 수정란이식 및 인공수정 유래 후대우 검증)

Verification of ET and AI Derived Offspring Using on the Genetic Polymorphisms of Microsatellite and Coat Color Related Genes in Jeju Black Cattle

Sang-Hyun Han, Jin-Cheul Ko¹, Young-Hoon Kim¹, Kim Nam-Young, Kim Jae-Hwan, Moon-Suck Ko, Ha-Yeon Jeong, In-Cheol Cho², Young-Hoon Yang³ and Sung-Soo Lee*

Subtropical Animal Experiment Station, National Institute of Animal Science, RDA, Jeju 690-150, Korea

¹Institute for Livestock Promotion, Jeju Special Self-governing Province, Jeju 690-802, Korea

²Animal Genomics & Bioinformatics Division, National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea

³Department of Animal Biotechnology, Jeju National University, 690-756, Korea

Received December 3, 2009 / Accepted January 14, 2010

To look for the offspring of Jeju Black cattle (JBC) produced by embryo transfer (ET) and artificial insemination (AI), molecular genetic study were carried out in candidate cattle population collected from cattle farms, in Jeju Island, Korea. The genetic marker set was composed of 11 ISAG microsatellite (MS) markers, 11 SAES MS markers selected by our preliminary analysis for population diversity of JBC, and two major coat color related genes *MC1R* and *ASIP*. The results showed higher combined non-exclusion probability for first parent (NE-P1) than that recommended by ISAG (above 0.9995), and the combined non-exclusion probability for sib identity was 5.3×10^{-10} . Parentage analysis showed that the cases identified candidate father only, mother only, and both parents were 77.0, 54.0, and 40.5% in the candidate offspring population. The ET and AI calves were identified as 14.7% to the *in vitro* fertilized eggs provided by the instructions and 32.4% in total population, respectively. However, the result from ISAG marker analysis showed 3 identical allele-combinations in 7 calves, and that from ISAG/SAES MS marker combination did also 1 identical allele-combination in 2 calves. Data from MS and coat-color gene analyses provided information for complete identification of all animals tested. Because the present JBC population was mostly bred using small nuclear founders by bio-engineering technique such as AI and ET, the genetic diversity levels obtained from MS analysis in JBC population were relatively lower than those of other cattle populations including Hanwoo. The results suggested that the more efficient marker combinations including coat color related genotypes should be studied and used for constructing the identification system and molecular breeding of JBC as well.

Key words : *MC1R*, *ASIP*, microsatellite, parentage, Jeju black cattle

서 론

사람이나 동물의 친자검정은 전통적으로 혈액형이나 혈액 단백질 분석방법에서 유전정보를 암호화하는 분자유전학 분석기술의 발달로 유전자 분석이 주목 이루고 있다. 최근 인간의 법의학적 검증에서 DNA 분석기법, 특히 MS의 반복양상에 따른 유전자형 분석이 공식 활용되면서 그 활용영역이 점차 확대되어 가족 품종들의 유연관계, 혈통 증명, 집단 식별 및 개체추적과 친자확인 등에 광범위하게 이용되고 있다[2,6,14,17,25,26]. 이와 함께 한우의 확모색처럼 품종의 특성을 반영하는 특정 유전자의 단일염기변이(single nucleotide polymorphism, SNP)와 부계(Y 염색체)나 모계(mtDNA) 유전을 통해 자손으로 전달되는 유전자의 다형성들은 검증 대상에서 특이적으로 중요한 정보의 보유여부를 관측할 수 있는 자료로

써 활용 가능성이 제기되었다[19,21,22,35,36].

제주흑우는 외형상 한우와 비슷하지만, 체형이 다소 작고 체모가 전반적으로 흑색을 나타내는 우리나라의 재래 소 중 한 품종이다. 1980년대 까지 유전자원의 중요성 보다 산업적 활용을 위한 개량을 지향하면서 한 때 심각한 멸종위기에 놓였던 적도 있으나, 재래가축유전자원의 중요성에 대한 인식이 전환되면서 1990년대 원종 수집과 축근 증식을 위한 연구 및 관리체계가 마련되었다. 현재까지 제주흑우 품종 단독으로 산업화를 진행할 규모에는 이르지 못하였으나, 사육용 희망하는 농가가 점차 증가하고 있으며, 수정란이식(ET)과 인공수정(AI) 등을 통해 소수 농가에 일부 보급되고 있다. 제주흑우의 품종 식별 및 혈통관리에서 가장 중요한 선결과제 중 하나는 타 품종 교배에 의해 생산된 흑색 교잡우와의 구분에 있다. 우리나라에 도입된 외래 소 품종 중 Holstein과 Angus 등은 우성확모색을 지니고 있으며, 이들 품종과 한우의 교잡 1세(F₁, 일명 막통, 막우로 불림)는 점진 흑색을 나타내어 모색 만으로는 제주흑우 명확히 구분되지 않는다. 또한 조지가 품

*Corresponding author

Tel : +82-64-754-5710, Fax : +82-64-754-5713

E-mail : lee6470@nda.go.kr

(2) Indel 마커 선발과 최적의 개체식별 및 친자감별 시스템 구축

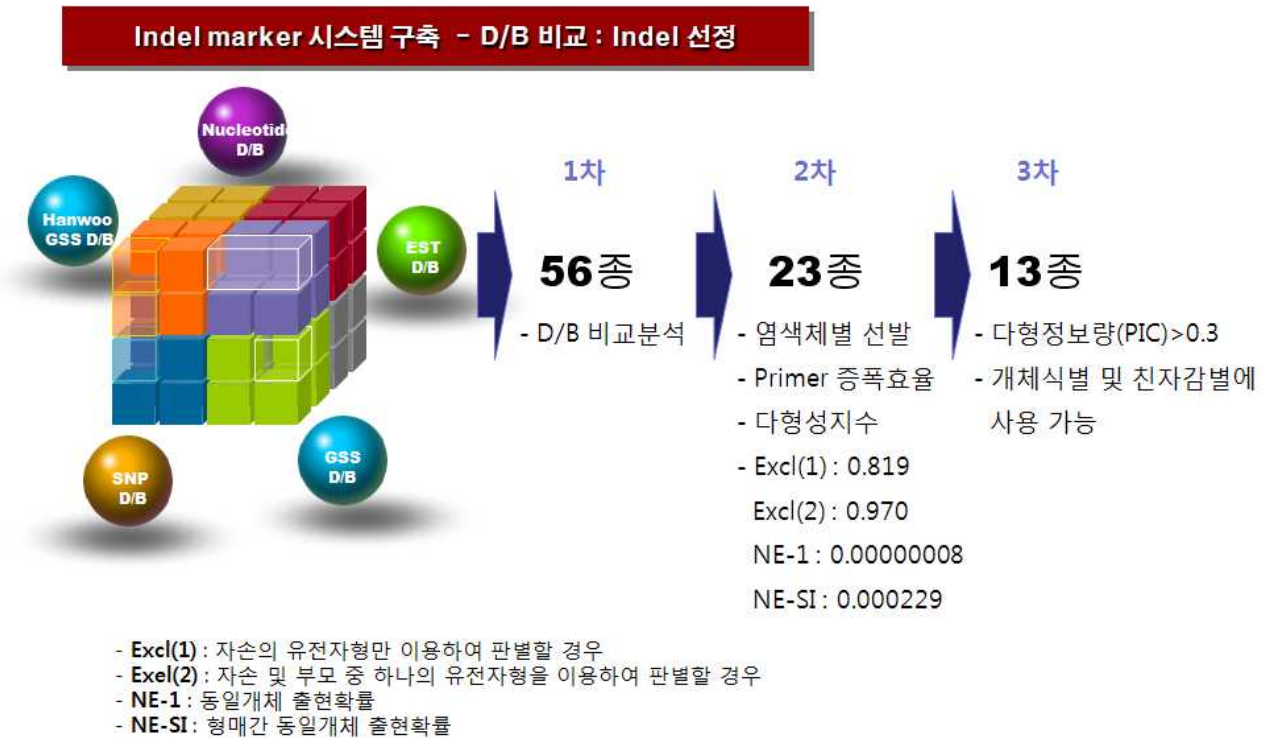


그림 64. Indel 마커의 수집, 선발 및 분석과정

- 제주흑우 190두에 대한 DNA 시료는 농촌진흥청 국립축산과학원 난지축산시험장과 제주특별자치도 축산진흥원으로부터 공시하였으며, 한우 145두, 흑모화우 15두, Hereford 11두, Holstein 54두, Angus 31두, Charolais 21두의 시료는 농촌진흥청 난지축산시험장에서 공시하여 총 467두의 DNA 시료를 사용하였음.
- 각 DNA 시료는 NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technology, USA)로 흡광도를 측정한 후 A_{260}/A_{280} 와 A_{230}/A_{280} 이 모두 1.8 이상인 DNA들을 40-60 ng/ μ l로 희석하여 PCR 반응의 주형으로 이용하였음.
- 분석에 사용된 indel 마커는 2년차 분석결과를 토대로 다형정보량 3.0 이상을 나타내는 9종의 indel 마커를 선발하고 각각을 증폭할 수 있는 primer를 합성 이용하였음 (표 63 참조).
- Indel 대립인자형 분석에서 산출된 모든 좌위에 대한 대립인자 출현빈도와 이형접합성 (heterozygosity; He), 다형정보량, 부권부정율 (exclusion probability, PE)을 산출하였음. 부권부정율은 부모에 대한 정보가 전혀 없는 경우 (NE-1P), 한쪽 부모를 알고 있을 때 다른 한쪽의 부권부정율 (NE-2P)는 경우, 양친과 자손을 모두 알고 있는 경우 (NE-PP)의 부권부정율을 산출하였음. 좌위별 유전자형에 대한 정보의 산출과 친자검정은 CERVUS 3.0.3 (Kalinowski 등, 2007)을 이용하였음.

표 63. 제주흑우 개체식별(친자감별)을 위해 선정된 Indel 마커 9종에 대한 정보

No	marker name	Indel	Primer F (5'---3')	Primer R (5'---3')	fragment length
1	G_1	-/gaacggggctagtgt	agactcttgggcctactcc	caagccacatgaggacagtg	155
2	G_4	-/tttgtgtgtttt	ttgcaagatctgaaggaattga	tgaacctgtgctattgtcca	269
3	G_14	-/actgcttac	ttgatgaccaatctccaaa	tgaaactggaaggtgagaacag	317
4	Indel_6	-/ggctgctgc	gggtcacaaagtggcatttc	cctgagctgttgaactca	182
5	Indel_13	-/gcatgaa	ctgaccggcggatagtgtg	tcacttgtcaatctttgctttc	260
6	Indel_15	-/tcaggatgtgtaa	ccccaaccctactccttta	cacaaatagcccaaggcaag	194
7	Indel_16	-/ctttctaacgc	tggcctctccttttgtgtg	taacaccatggaggaggagaa	242
8	Indel_29	-/natgtcaata	ctgagcaggggaagtgaag	ggaggctgaaaagcaccata	203
9	Indel_32	-/agcattaag	tcacagtgggctttgtctg	tttcctccttggctcctt	345

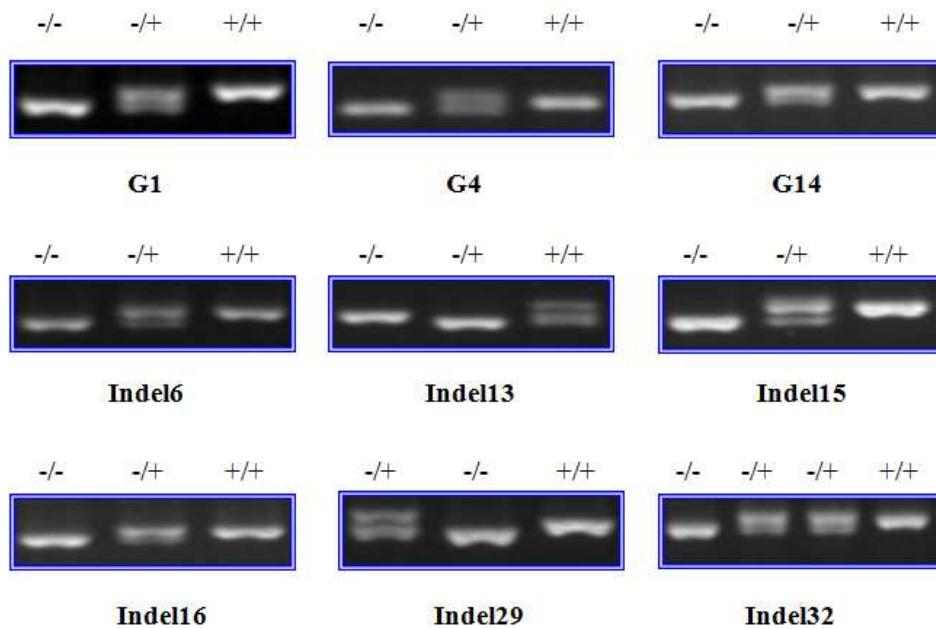


그림 65. Indel 마커별 유전자형 출현 양상

- 7품종 467두를 대상으로 9종의 indel 마커에 대한 유전자형을 분석한 결과, 다형정보량이 제주흑우에서 0.362로 가장 높게 나타나는 반면 Charolias에서 0.246으로 가장 낮게 나타남.
- 또한 한우는 제주흑우보다 조금 낮은 0.334를 보임(표 64 참조).

- 제주흑우와 한우를 제외한 나머지 품종에서 낮은 다형정보량을 보인 것은 PIC 값이 0 혹은 아주 낮은 수치를 보인 마커들이 존재하기 때문임. 예를 들어 다형정보량이 0 혹은 낮게 나타난 마커는 하나의 allele만 나타나거나 혹은 한쪽 allele에 치우쳐 있다는 것임. 즉, Holstein 과 Charolais는 indel_15의 유전자형이 나타남 (그림 65 참조).
- 또한 일본화우에서 G4와 G14 마커가 증폭되지 않았으며, 각 마커의 primer 결합위치의 서열이 타 품종과 다를 가능성이 존재하기 때문에 증폭영역 외부에서 primer를 재제작하여 증폭 유무 및 서열분석을 통해 확인할 예정임 (그림 67 참조).

표 64. 품종별 Indel 마커 다형정보 비교결과

Marker	제주흑우	한우	일본화우	Angus	Holstein	Charolias	Hereford
G1	0.372	0.351	0.332	0.375	0.338	0.312	0.373
G4	0.373	0.374	미분석	0.365	0.375	0.312	0.356
G14	0.341	0.289	미분석	0.375	0.286	0.360	0.340
Indel-6	0.305	0.373	0.346	0.373	0.330	0.261	0.367
Indel-13	0.335	0.372	0.315	0.200	0.166	0.346	0.152
Indel-15	0.309	0.282	0.204	0.263	0	0	0.373
Indel-16	0.362	0.371	0.354	0.348	0.358	0.124	0.356
Indel-29	0.365	0.269	0.346	0.137	0.375	0.239	0.152
Indel-32	0.363	0.333	0.371	0.088	0.114	0.261	0.083
평균	0.362	0.334	0.292	0.280	0.260	0.246	0.283

Marker	제주흑우	한우	일본화우	Angus	Holstein	Charolais	Hereford
G1	0.372	0.351	0.332	0.375	0.338	0.312	0.373
G4	0.373	0.374	n.d.	0.365	0.375	0.312	0.356
G14	0.341	0.289	n.d.	0.375	0.286	0.360	0.340
Indel-6	0.305	0.373	0.346	0.373	0.330	0.261	0.367
Indel-13	0.335	0.372	0.315	0.200	0.166	0.346	0.152
Indel-15	0.309	0.282	0.204	0.263	0	0	0.373
Indel-16	0.362	0.371	0.354	0.348	0.358	0.124	0.356
Indel-29	0.365	0.269	0.346	0.137	0.375	0.239	0.152
Indel-32	0.363	0.333	0.371	0.088	0.114	0.261	0.083
평균	0.362	0.334	0.292	0.280	0.260	0.246	0.283

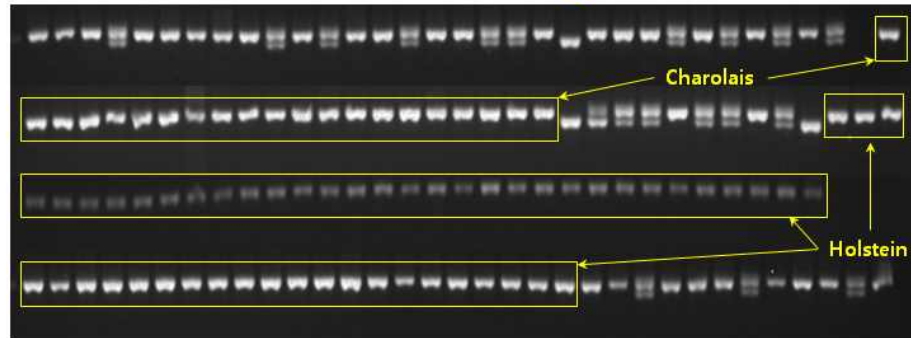


그림 66. Indel_15 마커에서 나타나는 품종-특이 현상

Marker	제주흑우	한우	일본화우	Angus	Holstein	Charolais	Hereford
G1	0.372	0.351	0.332	0.375	0.338	0.312	0.373
G4	0.373	0.374	n.d.	0.365	0.375	0.312	0.356
G14	0.341	0.289	n.d.	0.375	0.286	0.360	0.340
Indel-6	0.305	0.373	0.346	0.373	0.330	0.261	0.367
Indel-13	0.335	0.372	0.315	0.200	0.166	0.346	0.152
Indel-15	0.309	0.282	0.204	0.263	0	0	0.373
Indel-16	0.362	0.371	0.354	0.348	0.358	0.124	0.356
Indel-29	0.365	0.269	0.346	0.137	0.375	0.239	0.152
Indel-32	0.363	0.333	0.371	0.088	0.114	0.261	0.083
평균	0.362	0.334	0.292	0.280	0.260	0.246	0.283



G4 마커



Indel-6 마커

그림 67. 흑모화우에서 나타나는 품종-특이 현상

- 제주흑우 190두에 대한 각 마커별 유전자형 분석결과를 토대로 대립인자 출현빈도 (Ho, He)와 다형정보량을 산출하였음 (표 65 참조).
- 각각의 indel 마커 유전자 좌위에서 관찰된 이형접합성 (Ho)의 평균은 0.478, 기대 이형접합성 (He)의 평균은 0.462, 다형정보량의 평균은 0.362로 나타남.
- 1차 선발된 23종에서 PIC 0.3 이상을 갖는 9개의 마커를 선별하였기 때문에 예상되는 결과였으며, 이들 마커들은 제주흑우 집단의 개체식별 및 친자감별에 유용할 것으로 판단됨.

표 65. 제주흑우 집단 indel 표지인자별 이형접합성 및 다형정보량 (PIC)

No	Locus	Ho	He	PIC
1	G-1	0.600	0.496	0.372
2	G-4	0.568	0.498	0.373
3	G-14	0.441	0.438	0.341
4	Indel-6	0.395	0.376	0.305
5	Indel-13	0.455	0.427	0.335
6	Indel-15	0.376	0.383	0.309
7	Indel-16	0.508	0.476	0.362
8	Indel-29	0.505	0.482	0.365
9	Indel-32	0.458	0.478	0.363
	평균	0.478	0.462	0.362

Ho, observed heterozygosity; He, expected heterozygosity; PIC, polymorphic information content.

- 표 66와 표 67은 indel 마커 조합의 친자검정능력을 나타내는 친자감별효율성, 부권부정율 (PE) 및 동일개체부정율 (NE-I)을 보여줌.
- 친자감별효율성 측면에서 2차 년도 23종 구성으로 분석된 것과 비교해서 효율이 낮게 나타났는데, 이는 다형정보량이 높은 마커를 선별하기는 하였으나, 사용한 마커의 수가 적은 원인으로 판단됨.

표 66. 제주흑우 집단에서 나타나는 indel 마커 누적 친자감별효율성

구분	부모선별지수					
	Excl(1) ¹		Excl(2) ²		Excl(3) ³	
	Marker 당	누적	Marker 당	누적	Marker 당	누적
G_1	0.122	0.1223	0.186	0.1862	0.280	0.2795
G_4	0.123	0.2305	0.187	0.3380	0.280	0.4814
G_14	0.095	0.3038	0.171	0.4510	0.261	0.6166
Indel_6	0.070	0.3527	0.152	0.5346	0.239	0.7082
Indel_13	0.090	0.4013	0.167	0.6126	0.257	0.7832
Indel_15	0.073	0.4542	0.154	0.6724	0.241	0.8355
Indel_16	0.113	0.5157	0.181	0.7317	0.273	0.8805
Indel_22	0.116	0.5716	0.183	0.7807	0.275	0.9134
Indel_32	0.114	0.6203	0.182	0.8205	0.274	0.9371

¹Excl(1): The combined power of the set of loci to exclude a randomly-selected unrelated candidate parent from parentage of an arbitrary offspring, given only the genotype of the offspring.

²Excl(2): The combined power of the set of loci to exclude a randomly-selected unrelated candidate parent from parentage of an arbitrary offspring, given the genotype of the offspring and of a known parent of the opposite sex.

³Excl(3): The combined power of the set of loci to exclude a randomly-selected unrelated candidate parent from parentage of an arbitrary offspring, given the genotype of the offspring and of known parent pair.

표 67. Indel 마커에 대한 부권부정률 및 동일 개체 출현율

구분	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI
Indel marker	0.31855003	0.12708536	0.03551281	0.00007894	0.00791865

(*, ISAG 권장 수준은 0.0005 이하임)

NE-1P: Average non-exclusion probability for one candidate parent

NE-2P: Average non-exclusion probability for one candidate parent given the genotype of a known parent of the opposite sex

NE-PP: Average non-exclusion probability for a candidate parent pair

NE-I: Average non-exclusion probability for identity of two unrelated individuals

NE-SI: Average non-exclusion probability for identity of two siblings

- 표 68과 표 69는 최종 선발된 MS, indel 및 SNP 마커 조합으로 구성된 최종 마커 set의 친자검정능력을 나타내는 친자감별효율성, 부권부정율 (PE) 및 동일개체부정율 (NE-I)을 보여줌.
- MS 마커는 1차 년도에 이용된 22종의 마커들 중 정확성이 높고 다형정보량이 높은 8개 마커가 포함되었으며, indel 마커 역시 다형정보량이 상대적으로 높은 5개가 선발됨. 여기에 제주 흑우의 모색판별을 위한 한 개의 SNP 마커 (MC1R)를 포함한 총 14개의 마커로 구성됨.

표 68. 제주흑우 집단에서 나타나는 MS, SNP 및 indel 마커 누적 친자감별효율성

구분	부모선별지수					
	Excl(1) ¹		Excl(2) ²		Excl(3) ³	
	Marker 당	누적	Marker 당	누적	Marker 당	누적
MC1R	0.142	0.14218688	0.282	0.28213291	0.430	0.43007660
ETH3	0.334	0.42875573	0.516	0.65231079	0.709	0.83428917
INRA23	0.422	0.66962053	0.601	0.86135450	0.785	0.96444270
TGLA122	0.445	0.81651042	0.623	0.94776538	0.812	0.99332088
TGLA126	0.317	0.87471066	0.496	0.97365008	0.683	0.99788438
TGLA53	0.522	0.94013035	0.689	0.99181535	0.867	0.99971757
DIK4460	0.310	0.95871260	0.483	0.99577251	0.672	0.99990741
DIK3027	0.271	0.96986450	0.446	0.99765761	0.630	0.99996573
BL1134	0.307	0.97915008	0.485	0.99879255	0.671	0.99998873
G1	0.120	0.98164565	0.185	0.99901567	0.228	0.99999186
G4	0.122	0.98388003	0.186	0.99919860	0.279	0.99999413
Indel_16	0.103	0.98554152	0.175	0.99933923	0.267	0.99999570
Indel_29	0.116	0.98721596	0.183	0.99945997	0.275	0.99999688
Indel_32	0.117	0.98870678	0.183	0.99955889	0.276	0.99999774

¹Excl(1): The combined power of the set of loci to exclude a randomly-selected unrelated candidate parent from parentage of an arbitrary offspring, given only the genotype of the offspring.

²Excl(2): The combined power of the set of loci to exclude a randomly-selected unrelated candidate parent from parentage of an arbitrary offspring, given the genotype of the offspring and of a known parent of the opposite sex.

³Excl(3): The combined power of the set of loci to exclude a randomly-selected unrelated candidate parent from parentage of an arbitrary offspring, given the genotype of the offspring and of known parent pair.

표 69. MS, SNP 및 Indel 마커에 대한 부권부정률 및 동일 개체 출현율

구 분	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-1	NE-SI
MS 8-SNP 1-Indel 5 marker	0.01129322	0.00044111	0.00000226	1.25×10^{-11}	0.00002863

(*, ISAG 권장 수준은 0.0005 이하임)

NE-1P: Average non-exclusion probability for one candidate parent

NE-2P: Average non-exclusion probability for one candidate parent given the genotype of a known parent of the opposite sex

NE-PP: Average non-exclusion probability for a candidate parent pair

NE-I: Average non-exclusion probability for identity of two unrelated individuals

NE-SI: Average non-exclusion probability for identity of two siblings

표 70. 1차년도 MS 및 SNP 마커에 대한 부권부정률 및 동일 개체 출현율

Molecular marker	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-1	NE-SI
ISAG markers	0.9902701	0.9996973	0.9999991	7.6×10^{-12}	0.9999234
NISA markers	0.9505602	0.9965295	0.9999338	4.4×10^{-10}	0.9997092
ISAG+NISA MSs	0.9995189	0.9999989	3.63×10^{-12}	8.58×10^{-20}	0.9999999
<i>ASIP</i>	0.0150162	0.0791412	0.1396615	0.3015486	0.1620365
<i>MC1R</i>	0.1812402	0.3201026	0.4682533	0.7675028	0.4929075
combined all markers (24 markers)	0.9996120	0.9999993	7.13×10^{-12}	7.69×10^{-21}	5.30×10^{-10}

*따라서, 제주흑우에 적합한 친자확인체계로서 MS, indel, 현재 제주흑우의 등록과정에서 요구되고 있는 *MC1R* 유전자형을 결정하는 두 개의 SNP (*MC1R* g.297C>T, g.310delG)들을 조합했을 때의 친자감별효율성과 집단에 대한 대량분석의 효율성을 고려하여 최종적으로 MS 8 종, indel 5 종, *MC1R*의 SNP 1 종 등 최종 14마커(15좌위)를 선발하였음.



* 제주흑우용 marker 체계의 설계

- 1 SNP: *MC1R* (모색관련 필수 검사항목)

- MS & Indel marker: PIC가 높고 증폭 효율이 뛰어난 marker 선별

MS 8 종, Indel 5 종

→ 총 14 종의 marker 체계

- 선발된 14 종의 마커들을 제주흑우실용화축군의 친자확인 및 생산이력추적제를 위한 동일성 검사 marker로 개발하는 것이 적합하다고 판단됨.
- 선행 연구결과를 바탕으로 한우의 생산이력추적제용 marker set이나 국제적으로 통용되고 있는 ISAG marker set만으로는 제주흑우에 대한 친자확인 유전자검사 체계에 충분히 대응하지 못하고, 다수의 MS marker를 추가해야하는 문제점이 발생하였으며, indel marker에 대한 본 연구진의 선행연구결과와 신규성을 적극적으로 활용하여 제주흑우 집단 및 이를 원원종으로 해서 생산된 제주흑우실용화 축군의 등록, 친자확인 및 유통관리 에 매우 유용하게 이용될 것으로 판단됨.
- 또한 향후 SNP chip 대량분석에서 일본의 흑모화우, 한우, 수입산 흑모색 소의 주류를 이루는 Angus 등과 구분 가능한 SNP 마커들이 추가적으로 발견될 시에는 제주흑우-타 품종을 식별하는 유전자 진단 체계로 발전시킬 수 있을 것으로 사료됨.

*이상의 내용을 기초로 “제주흑우 친자확인 및 생산이력추적을 위한 유전자 마커 개발” 명칭으로 특허 출원중임 (농업기술실용화재단 자료 그림 68 참조).

그림 68. 특허 출원 진행 현황

다. 제주흑우 특이 모색 유전자 분석

(1) 제주흑우와 실용화 축군에서 모색 관련 유전자 분석

제주흑우 품종의 가장 중요한 형질 중 하나는 흑모색이다. 소의 모색에서 흑모색은 *MC1R* 유전자의 유전자형에 의해 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있음. 또한 *ASIP* 유전자의 경우 프랑스 소 품종인 Normande와 Holstein 등에서 brindle 표현형 (흑반 부위에 출현하는 흑모색과 적갈색의 혼합모색)의 원인이 되는 것으로 간주되고 있음.

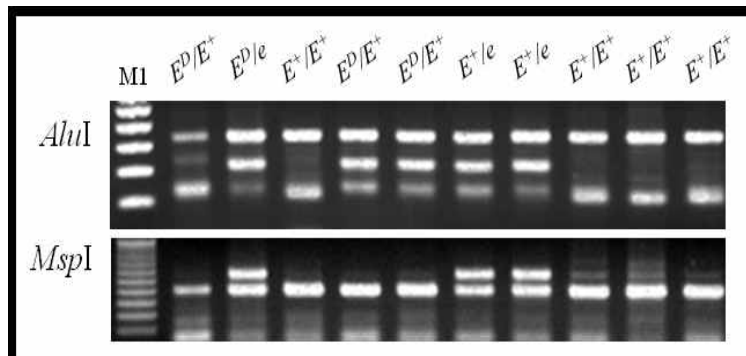


그림 69. *MC1R* 유전자형 분석

제주흑우실용화축군에서 제주흑우 종모우의 정액을 한우 종빈우와 교배해서 생산된 송아지는 종모우와 종빈우에서 물려받은 유전자형의 조합을 통해 출생 시 모색이 결정되게 됨. 제주흑우의 경우는 *MC1R* 유전자가 E^+/E^+ 이거나 E^+/e 이지만, 한우는 e/e 가 대부분이며 전체 한우 집단 10% 내외에서 하나의 E^+ 대립인자를 나타내는 E^+/e 인 경우도 보고되어 왔음.

제주흑우실용화축군의 생산된 종모우의 *MC1R* 유전자형이 E^+/E^+ 동형접합인 경우는 한우의 *MC1R* 유전자형에 상관없이 모두 E^+ 대립인자를 적어도 하나씩 보유하게 되어 검정색의 송아지가 출생하게 됨. 반면, 종모우의 유전자형이 E^+/e 인 경우 해당 종모우의 정액을 이용한 한우 교배 축군에서 생산된 송아지가 흑모색을 나타낼 확률은 50% 정도라고 할 수 있음.

이는 *MC1R*에 의해 결정되는 흑모색과 적모색 또는 황모색의 유전양상이 우성과 열성으로 완전히 구분되기 때문임. 하지만, 최근 조성된 제주흑우실용화축군에서 생산된 F₁ 송아지의 모색이 황색이나 적색 외에도 회갈색, 옅은 흑회색인 경우들이 발견되고 있어, 모색관련 주요 유전자의 다형성과 모색과의 연관관계를 분석하였음.

표 71은 제주흑우실용화사업 이후 농가에서 출생한 실용화축군에 대한 분석 결과임. 제주흑우 실용화축군의 생산은 제주도 축산진흥원과 국립축산과학원 난지축산시험장의 원종의 정액을 농가의 한우 암소와 인공수정을 통해 교배하여 생산되는 체계임. 실용화축군의 *MC1R* 유전자형의 경우 종모우의 유전자형이 *MC1R* E^+/E^+ 나 E^+/e 로 고정되어 있고, 한우의 유전자형이 *MC1R* e/e 가 기본형이므로 생산된 F₁ 자손에서는 *MC1R* E^+/e 나 e/e 를 갖게 됨. 또한 종모우의

MCIR 유전자형이 E^+/E^+ 인 개체들을 중심으로 인공수정용 정액을 생산하고 있기 때문에 F₁의 MCIR 유전자형은 E^+/e 가 80% 이상으로 높은 빈도를 나타내었음.

표 71. 농가에서 출생한 제주흑우실용화축군에 대한 MCIR 유전자형 분석 결과

	2010		2011		2012. 4.		총계	
	두 수	빈도	두 수	빈도	두 수	빈도	두 수	빈도
E^+/e	289	80.7	308	81.5	86	80.4	683	81.0
E^+/E^+	33	9.2	37	9.8	12	11.2	82	9.7
e/e	5	1.4	15	4.0	8	7.5	28	3.3
$E^D/-$	31	8.7	18	4.8	1	0.9	50	5.9
전체	358		378		107		843	

MCIR 유전자형이 E^+/e 인 F₁의 경우, 흑모색을 나타내어 실용화축군으로써 이상이 없으나, e/e 인 경우는 모색이 황색이나 적색을 띄게 되어 한우와 같은 모색을 나타내게 됨. 이는 품종 판정과정에서 한우와의 혼동을 초래할 수 있기 때문에 향후 인공수정용 정액 생산에 있어 종모우의 유전자형을 최우선으로 고려해야 할 것으로 판단됨.

2010년부터 2012년도까지의 분석 결과에서 E^+/E^+ 인 송아지들은 어미소인 한우의 유전자형이 MCIR e/e 가 아니라 E^+ 를 적어도 한 개 이상 가지고 있는 것으로 판단됨. 이는 기존에 농장에서 보유하고 있던 제주흑우 수정란 이식 개체가거나, 실용화사업 이전에 농가에서 제주흑우 정액을 이용한 인공수정을 통해 생산된 개체, 혹은 황/적색 한우에서 산발적으로 관찰되는 E^+/e 의 유전자형을 보유한 어미소에서 유래된 것으로 추정됨.

기존의 연구보고에 따르면 한우의 MCIR 유전자형은 기본적으로 e/e 이지만, 지역 집단에 따라 적게는 3%부터 많게는 15% 까지 MCIR E^+/e 인 동물들이 존재하는 것으로 보고되어 있음. 기존의 보고에서 E^+/e 인 한우가 존재하고 이들의 모색이 흑모색을 나타내지 않는다고 하더라도, 향후 제주흑우를 기본으로 한 실용화축군 육성사업에서 혈통관리, 품종식별 체계 구축, 생산이력제의 시행 등에 있어서는 하나의 명확한 체계가 필요하기 때문에, 제주흑우 정액을 이용한 인공수정을 원하는 농가의 어미소에 대해서는 필요에 따라 적어도 MCIR 유전자형에 대한 사전 분석을 시행하여야 할 것으로 판단됨.

반면, 표 71에서 $E^D/-$ 인 F₁ 개체들이 전체의 5.9% 정도의 수준에서 발견되었음. 물론 2010년부터의 자료 상에서 년차에 따라 그 빈도가 점차적으로 감소하는 추이를 나타내기는 하지만, 20102년 4월 현재까지도 $E^D/-$ F₁ 개체가 확인되었음. MCIR 유전자의 E^D 대립인자는 Holstein이나 Angus 등에서 주로 발견되는 대립인자형으로 한우에서는 발견되지 않는 것으로 확인되었고, 우리나라뿐만 아니라 중국, 일본의 재래 소 품종에서 발견된다는 보고들이 있으나, 재래 소 품종의 고유 대립인자형이 아닌 20세기에 서구의 품종들이 들어와서 개량되는 과

정에서 유입된 것으로 추정하고 있음.

과거 제주흑우 원종집단에서도 E^D -인 개체들이 발견되었으나, 현재는 이에 대한 검사 및 선별과정을 통해 완전히 제거한 상태임. 따라서 실용화축군에서 발견되는 E^D -인 F_1 들은 농가에서 젓소와 한우의 교배에서 생긴 F_1 (먹통 혹은 먹우로 불림)일 가능성이 대단히 높고, 농가에서 실용화축군의 유전자 검사를 위한 채혈과정에서 함께 수집된 것으로 보이며, 향후 실용화축군의 품종관리를 위해서는 반드시 제거되거나 등록에서 제외해야 할 것으로 판단됨. 뿐만 아니라 E^D -의 경우는 한우-교잡우 판독과정에서도 유전자진단에 의해 검출되어 비한우 판정을 받는 기준이 되기도 함. 따라서 제주흑우실용화축군의 품종관리, 혈통등록, 친자확인을 위한 유전자진단 체계의 구축에서 $MC1R$ 유전자형의 분석결과는 앞으로도 반드시 첨부되어야 할 것임.

(2) 제주흑우 실용화축군의 모색과 $MC1R$, $ASIP$ 유전자형의 분포

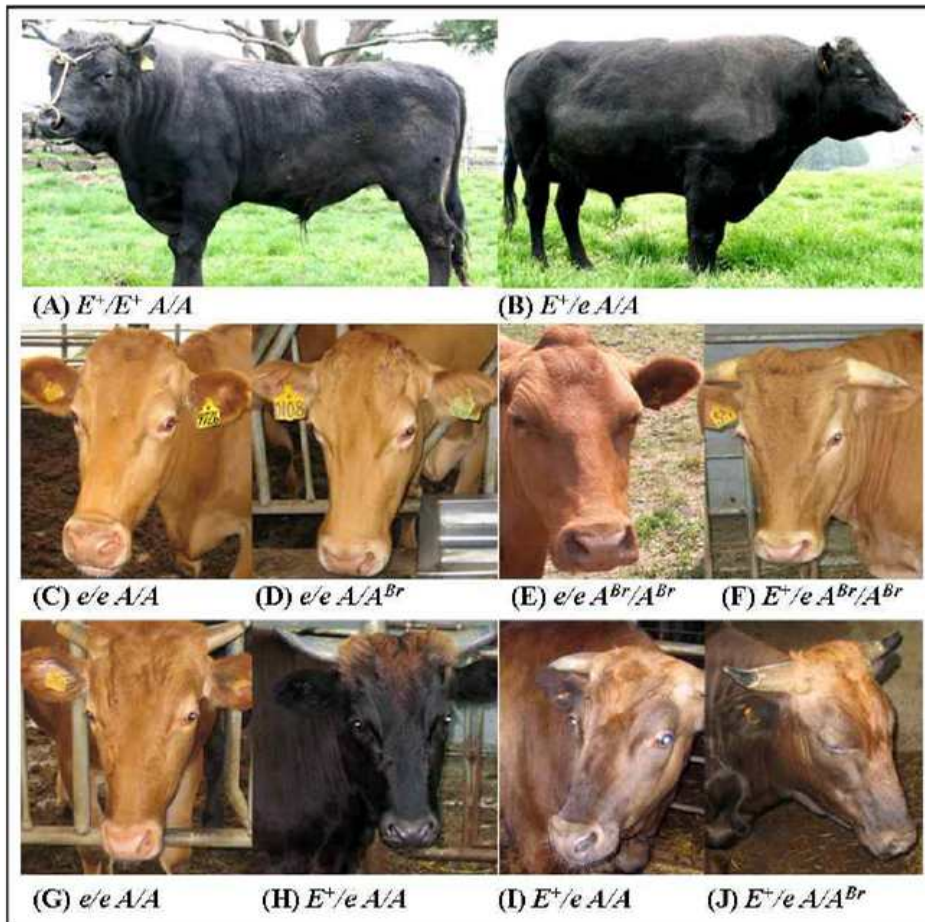


그림 70. 제주흑우, 한우, 두 품종간 교배 F_1 자손의 모색과 $MC1R$, $ASIP$ 유전자형의 조합

그림 70은 제주흑우 종모우 (A-B)와 한우 종빈우 (C-F), 교배후손 (G-J)의 모색과 $MC1R$, $ASIP$ 유전자의 유전자형 조합을 나타낸 것임. 제주흑우 종모우는 $MC1R$ E^D - 유전자형에 의해 모두 흑모색을 보이며, 한우 종빈우의 경우 e/e 나 E^D/e 인 경우에도 모두 황색/적색의 모색임. 생산된 F_1 송아지의 모색은 e/e 인 경우 황모색이었으나, E^D/e 인 경우 흑색과 흑갈색, 회갈색 등

으로 관찰되었음. *MC1R* 이외에 흑모색에 적갈색 모색이 산재되는 brindle 형태의 원인으로 알려진 *ASIP* 유전자형을 분석하였으나, F₁ 송아지의 흑갈색이나 회갈색 출현과는 관계가 없는 것으로 판단되었음.

그림 71은 한우와 제주흑우 두 품종의 교배에서 *MC1R* 유전자형과 모색의 유전양상을 나타낸 것임. *MC1R* E⁺/-인 제주흑우는 모두 흑모색이며, (A)에서는 종모우의 *MC1R* 유전자형에 따라 태어난 F₁ 자손들이 황적색, 이형접합 흑색과 동형접합 흑색으로 관찰되었음. 황적색의 한우 종모우×한우 종빈우의 교배에서는 흑색 송아지가 전혀 출현하지 않고, 흑모색 제주흑우 종모우×황적색 한우 교배에서는 모두 흑모색 송아지가 태어나거나 황적색 송아지가 태어남에 따라 흑모색은 황적색에 대해 우성유전형질이며, 한우의 황적색은 열성동형접합 상태에서 발현됨을 알 수 있었음.

(B)에서 화살표로 표시된 E⁺/E⁺ 제주흑우 종모우를 이용했을 경우 태어난 송아지들은 모두 이형접합이지만 흑모색을 나타내었음. 이상의 결과는 제주흑우실용화축군을 위해 이용하게 될 종모우의 경우 유전자 진단을 통해 *MC1R* 유전자를 E⁺/E⁺ 동형접합인 종모우를 선정하는 것이 바람직하다는 것을 의미함.

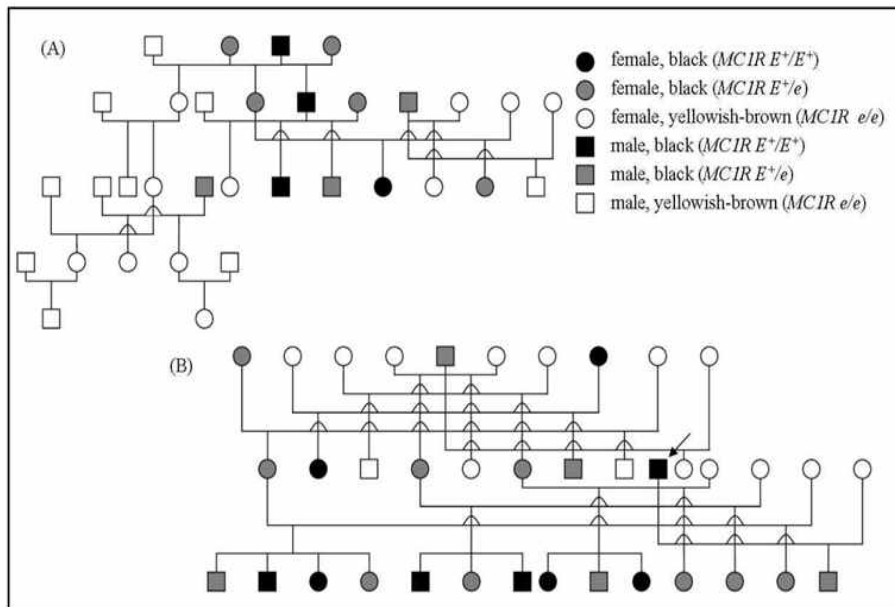


그림 71. 제주흑우와 한우 교배집단에서 *MC1R* 유전자형과 기본모색의 유전 양상

(3) 제주흑우 실용화축군에서 발견되는 특이모색 관련 유전자 분석

MC1R, *ASIP* 이외에 포유류의 모색과 관련하여 모색의 희석 (*dilution*, *MATP*, *SILV*, *champaign*), 갈모색 (*TYRP1*), roan (*KIT*), 알비노증 (*TYR*), 칩소무늬와 관련된 유전자에 대한 다형성 분석에서 한우와 제주흑우 모두 다형성을 나타내었으나, 제주흑우실용화축군 등 제주흑우와 한우의 교배에서 종종 출현하는 회갈색이나, 흑갈색 모색 (그림 72 참조)과 직접적인 관련이 있을 것이라 추정되는 분자유전학적 근거는 발견되지 않았음.



그림 72. 제주흑우 실용화축군에서 발견된 비-흑모색 송아지들의 모색 유형

2. 제주흑우의 타 품종과의 유전적 특이성 분석

가. 미토콘드리아 DNA 분석을 통한 제주흑우 계통유전학적 분석

제주흑우와 한국 내 재래 소 품종들-한우, 충북흑우, 칠향소-, 동아시아 인근 지역인 일본과 중국의 재래 소, 전 세계적으로 사육되는 다양한 소 품종들과의 계통간 유연관계를 조사하기 위해 DNA 염기서열을 이용한 계통 유전학적 분석을 수행하였음. 모계유전 및 세포질 전달의 특성을 나타내는 고도로 빠른 진화 양상을 보이는 미토콘드리아 DNA (mtDNA) D-loop 영역 서열을 결정하고 타 품종들과의 비교분석을 수행하였음. 또한 제주흑우 집단에서 대표적인 종모우로 이용된 바 있는 KN4의 미토콘드리아 유전체 전체 서열을 결정하였고, 이를 전 세계에 분포하는 소 품종에서 보고된 mtDNA 전체 서열들과 비교하였음.

(1) 제주흑우 NJ & network 분석

mtDNA D-loop 서열의 다형성을 바탕으로 작성한 NJ tree에서 제주흑우 집단은 크게 두 개의 clade로 구분되었음. Clade J1에는 국립축산과학원 난지축산시험장 축군 16 두와 제주도 축산진흥원 흑우축군 중 23 두가 관찰되었음. 반면 clade J2에서는 난지축산시험장 축군 17두와 축산진흥원 흑우 1 두만 관찰되었음.

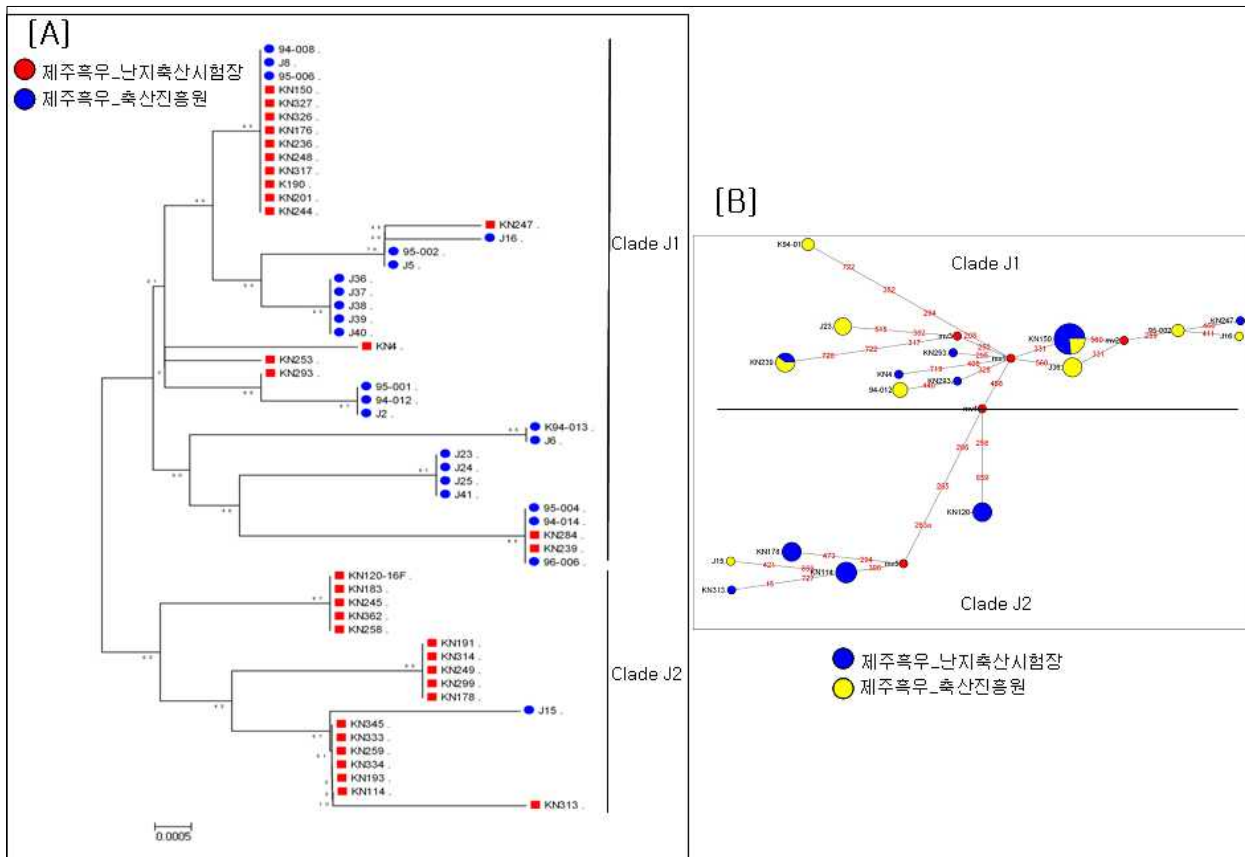


그림 73. 제주흑우 집단별 계통유전학적 분석. [A] NJ tree, [B] 제주흑우 network

제주흑우 D-loop 서열의 NJ tree는 제주흑우 핵군을 구성하고 있는 두 집단의 모계 기원이 전체적으로 둘 이상의 모계에서 유래된 것으로 추정되며, 1980년대 이후 농가에서 수집되었음을 감안하면, 수집되기 이전 시기에 농가에서 길러지던 제주흑우들이 여러 모계 성조에서 유래되었음을 짐작할 수 있음. 또한 수집 후 육성과정에서 난지축산시험장의 축군들은 clade J1, J2의 종빈우들이 고르게 이용되었던 것으로 사료됨. 반면, 축산진흥원 축군에서 J15가 단독으로 clade J2에서 출현하였음 (그림 73A 참조).

제주흑우 mtDNA D-loop 서열에 대한 network 분석 결과는 서열의 haplotype들이 가상의 median center mv1을 중심으로 2-3 부류로 구분되었음. mv4 중심를 기준으로 한 haplotype들은 NJ tree의 clade J2에 해당하는 모든 개체들이 출현하였음. 반면 NJ tree 상에서 clade J1에 출현한 개체들은 mv1을 중심으로 분산된 가지모양으로 관찰되었음 (그림 73B 참조).

(2) 한국 소 품종들 간 NJ & network

우리나라에서 사육되고 있는 한우, 충북흑우, 칩소, 제주흑우 등 4 품종의 계통 유연관계를 D-loop 서열을 이용하여 분석하였음. 제주흑우 NJ tree에서 clade J1과 J2로 구분되었던 (그림 74A 참조) 서열들은 한우를 포함한 전체 4 품종 분석에서도 clade A, B로 구분되었음.

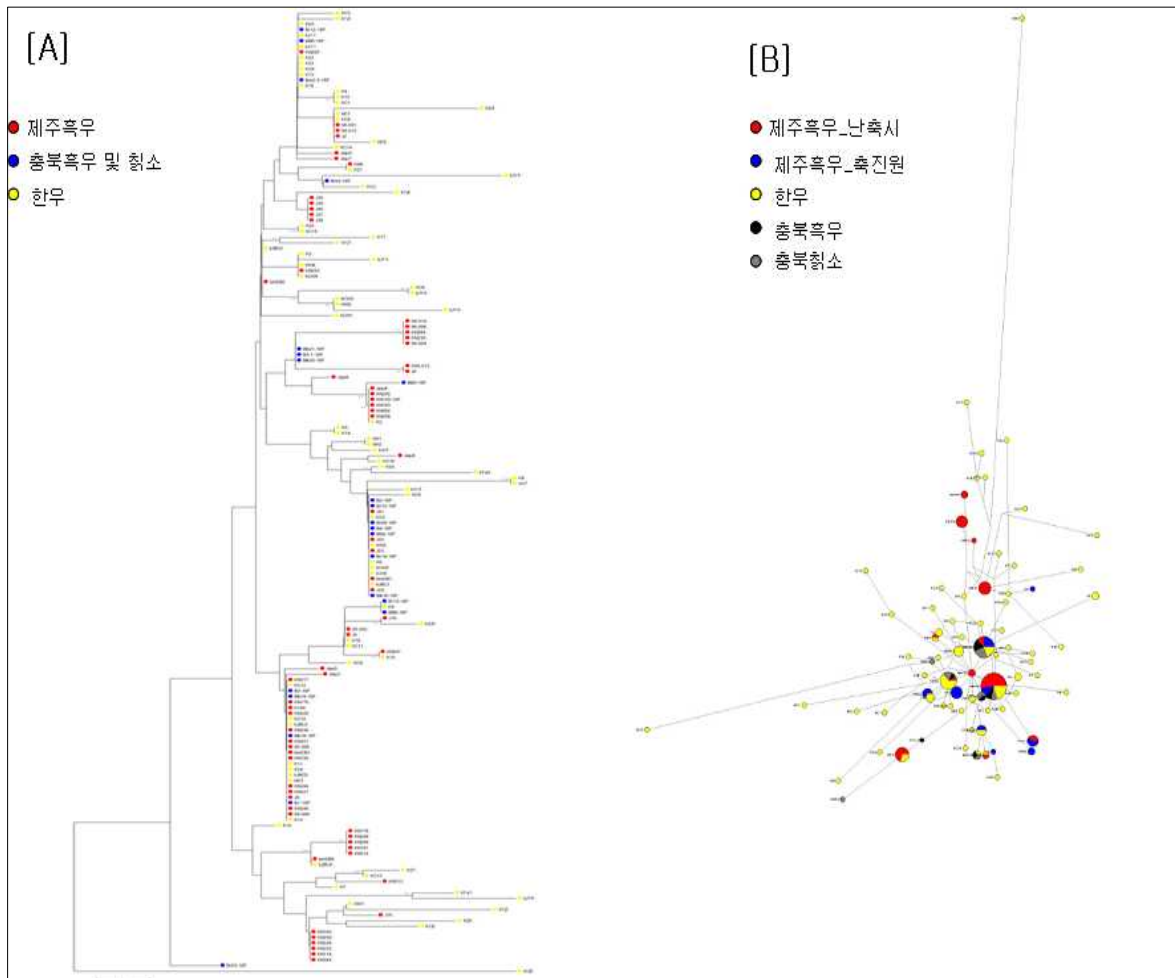


그림 74. 제주흑우와 한우 집단간 계통유전학적 분석. [A] NJ tree, [B] network.

특이할만한 점은 clade J2의 제주흑우들은 clade B에서 출현하며, 이들과 함께 clade를 형성하는 품종은 한우의 일부만 관찰되었고, 제주흑우와 모색이 비슷한 충북흑우와 칩소 품종의 개체들은 clade B에서는 관찰되지 않았음. 반면, clade J1에서 관찰되었던 제주흑우들은 clade A에서 관찰되었고, clade A는 제주흑우 J1 개체들만 아니라 한우, 충북흑우, 칩소 등이 함께 관찰되었음. 전체집단의 크기면에서도 한우는 200만 두 이상의 큰 집단이며, 제주흑우는 약 300여두, 칩소와 충북흑우는 100 두 이하임을 감안할 때, 한우의 유전적 다형성이 가장 높다는 것은 당연한 결과라 할 것임.

집단의 크기가 큰 것은 번식가능한 종빈우의 수도 가장 많다는 것을 의미하며, 제주흑우, 충북흑우, 칩소 등이 완전히 고립된 집단이 아니라는 점에서 한우 암컷들이 위 3 품종의 현존 집단에 일정부분 영향을 미쳤을 것으로 사료되며, clade A와 B로 구분되어 분포하는 한우 D-loop 서열들이 한반도 내 소 품종들이 형성이 기여하였음을 보여주는 분자적 증거라 사료됨. (그림 74A 참조).

D-loop 서열에 대한 median network 분석 결과에서도 동일한 haplotype 내에서 한우-제 흑우, 한우-충북흑우, 한우-충북흑우-칩소, 한우-제주흑우-충북흑우-칩소 등이 공동으로 분포하는 haplotype들이 발견되었음. 또한 한우집단에서 결정된 haplotype들이 숫적으로도 가장 많고 넓은 분산 범위를 나타내어 다형성이 높은 집단임을 보였고, 이에 비해 제주흑우, 충북흑우, 칩소 등은 반대적으로 중심부에 편중되어 있음을 확인하였음 (그림 74B 참조).

D-loop 서열에 대한 분석 결과에서 추정해 낼 수 있는 또 다른 가설은 우리 나라 고유 흑모색 품종인 제주흑우와 충북흑우의 경우 NJ tree의 clade A에서 공통으로 출현하기는 하지만 haplotype에 대한 network 상의 분포를 보면 두 품종 간의 직접적인 연관은 없고, 간접적으로 공통된 한우 모계집단이 두 품종의 형성에 관여한 것으로 추정됨. 칩소의 경우는 충북흑우, 한우와는 연관이 되어 있으나, 제주흑우와는 연관이 없는 것으로 나타났음 (그림 74 참조).

(3) 일본화우 NJ & network 분석

일본 화우의 mtDNA D-loop 서열에 대한 계통 유연관계의 분석 결과는 일본의 화우집단도 2 개의 clade Jap1, Jap2로 구분되었으나, 한반도 품종들의 분석결과와 마찬가지로 모색에 따라 흑모화우와 갈모화우가 구분되는 형태라 할 수는 없고, 이들 두 모색기준의 품종 역시 모계의 기원인 동일한 집단에서 유래되었음을 나타내었음.

Jap2에서 흑모화우보다는 갈모화우의 비율이 더 높게 나타나긴 하지만, 일본의 갈모화우와 흑모화우가 기원이 다르다고 할 만한 증거는 발견되지 않았음. 특히 1600년대 이후 고립된 섬환경에서 관리되고 있는 Mishima 소의 2 가지 haplotype은 M1과 M2가 clade Jap1과 Jap2에 분리되어 출현하였는데, 이는 M1, M2에 해당하는 선조들이 서로 다른 모계에서 유래된 것이며, 이들의 선조들은 Mishima 이외의 일본 Honshu나 다른 섬에서 사육되는 소들과 공동의 조상에서 유래된 것으로 섬으로 이동되면서 유전적으로 고립된 것으로 판단됨. Median network 분석결과 일본 화우의 D-loop haplotype들이 중앙원을 중심으로 방사형으로 분산되어 있으나 완전한 단순 방사형이 여러 개의 haplotype들이 연결된 형태로 다소 복잡한 구조를 나타내어

haplotype간 교류가 다분히 진행되었음을 보여주고 있음.

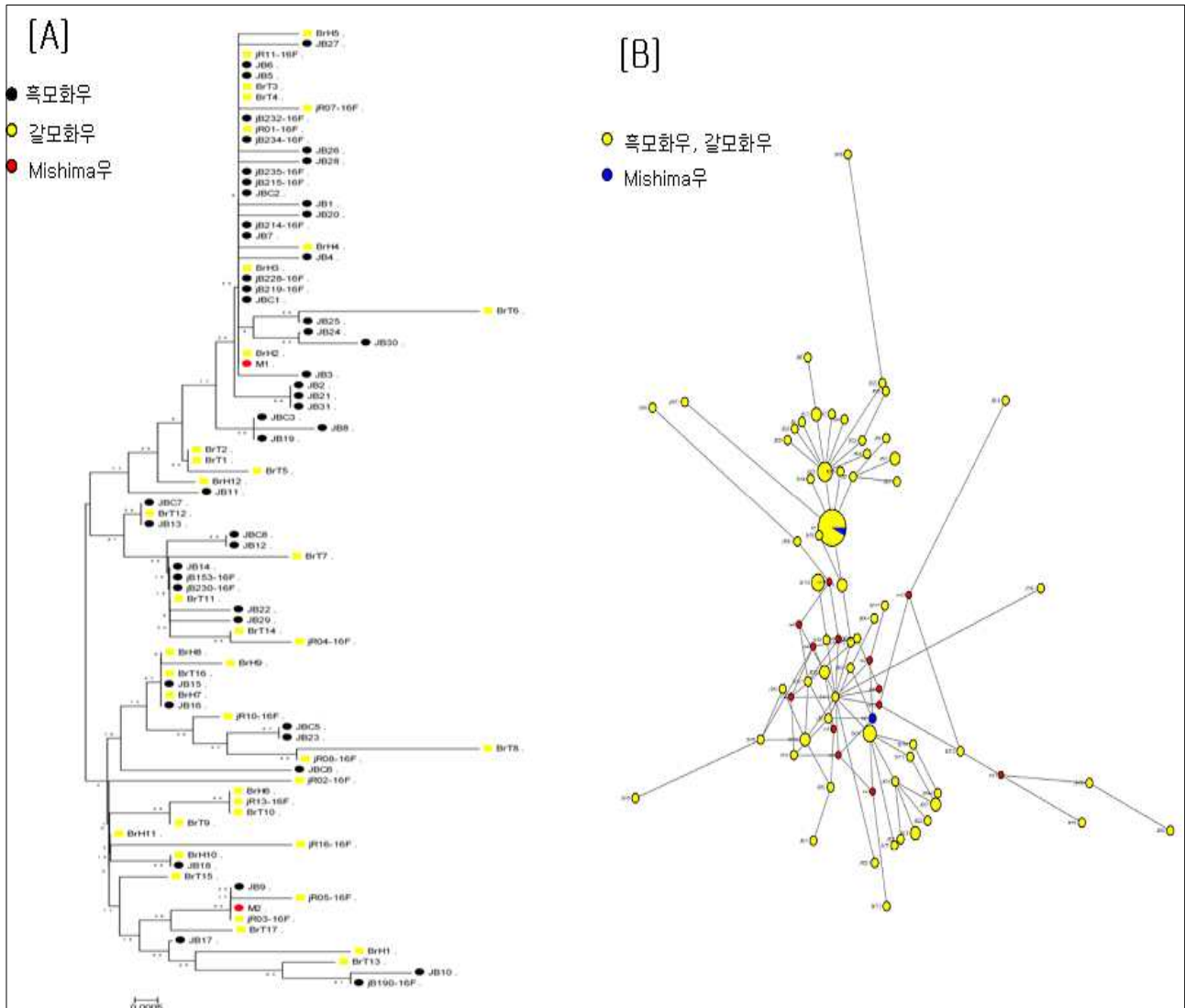


그림 75. 일본 화우 집단간 계통유전학적 분석. [A] NJ tree, [B] network

(4) 제주흑우와 일본화우의 NJ & network 분석

제주흑우와 일본의 화우, 특히 흑모화우와의 계통 유연관계를 구명하기 위해 mtDNA D-loop 서열에 대한 NJ 분석을 수행하였음. 분석된 NJ tree 상에서 제주흑우와 일본의 흑모화우, 갈모화우 등은 명확하게 구분되지 않았음. NJ tree는 크게 2 개의 clade로 구분되었으며, clade a는 일본 화우의 Jap1과 제주흑우 J1의 일부가 함께 출현하였고, clade b에서는 일본 화우 clade Jap2 전체, 제주흑우 clade J2 전체와 제주흑우 J1의 일부가 함께 출현하였음. Median network 분석 결과에서는 부분적으로 제주흑우와 일본 화우-특이적인 haplotype들이 발견되기는 하지만, 전체 중 규모가 큰 haplotype의 경우는 제주흑우와 일본 화우가 공동으로 출현하였음. 특히 일본의 고립육성 집단인 Mishima 우의 시료들은 일본 화우의 분석에서와 마찬가지로 두 개의 clade에 나누어져 출현하였음.

이상의 결과로부터 몇 가지 가설을 제기할 수 있을 것임. 첫째는 제주흑우와 일본의 화우

품종들이 공통의 모계기원에서 유래되었을 가능성임. 두 지역의 집단들이 공유하고 있는 haplotype들이 다수이며, 이들의 규모가 특이적인 haplotype들보다 크다는 점에서 공통 모계 선조에서 기원한 것을 의미함. 두 번째는 품종 형성과정에서 외부 유전자원의 유입을 추정해 볼 수 있음. 이는 제주흑우와 일본 화우 모두 각각의 품종 내에서 특이적인 haplotype들이 출현한다는 점이 그 증거라 하겠음. 셋째는 공통선조에서 유래 후 독립적인 선택 육종 단계로 접어들었다는 것으로, 이는 공통 모계 선조에서 유래된 haplotype에서 파생한 일부의 haplotype들이 비교적 큰 규모를 형성하고 있으며 또한 다시 분지되어 나가는 형태인 haplotype들이 발견되는 것에서 따른 것임 (그림 76 참조).

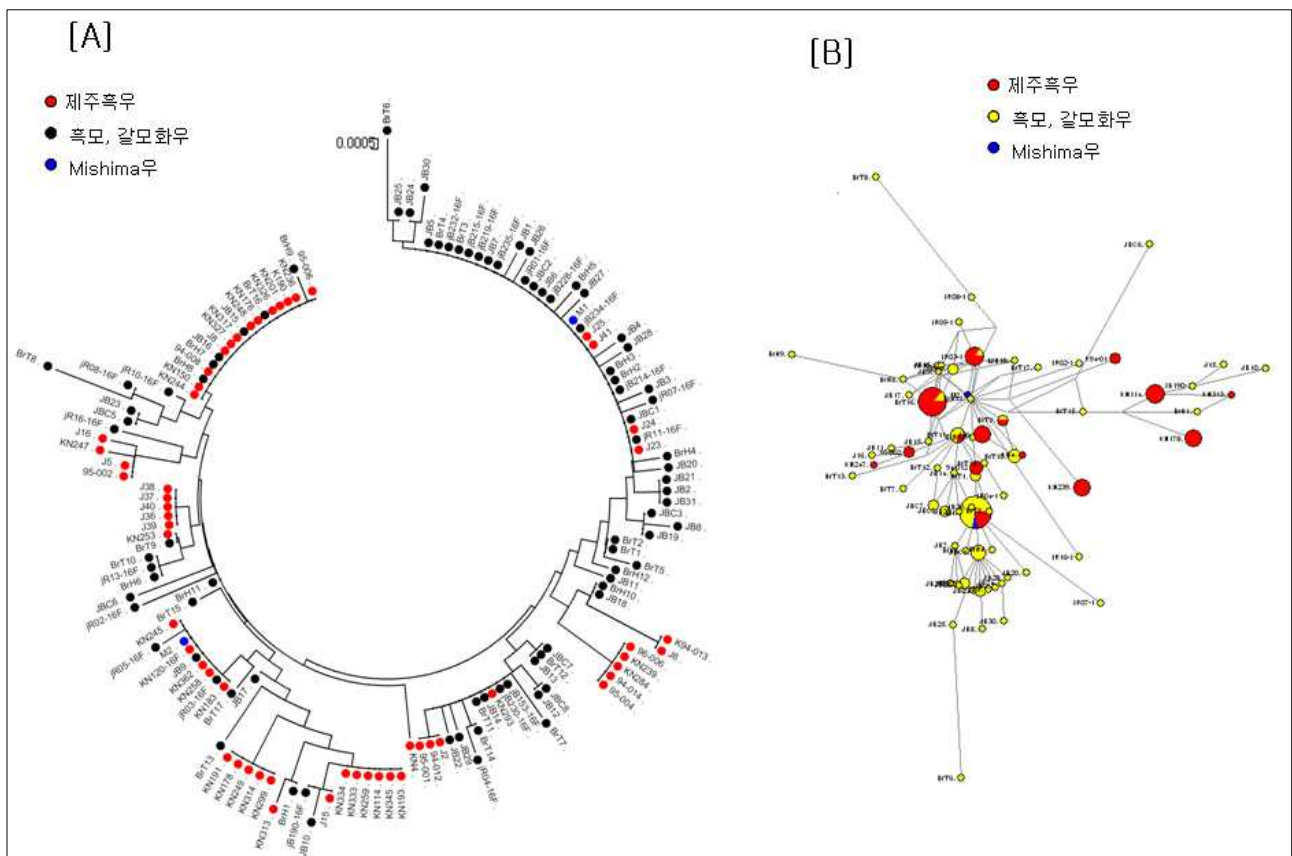


그림 76. 제주흑우와 일본 화우의 계통유전학적 분석. [A] NJ tree, [B] network

(5) KN4(super bull Jeju Black Cattle) 개체의 mt DNA 분석 및 NJ & network

제주흑우 집단 형성 초기에 대표적인 종모우로 활용되었던 KN4의 mtDNA 전체 유전체 서열을 결정하였고, 이를 전 세계 소 품종들에서 보고된 mtDNA 서열들과 비교하였음. NJ tree에서는 현재까지 보고된 소 품종들의 mtDNA 전체서열들이 크게는 4 개의 clade로 구분되었음. Clade 1에서는 *B. indicus* 품종인 Nellore (iNello)와 *B. taurus* 중 Mongolian (Mong01), Iran (Bos49)과 Iraq (Bos50)의 품종에서 보고된 서열들이 출현하였고, Clade 2는 Italy의 Romagnola (Rom478), Cinisara (Cin13, Cin19), Agerolese (Per12) 등이 분지되었음. Clade 3은 Romagnola 2 개체 (Rom475, Rom445)와 Italian Red Pied (Pri18), Chianina (Chi413)이 하나의 clade를 형성하고 나머지 *B. taurus* 품종들이 하나의 clade 4에서 관찰되었음. 한우에서 결정된 17 개체의 mtDNA 전체 서열들과 제주흑우 KN4의 서열은 모두 clade 4에서 관찰되었음 (Pri14에서는 동아

시아의 한국의 한Cla제주흑우, 분지되었음. C와 체 서서남아시아의 Iran, Iraq, 유럽의 Italy, Hungary, Ukraina, Greece, Spain, Germany 등의 소 품종들과 북아메리카의 USA에서 사육 중인 Angus, Srmmental, Charolais와 이들의 교잡우들이 모두 포함되었음.

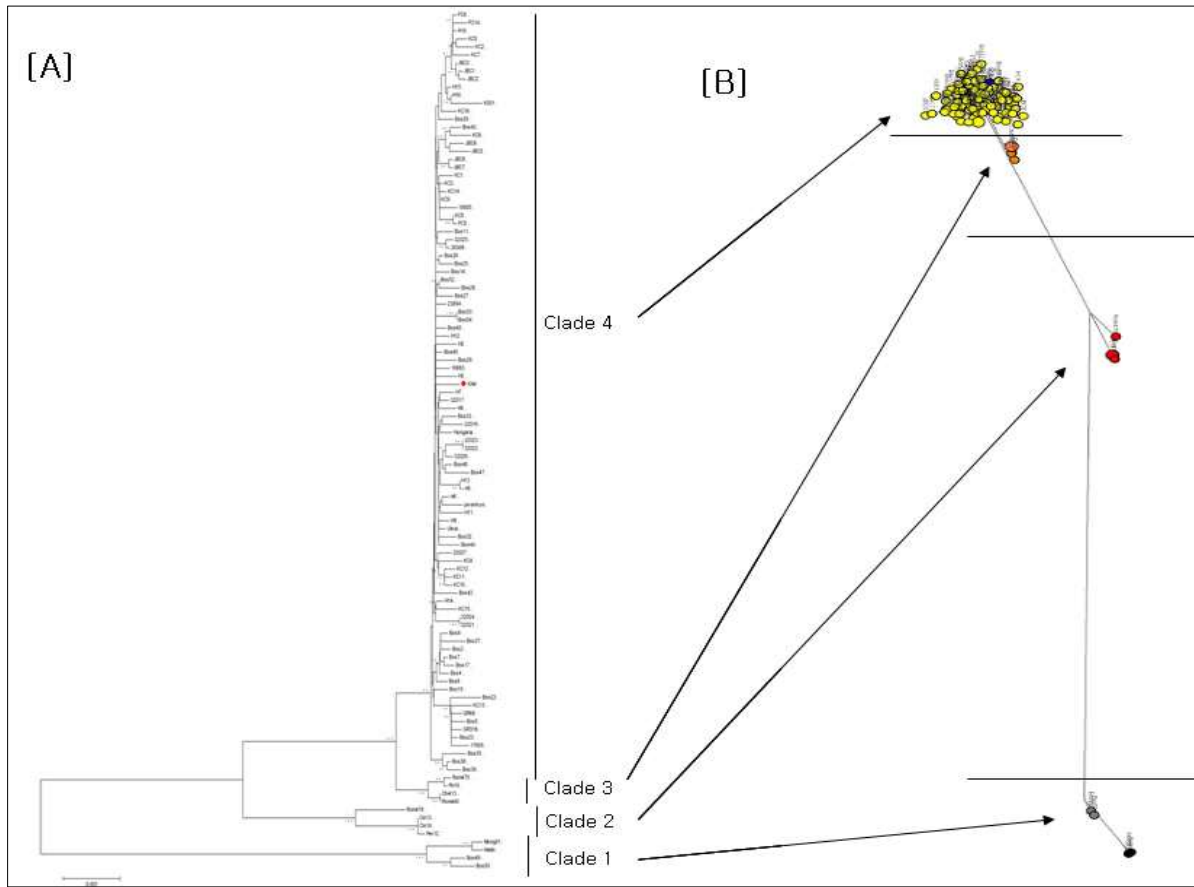


그림 77. mtDNA genome 분석에 의한 계통유전학적 분석. [A] NJ tree, [B] network

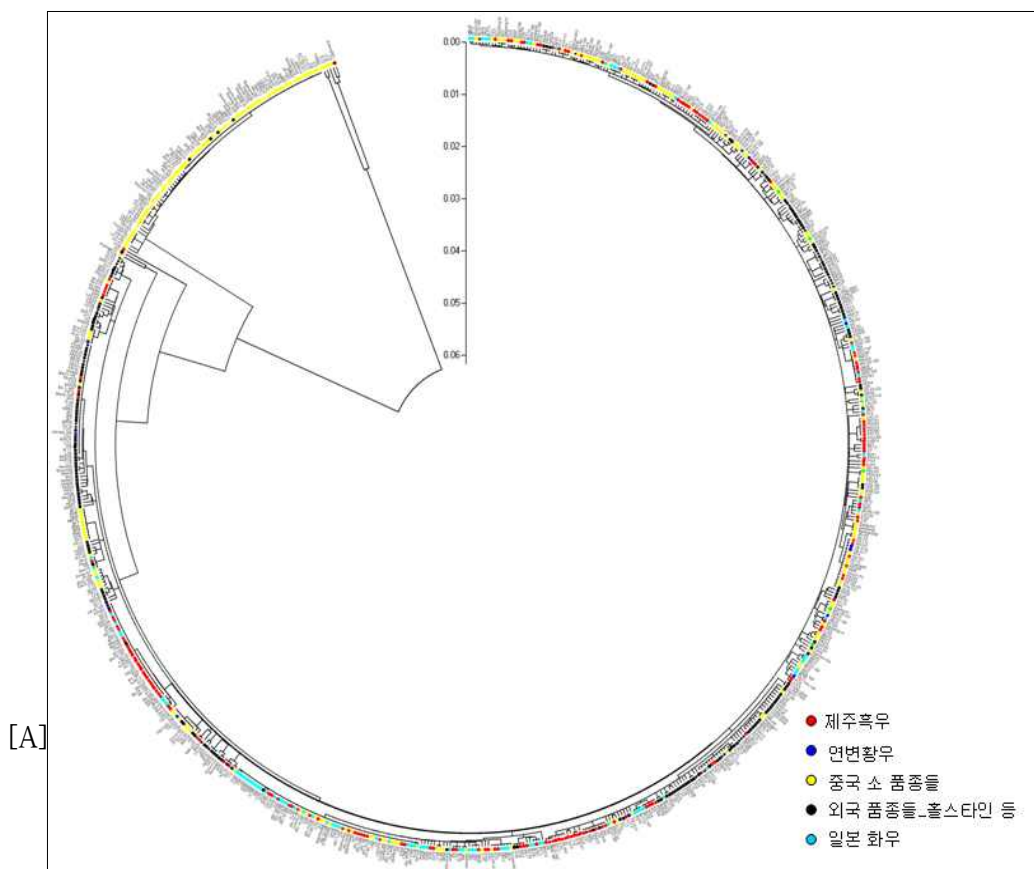
Clade 4의 경우는 전 세계적으로 분포되어 있는 소 품종들의 역동적인 이동과 품종간 교잡을 보여주는 단적인 예라고 할 것임. 즉, 현재 식육 및 낙농을 위해 사육 중인 전세계의 다양한 소 품종들이 모색을 비롯한 여러 가지 표현형 기준을 바탕으로 품종으로 구분되고는 있으나, 이들 품종들이 진화적으로 또는 계통 유연관계가 모두 개개의 품종에 따라 독립적인 품종형성과정과 가축화를 거치며 고정되었다기보다는 이를 이용해온 인간의 선택에 이동, 수요에 따라 대륙간 이동이 진행되어 왔으며 그 이동의 역사가 현대적인 교통수단이 동원되기 시작한 산업혁명 이후에 가속화되었기 때문에 현재의 품종들은 외부 형태적으로는 품종의 특성이 유지되고 있다고 하더라도 모계에 의해서만 전달되는 mtDNA의 서열을 근거로 했을 때, 품종간 유전자 pool의 교류가 진행되었었다는 사실을 부정할 수 없을 것임.

또한 소의 가축화가 서남아시아와 유럽에서 독립적으로 진행되었을 것으로 추정되고 있으나, 소의 대량 사육이 유목문화와 밀접한 관계를 가지고 있고, 농경문화의 중심에서도 소가 가축으로써 중요한 역할을 담당해 왔다는 점에서 두 문화 사이의 교류는 인간의 필요에 의해 지속적으로 진행되었을 것임.

제주흑우 KN4나 한우의 NJ tree 내에서의 위치 역시 소 품종들의 형성이나 이주와 무관하다고 볼 수 없기 때문에 전 세계적으로 분포하는 소 품종들의 가축화 및 이주경로와 함께 조명되어야 할 것임. NJ tree 상에서도 한우의 mtDNA 전체 서열은 clade 4에서 다수의 위치에서 발견되는데 이는 한우가 한반도 내에서만 사육되고 외부로 나가지 않았다 하더라도 역사적으로 외국과의 교역이나 외부인이 한반도 내로 유입되어 정착하는 과정-예를 들어 13C 원의 침입과 가축의 유입-을 고려한다면 유전자의 높은 다형성은 당연한 결과라 할 것이며, 이는 비단 우리나라에만 국한된 역사적 배경이 아니라는 면에서 유럽 소 품종의 mtDNA 유전체 서열과 유사한 서열들이 한우집단에서 발견되거나, 반대로 한우의 mtDNA 서열이 유럽 소 집단의 서열들 사이에서 출현하는 결과로 해석 가능할 것임. 특히 Holstein, Angus 등은 유우, 육우로써 전세계로 보급되어 현지의 소 품종들과 교잡되었을 가능성이 농후하기 때문에 mtDNA 서열의 NJ tree 상에서 지역적 재래 품종들과 유사한 위치에서 발견되고 있음.

(6) 전 세계 소 품종의 D-loop 유전자에 대한 계통유전학적 분석과 제주흑우의 위치

제주흑우와 근연 품종으로 추정되고 있는 한우, 충북흑우, 칠포 등 한국 재래 소 품종들과 일본의 흑모화우, 갈모화우, 중국 연변황우 품종에서 선발한 108 두에서 mtDNA D-loop 유전자 서열을 결정하였고, GenBank database에 기 보고된 한우, 중국 재래 소 품종들, 일본의 갈모화우와 흑모화우, Mishima 재래 소, USA와 Paraguay, Argentina, Brazil, Mexico 등 아메리카, Portugal 등 유럽에서 보고된 *B. taurus* 품종들, 중국과 인도, Mexico, USA 등에서 보고된 *B. indicus*와 yak (*B. grunniens*)의 서열을 추가하여 총 726 두의 D-loop 서열에 대한 계통 유연관계를 분석하였음.



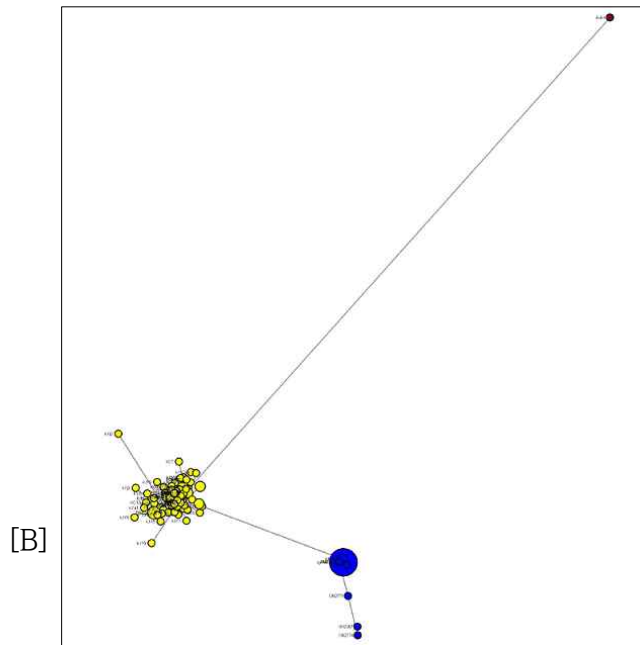


그림 78. 제주흑우와 기타 소 품종간의 계통유전학적 분석. [A] NJ tree, [B] network

D-loop 서열에 대한 NJ tree에서는 yak를 기준으로 하여 *B. taurus*와 *B. indicus*로 크게 구분되는 형태로 분지되었음. D-loop 서열에 대한 *B. taurus* 품종들의 개체들은 전체가 하나의 clade에서 관찰되었으며, 이는 mtDNA 전체 서열의 분석결과와 유사한 결과를 나타내었음.

한반도의 재래 소 품종인 한우와 제주흑우의 경우, mtDNA 전체 서열 분석에서 한우가 *B. taurus*의 넓은 clade 내에서 여기저기 산재되어 나타났던 것과 같이 D-loop 서열에 대한 NJ tree 상에서도 *B. indicus*와 근연인 지역부터 가장 먼 지역에 이르는 광대한 영역에 흩어져서 나타남을 확인할 수 있었음.

한우뿐만 아니라 제주 흑우의 경우도 한우만큼 넓은 범위는 아니지만 어느 한 영역에 특이적인 군을 형성하지 않고 전반적으로 산재되어 분포하는 양상을 보였음. 이 같은 현상은 일본의 재래 소 품종들에서도 유사한 양상을 나타내었음.

아시아, 유럽, 아메리카 등 대륙 특이적인 분포 역시 발견되지 않았으며, 이상의 결과에 대한 원인은 mtDNA 전체 서열에 대한 고찰에서 언급하였듯이 가축으로써의 소의 활용을 위해 인간의 이주, 무역, 현지 적응 후 재래 품종과의 교배 등 다양한 과정을 통해 품종 간 교배 및 유전자 pool의 교류가 진행되었다는 점을 보여주는 증거라 하겠음.

이와 같은 가설에 대한 대표적인 예는 중국 재래 소 품종들 사이에서 출현하는 Chinese Holstein의 경우에서 쉽게 추론할 수 있음. 중국에서 보고된 Chinese Holstein의 서열들 중 일부는 완전히 중국의 재래 소 품종들과 거의 또는 완전히 동일한 서열을 나타내는 경우들이 발견되었으며 이들은 NJ tree 상에서도 중국 재래 소품종의 D-loop 서열들과 동일한 위치에서 발

견되었음. 이는 외부에서 유입된 Holstein과 재래 소의 교잡을 통해 얻어진 F2 이상의 후손이 다시 Holstein과 동일한 특성을 나타냄에 따라 품종 구분에 있어 Holstein으로 판정하여 보고된 것으로 추정됨.

mtDNA가 모계에 의해서, 감수분열과 상관없이 세포질 전달과정을 통해 전달된다는 특성을 상기해볼 때, 외부에서 유입된 종모우의 정액이 인공수정 되어 출생한 F1 또는 그 이상의 후대가 Holstein의 외모 특성을 갖는다하더라도, 종빈우로 재래 소가 이용된 경우 이후 세대에서 출현하는 Holstein 외모의 소들은 전부 재래 소의 미토콘드리아를 보유한다는 점임.

염기서열 변이의 조합을 통해 구성된 haplotype들에 대한 median network 분석에서도 Bos 속 내에서 원시형이라 추정되는 yak와 비교하여 B. indicus와 B. taurus가 연속적으로 진화하였고, 현존 집단의 경우 B. indicus와 B. taurus의 mtDNA 서열은 상당한 유전적 차이를 나타내었음. Haplotype의 분포를 살펴보면 두 종의 품종들이 서로 완전히 구분되어 환형으로 분포하고 있었고, B. taurus 내에서 한국, 일본, 중국 등 아시아 소 품종뿐만 아니라 아메리카와 유럽의 소 품종들도 다양한 위치에서 발견되었음.

본 연구 결과들에서 모계유전 및 세포질 전달의 특색을 나타내면서 핵 유전자에 비해 비교적 빠르게 진화하는 유전자 마커인 mtDNA의 D-loop 또는 전체 서열을 이용하여 전 세계에 분포하는 다양한 소 품종들과 한우, 제주흑우 등 우리나라의 소 품종들의 계통 유연관계를 살펴보았음. 계통간 유연관계 추정에 이용되는 NJ tree 분석과 haplotype의 구성 및 분포를 median network로 분석하여 얻은 결과들은 제주흑우 집단은 적어도 둘 이상의 모계 기원에서 유래되었으며, 이들의 기원이 한우, 일본 화우 등과 공통의 모계 선조에서 유래되었음을 확인하였음. 또한 일부 개체들에서 발견되는 제주흑우, 일본화우 특이적인 haplotype들은 품종형성 과정이나 그 이후 공통선조 이외의 집단에서 새로운 유전자원의 유입을 시사하고 있음.

나. 제주흑우 Bovine SNP chip 분석 및 특이 SNP 탐색

; 유전체 수준의 단일염기다형 (single nucleotide polymorphism, SNP) 현상 비교를 통한 제주흑우와 타 품종과의 유전적 차별성 규명

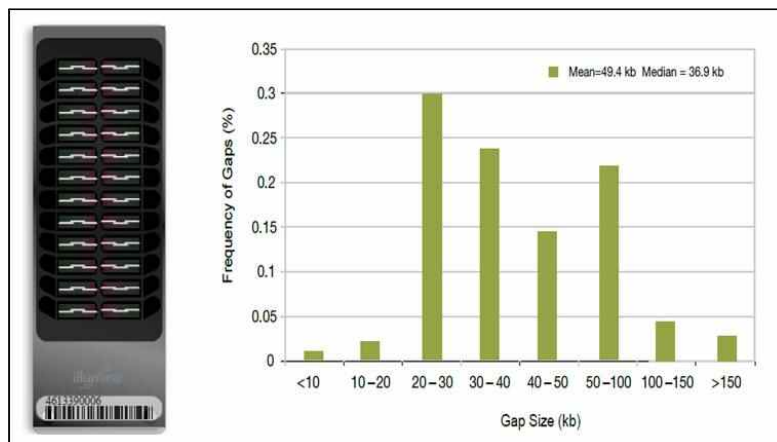


그림 79. Bovine 50K SNP beadchip (Illumina)과 marker 사이의 평균 거리

그림 79와 표 72는 본 연구에 이용된 Bovine SNP beadchip에 대한 정보임. Bovine 50K SNP chip에서 marker의 구성은 총 54,609 개의 SNP marker에 대한 Bovine SNP 50K v2 probe가 평균 50 kb 정도의 간격으로 위치하고 있으며, 소 염색체 (*Bos taurus*, BTA) 1에서 BTA29, BTAX의 SNP를 모두 포함하고 있음. 표 72는 소 19 품종에서 얻어진 SNP 분석 결과로, 전체적으로 47,168 개의 유전자좌위에서 다형성이 발견되었음. 다형 유전자좌위가 가장 많은 품종은 Charolais (43,723)이었으며, 다형성이 가장 적은 품종은 *Bos indicus*에 해당하는 Gir 품종임을 알 수 있음.

표 72. Bovine 50K SNP beadchip에 대한 소 품종에서의 사전 시험결과 (Illumina)

Breed	Samples	Polymorphic Loci*	Mean MAF	Median MAF**
Angus	24	41,073	0.21	0.21
Beefmaster	23	43,114	0.22	0.22
Bos indicus Gir	21	23,567	0.11	0.02
Bos indicus Nelore	19	25,492	0.11	0.03
Brahman	22	29,444	0.13	0.07
Brown Swiss	21	35,971	0.19	0.17
Charolais	19	43,723	0.22	0.21
Guernsey	21	36,748	0.19	0.17
Hereford	24	42,132	0.22	0.23
Holstein	49	42,849	0.22	0.22
Jersey	23	35,346	0.18	0.15
Limousin	39	42,617	0.22	0.21
N'Dama	23	28,869	0.14	0.07
Norwegian Red	17	42,055	0.22	0.21
Piedmontese	21	41,912	0.22	0.21
Red Angus	10	42,388	0.21	0.20
Romagnola	21	38,524	0.20	0.19
Santa Gertrudis	21	41,783	0.22	0.21
Sheko	16	35,084	0.17	0.13
Overall	434	47,168	0.24	0.25

*Minor allele frequency가 0.05 이상, ** 총 54,609 유전자좌위에 대한 시험결과임

당초 제주흑우, 일본흑모화우, 제주흑우×흑모화우 F₁을 대상으로 한 50K SNP v1에 해당하는 54,609 개의 SNP로 구성된 DNA chip을 분석할 예정이었으나, 연구과정 중에서 700K chip marker analysis의 개발로 계획을 변경하였음. 현재 Illumina HD bovine chip (777,962 SNP)을 이용하여 분석 중에 있음.

분석 대상은 제주흑우 종모우 및 후보종모우, 원원종 종빈우 등 총 22 두, 일본의 흑모화 (11), 일본의 갈모화우(10), 중국의 연변황우(4), 한우(8), 충북흑우(5), 충북쇠소(4)과 제주흑우실용화축군(32두) 등으로 구성하였음(표 73 참조). 유전체 수준의 SNP에 대한 유전자형이 결정된 이후, 분석된 유전자형 정보를 바탕으로 계통유연관계에 대한 분석을 수행함.

그 결과 총 SNP 좌위 777,962 좌위로 SNP reading 실패 좌위는 10,466으로 1.34%이고, minor allele frequency 0.05 이하는 188,545로 24.24%, SNP filtered는 565,764로 72.72%의 결과를 나타냄.

이를 통하여 제주흑우와 일본흑모화우 특이적인 SNP의 발굴과 각 품종 집단에서의 빈도 및 분포를 분석하여 제주흑우와 일본흑모화우 특이 SNP 조합을 통한 품종식별체계를 구축하고 제주흑우와 한우, 칠포, 충북흑우 등 타 품종과의 특이 SNP 발굴 및 집단 분석을 통한 개별품종 간 식별체계를 구축하는데 이용될 것임.

제주흑우 실용화축군의 능력개량용 유전자 marker 개발을 위해서 700K SNP chip을 활용하여 제주흑우 실용화 축군과 도축성적 보유분을 포함하여 현재 2013년 6월 기준으로 62두 분석이 완료 되었으며, 최종 분석 목표는 250-300두에 이용할 예정임.

이를 토대로 향후 genome-wide association test를 진행하고 도체형질(근내지방도, 도체중, 등지방두께, 등심단면적, 육색, 조직감) 관련 최상위 연관 유전자군의 선발과 후보유전자형 발굴하는데 활용 예정임.

표 73. Bovine 700K SNP chip 분석에 이용한 소 품종별 개체 수

품종	분석 두수
제주흑우	22
일본흑모화우	11
일본갈모화우	10
충북흑우	5
연변황우	4
충북칩소	4
한우	8
제주흑우실용화축군	32

다. 제주흑우의 도체형질 분석

제주흑우는 흑모색인 특성을 제외하면 외형적으로 한우와 비슷하지만, 체형이 다소 작은 것으로 알려져 있으나, 현재까지 이들에 대한 전반적인 성장형질 및 도체형질에 대한 조사 보고도 되고 있지 않음. 1990년대 이후 제주특별자치도 축산진흥원과 농촌진흥청 국립축산과학원 난지축산시험장에서 명맥을 유지하며 품종의 보존과 육성을 위해 다각적인 노력이 있어왔으나, 개체군의 수적 한계 때문에 상기 형질에 대한 조사나, 특히 비육 출하 후 얻어지는 도체형질에 대한 체계적인 조사는 이루어지지 않는 실정임.

향후 육용종으로 이용될 제주흑우에 맞는 사양과 관리체계의 구축을 위해 한우기준의 관행사양 후 출하된 제주흑우, 한우, 육우의 도체 특성을 조사하였음. 또한 수집된 도축우 집단에서 도체형질 연관 후보 유전자들(*growth hormone, GHI; growth hormone receptor, GHR; pituitary-specific transcription factor, POU1F1; IGF-binding protein 3, IGFBP3*)의 유전자형의 분포와 도체형질의 통계적 상관관계를 분석하였음.

본 연구에 이용된 시료는 제주도 축협공판장으로 1년간 출하된 한우, 육우, 제주흑우를 대상으로 수행하였음. 도축시 방혈과정에서 전혈을 수집하였고, 항응고제가 포함된 보관용기에 수집된 혈액은 실험실로 운반하여 DNA 분리에 이용하였음. 수집한 혈액에서 DNA 분리는 Sambrook 등(1989)의 방법을 변형하여 수행하였음. 준비한 DNA 시료는 NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technology, USA)로 흡광도를 측정 후 A_{260}/A_{280} 와 A_{230}/A_{280} 이 모두 1.8 이상인 DNA들을 50-60 ng/ μ l로 희석하여 PCR 반응의 주형으로 이용하였음.

도체형질 연관 분석을 위한 후보유전자는 *GHI*, *GHR*, *POUIF1*, *IGFBP3* 등 4종에 대한 유전자형을 분석하였음. *GHR*은 liver-specific promoter 상에서 약 1.25-kb LINE1 element의 삽입/결실 여부를 유전자형 분석에 이용하였음. *GHI*은 Reis 등 (2001)에 의해 보고된 primer 서열과 유전자형 결정 방법을 이용하였고, *POUIF1*은 Woollard 등 (1994)의 방법을 이용하였음. *IGFBP3*는 기존에 보고된 SNP 영역을 포함한 절편을 증폭할 수 있는 primer들을 직접 제작하여 PCR 증폭한 후, 제한효소 *HinfI*의 처리를 통해 유전자형을 결정하였음. *GHR*의 경우는 LINE1 전위인자의 삽입여부를 판독하는데 용이한 primer들을 직접 고안하였으며 (Han 등, 2009), PCR 산물을 1.5% agarose gel 상에 전개하여 유전자형을 결정하였음.

출하된 소의 도체형질은 축산물등급판정소 제주지역본부에서 수집하였음. 도체형질의 측정 (출하체중, 등지방두께, 등심단면적, 근내지방도, 육질등급, 육색, 지방색)은 전문 등급판정사 2인이 측정하였고, 동일 개체에서 다른 성적을 나타낸 경우, 출하된 소에 임상적 이상이 있는 경우, 암소나 수소, 비육기간이 지나치게 길거나 짧은 경우, 자연방목 후 출하된 경우는 모두 분석에서 제외하였음. 조사항목과 측정치는 비육우 출하 당시 등급판정기준에 준하였으며, 육량등급, 조직감, 성숙도 등은 통계분석에서 제외하였음. 조사된 도체형질 측정치에 대한 후보유전자 4종 5 유전자좌위에 대한 통계분석은 SAS ver 8.01 program package/PC의 GLM procedure를 이용하였고, 통계모델은

$$Y_{ij} = \text{평균} + \text{Type}_i + \text{Error}_{ij}$$

이며, 평균값의 차이는 Duncan's multiple range test로 유전자형별 유의차 검정을 수행하였음.

(1) 제주지역에서 출하된 소의 도체성적

표 74. 제주지역에서 출하된 제주흑우, 한우, Holstein의 도체성적

품종	n	생체량 (kg)	등지방두께 (mm)	등심단면적 (cm ²)	근내지방 (9단계)	1차등급 (5단계)	육색	지방색
제주흑우	27	574.1	13.0	72.6	4.1	3.1	4.9	3.0
한우	1,257	654.4	12.6	82.5	6.2	2.2	4.8	2.9
육우	578	665.5	6.3	73.2	3.1	3.8	4.7	2.6

표 74는 제주지역에서 출하된 제주흑우, 한우, Holstein 육우 집단의 도체형질에 대한 평균치를 나타낸 것임. 조사 대상은 거세 후 비육과정을 거친 소들만을 대상으로 하였으나, 품종의 특성 상 한우는 30±2개월, Holstein은 20±2개월, 제주흑우는 34±2개월에 출하된 소들만을 대상으로 하였음. 출하시 체중은 육우가 가장 높고 제주흑우가 가장 적은 체중을 나타내었음. 등지방두께는 제주흑우가 평균적으로 가장 두꺼웠으며, 이는 장기간(34±2개월)의 비육에 따라 등지방 축적이 육우나 한우보다도 더 많이 진행되어서 나온 결과로 추정됨. 등심단면적은 한우가 가장 넓었으며, 근내지방도와 근내지방도 기반인 1차등급 (육질등급) 역시 한우가 Holstein 육우나 제주흑우에 비해 월등히 좋은 것으로 관찰되었음. 반면 제주흑우의 경우는 고기의 선호도에 영향을 미치는 척도 중 하나로 알려진 육색과 지방색이 가장 진한 색을 보이는 것으로 확인되었음.

(2) GHR 유전자형의 다형성과 한우 및 제주흑우의 도체형질의 상관 분석

표 75. 제주도 도축한우와 Holstein, 한우×Holstein F₁에서 GHR 유전자의 유전자형과 빈도

Cattle breed	GHR genotype			Allele frequency	
	I/I	I/A	A/A	I	A
Hanwoo	229	237	70	0.648	0.352
Holstein	237	11	1	0.974	0.026
Hanwoo×Holstein F ₁	72	22	0	0.883	0.117

표 75에서 한우와 Holstein, 한우×Holstein F₁에 대한 유전자형의 빈도를 살펴보면, Holstein의 경우 LINE1 element가 삽입된 I 유전자형의 빈도가 97.4%로 월등히 높은 반면 한우의 I 유전자형은 64.8%로 Holstein에 비해 상대적으로 낮은 빈도를 나타내었음.

표 76. 비육 출하 한우의 GHR 유전자형과 도체형질의 상관

Trait tested	Mean ±SD ¹	GHR genotype						Significance
		II (n=229)		IA (n=237)		AA (n=70)		
		Mean±SD	SE	Mean±SD	SE	Mean±SD	SE	
age (month)	29.98±0.76	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
live weight (kg)	642.72±65.51	632.01±70.08 ^a	4.63	649.49±64.77 ^b	4.21	643.71±70.76 ^b	8.46	*
backfat thickness (mm)	12.24±5.22	11.81±5.29	0.35	12.46±5.28	0.34	12.81±4.95	0.59	ns
Eye muscle area (cm ²)	82.49±9.35	81.41±9.82 ^b	0.65	83.80±9.13 ^a	0.59	80.39±9.09 ^b	1.09	*
carcass weight (kg)	370.99±45.29	365.83±48.28	3.19	375.23±45.40	2.95	366.34±46.45	5.55	ns
carcass yield ratio (%)	57.72±03.95	57.88±4.26	0.37	57.72±3.37	0.43	56.95±4.27	1.12	ns
marbling score ²	6.06±2.17	5.87±2.28 ^b	0.15	6.08±2.18 ^{ab}	0.14	6.43±1.77 ^a	0.21	*
final grade ³	2.22±1.11	2.31±1.14	0.08	2.21±1.14	0.07	2.06±0.90	0.11	ns
meat color ⁴	4.85±0.38	4.84±0.39	0.03	4.86±0.38	0.02	4.87±0.38	0.05	ns
fat color ⁵	2.98±0.36	3.01±0.38 ^a	0.03	2.99±0.36 ^{ab}	0.02	2.90±0.35 ^b	0.04	*

¹Overall trait means and standard deviations in the Hanwoo population tested in this study.

²Marbling score: higher numbers for better quality (range from 1 to 9; 1=lean, 9=most marbled).

³Ranges from 1 to 5: 1= grade 1++ (marbling scores 8 and 9, top grade), 2=grade 1+ (marbling scores 6 and 7), 3=grade 1 (marbling scores 4 and 5), 4=grade 2 (marbling scores 2 and 3), and 5=grade 3 (marbling score 1, bottom grade).

⁴Light-darkness level of beef meat ranges from 1 to 7: 1=light red, 7=dark red.

⁵White-yellowness level of backfat ranges from 1 to 7: 1=white, 7=dark yellow.

*indicates means different at 5% significance thresholds and ns indicates means not significantly different. LS Mean±Standard error values in the same row with different letters are significantly different.

표 76은 도축한우의 도체형질과 *GHR* 유전자형의 상관관계를 분석한 것임. *GHR* 유전자형은 생체중, 등심단면적, 근내지방도, 지방색에서 유의적인 상관을 나타냄을 확인하였음. 근내지방도의 경우 LINE1 element가 없는 유전자형 *A*에서 더 높았고, 생체중은 역시 *A* 유전자형이 *I* 유전자형 개체군보다 높았으며, 등심단면적은 *A* 유전자형이 더 좁은 것으로 확인되었음.

표 77. 도축 제주흑우에서 *GHR* 유전자형과 도체형질 성적

유전자형	생체량	등지방두께	등심단면적	근내지방	1차등급	육색	지방색
<i>II</i> (n=13)	576.9	11.8	73.3	4.2	3.1	4.8	3.0
<i>IA</i> (n=11)	563.6	15.0	73.3	3.9	3.2	4.8	3.0
<i>AA</i> (n=3)	600.0	10.7	67.3	4.7	3.0	5.0	3.0

표 77은 비육 출하된 제주흑우 도축우에 대한 *GHR* 유전자형과 도체성적을 나타낸 것임. 출하된 도축 두수가 27두에 지나지 않아 통계적인 유의성 분석에는 적용하지 않았으나, 도체형질 성적의 경향은 한우와 유사한 결과를 보였음. 즉, *A* 유전자형 개체군에서 생체중과 근내지방도는 *I* 유전자형보다 증가하였고, 등심단면적은 감소하는 경향을 나타내었음.

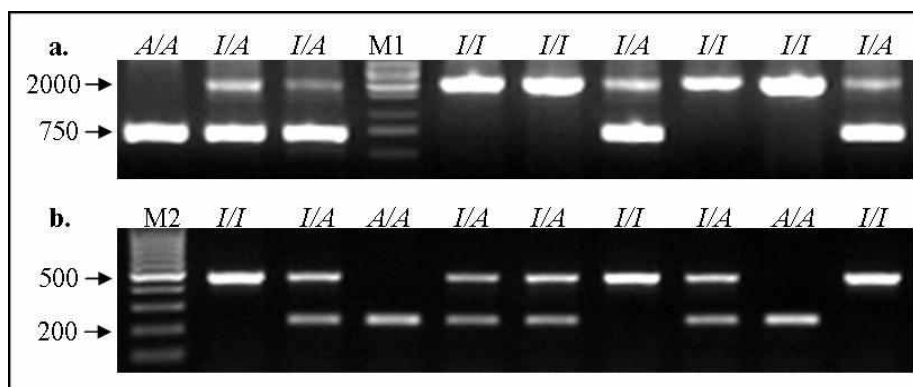


그림 80. *GHR* 유전자의 promoter 상에서 LINE1 element의 삽입/결실에 따른 유전자형

그림 80은 한우, Holstein, 한우×Holstein F1 등 소의 *GHR* 간 특이적 promoter 상에서 발견되는 1.25-kb LINE1의 삽입형 (대립인자 *I*)과 결실형 (대립인자 *A*) 대립인자들과 (a) 이에 대한 분석을 보다 효율적으로 수행할 수 있는 primer의 조합을 통해 얻어진 실험 결과를 나타낸 것임 (b).

(3) *GHI*과 *POUIF1* 유전자형의 다형성과 한우 및 제주흑우의 도체형질의 상관 분석

표 78. 한우집단에서 *GHI*과 *POUIF1* 유전자형의 빈도

Gene	Genotype	No. of animals	Frequency	H(e)	H(o)	χ^2
<i>POUIF1</i>	<i>AA</i>	438	0.537	0.400	0.374	3.306
	<i>AG</i>	305	0.374			
	<i>GG</i>	73	0.089			
<i>GHI</i>	<i>LL</i>	626	0.745	0.247	0.183	52.842
	<i>LV</i>	150	0.203			
	<i>VV</i>	43	0.052			

한우 도축우 집단에서 *POUIF1*의 유전자형은 *AA*가 가장 높은 빈도 (53.7%)를 나타내었고, *GHI*의 *LL* 유전자형이 74.5%로 높은 빈도를 나타내었음 (표 78 참조). 제주흑우 집단에서는 *GHI* 유전자형 중 *VV* 유전자형은 관찰되지 않았으며, 이형접합자인 *LV*만 전체 27 두 중 2 두 (7.4%)에서만 관찰되었고, *POUIF1* 유전자의 경우는 *AA*, *AB*, *BB* 유전자형이 모두 출현하였으며 빈도는 각각 40.8%, 44.4%, 14.8%로 확인되었음.

표 79. 한우 도축우에서 *GHI*과 *POUIF1* 유전자형과 도체형질의 상관

Trait	<i>GHI</i> genotype			<i>POUIF1</i> genotype		
	<i>Leu/Leu</i>	<i>Leu/Val</i>	<i>Val/Val</i>	<i>A/A</i>	<i>A/G</i>	<i>G/G</i>
weight at slaughter (kg)	650.43±71.48	646.87±68.08	645.58±53.24	646.12±70.48	651.11±73.47	656.16±67.86
backfat thickness (mm)	12.22±5.11	11.79±5.06	11.93±5.15	12.11±4.94 ^b	11.72±5.02 ^b	13.75±6.03 ^a
eye muscle area (cm ²)	82.90±9.19	82.05±9.59	82.44±8.92	82.66±9.18	82.64±10.03	82.85±8.25
marbling score ¹	6.11±2.10	5.84±2.14	5.95±2.14	6.12±2.08	6.01±2.14	5.87±2.28
meat color ²	4.80±0.43	4.83±0.41	4.77±0.43	4.81±0.36	4.77±0.42	4.85±0.43
fat color ³	2.94±0.35	2.91±0.37	2.91±0.29	2.92±0.36	2.94±0.30	2.95±0.37

¹Marbling score: higher numbers equal better quality (range 1 to 9; 1=lean, 9=most marbled).

²Meat color: light-darkness level of beef meat (range 1 to 7 1=light red, 7=dark red).

³Fat color: white-yellowness level of backfat (range 1 to 7 1=white, 7=dark yellow).

^{a,b}Values in the same row with different lower case superscripts are significantly different at 5% significance thresholds

한우에서 *GHI* 유전자형 세가지 *Leu/Leu* (*LL*), *Leu/Val* (*LV*), *Val/Val* (*VV*)가 모두 발견되었으나, 도체형질에 대한 통계적 유의성은 전혀 확인되지 않았음. *POUIF1* 유전자형 중 *G/G* 동형접합인 경우 등지방두께에서 *A/-* 인 개체군보다 유의적으로 더 두꺼운 등지방을 갖는 것으로 조사되었음.

표 80. 도축 제주흑우에서 *GHI*과 *POUIFI* 유전자형과 도체형질 성적

유전자형	생체량	등지방두께	등심단면적	근내지방	1차등급	육색	지방색
AA (n=11)	594.5	13.5	73.4	4.6	2.9	4.8	3.0
AG (n=12)	560.8	12.7	72.3	3.8	3.3	4.8	3.0
GG (n=4)	557.5	12.8	71.5	4.0	3.0	5.0	3.0

도축 제주흑우 집단에서는 한우와는 달리 *G/G* 유전자형의 등지방두께가 *A/-* 유전자형 개체군보다는 더 높은 수준으로 확인되지 않음.

(4) *IGFBP3* 유전자형의 다형성과 한우 및 제주흑우의 도체형질의 상관 분석

한우 도축우의 도체형질에 대한 *IGFBP3* 유전자형의 상관관계 분석에서 *IGFBP3* 유전자형이 *a/a*, *a/b*, *b/b*가 모두 출현하나 통계적인 유의성은 전혀 관찰되지 않았음. 도축 제주흑우 27 두 중에서 *IGFBP3* 유전자의 다형성을 나타내는 개체는 단 1 두 밖에 관찰되지 않았고, 이외의 26 두는 모두 *a/a* 동형접합으로 관찰되었음.

표 81. 한우 도축우에서 *IGFBP3* 유전자형과 도체형질의 상관

유전자형	생체중	등지방두께	등심단면적	근내지방	1차등급	육색	지방색
<i>a/a</i> (n=804)	651.7±2.5	12.6±0.2	82.5±0.3	6.2±0.1	2.1±0.0	4.8±0.0	2.9±0.0
<i>a/b</i> (n=341)	657.1±3.8	12.5±0.3	82.3±0.5	6.0±0.1	2.2±0.1	4.8±0.0	2.9±0.0
<i>b/b</i> (n=81)	667.0±7.9	12.4±0.6	83.2±1.1	5.9±0.2	2.3±0.1	4.8±0.0	2.9±0.0

(5) 제주흑우 도축우 집단에서 유전자의 SNP 분포와 도체형질의 성적

제주흑우 도축우 48 두를 대상으로 유전자의 SNP에 대한 다형성을 분석하였다. 표 82는 제주흑우 도축우 집단에서 유전자의 SNP에 대한 도체형질 자료를 정리한 것임. 조사된 5 가지 모든 유전자의 다형이 전부 확인되었으나, *GHI*의 *V/V* 동형접합체는 발견되지 않았고 *IGFBP3*의 경우 *A/A*가 89.7%로 대다수를 차지하였음. 또한 *POUIFI*의 *B/B* (6.7%), *GHR*의 *S/S* (10%), *MSTN*의 *A/A* (3.6%) 유전자형의 빈도는 다른 유전자형에 비해 매우 낮은 수준을 나타내었음 (표 82 참조).

표 82. 제주흑우 도축우에서 유전자형의 다형성에 따른 도체성적

gene	genotype	no. of animals	f	생체중	등지방 두께	등심 단면적	근내 지방	육색	지방색	조직감
<i>POU1F1</i> (n=30)	<i>AA</i>	14	0.467	597.14	13.07	74.50	5.14	4.79	3.14	1.00
	<i>AB</i>	14	0.467	569.29	11.79	74.64	3.64	4.79	3.00	1.36
	<i>BB</i>	2	0.067	580.00	11.50	81.00	4.00	5.00	3.00	1.00
<i>IGFBP3</i> (n=29)	<i>AA</i>	26	0.897	588.89	12.52	75.07	4.44	4.81	3.00	1.11
	<i>AB</i>	1	0.034	430.00	5.00	64.00	2.00	5.00	3.00	2.00
	<i>BB</i>	2	0.069	580.00	14.00	79.50	4.50	4.50	4.00	1.50
<i>GHR</i> (n=30)	<i>LL</i>	16	0.533	590.63	10.81	75.31	4.31	4.81	3.00	1.19
	<i>LS</i>	11	0.367	567.27	15.09	76.64	4.36	4.73	3.18	1.18
	<i>SS</i>	3	0.100	600.00	10.67	67.33	4.67	5.00	3.00	1.00
<i>MSTN</i> (n=28)	<i>AA</i>	1	0.036	640.00	9.00	73.00	6.00	5.00	3.00	1.00
	<i>AT</i>	10	0.357	552.00	11.80	71.80	3.60	4.90	3.00	1.30
	<i>TT</i>	17	0.607	602.94	13.12	77.35	4.82	4.76	3.12	1.06
<i>GHI</i> (n=30)	<i>LL</i>	27	0.900	587.04	12.89	75.48	4.59	4.78	3.07	1.11
	<i>LV</i>	3	0.100	546.67	7.67	70.67	2.33	5.00	3.00	1.67
	<i>VV</i>	0	0.000	-	-	-	-	-	-	-

확인된 유전자형들에 대한 도체형질을 살펴보면, *POU1F1*의 A/A 유전자형인 제주흑우 도체 성적은 A/B은 도체에 비해 생체중은 20kg 정도 더 무겁고, 등지방 1mm 이상 더 두껍고, 근내지방은 1.5 이상 높고, 지방색은 더 진한 양상을 보였다. 반면 등심단면적의 넓이나 육색은 거의 유사한 양상을 나타내었음.

*GHR*의 경우, 유전자형의 빈도가 더 높은 L/L 유전자형의 도체에서 생체중이 23kg 정도 더 무겁고, 등지방은 5mm 정도 더 얇은 양상을 보였음.

MSTN 유전자형 A/T 인 도체에서는 T/T 인 도체에 비해 생체중이 약 48kg 정도 가볍고, 등지방은 1.5mm 정도 얇으면서 등심단면적도 5cm² 정도 적고, 근내지방도가 1.2 정도 더 낮은 양상을 나타내었음.

전체적으로 분석한 표본의 수가 너무 적어 통계적인 유의성이 발견되지는 않았으나, 향후 제주흑우 또는 제주흑우실용화축군의 도체성적에 대한 자료들이 보충된다면, 유전자 marker에 근거한 분자유종체계의 구축에 활용될 수 있는 유용한 자료가 될 것으로 판단됨.

*이상의 결과 중 일부는 Genes and Genomics, 2009, 31 (1); 35-41에 게재되었으며 (논문제목: A *GHR* polymorphism and its associations with carcass traits in Hanwoo cattle), Genes and Genomics, 2010, 32, 105-9에 게재되었음 (논문 제목: Effects of *POU1F1* and *GHI* genotypes on carcass traits in Hanwoo cattle).

A *GHR* Polymorphism and Its Associations with Carcass Traits in Hanwoo Cattle

Sang-Hyun Han¹, In-Cheol Cho², Jin-Hyoung Kim², Moon-Suck Ko¹, Ha-Yeon Jeong¹,
Hong-Shik Oh³ and Sung-Soo Lee^{1*}

¹Jeju Sub-station, National Institute of Animal Science, RDA, Jeju 690-150, Korea

²National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-350, Korea

³Department of Science Education, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

Received , 2009; accepted , 2009

ABSTRACT

The growth hormone receptor (*GHR*) is a membrane transmitter for the growth hormone signal transduction pathway that regulates various metabolic activities, including cell growth and expressions of cytokine genes. The presence or absence of a genetic polymorphism for the LINE-1 retroposon in the P1 promoter, which specifically regulates the *GHR* gene expression in the liver, was screened by a novel detection method and examined for its relationships with carcass traits in Hanwoo cattle. Hanwoo cattle had taurine type LINE-1 present (allele *I*) as well as incidine type LINE-1 absent (allele *A*) promoter sequences. Three genotypes, *II*, *IA* and *AA*, showed frequencies of 49.1, 36.7 and 14.2%, respectively. The effects of allele *A* were significant on mean differences for final weight, eye muscle area, marbling score and fat color ($p < 0.05$), but not for carcass weight, backfat thickness, final meat quality grade or meat color ($p > 0.05$). Most 30-month old Hanwoo steers bearing the LINE-1 absent promoter had whiter fat color, heavier live weight and higher marbling score, reflecting intramuscular fat deposition in *M. longissimus dorsi*, compared to animals bearing a LINE-1 present promoter. This suggests that a *GHR* polymorphism could be a potential genetic marker for improving beef production of Hanwoo cattle.

Key words: Association, carcass trait, *GHR*, Hanwoo, LINE-1 polymorphism.

INTRODUCTION

Growth hormone (GH) plays multiple roles for growth and cellular metabolism in vertebrates. It exerts its effects via specific *GHR*-mediated signal transduction in the target cells. Alterations of *GHR* function can affect its binding capacity and the signaling pathway. Several examples are found in man,

such as mutations of the *GHR* gene that cause Laron syndrome and idiopathic short stature (Rosenbloom et al., 1998; Liu et al., 1999; Blair and Savage, 2002). In cattle, the *GHR* gene is encoded at BTA20 and has 9 untranslated exons. Among these, exon 1A is liver-specific, and at the upstream region, the P1 promoter is an important regulatory element for hepatic *GHR* expression (Moody et al., 1995; Moio et al., 1998; Jiang and Lucy 2001a; 2001b).

The Hanwoo breed is an important Korean beef cattle breed, and carcass traits, including marbling score,

*To whom correspondence should be addressed.
Email: lee6470@rda.go.kr

Effects of *POU1F1* and *GHI* genotypes on carcass traits in Hanwoo cattle

Sang-Hyun Han · In-Cheol Cho · Moon-Suck Ko · Ha-Yeon Jeong · Hong-Shik Oh · Sung-Soo Lee

Received: 1 April 2009 / Accepted: 26 January 2010 / Published online: 30 April 2010
© The Genetics Society of Korea and Springer 2010

Abstract

Growth hormone and pituitary specific transcription factor-1 are expressed in the pituitary gland and play critical roles in the development and growth of mammals. Genetic polymorphisms of *GHI* and *POU1F1* genes were investigated using PCR-RFLP and tested for statistical associations with meat quality traits in Hanwoo cattle. Three genotypes were found for each gene in a population of Hanwoo steers reared for beef production. No meat quality traits were significantly associated with the *GHI* genotypes. Animals with the *GHI* *Leu/Leu* genotype had heavier weights and higher marbling scores, but statistical significance was not detected. Backfat thickness was associated with *POU1F1* genotypes. Backfat of *POU1F1* *G/G* homozygotes was thicker than that of other genotypes ($p < 0.05$). Other carcass traits, including weight at slaughter, carcass weight, carcass yield ratio, eye muscle area, marbling score, meat color, and fat color were statistically insignificant in *POU1F1* genotypes ($p > 0.05$). These findings suggest that the *POU1F1* *G/G* genotype may contribute to improving body weights and backfat in Hanwoo steers using sire-based predictions.

Keywords *GHI*; *POU1F1*; Polymorphism; Backfat; Hanwoo

S.-H. Han · M.-S. Ko · H.-Y. Jeong · S.-S. Lee (✉)
Subtropical Animal Experiment Station, National Institute of Animal Science, RDA, Jeju 690-150, Korea
e-mail: lee6470@korea.kr

S.-H. Han
Educational Science Research Institute, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

I.-C. Cho
National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-350, Korea

H.-S. Oh
Department of Science Education, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

Introduction

In the livestock industry, selection of animals with faster growth rates and better body composition is very important for producing high quality meats. Recent advances in molecular biology techniques, such as DNA sequencing and mutation mining, enable easy detection of genetic polymorphisms and aid in the development of potential markers associated with or linked to desirable characteristics of livestock breeds, including meat quality traits such as intramuscular fat deposition.

For the *GHI* gene, several polymorphisms have been described at different sites including the peptide-encoding regions. Three missense nucleotide substitutions were detected in exon 5 at codon 127 Val/Leu (Lucy et al., 1993), 172 Thr/Met (Chikuni et al., 1994) and 112 Arg/Asp (Yoon et al., 2003). Other polymorphic sites were also reported in the promoter region (Rodrigues et al., 1998; Ferraz et al., 2006), 3' flanking region (Unanian et al., 1994) and intron 3 of the *GHI* gene (Zhang et al., 1993). *POU1F1*, a pituitary-specific transcription factor is responsible for pituitary development and controls the expressions of growth hormone (GH), prolactin, thyroid-stimulation hormone and GH-releasing hormone receptor genes (Nelson et al., 1988; Simmons et al., 1990; Lin et al., 1992; Cohen et al., 1996; Joudrey et al., 2003). *POU1F1* gene mutations lead to a loss of *GHI* expression, which causes pituitary hypoplasia, congenital hypothyroidism, dwarfism and prolactin deficiency in mice and humans (Li et al., 1990; Pfaffle et al., 1992; Tatsumi et al., 1992).

Quantitative trait locus (QTL) searches found that the region surrounding *POU1F1* had proposed association effects on ruminant animal production (Woollard et al., 2000). *POU1F1* polymorphisms showed associations with body composition and milk production in dairy cattle (Renaville et al., 1997) and several carcass traits in Brangus bulls and Piemontese (Di

제6절 제주흑우 우수 유전형질 보존 및 응용기술 개발

- 체세포핵이식 기술 최적화 및 복제수정란 생산 효율 개선
- 체세포복제수정란 이식 및 제주흑우 복제소 생산
- 체세포복제소의 생식능력 검정
- 줄기세포주 확립 기술 개발

1. 체세포핵이식 기술 최적화 및 복제수정란 생산 효율 개선

가. Oosight imaging system을 이용한 복제 수정란 생산 효율 개선

Improved Cloning Efficiency and Developmental Potential in Bovine Somatic Cell Nuclear Transfer Using the Oosight Imaging System

Abstract

In somatic cell nuclear transfer (SCNT) procedures, delicate enucleation of a recipient oocyte is critically important to cloning efficiency. This study was to compare the effect of two enucleation systems, 'Hoechst staining and UV irradiation' and 'Oosight imaging', on *in vitro* production of bovine SCNT embryos using Jeju Black (Korean Native) Cattle donor cells and their developmental potential. In the SCNT group using Oosight imaging, the fusion rate (75.6 % vs. 62.9%, $P<.01$), cleavage rate (78.0% vs. 63.7%, $P<.05$) at day2, blastocyst rate (40.2% vs. 29.2%, $P<.01$) at day 8 and total cell number (128.3 ± 4.8 vs. 112.2 ± 7.6 , $P<.05$) were significantly higher than the SCNT group using Hoechst staining and UV irradiation. Also, the apoptotic index was significantly lower in the Oosight imaging group (2.8 ± 0.5 vs. 7.3 ± 1.2 , $P<.05$) compared with the Hoechst staining and UV irradiation group. In addition, in the Oosight imaging group, the relative expression levels of Oct4, Nanog, Interferon tau, and Dnmt3A mRNA were higher, and of Caspase-3 and Hsp70 mRNA were lower, compared with the Hoechst staining and UV irradiation group ($P<.05$). The Oosight imaging system improves the cloning efficiency and *in vitro* developmental potential of bovine SCNT embryos through controlled reprogramming of gene expression.

Keywords: bovine, SCNT, enucleation, Hoechst staining and UV irradiation, Oosight imaging

체세포핵이식 복제 수정란 생산에서, 탈핵 시 기존에 주로 사용하는 Hoechst 염색과 UV 노출은 세포질 손상을 유발하는 것으로 알려져 노출을 극소화해야한다는 보고가 있었음. 따라서 spindle view system을 이용하여 세포질 손상 없이 탈핵을 했을 때 복제 효율에 미치는 영향을 조사했음.

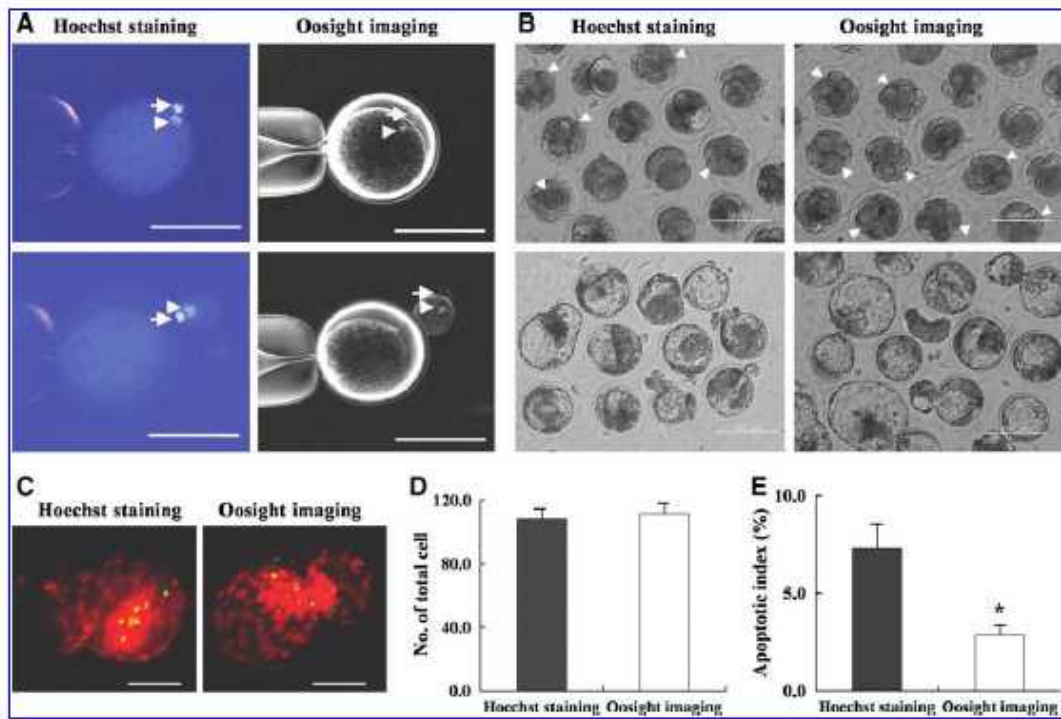


FIG. 1. JBC-SCNT embryos produced *in vitro* with different enucleation systems and their TUNEL-stained fluorescence microscopic images. (A) Hoechst staining and UV irradiation and Oosight imaging systems. The arrow and arrowhead in each photograph indicate the location of the first polar body and metaphase II plate, respectively. In both enucleation systems, the karyoplasts were removed by a squeezing method. Bar, 100 μ m. (B) Day-2 or day-7 JBC-SCNT embryos produced *in vitro* by the two enucleation systems. More good-quality four- to eight-cell embryos (arrowheads) and more rapidly developed blastocysts were produced in the Oosight group than in the irradiation group at day 2 and day 7 after SCNT. Bar, 200 μ m. (C) Representative fluorescence microscopic images of TUNEL-stained 8-day-old JBC-SCNT embryos produced with the two enucleation systems. Propidium iodide was used to stain chromatin. Yellow indicates fragmented DNA. Bar, 200 μ m. The TUNEL-staining results show that the total cell numbers (D) were not different between the Hoechst staining system and the Oosight imaging system, whereas their apoptotic indexes (E) were different ($p < 0.05$).

그림 81. Oosight Imaging system을 이용한 체세포핵이식 복제 수정란 생산방법

Hoechst 염색방법과 Oosight imaging system을 이용하여 탈핵 후 생산된 복제수정란의 발달형태를 조사하였던 바, spindle-view system을 이용한 처리군의 배반포기배 발달속도가 빠르고 건강하였으며 세포사멸율이 유의하게 감소하는 것으로 나타났음.

Table 83. In vitro development of JBC-SCNT embryos using two different enucleation systems (r=6)

Enucleation system	No. of enucleated oocytes	No.(%) of fused oocytes	No. (%) of embryos developed to				Total no. of cells (ICM)	Overall efficiency (%)
			Day 2		Day 8 blastocysts			
			Total	≥4-cell	Total	≥Hatching		
Hoechst staining	324	204 (62.9) ^a	130 (63.7) ^c	66 (50.8) ^a	38 (29.2) ^a	15 (39.5) ^c	111.2±7.6 ^a (27.4±3.4)	38/324 (11.7) ^c
Oosight imaging	320	242 (75.6) ^b	189 (78.0) ^d	135 (71.4) ^b	76 (40.2) ^b	37 (48.6) ^d	128.3±4.8 ^b (35.3±4.0)	76/320 (23.7) ^d

Means with different superscripts in the same column are significantly different (^{a-b}P<0.01; ^{c-d}P<0.05).

Hoechst 염색을 하고 UV 필터로 확인하여 탈핵을 실시한 처리군에 비해, Oosight imaging filter를 이용해 spindle 위치를 확인하여 탈핵을 실시한 처리군에서 체세포와의 융합율이 각각 62.9% 와 75.6%를 나타내어 유의하게 개선되었음.

또한 배양 2일 쯤 난할율에서도 63.7%와 78.0%를 나타내어 유의하게 Oosight imaging system 처리군이 좋았으며, 4-세포기 이상 발달 난자비율에서도 높게 나타나 탈핵시의 영향이 복제수정란 발달에 큰 영향을 미친다는 것을 확인하였음.

배양 8일 쯤 배반포기배 형성율에서 Hoechst 염색 군은 29.2%이며, Oosight imaging 처리군이 40.2%로 유의한 발달을 차이를 나타냈으며 부화 배반포기배 이상 발달배의 수율도 각각 39.5% 와 48.6%를 나타내어 탈핵시의 처리영향이 복제수정란 후기 발달에도 크게 미친다는 것을 확인하였음.

각 처리군에서 획득된 배반포기배의 세포수를 조사하였던 바, 총세포수는 Hoechst 염색처리군 111.2±7.6, Oosight imaging 처리군 128.3±4.8 였고, 내부세포피수는 각각 27.4±3.4, 35.3±4.0 나타내어 각 처리군 배반포기배의 건강도에도 차이가 있음을 확인하였음.

따라서, 공시된 난자로부터 복제수정란 생산효율을 조사했던 바, 두 처리군간에 두배 이상 수율 차이를 나타내어 Oosight imaging system 방법이 탈핵방법으로 유효하다는 것을 확인하였음.

Table 84. Oligonucleotide real-time RT-PCR sequences for variable genes

Genes	Primer sequence	Annealing temp.	Product size (bp)	GenBank accession no.
<i>bOct4</i>	5'-CTCTTTGGAAGGTGTTTCAG-3' 5'-GTCTCTGCCTTGCATATCTC-3'	53C	155	NM-174580
<i>bSox2</i>	5'-GCTGC'TCTGGACTGTGCTGA-3' 5'-ATCCAGT AATCTCCTCCAGC-3'	56C	247	NM-001105463
<i>bNanog</i>	5'-TGGAACAATCATTCAACAA-3' 5'-GCTGGGAATTGAAATACTTG-3'	54C	157	NM-001025344
<i>bInterferon-tau</i>	5'-ATGGCCGGCGTGCTCTCTCT-3' 5'-AGGTCCTCCAGCTGCTGTTG-3'	55C	356	NM-174106
<i>bCaspase-3</i>	5'-CGATCTGGTACAGACGTG-3' 5'-GCCATGTCATCCTCA-3'	50C	359	NM-001077840
<i>bDnmt3A</i>	5'-TGATCTCTCCATCGTCAACCC-3' 5'-GAAGAAGGGGCGGTCATCTC-3'	54C	221	XM-02691463
<i>bHsp70</i>	5'-GACAAGTGCCACGAGGTGATT-3' 5'-CAGTCTGCTGATGATGGGGTTA-3'	51C	117	NM-174550
<i>bβ-actin</i>	5'-GTCATCACCATCGGCAATGA-3' 5'-GGATGTCGACGTCACACTTC-3'	56C	111	NM-173979

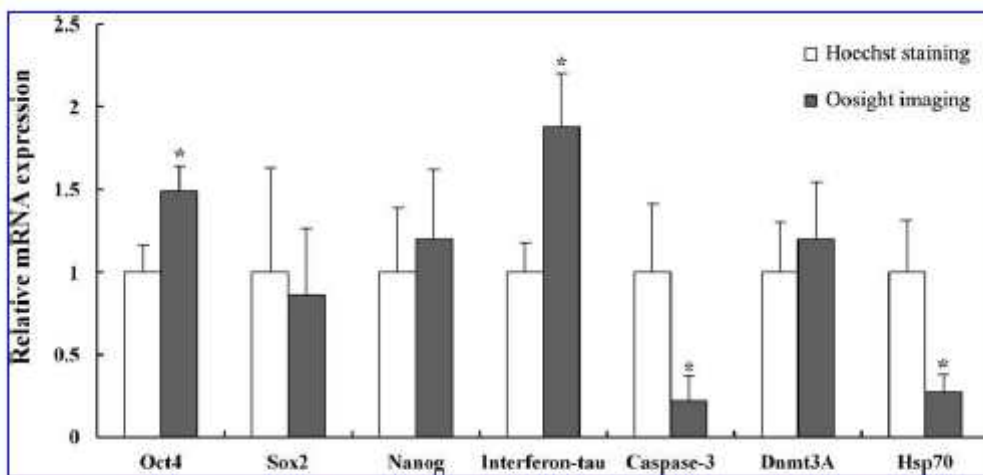


FIG. 2. Relative mRNA expression of candidate genes of 8-day-old JBC-SCNT embryos produced by different enucleation systems. Expression levels of genes related to pluripotency (*Oct4*, *Sox2*, and *Nanog*), implantation (*Interferon-tau*), proapoptotic activity (*Caspase-3*), demethylation (*Dnmt3A*), and stress (*Hsp70*) were examined. Bars with different superscripts within a panel differ significantly ($p^* < 0.05$). Error bars indicate standard deviation.

그림 82. 체세포핵이식 복제 수정란의 유전자 발현 조사

Oosight imaging system으로 획득된 복제수정란 유전자발현유무를 조사했던 바, 만능성 유전자 Oct4와 착상 관련유전자 interferon-tau 발현이 유의하게 높게 나타났고, 세포사멸 유전자 Caspase-3 와 스트레스 유전자 Hsp70 발현이 유의하게 낮게 나타나 체세포핵이식 복제수정란의 건강도를 확인할 수 있었음.

따라서, 체세포핵이식 복제수정란 생산 시 탈핵방법으로서 Oosight imaging system을 이용하면 건강한 복제수정란 획득이 가능하며, 이 방법에 의해 제주흑우 씨암소 흑우순이가 2010년 10월 31일 획득되었음.

*이상의 관련기술은 Cellular Reprogramming 저널 2012년 14권 305-311에 게재됨.

Improved Cloning Efficiency and Developmental Potential in Bovine Somatic Cell Nuclear Transfer with the Oosight Imaging System

Eun Young Kim,^{1,2,*} Min Jee Park,^{1,2,5,*} Hyo Young Park,^{1,2} Eun Ji Noh,^{1,2,5} Eun Hyung Noh,^{1,2,5} Kyoung Sik Park,³ Jun Beom Lee,⁴ Chang Jin Jeong,⁴ Key Zung Riu,⁵ and Se Pill Park^{1,2,5}

Abstract

In somatic cell nuclear transfer (SCNT) procedures, exquisite enucleation of the recipient oocyte is critical to cloning efficiency. The purpose of this study was to compare the effects of two enucleation systems, Hoechst staining and UV irradiation (hereafter, irradiation group) and Oosight imaging (hereafter, Oosight group), on the *in vitro* production of bovine SCNT embryos. In the Oosight group, the apoptotic index (2.8 ± 0.5 vs. 7.3 ± 1.2) was lower, and the fusion rate (75.6% vs. 62.9%), cleavage rate (78.0% vs. 63.7%), blastocyst rate (40.2% vs. 29.2%), and total cell number (128.3 ± 4.8 vs. 112.2 ± 7.6) were higher than those in the irradiation group (all $p < 0.05$). The overall efficiency after SCNT was twice as high in the Oosight group as that in the irradiation group ($p < 0.05$). The relative mRNA expression levels of Oct4, Nanog, Interferon-tau, and Dnmt3A were higher and those of Caspase-3 and Hsp70 were lower in the Oosight group compared with the irradiation group ($p < 0.05$). This is the first report to show the positive effect of the Oosight imaging system on molecular gene expression in the SCNT embryo. The Oosight imaging system may become the preferred choice for enucleation because it is less detrimental to the developmental potential of bovine SCNT embryos.

Introduction

SUCCESSFUL APPLICATION OF THE somatic cell nuclear transfer (SCNT) technique to developmental biology has resulted in the production of offspring from various species, including sheep, cattle, mice, and pigs (Campbell et al., 1996; Cibelli et al., 1998; Poljaeva et al., 2000; Wakayama et al., 1998). SCNT offers many opportunities in basic and medical research, as well as in endangered species conservation. However, the efficiency of SCNT is still very low. To date, numerous studies have been performed to optimize SCNT procedures, including enucleation, cell injection, and activation (Kawakami et al., 2003; Kurome et al., 2003; Miyoshi et al., 2006). Among these, enucleation is recognized as a critically important step. An ideal enucleation technique must completely avoid aneuploidy abnormalities that could lead to detrimental effects on later development. It must eliminate

any genetic contribution from the recipient cytoplasm and must exclude the possibility of parthenogenetic activation (Dominko et al., 2000).

To improve the enucleation procedure and cloning efficiency, several methods have been developed, including blind, Hoechst staining and ultraviolet (UV) irradiation, spindle imaging, and centrifugation (Liu et al., 2000; McGrath and Solter, 1983; Smith and Wilmut, 1990; Tatham et al., 1995). The Hoechst staining and UV irradiation approach is used routinely, particularly in domestic species, to ensure error-free enucleation by enabling clear visualization of the chromosomes before removal of the dense cytoplasm from the oocytes prior to nuclear transfer. This procedure involves the removal of a small amount of cytoplasm surrounding the spindle. However, even very brief UV exposure can have negative effects on the membrane integrity, mitochondrial DNA, and further embryo developmental potential (Smith, 1993).

¹Mirae Biotech, Seoul 143-854, Korea.

²Jeju National University Stem Cell Research Center, Seoul 143-854, Korea.

³Department of Surgery, Konkuk University School of Medicine, Seoul 143-729, Korea.

⁴Shin Woman's Hospital, Uijeongbu 480-848, Korea.

⁵Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea.

*These authors contributed equally to this work.

2. 제주흑우 복제소 생산

; 제주특별자치도에만 서식하는 400여마리에 불과한 멸종위기 제주흑우의 우수 유전을 보존하기 위해 체세포핵이식 기술을 도입하여 씨숫소 2마리 (BK01-10 복제, 흑영돌이; BK94-13복제, 흑올돌이) 와 씨암소 1마리 (BK94-14 복제, 흑우순이) 를 복제하였음.



그림 83. 체세포 핵이식 기술을 이용한 제주흑우 복제소 생산 모식도

소 난자는, 도축장에서 채취한 난소를 2~4 시간 이내에 32~37°C 생리 식염수에 유지하여 실험실로 운반한 뒤 직경이 2~6mm의 난포로부터 채취하여 사용하였음. 실제 현미경하에서 획득된 미성숙난자는 난구세포가 부착되어있고 세포질이 균일한 난자만을 선별하였고 TL-HEPES 로 세척하여 10% FBS (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) 가 첨가된 TCM-199 (Gibco-BRL) 배양액에 0.2 mM Na-pyruvate (Sigma, St. Louis, MO, USA), 1 mg/ml FSH (Sigma), 1 mg/ml estradiol-17b (Sigma) 와 50 mg/ml gentamycin (Sigma) 를 넣어 38.8°C, 5% 조건하에서 20 시간 동안 체외 배양하여 성숙을 유도하였음.

체외성숙된 소 수핵 난자는 0.1% hyaluronidase가 첨가된 TL-HEPES 배양액에서 난구세포를 제거한 뒤 제 1극체가 방출된 난자만을 선별하여 사용함. 탈핵할 난자는 0.5 ug/ml Hoechst 33258 과 7.5 mg/ml cytochalasin B (Sigma)가 첨가된 TCM-HEPES용액에서 10분간 염색한 뒤 형광현미경 하에서 Oosight imaging system을 이용하여 제 1극체와 핵을 제거함.

공여 체세포는 2008년 제주특별자치도 축산진흥원 소재 제주흑우 종모우 (BK01-10과 BK94-13, BK94-14)의 귀세포를 채취하여 체외에서 배양하여 동결 보관하였던 것으로 필요 시

용해하여 5~15 계대의 세포를 사용함. 핵이식 시 공여 체세포는 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 처리하여 단일세포로 분리한 후 10% FBS가 첨가된 체세포 배양액으로 한번 세척한 후 다시 PBS로 세척하여 준비하였고 10~15 mm 크기만을 골라 체세포 주입용 피펫으로 핵이 제거된 수핵난자의 투명대와 세포질 사이의 공간으로 주입함.

체세포가 주입된 난자는 0.3M mannitol (Sigma) 용액내에서 LF101 Electro Cell Fusion Generator (NEPA GENE, Shioyaki, Japan) 을 사용하여 직류 (DC) 로 20 volt에서 1pulse로 세포 융합을 실시하였으며 세포융합 여부는 30분 후에 관찰함. 융합이 확인된 핵이식란은 5 μ M Ca-ionophore에 5분 노출시키고 2.0 mM DMAP에서 3시간 동안 배양하여 난활성을 유도함.

핵이식 후 활성화 처리된 난자는 3 mg/ml FAF-BSA가 들어 있는 CR1aa 용액에 옮겨 배양하고 배양 24시간 쯤 분열된 분할구가 보이는 핵이식 배아는 10% FBS가 들어 있는 CR1aa 배양액으로 체세포와 공동 배양을 실시하였으며 배양 2일째부터 플라보노이드 처리군과 무처리군으로 나누어 배양함.

수란우는 CIDR-PLUS를 질내 7일간 삽입하고 제거하는 당일 PGF2 α 25mg을 투여하는 방법으로 발정동기화를 유도함. 플라보노이드 처리군 또는 무처리군으로 부터 발달된 체외 배양 8일 쯤 복제 배반포기 배아는 발정 동기화 처리된 수란 대상우중 정상적인 발정을 보이고 수정란 이식 당일 (발정 발현 7~8일째) 직장 검사를 통하여 황체 상태가 양호한 개체를 선발하여 황체가 존재하는 자궁각에 각각 1~2개 이식함.

수란우의 임신 진단은 수정란 이식 후 2개월에 직장 검사법에 의하여 임신 여부를 진단함. 분만시기가 가까이 올 10일~20일 전부터 수란우의 분만 징후를 관찰하고 적절한 시기에 정상적인 분만이 이루어지도록 유도함.

체세포 핵이식으로 복제되고 이식되어 태어난 소의 복제 유무를 검정하기 위해 핵이식에 이용된 체세포, 수란우의 근육세포와 복제송아지의 귀세포의 유전자 검정을 실시함. 각각의 검사 샘플에서 유전물질인 DNA를 추출하고, 특정 유전자를 동시에 증폭하여, 여러 유전자 좌위에서 체세포와 복제송아지가 일치하는지와 대리모소와 복제송아지가 일치하지 않은지의 여부를 조사함.

ISAG (International Society of Animal Genetics, 국제동물유전학회) 11개의 친자 감별 표지인자들을 사용하여 TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225, BM1824) 각 primer 의 forwad에 형광 dye를 labeling하고 pcr을 실시함. 검체의 PCR 산물은 형광을 분석하는 3100 genetic analyzer 기기를 이용하여 샘플별로 peak 크기를 계산하여 각각의 표지인자들의 반복성을 조사함. 검사 결과는 검사한 모든 유전자 좌위에서 일치 할 경우 친자라고 판명하고 3개이상의 유전자 좌위에서 불일치 할 경우 친자가 아니라고 판명함.

가. 복제씨수소 ‘흑영돌이’ 생산

Table 85. Jeju Black Cattle SCNT embryo transfer and their pregnancy

No. of transfer. surrogate mother	No. of Pregnancy	No. of Birth calf	No. of Living calf
59	6 (10.2%)	2	2 흑영돌이: BK01-10 흑울돌이: BK94-13



그림 84. 체세포 복제씨수소 흑영돌이 탄생 보도자료 (2009 조선닷컴)

2009년 3월 11일 국내 처음 제주흑우 씨수소 (BK01-10) 체세포 복제동물이 태어났고 생시 체중은 28kg임 (이름; 흑영돌이). BK01-10은 육량 증가에 효과적인 정자를 생산하는 흑우 수소임 (그림 85-86 참조).



그림 85. 체세포 복제 제주 흑우 씨수소 흑영돌이. 현존 400 여 마리 제주흑우 중 최고의 유전형질을 보유한 씨수소 “Ranking 1” (오른쪽) 의 귀세포로 복제된 체세포복제 숫송아지 “흑영돌이” (왼쪽 삽입된 그림; 2009년 3월 11일 탄생, 생시체중; 28kg) 와 제왕절개 직후 한우 대리모 (왼쪽)



그림 86. 2009년 8월 30일 현재 체세포 제공 제주흑우 씨수소 (왼쪽) 와 5개월령의 체세포복제 숫송아지 “흑영돌이” (오른쪽)

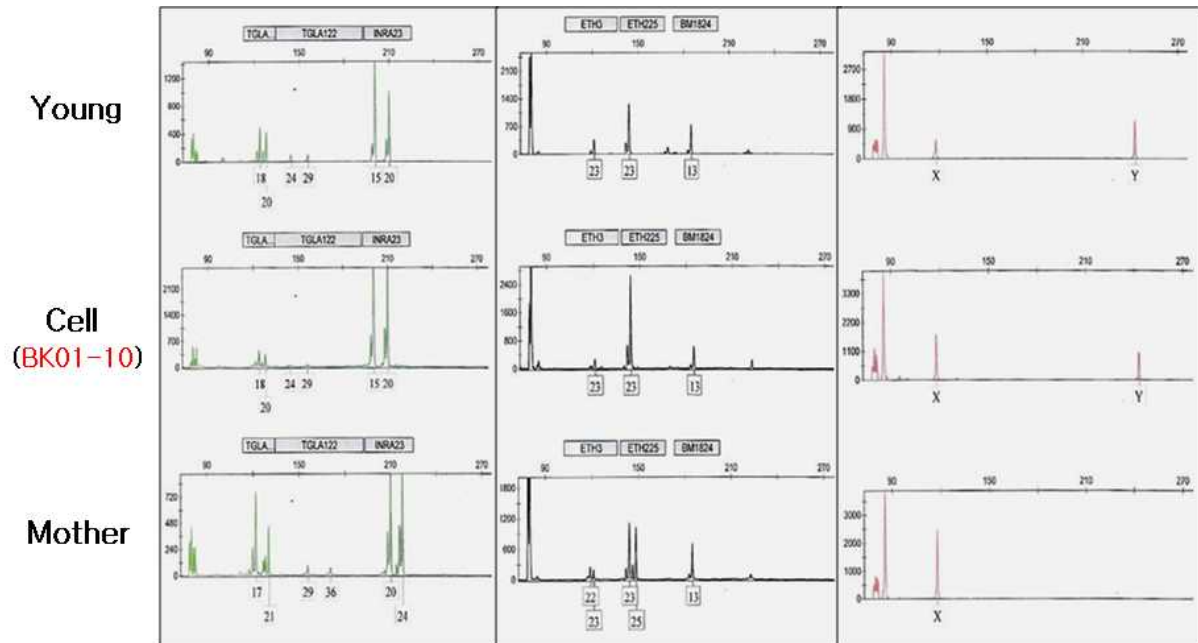


그림 87. 11 개 STR marker를 이용해 조사한 복제송아지 (young, 흑영돌이), 체세포(cell BK01-10) 그리고 대리모 (mother)의 full DNA fingerprint를 조사한 STR profile

STR marker를 이용해 복제송아지, 체세포 그리고 대리모의 full DNA fingerprint를 휴먼패스에 의뢰하여 분석한 결과임. 복제한 송아지와 체세포의 STR profile은 모든 부분에서 일치하였으나, 대리모와는 일치하는 부분을 거의 찾아 볼 수 없었음. 이 결과로 본 연구에서 태어난 송아지는 복제 송아지임을 확인함 (그림 87 참조).

나. 복제씨수소 ‘흑을돌이’ 생산

[체세포복제 제주흑우 씨수소 “흑을돌이 ‘ 생산]



[제왕절개 직후 한우 대리모, 삽입사진; 흑을돌이 (2009년 9월 9일 탄생, 생시체중; 27kg)]

[멸종위기 최우량 정자생산 제주흑우 노령 씨수소('08년 도축)]

그림 88. 체세포복제 제주흑우 씨수소 “흑을돌이 ‘ 생산

2009년 9월 9일에 태어난 두번째 복제 소 흑을돌이 (♂, 2010년 6월 16일 공개) 는 육질형질이 우수하여 근내 지방도가 높고 1등급 이상이 95% 이상 출현율을 보이는 종모우 (BK 94-13) 를 복제한 것임. 특히 두번째 소는 2008년 도축이 된 우량 소를 다시 복원한 것으로 복제 본래의 의미를 더해줌과 동시에 숫 적으로 열세인 제주흑우의 증식에 도움이 될 것으로 보여짐.

표 86. 복제송아지 (young, 흑을돌이), 체세포(cell, BK94-13) 와 대리모소 (mother) 의 full DNA fingerprint 분석한 STR typing

	Mother (대리모)		Young (복제소)		Cell (체세포)	
	I	II	I	II	I	II
TGLA227	15	20	14	15	14	15
BM2113	19	21	21	21	21	21
TGLA53	23	29	35	35	35	35
ETH10	16	19	18	19	18	19
SPS115	21	23	21	24	21	24
TGLA126	17	21	18	20	18	20
TGLA122	26	29	24	25	24	25
INRA23	18	20	15	20	15	20
ETH3	23	24	23	23	23	23
ETH225	23	26	23	25	23	25
BM1824	13	14	13	13	13	13



냉동보관된 체세포로 멸종위기 제주흑우

씨수소 '흑올돌이' 복제 성공

(2010년 6월 16일 보도)

- 노령으로 도축 (14세령, BK94-13, 2008년 도축) 된 멸종위기의 친우랑 정자 생산 제주흑우 씨수소 (육질 1등급이상 95% 생산 양질의 정자제공, 싹가: 2억 호기)의 냉동보관해 둔 체세포를 이용해 핵이식 방법으로 복원 (이름: 흑올돌이, 2009년 9월 9일 탄생, 2011년 6월 7일 현재 21개월령).
- 친자감별 유전자 분석 (DNA Finger printing)
11개의 STR 마커 이용: 씨수소 체세포와 유전자가 모두 일치함.
- 우수 동물자원이 사라진다 해도 체세포만 확보된다면 언제든지 완벽한 중 복원이 가능함을 실질적으로 입증함.
- 특허등록:
배양액 및 동물 복제를 위한
체외 배양 방법
(대한민국 제 10-1010156호)



방금 막 태어난 '흑올돌이' 에게 조유를 먹고 있는 박세필 교수

그림 89. 냉동보관된 체세포로 멸종위기 제주흑우 씨수소 흑올돌이 복제 성공
(2010년 6월 보도)

다. 복제씨암소 ‘흑우순이’ 생산

세계 최초 체세포핵이식난자 초급속 냉·해동 신기술개발로
씨암소 ‘흑우순이’ 복제 성공

-3년전 죽은 최우량 혈통 제주흑우 씨암소 복제 성공 -

초급속 냉·해동기술은 체세포 핵이식방법으로 생산된 복제수정란을 15분내에 초급속으로 냉동하고 현장에서 1분내 해동(생존율; 80~90%)하여 곧바로 대리모 자궁에 이식하는 초간편 방법



3년전 죽은 흑우 복제



연암뉴스
"인제트지 손위계 우수영량의 유전자 중을 보존, 개량 할 수 있는 실용의 기반기술을 구축한 데 의미 크다"



연암뉴스
"인제트 복제동물 만든다" 기술 첫 상용화
6월 13일 | 제주대학교



연암뉴스
최우량 혈통체세포 핵이식난자 "흑우순이" 복제 성공



연암뉴스
체세포핵이식난자 초급속 냉·해동 (스트로제라)
복제용 난자를 영하 196°C 급속 냉각 시켜, 원하는 시기 해동에 인제트지 복제동물 복제, 초급속 냉·해동 신기술



제주흑우 복제 성공
영하 196도 초급속 냉·해동 기술 개발
"인제트" 손위계 유전자 보존 "인제트" 복제 동물



자연분만으로 대리모 자궁 밖으로 나오고 있는 흑우순이



자연분만으로 갓 태어난 흑우순이



연암뉴스
최우량 혈통체세포복제
제주대 박세필 교수팀, 죽은 지 3년된 흑우 복제

(의의)

1. 초급속 냉동·초간편 해동 이식기술로 복제소를 용이하게 대량생산할 수 있는 진정한 의미의 실용화·산업화 기반 구축 확립
2. 초급속 냉동·초간편 해동 체세포복제 난자 이식기술 접목으로 현존하지 않는 최우량 혈통 제주흑우 씨암소 종 복원 (2010년 10월 31일 출생, 2011년 6월 현재 7개월령)
3. 최우량 혈통 제주흑우 씨암소; 94년 출생, 2008년 도축 1년 전인 2007년 체취해 냉동보관된 귀세포로 복제

(언론보도 총 81건)

1. 중앙방송 (2011.06.13); KBS뉴스, 연합뉴스, SBS뉴스, MBC뉴스
2. 제주방송 (2011.06.12~2011.06.14); 제주mbc뉴스 2회, KCTV뉴스, JIBS뉴스, 제주KBS뉴스
3. 신문기사 (2011.06.12~2011.06.16); 연합뉴스, 동아일보, 중앙일보, 경향신문, 국민일보, 서울신문, 세계일보, 헤럴드경제, 매일경제, 한국경제, 서울경제, 뉴시스, 아시아투데이경제, 전자신문, 머니투데이, 디지털타임즈, 아시아경제, FOCUS 등 52건
4. 제주기사 (2011.06.12~2011.06.16); 제주일보, 제민일보, 한라일보, 제주도민일보, 제주투데이, 제주포커스, 제주의소리, 제주매일, 미디어 제주, 시사 제주, 뉴스제주, 제주인터넷뉴스, 뉴스제주, 제주인뉴스, 헤드라인 제주 등 20건

그림 90. 복제씨암소 흑우순이 생산

- 체세포복제난자를 초급속냉동·초간편해동 후 곧바로 5마리의 대리모의 자궁에 이식된 결과 1마리의 제주흑우 복제씨암소가 자연분만으로 탄생함 (2010년 10월 31일, 생시체중 36 kg, 임신기간 299일).

Table 87. Jeju Black Cattle SCNT embryo transfer and their pregnancy using

No. of transfer. surrogate mother	No. of Pregnancy	No. of Birth calf	No. of Living calf
5	1 (20.0%)	1	1 흑우순이: BK94-14



그림 91. 세계최초로 개발된 초급속냉동·초간편해동 체세포복제난자 이식기술 접목으로 현존하지 않는 최우량 혈통 제주흑우 씨암소 BK94-14 중 복원 (2010년 10월 31일 출생, 2011년 6월 현재 7개월 령)

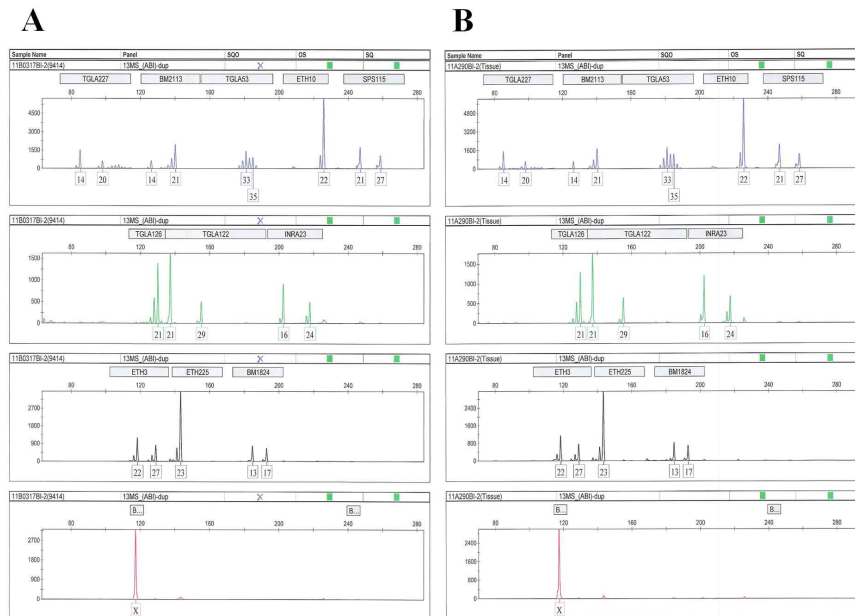


그림 92. 복제소 흑우순이 친자감별 결과

- 11개의 STR 마커로 친자 감별 유전자분석을 실시한 결과, 복제송아지와 공여된 제주흑우 씨암소 체세포간에 11개의 microsatellite loci에서 모두 완벽하게 유전자형이 일치하였으며 성별도 동일한 암컷으로 확인되었음.

3. 체세포복제소의 정액 분석 및 체외수정능 검정

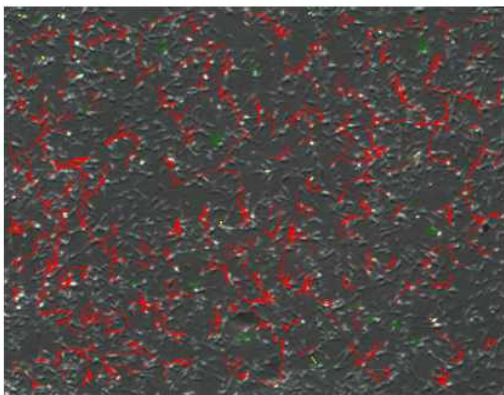
가. 복제소 흑영돌이 정액 분석 및 체외수정



그림 93 . 2011년 6월 현재 체세포핵이식기법으로 탄생한 체세포복제 제주흑우 씨수소 두마리의 장성한 모습. (우) 흑영돌이; 제주흑우 씨수소 중 몸집이 제일 큼. 2009년 3월 11일 출생, 2011년 6월 현재 26개월 령. 체세포제공 씨수소 현존 (좌) 흑울돌이; 제주흑우 씨수소 중 정액질이 제일 우수함. 2009년 9월 9일 출생. 011년 6월 현재 20개월 령. 체세포제공 씨수소 2008년 도축

(1) 컴퓨터 정액분석기 (CASA)를 이용한 정액 비교

> sperm 01-10



> sperm 흑영돌이

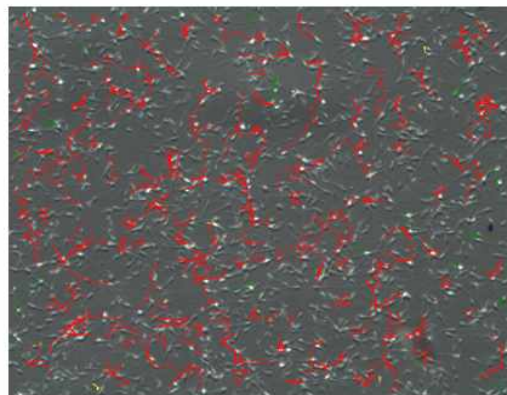


그림 94. 체세포 공여 소 (BK01-10, 왼쪽)와 복제소 흑영돌이 (오른쪽)의 정자 운동 상태 (붉은색의 선은 활발한 정자의 움직임을 나타냄)

➤ sperm 01-10

면적결과			
구분	결과	단위	참조사항
총 분석 횟수	5	Field(s)	
분석된 정자의 평균 수	378.8	Cell(s)	>> 100
총 정액의 농도	157.2	Million	
1ml당 정액의 농도	78.6	Million/ml	>> 20
운동성	88.2	(%)	>> 80
VCL (Curvilinear Velocity)	160.6	μ m/s	>> 46
VSL (Straight-line Velocity)	43.2	μ m/s	>> 26
VAP (Average-Path Velocity)	80.7	μ m/s	
LIN (Linearity)	29.6		>> 58
ALH (Amplitude of Lateral Head Displacement)	3.7	μ m	>> 2.4
HYP (Hyperactivated)	0.0	(%)	
STR (Straightness)	53.6		
BCF (Beat-Cross Frequency)	7.2	Hz	
MAD (Mean Angular Displacement)	41.1	Degree	
WOB (Wobble)	50.3		

속도에 따른 분류			
Category	Sperm	Percent(%)	Remark
빠른정자	353	87.6	>>35 μ m
보통정자	16	4.0	>>15 μ m
느린정자	34	8.4	<<15 μ m

➤ sperm 후영돌이

면적결과			
구분	결과	단위	참조사항
총 분석 횟수	4	Field(s)	
분석된 정자의 평균 수	93.2	Cell(s)	>> 100
총 정액의 농도	38.0	Million	
1ml당 정액의 농도	19.0	Million/ml	>> 20
운동성	84.8	(%)	>> 80
VCL (Curvilinear Velocity)	128.4	μ m/s	>> 46
VSL (Straight-line Velocity)	60.1	μ m/s	>> 26
VAP (Average-Path Velocity)	62.7	μ m/s	
LIN (Linearity)	48.7		>> 58
ALH (Amplitude of Lateral Head Displacement)	2.7	μ m	>> 2.4
HYP (Hyperactivated)	0.0	(%)	
STR (Straightness)	73.2		
BCF (Beat-Cross Frequency)	9.0	Hz	
MAD (Mean Angular Displacement)	44.0	Degree	
WOB (Wobble)	64.7		

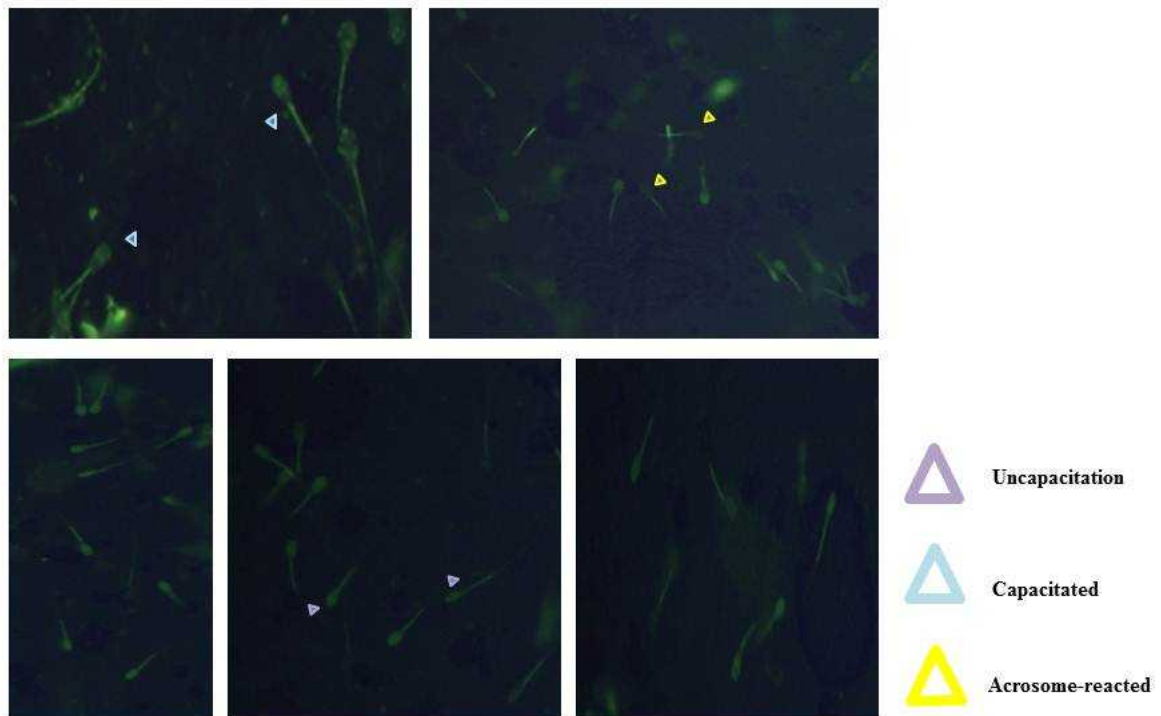
속도에 따른 분류			
Category	Sperm	Percent(%)	Remark
빠른정자	43	62.3	>>35 μ m
보통정자	6	8.7	>>15 μ m
느린정자	20	29.0	<<15 μ m

그림 95. 제주후우 01-10과 복제소 후영돌이 정액 분석 결과

체세포 공여 소(BK01-10)와 복제소 후영돌이의 정자를 컴퓨터 정액분석기 (CASA) 로 분석한 결과, 정자운동성이 각각 88.2%와 84.8%로 나타나 모두 활력이 좋은 것으로 확인됨.

(2) CTC 염색을 이용한 정자의 수정능 획득 비교

> sperm 01-10



> sperm 영돌이

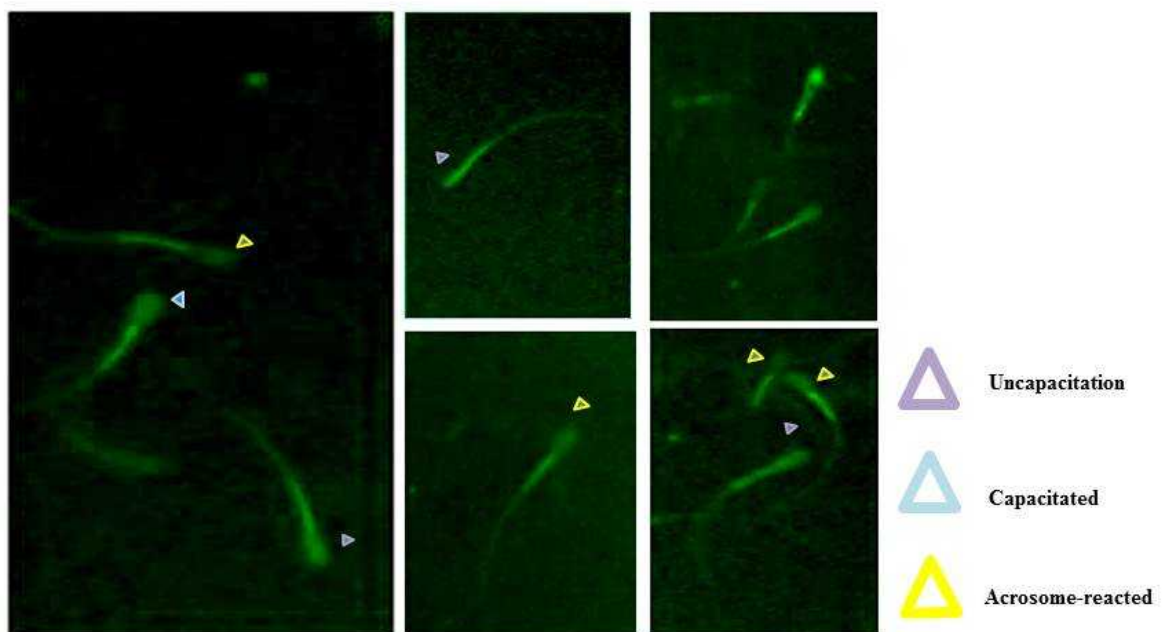


그림 96. CTC 염색에 의한 공여 소와 복제소 (영돌이) 정액의 수정능 획득 조사

정액 처리 후 CTC 염색을 통해 정자의 수정능 획득을 조사한 결과, 공여 소(BK01-10)와 복제소 흑영돌이 두 정액 모두 B pattern (capacitation)과 AR pattern (acrosome reaction)이 F pattern (uncapacitation) 보다 많은 것으로 확인됨.

(3) 복제소 흑영돌이의 체외수정 및 발달을 조사

표 88. 복제소 흑영돌이 정액을 이용한 체외수정 및 체외발달

정액	수정 공시난자	체외발달율 (%)			
		2일 ≥ 2-4세포기	4일 ≥ 8세포기	6일 ≥ 상실배	8일 ≥ 배반포기배
대조군 (BK01-10)	210	126 (60)	112 (88.8)	62 (49.2)	25 (20)
복제소 (흑영돌이)	267	178 (66.6)	173 (97)	106 (59.5)	56 (31.4)

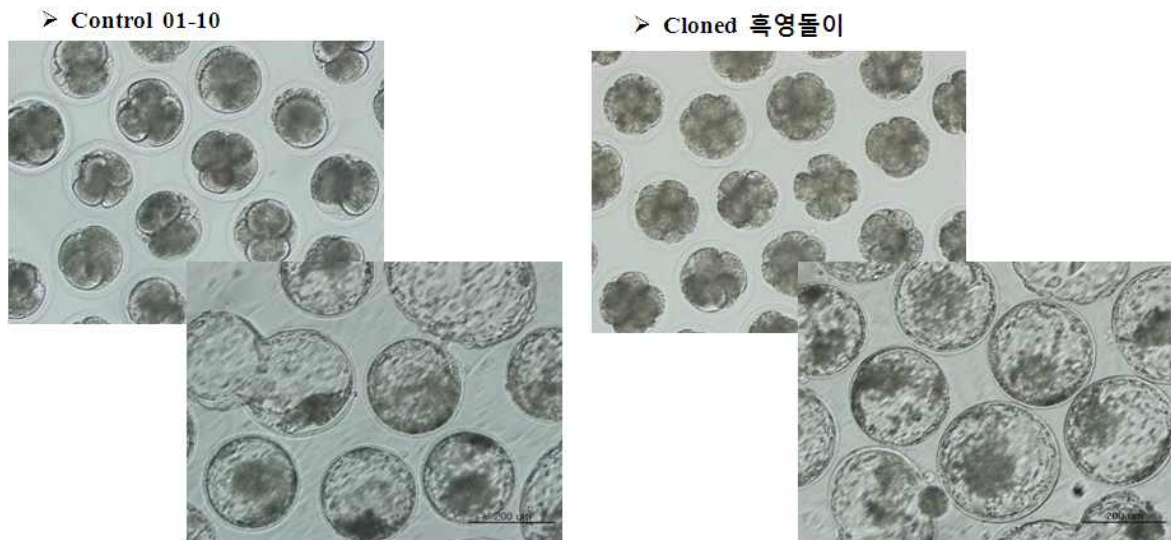


그림 97. 복제소 흑영돌이로부터 체외 생산된 배양 2일 체외수정란과 배양 8일 짜 배반포배

복제소 흑영돌이 정액의 특성을 분석하기 위하여

- i) 컴퓨터 정액분석기로 조사하였던 바, 공여 소 BK01-10과 유사하게 높은 정자 활력 및 운동성을 나타냈고,
- ii) 정액 처리 후 수정 전 상태에서 수정능 획득을 CTC염색법으로 조사하였던 바, 수정능 획득이 안 된 정자수보다 수정능 획득이나 침체반응이 일어난 정자수가 복제소와 공여 소 모두 유사하게 높은 것이 확인되었으며,
- iii) 체외수정을 실시하였던 바, 체외수정율과 배 발생율 모두 유사하거나 복제소 처리군에서 약간 높게 나타나 복제소 흑영돌이의 정액의 이용 가능성을 확인하였음.

나. 복제소 흑을돌이의 정액 분석 및 체외 수정

복제소 흑을돌이는 공여 소 (BK 94-13)가 2008년에 도축된 상태이므로 대조군 정액이 존재하지 않아 정액의 질적 상태를 비교하기 어려움. 정액분석기 최신 장비인 ISAS를 이용하여 흑을돌이 정액을 조사하였음.

(1) 컴퓨터 정액분석기 ISAS를 이용한 복제소 흑을돌이 정액 검사 비교

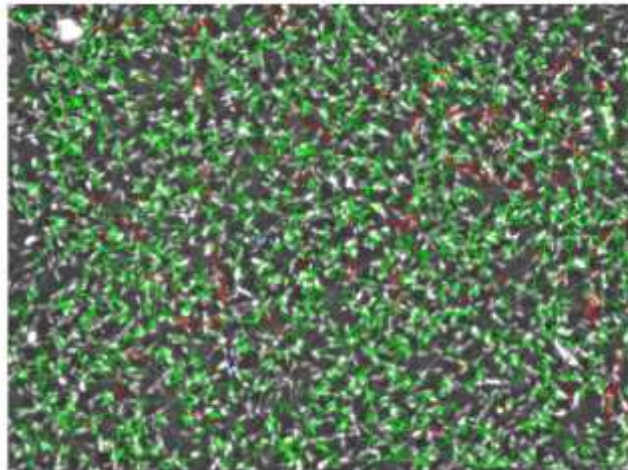


그림 98. ISAS 프로그램을 이용한 복제소 흑을돌이의 정자운동 상태

CONCENTRATION AND MOBILITY ANALYSIS						
SPERMS	Total	Percentage (%)	CONCENTRATION			
			millions per ml	in total ejaculated		
Static	185	2.8%	12.2	24.5		
No mobile progressive	5825	89.2%	385.6	771.2		
Mobile progressive	517	7.9%	34.2	68.4		
	6527	100.0%	432.0	864.1		
			(≥ 20 mill/ml)	(≥ 40 mill/total)		
BY SPEED	Total	Percentage (%)	CONCENTRATION			
			millions per ml	in total ejaculated		
Rapid	6270	96.1%	415.0	830.1		
Medium	72	1.1%	4.8	9.5		
Slow	0	0.0%	0.0	0.0		
Static	185	2.8%	12.2	24.5		
AVERAGE VALUES OF SPEED PARAMETERS						
		Total	Slow	Medium	Rapid	Units
Curvilinear Speed	VCL	83.0	0.0	31.1	83.6	µm/s
Rectilinear Speed	VSL	22.9	0.0	8.6	23.0	µm/s
Average Value	VAP	43.7	0.0	17.6	44.0	µm/s
Linearity Index	LIN	27.6	0.0	27.8	27.6	%
Straightness Index	STR	52.4	0.0	49.0	52.4	%
Oscillation Index	WOB	52.6	0.0	56.7	52.6	%

그림 99. 흑을돌이 정자의 ISAS 프로그램 분석 결과

(2) 복제소 흑을돌이 정액을 이용한 체외수정

표 89. 복제소 흑을돌이 정액을 이용한 체외수정란의 발달

수정 공시 난자	체외 발달율 (%)			
	2 일	4 일	6 일	8 일
	≥ 2-4 세포기	≥ 8 세포기	≥ 상실배	≥ 배반포기배
133	82 (61.6)	59 (71.9)	49 (59.8)	20 (24.4)

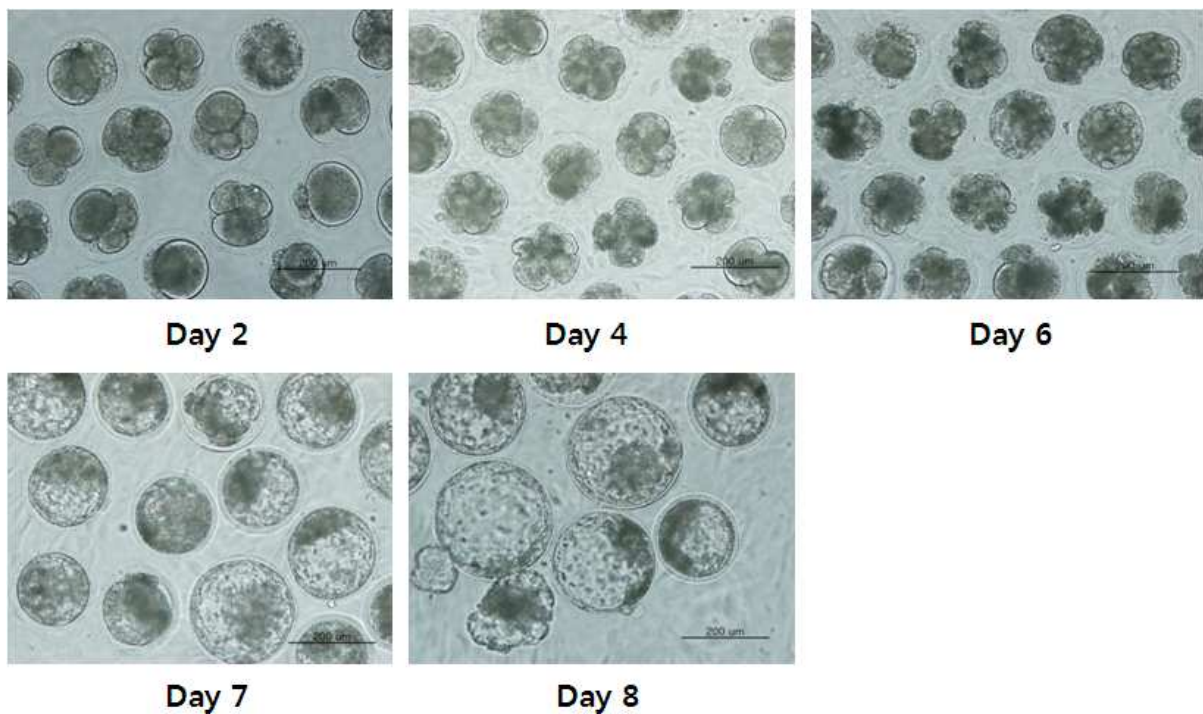


그림 100. 흑을돌이 정액을 이용한 체외수정으로 발달된 배아

흑을돌이는 육질 우수 (1등급이상 95%) 1등급 정액을 생산했던 94-13 제주흑우 씨수소의 보관된 체세포로부터 생산된 복제소임. 2008년에 도축이 되어 현존하지는 않지만 흑을돌이의 정액을 조사하였던 바, 활력, 운동성 모두 좋은 것으로 나타났고 또한 이러한 정액을 이용하여 체외수정을 실시하였던 바, 수정율과 배발생율 모두 좋은 것으로 확인되었음. 이 정액은 동결 정액을 이용하여 체외수정을 실시한 것임. 수작업으로 제작된 정액은 용해 후 상태가 좋은 것으로 나타나 인공수정에 사용할 계획임.

4. 소 배아줄기세포주 확립 기술 개발

소 체외수정란으로 부터 유사 배아줄기세포주 확립에 대한 기초 연구를 실시하였음. 본 연구팀은 우수 유전 형질 보존 및 활용을 위한 기초 연구로 지난 3차 년도에 이어 소 배아줄기세포주 확립 기술을 개발함으로써 내부 세포괴가 큰 부화기 배반포기배를 이용하였을 때 배아줄기세포주의 확립 가능성이 높다는 것을 확인함 (표 90 참조).

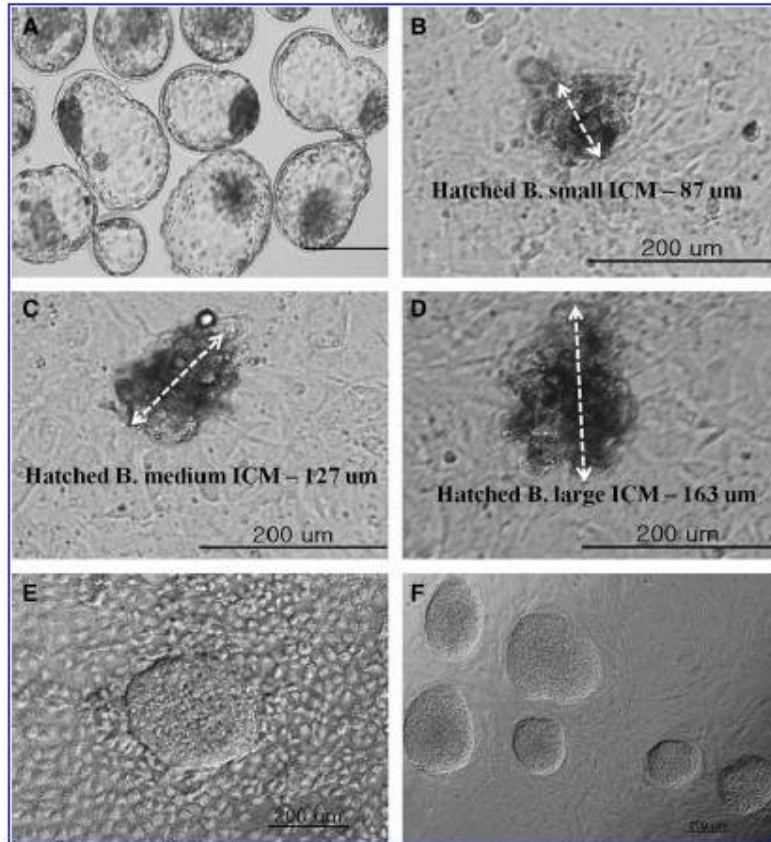


그림 101. 부화 배반포기배를 이용한 소 배아줄기세포 생산

Table 90. Establishment of bovine embryonic stem cell lines from in vitro-fertilized embryos

Developmental stage	No. (%) of bovine ESC-like colonies				No. (%) of established bovine ESC lines	Name
	ICM Size			SLIM		
	Small	Medium	Large			
Expanded blastocyst	1/7 (14.2)	2/18 (11.1)	2/17 (11.7)	5/42 (11.9)	1/5 (20.0)	JNU-ibES-01
Hatching blastocyst	1/6 (16.7)	2/14 (14.3)	3/21 (14.3)	6/41 (14.6)	1/6 (16.7)	JNU-ibES-02
Hatched blastocyst	0/2 (0.0)	7/24 (29.2)	3/17 (17.6)	10/43 (23.3)	4/10 (40.0)	JNU-ibES-03~06
	2/15 (13.3)	11/56 (19.6)	8/55 (14.5)	21/126 (16.7)	6/21 (28.6)	

ESC, embryonic stem cell; ICM, inner cell mass.

부화기 배반포기배로부터 잘라낸 내부세포괴를 마이크로드롭 지지세포위에 올려 배양하여 ES-like 콜로니를 21개 (16.7%) 획득할 수 있었으며, 그 중 6개 세포주는 3개월 이상 계대 배양이 가능하였으며 고유의 배아줄기세포특성이 확인되었음.

Establishment of Bovine Embryonic Stem Cell Lines Using a Minimized Feeder Cell Drop

Eun Young Kim,^{1,2,*} Eun Ji Noh,^{2,4,*} Hyo Young Park,^{1,2} Min Jee Park,^{2,4} Eun Hyung Noh,^{2,4} Jun Beom Lee,³ Chang Jin Jeong,³ Dong Sun Lee,⁴ Key Zung Riu,⁴ and Se Pill Park^{1,2,4}

Abstract

Bovine embryonic stem cells (ESCs) are a powerful tool for agricultural and biomedical applications. The purpose of this study was to introduce a new method for generating bovine ESCs. Mechanically isolated bovine inner cell masses (ICMs) from *in vitro*-produced blastocysts were cultured individually on a 10- μ L mouse embryonic fibroblast (MEF) feeder cell drop covered with oil. From 126 blastocysts classified by their developmental stage and ICM size, 21 primary bovine ESC-like colonies were formed (16.7%) and established six JNU (Jeju National University)-ibES cell lines (28.6%, 6/21; hatched blastocyst \times 4, hatching blastocyst \times 1, and expanded blastocyst \times 1). These cells exhibited typical ESC morphology, and pluripotency markers were detected through immunocytochemistry, RT-PCR, and real-time RT-PCR, including Oct4, stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA-1), Nanog, Tumor rejection antigen-1-81, Rex1, and alkaline phosphatase. Through RT-PCR analysis of spontaneous differentiation, gene expression of all three embryonic germ layers was detected: ectodermal (Pax6 and DBH), mesodermal (CMP and Enolase), and endodermal [alpha fetoprotein (α -FP) and albumin]. In addition, JNU-ibES cell lines were directed differentiated into neuronal (Map2 and Tuj1) and glial (GFAP) cells. Bovine ESC lines had a normal karyotype, with a chromosome count of 58+XY (JNU-ibES-05). This is the first trial investigating a minimized microdrop culture method for the generation of bovine ESCs. These results demonstrated that the minimized MEF feeder cell drop can support the establishment of bovine ESC lines.

Introduction

EMBRYONIC STEM CELLS (ESCs) ARE derived from inner cell mass (ICM) cells of preimplantation embryos (Saito et al., 1992). These cells are pluripotent and should retain their long-term proliferative potential in an undifferentiated state (Reubinoff et al., 2000). Also, ESCs can differentiate into derivatives of all three embryonic germ layers when they are transferred to *in vitro* differentiation culture conditions or into an *in vivo* environment (Heins et al., 2004; Kim et al., 2002; Lagasse et al., 2000). Since the first ESC line was isolated from mouse in 1981 (Evans and Kaufman, 1981), stable ESC lines have been established in many species, including hamster (Doetschman et al., 1988), rabbit (Graves and Moreadith, 1993), pig (Wheeler, 1994), monkey (Thomson et al., 1995),

cow (Stice et al., 1996), and humans (Thomson et al., 1998). ESCs derived from farm animals could provide a powerful tool for studies on early embryonic development (Robertson, 1991), gene targeting (Zheng et al., 1999), cloning (Stice and Keefer, 1993), and regenerative medicine (Dinsmore et al., 1996). Because of their potential use in targeted gene manipulation, the availability of ESCs in livestock species could have enormous agricultural, pharmaceutical, and biomedical applications.

However, ESC lines from domestic animals have been relatively less studied than those of murine ESC due to several challenges, such as longer generation time and sub-optimal culture condition (Mann and Stewart, 1991; Wilmut et al., 1991). The derivation and maintenance of ESC lines from bovine blastocysts is perhaps more difficult and

¹Mirae Biotech, Seoul 143-854, Korea.

²Jeju National University Stem Cell Research Center, Seoul 143-854, Korea.

³Shin Woman's Hospital, Uijongbu 480-848, Korea.

⁴Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea.

*These authors contributed equally to this work.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연구개발 목표의 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
1차 연도 (2008)	[제 1세부] 수정란이식 산자생산을 제고	체외수정란 배양환경 개선 을 위한 배양첨가제개발	-항산화제를 이용한 배양환경 개선 (국내특허출원) -줄기세포 생리활성물질을 이용한 배양 환경 개선 (국내특허출원)	100
		체외수정란 생산 및 이식	-제주한우 엘리트 체외수정란 생산 및 이식 (13두)	100
	[제 1협동] 수정란의 성감별	수정란 성감별 기술 도입	-수정란 성 감별용 프라이머 제작 -수정란 성 감별 적정화 -체외수정란 성감별 시도 (국내특허출원)	100
	[제 2협동] 대량증식 및 보급	체내수정란 생산 및 이식 조건 확립	-공란우 다배란 유기에 의한 수정란 생산 -수란우 발정동기화 처리 및 선발	100
		체내수정란 이식	-제주흑우 수정란 이식: 75두 완결 25두 임신(33.3%) 21두 분만 -체외수정란 이식: 4두 -제주흑우등록두수: 96두 ※ 신선란 및 동결란이식 수태성적비교 예비실험: 168두	100
	[제 3협동] 유전형질 검출, 분석	제주흑우 집단 개체별 기 초 조사 및 채혈	-외모 표현형 조사 및 유전자 분석용 혈액 시료 수집	100
		유전자형 분석을 위한 DNA 추출 및 MS 표지인 자 선정	-제주흑우 집단 분석용 MS marker 및 선정 (22개와 모색유전자 2개)	100
		제주흑우 집단 MS 유전자 형 분석	-제주흑우 집단 MS 유전자형 분포 및 빈도, 특성 분석 (제주흑우등록 22두, 기타정밀 재확인 요망 27두, 도태대상 171두 확인)	100
		친자감별 효율성 및 제주 흑우 가계도 작성	-선정 marker 조합별 친자감별 효율 검증	100
	[제 4협동] 생식세포 성감별 및 수정란동결기술 개발	생식세포 성감별 기술 도 입	-제주흑우 정액의 생존능 및 질적검사 -제주흑우 동결 정액의 성감별 -제주흑우 원정액 성감별 정자의 인공 수정 시도 (성감별 암·수정자로 각 1 두 씩 실시) -제주흑우 원정액 성감별 정자의 체외 수정능 조사	100
		도축 제주한우 및 제주흑 우 체외수정란의 동결 기 술 도입	-동결조건 적정화 (국내특허출원) -제주한우 엘리트 체외수정란의 초자 화동결 및 이식 (6두) -완만동결법을 이용한 제주흑우 체외수 정란 동결·융해 및 이식	100

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
2차 년도 (2009)	[제 1세부] 수정란이식 산자생산을 제고	산자생산 저해 요인 분석	-체내·외 수정란 이식축 수태율 조사 및 분석 -산자생산 저해요인 분석 및 해결책 제시	100
		우수수정란 배양 조건 확 립	-체외수정란 생산을 제고 -배양 첨가제 및 배양 방법개발 -배양첨가제 성분분석 실시 -체외수정란(복계소;신선란)이식 59두 중 분만 2두 (3.11 흑영돌이; 9.9 흑울돌이)	100
	[제 1협동] 수정란의 성감별	수정란 성감별 기술도입 및 개발	-성감별 방법 적정화; 프라이머, 방법등 -체외수정란 성감별 -염색체 검사를 통한 성감별을 재확인	100
	[제 2협동] 대량증식 및 보급	수정란 생산 공란우 선발 조건 확립	-공란우 호르몬 수준, 난소 상태, 영양균형 (BCS)등 조건이 수정란 생산수 및 수정란의 질에 미치는 영향 검토	100
		최적 수란우 선발 및 이 식기술 개발	-수란우 호르몬 수준 및 황체등급 향상 사양 기준 개선 -수란우 질병 검사 실시 -체내수정란 이식; 84두(목표량 75두) 38두 임신(45.2%) 30두 분만 -제주흑우등록; 217두	100
	[제 3협동] 유전형질 검출, 분석	제주흑우 특이 표현형 연 관 후보유전자 분석	-근친방지를 위한 제주흑우 종모우 추가 선정; 모색유전자, 혈통 고려 -오차를 최소화용 Indel마커 구축 -타품종과의 유전자 분석	100
		제주흑우 비육시험 및 생 검시료 채취; 제주흑우, 한우, 흑x한우	-비육단계별 성장, 초음파 육질 진단 및 생검	100
	[제 4협동] 생식세포 성감별 및 수정란 동결기술 개발	성감별 정자의 체외수정 란 생산을 제고	-성감별 조건 적정화 -성감별 정자의 활력유지 조건 적정화 -성감별 정자를 이용한 인공수정 및 성감별을 조사 -성감별된 정자를 이용한 체외수정란 생산 효율 제고	100
		수정란 동결 기술 개발	-완만동결 및 급속동결 기술 개발 및 생존율 제고 -직접이식용 동결 방법 적정화 -미수정란 동결 방법 적정화 -전년도에 이식된 동결란의 산자 생산을 조사	100

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
3차 년도 (2010)	[제 1세부] 수정란이식 산자생산을 제고	산자생산을 제고	-체내수정란 이식축 수태율 조사, 분석 및 개선 방안 도출	100
		증식 및 우수 유전자원 보존	-배양액 및 동물복제를 위한 체외배양방법 개 발 (특허등록) -체외수정란(복제소;동결란)이식 5두 중 분만 1두 (10.31 흑우순이) -소 배아줄기세포 확립기술 개발	100
		우수수정란 배양 환경 개발	-가축의 체외수정용 정자처리방법 개발 (특허출원) -줄기세포 생리활성물질을 이용한 배양환경 기술 개발 (특허등록)	100
	[제 1협동] 수정란의 성감별	수정란 성감별 기술도 입 및 개발	-성감별 방법 적정화; 프라이머, 방법등 -체외수정란 성감별 -염색체 검사를 통한 성감별을 재확인	100
	[제 2협동] 대량증식 및 보급	수정란 생산 공란우 선 발조건 확립	-공란우 호르몬 수준, 난소 상태 등 조건이 수정란 생산 수 및 수정란의 질에 미치는 영향 검토	100
		수정란 이식 및 수태율 조사	-체내수정란 이식; 이식 132두 완결 (목표량 125두) 59두 임신(44.7%) 51두 분만	100
		제주흑우 등록증 발급 및 씨수소 명호부여	-등록증 243두 발급(혈통등록 33두, 기초 등록 73두, 예비등록 137두) -씨수소 17두 명호부여	100
	[제 3협동] 유전형질 검출, 분석	제주흑우 집단 개체 및 친 자감별 시스템 구축 분석	-Indel 및 MS 유전자형 분석 -친자감별 최종 마커 시스템 구축	100
		제주흑우 SNP chip	-제주흑우 SNP 분석 -분석 자료의 DB 구축 및 비교	100
	[제 4협동] 생식세포 성감별 및 수정란 동결기술 개발	성감별 기술 적정화	-정자 성감별 적정화 및 성감별 정자확보 -성감별정자 체외수정란 생산 효율 조사	100
		수정란 동결 기술 적정 화	- 필드 적용 초급속동결/1-단계용해/직접이식 간편화 기술 개발 (제주흑우 암소 복제 1 두 생산 성공)	100

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
4차 년도 (2011)	[제 1세부] 수정란이식 산자생산을 제고	산자생산을 개선 및 체내·외 수정란 생산 체계 확립	- 체내·외 수정란 이식축 수태율 조사 및 분석 (3차년도 45% 분만율, 45 두 증식) - 산자생산 저해요인 분석 및 해결책 제시 - F1 900여두 포함 1300여두로 제주흑우 증식	100
		증식 및 우수 유전자원 보존	- 제주흑우 씨암소 복제 성공 보도 (흑우순이, 2011년 6월 12일) - 제주흑우 복제소 생식능 조사 - 복제효율 증진 기술 개발 - 줄기세포 확립기술 개발	100
		우수수정란 배양 환경 개발	- 가축의 체외수정용 정자처리방법 개발 (특허등록) - 체외수정란 생산을 제고	100
	[제 1협동] 수정란의 성감별	수정란 성감별 기술도입 및 개발	- 성감별 방법 적정화: 프라이머, 방법등 - 체외수정란 성감별 - 염색체 검사를 통한 성감별 재확인	100
	[제 2협동] 대량증식 및 보급	제주흑우 체내수정란 생산 이 식 및 수태율조사	- 체내수정란 이식; 이식 183두 완결 (목표량 175두) 63두 임신(34.4%) 61두 분만	100
		제주흑우 등록	- 제주흑우 후보 씨수소 추가 등록 5두 - 제주흑우 등록증 발급 (총 335 두) ;혈통등록 118두, 기초등록 74두, 예비등록 143두	100
	[제 3협동] 유전형질 검출 및 분석	제주흑우 집단 및 개체 친자감 별 system 개발 연구	- 최종선발된 MS, Indel 및 SNP 마커들을 이용한 효율적 분석법 개발	100
		Bovine 50K chip 분석 및 제주 흑우 특이 표지인자 개발	- 제주흑우 Bovine 50K chip 분석 결과를 이용한 대량 SNP 탐색 및 data화	100
	[제 4협동] 생식세포 성감별 및 수정란 동결기술 개발	성감별 기술 적정화	- 제주흑우 복제 씨숫소 (흑영돌이, 흑울돌이) 정액 생산 및 특성 검토 - 정자 성감별 실시 - 성감별 정자를 이용한 체외수정	100
		수정란 동결 기술 적정화	- 흑우 도태축 활용 방안 마련 - 이식 간편화 및 최적 동결 방법 적정화 - 동결란 이식에 따른 임신율 제고 - 미수정란 동결 및 활용 방법 개발	100

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
5차 년도 (2012)	[제 1세부] 수정란이식 산자생산을 제고	산자생산을 개선 및 체내·외 수정란 생산 체계 확립	- 체내·외 수정란 이식축 수태율 조사 및 분석 - 산자생산 저해요인 분석 및 해결책 제시	100
		증식 및 우수 유전자원 보존	- 복제소 생식능력 검정 - 소 배아 줄기세포 확립기술 개발	100
	[제 1협동] 수정란의 성감별	수정란 성감별 기술도입 및 개발	- 성감별 방법 적정화 - 체외수정란 성감별 - 염색체 검사를 통한 성감별 재확인	100
	[제 2협동] 대량증식 및 보급	제주흑우 체내수정란 생산 이 식 및 수태율조사	- 체내수정란 이식; 이식 204두 완결 (목표량 200두), 임신 결과 추후 보고	100
		제주흑우 등록	- 제주흑우 후보 씨수소 추가 등록 5두 - 제주흑우 등록증 발급 (총 460 두) 등록대기 150두 - 제주흑우천연기념물 지정	100
	[제 3협동] 유전형질 검출 및 분석	제주흑우에 적합한 유전자 친 자확인 system 개발 연구	- 최종선발된 MS, Indel 및 SNP 마커들을 이용한 효율적 분석법 개발	100
		Bovine 50K chip 분석 및 제주 흑우 특이 표지인자 개발	- 제주흑우 Bovine 50K chip 분석 결과를 이용한 대량 SNP 탐색 및 data화 진행 중	100
	[제 4협동] 생식세포 성감별 및 수정란 동결기술 개발	성감별 기술 적정화	- 제주흑우 복제소 생식능력 검정 - 흑우정액 분석 및 응용 - 성감별 정자를 이용한 체외수정	100
		수정란 동결 기술 적정화	- 동결 방법 적정화 - 산업화 가능한 동결 기술개발 - 미수정란 동결 및 활용 방법 개발	100

제2절 관련분야의 기술발전의 기여도

제주특별자치도에서는 전 세계 유일의 제주흑우를 FTA에 대응한 축산물로 육성키 위해 2017년까지 3만 마리로 전 두수 도 전역 흑우로 전환하며 이를 위해 기존 송아지 생산 기지 등 기반시설 및 마을공동목장 및 전업목장, 한우단지는 흑우 생산기반으로 대체하며, 축협 등 생산자 단체, 전 기업 목장을 흑우 브랜드 추진 주체로 육성할 계획이라고 발표하였음 (2008년 3월).

과제 도출 당시 정책적으로 제주흑우의 육성과 필요성이 맞물려 의욕적으로 출발하였으나, 본 연구에서 추진하기 위한 연구 아이템들을 수용하기에는 제주흑우의 가용 수가 턱없이 부족했음. 우수 체내수정란 생산을 위해 우량 씨암소와 씨수소가 요구되었으나 그 수가 적어 근친 번식을 막기 위한 노력이 필요했으며, 체외수정란을 생산하기 위한 도태시키는 암소를 구하기가 쉽지 않았음. 또한 체내·외 수정란의 질에는 절대적으로 흑우정액의 quality가 중요한 요소인데 반해, 흑우 정액 데이터베이스가 제대로 구축되지 않아 기존 씨수소의 관리 및 후보 종모우에 대한 선발이 시급했음.

제주흑우 개량을 위해 본 연구에서는 흑우정액의 관리 및 개선을 위해 정액분석기와 정액 자동화제조기의 필요성을 계속적으로 피력하였고, 제주특별자치도 축산진흥원 및 국립축산과학원 난지축산시험장에서는 최근 전 장비시스템을 구축하여 현재 제주도내 씨수소 및 후보 씨수소 총 36두를 조사 중에 있음. 이러한 변화는 앞으로 제주흑우의 증식 및 개량에 절대적으로 긍정적인 영향을 끼칠 것으로 사료됨. 인공수정 성공률에 긍정적인 영향을 미칠 뿐만 아니라 현대화된 자동설비 데이터에 기초하여 비교 조사 선발하므로 계획적인 생산 예측이 가능해질 것으로 기대됨.

이러한 변화는 본 과제의 반기별 협의회를 통해서 흑우정액 분석, 흑우동결정액스트로를 이용한 체외수정란 생산과 성감별을 통해 현대화된 흑우 정액활용의 필요성을 피력하여 제주특별자치도 축산진흥원과 국립축산과학원 난지축산시험장내에 자동화된 장비를 구입하고 이용하도록 유도한 계기가 됨. 현재 이 장비는 도내 흑우정액 생산의 재정비를 위한 새로운 개념과 취지로 활발히 활용되고 있음. 제주흑우 원정액 상태가 나쁘지 않으므로 제주흑우 정자의 생존능과 운동성이 잘 유지되도록 동결스트로가 제조되어 임신율 뿐 만아니라 건강한 제주흑우 송아지 생산이 가능하여 제주흑우 개량에 도움이 될 것으로 보임.

본 연구에서는 제주흑우를 한우 및 타 품종과 구별할 수 있는 표지인자를 3년여 간의 연구 결과로 14개의 마커 (MS 8종, Indel 마커 5종, MCIR 1종) 및 15좌위로 선정하여 제주흑우 친자감별 및 등록에 기여하였고, SNP chip 연구를 통해 타 품종과의 차별성을 확인하였으며, 육질관련 및 차후 개량에 필요한 유전 특성도 발굴해 낼 수 있는 기반을 마련하였음.

수정란 생산 및 배양을 위한 새로운 기술이 개발되어 특허 3건을 등록 [i) 배양액 및 동물복제를 위한 체외 배양 방법; ii) 가축의 체외 수정용 정자 처리방법; iii)미분화 인간배아줄기세

포 유래 배양 조성물을 이용한 소 난자의 체외배양 방법] 하였고 관련 기술은 논문에 게재했으며, 일부 기술은 (Oosight imaging system 이용한 복제 효율 증진 기술) 언론 및 매체에 보도되어 관련 연구자에게 알리는 계기를 제공하였으며 (15건 홍보), “배아줄기세포생리활성물질을 이용한 수정란 배양 기술” 국제연구논문게재로 우수성을 인정받아 ‘일본 동물생식학회로부터 우수논문으로 선정’ 되었음 (10건 홍보). 이러한 배양 기술은 체외수정란 생산에 핵심 기술로 이용될 수 있는 것으로 특허를 획득한 신기술이며, 실제로 체세포핵이식유래 복제 수정란 배양에 이용되어 제주흑우 복제소를 생산하는 데에 유효하게 활용되었음.

제주흑우가 재래한우 중에는 처음으로 별도의 등록규정을 제정하여, 본 연구과제를 추진할 당시 2008년 등록우 96두 였으나 2008년 등록규정이 개정되고 2009년까지 증식된 개체에 대해 등록을 실시하여 2009년 12월 기준 등록우가 217마리로 증가되었고, 2011년 기준으로 335마리까지 증가되었으며, 2012년부터 2013년 6월까지 총 125마리가 등록 관리되고 있음. 또한, 등록우에서 생산된 등록심사 대상축 150마리를 포함하면 총 610여 마리로 5년간 제주흑우 수가 6.4배 증식 효과가 있었음. 다만 사육관리 과정에서 비육출하거나 도태로 자연 감소된 개체도 상당수 존재하지만 본 연구과제 사업을 통해 순수 제주흑우 두수 증식에 기여한 바가 매우 크다고 사료됨.

제주흑우의 연구 필요성은 연구가 진행된 5년간 지속적인 연구 성과 홍보로 이어져 대내·외적으로 알리는 계기가 되었으며, 제주흑우등록 사업이 계속적으로 진행되어 원원종 보존이 체계적으로 잘 이루어진 것이 파악되어 최근에 (2013년 6월 27일) 문화재청으로부터 “제주흑우를 천연기념물로 지정 확정 한다” 는 내용이 발표되었고 2013년 7월 22일 천연기념물 제546호로 지정됐다는 내용을 안전행정부 관보에 공고됨.

또한 본 연구진은 최첨단 생명공학 기술을 이용하여 제주흑우 씨수소 2두와 씨암소 1두를 복제하였고 총 160건의 제주흑우와 복제소 관련 홍보를 하여 멸종위기 제주흑우의 보존의 필요성과 고려시대부터 임금님 진상품으로 제공되었다는 웰빙 식품으로서 제주흑우를 전국에 알리고 본 연구의 중요성을 언론매체를 통해 보도하였음. 현재 제주특별자치도내에는 ‘제주흑우 명품관’ 이라는 전용식당이 있어 제주를 방문하는 관광객들과 일부 제주흑우 고기 맛을 아는 고객들의 입을 통해 홍보가 되고 있음. 이러한 노력으로 2010년 농림축산식품부 기술기획평가원 (IPET) 으로부터 우수과제로 선정된바 있음.

본 연구과제를 통해 획득된 제주흑우 대량증식 기반기술은 앞으로 청정지역 제주특별자치도가 내세운 대표상품으로 ‘제주흑우’ 를 일본의 화우브랜드처럼 세계적인 브랜드로 성장 시켜 나가는 데에 밑거름이 될 것으로 사료되며, 세계 7대 자연경관 제주에만 서식하는 천연기념물 제주흑우는 개량과 증식을 통해 축산농가소득에도 기여할 수 있는 효자상품이 될 수 있을 것으로 기대해 봄.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제1절 연구성과 목표 및 달성

구분	특허출원	특허등록	신품종등록 (유전자원 등 포함)	논문		기타	
				국외(SCI)	국내		
1차년도	목표	1			2	1	3
	달성	4			1	2	38 (전시회1건, 수상 1건, 교육지도 6건, 언론홍보 13건, 학회 16건, 인력양성 1건)
2차년도	목표	1	1		2	2	3
	달성	3	0	1	1	2	87 (수상 2건, 교육지도 3건, 언론홍보 76건, 학회 6건)
3차년도	목표	1	1		2	2	3
	달성	1	2		5	3	164 (교육지도 3건, 언론홍보 139건, 학회 21건, 인력양성 1건)
4차년도	목표	2	1	1	2	2	3
	달성	0	1		2	0	19 (수상 1건, 교육지도 5건, 언론홍보 4건, 학회 6건, 인력양성 3건)
5차년도	목표	2	2		2	2	3
	달성	0	0	1	2	1	30 (교육지도 3건, 언론홍보 25건, 학회 2건)
계	목표	7	5	1	10	9	15
	달성	8	3	2	11	8	338 (전시회1건, 수상 4건, 인력양성 5건, 교육지도 20건, 언론홍보 257건, 학회 51건)

1. 특허 성과

no.	출원등록명	출원등록자명	출원등록번호	산업재산종류	출원등록일
1	미분화 인간배아줄기세포유래 배양 조성물을 이용한 소 난자의 체외배양 방법	제주대학교 산학협력단; 제주특별자치도.(주)미래생명공학연구소	10-2008-0138099	특허 (출원)	2008-12-31
2	배양액 및 동물 복제를 위한 체외 배양 방법	(주)미래생명공학연구소; 제주대학교 산학협력단; 제주특별자치도	10-2009-0035112	특허 (출원)	2009-04-22
3	소 수정란의 성 감별 방법	제주대학교 산학협력단; 충북대학교 산학협력단; 제주특별자치도.(주)미래생명공학연구소	10-2009-0035113	특허 (출원)	2009-04-22
4	동물 배아의 보존 방법	(주)미래생명공학연구소; 제주대학교 산학협력단	10-2009-0035114	특허 (출원)	2009-04-22
5	소 복제 수정란의 체외배양 방법	충북대학교 산학협력단	10-2009-0106944	특허 (출원)	2009-11-06
6	돼지 수정란 또는 복제 수정란의 체외 배양 방법	충북대학교 산학협력단	10-2009-0106946	특허 (출원)	2009-11-06
7	가축의 체외 수정용 정자 처리방법	(주)미래생명공학연구소; 제주대학교 산학협력단; 제주특별자치도	10-2010-0040969	특허 (출원)	2010-04-30

8	가축의 체외 수정용 정자 처리방법	(주)미래생명공학연구소; 제주대학교 산학협력단; 제주특별자치도	10-2011-0018668	특허 (출원)	2011-03-02
9	미분화 인간배아줄기세포 유래 배양 조성물을 이용한 소 난자의 체외 배양 방법	제주대학교 산학협력단 제주특별자치도; (주)미래생명공학연구소	10-1010077	특허 (등록)	2011-01-14
10	배양액 및 동물 복제를 위한 체외 배양 방법	(주)미래생명공학연구소; 제주대학교 산학협력단; 제주특별자치도	10-1010156	특허 (등록)	2011-01-14
11	가축의 체외 수정용 정자 처리방법	(주)미래생명공학연구소; 제주대학교 산학협력단; 제주특별자치도	10-1064415	특허 (등록)	2011-09-05



2. 논문발표 성과

no.	논문명	주저자명	학술지 게재일	SCI구분
1	A MAPK pathway is involved in the control of cortical granule reaction and mitosis during bovine fertilization.	태진철; 김은영	2008-08-01	SCI
2	한우와 제주흑우, 홀스타인에서 MC1R 유전자형에 따른 melanin 생합성 유전자들의 발현수준과 모색 출현양상의 관계	이성수	2009-03-01	비SCI
3	A GHR Polymorphism and Its Associations with Carcass Traits in Hanwoo Cattle	한상현	2009-02-01	SCI
4	Pregnancy Rate of in Vitro Produced Korean Cattle Embryos according to Transport Time Course	박효영; 김은영	2009-12-31	비SCI
5	Verification of ET and AI Derived Offspring Using on the Genetic Polymorphisms of Microsatellite and Coat Color Related Genes in Jeju Black Cattle	한상현	2010-01-14	비SCI
6	Effects of POU1F1 and GH1 genotypes on carcass traits in Hanwoo cattle	한상현	2010-04-30	SCI
7	플라보노이드 처리된 체세포 핵이식 배아의 체외 발달 및 제주흑우 복제 소 생산	김은영	2010-09-01	비SCI
8	Differentiated human embryonic stem cells enhance the in vitro and in vivo developmental potential of mouse preimplantation embryos	김은영	2010-09-12	SCI
9	Generation of functional cardiomyocytes from mouse induced pluripotent stem cells	소경하; 한영준	2010-09-24	SCI
10	3,4-Dihydroxyflavone Acts as an Antioxidant and Antiapoptotic Agent to Support Bovine Embryo Development In Vitro	이금실; 김은영	2010-11-06	SCI
11	Differences between cellular and molecular profiles of induced pluripotent stem cells generated from mouse embryonic fibroblasts	김은영	2010-12-12	SCI
12	다산차 젖소에 있어서 인공수정 관련요인에 관한 연구	정경용	2010-	비SCI
13	초자화 동결과 1-단계 용해된 체세포 핵이식란의 직접 이식 기술로 제주흑우 복제소 생산	김은영	2011-03-03	비SCI
14	Coat Color Patterns and Genotypes of Extension and Agouti in Hanwoo and Jeju Black Cattle	한상현	2011-04-26	비SCI
15	The Use of embryonic stem cell derived bioactive material as a new protein supplement for the in vitro culture of bovine embryos	김은영	2011-07-07	SCI
16	A promoter polymorphism of MSTN g.2371T>A and its associations with carcass traits in Korean cattle	한상현	2012-04-05	SCI
17	Improved Cloning Efficiency and Developmental Potential in Bovine Somatic Cell Nuclear Transfer with the Oosight Imaging System	김은영; 박민지	2012-07-20	SCI
18	Efficient Generation of Virus-Free iPS Cells Using Liposomal Magnetofection	박효영	2012-09-25	SCI
19	Polymorphisms and allele distribution of novel indel markers in Jeju Black Cattle, Hanwoo and imported cattle breeds	한상현	2012-12-20	비SCI
20	Insertion/deletion Polymorphism of <i>GALM</i> gene and its associations with carcass traits in Hanwoo and Jeju Black cattle (Molecular Biology Reports)	한상현	투고예정	
21	제주흑우 집단에서 친자확인을 위한 indel과 microsatellite를 포함하는 새로운 분자 마커 체계	한상현	한국수정란이식학회지, 투고중	

A MAPK Pathway is Involved in the Control of Cortical Granule Reaction and Mitosis During Bovine Fertilization

JEN CHEOL YAE,*** EUN YOUNG KIM,** KILSOO JEON,** KEEM SILL LEE,** CHANG HYUN LEE,** YKON OK KIM,** SE PILL PARK,** and NAM-HYUNG KIM***

*Maeil Research Co., Seoul, Korea; **Faculty of Biotechnology, Seoul City Research Center, College of Applied Life Sciences, Chon National University, Chonju, South Korea; ***Department of Animal Biotechnology, National Research Laboratory of Molecular Biotechnology, Chungbuk National University, Cheongju, Korea

ABSTRACT In order to understand the mechanism by which mitogen-activated protein kinase (MAPK) regulates fertilization, we examined the effect of the MAPK pathway inhibitor U0126 on phosphorylation of cortical granule reaction and mitosis in bovine oocytes during and after fertilization. Oocytes were treated with 30 μM U0126 for 30 min prior to insemination, or from 1 h to 27 h following insemination. Western blotting with antibodies that detect active, phosphorylated MAPK revealed that MAPK activity was decreased in U0126-treated oocytes. Oocytes that were treated with U0126 before insemination displayed a significantly higher incidence of polyspermy penetration and incomplete cortical granule reaction than that observed in untreated oocytes (P < 0.05). Exposure of oocytes to U0126 15–27 h after insemination induced aberrant microtubule assembly and cell division, often resulting in the formation of two or three daughter cells with altered shapes and sizes. These results suggest that an ERK cascade is part of a mechanism that controls cortical granule reaction and the formation of the oocyte nuclei following sperm penetration in the bovine. Mol Reprod 2006. 17: 1009–1016. © 2006 Wiley-Liss, Inc.

Key Words: MAPK, fertilization, cortical granule, pronuclear formation, mitosis

INTRODUCTION

During mammalian fertilization, many dynamic events occur to ensure successful meiotic division and the accurate union of maternal and paternal genomes (Shen et al., 2001). This cascade of events includes the reorganization of nucleoli, chromosome condensation, spindle formation and migration, polar body (PB) emission, cortical granule excystolysis, sperm insemination, pronuclear (PN) formation, and reorganization (Shen et al., 2001). Mitogen-activated protein kinase (MAPK) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade mediate phosphorylation and dephosphorylation events that are essential for cell cycle regulation throughout meiosis and metaphase during the first cleavage.

MAPK is a group of serine/threonine protein kinases that are activated by phosphorylation (Ueda and Goldsmith, 2003). Two isoforms of MAPK are expressed in mammalian oocytes: ERK1 (p44) and ERK2 (p42) (Shagavan et al., 1991; Yoshida et al., 1993; Goto et al., 1994). Several reports have shown the activation of ERK 1/2, or its upstream partners MEK and RSK, with the mitotic spindle (Wang et al., 1997; Shapiro et al., 1999; Cha and Shapiro, 2001; Willard and French, 2001).

U0126 is a potent and specific inhibitor of MEK1 and MEK2, and has little effect on other kinases such as CaMK, ERK, JNK, MEK3, and Raf (Favata et al., 1998). A number of studies have investigated the effect of treating oocytes with U0126. For example, inhibition of ERK activity with U0126 during the meiosis II transition has been shown to suppress chromosome separation, first polar body emission, and formation of the metaphase II spindle (Lee et al., 2000). A different study showed that PD2 emission was also markedly inhibited in oocytes treated with U0126, however, little difference was observed in the time course of PN formation in U0126-treated oocytes compared to untreated oocytes.

Jen Cheol Yae and Eun Young Kim contributed equally to this work. Grant sponsor: The Korean Ministry of Science and Technology; Grant sponsor: National Research Laboratory Program.

*Correspondence to: Dr. Se Pll Park, Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Chon National University, 99, Jeukheon-ri, Jeonju 550-749, South Korea. E-mail: spark@chonju.ac.kr

**Correspondence to: Nam-Hyung Kim, PhD, Department of Animal Biotechnology, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-762, South Korea. E-mail: nhkim@chungbuk.ac.kr Received 9 April 2005; Accepted 21 April 2005 Published online 5 May 2006 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/mrd.20717

한우의 체중후부, 골수지방에서 IGF1R 유전자형에 따른 melanin 생성상 유전자들의 발현수준과 조직 출현양상의 관계

이승하 · 장영호 · 조진홍 · 김남준 · 고영진 · 김희연 · 한영환

농촌진흥청 국립축산과학원, *축산대학과 동물생명대학

Received December 22, 2005; Accepted March 12, 2006

Relation of Expression Levels of Melanin Synthesis Genes according to the MC1R Genotypes with the Coat Color Pattern in Hanwoo, Jeju Black Cattle and Holstein. Seung-Ha Lee, Young-Ho Yang, In-Chul Cho, Nam-Young Kim, Moon-Suck Ko, Ho-Yoon Jung and Sang-Hyun Han*, National Institute of Animal Health, Department of Animal Pathobiology, Chon National University - This study was carried out to elucidate the relation between expression levels of three melanin synthesis genes (TYR, TYRP1, and MC1R) and Dopa-enzyme (tyrosinase) according to the Melanocortin 1 receptor genotypes with coat color pattern in Hanwoo cattle, Jeju Black cattle and Holstein. Using real-time semiquantitative reverse transcription-PCR assay (RT-PCR), the expression levels of these three genes were analyzed in skin tissue from two representative coat colored animals (brown from MC1R of Hanwoo, red type black from L/L of Jeju black cattle (JBC) and dominant black and white patch regions from L/L of Holstein). The TYR, TYRP1 and MC1R genes showed higher expression levels of 4.3, 2.3 and 2.7 times higher in the black skin area of Holstein than that of Jeju JBC, respectively (P<0.05). In addition, the expression levels of these three genes from JBC were significantly higher than those from Hanwoo cattle (P<0.05). These results show that coat color phenotypes in Hanwoo, cattle, JBC and Holstein is directly correlated with TYR, TYRP1 and MC1R transcription levels, which probably affected involvement with MC1R genotypes, L/L in Hanwoo, L/L in JBC and L/L in Holstein. Consequently, this study suggested that the status of MC1R protein may not only induce the transcription activities of a series of TYR and its related genes responsible for melanin synthesis, but also determine the levels of total melanin contents in bovine skin.

Key words: Melanin, TYR, MC1R, coat color, cattle

지침

본 저널에 게재되는 논문의 경우, 저자로부터는 사생활 보호를 위하여 논문의 내용을 익명화하여 게재합니다. 저자가 원한다면, 저자의 이름을 논문에 게재할 수 있습니다. 그러나, 저자의 이름을 논문에 게재하지 않을 경우, 저자의 이름은 논문의 제목과 함께 게재될 수 없습니다. 저자가 원한다면, 저자의 이름을 논문에 게재할 수 있습니다. 그러나, 저자의 이름을 논문에 게재하지 않을 경우, 저자의 이름은 논문의 제목과 함께 게재될 수 없습니다.

본 저널에 게재되는 논문의 경우, 저자로부터는 사생활 보호를 위하여 논문의 내용을 익명화하여 게재합니다. 저자가 원한다면, 저자의 이름을 논문에 게재할 수 있습니다. 그러나, 저자의 이름을 논문에 게재하지 않을 경우, 저자의 이름은 논문의 제목과 함께 게재될 수 없습니다. 저자가 원한다면, 저자의 이름을 논문에 게재할 수 있습니다. 그러나, 저자의 이름을 논문에 게재하지 않을 경우, 저자의 이름은 논문의 제목과 함께 게재될 수 없습니다.

본 저널에 게재되는 논문의 경우, 저자로부터는 사생활 보호를 위하여 논문의 내용을 익명화하여 게재합니다. 저자가 원한다면, 저자의 이름을 논문에 게재할 수 있습니다. 그러나, 저자의 이름을 논문에 게재하지 않을 경우, 저자의 이름은 논문의 제목과 함께 게재될 수 없습니다. 저자가 원한다면, 저자의 이름을 논문에 게재할 수 있습니다. 그러나, 저자의 이름을 논문에 게재하지 않을 경우, 저자의 이름은 논문의 제목과 함께 게재될 수 없습니다.

*Corresponding author. Tel: +82-43-754-5754. Fax: +82-43-754-5753. E-mail: seung@cares.ac.kr

A GHR Polymorphism and Its Associations with Carcass Traits in Hanwoo Cattle

Hwang-Hyun Han*, In-Chul Cho*, Jui-Hyung Kim*, Moon-Suck Ko*, Ho-Yoon Jung*, Hwang-Shik Oh* and Seung-Hyun Lee*

*National Institute of Animal Health, Seoul, Korea; **National Institute of Animal Health, Jeonju, Korea; ***Department of Animal Biotechnology, Chon National University, Jeonju, Korea

Received: 2005; accepted: 2006

ABSTRACT

The growth hormone receptor (GHR) is a membrane transmembrane for the growth hormone signal transduction pathway that regulates various metabolic activities, including cell growth and cell proliferation of various tissues. A polymorphism for the L292G substitution in the 5' promoter, which specifically regulates the GHR gene expression in the liver, was detected by a novel detection method and associated for its relationships with carcass traits in Hanwoo cattle. Hanwoo cattle had various types (L292G polymorphism) as well as the incidence (type L292G) almost 100% of polymorphism. Three genotypes, LL, LG and GG, showed the genotype of 80.1, 18.7 and 1.2%, respectively. The effects of allele G were significant on mean differences for final weight, eye muscle area, marbling score and fat color (P < 0.05), but not for carcass weight, backfat thickness, final mean quality grade or mean color (P > 0.05). Mean 20-month-old Hanwoo steers bearing the L292G allele genotype had higher final weight, heavier live weight and higher marbling score, reflecting intramuscular fat deposition by M. longissimus dorsi, compared to animals bearing a L292G genotype. This suggests that a GHR polymorphism could be a potential genetic marker for improving beef production of Hanwoo cattle.

Key words: Association, carcass traits, GHR, Hanwoo, L292G polymorphism

INTRODUCTION

Growth hormone (GH) plays multiple roles for growth and cellular metabolism in vertebrates. It exerts its effects via specific GH-receptor signal transduction in the target cells. Structures of GHR function can affect the binding capacity and the signaling pathway. Several studies are based on this.

such as mutations of the GHR gene that cause Laron syndrome and idiopathic short stature (Shanghaan et al., 1998; Liu et al., 1998; Rice and Swanson, 2000). In cattle, the GHR gene is located on BTA10 and has 9 alternative exons. Among them, exon 1A is tissue-specific, and is the upstream region. The 5' promoter is an important regulatory element for GHR expression (Meady et al., 1993; Adams et al., 1999; Jiang and Luty, 2004a, 2004b).

*To whom correspondence should be addressed. Email: hhan@cares.ac.kr

Pregnancy Rate of In Vitro Produced Korean Cattle Embryos according to Transport Time Course

Hyeon Young Park*, Eun Young Kim*, Young Han Kim*, Seung Ho Ma*, Chang Eun Oh*, Young Jun Ha*, Nam Hyung Kim*, Sang Seon Lee*, Moon Suck Ko*, Key Zang Lee* and Se Pll Park**

*Maeil Research Co., National Institute of Animal Health, Seoul, Korea; **Department of Animal Biotechnology, National Institute of Animal Health, Jeonju, Korea; ***Department of Animal Biotechnology, Chon National University, Jeonju, Korea

ABSTRACT

This study was to investigate pregnancy rate of IVM/IVF Korean cattle (registered in government) embryos according to transport time course. For the production of embryos, oocytes recovered from slaughtered excellent grade cow and highly fertile frozen-thawed bull semen (produced from LDMC KPN07) was used. In vitro produced embryos were cultured in OELAA medium for 8 days and some of them were frozen. The rate of average cleavage (2-cell) was 85.6% (60/70) and blastocyst rate at day 8 was 34.7% (107/306). Among in vitro produced blastocyst embryos at day 8, most healthy embryos were freshly transferred on production day and some frozen embryos were thawed transferred on appropriate day. These embryos were produced in a laboratory, embryo transfer (ET) was planned in 10 areas of the remote island (Jeju) from the laboratory by airplane. Thus, we examined the pregnancy rate in recipient cow according to embryos of transport time course before ET. From embryo transferred 10 recipient cows, overall pregnancy was 40.0% (10/24). These 10 cows were all calves (single, 9%; (3/10), twin, 6% (1/10)) and total embryo implantation rate was 30% (10/34). Comparing transport time in the base of 4 h, pregnancy rate in ET group required less 4 h (60%, 6/10) was significantly higher than that required more 4 h (26.7%, 3/10). In direct ET of freezing embryos, the pregnancy rate was 40% (4/10). However, it was difficult to find the meaning of temperature, pH and oxygen tension quality of recipients on comparison of pregnancy rate. When the calf death level of embryos according to storage time in thermic bottle container before ET was assessed by TUNEL staining, apoptosis index was increased with storage time-dependent. These results demonstrated that long distance transfer of IVM/IVF embryos is possible and the time of embryo transport is very important for the pregnancy rate on field trial.

Key words: Korean cattle, Embryo transfer, Transport time, Pregnancy, Apoptosis

INTRODUCTION

Ever since Edwards reported the in vitro culture of bovine embryos in 1965 (Edwards, 1965), many researchers reported the IVF of bovine oocytes. Following the success of bovine oocytes fertilized in vitro, cell production was reported (Harada et al., 1980). Until now, many people are using the embryo transfer to improve the effect of breeding stock. For industrial utilization of embryo transfer, embryo must be cultured in vitro before everything else and improve the pregnancy rate before everything else.

The effects of a large number of factors on the pregnancy rate of cattle embryos were examined over a period of years at several different locations. The quality and developmental stage of embryos are important factors in determining the success of embryo transfer. Kubik et al. (2003) showed that transfer of expanded blastocysts resulted in a significantly higher pregnancy rate than transfer of embryos of early or hatched stage. Intracellular pH regulates a variety of cellular processes such as enzyme activity, cell division, differentiation and protein synthesis (Baker, 1996). Otonari et al. (2003) observed that low pH induced development in the blastocyst stage and low pH is involved in the early embryonic death of mouse eggs. Larson et al., (1994). Bovine embryos are susceptible to thermal stress.

*Hyeon Young Park and Eun Young Kim contributed equally to this work.

**This study was supported by a grant (2005R-1A1-A1-010-01001-0) of the Technology Development Program for Agriculture and Forestry, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea.

***Corresponding author. Phone: +82-43754-5756. E-mail: seung@cares.ac.kr

Generation of functional cardiomyocytes from mouse induced pluripotent stem cells

Kyoung Ha Se^{a,b,c,d}, Young Joon Han^{a,b}, Hyeon Young Park^{a,b}, Jae Gon Kim^a, Dong Jun Sung^a, Young Min Baek^a, Byoung Chul Yang^a, Soo Bong Park^a, Sang Kwan Chung^a, Eun Young Kim^{a,b,c,d}, Se Pil Park^{a,b,c,d}

^a Stem-Genetic, Seoul Natl Univ, Seoul, Korea; ^b Stem Cell Research Center, Seoul Natl Univ, Seoul, Korea; ^c Institute of Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Jeju National University, Jeju, Korea; ^d Department of Biotechnology, Konkuk University, Seoul, Korea

ARTICLE INFO

Received 17 April 2012
Received in revised form 1 July 2012
Accepted 17 August 2012
Available online 23 September 2012

Keywords:
iPS cell
Cardiomyocyte
Differentiation
Microarray

ABSTRACT

Induced pluripotent stem (iPS) cells allow derivation of multipotent differentiated cells *in vitro*. During the process of this study we compared the cardiac differentiation potential of mouse iPS cells with embryonic stem (ES) cells and determined that they could produce functional cardiomyocytes. Mouse iPS cells were generated from mouse embryonic fibroblasts by transient reprogramming of mouse transcription factors (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) to induce cardiac cell differentiation. 20–6 × 10⁴ cells were cultured in differentiation medium (DM) using various medium/culture protocols, then placed into gelatin-coated plates and maintained in DM.

1. Introduction

Cardiovascular diseases, including heart failure and infarction, are the most frequent cause of death in industrialized nations. The primary pathogenic factor in cardiovascular disease is cardiomyocyte death due to ischemia, arrhythmia, and apoptosis. A number of strategies have emerged to facilitate replacement of lost cardiac tissue, these include autologous stem cell transplantation, adult stem cell therapy [1].

Induction of myogenic stem cells [2], and/or transposition of cardiomyocytes [3] *in vitro*, cell transplantation approaches are necessary for most advanced and recent study has shown that stem cell-derived cardiomyocytes can improve myocardial function in experimental animal models [4].

Stem cells are fundamentally characterized by prolonged self-renewal and a long-term potential to differentiate into multiple cell types. Embryonic stem (ES) cells, derived from the inner cell mass of mammalian blastocysts, have the ability to give indefinitely while maintaining the capacity to differentiate into derivatives of the three germ layers [5].

Stem cells are functionally characterized by prolonged self-renewal and a long-term potential to differentiate into multiple cell types. Embryonic stem (ES) cells, derived from the inner cell mass of mammalian blastocysts, have the ability to give indefinitely while maintaining the capacity to differentiate into derivatives of the three germ layers [5].

Stem cells are functionally characterized by prolonged self-renewal and a long-term potential to differentiate into multiple cell types. Embryonic stem (ES) cells, derived from the inner cell mass of mammalian blastocysts, have the ability to give indefinitely while maintaining the capacity to differentiate into derivatives of the three germ layers [5].

CELLULAR REPROGRAMMING
Volume 15, Number 6, 2012
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/ijcard.2012.2513

Original Article

Differences between Cellular and Molecular Profiles of Induced Pluripotent Stem Cells Generated from Mouse Embryonic Fibroblasts

Eun Young Kim^a, Kibon Jeon^a, Hyeon Young Park^a, Young Joon Han^a, Byoung Chul Yang^a, Soo Bong Park^a, Hyeon Min Chung^a, and Se Pil Park^{a,b}

Abstract

Induced pluripotent stem (iPS) cells are a new alternative for the development of patient-specific stem cells, and the aim of this study was to determine whether differences exist between the cellular and molecular profiles of iPS cells generated using transient factors, compared to ES cells. The lentiviral infection efficiency differed according to the method of cell culture (adherent cells: 0.89%; suspension cells: 0.78%). Six iPS cell lines exhibited typical ES cell morphology and nuclear expression, but varied in their in vitro self-differentiation ability. Global gene transcription analysis revealed that core pluripotency genes were expressed at lower levels in iPS cells than compared to ES cells (Dnmt3l: +1.6–2.2-fold, Sox2: +2.58–10.0-fold, Esrrb: +1.04–2.35-fold, Dppac1b: +1.04–1.41-fold), while other genes showed higher expression in iPS cells (Sox2b: +1.43–2.35-fold, Dnmt3b: +1.33–2.44-fold). This pattern was repeated in a survey of specific functional groups of genes (surface markers, cell death, JAK-STAT and PI3K-AKT signaling pathways, endothelial, cardiovascular, and neurogenesis genes). Among the iPS cell lines examined, only two showed similar characteristics to ES cells. These results demonstrated that, in addition to cellular characteristics, the molecular evaluation of gene expression using DNA microarrays might help to identify the stem cell stability and pluripotency of iPS cells.

Introduction

Stem cell research is prominent in the fields of bio-technology and medicine as stem cells are recognized as promising disease sources but cell reprogramming therapies for diseases such as Parkinson's disease, spinal cord injury, and heart failure (Thomson et al., 1998). Stem cells can be derived either from embryonic or from various postnatal sources, the former are known as embryonic stem (ES) cells and the latter as adult stem cells. ES cells are capable of differentiating into cells representing all three germ layers and have prolonged self-renewal capacity, while adult stem cells exhibit limited plasticity and give growth potential. However, recently developed induced pluripotent stem (iPS) cells, artificially derived from somatic cells reprogrammed by the introduction of certain transcription

factors, are gaining the way toward simplifying the generation of patient-specific stem cells without the ethical concern use of embryos (Takahashi and Yamanaka, 2006; Yu et al., 2007).

Several investigators have reported that, in many respects, iPS cells are very similar to ES cells, with comparable morphology, surface marker expression, embryonic body formation, epigenetic status, trypsin sensitivity, and direct differentiation into neural cells and beating cardiomyocytes (Matsuda et al., 2007; Park et al., 2006; Takahashi et al., 2007). The reprogramming method was initially attempted with retroviral nucleic transfer, four defined pluripotency genes (Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc); however, recent advances have indicated that reprogramming can be accomplished using plasmids without a viral transfection system, or by using proteins passed into the cells through poly-siRNA and/or

^a Stem-Genetic, Seoul Natl Univ, Seoul, Korea; ^b Stem Cell Research Center, Seoul Natl Univ, Seoul, Korea; ^c Institute of Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Jeju National University, Jeju, Korea; ^d Department of Biotechnology, Konkuk University, Seoul, Korea; ^e National Institute of Subaqueous Aquaculture, Jeju 630-750 and ^f Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Jeju National University, Jeju, Korea

—Original Article—

3,4-Dihydroxyflavone Acts as an Antioxidant and Antiapoptotic Agent to Support Bovine Embryo Development *In Vitro*

Kyeom Sil Lee^{a,b}, Eun Young Kim^{a,b}, Kibon Jeon^{a,b}, Sang Gu Cho^{a,b}, Young Joon Han^a, Byoung Chul Yang^a, Sung Soo Lee^a, Moon Saek Ko^a, Kyeon Jung Rhee^a, Hyeon Taek Lee^a, and Se Pil Park^{a,b}

^aAnimal Biotechnology National University Stem Cell Research Center, Seoul 143-854, ^bDepartment of Animal Biotechnology, Konkuk University, Seoul 143-702, ^cNational Institute of Animal Science, RD4, Seonam 441-706, ^dNational Institute of Subaqueous Aquaculture, Jeju 630-750 and ^eFaculty of Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Jeju National University, Jeju 630-756, Korea

Abstract. The effects of two antioxidants, superoxide dismutase (SOD) and the flavonoid 3,4-dihydroxyflavone (DHF), on bovine embryo development *in vitro* were examined. Blastocyst development, total cell and inner cell mass (ICM) numbers, intracellular levels of reactive oxygen species (ROS), apoptotic indices and gene expression levels were examined before and after treatment of day 2 bovine embryos (2–4 cells) with various concentrations of 3,4-DHF or SOD for 6 days. Statistical analysis was performed using analysis of variance, with significance defined at the P<0.05 level. SOD had no significant effect on bovine embryo development at any tested concentration (control, 32.8%, 300 U/ml, 300.0, 400 U/ml, 24.2%). In contrast, 10 μM 3,4-DHF promoted higher blastocyst development (39.3%) than any other concentration (control, 26.7%, 1 μM, 30.3%, 50 μM, 20.5%, 100 μM, 30.5%). Compared with 300 U/ml SOD, 10 μM 3,4-DHF resulted in significantly higher blastocyst development (44.2% (control, 31.5%; SOD 300 U/ml, 33.4%). Treatment with 3,4-DHF increased the ICM:cell number and reduced non-cellular DNA production and apoptotic cell numbers. When O₂ tension was decreased from 20% (high tension) to 5% (low tension), embryo development rates were doubled regardless of 3,4-DHF treatment. Under high O₂ tension, 10 μM 3,4-DHF treatment may render bovine embryo development similar to a low O₂ tension environment. The best blastocyst development was obtained under low O₂ tension plus 10 μM 3,4-DHF treatment. The relative expression levels of antioxidant (MnSOD), antiapoptotic (Survivin), the inhibitor and growth-related genes (Bcl-2, C-Myc) were significantly increased after 3,4-DHF treatment, while the expression levels of oxidant (iNOS) and apoptotic genes (Caspase-3 and Bax) were reduced. These results suggest that 3,4-DHF may promote the *in vitro* development of bovine embryos through its antioxidant and Key words: Antiapoptotic, Antioxidant, Bovine embryo, 3,4-Dihydroxyflavone, Superoxide dismutase (SOD) (J. Reprod. Dev. 07: 127–134, 2011)

In vitro bovine embryo production generally involves oxygenation, fertilization and oxygen culture. For *in vitro* culture of mammalian oocytes, an environment consisting of 5% CO₂ and 95% air (<20% O₂) is widely used [1]. However, a high O₂ concentration during *in vitro* culture impairs embryonic development, perhaps due to the increased accumulation of reactive oxygen species (ROS) in the cytoplasm of developing embryos [2]. These ROS are highly reactive with subcellular macromolecules, including proteins, lipids and DNA, and may cause significant dysfunction such as enzyme inactivation, mitochondrial dysfunction or DNA fragmentation [2, 3]. Living organisms possess natural protective systems (ROS scavengers), which are intracellular molecules that counteract the negative effects of ROS [4]. However, antioxidant levels *in vitro* are lower than those *in vivo*, thus,

antioxidant supplementation of the medium may support improved developmental capacity [5]. Antioxidants include enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase and glutathione peroxidase, as well as various and ascorbic acids and alpha-tocopherol. For the antioxidant system, SODs are the initial enzymes that promote the conversion of its main substrate to H₂O₂, which is then removed by catalase or glutathione peroxidase. SODs are characterized by their strict cationic requirements and substrate localization.

The structure and function of flavonoids have evolved considerably because of their antioxidant properties. The flavonoid structure is shared by the monomers, flavanols, flavones and flavonols. Some flavonoids exhibit potent antioxidant properties and can scavenge superoxide, differentiate and the cell cycle, probably by virtue of their antioxidant functions [6]. Flavonoids may inhibit the generation of primary oxygen radicals and subsequent oxidant chain, since they are effective chelators of transition metal ions [6]. The number of hydroxyl substituents in a flavonoid is thought to be a critical factor in its ROS-scavenging ability [7].

The present study examined the use of a flavonoid as an antioxidant supplement of the medium may support improved developmental capacity [5].

Antioxidant supplementation of the medium may support improved developmental capacity [5].

Antioxidant supplementation of the medium may support improved developmental capacity [5].

Antioxidant supplementation of the medium may support improved developmental capacity [5].

A Study of Factors effecting on Artificial Insemination in Multi-Parturition Cattle

X. Y. Jung, S. J. Park, N. H. Kim, K. S. Baek, B. S. Jeon, H. J. Lim, T. Y. Han, K. S. Oh, K. S. Lee, S. Y. Kang, H. J. Lee, W. K. Chang, H. S. Kim
National Livestock Research Institute, RDA^a, Chungbuk National University^b

Received February 13, 2012
Accepted October 5, 2012
Published online February 8, 2013
© 2013 by the Society for Reproduction and Development
Correspondence: X. Y. Jung (xkj@nri.re.kr), S. J. Park (sjp@nri.re.kr) and W. K. Chang (wkc@nri.re.kr)
DOI: 10.1007/s12771-012-2011-2

SUMMARY

The objective of this study was to determine physiological and mechanical factors effecting on the pregnancy rates following artificial insemination in dairy cattle. Estrus for artificial insemination of cows was checked whether the outflow of mucus from the elements was out flow or not. There were no significant difference of gestation rates with mucus release (31.76%) and without mucus release (24.03%). The pregnancy rates were 39.02% in 10–20mm of follicle size group and 27.03% (p<0.05) in 30–30mm diameter of the follicles. There were not different pregnancy rates between twice inseminated dairy cattle and more than 3 times inseminated cattle. The pregnancy rate was 20.57% under automatic milking system. In contrast, under artificial milking system pregnancy rate was 36.85%. Two systems significantly (p<0.05) were different. These results suggest that pregnancy rates were not effected by physiological system, but mechanical condition.

조식색 품종과 1-단계 동결된 체세포 핵전사배양 죽은 이식 기술로 복원된 제주 흑소 생산

김은철¹, 이현진², 김병진³, 김희정⁴, 노은영⁵, 조은영⁶, 송종복⁷, 오영진⁸, 고재훈⁹, 손승민¹⁰, 이준희¹¹, 박성민¹², 김희정¹³, 송종복¹⁴, 오영진¹⁵

Production of Cloned Jeju Black Cattle (Korean Cattle) from SCNT Embryo using Verification, One-Step Dilution and Direct Transfer Technique

Eun Young Kim¹, Hee Hyun Lee², Hee Young Kim³, Hee Young Park⁴, Eun Hee Choi⁵, Eun Hyoung Noh⁶, Dong Hyun Song⁷, Chang Kim Cho⁸, Young Hyun Kim⁹, Seong Ho Lee¹⁰, Dong Sun Lee¹¹, Moon Suk Ko¹², Kay Zang Ryu¹³ and Se Pil Park¹⁴

ABSTRACT

One-step dilution and direct transfer would be a practical technique for the field application of stem cells. This study was to examine whether Jeju Black Cattle (JBC) Korean Cattle can be successfully cloned from vitrified and stored about 10 years old nuclear transfer (SCNT) embryos after direct transfer. For verification, SCNT embryos were cultured in glycerol (G) and ethylene glycol (EG) solutions (10% v/v) for 7 and 10 min, 10% G plus 10% EG for 10 min, and 10% G plus 10% EG for 10 min for 1 min. SCNT embryos were cultured in 10% G plus 10% EG for 10 min, 10% G plus 10% EG for 10 min, 10% G plus 10% EG for 10 min, and 10% G plus 10% EG for 10 min for 1 min. SCNT embryos were cultured in 10% G plus 10% EG for 10 min, 10% G plus 10% EG for 10 min, 10% G plus 10% EG for 10 min, and 10% G plus 10% EG for 10 min for 1 min. SCNT embryos were cultured in 10% G plus 10% EG for 10 min, 10% G plus 10% EG for 10 min, 10% G plus 10% EG for 10 min, and 10% G plus 10% EG for 10 min for 1 min.

서론

본 연구는 조식색 품종과 1-단계 동결된 체세포 핵전사배양 죽은 이식 기술로 복원된 제주 흑소 생산을 위한 기술적 접근을 평가하는 데 목적이 있다. 본 연구는 조식색 품종과 1-단계 동결된 체세포 핵전사배양 죽은 이식 기술로 복원된 제주 흑소 생산을 위한 기술적 접근을 평가하는 데 목적이 있다. 본 연구는 조식색 품종과 1-단계 동결된 체세포 핵전사배양 죽은 이식 기술로 복원된 제주 흑소 생산을 위한 기술적 접근을 평가하는 데 목적이 있다.

Coat Color Patterns and Genotypes of Edanseo and Apseul in Hanwoo and Jeju Black Cattle

Sung-Hyun Han¹, In-Cheol Cho², Moo-Suk Ko³, Young-Hoon Kim⁴, Eun-Young Kim⁵, Se-Pil Park⁶ and Sang-Soo Lee⁷

¹National Animal Quarantine Station, National Institute of Animal Health, 2214, Joo 499-120, Seong
²Animal Quarantine Station, National Institute of Animal Health, 2214, Joo 499-120, Seong
³Animal Quarantine Station, National Institute of Animal Health, 2214, Joo 499-120, Seong
⁴Animal Quarantine Station, National Institute of Animal Health, 2214, Joo 499-120, Seong
⁵Animal Quarantine Station, National Institute of Animal Health, 2214, Joo 499-120, Seong
⁶Animal Quarantine Station, National Institute of Animal Health, 2214, Joo 499-120, Seong
⁷Animal Quarantine Station, National Institute of Animal Health, 2214, Joo 499-120, Seong

To understand the relationship between coat color inheritance patterns and genotypes of Edanseo (E) and Apseul (A) in cattle, the genotypes for melanocortin-1 receptor (MC1R) and agouti signaling protein (ASIP) were analyzed in Hanwoo, Jeju black cattle (JBC), and their crossbred progeny. Three MC1R alleles (E⁺, E⁻, and e) were found in the black-colored JBC population. JBC had no recessive melanocortin-1 receptor (MC1R) allele but this genotype was predominant in the Hanwoo breed. However, MC1R E⁺ Hanwoo did not produce a black coat color as they appeared either as brown or solid red. For ASIP three genotypes (AA, A⁺, and A⁻) were determined by insertion/deletion of an L1-RT element in Hanwoo. The ASIP A⁻ allele was rarely observed, and no A⁺ A⁻ heterozygotes were detected in the JBC population. Cattle carrying ASIP A⁻ did not show any agouti-like banded pigmentation patterns in either breed or their progeny. The coat colors of the crossbred progeny were distinguished by two colors, yellowish-brown versus dark-brown or black, and their coat colors were directly related to the genotypes of the Edanseo breed, yellowish-brown (off) and dark-brown or black (C⁺), but not to the Apseul breed. ASIP genotypes probably did not affect coat color development in the Hanwoo or crossbred progeny. Our results suggest that the ASIP genotypes do not play key roles in coat color variation, but the MC1R genotypes do direct the phenotypes of Hanwoo, JBC, and their progeny.

Key words: Coat color, melanocortin-1 receptor (MC1R), agouti signaling protein (ASIP), Hanwoo, Jeju black cattle

INTRODUCTION

In Korea, there are 6 indigenous cattle breeds distinguished by 3 coat color patterns: a brown or red cattle breed (Hanwoo), a black-colored brown cattle breed (Jeju black cattle, also called Cheo-woo) and 2 black cattle breeds. The 2 indigenous black cattle breeds can be separated by their localities: mountain (Jeju black cattle) and lowland (Jeju black cattle, JBC). The popular cattle breed Hanwoo has the largest population estimated at about 1.8 million-head, while the other 3 breeds have small populations (total number animals of each breed are lower than 500 head). In particular, low black cattle (JBC) that are raised only on lowland are regarded as an endangered breed, which featured the JBC Conservation Program to the cattle

1990s. After its political protection for maintenance and preservation, the JBC population has increased to about 300 head at present. JBC cattle are typically characterized as black cattle with/without abdominal white spots (some other animals show partially diluted, light-yellow or colorless).

In mammals, coat color inheritance is regulated by more than 120 genes, and is mainly determined by the combination of genotypes from several distinct loci, e.g. agouti (A), extension (E), spotting (S), dilution (D) and albino (I) (Muller 2010). The melanocortin-1 receptor (MC1R) encoded by the E locus plays a primary role in signal transduction for the melanocyte-stimulating hormone-1 (MSH1) in melanocytes, and was recently studied at the molecular level for black, brown and red coat colors in various cattle breeds (Jin et al. 2007). In the E locus, 3 major alleles, E⁺ for dominant black, E⁻ for intermediate/light type and e for recessive red/yellow/brown, were previously described. The dominant E⁺ allele produces a completely

*Corresponding author
Tel: +82-31-290-1753, Fax: +82-31-290-1900
E-mail: seon@jks.or.kr

The Use of Embryonic Stem Cell Derived Bioactive Material as a New Protein Supplement for the In Vitro Culture of Bovine Embryos

Eun Young KIM¹, Jun Beom LEE², Hye Young PARK³, Chang In JONG³, Key Zang RYU⁴ and Se Pil PARK^{3*}

¹Animal Quarantine Station, National Institute of Animal Health, 2214, Joo 499-120, Seong
²Animal Quarantine Station, National Institute of Animal Health, 2214, Joo 499-120, Seong
³Animal Quarantine Station, National Institute of Animal Health, 2214, Joo 499-120, Seong
⁴Animal Quarantine Station, National Institute of Animal Health, 2214, Joo 499-120, Seong

Abstract. Embryonic stem (ES) cells are expanded systems of the inner cell mass cells that comprise the early mammalian blastocyst. Components derived from ES cells may contain various bioactive materials (BM) suitable for early preimplantation embryo growth. In this study, we examined the effect of human ES cell derived BM (hES-BM) on *in vitro* culture of bovine embryos. When bovine parthenogenetic day 2 embryos were cultured in 10% M2-BM, a significantly higher embryo development rate (84.7%) and increased cell numbers were observed relative to control medium containing 1 mg/ml BSA (100%), P-0.01). Among the various concentrations (5, 10 and 15%) and days of treatment (2 or 4 days) tested, 10% M2-BM treatment for 4 days provided the best culture environment to support the growth of bovine embryos *in vitro* (P<0.05). Little difference was observed between 10% M2-BM and 10% FBS treatment in the extended parthenogenesis or *in vitro* fertilized embryos, although the M2-BM group developed at a slightly better rate. However, the M2-BM cell numbers were significantly higher in the M2-BM group in respect to embryo origin (P<0.05). In addition, the relative levels of glutathione (GSH, +1.8 fold), Na⁺ (+3.3 fold), embryogenesis (Stat), +2.8 fold, IGF1B, +1.8 fold, IGF1A, +2.0 fold and growth (GSH), +2.6 fold) genes were significantly higher in the 10% M2-BM group than in the 10% FBS group (P<0.05), while the levels of other genes (Bax, Bcl2, MDC03 and Connexin43) were not different. This is the first report regarding the positive effects of hES-BM on bovine embryo development *in vitro*. Based on our results, we conclude that hES-BM can be used as a new protein supplement for bovine preimplantation embryo development.

Key words: Bovine embryos, Differentiation, staining, Human ES cell derived BM (hES-BM), Real time RT-PCR

Successful preimplantation embryo development *in vitro* requires a culture environment compatible to *in vivo* conditions, specifically, this entails using an effective basic culture medium, various protein supplements and a suitable system with a suitable cell feeder layer [1, 2]. Almost all media used for bovine embryo development *in vitro* contain bovine serum albumin (BSA) and fetal bovine serum (FBS) as a source of protein, and normally serum replacement (SR) or a synthetic serum substitute have also been used [3, 4]. Various proteins supply substrate, amino acids, vitamins, growth factors and fatty acids (cholesterol [5]. Serum also has a higher effect, stabilizing early cleavage divisions and accelerating the development of nuclei and blastocysts [6]. However, the undefined nature of serum may result in highly variable developmental rates *in vitro* and affect the high incidence of apoptosis observed in *in vitro* produced embryos. Moreover, the presence of serum over a prolonged period of time has been shown to cause the expression pattern of various genes [7, 8]. Therefore, such serum is an important protein supplement for bovine embryo development *in vitro*, a finding for the better protein supplement to

Received August 1, 2010
Accepted December 21, 2010
Published online in JZS on January 20, 2011
©2011 by the Society for Reproduction and Development
Correspondence: S.P. Park (e-mail: seon@jks.or.kr and sp.park@jks.or.kr)

A promoter polymorphism of MSTN g.-371T>A and its associations with carcass traits in Korean cattle

Sung-Hyun Han¹, In-Cheol Cho², Moo-Suk Ko³, Young-Hoon Kim⁴, Eun-Young Kim⁵, Se-Pil Park⁶ and Sang-Soo Lee⁷

¹National Animal Quarantine Station, National Institute of Animal Health, 2214, Joo 499-120, Seong
²Animal Quarantine Station, National Institute of Animal Health, 2214, Joo 499-120, Seong
³Animal Quarantine Station, National Institute of Animal Health, 2214, Joo 499-120, Seong
⁴Animal Quarantine Station, National Institute of Animal Health, 2214, Joo 499-120, Seong
⁵Animal Quarantine Station, National Institute of Animal Health, 2214, Joo 499-120, Seong
⁶Animal Quarantine Station, National Institute of Animal Health, 2214, Joo 499-120, Seong
⁷Animal Quarantine Station, National Institute of Animal Health, 2214, Joo 499-120, Seong

Received 27 February 2011 / Accepted 29 June 2011 / Published online 9 July 2011
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

Abstract. A promoter polymorphism of bovine *MSTN* gene g.-371T>A was screened in Hanwoo and Jeju black cattle (JBC). The *MSTN* g.-371T>A polymorphism was found in all three cattle breeds tested. An allele *MSTN* g.-371A was the most frequent in the JBC breed among breeds tested. The association of *MSTN* genotypes for carcass traits was also tested in the Hanwoo population. Significant differences were found between the genotypes and level of meat quality grade index which consisted the marbling score level ($P < 0.01$), reflecting the metabolic role of *MSTN* for inhibition of postnatal differentiation to intramuscular fat deposition. In addition, significant differences were found for fat color index of backfat according to *MSTN* genotypes ($P < 0.05$), suggesting that *MSTN* may play a role in deposition of white/yellow adipocyte in backfat. However, there was no detection of significant association of genotypes with live weight, carcass weight, backfat thickness, eye muscle area, marbling score, or meat color index ($P > 0.05$). Despite the lack of statistical association, wild type g.-371T showed association pattern similar to those of *ASB* homozygotes, such as heavier weights, thinner backfat, larger eye muscle area, and lower marbling score. The results of the present study suggest that *MSTN* promoter polymorphism g.-371T>A may affect carcass traits, which could be a useful molecular marker for planning improvement in the economic traits of Korean cattle breeds.

Keywords: Association, Carcass trait, *MSTN*, Polymorphism, Hanwoo, Jeju Black cattle

Introduction
Myostatin, encoded by the *MSTN* gene (previously referred to as *GDF11*), is a member of the transforming growth factor-beta (TGF- β) superfamily that reportedly acts to inhibit growth and differentiation of muscle fibers and myoblasts [1-4]. Expression of myostatin is increased during conditions of muscle atrophy [5], and both congenital and induced mutations that result in loss of function or in lower expression activity induce remarkable muscle hypertrophy in a number of mammalian species, including mice [1, 6-9], dogs [10, 11], sheep [12-17], horses [18, 19] and humans [20]. It has been revealed that Piedmonte and Belgian Blue cattle, commonly known as double-muscling cattle, contain the *MSTN* mutation. The *MSTN* sequences of Piedmonte and Belgian Blue cattle contain a nonsense mutation (C>T) and an 11-bp deletion in exon 3, respectively [21-23]. Other highly muscled cattle breeds

S.H. Han: ¹C.C. Cho: ²M.S. Ko: ³Y.H. Kim: ⁴E.Y. Kim: ⁵S.P. Park: ⁶S.S. Lee: ⁷
¹National Animal Quarantine Station, National Institute of Animal Health, 2214, Joo 499-120, Seong
²Animal Quarantine Station, National Institute of Animal Health, 2214, Joo 499-120, Seong
³Animal Quarantine Station, National Institute of Animal Health, 2214, Joo 499-120, Seong
⁴Animal Quarantine Station, National Institute of Animal Health, 2214, Joo 499-120, Seong
⁵Animal Quarantine Station, National Institute of Animal Health, 2214, Joo 499-120, Seong
⁶Animal Quarantine Station, National Institute of Animal Health, 2214, Joo 499-120, Seong
⁷Animal Quarantine Station, National Institute of Animal Health, 2214, Joo 499-120, Seong

3. 학술발표

NO	발표자	학술회의명	발표제목	발표일시
1	소경하, 김재연,박민지,박효영,김연옥,김은영, 박세필	The 8th International Symposium on Developmental Biotechnology	The Antioxidant potent of Apple Poly to Support In Vitro Produced Bovine Parthenogenetic Embryos	2008-10-24
2	박효영, 김은영, 김재연, 소경하, 박민지, 김연옥, 김영훈,문성호,오창언,황호진,박세필	The 8th International Symposium on Developmental Biotechnology	Pregnancy Rate of In Vitro Produced Elite Hanwoo Embryos according to Transport Time Course	2008-10-24
3	박민지,김재연,소경하,박효영,김연옥, 김은영,박세필	The 8th International Symposium on Developmental Biotechnology	Flavonoid Treatment Improves the In Vitro Developmental Capacity of Bovine Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos	2008-10-24
4	김재연,소경하,박민지,박효영,김연옥, 김은영,박세필	The 8th International Symposium on Developmental Biotechnology	Effect of Flavonoid Treatment on In Vitro Survival of Frozen-thawed Bovine Parthenogenetic Embryos	2008-10-24
5	김재연,소경하,박민지,박효영,김연옥, 전길수,김은영,박세필	한국동물번식학회 2008년도 춘계학술대회	In Vitro Survival of Vitrified Bovine Parthenogenetic Blastocysts according to Treatment of Flavonoid before Freezing and after Thawing	2008-06-20
6	박효영,김은영,김재연,소경하,박민지, 김연옥,전길수,김영훈,문성호,오창언, 황호진,박세필	한국동물번식학회 2008년도 춘계학술대회	Pregnancy Rate of In Vitro Produced Korean Cattle Embryos according to Transport Time Course	2008-06-20
7	박민지,김재연,소경하,박효영,김연옥, 전길수,김은영,박세필	한국동물번식학회 2008년도 춘계학술대회	Effect of Flavonoid on In Vitro Development and Gene Expression of Bovine Parthenogenetic Embryo	2008-06-20
8	소경하,김재연,박민지,박효영,김연옥, 전길수,김은영,박세필	한국동물번식학회 2008년도 춘계학술대회	Apple Poly is a High-Potency Strong Antioxidant to Support In Vitro Produced Bovine Parthenogenetic Embryos	2008-06-20
9	태진철,김은영,김남형,박세필	The 5th Annual Conference of the Asian Reproductive Biotechnology Society	IN VITRO DEVELOPMENT OF BOVINE SOMATIC CELL NUCLEAR TRANSFER EMBRYOS TREATED WITH FLAVONOID	2008-11-26
10	김은영,김재연,박민지,소경하,박효영, 노은형,노은지,박세필	한국동물번식학회 2009년도 춘계학술대회	In Vitro Fertilization with Flow-Cytometrically-Sorted Jeju Black Cattle Sperm.	2009-06-19
11	김재연,박민지,소경하,박효영,노은형, 노은지,김은영,박세필	한국동물번식학회 2009년도 춘계학술대회	The Usability of Embryonic Stem Cell Derived Bioactive Material as an Supplement on In Vitro Culture of Bovine Embryos	2009-06-19
12	노은지,박민지,김재연,노은형,박효영, 소경하,김은영,박세필	한국동물번식학회 2009년도 춘계학술대회	A Novel Method for Improvement of Bovine In Vitro Fertiliza+tion System	2009-06-19
13	노은형,김재연,박민지,노은지,소경하, 박효영,김은영,박세필	한국동물번식학회 2009년도 춘계학술대회	Flavonoid Effect on In Vitro Development of Bovine Embryos with Five or Twenty Percent Oxygen	2009-06-19
14	박민지,김재연,박효영,소경하,노은형, 노은지,김은영,박세필	한국동물번식학회 2009년도 춘계학술대회	Analysis of Embryonic Stem Cells Derived Bioactive Material and Their Effect on Skin Fibroblast	2009-06-19
15	박효영,소경하,김재연,박민지,노은형, 노은지,김은영,박세필	한국동물번식학회 2009년도 춘계학술대회	In Vitro Differentiation of Mouse Induced Pluripotent Stem (miPS) Cells into Endithelial Cells	2009-06-19
16	소경하,박효영,김재연,박민지,노은형, 노은지,김은영,박세필	한국동물번식학회 2009년도 춘계학술대회	Characterization of Cardiac Cells Derived from Mouse Induced Pluripotent Stem (miPS) Cells	2009-06-19

17	Eun Ji Noh, Min Jee Park, Jae Youn Kim, Eun Hyung Noh, Hyo Young Park, Kyoung Ha So, Eun Young Kim and Se Pill Park	The 9th International Symposium on Developmental Biotechnology	A New Method for Improving Bovine Embryo Developmental Capacity.	2009-10-23
18	Eun Hyung Noh, Jae Youn Kim, Min Jee Park, Eun Ji Noh, Kyoung Ha So, Hyo Young Park, Eun Young Kim and Se Pill Park	The 9th International Symposium on Developmental Biotechnology	Low Oxygen Environment with Flavonoid Treatment Supports for the Better In Vitro Developmental Capacity of Bovine Embryos.	2009-10-23
19	Jae Youn Kim, Kyoung Ha So, Min Jee Park, Hyo Young Park, Eun Hyung Noh, Eun Ji Noh, Seong Ho Mun, Young Hoon Kim, Sung Soo Lee, Moon Suck Ko, Eun Young Kim and Se Pill Park	The 9th International Symposium on Developmental Biotechnology	Production of Cloned Jeju Black Cattle by Somatic Cell Nuclear Transfer and Flavonoid Treatment.	2009-10-23
20	Min Jee Park, Jae Youn Kim, Hyo Young Park, Kyoung Ha So, Eun Hyung Noh, Eun Ji Noh, Eun Young Kim and Se Pill Park	The 9th International Symposium on Developmental Biotechnology	Composition of Embryonic Stem Cells Derived Bioactive Material Effects on Skin Fibroblast Proliferation.	2009-10-23
21	Hyo Young Park, Eun Hyung Noh, Kyoung Ha So, Min Jee Park, Jae Youn Kim, Eun Ji Noh, Eun Young Kim and Se Pill Park	The 9th International Symposium on Developmental Biotechnology	Characterization of In Vitro Differentiated Endothelial Cells Derived from Mouse Induced Pluripotent Stem Cells(miPS).	2009-10-23
22	Kyoung Ha So, Hyo Young Park, Jae Youn Kim, Min Jee Park, Eun Hyung Noh, Eun Ji Noh, Eun Young Kim and Se Pill Park	The 9th International Symposium on Developmental Biotechnology	In Vitro Differentiated Functional Cardiomyocytes Derived from Mouse Induced Pluripotent Stem (miPS) Cells.	2009-10-23
23	Eun Young Kim ,Byong Chul Yong,Sung Soo Lee,Moon Suck Ko, Key Jung Riu and Se Pill Park	The 10th international Symposium on Developmental Biotechnology	3,4-Dihydroxyflavone Acts as an Antioxidant and Antiapoptotic Agent to support Bovine Embryo Development In Vitro	2010-10-29
24	Eun Hyung Noh, Hyo Young Park, Byong Chul Yong, Eun Young Kim, and Se Pill Park	The 10th international Symposium on Developmental Biotechnology	Effect of Glycosaminoglycan on Sperm Capacitation and Development In Vitro Produced Bovine Embryos	2010-10-29
25	Min Jee Park, Hyo Young Park,Eun Young Kim and Se Pill Park	The 10th international Symposium on Developmental Biotechnology	Positive Effect of Development of Bovine Somatic Cell Nuclear Transfer Embryo Using Oosight Imaging System	2010-10-29
26	Eun Young Kim ,Hyo Young Park, Byong Chul Yong, Soo Bong Park, Hyung Min Chung and Se Pill Park.	The 10th international Symposium on Developmental Biotechnology	Differences between Cellular and Molecular Profiles of Induced Pluripotent Stem Cells Generated from Mouse Embryonic Fibroblasts	2010-10-29
27	Eun Ji Noh ,Hyo Young Park, Min Jee Park, Eun Young Kim and Se Pill Park	The 10th international Symposium on Developmental Biotechnology	Establishment of Embryonic Stem Cell Line from Bovine IVM/IVF/IVC Embryos	2010-10-29
28	Hyo Young Park, Eun Hyung Noh, Eun Young Kim and Se Pill Park	The 10th international Symposium on Developmental Biotechnology	Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells using Magnetofection	2010-10-29
29	Kyoung Ha SO,Hyo Young Park, Jae Gon Kim, Dong Jun Sung, Young Min Bae,Byoung Chul Yang, Soo Bong Park, Sang Keun Chang, Eun Young Kim and Se Pill Park	The 10th international Symposium on Developmental Biotechnology	Generation of Functional Cardiomyocytes from Mouse Induced Pluripotent Stem Cells	2010-10-29
30	Eun Hyung Noh, Young Joon Han, Hyo Young Park, Eun Young Kim, and Se Pill Park	Reproductive & Developmental Biology	Effect of Glycosaminoglycan Treated Sperm on In Vitro Developmental Capacity of Bovine Embryos	2010-06-18
31	Eun Ji Noh, Hyo Young Park, Jae Youn Kim, Eun Young Noh, Eun Young Kim and Se Pill Park	Reproductive & Developmental Biology	Efficient Formation of Primary Embryonic Stem Like Colonies from In Vitro Produced Bovine Embryos	2010-06-18
32	Min Jee Park, Jae Yeon Kim, Hyo Young Park,Eun Young Kim and Se Pill Park	Reproductive & Developmental Biology	In Vitro Development of Bovine Somatic Cell Nuclear Transfer Embryo Using Oosight Imaging System	2010-06-18

33	Kyoung Ha So, Young Joon Han, Hyo Young Pa가, Eun Young Kim and Se Pill Park	Reproductive & Developmental Biology	Generation Functional Cardiomyocytes Derived from Mouse Induced Pluripotent Stem(miPS) Cells	2010-06-18
34	Hyo Young Park, Eun Hyung Noh, Eun Young Kim and Se Pill Park	Reproductive & Developmental Biology	Efficient Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells using Magnetofection	2010-06-18
35	Jae Yeon Kim, Min Jee Park, Seong Ho Mun, Young Hoon Kim, Sung Soo Lee, Mon Suck Ko, Eun Young Kim and Se Pill Park	Reproductive & Developmental Biology	Production of Cloned Jeju Black Cattle using Somatic Cell Nuclear Transfer Embryo Treated with Flavonoid	2010-06-18
36	Eun Young Kim and Se Pill Park.	The 10th international Symposium on Developmental Biotechnology	Differentiated Human Embryonic STEM Cells Enhance the In Vitro and In Vivo Developmental Potential of Mouse Preimplantation Embryos	2010-10-29
37	박민지, 김은영, 박효영, 문성호, 오창언, 김영훈, 이성수, 고문석, 박세필	한국동물번식학회 2011년도 춘계학술대회	In Vitro Development of Somatic Cell Nuclear Transfer Embryo reated with flavonoid and production of cloned Jeju black cattle	2011-06-17
38	김은영, 박민지, 박효영, 노은지, 노은형, 송동환, 오창언, 김영훈, 문성호, 고문석, 박세필	한국동물번식학회 2011년도 춘계학술대회	sperm characteristics and In vitro Developmental Potential of Genetically Identical Jeju Black Cattle Cloned Bull and Its Donor Bull	2011-06-17
39	박효영, 노은형, 김은영, 박세필	한국동물번식학회 2011년도 춘계학술대회	Non-toxic Magnetofection for Nuclear Reprogramming of Mouse Somatic Cells	2011-06-17
40	박민지, 김은영, 박효영, 노은지, 노은형, 송동환, 오창언, 김영훈, 문성호, 이동선, 고문석, 류기중, 박세필	한국동물번식학회 2011년도 춘계학술대회	Production of Cloned Jeju Black Cattle (Korean Cattle) from SVNT Embryo using Vitrification, One-step Dilution and Direct Transfer Technique	2011-06-17
41	김은영, 이준범, 박효영, 정창진, 류기중, 박세필	한국동물번식학회 2011년도 춘계학술대회	The Use of Embryonic Stem Cell Derived Bioactive Material as a New Protein Supplement for the In Vitro Culture of Bovine Embryos	2011-06-17
42	노은형, 노은지, 박효영, 박민지, 김은영, 박세필	한국동물번식학회 2011년도 춘계학술대회	GAG Treatment on Sperm Enhanced The Developmental Capacity of Bovine Follicular Oocytes	2011-06-17
43	노은지, 박효영, 박민지, 노은형, 김은영, 박세필	한국동물번식학회 2011년도 춘계학술대회	Characterization of Embryonic Stem Cell Line Derived from Bovine IVM/IVF/IVC Embryos	2011-06-17
44	김은영, 박효영, 노은형, 박세필	The 11th international Symposium on Developmental Biotechnology	Neuronal Cell Differentiation from Human Induced Pluripotent Stem Cells	2011-10-21
45	노은지, 박효영, 박민지, 김은영, 박세필	The 11th international Symposium on Developmental Biotechnology	Generation and characterization of bovine parthenogenetic stem cells	2011-10-21
46	박민지, 노은지, 박효영, 김은영, 박세필	The 11th international Symposium on Developmental Biotechnology	Embryonic stem cell nuclear reprogramming of bovine oocytes has better growth potential	2011-10-21
47	노은형, 박효영, 김은영, 박세필	The 11th international Symposium on Developmental Biotechnology	Neuron differentiation condition of human adipose tissue derived stem cells	2011-10-21
48	박효영, 박민지, 노은형, 김은영, 박세필	The 11th international Symposium on Developmental Biotechnology	In vitro production of human erythropoietin (hEPO) transgenic bovine embryos by somatic cell nuclear transfer	2011-10-21

49	박민지, 노은지, 박효영, 한영준, 김은영, 박세필	한국동물번식학회 2012년도 춘계학술대회	The usability of morphological evaluation of the vitrified-thawed oocyte before somatic cell nuclear transfer using Oosight imaging system	2012-06-21
50	박민지, 박효영, 한영준, 김은영, 박세필	The 12th international Symposium on Developmental Biotechnology	Application of Oosight imaging system in the monitoring and somatic cell nuclear transfer of vitrified-thawed bovine oocytes	2012-10-25
51	김영훈, 장원호, 김현주, 김창능, 김병학, 김은영, 오창언, 조상래, 최연호, 박세필	.The 12th international Symposium on Developmental Biotechnology	제주흑우 증식을 위한 수정란 이식 기술 적용 연구	2012-10-25

KSAR-75

The Antioxidant Potent of Apple Poly to Support *In Vitro* Produced Bovine Parthenogenetic Embryos

Kyoung Ha So^{1,2}, Jae Youn Kim^{1,2}, Min Joo Park^{1,2}, Hye Young Park^{1,2}, Yoon Ok Kim^{1,2}, Eun Young Kim^{1,2}, Se Pil Park^{1,2,3,4}

¹Mirae Biotech, ²Cheju National University Stem Cell Research Center, ³Cheju National University

The culture of embryos with high concentration oxygen produces free oxygen radicals which have been implicated as major cause of *in vitro* embryo development arrest and cell death. This study was to investigate the effect of phytochemicals Apple poly (AP) as an anti-oxidant on the bovine parthenogenetic embryos development *in vitro*. Bovine parthenogenetic embryos were produced from activation procedure of *in vitro* matured bovine oocytes in 5 μ M ionomycin for 5 min and α -DMAP for 5 h. To optimize the treatment concentration of AP, day 2 (2-cell) embryos were treated with varying concentrations of AP (0.01, 0.05 and 0.1 %) for 6 days. 0.05 % AP treatment group was indicated higher development rates (88.8 %) than any other groups (control, 47.1; 0.025 % AP, 49.7; 0.1 % AP, 50.2 %). Total cell and ICM cell number in 0.05 % AP treatment group was also higher than those in other treatment groups. This result was proved that the cystic blastomere formation in 0.05 % AP group was appeared earlier than that in other groups. TUNEL assay of DNA fragmentation presented that apoptotic index was significantly low in 0.05 % AP treatment group than other groups ($p < 0.05$). The relative expression levels of anti-oxidant (MnSOD), anti-apoptotic (Bcl-2), Bax-inhibitor and growth (In-tau) genes were significantly higher after AP treatment ($p < 0.05$), while oxidant (ROS), apoptotic (Caspase-3, Bax) expression levels were after AP treatment low than control. This result demonstrated that the addition of AP in culture medium can support the better *in vitro* developmental capacity of bovine parthenogenetic embryos.

Key words: apple poly, anti-oxidant, bovine embryo, parthenogenetic

KSAR-72

Pregnancy Rate of *In Vitro* Produced Elite Hanwoo Embryos according to Transport Time Course

Hye Young Park^{1,2}, Eun Young Kim^{1,2}, Jae Youn Kim^{1,2}, Kyoung Ha So^{1,2}, Min Joo Park^{1,2}, Yoon Ok Kim^{1,2}, Young Hui Kim^{1,2}, Seong Ho Min^{1,2}, Chang Eun Cho¹, Hu Jin Hwang¹, Se Pil Park^{1,2,3,4}

¹Mirae Biotech, ²Cheju National University Stem Cell Research Center, ³Jeju Livestock Promotion Center of Jeju Special Self-Governing Province, ⁴Cheju National University

This study was to investigate pregnancy rate of IVM/IVF/IVC elite Hanwoo (registered in government) embryos according to transport time course. For the production of elite embryos, oocytes recovered from slaughtered excellent grade cow and highly fertile frozen-thawed bull semen (purchased from LIMC, KFN# 497) were used. *In vitro* produced embryos were cultured in CR1aa medium for 8 days and some of them were frozen. The rate of cleavage (2-cell) was 83.0% (308/371) and blastocyst rate at day 8 was 34.7% (107/308). Among *in vitro* produced blastocysts at day 8, healthy embryos were freshly transferred on production day and frozen embryos were direct transferred on appropriate day. These IVM/IVF/IVC embryos were produced in Seoul, embryo transfer (ET) was planned in 10 areas of Cheju island by airplane. Thus, we examined the pregnancy rate in recipient cow according to transport time course. From embryo transferred 44 recipient cows, overall pregnancy was 40.9% (18/44), these 18 cows were all calved [single, 94% (17/18); twin, 6% (1/18)] and total embryo implantation rate was 26% (19/66). Comparing transport time in the base of 6 h, pregnancy rate in ET group required less 4 h (62%, 9/15) was significantly higher than that required more 6 h (26.2%, 5/19). In direct ET of freezing embryos, the pregnancy rate was 40% (4/10). However, it was difficult to find the meaning of corpus luteum quality of recipients on comparison of pregnancy rate. When the cell death level of embryos according to storage time in Thermax (straw container) before ET was measured by TUNEL assay, apoptotic index was increased with storage time-dependent. These results demonstrated that long distance transfer of IVM/IVF/IVC embryos is possible and the time of embryo transport is very important for the pregnancy rate on field trial.

Key words: bovine embryo, embryo transfer, transport time, pregnancy

KSAR-71

Flavonoid Treatment Improves the *In Vitro* Developmental Capacity of Bovine Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos

Min Jee Park^{1,2}, Jae Yeon Kim^{1,2}, Kyung Ha So^{1,2}, Hye Young Park^{1,2},
Yoon Ok Kim^{1,2}, Eun Young Kim^{1,2}, Se Pil Park^{1,2,3}

¹Mirae Biotech, ²Cheju National University Stem Cell Research Center,
³Cheju National University

Flavonoid serves as radical scavenger was thought that have beneficial effects on embryonic development *in vitro*. This study was to examine the effect of flavonoid treatment on *in vitro* development of bovine somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos. For the activation, *in vitro* matured or SCNT bovine oocytes were treated in 3 μ M ionomycin for 5 min and 6.0MAP for 3 h. To optimize the flavonoid concentration, when the parthenogenetic day 2 (>4-cell) embryos were treated with varying concentrations of flavonoid (0.5, 1, 10, and 20 μ M) for 6 days, *in vitro* development rate of 10 μ M treatment group was higher (52.1% blastocyst) than that of any other groups (control, 49.5; 0.5 μ M, 46.7; 1 μ M, 54.3; 20 μ M, 37.3%). In differential staining, ICM cell number was significantly higher after 10 μ M flavonoid treatment than control or 20 μ M flavonoid treatment ($p < 0.05$), while total cell was slightly increased after 10 μ M treatment. Also, DNA fragmentation was significantly decreased after 10 μ M flavonoid treatment ($p < 0.05$). The relative abundance of transcripts for internal anti-oxidant (Mn-SOD) gene was significantly higher after flavonoid treatment ($p < 0.05$), while oxidant (NOS) gene expression was lower than control. Transcripts level of anti-apoptotic (Bax inhibitor, Survivin) gene and growth (In-Tau, Cln-5) gene was also significantly high after flavonoid treatment ($p < 0.05$), while apoptotic (caspase-3, Bax) gene expression was low after flavonoid treatment. Thus, when we cultured SCNT *in vitro* embryos in 10 μ M flavonoid, blastocyst production rate (30.7%) was higher than control (26.0%). In addition, cell numbers of total cell and ICM cell (144.3 \pm 13.5, 3016.5 \pm 8) of day 8 SCNT blastocysts produced after 10 μ M flavonoid treatment were significantly higher than those of control (133.6 \pm 3, 3676 \pm 0). These results demonstrated that flavonoid treatment can improve the *in vitro* developmental capacity of bovine SCNT embryos by anti-oxidant and anti-apoptotic effect.

Key words: bovine embryos, flavonoid, anti-oxidant, anti-apoptotic, SCNT

KSAR-66

Effect of Flavonoid Treatment on *In Vitro* Survival of Frozen-thawed Bovine Parthenogenetic Embryos

Jae Yeon Kim^{1,2}, Kyung Ha So^{1,2}, Min Jee Park^{1,2}, Hye Young Park^{1,2},
Yoon Ok Kim^{1,2}, Eun Young Kim^{1,2}, Se Pil Park^{1,2,3}

¹Mirae Biotech, ²Cheju National University Stem Cell Research Center,
³Cheju National University

This study was to investigate the *in vitro* survival of frozen-thawed bovine parthenogenetic embryos according to treatment of flavonoid before freezing and after thawing. *In vitro* produced bovine parthenogenetic day 2 (>2-cell) embryos were treated w/wo 10 μ M flavonoid for 6 days. For freezing, parthenogenetic expanding blastocysts were pretreated in 10% ethylene glycol (EG) (v/v) in D-PBS for 5-10 min, exposed in EG 30 for 30 sec, put on the inner wall of 0.25 ml straw, and then straw was directly plunged into LN₂. Thawing was taken by 5-step procedures, thawed embryos were exposed in 1.0 M sucrose (MS), 0.5 MS, 0.25 MS, 0.125 MS and then D-PBS without sucrose for 1 min in each step. In non-treatment (-) or flavonoid treatment (+) group before freezing, thawed blastocysts were divided into four groups according to the treatment of flavonoid after thawing (+/-, -/-, +/-, +/+). Also, these results were compared with frozen-thawed IVF group. Among the frozen-thawed parthenogenetic embryo groups, irrespective of flavonoid treatment before freezing, *in vitro* survival rate of flavonoid treatment groups after thawing were higher (-/-, 38%; +/-, 40%) than those of non-treatment group (+/-, 42%; +/, 55%) after thawing. However, all of these results were not better than that of frozen-thawed IVF group (55%). TUNEL assay of DNA fragmentation indicated apoptotic indices were also decreased in flavonoid treatment group (+/-, 13.8%; +/-, 13.3%) after thawing compared to non-flavonoid treatment group (+/-, 24.8%; +/-, 25.7%), irrespective of flavonoid treatment before freezing. These results demonstrated that flavonoid addition in culture medium before freezing and after thawing brings beneficial effects on *in vitro* survival of bovine frozen-thawed parthenogenetic embryos and especially flavonoid treatment after thawing mainly affect the *in vitro* survival of them.

Key words: bovine embryo, parthenogenetic, freezing, flavonoid, TUNEL

P 078

***In Vitro* Survival of Vitrified Bovine Parthenogenetic Blastocysts according to Treatment of Flavonoid before Freezing and after Thawing**

Jae Yeon Kim^{1,2}, Kyung Ha So^{1,2}, Min Jee Park^{1,2}, Hye Young Park^{1,2},
Yoon Ok Kim^{1,2}, Kilsoo Jeon^{1,2}, Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2,3}

¹Mirae Biotech, ²Cheju National University Stem Cell Research Center,
³Cheju National University

The objective of this study was to investigate *in vitro* survival of vitrified bovine parthenogenetic blastocysts according to treatment of flavonoid before freezing and after thawing.

In vitro produced parthenogenetic day 2 (2-cell) bovine embryos were treated with 10 μ M flavonoid (3,4-dihydroxyflavone) for 6 days. For freezing, *in vitro* produced parthenogenetic day 7 or 8 expanding blastocysts were pretreated in 10% ethylene glycol (EG) (v/v) in D-PBS for 5-10 min, exposed in EG 30 for 30 sec, individually put on the inner wall of 0.25 ml straw, and then straw was directly plunged into LN₂. Thawing was taken by 5-step procedures, thawed embryos were exposed in 1.0 M sucrose (MS), 0.5 MS, 0.25 MS, 0.125 MS and then D-PBS without sucrose for 1 min in each step. In non-treatment or flavonoid treatment group before freezing, thawed blastocysts were again divided into two groups according to treatment of flavonoid and they were cultured in co-culture drop for 48 h. The treatment effect was assessed by *in vitro* survival rate, apoptotic index. Embryo survival was assessed as re-expanded and hatching rates at 24 h and 48 h after thawing, respectively. In the result, *in vitro* survival rate of flavonoid treatment group (48%) was higher than that of control group (23%). TUNEL assay of DNA fragmentation indicated apoptotic index in flavonoid treatment group (5.2 \pm 1.0) was lower than that in control group (17.2 \pm 6.1) ($p < 0.05$).

This result indicates that flavonoid addition in culture medium before freezing and after thawing brings beneficial effects on *in vitro* survival of bovine vitrified parthenogenetic embryos and that may effect on *in vitro* survival of bovine nuclear transferred and frozen-thawed embryos.

Key words: Parthenogenetic, bovine embryo, blastocyst, vitrification, freezing, thawing

P 075

Pregnancy Rate of *In Vitro* Produced Korean Cattle Embryos according to Transport Time Course

Hye Young Park^{1,2}, Eun Young Kim^{1,2}, Jae Yeon Kim^{1,2}, Kyung Ha So^{1,2},
Min Jee Park^{1,2}, Yoon Ok Kim^{1,2}, Ki Soo Jeon^{1,2}, Young Hun Kim¹, Seong Ho Mun¹,
Chang Eun Oh¹, Ho Jin Hwang¹ and Se Pil Park^{1,2,3}

¹Mirae Biotech, ²Cheju National University Stem Cell Research Center, ³Jeju Livestock Promotion Center of Jeju Special Self-Governing Province, ⁴Cheju National University

This study was to investigate pregnancy rate of IVM/IVF/IVC site Korean Cattle (registered in government) embryos according to transport time course. For the production of embryos, individual slaughtered ovaries were obtained and then their cumulus-oocyte complexes were recovered and matured *in vitro*. After 22 h, matured oocytes were fertilized using highly motile frozen-thawed bull semen (purchased from LINC, KPM437) and their *in vitro* produced embryos were cultured in CR1aa medium for 6 days. The rate of average cleavage (>2-cell) was 83.0% (308/371) and blastocyst rate at day 6 was 34.7% (107/308). Among *in vitro* produced blastocyst embryos at day 6, most healthy embryos were freshly transferred on production day and some embryos were frozen and direct transferred on appropriate day. These IVM/IVF/IVC embryos were produced in Seoul, embryo transfer (ET) was planned in 10 areas of Cheju island by airplane. Thus, we examined the pregnancy rate in recipient cow according to transport time course. From embryo transferred 44 recipient cows, overall pregnancy was 40.9% (18/44), these 18 cows were all calved (single, 94% (17/18); twin, 6% (1/18)) and total embryo implantation rate was 26% (18/66). Comparing transport time in the base of 6 h, pregnancy rate in ET group required less 4 h (60%, 9/15) was significantly higher than that required more 6 h (26.3%, 5/19). In direct ET of freezing embryos, the pregnancy rate was 40% (4/10). However, it was difficult to find the meaning of corpus luteum quality of recipients on comparison of pregnancy rate. When the cell death level of embryos according to storage time in Thermo (straw container) before ET was measured by TUNEL staining, apoptosis was increased with storage time-dependent. These results demonstrated that long distance transfer of IVM/IVF/IVC embryos is possible and the time of embryo transport is very important for the pregnancy rate on field trial.

Key words: Korean cattle, transport time, pregnancy, apoptosis

P 017

Effect of Flavonoid on *In Vitro* Development and Gene Expression of Bovine Parthenogenetic Embryo

Min Jee Park^{1,2}, Jae Youn Kim^{1,2}, Kyoung Ha So^{1,2}, Hyo Young Park^{1,2},
Yeon Ok Kim^{1,2}, Ki Soo Jeon^{1,2}, Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2,3}
¹Mirae Biotech, ²Cheju National University Stem Cell Research Center,
³Cheju National University

Flavonoid serves as radical scavenger was thought that have beneficial effects in embryonic development *in vitro*. The objective of this study was to examine the effect of flavonoid treatment on *in vitro* development and gene expression of bovine parthenogenetic embryos.

Bovine parthenogenetic embryos were produced from activation procedure of *in vitro* matured bovine oocytes in 5 μ M ionomycin for 5 min and 6-DMAP for 3 h. To optimize the treatment concentration of flavonoid, parthenogenetic day 2 (2-cell) bovine embryos were treated with various concentrations of flavonoid (0.5, 1, 10, and 20 μ M) for 6 days. When the effect of flavonoid treatment on *in vitro* development of parthenogenetic embryos was examined, the result of 10 μ M treatment group was higher (70.0%) than control groups (68.8%) ($p < 0.05$). When total cell numbers of treatment groups were compared, the result of 1 μ M flavonoid treatment group (178.43 \pm 38.9) was higher than that of control group (145.4 \pm 10.2). Also, the higher cell number of inner cell mass was obtained in 10 μ M flavonoid treatment group (47.8 \pm 7.8) compared to control group (26.4 \pm 3.2) ($p < 0.05$). The relative abundance of transcripts for internal anti-oxidant Mn-SOD gene was higher for embryos cultured in flavonoid treatment group, while internal oxidant SOX gene expression was lower than control group. And transcripts level of anti-apoptotic gene BAX inhibitor was also significantly high in the flavonoid treatment group.

This result indicated that flavonoid treatment supports for the *in vitro* developmental capacity of bovine parthenogenetic embryos and thus flavonoid may be a good radical scavenger of poor *in vitro* culture environment for the nuclear transfer embryos.

Key words: parthenogenetic bovine embryo, anti-oxidant, real-time PCR.

P 016

Apple Poly is a High-Potency Strong Antioxidant to Support *In Vitro* Produced Bovine Parthenogenetic Embryos

Kyoung Ha So^{1,2}, Jae Youn Kim^{1,2}, Min Jee Park^{1,2}, Hyo Young Park^{1,2},
Yeon Ok Kim^{1,2}, Kisoo Jeon^{1,2}, Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2,3}
¹Mirae Biotech, ²Cheju National University Stem Cell Research Center,
³Cheju National University

The culture of embryos with a high concentration oxygen produces free oxygen radicals which have been implicated as major causes of *in vitro* embryo development arrest and cell death. Apple Polyphenols (Apple poly) are phytochemicals concentrated in the skin of unripe apples which contain procyanidins as the major ingredients and are known to anti-oxidant chemical. This study was to investigate the effect of Apple poly as an anti-oxidants on the bovine parthenogenetic embryo development *in vitro*.

Bovine parthenogenetic embryos were produced from activation procedure of *in vitro* matured bovine oocytes in 5 μ M ionomycin for 5 min and 6-DMAP for 3 h. To optimize the treatment concentration of Apple poly, *in vitro* produced day 2 (2-cell) bovine parthenogenetic embryos were treated with various concentrations of Apple poly (0.01, 0.05 and 0.1%) for 8 days. The treatment effect was analyzed by blastocyst development rate, total cell/inner cell mass cell number and apoptotic index. In Apple poly test, 0.05 % treatment group was indicated higher development rates (89.2%) than control group (50.0%). When the effects of Apple poly treatment on the cell numbers of *in vitro* produced parthenogenetic blastocysts were compared, total cell number in 0.05% Apple poly treatment group (154.8 \pm 14.0) was significantly higher than that in control group (116.4 \pm 18.0) ($p < 0.05$). TUNEL assay of DNA fragmentation indicated that apoptotic index was low in Apple poly treatment group than control group.

This result indicated that addition of Apple poly in culture medium supports the *in vitro* developmental capacity of bovine parthenogenetic embryos and that may be a good radical scavenger of poor *in vitro* culture environment for the nuclear transfer embryos.

Key words | Apple poly, anti-oxidant, bovine embryo, parthenogenetic

IN VITRO DEVELOPMENT OF BOVINE SOMATIC CELL NUCLEAR TRANSFER EMBRYOS TREATED WITH FLAVONOID

Cheol Tae JIN¹, Eun Young KIM², Nam Hyung KIM¹, Se Pil PARK^{1,2,3}
¹Changbuk National University, ²Mirae Biotech/ Cheju National University Stem Cell
Research Center, ³Cheju National University
E-mail: sppark@cheju.ac.kr

The success of somatic cell cloning gives promise to applications such as species preservation, cell therapy and production of somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryonic stem cells. To improve the *in vitro* developmental capacity of SCNT bovine embryos, flavonoid additive effect as a radical scavenger in culture medium was examined. To optimize the treatment concentration of flavonoid, parthenogenetic day 2 (\geq 2~4 cell) bovine embryos were treated with various concentrations of flavonoids (3,4-dihydroxyflavone; 1, 10 and 100 μ M) for 6 days. Also, the 10 μ M flavonoid addition effect was examined on *in vitro* development of SCNT day 2 (\geq 2~4 cell) bovine embryos. The treatment effect was assessed by *in vitro* blastocyst development rate. In comparison with the absence of flavonoid, treatment with flavonoid at a concentration of 10 μ M showed a significant increase for the blastocyst formation in the parthenogenetic embryos (control, 27.4%; 1 μ M F, 32.7; 10 μ M F, 38.9 and 100 μ M F, 32.7%; $p < 0.05$). Also, the supplementation of 10 μ M flavonoid (30.7%) during *in vitro* culture gives positive effect on blastocyst formation of SCNT embryos compared to control (26.1%). This result suggests that flavonoid addition in culture medium brings beneficial effects on subsequent embryo development of bovine SCNT embryos.

Key words: bovine embryo, Flavonoid, Somatic cell nuclear transfer (SCNT)

P 011

In Vitro Fertilization with Flow-Cytometrically-Sorted Jeju Black Cattle Sperm

Eun Young Kim^{1,2}, Jae Youn Kim^{1,2}, Min Jee Park^{1,2,3}, Kyoung Ha So^{1,2,3}, Hyo Young
Park^{1,2}, Eun Hyung Noh^{1,3}, Eun Ji Noh^{1,2} and Se Pil Park^{1,2,3}
¹Mirae Biotech, ²Cheju National University Stem Cell Research Center,
³Cheju National University

Sperm-sorting by flow cytometry separates X-sperm from Y-sperm offers the potential productivity by producing the desired sex. This study was to examine whether the sexed sperm has fertility for the bovine *in vitro* matured oocytes and they can be developed into blastocyst *in vitro*. Ejaculated Jeju black cattle raw semen (BX00351) was diluted into appropriate concentration using working solution, stained with Hoechst 33342 for 1 hr, and then sex-sorted in flow cytometer. Separation and recovery rate of X-sperm and Y-sperm was mean 1,400-1,500/sec. and sexed sperm collected for 10 hrs was used for IVF. Bovine oocytes were recovered from slaughtered bovine ovary and matured in TCM-199 supplemented with 10% FBS. For the IVF, highly motile sperm was recovered individually from the one day before prepared raw semen or sexed sperm (X-, Y-) by swim-up method with our newly designed sperm preparation solution (SPS). And then raw semen or sexed sperm was individually inseminated in fertilization media drop containing 10 oocytes with 1-2 \times 10⁶ cells/ml, and 2 μ l heparin and 2 μ l PHE (20 μ M penicillamine, 10 μ M hypotaurine, 2 μ M epinephrine) were added. At two days after IVF, the cleaved rates (2-cell) in raw semen, X-sperm and Y-sperm groups were indicated 91.4, 82.4, and 80.0%, respectively. Also, at 8 days after IVF, the blastocysts development rates in raw semen, X-sperm and Y-sperm groups were presented into 31.1, 42.0 and 95.0% against fertilized embryos, respectively. Especially, it was interesting that sex-sorted Y-sperm presented high fertility resulted in better development rate and faster development speed in bovine IVF system. These results indicated that sexed sperm can maintain their fertility by our designed sperm preparation method, even after total procedures including sexing by flow cytometry, storage for 1 day, recovery of motile sperm and insemination.

Key words | bovine sperm, sexing, flow cytometer, IVF

P 012

The Usability of Embryonic Stem Cell Derived Bioactive Material as an Supplement on *In Vitro* Culture of Bovine Embryos

Jae Youn Kim^{1,2}, Min Jee Park^{1,2,3}, Kyoung Ha So^{1,2,3}, Hyo Young Park^{1,2}, Eun Hyung Noh^{1,2}, Eun Ji Noh^{1,2}, Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2,3}
¹Mirae Biotech, ²Cheju National University Stem Cell Research Center, ³Cheju National University

In vitro embryonic stem cell derived bioactive material (hES-BM) has been expected that there were various bioactive materials useful for embryo culture. This study was to examine the usability of human embryonic stem cell derived bioactive material (hES-BM) as a supplement on *in vitro* culture of bovine embryos. In Exp. 1, *in vitro* produced parthenogenetic day 2 (2-cell) bovine embryos were cultured with 10% hES-BM in CR1aa medium for 6 days. In the result, *in vitro* development rate (47%) of hES-BM group was significantly higher than that of control group (7%) and also total cell and ICM cell numbers in hES-BM group were significantly higher than those of control group ($p < 0.05$). In Exp. 2, the treatment effect of various concentration (0, 5, 10 and 15%) of hES-BM on day 4 (2-cell) embryos was examined after culture for 4 days. 10% hES-BM group presented significantly higher blastocysts development rates (63%) than any other groups (0% 5%, 5%, 47%, 15%, 50%) ($p < 0.05$). In Exp. 3, using day 4 embryos, *in vitro* development rate of 10% hES-BM treatment group was compared with that of 10% FBS treatment group. After culture for 4 days, there was not different between two groups. However, it has been shown that embryo growth speed was faster in 10% FBS group than 10% hES-BM group. Also, when the relative gene expression was compared *in vitro* produced day 6 blastocysts recovered from 10% hES-BM group and 10% FBS group, respectively, it was very interesting that the relative abundances of Oct4 (pluripotency, x1.8), Nanog (pluripotency, x3.3), Stat3 (cavitator, x2.8), E-cad (morphogenesis and biogenesis of trophoderm, x2.0), Glut5 (growth, x2.0), FGF4 (implantation, x18.8) genes were significantly higher in 10% hES-BM group than those in 10% FBS group ($p < 0.05$), while those of other genes (Bax, Bcl2, MnSOD and Connexin43) were not different between two groups. This result demonstrated that the hES-BM can be able to use for bovine embryo culture as an alternative to serum by supporting internal gene expression useful for improvement of embryo quality.

Key words) Bovine, parthenogenetic embryo, hES-BM, Blastocyst, gene expression

P 013

A Novel Method for Improvement of Bovine *In Vitro* Fertilization System

Eun Ji Noh^{1,2}, Min Jee Park^{1,2,3}, Jae Youn Kim^{1,2}, Eun Hyung Noh^{1,2}, Hyo Young Park^{1,2}, Kyoung Ha So^{1,2,3}, Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2,3}
¹Mirae Biotech, ²Cheju National University Stem Cell Research Center, ³Cheju National University

Generally, swim-up or percoll gradient methods were used for sperm preparation of *in vitro* fertilization (IVF). Sperm preparation method affects on fertility and embryo developmental rates. However the percoll gradient method is usually used for sperm preparation, but it has known that percoll is toxic. This study was to compare the effect of percoll gradient method or our newly developed method on bull sperm preparation, sperm fertility and embryo development. *In vitro* fertilization (IVF) was performed on bovine oocytes harvested by follicles aspiration from slaughtered ovary. Oocyte maturation was done in a 5% CO₂ in air using TCM199 maturation medium for 22-24 hrs. In percoll gradient method, frozen-thawed sperm was loaded onto percoll gradient (45%/90%), centrifuged at 2,000 rpm for 15 min., and then collected sperm pellet was counted. In another novel method, frozen-thawed sperm was washed once with our designed sperm preparation solution (SPS) by centrifugation, incubation in SPS for 30 min, and pellet was swim-up using SP-TALP for 30 min, and then collected sperm was counted (SPS plus swim-up method). After preparation, two groups of sperm was individually inseminated in fertilization media drop containing 10 oocytes with $1-2 \times 10^6$ cells/ml, and 2 μ l heparin and 2 μ l PHE(20 μ M pericollamine, 10 μ M hypotaurine, 2 μ M epinephrine) were added. After 2 days, the fertilization rates were significantly different, the result of SPS plus swim-up method was better (84%) than that of percoll method (70%) using the same bull sperm ($p < 0.05$). In addition, When the effect of sperm preparation method on the pronucleus (PN) formation after insemination was examined, at 18-20 h after IVF, 2PN formation in SPS plus swim-up method was higher (68.7%) than percoll method (55.8%), while polyspermy rates were similar in both groups. *In vitro* blastocyst development rate was also high in SPS plus swim-up method (42%) than percoll (25%) ($p < 0.05$). This result demonstrated that a novel sperm preparation method is very efficient to support sperm quality, fertilization and PN formation and *in vitro* embryo development rates than percoll gradient method.

Key words) Bovine, sperm preparation, percoll, swim-up, *in vitro* fertilization

P 014

Flavonoid Effect on *In Vitro* Development of Bovine Embryos with Five or Twenty Percent Oxygen

Eun Hyung Noh^{1,2}, Jae Youn Kim^{1,2}, Min Jee Park^{1,2,3}, Eun Ji Noh^{1,2}, Kyoung Ha So^{1,2,3}, Hyo Young Park^{1,2}, Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2,3}
¹Mirae Biotech, ²Cheju National University Stem Cell Research Center, ³Cheju National University

In vitro environments usually increase production of ROS, which has been implicated as a main cause of cell damage. Flavonoid that serves as radical scavenger was thought that have beneficial effects on embryonic development *in vitro*. The objective of this study was to examine the effect of flavonoid treatment on *in vitro* bovine embryo development with five (low O₂) or twenty (high O₂) percent oxygen environment. Bovine oocytes or parthenogenetic day 2 (2-cell) embryos were cultured in two different oxygen environment (five or twenty percent) or/and flavonoid treatment (10 μ M). Bovine parthenogenetic embryos were produced from activation procedure of *in vitro* matured bovine oocytes in 5 μ M ionomycin for 5 min and 6-DMAP for 3 h. In exp. 1, day 2 embryos prepared from high O₂ condition were equally redistributed into high and low O₂ condition and their *in vitro* development rates were examined after 6 days. The results of low O₂ group (45-55%) were higher than those of high O₂ group (30-40%), irrespective of flavonoid treatment ($p < 0.05$). In exp. 2, from the maturation stage, bovine oocytes were cultured in different oxygen conditions, and their parthenogenetic embryos were cultured in each oxygen percent condition. When the *in vitro* development rates of low and high percent oxygen group were examined, their results were 50-65% and 30-45%, respectively ($p < 0.05$). In addition, 10 μ M flavonoid addition presented better effect in each oxygen group. Therefore, this result indicated that five percent oxygen environment with flavonoid treatment supports for the better *in vitro* developmental capacity of bovine embryos.

Key words) Bovine, parthenogenetic, oxygen percent, flavonoid, blastocyst

P 015

Analysis of Embryonic Stem Cells Derived Bioactive Material and Their Effect on Skin Fibroblast

Min Jee Park^{1,2,3}, Jae Youn Kim^{1,2}, Hyo Young Park^{1,2}, Kyoung Ha So^{1,2,3}, Eun Hyung Noh^{1,2}, Eun Ji Noh^{1,2}, Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2,3}
¹Mirae Biotech, ²Cheju National University Stem Cell Research Center, ³Cheju National University

Embryonic stem (ES) cells are pluripotent cells derived from the preimplantation embryo and therefore, able to differentiate into numerous cell types useful for cell replacement therapy. This study was to analyse the component of human embryonic stem cells derived bioactive material (hES-BM) and examine the effect of hES-BM treatment on the growth of human skin fibroblast (hSF). The hES-BM was prepared two types, from undifferentiated hES cells (U-hES-BM) and differentiated hES cells (D-hES-BM). For the experiment, hSF cells were cultured in 0.1% FBS-added DMEM (basic medium), and tested with various concentration (0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30%) of U-hES-BM or D-hES-BM for 24h. The effect was examined by cell growth (CCK-8), growth factor or protein expression (ELISA, RT-PCR), and Amino acid content assay. In cell growth analysis using CCK-8 kit, plated hSF cells (2-4 x 10000 cells/96 mm dish) were treated with two U-hES-BM or D-hES-BM, respectively, the growth effect was appeared in 10% or more concentration of both treatment groups. When we examined growth factor (GF) or protein (hFGF, hVEFG, hKGF and collagen) secretion after treatment of two types of hES-BM on hSF cells using ELISA kit, the expression levels were increased with dose-dependent on treatment concentration, respectively. However, between two types of hES-BM, the protein or GF contents of D-hES-BM groups were higher value than those of U-hES-BM groups. In RT-PCR, the expression level of collagen I and collagen III was also increased with treatment concentration, while MMP-1 expression was decreased. In addition, we confirmed that in D-hES-BM free amino acid content was decreased than control medium while total amino acid content was increased. In conclusion, it is considered that hES-BM has various and useful ingredients derived from stem cell culture environment, and that has shown positive effect on cell proliferation by inducing protein or growth factor expression.

Key words) hES-BM, hSF, cell growth, ELISA, amino acid

In Vitro Differentiation of Mouse Induced Pluripotent Stem (miPS) Cells into Endothelial Cells

Hyo Young Park^{1,2}, Kyoung Ha So^{1,2,3}, Jae Youn Kim^{1,2}, Min Jee Park^{1,2,3}, Eun Hyung Noh^{1,2}, Eun Ji Noh^{1,2}, Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2,3}
¹Mirae Biotech, ²Cheju National University Stem Cell Research Center, ³Cheju National University

Induced pluripotent stem cells can be differentiated into any cellular types in the body. Endothelial cells are great interest because of their potential in cell therapy for vascular diseases and ischemic tissue. Tissue engineering for vascular grafts. This study was to define the differentiation trait of our established miPS cells into endothelial cells. miPS cells were prepared from the lentiviral transfection of four transcription factors (Oct4, Sox2, Klf4, and C-myc) and grown on mitotically inactivated STO feeder layer in high glucose DMEM medium contained 20% FBS and 103 units/ml of LIF. For the endothelial differentiation, miPS colonies were suspension cultured to form embryoid bodies (EBs) for 5 days and EBs were plated on gelatin-coated plates in endothelial growth medium-2 for 7 days. When the endothelial differentiation was compared between miPS cell and D3 mouse embryonic stem (mES) cell, in RT-PCR, Flk-1 was expressed from the EB and PECAM-1 was expressed at attached EB stage, respectively, however the specific genes were high expressed in miPS cells than mES cells. In attached EB stage, there were two type of cells in center and outer part, the center part cells were positively immunostained with endothelial specific Flk-1 and Tie2 markers, while the outer part cells were not. And, the result was proved by RT-PCR, using Flk-1, PECAM and Tie-2 markers. Thus, mechanically separated center part cells were dissociated, stained with Flk-1 marker and then sorted using flow cytometer. FACS analysis indicated that the percent of Flk-1 positive cells among the center part cells was 5%, this result was similar to mES cells. In addition, we confirmed the ability of acetylated-LDL uptake of isolated Flk-1 positive cells, which is specific functional characteristics of endothelial cells. Although further studies are required to understand fully the function of differentiated miPS cells on *in vivo*, these results demonstrate that miPS cells can be differentiated into endothelial cells and be used to study mechanisms involved in angioblast differentiation, endothelial cell-cell adhesion and vascular morphogenesis.

Key words: miPS cell, mES cell, differentiation, endothelial cells, LDL-uptake

Characterization of Cardiac Cells Derived from Mouse Induced Pluripotent Stem (miPS) Cells

Kyoung Ha So^{1,2,3}, Hyo Young Park^{1,2}, Jae Youn Kim^{1,2}, Min Jee Park^{1,2,3}, Eun Hyung Noh^{1,2}, Eun Ji Noh^{1,2}, Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2,3}
¹Mirae Biotech, ²Cheju National University Stem Cell Research Center, ³Cheju National University

The stem cell research plays a role in the new method of cell therapy such as cardiovascular disease. This study was to examine whether the differentiated cardiac cells derived from miPS cells were functional and has similar differentiation character compared to control D3 mouse embryonic stem (mES) cells. Our established miPS cells were prepared from the lentiviral transfection of four transcription factors (Oct4, Sox2, Klf4, and C-myc) and grown on mitotically inactivated STO feeder layer in high glucose DMEM medium contained 20% FBS and 103 units/ml of LIF. For the cardiac differentiation, mES or miPS colonies were suspension cultured to form embryoid bodies (EBs) for 8 days, and then EBs were plated on 0.1% gelatin coated dish and cultured until 20 days. In miPS cells, cardiac specific contracting cell masses were appeared from 10 days after differentiation. The accumulation rate of contracting masses against the plating EBs was 45% at 20 days after differentiation. This result was not different from that of D3 ES cells. And the beating mass or single cardiomyocytes derived from miPS were positively immunostained with cardiac specific marker such as Sarcomeric actin, Troponin I, and Myosin heavy chain. In RT-PCR analysis, cardiac cells derived from miPS were expressed cardiac specific gene similar to mouse heart cells, such as L-type calcium channel α , cardiac muscle heavy polypeptide 7 β , cardiac MHC α , atrial natriuretic factor, GATA binding protein 4. Also, when the differentiation characteristics were defined in various time, Ncc2.5 was expressed from the EBs to early cardiac stage, and other genes (Mesoderm posterior factor 1, Connexin 40, Troponin I, Troponin T and Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 2) were expressed in middle and different stage. Finally, we confirmed the presence of calcium ion, sodium ion and potassium ion channels in single contracting cells derived from miPS cells using electrophysiology. These results indicated that miPS cells can be differentiated into functional cardiomyocytes similar to control mES cells.

Key words: mES cell, miPS cell, cardiac, differentiation, electrophysiology

A New Method for Improving Bovine Embryo Developmental Capacity

Eun Ji Noh^{1,2}, Min Jee Park^{1,2,3}, Jae Youn Kim^{1,2}, Eun Hyung Noh^{1,2}, Hyo Young Park^{1,2}, Kyoung Ha So^{1,2,3}, Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2,3}
¹Jeju National University, ²Jeju National University Stem Cell Research Center, ³Mirae Biotech

In vitro fertilization (IVF) is an important biotechnology for improving and expanding donor cows of high genetic merits. Generally, swim-up or Percoll gradient methods were used for sperm preparation of IVF, the Percoll gradient method is commonly used for sperm preparation, but it has known that Percoll component is toxic. This study was to compare the effect of Percoll gradient method or our newly developed method on bull sperm preparation, sperm fertility and embryo development. *In vitro* fertilization (IVF) was performed on bovine oocytes harvested by follicles aspiration from slaughtered ovary. Oocyte maturation was done in a 5% CO₂ in air using TCM199 maturation medium for 22–24 hrs. In Percoll gradient method, frozen-thawed sperm was loaded onto Percoll gradient (45%/50%), centrifuged at 2,000 rpm for 15 min., and then collected sperm pellet was counted. In another novel method, frozen-thawed sperm was washed once with our designed sperm separation solution (SPS) by centrifugation, incubation in SPS for 30 min, and pellet was swim-up using SP-TALP for 30 min, and then collected sperm was counted (SPS plus swim-up method). After preparation, two groups of sperm were individually inseminated in fertilization media drop containing 10 oocytes with 1–2 × 10⁶ cells/ml, and 2 μ l heparin and 2 μ l PHE(20 μ M penicillamine, 10 μ M hypotaurine, 2 μ M epinephrine) were added. After 2 days, the fertilization rates were significantly different, the result of SPS plus swim-up method was better (84%) than that of Percoll method (70%) using the same bull sperm ($p < 0.05$). In addition, when the effect of sperm preparation method on the pronucleus (PN) formation after insemination was examined, at 18–20 hrs after IVF, 2PN formation in SPS plus swim-up method was higher (66.7%) than Percoll method (55.8%), while polyspermy rates were similar in both groups. *In vitro* blastocyst development rate was also higher in SPS plus swim-up method (42%) than in Percoll (25%) ($p < 0.05$). This result demonstrated that a novel sperm preparation method is more efficient to support sperm quality, fertilization and PN formation and *in vitro* embryo development rates than Percoll gradient method.

Key words: bovine, sperm preparation, Percoll, swim-up, *in vitro* fertilization

Low Oxygen Environment with Flavonoid Treatment Supports for the Better *In Vitro* Developmental Capacity of Bovine Embryos

Eun Hyung Noh^{1,2}, Jae Youn Kim^{1,2}, Min Jee Park^{1,2,3}, Eun Ji Noh^{1,2}, Kyoung Ha So^{1,2,3}, Hyo Young Park^{1,2}, Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2,3}
¹Jeju National University, ²Jeju National University Stem Cell Research Center, ³Mirae Biotech

For *in vitro* culture of mammalian embryos, an environment consisting of 5% CO₂ and 95% air has been widely used. In this state, oxygen concentration is estimated approximately 20% before and after. Thus, *in vitro* environments usually increase production of ROS (radical oxygen scavenger), which has been implicated as a main cause of cell damage. Flavonoid that serves as radical scavenger was thought that have beneficial effects on embryonic development *in vitro*. The objective of this study was to examine the effect of flavonoid treatment on *in vitro* bovine embryo development with five (low O₂) or twenty (high O₂) percent oxygen environment. Bovine oocytes or parthenogenetic day 2 (2-cell) embryos were cultured in two different oxygen environment (five or twenty percent) and flavonoid treatment (10 μ M). Bovine parthenogenetic embryos were produced from activation procedure of *in vitro* matured bovine oocytes in 5 μ M ionomycin for 5 min and 8-DMAP for 3 h. In exp. 1, day 2 embryos prepared from high O₂ condition were equally redistributed into high and low O₂ condition and their *in vitro* development rates were examined after 6 days. The results of low O₂ group (45–55%) were higher than those of high O₂ group (30–40%), irrespective of flavonoid treatment ($p < 0.05$). In exp. 2, from the maturation stage, bovine oocytes were cultured in different oxygen conditions, and their parthenogenetic embryos were cultured in each oxygen percent condition. When the *in vitro* development rates of low and high percent oxygen group were examined, their results were 50–66% and 30–45%, respectively ($p < 0.05$). In addition, 10 μ M flavonoid addition presented better effect in each oxygen group. Therefore, this result indicated that five percent oxygen environment with flavonoid treatment supports for the better *in vitro* developmental capacity of bovine embryos.

Key words: bovine, parthenogenetic, oxygen percent, flavonoid, blastocyst

P-024

Production of Cloned Jeju Black Cattle by Somatic Cell Nuclear Transfer and Flavonoid Treatment

Jee Youn Kim^{1,2}, Kyoung Ha So^{1,2,3}, Min-Jee Park^{1,2,3}, Hyo Young Park^{1,2}, Eun Myoung Nah^{1,2}, Eun Ji Noh^{1,2}, Seong Ho Mun¹, Young roon Kim¹, Sung Soo Lee¹, Moon Suk Ko¹, Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2,3}
¹Jeju National University Stem Cell Research Center, ²Jeju National University, ³Mirae Biotech, ⁴Jeju Special Self-Governing Province Institute for Livestock Promotion, ⁵National Institute of Subtropical Agriculture

In recent years, somatic cell nuclear transfer (SCNT) techniques are commonly used for the restoration and propagation of valuable genetic lines, and the preservation of endangered species. Jeju Black Cattle is one of the Korean Native Cattle, there are a few numbers only in Jeju island and thus it needs to be preserved.

To produce the cloned Jeju Black Cattle, ranking number 1 bull somatic cells were transferred into enucleated bovine MI oocytes and cleaved reconstructed embryos were cultured in two groups, w/evo the anti-oxidant 10 µM flavonoid treatment environment, *in vitro* produced day 7 or 8 SCNT blastocysts were transferred into a number of recipients and then confirmed the pregnancy rates and the percent of live births in each group. After parturition, we carried the STR (short tandem repeat) marker analysis of these samples (donor cell, live births' tissue and surrogate mothers' tissue) relating on each cloned calf. In the result, 10 µM flavonoid treatment group was indicated higher pregnancy rate (10.2%, 6/59) than control group (5.9%, 2/34) ($p < 0.05$). Also, in 10 µM flavonoid treatment group, two cloned calves of Jeju Black Cattle were born (Mar. 11, 2009 and Sep. 06, 2009) and both of them were all healthy at present, while the one cloned calf born in control group was dead one month after birth. In addition, the result of STR marker analysis of each cloned calf was indicated microsatellite loci of 11 number and was agreed genotype between donor cell and cloned calf tissue, while surrogate mother tissue was different. However, we preserved two species cloned male in Jeju Black Cattles, old aged but a valuable genetic ranking No. 1 bull (BK01-10) and a valuable one but previously dead bull in last year (SK94-13). This result indicates that flavonoid addition in culture medium may have beneficial effects on *in vitro* and *in vivo* developmental capacity of SCNT embryos and pregnancy rate.

Key words) bovine embryo, cloning, Jeju black cattle, SCNT, flavonoid

P-026

Composition of Embryonic Stem Cells Derived Bioactive Material Effects on Skin Fibroblast Proliferation

Min Jee Park^{1,2,3}, Jee Youn Kim^{1,2}, Hyo Young Park^{1,2}, Kyoung Ha So^{1,2,3}, Eun Myung Nah^{1,2}, Eun Ji Noh^{1,2}, Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2,3}
¹Mirae Biotech, ²Jeju National University Stem Cell Research Center, ³Jeju National University

Embryonic stem (ES) cells are pluripotent cells derived from the preimplantation embryo and therefore, able to differentiate into numerous cell types useful for cell replacement therapy. This study was to analyse the component of human embryonic stem cells derived bioactive material (hES-BM) and examine the effect of hES-BM treatment on the growth of human skin fibroblast (HSF). The hES-BM was prepared two types, from undifferentiated hES cells (U-hES-BM) and differentiated hES cells (D-hES-BM). For the experiment, NSF cells were cultured in 0.1% FBS added DMEM (basic medium), and tested with various concentration (0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30%) of U-hES-BM or D-hES-BM for 24 h. The effect was examined by cell growth (CCK-8), growth factor or protein expression (ELISA, RT-PCR), and Amino acid content assay. In cell growth analysis using CCK-8 kit, plated HSF cells ($2 \sim 4 \times 10,000$ cells/30 mm dish) were treated with two U-hES-BM or D-hES-BM, respectively, the growth effect was appeared in 10% or more concentration of both treatment groups. When we examined growth factor (GF) or protein (hFGF, hVEFG, hKGF and collagen) secretion after treatment of two types of hES-BM on NSF cells using ELISA kit, the expression levels were increased with dose-dependent on treatment concentration, respectively. In RT-PCR, the expression level of collagen I and collagen III was also increased with treatment concentration, while MMP-1 expression was decreased. In addition, we confirmed that free amino in D-hES-BM acid content was decreased lower than that in control medium while total amino acid content was increased. In conclusion, it is considered that hES-BM has various and useful ingredients derived from stem cell culture environment, and that has shown positive effect on cell proliferation by inducing protein or growth factor expression.

Key words) hES-BM, HSF, cell growth, ELISA, amino acid

P-045

Characterization of *In Vitro* Differentiated Endothelial Cells Derived from Mouse Induced Pluripotent Stem Cells (miPS)

Hyo Young Park^{1,2}, Eun Myung Nah^{1,2}, Kyoung Ha So^{1,2,3}, Min Jee Park^{1,2,3}, Jee Youn Kim^{1,2}, Eun Ji Noh^{1,2}, Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2,3}
¹Jeju National University Stem Cell Research Center, ²Jeju National University, ³Mirae Biotech

Induced pluripotent stem cells are generated from somatic cells by ectopic expression of four transcription factors and can be differentiated into any cellular types in the body. Endothelial cells are great interest because of their potential in cell therapy for vascular diseases and ischemic tissue, tissue engineering for vascular grafts. This study was to define the differentiation trait of our established miPS cells into endothelial cells. miPS cells were prepared from the lentiviral transfection of four transcription factors (Oct4, Sox2, Klf4, and C-myc) and grown on mitotically inactivated STO feeder layer in high glucose DMEM medium contained 20% FBS and 100 units/ml of LIF. For the endothelial differentiation, miPS colonies were suspension cultured to form embryoid bodies (EBs) for 5 days and EBs were plated on gelatin-coated plates in endothelial growth medium-2 for 7 days. When the endothelial differentiation was compared between miPS cell and D3 mouse embryonic stem (mES) cell, *in RT-PCR*, Fli-1 was expressed from the EB and PECAM-1 was expressed at attached EB stage, respectively, however the specific genes were higher expressed in miPS cells than in mES cells. In attached EB stage, there were two type of cells in center and outer part, the center part cells were positively immunostained with endothelial specific Fli-1 and Tie2 markers, while the outer part cells were not. And, this result was proved by RT-PCR, using Fli-1, PECAM and Tie-2 markers. Thus, mechanically separated center part cells were dissociated, stained with Fli-1 marker and then sorted using flow cytometer. FACS analysis indicated that the percent of Fli-1 positive cells among the center part cells was 5%, this result was similar to mES cells. In addition, we confirmed the ability of acetylated-LDL uptake of isolated Fli-1 positive cells, which is specific functional characteristics of endothelial cells. These results demonstrate that miPS cells can be differentiated into endothelial cells and be used to study mechanisms involved in angioblast differentiation, endothelial cell-cell adhesion and vascular morphogenesis.

Key words) miPS cell, mES cell, differentiator, endothelial cells, LDL uptake

P-049

In Vitro Differentiated Functional Cardiomyocytes Derived from Mouse Induced Pluripotent Stem (miPS) Cells

Kyoung Ha So^{1,2,3}, Hyo Young Park^{1,2}, Jee Youn Kim^{1,2}, Min Jee Park^{1,2,3}, Eun Myung Nah^{1,2}, Eun Ji Noh^{1,2}, Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2,3}
¹Mirae Biotech, ²Jeju National University Stem Cell Research Center, ³Jeju National University

In cell therapy, stem cell research plays a role in the new method like cardiovascular diseases. This study was to examine whether the differentiated cardiac cells derived from miPS cells were functional and have similar differentiation characteristics compared to control D3 mouse embryonic stem cells (mES). Our established miPS cells were prepared from the lentiviral transfection of four transcription factors (Oct4, Sox2, Klf4, and C-myc) and grown on mitotically inactivated STO feeder layer in high glucose DMEM medium contained 20% FBS and 100 units/ml of LIF. For the cardiac differentiation, mES or miPS colonies were suspension cultured to embryoid bodies (EBs) for 8 days, and then cyclic EBs were plated on 0.1 % gelatin coated dish and cultured until 20 days. In miPS cardiac masses, specific contracting was appeared from 10 days after differentiation. On plating EBs, the accumulation rate of contracting masses was 45 % at 20 days after differentiation. This result was not different from that of D3 mES cells. And the beating masses or single cardiomyocytes derived from miPS were positively immunostained with cardiac specific markers such as Sarcomeric actin, Troponin I, and Myosin heavy chain. In RT-PCR analysis, miPS cardiac cells were expressed to cardiac specific gene and similar to mouse heart cells, such as L-type calcium channel- α , cardiac muscle heavy polypeptide 7B, cardiac MHC α , atrial natriuretic factor, GATA binding protein 4. Also, when the differentiation characteristics were defined in various time, *Nes2.5* was expressed from the EBs to early cardiac stage, and other genes (Mesoderm posterior factor 1, Connexin 40, Troponin I, Troponin T and Hairy/enhancer-of-4pili related with YRPW motif 2) were expressed in middle and differentiation stage. Finally, single miPS contracting cells were confirmed the presence of calcium ion, sodium ion and potassium ion channels using electrophysiology. These results indicated that miPS cells can be differentiated into functional cardiomyocytes and this similar to control D3 mES cells.

Key words) mES cell, miPS cell, cardiac differentiation, electrophysiology

P 013

3,4-Dihydroxyflavone Acts as an Antioxidant and Antipapoptotic Agent to Support Bovine Embryo Development *In Vitro*

Eun Young Kim^{1,2}, Byoung Chul Yang³, Sung Soo Lee⁴, Moon Suk Ko⁵,
Key Jung Ryu⁶ and Se Pil Park^{1,2*}
¹Mirae Biotech, ²Jeju National University Stem Cell Research Center
³National Institute of Animal Science, ⁴National Institute of Subtropical Agriculture,
⁵Jeju National University

The effects of two antioxidants, superoxide dismutase (SOD) and the flavonoid 3,4-dihydroxyflavone (DHF) on bovine embryo development *in vitro* were examined. Blastocyst development, total cell and inner cell mass (ICM) numbers, intracellular levels of reactive oxygen species (ROS), apoptotic indices, and gene expression levels were examined before and after treatment of day 2 bovine embryos ($n = 200$) with various concentrations of 3,4-DHF or SOD for 6 d. Statistical analysis was performed using analysis of variance, with significance defined at the $p < 0.05$ level. SOD had no significant effect on bovine embryo development at any tested concentration (control, 32.8%, 300 U/ml, 3.9%, 600 U/ml, 24.2%). In contrast, 10 nM 3,4-DHF promoted higher blastocyst development (39.3%) than any other concentration (control, 26.7%; 1 nM, 30.3%; 50 nM, 29.5%; 100 nM, 20.5%). Compared with 300 U/ml SOD, 10 nM 3,4-DHF resulted in significantly higher blastocyst development (44.2%) (control, 31.5%; SOD 300 U/ml, 33.6%). 3,4-DHF treatment increased the ICM cell number and reduced the intracellular ROS production and apoptotic cell numbers. When O_2 tension was decreased from 20% (high tension) to 5% (low tension), embryo development rates were double regardless of 3,4-DHF treatment. Under high O_2 tension, 10 μ M 3,4-DHF treatment may render the bovine embryo development similar to a low O_2 tension environment. The best blastocyst development was obtained under low O_2 tension plus 10 nM 3,4-DHF treatment. The relative expression levels of antioxidant (MnSOD), antipapoptotic (Survivin, Bax-inhibitor) and growth-related genes (IFN- γ , Glut-5) were significantly increased after 3,4-DHF treatment, while expression levels of oxidant (iNOS) and apoptotic genes (Caspase-3 and Bax) were reduced. These results suggest that 3,4-DHF may promote the *in vitro* development of bovine embryos through its antioxidant and antipapoptotic effects.

Key words: bovine, antipapoptotic, antioxidant, 3,4-dihydroxyflavone, SOD

- 45 -

P 014

Effect of Glycosaminoglycan on Sperm Capacitation and Development of *In Vitro* Produced Bovine Embryos

Eun Hyung Noh^{1,2}, Hye Young Park^{1,2}, Byoung Chul Yang³,
Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2*}
¹Mirae Biotech, ²Jeju National University Stem Cell Research Center,
³National Institute of Animal Science, ⁴Jeju National University

Mammalian sperm are not immediately capable of fertilizing oocytes, rather they must undergo a period of preparation that normally occurs in the female reproductive tract. The glycosaminoglycans (GAG) presents in female reproductive tract fluid as promoting factor of sperm capacitation and acrosome reaction (AR). This study was to investigate whether 1) the effect of four GAGs (heparin (HP), hyaluronic acid (HA), chondroitin sulfate (CS) and dermatan sulfate (DS)) treatment on sperm capacitation, AR, motility, and 2) the GAG treated sperm has functional role on *in vitro* developmental capacity of bovine embryos. To determine the capacitation and AR potential, frozen-thawed bovine sperm was incubated with 10 μ g/ml of each GAG for 5 hrs, respectively. By the chlorotetracycline (CTC) assay, as time passes, AR sperm rates were significantly increased while capacitated sperm rates were decreased in GAG treatment groups compared to control group, especially in HP or HA treatment groups ($p < 0.05$). When the motility of each treatment sperm was assessed, the presence of GAGs significantly increases the ALH and BCF of bull spermatozoa compared to without GAGs. When the GAG treated sperm was tested for their ability of *in vitro* fertilization (IVF) frequencies, 2 pronuclei formation rates were significantly higher in GAG treatment groups than in control group ($p < 0.05$). Also, we found that GAG treated sperm significantly increased the *in vitro* developmental capacity of bovine embryos compared to control (HP, 54.1%; HA, 45.1%; CS, 53%; DS, 35.9%; Control, 34.1%) ($p < 0.05$), though it has no effect on IVF rates. In addition, GAG treated groups indicated high expression of cell growth and development marker genes such as Glut-5, Oct-4 and Bax inhibitor, while the expression of apoptotic marker genes (Caspase-3, Bax) were lower than control group. These results demonstrated that GAG treated sperm can improve the *in vitro* developmental capacity of bovine embryos.

Key words: bovine, GAG, CTC, CASA, development.

P 022

Positive Effect of Development of Bovine Somatic Cell Nuclear Transfer Embryo Using Oosight Imaging System

Min Jee Park^{1,2}, Hye Young Park^{1,2}, Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2*}
¹Mirae Biotech, ²Jeju National University Stem Cell Research Center, ³Jeju National University

Enucleation of the oocyte is one of the key steps in somatic cell nuclear transfer (SCNT). Because the chromosomes of bovine oocytes are invisible under common light microscopy, the position of the chromosomes is indirectly determined by the location of the first polar body or directly observed under ultraviolet irradiation light after staining of oocytes with a DNA-specific dye (e.g., Hoechst 33342). However, UV irradiation damages the developmental ability of pre-implantation bovine oocytes, especially in combination with Hoechst staining. In this study, we compared the effect of two enucleation methods (Hoechst staining or Oosight imaging system) for *in vitro* production of bovine somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryo. After fusion for 15–20 min, the fusion rate in the Oosight imaging system group (75.6%) was significantly higher than that in the Hoechst staining group (62.9%) ($p < 0.05$). When the reconstructed embryos were cultured for 48 h after activation, the cleavage rate in Oosight imaging system group (63.7%) was significantly higher than that in Hoechst staining group (78.0%) ($p < 0.05$). Also, in Oosight imaging system group, the percentage of SCNT embryos that developed to the blastocyst stage (31.4%) was significantly higher than that in Hoechst staining group (13.6%) ($p < 0.05$). In addition, the approximate values of apoptotic index per blastocysts were evaluated using fluorescence microscopy by TUNEL assay, the rate (3.6%) of Oosight imaging system group was lower than that (7.7%) of Hoechst staining group, while total cell numbers of SCNT embryos in Oosight imaging system group were similar to those in Hoechst staining group. The relative abundance of transcripts for Oct3/4 and interferon- τ gene was higher for embryos cultured in Oosight imaging system group than Hoechst staining group, whereas gene expression of dnmt4, Hsp70 and caspase-3 in imaging system group was significantly lower than that in Hoechst staining group ($p < 0.05$). These results demonstrated that Oosight imaging system can improve the *in vitro* developmental capacity of bovine SCNT embryos by decreasing the genetic damage.

Key words: bovine, imaging system, Hoechst stain, SCNT

P 034

Differences between Cellular and Molecular Profiles of Induced Pluripotent Stem Cells Generated from Mouse Embryonic Fibroblasts

Eun Young Kim^{1,2}, Hye Young Park^{1,2}, Byoung Chul Yang³, Soo Bong Park⁴,
Hyung Min Chung⁵ and Se Pil Park^{1,2*}
¹Mirae Biotech, ²Jeju National University Stem Cell Research Center,
³National Institute of Animal Science, ⁴Pocheon CHA University, ⁵Jeju National University

Induced pluripotent stem (iPS) cells are a new alternative for the development of patient-specific stem cells, and the aim of this study was to determine whether differences exist between the cellular and molecular profiles of iPS cells, generated using lentiviral vectors, compared to ES cells. The lentiviral infection efficiency differed according to the method of cell culture (adherent cells: 0.065%; suspended cells: 0.785%). Six iPS cell lines exhibited typical ES cell morphology and marker expression, but varied in their *in vitro* differentiation ability. Global gene transcription analysis revealed that core pluripotency genes were expressed at lower levels in iPS cell lines compared to D3-ES cells (Pou5f1: x1.6–2.2-fold, Sox2: x2.58–10.0-fold, Eras: x1.08–2.54-fold, Dppa5a: x1.04–1.41-fold), while other genes showed higher expression in iPS cells (Linc28: x1.43–2.33-fold; Dnm3b: x1.33–2.64-fold). This pattern was repeated in a survey of specific functional groups of genes (surface markers, cell death, JAK-STAT- and PI3K-AKT-signaling pathways, endothelial, cardiovascular and neurogenesis genes). Among the iPS cell lines examined, only two showed similar characteristics to ES cells. These results demonstrated that, in addition to cellular characterization, the numerical evaluation of gene expression using DNA microarrays might help to identify the stem cell stability and pluripotency of iPS cells.

Key words: iPS cell, infection, DNA microarray, mouse

P 036

Establishment of Embryonic Stem Cell Line from Bovine IVM/IVF Embryos

Eun Ji Noh^{1,2}, Hye Young Park^{1,2}, Min Jee Park^{1,2}, Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2,3,4}
¹Mada Biotech, ²Jju National University Stem Cell Research Center, ³Jju National University

Embryonic stem (ES) cells were derived from inner cell mass (ICM) of blastocysts, can proliferate indefinitely while maintaining pluripotency culture, and can differentiate into all derivatives of three germ layers *in vivo* and *in vitro*. However, authentic bovine ES cell lines have not been established despite progress made for more than two decades. In this study, to optimize the establishment condition of bovine ES cells, total 164 blastocysts were classified into their developmental stages (hatched × 67, hatching × 55 and expanded × 42), development day (day 8 × 56 and day 9 × 108) or ICM size (large × 62, medium × 82 and small × 20). For producing ES-cells, ICM and trophectoderm-rich clumps were mechanically dissociated and were cultured on mitomycin-C treated mouse embryonic fibroblast feeder cell strip and covered with mineral oil in DMEM medium containing 20% FBS, 5 ng/ml basic FGF, 1% essential amino acids, and 0.55 mM β-mercaptoethanol. We obtained 28 primary bovine ES-like colonies and the rates of ES-like colony formation were highest in the fast developed hatched blastocyst (22.4%, 15/67) than those in hatching (14.5%, 8/56) or expanded blastocysts (11.0%, 5/42). Also, the ES-like colony formation rates were higher in day 9 blastocysts (19.4%, 21/108) than in day 8 blastocysts (12.5%, 7/56), and in medium sized ICM clumps (18.2%, 15/82) and large sized ICM clumps (16.1%, 10/62) than in small sized ICM clumps (15%, 3/20). Among those colonies, 4 ES cell lines were successfully established from Day 9 hatched blastocysts (medium sized ICM × 3, large sized ICM × 1) and cultured for over 12 passages. These bovine ES colonies were positively expressed pluripotency markers such as Oct4, Nanog, TRA-1-81, SSEA-1 and Alkaline phosphatase. In addition, *in vitro* differentiation condition, these ES cell lines were easily differentiated into neuronal and atrial cells. This result demonstrated that bovine ES cell line can be efficiently established using healthy day 9 hatched blastocysts including over the medium sized ICM under the optimized bovine ES cell culture condition.

Key words: bovine, ICM, ES, alkaline phosphatase, Oct4

P 037

Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells using Magnetofection

Hye Young Park^{1,2}, Eun Hyung Noh^{1,2}, Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2,3,4}
¹Mada Biotech, ²Jju National University Stem Cell Research Center, ³Jju National University

Induced pluripotent stem (iPS) cells can obtain by different delivery system of transcription factors. While the viral infection has entailed the risk of insertional mutagenesis, virus-free systems have the handicap of slow kinetics of the reprogramming process and low efficiency. Here, we transfected mouse embryonic fibroblast (MEF) cells using different concentration combination [1.5µg (1+0.5, n) or 0.75µg (0.5+0.25, n)] of two types of DNA (pCX-DKS-2A and pCX-Myc) and combimix. When magnetofection (MF) was carried out one (1MF) or twice (2MF), the reprogramming efficiency was similar regardless of DNA concentration (1MF-0, 0.01%; 1MF-n, 0.04%; 2MF-n, 0.02%; 2MF-n, 0.02%). In all treatment groups, embryonic stem (ES)-like colonies were formed 6 days after magnetofection and they showed typical mouse ES cell morphology. In the results, we established 9 iPS cell lines and they were stably expanded for over 20 passages. Among them, selected 7 iPS cell lines were expressed high levels of alkaline phosphatase, SSEA-1, Oct3/4, Nanog, Ter1 and Zfp with similar levels to mouse ES (D3) cells. When we analyzed the integration of transgene by PCR and southern blot, no integration of DNA was confirmed in 2 iPS cell lines. Non-integrated two iPS cell lines were differentiated into three germ layer cell types. In addition, they produced teratomas and contributed to chimera. For the verification of no damage of magnetofection, we investigated the position of combimix complex within MEF cells after transfection. Through the transmission electron microscopy analysis, it found that cellular uptake of combimix complex was mediated by endocytosis. Numerous enlarged endosomes were observed in cytoplasm of MEF cells at 24 h post-magnetofection. The combimix complexes were declined or moved toward the cell membrane of magnetofected MEF cells at 48 h post-magnetofection. This is the first report of iPS cell generation from MEF cells using magnetofection. Our results demonstrated that pluripotent non-viral iPS cells can be efficiently generated using magnetofection with no integration evidence.

Key words: mouse, iPS cell, non-viral, magnetofection

P 038

Generation of Functional Cardiomyocytes from Mouse Induced Pluripotent Stem Cells

Kyoung Ha So^{1,2,3}, Hye Young Park^{1,2}, Jae Gon Kim¹, Dong Jun Sung¹, Young Min Bae¹,
 Byoung Chul Yang¹, Soo Bong Park¹, Sang Keun Chang¹,
 Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2,3,4}

¹Mada Biotech, ²Jju National University Stem Cell Research Center, ³Jju National University,
⁴Konkuk University, ⁵National Institute of Animal Science, ⁶Konkuk University Hospital

Induced pluripotent stem (iPS) cells allow derivation of autologous differentiated cells for cell therapy. The purpose of this study was to compare the cardiac differentiation potential of mouse iPS cells with embryonic stem (ES) cells and demonstrate that they could produce functional cardiomyocytes. iPS cells were prepared from mouse embryonic fibroblasts by lentiviral mediated expression of four transcription factors (Oct4-Sox2-303Kc-myc). To induce cardiac cell differentiation, iPS-E6 or D3-ES cells were induced to form embryoid bodies (EBs) using a two medium culture protocol, then plated onto gelatin coated plates and maintained in DMEM. Following classification of the generation periods of contracting EBs into early (d8~d11), middle (d12~d15) and late (d16~20), iPS cells in the early period exhibited characteristics similar to ES cells. In iPS cells from the middle period group, the ratio of contracting EBs was significantly increased compared to ES cells, and the difference persisted in cells from the late period group ($p < 0.05$). The percentage of contracting EBs formed from iPS and ES cells were 44.8% and 33.3%, respectively. In addition, iPS cell-derived cardiomyocytes exhibited mRNA expression of cardiac mesoderm markers such as GATA4 and NICK-5, and cardiomyocyte markers such as α 1t, α 1c, α -MHC, β -MHC, Cav40, Trn, TnT, ANP and Hsp2. Single cardiomyocytes exhibited typical cross-striated myofibrillar organization, and electrophysiological studies revealed functional cardiac-specific voltage-gated Na⁺, Ca²⁺ and K⁺ channels. These results demonstrate that functional cardiomyocytes can be generated from iPS cells, and suggest that these cells may be useful for the treatment of cardiovascular disease.

Key words: iPS cell, cardiac, differentiation, electrophysiology

P 039

Effect of Glycosaminoglycan Treated Sperm on *In Vitro* Developmental Capacity of Bovine Embryos

Eun Hyung Noh¹, Young Joon Han^{1,2}, Hye Young Park^{1,2}, Eun Young Kim^{1,2}
 and Se Pil Park^{1,2,3,4}

¹Mada Biotech, ²Jju National University Stem Cell Research Center,
³Jju National University

For generating an egg and fertilizing it *in vivo*, mammalian spermatozoa must undergo the capacitation and the acrosome reaction (AR). The glycosaminoglycan (GAG) presents in female reproductive tract fluid as promoting factor of sperm capacitation and AR. This study was to investigate whether (i) the effect of four GAGs [heparin (HP), hyaluronic acid (HA), chondroitin sulfate (CS) and dermatan sulfate (DS)] treatments on sperm capacitation and AR, and (ii) the GAG treated sperm has functional role on *in vitro* developmental capacity of bovine embryos. To determine the capacitation and AR potential, frozen-thawed bovine sperm was incubated with 10µg/ml of each GAG for 5 hrs, respectively. According to chlrolatracycline (CTC) assay, as time passes, AR sperm rates were significantly increased while capacitated sperm rates were decreased in GAG treatment groups compared to control group, especially in HP or HA treatment groups ($p < 0.05$). When the GAG treated sperm was tested for their ability of *in vitro* fertilization (IVF) frequencies, 2 pronuclei formation rates were significantly higher in GAG treatment groups than in control group ($p < 0.05$). Also, we found that GAG treated sperm significantly increased the *in vitro* developmental capacity of bovine embryos compared to control (HP, 64.1%; HA, 45.1%; CS, 63%; DS, 35.8%; Control, 34.1%) ($p < 0.05$), though it has no effect on IVF rates. In addition, when *in vitro* developed day 8 blastocysts were analyzed their relative abundance of gene expression by real-time PCR, GAG treated groups indicated high expression of cell growth and development marker genes such as Glut-5, Oct-4 and Bax inhibitor, while expression of apoptosis marker genes (Caspase-1, Bax) were lower than control group. These results demonstrated that GAG treated sperm can improve the *in vitro* developmental capacity of bovine embryos.

Key words: Bovine, GAG, IVF, Development, Gene expression

P 028

Efficient Formation of Primary Embryonic Stem Like Colonies from *In Vitro* Produced Bovine Embryos

Eun Ji Noh^{1,2}, Hyo Young Park^{1,2}, Jae Yeon Kim^{1,2}, Eun Hyung Noh^{1,2},
Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2,3}
¹Miase Biotech, ²Jegu National University Stem Cell Research Center,
³Jegu National University

Embryonic stem (ES) cells were derived from inner cell mass (ICM) of blastocysts, can proliferate indefinitely while maintaining pluripotency *in vitro*, and can differentiate into all derivatives of three germ layers *in vivo* and *in vitro*. However, authentic bovine ES cell lines have not been established despite progress made for more than two decades. Yet, it has been tremendous challenge to establish bovine ES cell lines. In this study, to investigate the efficiency of establishment and maintenance of bovine ES-like cells, total 184 blastocysts were examined according to their developmental stages (hatched × 67, hatching × 55 and expanded × 42), development day (day 6 × 56 and day 9 × 100) or ICM size (large × 62, medium × 62 and small × 20). For producing ES-like cells, ICM and trophectoderm-rich clumps were mechanically dissociated using 29 gauge needle and were cultured on mitomycin-C treated mouse embryonic fibroblast feeder cell drop and covered with mineral oil in DMEM medium containing 20% FBS, 5 ng/ml basic FGF, 1% nonessential amino acids, and 0.55 mM β-mercaptoethanol. We obtained 29 primary bovine ES-like colonies and the rates of ES-like colony formation were highest in the fast developed hatched blastocyst (22.4%, 15/67) than those in hatching (14.5%, 5/55) or expanded blastocysts (11.9%, 5/42). Also primary bovine ES-like colony formation was higher in day 9 blastocysts (19.4%, 21/108) than in day 8 blastocysts (12.5%, 7/56). In addition, the ES-like colony formation was slightly higher in medium sized ICM clumps (18.2%, 15/82) and large sized ICM clumps (18.1%, 10/62) than in small sized ICM clumps (15%, 3/20). These primary bovine ES-like colonies expressed pluripotency markers such as Oct4 and alkaline phosphatase. This result demonstrated that bovine primary ES-like colonies can be efficiently formed in day 9 hatched blastocysts including over the medium sized ICM under the optimized bovine ES culture condition.

Key words: Bovine, ICM, ES, Alkaline phosphatase, DMEM

P 024

In Vitro Developmental Potential of Bovine Somatic Cell Nuclear Transfer Embryo Using Oosight imaging System

Min Jae Park^{1,2}, Jae Yeon Kim^{1,2}, Hyo Young Park^{1,2}, Eun Young Kim^{1,2}
and Se Pil Park^{1,2,3}
¹Miase Biotech, ²Jegu National University Stem Cell Research Center,
³Jegu National University

Excystation of oocyte is one of the key steps in nuclear transfer (NT). Because the chromosomes of bovine oocytes are invisible under common light microscopy, the position of the chromosomes is indirectly determined by the location of the first polar body or directly observed under ultraviolet (UV) irradiation light after staining of oocytes using a DNA-specific dye (Hoechst 33342). However, UV irradiation damages the developmental ability of pre-implantation bovine oocytes, especially in combination with Hoechst staining. In recent years, developed oocyte imaging system can remove the spindle in NT without Hoechst staining, thus minimizing damage to vital cytoplasmic organelles and ensuring complete spindle removal. In this study, we compared the two excystation methods (Hoechst staining or Oosight imaging system) for *in vitro* production of bovine somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryo. In the results, fusion rate of Oosight imaging system group (69.6%) was significantly higher than that of Hoechst staining group (58.1%) ($p < 0.05$). When the reconstructed SCNT embryos were *in vitro* cultured, the cleavage rate in Oosight imaging system group (78.1%) was slightly higher than that in Hoechst staining group (74.4%). Also, *in vitro* development rate of SCNT embryos at day 8 was higher in the Oosight imaging system group (37.2%) compared with the Hoechst staining group (29.5%). In addition, when the blastocysts were evaluated using TUNEL assay, the apoptotic index was lower in Oosight imaging system group (5.7%) than in Hoechst staining group (8.3%), while the total cell number was similar between two groups. These results demonstrated that the Oosight imaging system is helpful to maintain viable oocyte condition in NT procedure and thus it can improve the *in vitro* developmental capacity of bovine SCNT embryos.

Key words: Bovine, SCNT, Oosight imaging system, Hoechst stain

P 022

Generation of Functional Cardiomyocytes Derived from Mouse Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells

Kyung Ha So^{1,2}, Young Joon Han^{1,2}, Hyo Young Park^{1,2},
Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2,3}
¹Miase Biotech, ²Jegu National University Stem Cell Research Center,
³Jegu National University

In recent, stem cell research plays a role in the new method like cardiovascular disease. iPS cells allow derivation of autologous differentiated cells for cell therapy. This study was to examine the cardiac differentiation potential of mouse iPS cell compared to embryonic stem (ES) cells and characterize the cardiomyocytes were functional. iPS cells were prepared from mouse embryonic fibroblasts by lentiviral infection of four transcription factors (Oct4/Sox2/Nfya/c-myc). For cardiac cell differentiation, iPS or ES cells were formed embryoid bodies (EBs) for 8 days by two medium combination culture protocol during early 4 days in DMEM and late 4 days in EGM-2 medium, plated onto gelatin coated plate and then further cultured in DMEM for 12 days. When the generation periods of contracting EBs were classified into early (d8-d11), middle (d12-d15) and late (d16-20), in early period the result of iPS cell group was similar to that of ES cell group. From middle period the contracting EBs ratio was significantly increased in iPS cells compared to ES cells and the differences were continued to late period ($p < 0.05$). The accumulation rates of contracting EBs of iPS and ES cell were 44.8% and 33.3%, respectively. Also, iPS cell derived cardiomyocytes revealed mRNA expression such as GATA4 and NKX2.5 as cardiac mesoderm markers, α1s, α1c, α-MHC, β-NHC, Cx40, TnI, TnT, ANF and Hcy2 as cardiomyocyte markers. And single cardiomyocytes presented typical cross-striated myofibrillar organization. Electrophysiological studies revealed the functionality of cardiac-specific voltage-gated Na⁺, Ca²⁺ and K⁺ channels in iPS cell cardiomyocytes. This result demonstrates that functional cardiomyocytes can be generated from iPS cells and these cells might be useful for cardiovascular disease.

Key words: iPS, ES, Cardiac Differentiation, Electrophysiology

P 025

Efficient Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells using Magnetofection

Hyo Young Park¹, Eun Hyung Noh^{2,3}, Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2,3}
¹Miase Biotech, ²Jegu National University Stem Cell Research Center,
³Jegu National University

Induced pluripotent stem (iPS) cells can obtain by different delivery system (retrovirus, lentivirus, plasmid or protein) of transcription factors. While the viral infection has entailed the risk of insertional mutagenesis and oncogenesis, virus-free systems have the feasibility of slow kinetics of the reprogramming process and low efficiency. Here, we transfected mouse embryonic fibroblast (MEF) cells using different concentration combination (1.5ug (1+0.5) or 0.75ug (0.5+0.25)) of two types of DNA (pCX-OKS-2A and pCX-Myc) and combomag. When transfection was carried out one (1TF) or twice (2TF), the reprogramming efficiency was similar regardless of DNA concentration (1TF-1.5, 0.01%; 1TF-0.75, 0.04%; 2TF-1.5, 0.02%; 2TF-0.75, 0.02%). In all treatment groups, embryonic stem (ES)-like colonies were formed 8 days after transfection and they showed typical iPS cell morphology. In the results, we established 9 iPS cell lines and they were stably expanded for over 20 passages. Among them, 7 iPS cell lines were selected from each treatment (1TF-1.5, 1 line; 1TF-0.75, 2 lines; 2TF-1.5, 2 lines; 2TF-0.75, 2 lines) for characterization of stem cell pluripotency. These iPS cell lines were expressed high levels of alkaline phosphatase, Oct3/4 and SSEA 1. Also, all iPS cell lines expressed ES cell marker genes such as Nanog, Tert and Zfp with similar levels to mouse O3 ES cells. When we analyzed the integration of transgene by PCR, no amplification of plasmid DNA was confirmed in 2 iPS cell lines (1TF-0.75, 1 line; 2TF-1.5, 1 line). Non-integrated two iPS cell lines were differentiated into various cell types through the EB formation and specific differentiation protocol. three germ layered cell differentiation was observed by immunofluorescence; endoderm (endothelial cell marker, Tbx2) mesoderm (cardiac cell marker, TnI) and ectoderm (Neuronal cell marker, TuJ1). In addition, they produced teratomas when transplanted into SCID mouse and contributed to chimeras. This is the first report of iPS cell generation from MEF cells using magnetofection. Our results demonstrated that pluripotent non-viral iPS cells can be efficiently generated using magnetofection with no integration evidence.

Key words: Mouse, iPS cell, Non-viral, Magnetofection

P 014

Production of Cloned Jeju Black Cattle using Somatic Cell Nuclear Transfer Embryo Treated with Flavonoid

Jee Youn Kim^{1,2}, Min Jee Park^{1,2,3}, Hyo Young Park^{1,2}, Seong Ho Mun¹, Young Hun Kim¹, Sung Soo Lee¹, Min Suck Ko¹, Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2,4}
¹Mirae Biotech, ²Jeju National University Stem Cell Research Center, ³Jeju Special Self-Governing Province, Institute for Livestock Promotion, ⁴National Institute of Subtropical Agriculture, ⁵Jeju National University

The objective of this study was to investigate the effect of flavonoid treatment on *in vitro* development of bovine somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos, and their pregnancy and delivery rate after embryo transfer into recipient. In Exp. 1, to optimize the flavonoid concentration, parthenogenetic bovine day 2 (2-cell) embryos were cultured in 0 (control), 1, 10 and 20µM flavonoid for 6 days. In the result, *in vitro* development rate was the highest in 10µM flavonoid group among treatment groups (control, 49.5%; 1µM, 54.2%; 10µM, 57.1%; 20µM, 37.5%), and total cell and ICM cell numbers were significantly higher in 10µM flavonoid group than other groups ($p<0.05$). We found that 10µM flavonoid treatment can significantly decrease the apoptotic index and derive high expression of anti-oxidant, anti-apoptotic, cell growth and development marker genes such as Mn-SOD, Survivin, Bax inhibitor, Gkl-5, In-tau, compared to control group ($p<0.05$). In Exp. 2, to produce the cloned Jeju Black Cattle, ranking number 1 bull somatic cells were transferred into enucleated bovine MI oocytes and reconstructed embryos were cultured in 10µM flavonoid added medium. When the *in vitro* produced day 7 or 8 SCNT blastocysts were transferred into a number of recipients, 10µM flavonoid treatment group was indicated higher pregnancy rate (10.2%, 6/59) than control group (5.9%, 2/34). Total three cloned Jeju Black calves were born. Also, two cloned calves in 10µM flavonoid group were born and both were all healthy at present, while the one cloned calf born in control group was dead one month after birth. In addition, when the result of short tandem repeat marker analysis of each cloned calf was investigated, microsatellite loci of 11 numbers perfectly matched genotype between donor cell and cloned calf tissue, while surrogate mother tissue was different. These results demonstrated that the flavonoid addition in culture medium may have beneficial effects on *in vitro* and *in vivo* developmental capacity of SCNT embryos and pregnancy rate.

Key words: Bovine, SCNT, Parthenogenetic, Flavonoid, Pregnancy

P 035

Differentiated Human Embryonic Stem Cells Enhance the *In Vitro* and *In Vivo* Developmental Potential of Mouse Preimplantation Embryos

Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2,3}
¹Mirae Biotech, ²Jeju National University Stem Cell Research Center, ³Jeju National University

In differentiating human embryonic stem (h-ES) cells, there are a number of types of cells and which may secrete various nutrients and helpful materials for preimplantation embryonic development. This study was to examine whether the h-ES could function as a feeder cell *in vitro* to support mouse embryonic development. By RT-PCR analysis, the h-ES cells revealed high expression of three germ layered differentiation markers while markedly reduced expression of stem cell markers. Also, in h-ES cells, embryo implantation related material LIF expression was confirmed in a similar level to undifferentiated ES cells. When mouse 2PN embryos were cultured in control M16 medium, co-culture control CR1aa medium or co-cultured on h-ES cell, their blastocyst development rate at embryonic day 4 (83.9%) were significantly better in h-ES cell group than in CR1aa group (66.0%), while it was not better than in M16 group (90.7%) ($p=0.05$). However, in embryonic days 5 and days 6, embryo hatching and hatched-out rates of h-ES cell group (53.0 and 45.2%) were superior to those of M16 group (40.7 and 40.7%), respectively. At embryonic day 4, blastocysts of h-ES cell group were transferred into pseudo-pregnant recipients, pregnancy rate (75.0%) was very high than any other groups (M16, 57.1%; CR1aa, 37.5%). In addition, embryo implantation (55.9%) and live fetus rate (38.2%) of the h-ES cell group were also better than those of other groups (M16, 36.7 and 18.3%, respectively, CR1aa, 23.2 and 6.7%, respectively). These results demonstrated that h-ES cell can be used as a feeder cell for enhancing of *in vitro* and *in vivo* developmental potential of mouse preimplantation embryos.

Key words: mouse, h-ES feeder cell, co-culture, developmental potential

- 14 -

P 015

***In Vitro* Development of Somatic Cell Nuclear Transfer Embryo Treated with Flavonoid and Production of Cloned Jeju Black Cattle**

Min Jee Park^{1,2}, Eun Young Kim^{1,2}, Hyo Young Park^{1,2}, Seong Ho Mun¹, Chang Eun Oh¹, Young Hun Kim¹, Sung Soo Lee¹, Moon Suck Ko¹ and Se Pil Park^{1,2,3}
¹Mirae Biotech, ²Jeju National University Stem Cell Research Center, ³Jeju National University, ⁴Jeju Special Self-Governing Province, Institute for Livestock Promotion, ⁵National Institute of Subtropical Agriculture

This study was to investigate the effect of flavonoid treatment on *in vitro* development of bovine somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos, and their pregnancy and delivery rate after embryo transfer into recipient. In Exp. 1, to optimize the flavonoid concentration, parthenogenetic bovine day 2 (2-cell) embryos were cultured in 0 (control), 1, 10 and 20 µM flavonoid for 6 days. In the result, *in vitro* development rate was the highest in 10 µM flavonoid group among treatment groups (control, 49.5%; 1 µM, 54.2%; 10 µM, 57.1%; 20 µM, 37.5%), and total cell and ICM cell numbers were significantly higher in 10 µM flavonoid group than other groups ($p<0.05$). We found that 10 µM flavonoid treatment can significantly decrease the apoptotic index and derive high expression of anti-oxidant, anti-apoptotic, cell growth and development marker genes such as Mn-SOD, Survivin, Bax inhibitor, Gkl-5 and In-tau, compared to control group ($p<0.05$). In Exp. 2, to produce the cloned Jeju Black Cattle, ranking number 1 bull somatic cells were transferred into enucleated bovine MI oocytes and reconstructed embryos were cultured in 10 µM flavonoid added medium. When the *in vitro* produced day 7 or 8 SCNT blastocysts were transferred into a number of recipients, 10 µM flavonoid group was indicated higher pregnancy rate (10.2%, 6/59) than control group (5.9%, 2/34). Total three cloned Jeju Black calves were born. Also, two cloned calves in 10 µM flavonoid group were born and both were all healthy at present, while the one cloned calf born in control group was dead one month after birth. In addition, when the result of short tandem repeat marker analysis of each cloned calf was investigated, microsatellite loci of 11 numbers perfectly matched genotype between donor cell and cloned calf tissue, while surrogate mother tissue was different. These results demonstrated that the flavonoid addition in culture medium may have beneficial effects on *in vitro* and *in vivo* developmental capacity of SCNT embryos and pregnancy rate.

Key words: Bovine, SCNT, Flavonoid, Jeju Black cattle, Pregnancy

P 001

Sperm Characteristics and *In Vitro* Developmental Potential of Genetically Identical Jeju Black Cattle Cloned Bull and Its Donor Bull

Eun Young Kim^{1,2}, Min Jee Park^{1,2}, Hyo Young Park^{1,2}, Eun Ji Noh^{1,3}, Eun Hyung Noh^{1,3}, Dong Hwan Song^{1,3}, Chang Eun Oh¹, Young Hun Kim¹, Seong Ho Mun¹, Moon Suck Ko¹ and Se Pil Park^{1,2,3}
¹Mirae Biotech, ²Jeju National University Stem Cell Research Center, ³Jeju National University, ⁴Jeju Special Self-Governing Province, ⁵Institute for Livestock Promotion, ⁶National Institute of Subtropical Agriculture

Animal cloning technology would provide many new opportunities for livestock agriculture, human medicine, and animal conservation. Nuclear cloning involves the production of animals that are genetically identical to the donor cells used in a technique known as nuclear transfer. In previous study, we reported the production of two Jeju Black Cattle cloned bulls, "Heuk Young Dolee and Heuk Ol Dolee", well grown (2.5 yrs and 2yrs), and both become adults able to produce sperm. This study was to assess reproductive potential of a cloned bull (Heuk Young Dolee) by comparing its sperm characteristics and *in vitro* developmental capacity to its existing original cell donor bull (BK01-10). The parameters evaluated were included the motility of frozen-thawed spermatozoa, *in vitro* fertilization (IVF) ability and embryo development. In computer-aided sperm analysis, using thawed sperm and treated sperm, the motility, curvilinear and straight velocity were not differed between cloned bull and its donor bull. Also, before and after sperm preparation, capacitated and acrosome reacted sperm rates of cloned bull were very similar to those of its donor bull using chlortetracycline staining assay. In addition, cloned bull sperm (86.4%) indicated IVF rates slightly higher to its donor bull (80.0%). Furthermore, there was not differed in embryo development rate (27.9% vs 31.1%) per cleaved embryo or quality of blastocysts (125±11.6 vs 121±13.3) between donor and cloned bull. These results demonstrated that a Jeju Black Cattle cloned bull has the excellent quality of collected semen and *in vitro* developmental potential equivalent to its original cell donor.

Key words: Bovine, Jeju Black Cattle, NT, Motility, Capacitation

P 083

Characterization of Embryonic Stem Cell Line Derived from Bovine IVF/IVC Embryos

Eun Ji Noh^{1,2}, Hyo Young Park^{1,2}, Min Jee Park^{2,3}, Eun Hyung Noh¹,
Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2,3}
¹Mirae Biotech, ²Jeju National University Stem Cell Research Center,
³Jeju National University

Embryonic stem (ES) cells from farm animals could provide a powerful tool for studies on early embryonic development, gene targeting, cloning, chimera formation and transgenesis. However, the generation and maintenance of ES cell line from bovine blastocysts is the most difficult and challenging among all mammals. This study was to examine the characteristics of our established bovine ES (bES) cell line. These bES cells were cultured on mitomycin-C treated mouse embryonic fibroblast feeder cell drop and covered with mineral oil in DMEM medium containing 20% FBS, 5 ng/ml basic FGF, 1% nonessential amino acids, and 0.55 mM β -mercaptoethanol, and subcultured every week. We established six bES cell lines from *in vitro* produced blastocysts (hatched \times 4, hatching \times 1 and expanded \times 1) and named Jeju National University (JNU)-bES. These bES cell lines were maintained for more than 12 passages (>90 days), exhibited typical ES cell morphology and expressed pluripotent markers including Oct4, stage-specific embryonic antigens 1, Nanog, tumor rejection antigen-1-81, Rex1 and alkaline phosphatase in immunocytochemistry and semiquantitative RT-PCR. Also, *in vitro* differentiated embryoid bodies derived from bES cells were expressed representative genes of the three embryonic germ layers using RT-PCR analysis (Pax6, DBH, Albumin, α FP, Endoase and CMP). In addition, bovine ES cell lines were easily differentiated into neuronal and adrenal cells (MAP2, TuJ1, GFAP and sarcomeric α -actinin). These results demonstrated that bovine ES cell shows a complex tendency sharing mouse and human ES cell characteristics has been known immediately although their stem cell control system was not completely defined yet.

Key words: Bovine, ES, Oct4, Alkaline phosphatase, SSEA-1

P 077

Neuronal Cell Differentiation from Human Induced Pluripotent Stem Cells

Eun Young Kim^{1,2}, Hyo Young Park^{1,2}, Eun Hyung Noh^{1,3} and Se Pil Park^{1,2,3}
¹Mirae Biotech, ²Jeju National University Stem Cell Research Center,
³Jeju National University

The generation of patient-specific pluripotent stem cells has the potential to accelerate the implementation of stem cells for clinical treatment of degenerative diseases. This study was to examine the *in vitro* neuron cell differentiation characteristics of our established human (h) IPS cells (MRB0-IPS-1-2) derived from human somatic cells. For the neuron differentiation, well grown hPS colonies were recovered by collagenase treatment and then suspended cultured in a non-adherent bacteriological culture well using human embryonic stem (hES) cell culture medium for 4 days. Embryoid bodies were plated and cultured in serum-free ITSFN (insulin/transferrin/selenium/retention) medium for 8 days to select neural precursor cells. Then selected neuronal cells were dissociated, plated onto poly-L-ornithin/laminin coated dish at a concentration of 2×10^5 cells/cm² and expanded in N2 medium containing 20 ng/ml bFGF, 300 ng/ml BDNF and 100 ng/ml FGF-8 for 7 days. For the final differentiation step involved removing agents and culturing for 14 days in 20 ng/ml BDNF added N2 medium. In the neuron precursor stage, >90% of nestin positive cells and >50% NCAM positive cells were obtained. Also, in final differentiation step, we confirmed the high percent (>80%) of mature neuron tubulin- β positive cells and approximately >20% of tyrosine hydroxylase positive cells. Also, these results were confirmed by RT-PCR. These results indicated that hPS cells have potential to generate specific neuron differentiation and especially TH⁺ neuron was also can be obtained, and thus hPS-derived neural cells might be a useable source for the study of neuro-degenerative diseases.

Key words: Human IPS cell, Neuron cell differentiation, Nestin, Tyrosine hydroxylase

e-mail : sppark@jeju.ac.kr

P 086

Generation and Characterization of Bovine Parthenogenetic Stem Cells

Eun Ji Noh^{1,2}, Hyo Young Park^{1,2}, Min Jee Park^{2,3},
Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2,3}
¹Mirae Biotech, ²Jeju National University Stem Cell Research Center,
³Jeju National University

It is known that oocytes can be activated without male contribution *in vitro* and develop to blastocysts which are used to isolate parthenogenetic embryonic stem (ES) cells. Differentiation capacity of the parthenogenetic ES cells was rather lower than that of fertilized embryos derived ES cells, which might be the result of the absence of male genome. However, parthenogenetic ES cells might be useful research tool for genetic engineering and generating SCNT embryo derived ES cells. In our previous study, we reported that establishment of several bovine ES cell lines from *in vitro* fertilized (IVF) embryos named JNU-bES. Based on this data, the objective of this study is to generate parthenogenetic ES cells and to examine their stem cell characteristics. Total 107 parthenogenetic embryos produced at day 8 or 9 were classified into their developmental stages (full expanded \times 40, hatched \times 67). For producing ES cells, ICM and trophoderm-rich clumps were mechanically dissociated and were cultured on mitomycin-C treated mouse embryonic fibroblast feeder cell drop and covered with mineral oil in DMEM medium containing 20% FBS, 5 ng/ml basic FGF, 1% nonessential amino acids, and 0.55 mM β -mercaptoethanol. We obtained 20 primary parthenogenetic bovine ES (pbES)-like cell colonies. And pbES colony formation was higher in hatched blastocyst (25.4%, 16/67) than expanded blastocysts (10%, 4/40). Among those colonies, 5 pbES cell lines were successfully established and they were named as a series of JNU-pbES. These pbES cells were positively expressed pluripotency markers such as Oct4, Nanog, TRA-1-81, SSEA-1 and alkaline phosphatase. This result demonstrated that the establishment efficiency and characteristics of pbES cell line was very similar to those of bES cell line.

Key words: Bovine, Parthenogenesis, ES, Alkaline phosphatase, Oct4

e-mail : sopark@jeju.ac.kr

P 087

Embryonic Stem Cell Nuclear Reprogramming of Bovine Oocytes Has Better Growth Potential

Min Jee Park^{1,2}, Eun Ji Noh^{1,2}, Hyo Young Park^{1,2},
Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2,3}
¹Mirae Biotech, ²Jeju National University Stem Cell Research Center,
³Jeju National University

Somatic cell nuclear transfer (SCNT) is an efficient technique which has been successfully applied to developmental biology, and resulted in the production of offspring from various species. It offers many opportunities in basic and medical research as well as endangered species preservation. On the other hand, embryonic stem (ES) cells are useful research tools for genetic engineering and developing disease models. In previous study, we established bovine IVF embryo derived ES cell line which can be grow indefinitely as undifferentiated cell state. In this study, we compared the effect of two different age cells (bovine ES cell: JNU-iES-05 or adult ear fibroblast cell) on *in vitro* developmental potential of bovine SCNT embryo. To produce SCNT embryos, the ES cells or somatic cells were dissociated and transferred into enucleated MI oocytes, and cleaved reconstructed embryos were cultured in CR1aa medium containing 10% FBS, 1 μ g/ml epidermal growth factor (EGF) and 1 μ g/ml insulin growth factor (IGF) for 8 days. In the result, blastocyst development rate was similar between ES cell treatment group and somatic cell treatment group, 27.7% (10/36) and 28.9% (11/38), respectively. However, there was particular difference in development speed from day 5 post SCNT, blastocyst expanding was 1 day faster in ES cell group than in somatic cell group. This difference was analyzed by semi-quantitative RT-PCR using pluripotency, growth and cell cycle gene markers. These results demonstrated that SCNT embryo using ES cell as a donor cell has better growth potential than somatic cell, and it will be a useful tool for a transgenic animal production.

Key words: Bovine, SCNT, Embryonic Stem cell, Reprogramming

e-mail : sopark@jeju.ac.kr

P 088

Neuron Differentiation Condition of Human Adipose Tissue Derived Stem Cells

Eun Hyung Noh^{1,2}, Hyo Young Park^{1,2}, Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2,3}
¹Mirae Biotech, ²Jeju National University Stem Cell Research Center,
³Jeju National University

Stem cell therapy is undoubtedly the most promising therapeutic approach for neurological disorders. Adipose tissue is ubiquitous and it can be easily harvested in large quantities under local anesthesia with little patient discomfort, making adipose tissue into the ideal large-scale source for research on clinical applications. In this study we monitored the neuronal cell differentiation potential of human adipocyte in the following condition; i) N2 medium containing 200 μ M ascorbic acid (AA) and/or 10 μ M flavonoid (F) and ii) N2 medium containing AA and/or 10 ng/ml brain derived neurotrophic factor (BDNF) and/or, 200 ng/ml sonic hedgehog (SHH) plus 100 ng/ml fibroblast growth factor (FGF) 8. Adipose stem cells were cultured in above described differentiation condition for three weeks. RT-PCR analysis demonstrated that the mRNA levels of neuronal cell markers in differentiated adipose stem cells. Under the culture condition using N2 medium containing AA, the expression level of nestin (neural progenitor marker) mRNA was high in all groups, while those of Neuro D, and LEP and FABP4 (adipocyte marker) mRNA were significantly decreased. Also, the addition of BDNF or SHH+FGF8 in N2 medium containing AA enhanced the neural cell differentiation from adipose stem cells, the expression level of Map2 (mature neuron) mRNA was increased, and that of TH (dopaminergic neuron marker) mRNA was high. In addition, we confirmed that the flavonoid addition has effect on the increase of Map2 expression. These results demonstrate that our designed culture condition has effect on the neural cell differentiation of adipose stem cells and this stimulatory effect may be further enhanced by transplantation.

Key words: Adipocyte, Differentiation, Neuron, Ascorbic acid, Flavonoid

e-mail : sppark@jeju.ac.kr

P 100

In Vitro Production of Human Erythropoietin (hEPO) Transgenic Bovine Embryos by Somatic Cell Nuclear Transfer

Hyo Young Park^{1,2}, Min Jee Park^{1,2}, Eun Hyung Noh^{1,2},
 Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2,3}
¹Mirae Biotech, ²Jeju National University Stem Cell Research Center,
³Jeju National University

The production of transgenic animals using somatic cell nuclear transfer (SCNT) has been widely described. A critical problem in the production of transgenic animals is the uncontrolled constitutive expression of the foreign gene which occasionally results in serious physiological disorders in the transgenic animal. In this study, we designed three different expression vectors that express the hEPO gene. hEPO is a hormone produced by the kidney that promotes the formation of red blood cells by the bone marrow. For the *in vitro* production of transgenic embryos, the different expression vectors were transfected into hostain ear fibroblast cells, respectively, and GFP expressed donor cells were transferred into enucleated oocytes, and then the reconstructed SCNT embryos were developed into pre-implantation stage. From three replicates, GFP expressed 112 transgenic SCNT embryos were produced. When their cleavage rate and blastocyst rate were compared with non-transgenic SCNT embryos, the results were presented into 73.2% vs. 76.9% and 26.8% vs. 30.6%, respectively, there were no differences. Also, total cell number and ICM cell numbers of day 8 blastocysts were statistically not different between the transgenic SCNT groups (120.0±7.0 and 31.4±8.2) and control SCNT group (128.3±4.8 and 35.3±4.0). The GFP expression levels were presented consecutively high during the culture of transgenic SCNT embryos. By analysis of semi-quantitative RT-PCR, the relative expression levels of hEPO mRNA and pluripotent gene were determined. These results demonstrated that the hEPO expressed transgenic bovine embryos can be efficiently produced *in vitro* by SCNT technique, while their potential of cloned animal production have to be examined in further study.

Key words: hEPO, Bovine, Transgenic animal, SCNT

e-mail : sppark@jeju.ac.kr

P 021

The Usability of Morphological Evaluation of the Vitrified-thawed Oocyte before Somatic Cell Nuclear Transfer using Oosight Imaging System

Min Jee Park^{1,2}, Eun J Noh^{1,2}, Hyo Young Park^{1,2}, Young Joon Han^{1,2},
 Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2,3}
¹Mirae Biotech, ²Jeju National University Stem Cell Research Center,
³Jeju National University

This study was to analyse the usability of morphological evaluation of vitrified-thawed oocyte before somatic cell nuclear transfer (SCNT) using Oosight imaging system to view spindles. For the vitrification, *in vitro* matured bovine MII oocytes were treated by two-step freezing medium without (control group) or with 5 μ g/ml cytochalasin-b (CCB group). In Exp. 1, after thawing, recovered oocytes in each treatment group were assessed by live image using Oosight imaging system and cytoskeletal protein image using immunostaining. In Exp. 2, in each treatment group the *in vitro* developmental potential of frozen-thawed bovine oocytes post evaluation using Oosight imaging system and then SCNT was investigated. The SCNT embryos were cultured in CR1aa medium supplemented with 10% FBS, 1 mM EGF and 1 mM IGF at 38.5 C in 5% O2 and 5% CO2 in air for 8 days. In Exp.1, the rates of *in vitro* survival, morphological good grade and spindle normality of CCB treatment group (91.1%, 54.2% and 55.5%) were better than those of control group (86.1%, 48.5% and 48.5%). After SCNT using vitrified-thawed oocyte, the rates of fusion, reconstructed embryos and blastocyst development were also high in CCB treatment group (86.6%, 36.4% and 3.0%) than control group (80.0%, 27.3% and 0%). These results demonstrated that the identification of morphological spindle image of the vitrified-thawed bovine oocytes using Oosight imaging system helps to predict the SCNT embryo quality.

Key words: Vitrified-thawed oocyte, Oosight imaging system, SCNT, CCB, Spindle

E-mail : sppark@jeju.ac.kr

P 004

Application of Oosight Imaging System in the Monitoring and Somatic Cell Nuclear Transfer of Vitrified-Thawed Bovine Oocytes

Min Jee Park^{1,2}, Hyo Young Park^{1,2}, Young Jun Han^{1,2},
 Eun Young Kim^{1,2} and Se Pil Park^{1,2,3}
¹Mirae Biotech, ²Jeju National University Stem Cell Research Center, ³Jeju National University

Oosight imaging system is proper to the observation of meiotic spindles of matured oocytes and this spindle images could be used to monitor the oocyte qualities. This study was to examine whether the assessment of spindle image of vitrified-thawed bovine MII oocyte using Oosight imaging system prior to enucleation can be used to predict the *in vitro* production of SCNT embryos. For the vitrification, bovine MII oocytes were treated with two-step freezing medium without (control group) or with 5 μ g/ml cytochalasin-b (CCB group). In Exp. 1, after thawing, recovered oocytes in each treatment group were assessed by live image using Oosight imaging system and cytoskeletal protein image using immunostaining. In Exp. 2, in each treatment group the *in vitro* developmental potential of frozen-thawed bovine MII oocytes post spindle image evaluation and SCNT using Oosight imaging system was investigated. In the result of Exp.1, the rates of *in vitro* survival, morphological good grade and spindle normality of CCB treatment group (91.1%, 54.2% and 64.1%) were better than those of control group (86.1%, 48.5% and 57.8%). In Exp. 2, after spindle imaging assessment and SCNT of vitrified-thawed MII oocyte, the rates of fusion and blastocyst development were also high in CCB treatment group (86.7% and 8.3%) than control group (80.0% and 0%). These results demonstrated that the identification of spindle image using Oosight imaging system can be used to enhance the production rate of higher quality SCNT embryos derived from vitrified-thawed bovine MII oocytes

Key words: vitrified-thawed oocyte, Oosight imaging system, SCNT, CCB, Spindle

제주흑우 증식을 위한 수정란 이식 기술 적용 연구

김원호¹, 김원주¹, 김창동¹, 김병혁¹, 김은영³, 오창현⁴, 조상래⁵, 최연호⁶, 박세필^{2,3}
¹제주특별자치도축산진흥원, ²제주대학교축기체포연구센터, ³미래생명공학연구소, ⁴한국동물번식센터, ⁵국립축산과학원

제주지역 특산종으로 총 사육두수가 400여두에 불과하여 멸종위기종으로 분류되고 있는 제주흑우의 집단증식과 유전자원 보호를 위하여 체내수정란을 대량생산 일반한우와 고잡우 대립도에 이식한 결과, 수태를 조사 등 산업적 이용 가능성을 검토하고자 추진한 결과를 요약하면 다음과 같다. 수정란 생산에 공시된 공란우로는 제주흑우종특규정에 의해 등록관리되고 있는 제주흑우 번식우 암소 32마리와 축산진흥원 사육 한우 번식우 29마리를 활용하여 암소 32마리당 1회 관개없이 CIDR Plus 처리후 4일간 8회에 걸쳐 FSH제제(Antorin, Japen) 28AU를 점진법으로 근육주사하고, 주사개시 6회째 CIDR Plus 제거 및 PGF₂ α제제(Lutalyse, Wako) 25 mg 근육주사하였으며, 주사 후 2일째 저녁부터 발정을 확인하고 12시간 간격으로 2-3회에 걸쳐 인공수정을 실시하였다. 발정 및 인공수정 개시 7일째 2-way 채란법으로 수정란을 회수하고, 현미경검사를 통해 이식가능 수정란만을 골라 동결보존액(牛 凍液, 일본 기노시타이드연구소)에 넣은 다음 알콜동결기를 이용 3단계 완만동결법으로 동결보존하였다. 제주흑우 수정란이식은 전두수 동결보존된 수정란을 이용하였는데, 20℃ 물이 들어있는 용해기에서 20초간 용해하여 황체생성이 양호한 대리모 암소에 이식하였고, 수정란 이식후 3개월 후에 격감임사법으로 임신 여부를 판정하였다. 제주흑우 암소 공란우 과배란치리에 따른 난소 반응은 총 32마리에서 평균 14.7개의 황체 형성이 확인되었으며, 공란우 과배란 처리후 7일째 수정란을 채란하고 생산성을 조사한 결과 평균 9.4개의 난자를 채취하였으며, 그중 이식가능 수정란이 5.8개로 같은 시기에 한우 공란우에서 채취된 이식가능 수정란수 5.4개보다 양호한 결과를 보였으며, 생산된 난자의 등급별 분포를 보면 전체 301개 회수난자 중 등급이 가장 양호한 Excellent급이 135개로 44.9%이고, Good급이 13.0%였으며, 이식용으로 활용이 불가능한 Poor급도 116개로 38.5%를 차지하였고, 생산 수정란의 발육단계별 분포를 살펴보면 생식대기 난자가 160개로 53.2%를 차지하여 가장 높은 비율을 차지하였으며, 초기배반포 난자를 포함 배반포기 난자는 29개로 9.6%를 보였다. 생산된 수정란을 153마리 대리모에 이식하였고 수태 확인된 105마리 중 유사산 1마리를 포함 47마리에서 수태가 확인되어 31%의 수태율을 보였다.

Key words) Jeju Black Cattle, embryo collection, embryo transfer, conception rate

4. 교육·지도활동

no.	교육명	주요내용	교육일자	개최주체
1	'08년 소 수정란이식 기술교육	소 수정란이식 이론 및 실기	2008.02	축산진흥원
2	'08년 소 자가인공수정 기술교육	소 자가인공수정 이론 및 실기, 수태율 향상을 위한 번식우 사양관리, 혹서기 한우질병 예방 및 관리방안	2008.07	〃
3	'08년 한우 선도농가 축산기술교육	대관령 한우 브랜드 육성사례를 통해 세계 비육우 시장에 전망과 제주 한우브랜드에 성공조건을 알아본다.	2008.07	〃
4	'09년 소 수정란이식 기술교육	소 수정란이식 및 한우 개량방안 이론교육	2009.03	〃
5	2010년 소 수정란이식 기술교육	소 수정란이식 수태율 향상 및 한우 개량방안 이론교육	2010.03	〃
6	2011 소 수정란이식 기술교육	한우개량을 위한 수정란이식 기술의 활용 외	2011.04	〃
7	2012 소 수정란이식 기술교육	제주흑우산업 육성을 위한 수정란이식 및 혈통관리 외	2012.02	〃
8	2013년소 수정란이식 기술교육	한우개량 및 제주흑우 산업육성과 혈통관리 외	2013.03	〃
9	2008평창한우 CEO대학 농업인 견학교육-평창군	목장안내 및 한우육종현황, 운영현황	2008.11	난지축산 시험장
10	친환경축산교육 과정생 현장견학교육-순천대학교	전남 녹색축산핵심선도농가 과정생(한우농가) 교육 현장견학	2009.01	〃
11	육천영동축협-흑우 방목장 견학교육	제주 흑우 방목현장 견학, 흑우산업 현황 시찰	2009.08	〃
12	전남농업마이스터대학 친환경한우과정 현장견학 교육	한구의 연구현황등	2009.12	〃
13	2010학년도 농업전문 CEO양성과정(한우-비육우반) 현장견학교육-경북대학교	2010학년도 농업전문 CEO양성과정(한우-비육우반) 현장견학교육	2010.09	〃
14	제주흑우 강소농 육성을 위한 간담회	제주흑우 육성을 위한 기관별 역할분담, 제주흑우 및 실용화축군 관리 방안 등	2011.05	〃
15	개장 55주년 행사 및 제주흑우 육질 평가회	제주흑우 실용축 육질평가회 및 시식회	2011.07	〃
16	제주흑우 신규연구과제 계획을 위한 간담회	제주흑우 관련 신규연구과제 추진을 위한 간담회	2011.10	〃
17	제주흑우 번식력 향상을 위한 공동실험수행-중앙대학교산업대학동물자원과학과	제주흑우 산업화를 위한 우수 유전형질 탐색 및 활용, IEF를 이용한 정자관련 단백질 분석	2012.01	〃
18	FTA대응 제주흑우 브랜드화 전략 세미나	제주흑우의 개량과 정책방안 설정 및 제주흑우의 대량증식 방안, 제주흑우 산업화 및 명품브랜드화 전략	2012.04	〃
19	2012학년도 전남생명농업대학생 현장견학교육-전라남도농업기술원	한우(흑우), 말 연구 및 산업 전망 등의 강의, 시험장 시설 및 목장 견학 안내	2012.08	〃
20	제주흑우 및 제주마 유전자 분석 기술 교육	제주흑우 및 제주마 유전자분석 교육	2013.01	〃

2012 소 수정란이식 기술교육 추진결과

□ 교육개요

- 일 시 : 2012. 3. 24(일) 10:00 ~ 16:00
- 장 소 : 육산동물팀 강당
- 참 여 : 44명 (교육담당자 22, 비서교사대학 14, 수강생에 8)

□ 교육내용 및 평가

교육내용	평가
- 수정란이식 방법의 중요성 및 수태율 향상방법	비육수준향상기술연구부수 이원호 박사
- 교육프로그램 운영을 위한 수정란이식 및 육종대학교수장학생지원센터의 활동방식 설명	육종대학교수장학생지원센터 김영호 교수
- 2012년 소 수정란이식 사업계획 설명	비육수준향상팀 이원호

□ 교육소감

- 농가에 현장에서 필요한 사례, 특화된 지식을 제공해 주셨고, 강의자료는 영어로 된, 견본들이 많이 사들여주고 있어 농가들이 이해하기가 조금 어려움 부분도 있었음.
- 제주목우 협동조합에 대한 설명을 듣고싶은데, 제주대학 교와 협동조합들이 협력하여 그 역할을 수행할수있도록 하는 것



2013년 소 수정란이식 기술교육

□ 교육개요

- 주 관 : 제주특별자치도육산동물팀
- 일 시 : 2013. 3. 24(월) 10:00 ~ 16:00
- 장 소 : 육산동물팀 강당

□ 교육내용

- ▶ 수정란이식 기술의 중요성, 수태율, 육질 향상의 필요성
- ▶ 2013년 소 수정란이식사업 참여농가
- ▶ 수정란이식을 통해 우수계통 및 우수축종 사육을 희망하는 농가

○ 교육방법 : 동기형강 강연이식 기술 및 사례 중심의 집합교육

○ 교육내용

- ▶ 2013년 소 수정란이식 사업계획 설명
- ▶ 소의 수정란이식 수태율 향상 방안
- ▶ 협동조합 및 제주목우 협동조합의 역할과리

□ 교육시간표

시간	주	주	내	용	강	사
10:00 ~ 10:30	환	영	대	개	육	산
10:30 ~ 11:30	소	의	수	정	란	이
11:30 ~ 13:30	식	사	업	추	진	현
13:30 ~ 14:30	농	가				
14:30 ~ 15:30	비	육	수	준	향	상
15:30 ~ 16:00	비	육	수	준	향	상

발령증

주요 내용: 발령증 발급 관련 규정, 발급 대상, 발급 절차, 발급 기한, 발급 수수료 등.

육산대학교

주요 내용: 육산대학교 설립 목적, 교육 목표, 교육 과정, 입학 요건, 학비 등.

제주특별자치도육산동물팀소장

주요 내용: 육산동물팀 소장 직책, 임명 절차, 임명 기한, 임명 수수료 등.

경남농업마이스터대학

주요 내용: 경남농업마이스터대학 설립 목적, 교육 목표, 교육 과정, 입학 요건, 학비 등.

경북대학교

주요 내용: 경북대학교 설립 목적, 교육 목표, 교육 과정, 입학 요건, 학비 등.

남강육산기술센터

주요 내용: 남강육산기술센터 설립 목적, 교육 목표, 교육 과정, 입학 요건, 학비 등.

5. 수상실적

no.	일자	수상명칭	공적내용
1	2008-12-26	표창패	'제주시를 빛낸 시민' 표창
2	2009-12-31	2009.대학을 빛낸 교수상	2009.대학을 빛낸 교수상 수상
3	2010-04-05	농림수산식품 우수과제 선정	임금님 진상품 제주흑우의 대량증식 기술 - 제주흑우의 대량증식 기술개발 및 산업화
4	2012-04-01	일본 'JDR 아웃스탠딩 페이퍼 어워드' 수상	일본 'JDR 아웃스탠딩 페이퍼 어워드' 수상



6. 연구인력 활용/양성 성과

No	인력양성명	인력양성내용	인력양성년도
1	이영화	석사학위취득	2009
2	이성현	석사학위취득	2011
3	박민지	석사학위취득	2012
4	노은형	석사학위취득	2012
5	노은지	석사학위취득	2012



7. 홍보 (언론 및 영상 매체); 33개 종류 총 257회

1) 멸종 위기 제주흑우 복제소 ‘흑영돌이’ 생산 관련 홍보 (총 33건)




그림 1. 2009년 8월 30일 현재 체세포 제공 제주흑우 씨수소 (왼쪽) 와 5개월령의 체세포복제 숫송아지 “흑영돌이” (오른쪽)


출 생 일 : 2009. 3. 11

제품특징 : 체세포핵이식 기술로 생산된 흑영돌이는 육량증가에 효과적인 정자를 생산하는 고령 제주흑우 씨수소 BK01-10 (숫가; 2억 호가) 으로부터 복제된 소로 현재 22개월령으로 성장하였음.


(1) 연합 뉴스 (2009-08-31) - 동영상뉴스 2회

 멸종위기 제주 흑우 첫 복제성공


(2) 매일경제 뉴스 (2009-08-31) - 동영상뉴스 1회

 멸종위기 ‘제주흑우’ 복제 성공


(3) SBS 뉴스 (2009-08-31) - 동영상뉴스 1회

 늙어 죽은 ‘제주흑우’ 복제 성공


(4) 아시아 경제 (2009-09-01)

 국내 연구진, 멸종 위기 ‘제주 흑우 복제 성공’


(5) 서울신문 (2009-08-31)

 멸종위기 제주 흑우 체세포 복제 성공


(6) 한국일보 (2009-08-31)

 제주 흑우 복제 성공


(7) 세계일보 (2009-09-01)

 멸종위기 ‘제주 흑우’ 첫 복제 성공


(8) 아시아경제 (2009-08-31)

 국내 연구진, 멸종위기 제주흑우 첫 복제 성공


(9) 한겨레 (2009-08-31)

 복제 흑우 ‘흑영돌이’ 와 아빠


(10) 국민일보 (2009-08-31)

 멸종 위기 제주 흑우 복제 성공.. 제주대 박세필 교수팀 체세포 핵이식 방법 이용


(11) 경향신문 (2009-08-31)

 멸종 위기 ‘제주 흑우’ 복제 성공했다


(12) 매일경제 (2009-08-31)

 멸종위기 ‘제주 黑牛’ 복제 성공


(13) 국민일보 (2009-08-31)

 멸종 위기 ‘임금님 진상품’ 제주 흑우 첫 복제 성공


(14) 전자신문 (2009-08-31)

 멸종위기 제주 흑우 복제 성공


(15) 연합뉴스 (2009-08-31)

 첫 복제 흑우와 박세필 교수

(16) 연합뉴스 (2009-08-31)

 갓 태어난 첫번째 복제 흑우


(17) 아이뉴스 (2009-08-31)

 제주대 박세필 박사, 흑우 체세포 복제 성공


(18) 머니투데이 (2009-08-31)

 박세필 제주대 교수팀, 제주 흑우 복제성공


(19) 헤럴드 경제 (2010-03-30)

 제주 흑우 체세포 복제 성공했다


(20) 헤럴드 경제 (2010-03-30)

 멸종위기 제주 黑牛 첫 번째 복제 성공


(21) 뉴시스 (2009-08-31)

 제주 흑우 체세포 복제 성공 과정을 설명하는 박세필 교수


(22) 뉴시스 (2009-08-31)

 체세포 핵이식을 통해 ‘흑영돌이’ 복제 과정을 설명하는 박세필 교수


(23) 뉴시스 (2009-08-31)

 ‘흑영돌이’ 체세포 복제 성공과 기대효과를 설명하는 박세필 교수


(24) 뉴시스 (2009-08-31)

 국내 첫 흑우 체세포 복제 씨수소 ‘흑영돌이’ 탄생.. 대량증식 시대 개막


(25) 제주의 소리 (2009-08-31)

 임금님 진상품 ‘제주 흑우’ 붕어빵 복제가능. 세계적 쾌거


(26) 제주일보 (2009-09-02)

 박세필 교수팀, 제주 黑牛 첫 복제 성공


(27) 조선일보 (2009-08-31)

 멸종위기 제주흑우 첫 복제 성공

(28) 환경일보(2009-08-31)

 제주흑우 ‘씨 수소’ 체세포 복제동물 생산 성공


(29) MBN 매일경제 tv2 (2009-08-31)

 제주흑우 체세포 복제 첫 성공


(30) 이슈제주 (2009-08-31)

 제주 축산업 ‘획기적 발전계기’ 마련


(31) 미디어제주 (2009-08-31)

 멸종위기 제주흑우 씨수소 체세포 복제 성공

(32) 중앙일보 (2009-09-01)


 제주 흑우 복제 해냈다

(33) KBS 뉴스광장 (2009-09-01)


 국내 최초 ‘제주흑우’ 체세포 복제 성공

2) 제주흑우 혈통등록 및 브랜드화 관련 홍보 (총 13건)


(1) 경향신문 (2009-10-06)

 제주 흑우 217마리 등록 확정


(2) 뉴시스 (2009-10-06)

 제주흑우 217마리 혈통등록


(3) 서귀포신문(2009-10-06)

 제주흑우 혈통, 217마리 인정


(4) 연합뉴스 (2009-10-06)

 제주 흑우 30% 순수품종 인정 등록


(5) 이슈제주 (2009-10-06)

 제주흑우 브랜드화 사업 '본격화'


(6) 제주관광신문 (2009-10-06)

 제주 흑우 혈통 정비 마무리, 총217마리 등록


(7) 제주일보 (2009-10-06)

 제주흑우 혈통정비,등록 추진


(8) 한라일보 (2009-10-06)

 제주흑우 217마리 혈통등록


(9) 매일경제 (2009-10-06)

 제주 흑우 30% 순수품종 인정 등록


(10) 한국디지털뉴스 (2009-10-06)

 제주흑우 명품화로 옛 명성 찾기 돌입


(11) 한라일보 (2009-10-07)

 제주흑우 브랜드화

(12) 조선일보 (2009-10-07)

 제주 흑우 30%가 순수품종

(13) 제주타임스 (2009-10-07)

 제주흑우 217마리 순수 품종 등록

3) 죽은 제주흑우 복제 씨수소 ‘흑올돌이’ 생산 관련 홍보 (총 26건)




그림 2. 2010년 6월 16일 현재 9개월령의 체세포복제 숫송아지 “흑올돌이” (왼쪽) 멸종위기 최우량 정자생산 제주흑우 노령 씨수소 (08'년 도축)


출 생 일 : 2009. 9. 9
제품특징 : 2년 전 노령으로 도축 (14세 령, 2008년 도축) 된 멸종위기의 최우량 정자 생산 제주흑우 씨수소 (육질 1등급이상 95% 흑우송아지 생산한 양질의 정자제공 싯가; 2억 호가) 의 냉동 보관해둔 체세포를 이용해 핵이식방법으로 복원하는데 성공.

- (1) 연합뉴스 (2010-06-16) - 동영상뉴스 1회
 죽은 제주흑우 냉동세포로 복제 성공
- (2) 제주 kbs 뉴스 (2010-06-17) - 동영상뉴스 2회 (뉴스12)
 멸종위기 ‘제주흑우’ 복제 성공
- (3) 제주 kbs 뉴스 (2010-06-17) - 동영상뉴스 1회 (뉴스광장)
 늙어 죽은 ‘제주흑우’ 복제 성공
- (4) koreatimes (2010-06-16)
 Jeju' s black cow cloned 'back to life'
- (5) JoongAngDaily (2010-06-16)
 Researchers clone long-dead bull
- (6) 연합뉴스 (2010-06-16)
 죽은 제주흑우 냉동세포로 복제 성공
- (7) 중앙일보 (2010-06-16)
 제주토종 흑우 복제 소 9개월째 잘 자라
- (8) 조선일보 (2010-06-16)
 최우량 제주흑우 복제 성공


(9) 뉴스한국 (2010-06-16)

 복제 제주흑우 ‘흑올돌이’


(10) 뉴시스 (2010-06-16)

 죽은 소 체세포이식으로 국내 첫 ‘복제’ 성공


(11) 한국일보 (2010-06-16)

 제주흑우 씨수소 냉동체세포로 복제 성공


(12) 한국일보 (2010-06-16)

 멸종 위기 제주흑우 복제 성공


(13) 세계일보 (2010-06-16)

 냉동 체세포로 제주 흑우 복원 성공


(14) 한겨레 (2010-06-16)

 박세필 교수, 제주흑우 냉동세포로 복제 성공


(15) 국민일보 (2010-06-16)

 제주대 박세필 교수..제주흑우서 채취,보관된 체세포로 사후 2년만에 씨수소 복원 성공


(16) 헤럴드경제 (2010-06-16)

 냉동보관 체세포로 멸종위기 제주흑우 씨수소 복제 성공


(17) 문화일보 (2010-06-16)

 최우량 씨수소 ‘제주흑우’ 체세포 복원


(18) 서울신문(2010-06-17)

 제주흑우 복제성공


(19) 제민일보 (2010-06-17)

 멸종위기 제주흑우 복제 성공 개가


(20) 제주의 소리 (2010-06-16)

 2년 전 죽은 소 체세포이식 국내 최초 ‘복제’ 성공 막

(21) 미디어제주 (2010-06-16)

 멸종위기 제주흑우, 대량증식 길 열렸다


(22) 시사제주 (2010-06-16)

 제주축산업의 희망인 ‘흑올돌이’ 국내 첫 공개


(23) 한라일보 (2010-06-17)

 죽은 제주흑우 복제 성공


(24) 제주타임즈 (2010-06-16)

 되살아난 제주 흑우 '흑올돌이'

(25) 제주일보 (2010-06-16)


 국내 최초 냉동 보관 체세포로 흑우 복제 성공

(26) 제주투데이 (2010-06-16)


 멸종위기 제주흑우 복제에 성공

4) 난자의 이용없이 피부세포로 심장근육세포 분화배양 성공 관련 홍보 (총 28건)

(1) 경향신문 (2010-11-22)

 심장근육세포 분화배양 국내 첫 성공


(2) 한겨레 (2010-11-22)

 제주대 “난자 사용않고 줄기세포 분화 배양”


(3) Koreatimes (2010-11-22)

 Can stem cells repair damaged heart?


(4) 제주 KCTV 종합뉴스 (2010-11-22)

 줄기세포 역분화 성공


(5) 제주 MBC 뉴스데스크 (2010-11-22)

 세계3번째 체세포 역분화 줄기세포 성공


(6) 제주KBS NEWS (2010-11-22)

 세계에서 세번째 역분화줄기세포 기술 확립


(7) KBS NEWS 9 (2010-11-22)

 '피부로 만든 심장', 세계3번째 쾌거


(8) KBS NEWS 12 (2010-11-22)

 피부세포로 심장근육 만든다

(9) MBN NEWS (2010-11-22)

 피부세포로 심장근육세포 분화 성공

(10) 제주포커스 (2010-11-22)

 “세계 3번째 심장근육세포 분화배양 성공”

(11) 시사제주 (2010-11-22)



난치병 치료 핵심 줄기세포 기술, 제주대 연구진이 개발

(12) 동아 이코노미 (2010-11-22)



피부세포로 심장 근육세포 만들었다

(13) 한국경제 (2010-11-22)



제주대 박세필 교수팀 “피부세포로 심장근육 만든다“

(14) 파이낸셜 뉴스 (2010-11-22)



심장근육세포 재생 맞춤치료 가능

(15) 한국일보 (2010-11-22)



피부세포로 심장근육세포 분화 성공

(16) 문화일보 (2010-11-22)



피부세포로 심장근육세포 만들었다

(17) 노컷뉴스 (2010-11-22)



“난자 사용않고 체세포로 난치병 치료 가능“

(18) 매일경제 (2010-11-22)



역분화줄기세포로 심장근육 만들었다

(19) 제주일보 (2010-11-22)



피부세포로 심장근육세포 만들다

(20) 제민일보 (2010-11-22)



피부세포로 심장근육세포 분화 성공

(21) 제주도민일보 (2010-11-22)



제주대 박세필 연구팀 피부세포로 심장근육세포 분화 성공

(22) 한라일보 (2010-11-22)



박세필교수팀,맞춤형 세포치료가능성 성과

(23) 제주의소리 (2010-11-22)



제주대 박세필 교수 국내 최초 체세포 역분화줄기세포 배양 성공

(24) 이슈제주 (2010-11-22)



세계 3번째 심장근육세포 분화배양 성공

(25) 미디어제주 (2010-11-22)



“피부세포로 심장근육세포 만든다“

(26) 제주투데이 (2010-11-22)



피부세포 이용 심장근육세포 분화 기술 개발

(27) KBS 뉴스광장 (2010-11-23)



‘피부로 심장만든다’ 세계 3번째 신기술

(28) 매일경제 (2010-11-22)





역분화줄기세포로 심장근육 만들었다

5) 2008. 04. 25 제주일보, 제주흑우 명품화로 미 쇠고기 파고 넘는다


6) 2008. 05. 08 난지농업연구소 제주흑우 브랜드화 전략 세미나 및 육질평가회 개

최, 임금님께 진상했던 제주흑우의 고기 맛 옛 명성을 되찾다


- 7)  2008. 07. 30 제주특별자치도 축산진흥원 보도자료,
수정란이식 사업으로 농가 한우개량효과 증진
- 8)  2008. 12. 22 연합뉴스, 제주흑우, 수입산 맞설 명품으로 키운다

9) 제주시를 빛낸 시민 관련 홍보 (총 6건)


(1) 연합뉴스 (2008-12-26)

 박세필 교수 '제주시를 빛낸 시민'


(2) 제주의소리 (2008-12-26)

 무자년,제주시를 빛낸 시민들


(3) 뉴시스 (2008-12-26)

 제주시, '제주시를 빛낸인물' 선정포창


(4) 제주인터넷뉴스 (2008-12-26)


 제주시를 빛낸 시민 4명 선정


(5) 현대축산뉴스 (2008-12-26)


 제주흑우, 대량증식해 명품만든다


(6) 제주일보 (2008-12-26)


 올 한해 제주시를 빛낸 4인

10)  2008. 12. 31 조선닷컴, '멸종위기' 제주 흑우 되살린다


11)  2009. 01. 02 한겨레, 부활 꿈꾸는 명품 '제주흑우'


12)  2009. 01. 03 SBS뉴스, '멸종 위기' 제주토종 흑우 부활...명품 만든다

13)  2009. 12. 31 연합뉴스, 제주대, '대학을 빛낸 교수상' 수여


14)  2009. 12. 31 뉴시스, 제주대, 박세필.신태균 교수에 '대학을 빛낸 교수상' 수여

15)  2010. 06. 19 시사인제주, 제주흑우목제관련 토크쇼






16)  2010. 07. 29 KBS 6시 내고향, 탐나는 소다.

17)  2010. 07. 31 The Jeju Weekly, Bringing back the dead, 제주흑우 소개

18)  2010.12.16 Jeju at forefront of global stem cell technology

19)  2010. 12, 13 교수신문 [나의 연구실], 미래생명공학과 '생얼'여성연구자

20)  2010. 12. 30 KBS 뉴스네트워크, 제주흑우 복원 사업 성과

- 21)  2011. 01. 01 제주일보 신년특집기획 1탄,
'서울의 밤 밝히며 생명공학 신기원 꿈꾼다.
- 22)  2011. 01. 07 제주일보 신년특집기획 2탄,
'재정부족 등 악조건 딛고 제주발전 큰기대
- 23)  2011. 02. 11 EBS 뉴스, 토종을 지키는 생명공학
- 24)  2010 우수연구성과로 소개, 농림수산식품 연구개발사업,
'임금님진상품 제주흑우의 대량증식 기술'
- 25)  2011. 06. 01 Herald Interview,
Top stem cell expert urges lower regulatory barriers


26) 초급속 냉·해동 체세포핵이식난자로 3년전 죽은 최우량 혈통 제주흑우 씨암소 복제 성공 (총 101건)




2008년 도축된 최우량 암소 (좌) 와 2010년 10월 태어난 제주흑우 씨암소 “흑우순이 “

- (1) KBS 뉴스 (2011-06-13) - 동영상뉴스 1회
 급속 냉·해동 기술로 제주 흑우 복제 - 뉴스12
- (2) 연합뉴스 (2011-06-13) - 동영상뉴스 1회
 “언제든 복제동물 만든다” - 기술 첫 상용화
- (3) SBS 뉴스 (2011-06-13) - 동영상뉴스 1회
 ‘제주 흑우’ 복제 성공- 대량 증식 기반 마련 - 8시뉴스
- (4) MBC 뉴스 (2011-06-13) - 동영상뉴스 1회
 ‘3년전 죽은’ 초우량 제주 흑우, 복제 성공


(5) 제주 KCTV (2011-06-12)

 언제든 동물복제 가능한 '급속 냉동 복제기술' 개발


(6) KCTV 뉴스 (2011-06-13) - 동영상뉴스 1회

 '명품' 제주 흑우 복제 성공 - 저녁뉴스


(7) 제주 KBS 뉴스 (2011-06-14) - 동영상뉴스 1회

 멸종위기 동물 복제 신기술 개발

(8) 아시아 경제 (2011-06-12)

 멸종위기 제주 흑우 씨암소 복원


(9) 연합뉴스 경제 (2011-06-12)

 멸종위기 제주흑우 씨암소 복제 성공


(10) KBS 뉴스 (2011-06-12)

 멸종위기 제주흑우 씨암소 복제 성공


(11) 아시아투데이 (2011-06-12)

 멸종 위기 처한 제주도 흑우, 씨암소 복제 성공


(12) 뉴시스 경제 (2011-06-12)

 제주 흑우 씨암소 유전 복제 성공


(13) 머니투데이 (2011-06-12)

 멸종 위기 제주 흑우 씨암소 17년만에 복원


(14) 동아일보 (2011-06-12)

 “언제든 복제동물 만든다” - 멸종위기 제주 흑우 복제 성공


(15) 연합뉴스 (2011-06-12)

 “언제든 복제동물 만든다 ” - 기술 첫 상용화


(16) 이투데이 (2011-06-12)

 ‘언제든지 복제할 수 있다’ - 기술 첫 상용화


(17) 메디컬투데이 (2011-06-12)

 멸종 위기 '제주 흑우' 복원 성공


(18) 매일경제 (2011-06-12)

 멸종위기 제주 씨암소 ‘흑우순이’ 복원 성공


(19) 국민일보 (2011-06-12)

 제주대 박세필 교수팀, 멸종위기 ‘제주 흑우’ 복제 성공


(20) 세계일보 (2011-06-12)

 멸종위기 ‘제주흑우’ 씨암소 복제 성공


(21) YTN 뉴스 (2011-06-12)

 멸종 위기종 ‘냉동 후 복제’ 첫 상용화


(22) 헤럴드 경제 (2011-06-12)

 ‘언제든 복제동물 만든다’ - 기술 첫 상용화


(23) 디지털타임스 (2011-06-12)

 제주대-생명공학연 “언제든지 복제동물 만든다”


(24) 매일경제 (2011-06-12)

 급속 냉동난자로 제주 흑우 복제 성공


(25) 경향신문 경제 (2011-06-12)

 멸종위기 제주 흑우 씨암소 복제 성공


(26) 전자신문 (2011-06-12)

 언제든 동물복제 가능한 ‘급속 냉동 복제 기술’ 개발


(27) 서울경제 (2011-06-12)

 멸종위기 제주 흑우 씨암소 복제 성공


(28) 이티뉴스 (2011-06-12)

 언제든 동물복제 가능한 ‘급속 냉동 복제기술’ 개발


(29) 제주매일 (2011-06-12)

 제주흑우 씨암소 복제 성공 - 세계 최초 복제수정란 초급속 냉.해동기술로 복원


(30) 아시아경제 (2011-06-12)

 멸종위기 제주 흑우 씨암소 복원


(31) 아시아투데이 (2011-06-12)

 멸종위기 처한 제주도 흑우, 씨암소 복제 성공


(32) 연합뉴스 사회 (2011-06-12)

 갓 태어난 흑우순이


(33) 연합뉴스 사회 (2011-06-12)

 갓 태어난 흑우순이


(34) 연합뉴스 사회 (2011-06-12)

 갓 태어난 흑우순이


(35) 연합뉴스 사회 (2011-06-12)

 갓 태어난 흑우순이


(36) 연합뉴스 사회 (2011-06-12)

 갓 태어난 흑우순이


(37) 연합뉴스 사회 (2011-06-12)

 갓 태어난 흑우순이


(38) 연합뉴스 사회 (2011-06-12)

 갓 태어난 흑우순이


(39) 연합뉴스 사회 (2011-06-12)

 갓 태어난 흑우순이


(40) 연합뉴스 사회 (2011-06-12)

 복제 흑우 ‘흑우순이’ 탄생


(41) 이티뉴스 (2011-06-13)

 흑우 복제기술 상용화 한 줄기세포연구자 ‘인간 복제도 가능하다’ 주장


(42) FNN (2011-06-13)

 동물복제 언제든 OK!


(43) 뉴스엔 (2011-06-13)

 제주 흑우 복제성공, 멸종위기종 세계최초 기술로 17년만에 복원


(44) 한겨레 (2011-06-13)

 흑우복제’ 박세필 교수 “인간 복제도 가능하다”


(45) 연합뉴스 (2011-06-13)

 “언제든 복제동물 만든다”


(46) 소비자 연합 타임즈 (2011-06-13)

 제주흑우 어떻게 복원했나


(47) 연합뉴스의약신문 (2011-06-13)

 신기술로 복제한 제주도 흑우들


(48) 세계일보 (2011-06-13)

 멸종위기 동물 대량복제 길 열렸다


(49) 중앙일보 (2011-06-13)

 죽은지 3년 만에 - ‘명품’ 제주흑우 씨암소 복제 성공


(50) 포커스 신문 (2011-06-13)

 동물 복제 언제든 OK!


(51) 연합식품의약신문 (2011-06-13)

 세계최초 개발 초급속 냉·해동기술, 마침내 제주 흑우 복원 성공


(52) 뉴시스 (2011-06-13)

 죽은지 3년만에 다시 태어나- 흑우복제 성공


(53) 소비자연합타임즈 (2011-06-13)

 세계최초 초급속 복제수정란 냉·해동기술 개발


(54) 뉴시스 (2011-06-13)

 “인간 복제 가능하다” - 흑우복제 박 교수 발언 ‘눈길’


(55) 뉴스엔 사회 (2011-06-13)

 제주 흑우 복제 성공, 멸종위기종 세계 최초 기술로 17년만에 복원


(56) 뉴시스 (2011-06-13)

 흑우 복제 연구성과 브리핑하는 박세필 교수


(57) 뉴스웨이브 (2011-06-13)

 멸종위기 제주 흑우 복원 성공


(58) 연합뉴스 (2011-06-13)

 박세필, 초급속 냉·해동 신기술 설명


(59) 연합뉴스 (2011-06-13)

 박세필, 초급속 냉·해동 신기술 설명


(60) 연합뉴스 (2011-06-13)

 박세필, 초급속 냉·해동 신기술 설명


(61) 연합뉴스 (2011-06-13)

 박세필, 초급속 냉·해동 신기술 설명


(62) 연합뉴스 (2011-06-13)

 초급속 냉·해동 기술로 복제한 흑우


(63) 연합뉴스 (2011-06-13)

 초급속 냉·해동 기술로 복제한 흑우


(64) 연합뉴스 (2011-06-13)

 초급속 냉·해동 기술로 복제한 흑우


(65) 연합뉴스 (2011-06-13)

 초급속 냉·해동 기술로 복제한 흑우


(66) 연합뉴스 (2011-06-13)

 초급속 냉·해동 기술로 복제한 흑우


(67) 푸드투데이 (2011-06-13)

 멸종 위기 제주 흑우 복원 성공


(68) 경향신문 (2011-06-13)

 제주대, 신기술 복원 제주흑우 복제송아지 공개


(69) ZDnet Korea (2011-06-13)

 제주대연구팀, “인간복제, 불가능 아니다”


(70) 전자신문 (2011-06-13)

 흑우 복제기술 상용화 한 줄기세포 연구자 “인간복제도 가능하다” 주장


(71) 공감코리아 (2011-06-13)

 멸종위기 제주 흑우 복원 성공


(72) 서울신문 (2011-06-13)

 급속 냉·해동 수정란으로 제주 흑우 복제


(73) 뉴시스 (2011-06-13)

 제주흑우 복제 성공 브리핑하는 박세필 교수


(74) Korea times (2011-06-14)

 cloning powerhouse


(75) 어린이 동아 (2011-06-14)

 멸종위기종 냉동복제시대 열렸다

(76) 동아일보 (2011-06-14)

 [제주] 언제든지 손쉽게 복제동물 만든다


(77) Focus (2011-06-14)
















 신기술로 복제한 제주도 흑우들

(78) 뉴테일리 (2011-06-14)


 '멸종위기 '제주黑牛' 복제 성공했다'

(79) 한국경제 (2011-06-16)


 신기술로 복제한 제주도 흑우들

- (80) 한국경제(보도자료) (2011-06-16)
 한국 라엘리안, 박세필 교수 멸종위기 제주흑우 복제 성공 지지
- (81) 뉴데일리 (2011-06-16)
 “멸종위기 ‘제주黑牛’ 복제 성공했다“
- (82) 제주투데이 (2011-06-12)
 멸종위기 제주흑우, 복원 작업 ‘가속화’
- (83) 제주포커스 (2011-06-12)
 멸종위기 제주흑우 씨암소 복원 ‘성공’
- (84) 제민일보 (2011-06-12)
 멸종위기 제주 흑우 복원 성공
- (85) 제주의 소리 (2011-06-12)
 복제동물 맘만 먹으면 언제든 만들 수 있다고?
- (86) 제주매일 (2011-06-12)
 제주흑우 씨암소 복제 성공
- (87) 제주일보 (2011-06-12)
 멸종 위기 제주 흑우 씨암소 17년 만에 복원
- (88) 미디어제주 (2011-06-13)
 복원성공! 멸종위기 제주 흑우 ‘17년만에 되살아나다’
- (89) 시사제주 (2011-06-13)
 3년 전 죽은 씨암소가 내 눈 앞에 - 제주흑우 복제 성공
- (90) 제주도민일보 (2011-06-13)
 멸종위기 동물 대량생산 길 열렸다
- (91) 뉴스제주 (2011-06-13)
 박세필 교수팀, 제주흑우 씨암소 복제 성공
- (92) 제주의 소리 (2011-06-13)
 세계 최초 ‘체세포 핵이식 초급속 냉해동’ 기술 씨암소 복제
- (93) 제주인터넷 뉴스 (2011-06-13)
 박세필 교수팀, 제주흑우 씨암소 복제 성공
- (94) 뉴스제주 (2011-06-13)
 “인간 복제 가능하다” - 흑우 복제 박교수 발언 눈길


(95) 제주도민일보 (2011-06-13)

 복제소 ‘흑우순이’


(96) 제주인뉴스 (2011-06-13)

 멸종위기 제주흑우 17년 만에 복원 성공


(97) 한라일보 (2011-06-13)

 박세필 교수 “인간복제 가능하다”


(98) 헤드라인제주 (11-06-13)

 멸종위기 ‘제주흑우’ 씨암소 복제 성공


(99) 제주일보 (2011-06-13)


 멸종동물 복원 상용화 ‘눈앞’


(100) 제주일보 칼럼(2011-06-14)


 제주와 블랙푸드


(101) 제주일보 칼럼(2011-06-14)


 제주흑우 복원 박세필 교수팀의 성과

27)  2011. 06. 24 The Jeju Weekly, Jeju black cow to be cloned, commercialized,

28)  2011. 06. 30 아시아경제, 즐기세포 권위자, 코스닥 투자 받은 이유

29)  2011. 07. 06 한겨레, 죽은 제주 흑우, 복제기술로 살아나다!

30)  2012. 05. 22 한라일보, 도, 제주흑우명품 브랜드화 육성 추진

31)  2012. 05. 26 YTN, ‘제주흑우’ 명품 브랜드로 육성

32) 소 복제효율 높이는 신기술 도입 관련 논문 게재 홍보 (총 15건)

교육/과학제주대 박세필 교수팀 보유 소 복제 신기술, 국제학술지에 실려


데스크승인 2012.08.20김문기 기자 | kafka71@jejunews.com



제주대학교 생명공학부 박세필 교수팀과 (주)미래생명공학연구소(소장 김은영)가 2010년 제주흑우 씨암소 복원에 사용한 ‘무염색 난자핵 제거방법(Oosight Imaging System)’ 기술이 복제 및 줄기세포 관련 국제저명 학술지 ‘Cellular Reprogramming’ 8월호 온라인판에 실렸다.

‘복제와 줄기세포’ 관련 국제저명저널인 “Cellular Reprogramming” 8월 온라인 “판에 게재


(1) KBS 뉴스 (2012-08-21) - 동영상뉴스 1회

 소 복제 성공률 두배로 높인다


(2) 제주 mbc 뉴스 (2012-08-20) - 동영상뉴스 1회

 체세포 복제 신기술 개발 - (뉴스데스크) (10분 25초)


(3) KCTV 뉴스 (2012-08-20) - 동영상뉴스 1회

 소 복제 신기술 ‘국제인증’ - 5시뉴스


(4) JBS (2012-08-20)

 소 복제기술 첫 세계 공인


(5) 매일경제 (2012-08-20)

 제주대 박세필 교수팀, 소 복제 성공률 두배 높여


(6) 경향신문 (2012-08-20)

 제주대, 소 복제 신기술 개발


(7) 연합뉴스 (2012-08-20)

 “소 복제 성공률 높이는 방법 찾았다“


(8) 연합뉴스 (2012-08-20)

 향상된 소 복제 기술 설명하는 박세필


(9) 연합뉴스 (2012-08-20)

 소 복제 성공률 높인 박세필


(10) 뉴시스 (2012-08-20)

 박세필 연구팀, 소 복제효율 높이는 신기술 발견


(11) 뉴시스 (2012-08-20)

 국제저명저널에 게재된 소 복제효율 높이는 신기술


(12) 제주도민일보 (2012-08-20)

 소 복제 효율 2배 높이는 신기술 개발


(13) 제주의소리 (2012-08-20)

 제주대 박세필교수 소 복제 신기술, 세계가 인정

(14) 제민일보 (2012-08-20)

 “소 복제효율 두 배로 높였다“

(15) 시사제주 (2012-08-20)

 “소 복제 성공률 높이는 신기술 개발됐다“

33) JRD 아웃스탠딩 페이퍼 어워드 수상 관련 홍보 (총 10건)

제주대 줄기세포팀, 'JRD 아웃스탠딩 페이퍼 어워드' 수상

박세필 교수팀, 한국 줄기세포 기술 전 세계에 알려

2012년 09월 10일 (월) 09:55:30
이보람 기자 webmaster@jejutoday.com




▲ 박세필 교수·김은영 연구소장

제주대학교 줄기세포연구센터 박세필 교수팀이 'JRD 아웃스탠딩 페이퍼 어워드'를 수상했다.


제주대학교는 최근 일본 츠크바 대학교에서 진행된 일본 번식생물학회 주최 '2011년도 JRD 아웃스탠딩 페이퍼 어워드' 수상자로 박 교수 연구팀이 선정됐다고 10일 밝혔다.

제주대학교에 따르면 박 교수 연구팀의 협동연구 책임자인 미래생명공학연구소 김은영 소장은 '배아줄기 세포유래 생리활성 물질이 착상 전 배아발달에 효과적인 영향을 준다'는 내용을 증명한 논문을 제출, 우수성을 인정받았다.


이번 연구는 농림수산식품부 생명산업기술개발사업(과제번호308008-5)과 제주도의 지원을 받아 '제주흑우의 대량증식 기술개발 및 산업화' 연구의 일환으로 진행된 것이다.

JRD 아웃스탠딩 페이퍼 어워드 수상


(1) 제민일보 (2012-09-11)

 제주대 박세필 교수팀 일본서 최우수논문상


(2) 파이낸셜뉴스 (2012-09-10)

 제주대 박세필 교수팀, 일본 아웃스탠딩 페이퍼 어워드 수상


(3) 제주의소리 (2012-09-10)

 제주대 박세필 교수팀, 일본 저명 학회지서 논문상


(4) 뉴스타운 (2012-09-10)

 제주대 줄기세포팀 박세필 교수팀, JRD Outstanding Paper Award 수상


(5) 메디파나 뉴스 (2012-09-10)

 제주대 박세필 교수팀, 줄기세포 성공가능성 입증
JRD Outstanding Paper Award 수상...“귀중한 연구결과“


(6) 뉴시스 (2012-09-10)

 제주대 줄기세포 팀 'JRD 아웃스탠딩 페이퍼 어워드' 수상


(7) 약업신문 (2012-09-10)

 제주대 줄기세포팀, '아웃스탠딩 페이퍼 어워드' 수상


(8) 미디어제주 (2012-09-10)

 박세필 교수팀 '아웃스탠딩 페이퍼 어워드' 수상

(9) 제주투데이 (2012-09-10)

 제주대 줄기세포팀, 'JDR 아웃스탠딩 페이퍼 어워드' 수상

(10) 시티신문 (2012-09-10)

 제주대 줄기세포연구센터 '아웃스탠딩 페이퍼 어워드' 수상

제2절 성과활용 계획

1. 확립된 유전자 marker 체계를 활용한 친자감별확인과 도체 형질분석 통한 우수유전능력 제주흑우 발굴

- 제주흑우에 적합한 친자확인체계로서 선발된 MS 8 종, indel 5 종, MC1R의 SNP 1 종 등 최종 14마커(15좌위)를 제주흑우실용화축군의 친자확인 및 생산이력추적체를 위한 동일성 검사 marker로 활용함과 아울러 최근 천연기념물로 지정된 제주흑우의 우량형질선발과 원종 확립 및 보존 확립에 크게 기여할 것으로 사료됨.



*** 제주흑우용 marker 체계의 설계**

- 1 SNP: MC1R (모색관련 필수 검사항목)
- MS & Indel marker: PIC가 높고 증폭 효율이 뛰어난 marker 선별
MS 8 종, Indel 5 종
- 총 14 종의 marker 체계

- 향후 SNP chip 대량분석은 제주흑우와 일본흑모화우 특이적인 SNP 발굴과 각 품종 집단에서의 빈도 및 분포를 분석하여 제주흑우와 일본흑모화우 특이 SNP 조합을 통한 품종식별체계를 구축하고 제주흑우와 한우, 칠포, 충북흑우 등 타 품종과의 특이 SNP 발굴 및 집단 분석을 통한 개별품종 간 식별체계를 구축하는데 이용될 것임.
- 이를 토대로 향후 genome-wide association test를 진행하고 현재 제주도 도축현장에서 제주흑우 및 제주흑우실용축 도체형질(근내지방도, 도체중, 등지방두께, 등심단면적, 육색, 조직감) 분석시스템이 잘 이뤄지고 있어(아래그림 참조) 관련 최상위 연관 유전자군의 선발과 후보유전자형 발굴하는데 가일층 탄력을 받을 것으로 여겨짐.

◆제주흑우 원종 도체 근내지방 분석 자료



2012.9.14 도축, 212 13 1+B 축산진흥원 039444105

2012.1.11 도축, 223 13 1+B 축산진흥원 039444076



2012.1.11 도축, 212 13 1+B 김권호 032237565

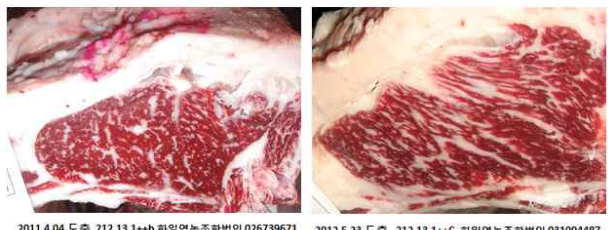
2012.9.17 도축, 219 13 1+B 김권호 051319509

◆제주흑우 실용축 도체 근내지방 분석 자료



2012.7.1 도축, 207 13 1++A 송동원 051318772

2012.1.10 도축, 231 13 1++B 송봉실 035736378

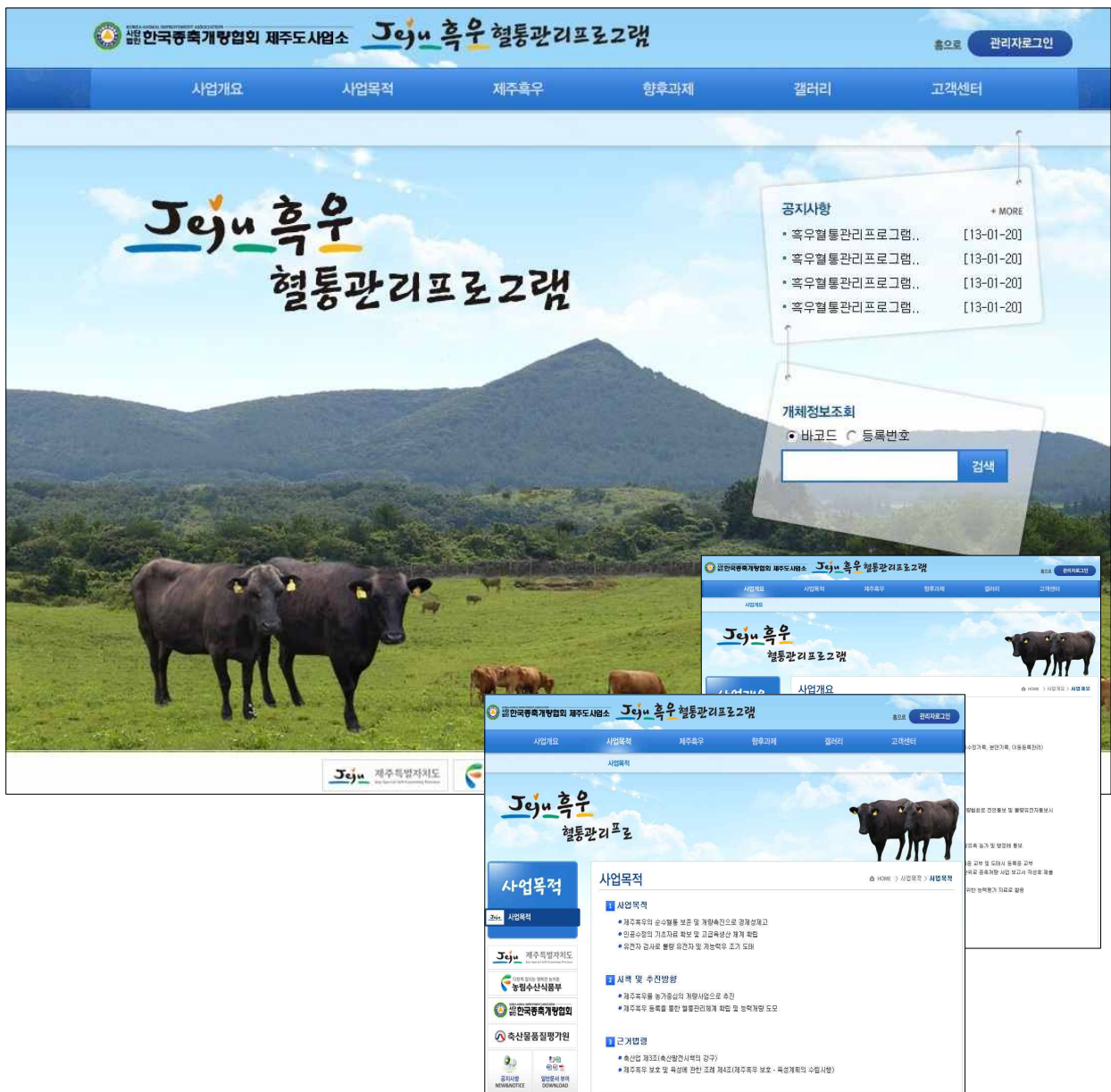


2011.4.04 도축, 212 13 1++b 최일영농조합법인 026739671

2012.5.23 도축, 212 13 1++C 최일영농조합법인 031994487

2. 제주흑우 전용 홈페이지를 통한 제주흑우 전수 공개로 소비자 니즈 충족

- 본 연구 과제를 통해 획득된 제주흑우 대량증식 기반기술 자료를 활용하여 앞으로 청정지역 제주특별자치도가 내세운 대표상품으로 ‘제주흑우’를 일본의 화우브랜드처럼 세계적인 브랜드로 성장 시켜 나갈 목적으로 i) 제주흑우의 순수혈통 보존 및 개량촉진으로 경제성 제고 ii) 인공수정의 기초자료 확보 및 고급육생산 체계 확립 iii) 유전자 검사로 불량 유전자 및 저능력우 조기 도태 업무와 자료공개.
- 소비자의 알권리차원에서 제주지역에서 서식하고 도축되는 제주흑우와 실용축 전수 이력을 손쉽게 확인할 수 있는 홈페이지를 제작 (아래그림 참조) 사용할 예정임 (조만간 제작완료).
- 세계 7대 자연경관 제주에만 서식하는 천연기념물 제546호 제주흑우는 개량과 증식을 통해 축산농가 소득에도 기여할 수 있는 효자상품이 될 수 있을 것으로 기대해 봄.





향후과제

향후과제

Jeju 제주특별자치도

농림수산식품부

한국농축협협의회

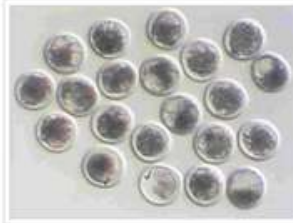
축산물품질평가원

공지사항
 NEWS/NOTICE

회원
 회원가입
 DOWNLOAD

향후과제

HOME > 향후과제 > 향후과제



제주도는 흑우 육성사업 및 맞춤형 사업등 원형종사업에 건력적인 준비를 하고 사육두수 증가와 지역특산물화를 위한 기반시설을 강화하고 있는 실정이다. 서귀포시와 서귀포축협은 이에 부응하여 현장에서 순조롭게 진행되고 있으나, 제주시 지역은 농가들의 소극적인 자세를 보이고 있다. 현실적으로 도와 양축협이 제주흑우사업을 진행시키기는 어려움이 많다고 생각된다. 현재 진행되는 제주흑우사업에서 농촌진흥청 난자연구소와 축산진흥원은 흑우종모우 정책공급과 수정난채란, 유전자분석등이 이루어지고 있는 실정이다. 그림17은 축산진흥원에서 채란된 흑우수정난이며 그림18은 일반한우에 수정난미석을 통하여 개인농가에서 생산한 제주흑우송아지이다. 그림19은 흑우의 마블링 사진이며, 현장에서 이러한 사업은 진행되고 있지만 기반 환경이 너무나 미약한 현실이다. 흑우공판우 및 이식할 수란을 선발등 인력확보문제도 시급한 상황이다. 이러한 문제점을 보완하기 위해서는 농림수산식품부가 내륙에 지역적 광역브랜드 한우사업도 중요하지만 제주흑우사업도 애정을 가지고 현실적인 지원이 필요하며, 흑우에 체계적인 관리 시스템을 가동하기 위해서는 가형 제주흑우연구소가 필요한 실정이다. 관이 주도하지 않고 민간연구팀이 고유업무를 수행하고 흑우생산 농가와 흑우경영이라는 틀을 새로이 만들어 내는 이러한 구조조정이 없이는 제주에 흑우사업은 어려움이 적잖을 것으로 생각된다.

제주흑우연구소 향후 핵심 주업무

- 제주흑우 혈통체계화(가형-제주흑우연구소)
- 흑우종모우 거양육을 국대화(생산 및 등록, 경력선정)
- 흑우종모우 능력검정실시(협조기관 : 한국농축협협의회, 서산한우개발사업소, 축산과학원, 난자연구소)
- 흑우종모우 유전자 다양성확보(협조기관 : 미래성장공헌연구소, 충북대학교, 전남대학교, 제주대학교)
- 흑우종모우 고급육을 위한 프로그램개발(제주흑우협회 TMR사료개발 및 흑우가세우 고급육프로그램 기술개발)
- 흑우종모우 선양을 위한 흑우 전문 육종농가 1차 5개소 운영 (제주흑우 우수종번우확보, 후대검정축군생산, 수정난이식 및 체세포복제)



이러한 일그림이 완성되어야만 흑우사업은 차질없이 진행될 것이며, 현실중에서 제주축산에 관여하는 모든이들의 동참과 애정을 가져주어야 이 사업이 진행될 것이며, 지금 현 가성세대가 꼭 해결되어야 할 과제라고 생각된다. 제주축협과 제주흑우는 축협의 땅에 내려주신 고귀한 전통이며 이러한 우수유전자를 현실에서 접목시키지 못한다면, 매우 가슴아픈 일이다. 이 지면을 마감하면서 필드에서 업무를 수행하는 연구인력과 흑우를 사랑하는 농가들에게 고마움을 전하면서 내용이 미흡하다라도 이해하여 주시기를 바라며, 지면을 마감하고자 한다.



사업개요

사업목적

절리리

1:1 문의

운영지시에 해당도내거

한국농축협협의회 제주도시업소
 Jeju 흑우 혈통관리프로그램

사단법인 한국농축협협의회 제주도시업소 | 대표자: 전상익 | 사업자등록번호: 616-82-14396
 제주도 제주시 노형동 315-7 (축산진흥원 내) | TEL: 064-712-6637 | FAX: 064-712-6637 | E-mail: chongdal@hanmail.net
 COPYRIGHT (C) 2013 사단법인 한국농축협협의회 제주도시업소. ALL RIGHTS RESERVED.

3. 구축된 기반·설비를 이용한 수정란이식사업의 활성화유도

가. 자동화 기계 이용으로 정액데이터베이스구축을 통한 우수 정액 스트로 제조

- 제주흑우 대량생산을 위해 그 동안 본 과제의 반기별 협의회를 통해서 흑우정액 분석, 흑우 동결정액스트로를 이용한 체외수정란 생산과 성감별을 통해 현대화된 흑우 정액활용의 필요성을 피력해옴.
- 제주특별자치도 축산진흥원과 국립축산과학원 난지축산시험장은 두 기관 내에 자동화된 장비를 구입하고 이용하도록 유도한 계기가 됨(아래그림 참조).
- 본 장비는 도내 흑우정액 생산의 재정비를 위한 새로운 개념과 취지로 활발히 활용될 것임.
- 제주흑우 원정액 상태가 나쁘지 않으므로 제주흑우 정자의 생존능과 운동성이 잘 유지 되도록 동결스트로가 제조 활용됨으로서 임신율 뿐 만아니라 건강한 제주흑우 송아지 생산이 가능하여 제주흑우 개량에 일조할 것으로 사료됨.



정액성상분석기 (CASA)



정액자동분주장치 (축산진흥원)



정액동결기 (축산진흥원)



정액자동분주장치
(MPPUNO, 독일/제주 난지축산시험장)

나. 수정란이식사업을 기관 주도형에서 농가와 기관혼합형으로 활용

○ 제주흑우는 아직 개체두수가 적어 체내수정란 이식사업은 그 동안 제주도 축산진흥원 (아래 그림 참조) 과 국립축산과학원 난지축산시험장 두 기관에서 보유중인 암소 위주로 과배란에 따른 인공수정 후 체내수정란을 만들어 기관주도형으로 농가에 이식사업을 추진해옴.

○ 일례로 축산진흥원 소유 암소 (B204005)에서 7cycle에서 74개의 정상수정란을 얻어 70개의 수정란을 이식하여 다수의 산자를 생산할 정도로 수정란이식기술은 안정화단계에 있는 기술임.



- 반면에 농가(아래그림 참조)가 보유중인 암소 (B9035)에서도 5개의 수정란을 이식해 5두의 송아지를 생산해 낼 수 있을 정도로 기술보급에 따라 수정란이식기술이 발전해옴.

◆농가공여소를 활용한 제주흑우 증식 사례



- 이는 그동안 본 과제로부터 현장으로의 기술접목과 기관연수교육에 따른 결과로 사료됨.
- 뒷부분에 제시된 제주특별자치도와의 “우량 제주흑우 체외수정란 이식사업” 협약체결이 이루어지면 수정란이식 사업은 명실 공히 기관 주도형에서 농가와 기관혼합형으로 활용되어 제주흑우의 증식사업에 큰 기폭제가 될 수 있을 것으로 판단됨.

다. 초급속 간편 동결 용해 기술이용

- 한편, 본 연구팀에 의해 개발된 초자화동결/1-단계 용해 후 직접이식기술 방법의 유용성 및 안전성은 이미 체외수정란을 이용한 선행연구로서 제주도 일부 농장에서 시행한 한우 엘리트 송아지 생산 시도에서 40% 분만을 (4/10) 을 획득하여 그 가능성을 확인한 바 있음 (Park 등, 2008). 이러한 안정된 동결-용해 기술을 바탕으로 본 연구에서는 2007년에 냉동 보관해둔 제주특별자치도 축산진흥원 보유의 제주흑우 암소의 귀 체세포를 이용해 핵이식 배반포기배를 생산하고 2개씩을 각 스트로에 장착하여 초자화동결 방법으로 보관해 두었다가, 그 중 일부를 초간편 용해법으로 녹인 후 이식하여 '현존하지 않는 최우량 혈통 제주흑우 씨암소 종을 복원'하는데 성공하였음.
- 따라서, 본 연구에서 개발된 초자화동결과 1-단계 용해 및 직접 이식 기술은 체내외 수정란 활용에 효과적으로 이용될 수 있을 것이며 제주흑우의 대량 증식 기술 개발 및 산업화의 기반 기술구축뿐만 아니라 구제역등 예견되지 않는 자연환경질환으로 인해 사라지는 우수 종 보존과 멸종위기의 우수 혈통 복원에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대됨.

4. 제주흑우 대량증식을 통한 제주흑우 판매유통 산업화 기반 활성화

- 본 연구진은 최첨단 생명공학 기술을 이용하여 제주흑우 씨수소와 씨암소를 복제하였고 총 154건의 제주흑우와 복제소 관련 홍보를 하여 멸종위기 제주흑우의 보존의 필요성과 고려 시대부터 임금님 진상품으로 제공되었다는 웰빙식품으로서 제주흑우를 전국에 알리고 본 연구의 중요성을 언론매체를 통해 보도한 바 있음.
- 이를 계기로 현재 제주특별자치도내에는 서귀포소재 ‘제주흑우명품관’ 과 제주시에 ‘누렁소 물고가는’ 이라는 전용식당 (아래그림 참조) 이 있어 제주를 방문하는 관광객들과 일부 제주흑우 고기 맛을 아는 고객들의 입을 통해 홍보가 생산과 유통을 유도하는 견인차가 되고 있음.
- 또한 압구정 현대백화점과 농가들 (아래그림 참조) 과의 유통판매계약을 통해 차별화된 고급육 웰빙식품으로 농가소득에 기여할 수 있을 것으로 여겨지며, 대량생산 기반기술이 구축됨으로서 농가의 유통참여 수는 더욱 더 증가할 것으로 판단됨.
- 다만 초기 산업화단계로서 체계적인 유통산업화가 이루어질 수 있는 system이 마련되어야 할 것으로 사료됨.

◆제주흑우판매점



압구정, 현대백화점



서귀포, 흑한우명품관



제주시, 누렁소물고가는

◆압구정 현대백화점 계약농가



김권호농가



양경대농가



김두봉농가



양철우농가



5. 제주흑우 천연기념물 제546호 지정에 따른 제주특별자치도와 제주대학교 줄기세포연구센터 간 “우량 제주흑우 체외수정란 이식사업협약” 으로 활성화

○ 제주흑우는 본 연구과제를 추진할 당시 2008년 등록우 96두 였으나 2008년 등록규정이 개정되고 2009년까지 증식된 개체에 대해 등록을 실시하여 2009년 12월 기준 등록우가 217마리로 증가되었고, 2011년 기준으로 335마리까지 증가되었으며, 2012년부터 2013년 6월까지 총 125마리가 등록 관리되고 있음.

제주 흑우 천연기념물 됐다
 제주흑우가 천연기념물 제546호로 22일 지정됐다.

제주도 축산진흥원은 문화재청이 제주흑우를 국가지정문화재 천연기념물 제546호로 지정, 이날 안전행정부 관보에 공고했다고 밝혔다. 제주도는 이에 따라 1986년 제주마 천연기념물 지정에 이어 전국 최초로 2개 축종의 천연기념물을 보유하게 됐다.

축산진흥원은 1992년부터 제주 흑우 유전자원을 수집하고 혈통관리를 통한 흑우집단 증식을 추진해왔다. 또 국제식량농업기구에 제주흑우를 지역 재래가축으로 등재했으며, 제주흑우 보호 육성에 관한 조례도 제정했다.



천연기념물 제546호로 지정된 제주 흑우. | 제주도 축산진흥원 제공

축산진흥원은 앞으로 제주대 줄기세포연구센터 박세필 교수팀과 업무 공조를 통해 제주흑우 대량 증식을 위한 유전자 확보, 체외 수정란 생산보급 등 흑한우 수정란의 안정적 공급과 증식을 위한 기반을 마련할 계획이다. 축산진흥원은 천연기념물 지정에 따라 제주흑우 종 보존 대책을 수립하고, 지역특화산업의 토대를 마련해 제주흑우 글로벌 명품화 블루오션 산업 진출을 추진할 방침이다.

축양동물중 천연기념물로 지정된 동물은 진도 진도개, 연산 오계, 제주 제주마, 경산 삽살개, 경주 개 동경이 등 5종이다.

<김홍균 기자 khk5056@kyunghyang.com>

입력 : 2013-07-22 15:28:53 | 수정 : 2013-07-22 15:28:53

Copyright©The Kyunghyang Shinmun. All rights reserved.

○ 또한, 등록우에서 생산된 등록심사 대상 축 150마리로 사육관리 과정에서 비육출하거나 도태로 자연 감소된 개체포함하면 총 610여 마리로 5년간 제주흑우 수가 6.4배 증식 효과가 있었음.

○ 제주흑우의 연구 필요성은 본 연구가 진행된 5년간 지속적인 연구 성과 홍보로 이어져 대내·외적으로 알리는 계기가 되었으며, 제주흑우등록 사업이 계속적으로 진행되어 원원종 보존이 체계적으로 잘 이루어진 것이 파악되어 최근에 (2013년 6월 27일) 문화재청으로부터 “제주흑우를 천연기념물 제546호로 지정” 되어 2013년 7월 22일 안전행정부 관보에 공고됨.

○ 따라서 제주특별자치도는 ‘제주흑우 대량증식을 위한 장기 발전방향 로드맵’ 일환으로 본 연구주관기관인 제주대 줄기세포연구센터와 “**우량 제주흑우 체외수정란 이식사업**” 협약체결 (뒷 페이지 참조) TF팀을 운영 중에 있어 제주흑우 증식을 위해 본 연구 사업으로 얻어진 ART기법 등이 효율적 기여를 할 것으로 사료됨.

- 양축농가 서비스 질 향상을 위한 -
우량 제주흑우 체외수정란 이식사업

- 발생공학분야 기술력이 우수한 도내 대학교 연구소의 전문인력을 활용 우수 수정란이식 희망농가 서비스 질 개선
- 우량 한우 및 제주흑우 증식 및 개량을 위해 다양한 수정란 생산 활용방안 강구

검토배경

- 육질등급 차등화에 따른 비육우 판매가격 차이가 커짐에 따라
⇒ 한우 능력개량에 대한 양축농가의 관심이 높아짐
- 체외배양기술 발달로 도축되는 한우 암소를 활용한 수정란 생산 이식에 의한 우수 혈통 송아지 생산 희망농가 증가

추진방향

- 우수한 체외배양기술 보유 제주대학교 줄기세포연구센터 연구팀 활용 희망농가 암소 체외수정란 생산을 위한 추진 및 제주흑우 체외수정란 이식 사업 센터 (제주대학교 줄기세포연구센터)를 둔다.
- 생산 수정란 및 송아지 수정란 혈통증명서 발급 및 친자감별 혈통관리
- 기관 간 공동사업 추진을 위한 협약 체결하여 사업추진

추진계획

가. 공란우 확보 및 체외수정란 생산

- 담당기관
 - 공란우 확보 : 축산진흥원(지역축협, 종개협 및 축산물품질평가원)
 - 체외수정란 생산 : 제주대 줄기세포연구센터
- 공란우 선정 대상
 - 후대 수송아지 도체성적이 우수한 한우 암소
 - 제주흑우 등록우 중 번식장애 및 노령으로 도태 예정인 개체
- 공란우 모니터링 및 선정 방법(수요조사)
 - 우량암소 수정란 생산 희망 농가 조사 및 개체정보 확인
 - 개체바코드 번호, 등록정보 및 도체성적 정보 파악
 - ※ 도태축 활용 한우 및 제주흑우 체외수정란 생산 동의서 작성

- 공란우 도태 시기 및 생산된 수정란 이식계획 확인
- 도축 일정, 수정란이식 시기 및 대리모 확보 상황 확인
- 공란우 대상축 유전자 정보 구축을 위한 현장확인 혈액채취
- 혈액 DNA를 추출 송아지 생산시 친자감별용 활용

○ 난소채취 및 체외수정란 생산

- 난소채취 : 제주대 줄기세포연구센터(협조 : 제주축협)
- 체외수정란 생산 : 제주대 줄기세포연구센터
- 체외수정란 생산용 제주흑(한)우 정액 공급: 축산진흥원
- 공란우 제공 농가의 수정란 이식 희망 일정에 맞추어 난소채취 및 수정란 생산
- 수정란이식에 활용하고 남은 수정란은 동결보존 후 활용
- ※ 제주흑우 정액의 사용제한
- 한우 도축 난소를 활용한 실용화 흑우 체외수정란 생산 금지

나. 체외 수정란 증명서 발급 및 수정란 이식

○ 수정란 혈통 및 이식증명서 발급 농가배부

- 생산 수정란 혈통기록 확인 : 수정란 생산일지 확인
- 체외수정란 혈통 및 이식증명서 발급신청
- 축산진흥원 ⇒ (사)한국종축개량협회 한우개량부

○ 수정란 농가 공급

- 공급담당 : 제주대학교 줄기세포연구센터
- 공 급 선 : 수정란 이식 시술자를 통해 이식 농가에 공급
- 수정란 공급가격 : 무상공급을 원칙으로 함
- 공급된 수정란에 대해서는 수정란 인수증을 작성 보관(양식 별첨)

○ 수정란 농가이식

- 수정란이식 희망농가 대리모 준비상황을 파악하고 체외수정란 생산일정에 맞추어 발정동기화 처리 유도
- 신선란으로 이식할 경우 수정란 이식전 발정동기화 처리 대리모의 황체 검사를 통해 수정란이식 대상축을 확정하여야 함
- 수정란이식축에 대한 이식확인서 작성 비치(양식 별첨)

다. 수정란이식 수태·분만 조사

○ 수정란 이식 확인 및 수태·분만 조사

- 조사담당 : 축산진흥원
- 조사방법
- 수정란이식 확인서를 기초로 분만 예정일 전후에 분만확인
- 송아지 분만후 1개월 전후에 송아지 친자감별용 혈액채취 및 친자감별

라. 행정사항

○ 업무협약

- 협약기관 : 축산진흥원, 제주대학교 줄기세포연구센터
- 주요사항
 - 도축되는 한우(제주흑우) 암소활용 체외수정란 생산
 - 제주흑우 증식을 위한 수정란 배양기술 활용
 - 우량한우 및 제주흑우 수정란 혈통 및 이식증명서 발급
 - 체외수정란 생산 협력기관 지정
 - ※ 공동업무 추진을 위한 협약서 : 별첨

○ 공란우 난소채취 지원요청

- 담당기관 : 축산진흥원
- 협조기관 : 제주축산업협동조합장
- 추진사항
 - 수정란 생산용 도축 공란우 난소채취 협조 요청

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 제주흑우 수정란 생산 및 이식 체계 확립

수정란 이식 기술은 번식 효율 증대 및 가축 개량에 매우 유용한 기술로 우수 유전형질을 보유한 암 가축으로부터 과배란을 유도 후 다수의 수정란을 회수하거나 도축된 난소로부터 난자를 회수하여 체외수정란을 생산하고 이를 다른 개체에 이식하는 것으로 국내외에서 이식 두수가 증가하고 있는 추세임.

년도	체내수정란이식		체외수정란이식	
	신선수정란	동결수정란	신선수정란	동결수정란
1987	48	31		41
1988	51	35		37
1989	52	39		38
1990	51	41		36
1991	50	41		36
1992	51	43		33
1993	51	42		30
1994	51	43		28
1995	51	46		34
1996	50	46		37
1997	51	45	36	32
1998	50	46	41	32
1999	52	46	39	33
2000	52	46	37	35
2001	52	46	41	34
2008	50	46		

-대한수의사회지, 2010. 08-

국·내외 수정란이식 성공률은 50% 전후로 알려져 있음. 수정란이식 기술이 산업화를 이루기 위해서는 신선란으로 보급하는 한계를 극복하고 산업화를 달성하려면 동결란 이식체제로 바뀌어야 하기 때문에 수태율 저하를 감수하고 거의 전수를 수행하였음.

본 연구팀의 2010년 44.7%는 제주지역의 소 사육 형태가 수정란 이식을 실시할 때는 축사에서 사육하지만 수정란이식 후 2~3회 발정관찰후 인근 목장에 방목을 실시하게 되고, 자연적으로 방목지 진드기에 대리모가 노출되게 되어 진드기 매개 질병인 ‘타이에리아’에 의한 대리모 건강상태 악화로 유사산 발생율이 높아짐을 감안하면 양호한 성적이라 사료됨.

체외 배양환경을 개선하기 위한 시도로써 항산화제를 배양액에 첨가하여 배 발달능을 개선시키고자 하는 연구들이 시도된 바 있음.



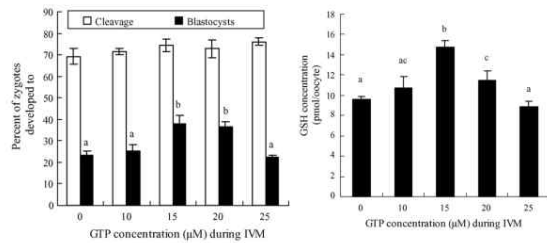
Improvement in bovine embryo production in vitro by treatment with green tea polyphenols during in vitro maturation of oocytes

Zheng-guang Wang, Song-dong Yu*, Zi-rong Xu

College of Animal Science of Zhejiang University, Key Laboratory for Molecular Animal Nutrition, Ministry of Education, Hang Zhou 310029, PR China

Received 24 April 2006; received in revised form 12 May 2006; accepted 21 June 2006
Available online 25 July 2006

Concentration of GTP (μM)	Examined oocytes (N)	Sperm penetration (%)	Monospermic fertilization ^a		Polyspermic fertilization ^a (%)
			2PN (%)	Asynchronous (%)	
0	115	73.9 ± 1.3	63.3 ± 3.1 ^b	17.9 ± 0.7 ^b	18.7 ± 2.1
10	121	76.0 ± 3.7	67.6 ± 0.7 ^b	12.8 ± 2.1 ^b	19.7 ± 1.9
15	102	71.3 ± 0.9	79.9 ± 1.2 ^c	5.3 ± 4.3 ^c	14.1 ± 3.1
20	103	80.6 ± 2.7	65.3 ± 1.1 ^b	15.9 ± 1.1 ^b	16.8 ± 0.5
25	112	79.3 ± 4.1	64.7 ± 4.0 ^b	15.6 ± 2.3 ^b	18.5 ± 1.3



녹차 폴리페놀을 소의 성숙단계에 첨가하였을 경우 수정률을 높이며 항산화물질인 글루타치온의 농도와 배아발달을 증진시키는 논문임.

정자의 침투성의 경우 녹차 폴리페놀의 농도와는 상관없이 비슷한 침투율을 보이지만 정상적으로 수정되어진 2개의 전핵을 가진 배아는 15 μm에서 가장 많은 수정률을 보이고 글루타치온의 농도가 높은 것으로 보고됨.

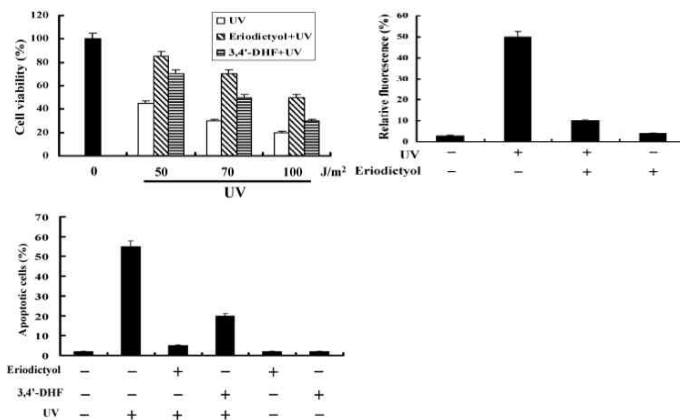
The Anti-apoptotic and Anti-oxidant Effect of Eriodictyol on UV-Induced Apoptosis in Keratinocytes

Eung-Ryoung LEE, Jung-Hyun KIM, Yong-Jin KANG, and Ssang-Goo CHO*

Department of Animal Biotechnology and Bio-Molecular Informatics Center, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea. Received July 21, 2006; accepted September 5, 2006

Recently, considerable scientific and therapeutic interest has focused on the structure and functions of the flavonoids. In a previous study, we suggested that hydroxyl (OH) substitutions on specific carbons in the skeleton of the flavonoids might significantly affect their apoptosis-modulating properties. Here, to investigate the effect of various OH substitutions on their diphenylpropane (C6C3C6) skeleton carbons, we selected 10 different flavonoids and assessed their role on UV-induced apoptosis of human keratinocytes, the principal cell type of epidermis. The results showed that 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavanone (eriodictyol) and 3,4'-dihydroxy flavone (3,4'-DHF) had a positive effect on cell proliferation of human HaCaT keratinocytes. Treatment with eriodictyol in particular resulted in significant suppression of cell death induced by ultraviolet (UV) light, a major skin-damaging agent. We found that eriodictyol treatment apparently reduced the percentage of apoptotic cells and the cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase, concomitant with the repression of caspase-3 activation and reactive oxygen species (ROS) generation. The anti-apoptotic and anti-oxidant effects of eriodictyol were also confirmed in UV-induced cell death of normal human epidermal keratinocyte (NHEK) cells. Taken together, these findings suggest that eriodictyol can be used to protect keratinocytes from UV-induced damage, implying the presence of a complex structure-activity relationship (SAR) in the differential apoptosis-modulating activities of various flavonoids.

Key words: eriodictyol; human epidermal keratinocyte; apoptotic flavonoid; UV; structure-activity relationship



로 에리오디티올의 경우 세포증식과 항산화효과가 뛰어난 효과를 가지며 3,4 다이하이드록시 플레이본의 경우 세포사멸을 막아주는 결과를 얻음.

체외 배양 환경에서 항산화제 첨가는 매우 중요한 것으로 여겨지며 새로운 항산화제 개발이 계속적으로 이루어지고 있음.

합성 플라보노이드의 경우 소 배아 체외배양에 미치는 영향은 보고된바 없어 본 연구팀이 배양 2 일째부터 2~4 세포기에 플라보노이드를 처리하고 확인한 결과 배반포 발달율이 상승되고 영양배엽세포와 내부세포피 수가 증가되며 활성 산소종과 세포사멸이 줄어드는 효과를 확인 함. 이상의 내용은 Journal of Reproduction and Development 2011 Vol. 57 127~134에 게재 됨.

한편, 본 연구팀에 의해 개발된 미분화 인간배아줄기세포 유래 생리활성물질은 배반포기배 중 태아로 발생될 부위의 내부세포피로부터 무한 증식된 배아줄기세포의 배양 산물로 태아발

생에 유용한 성장인자, 싸이토카인, 아미노산 및 미지성분들이 다수 포함되어 있음.

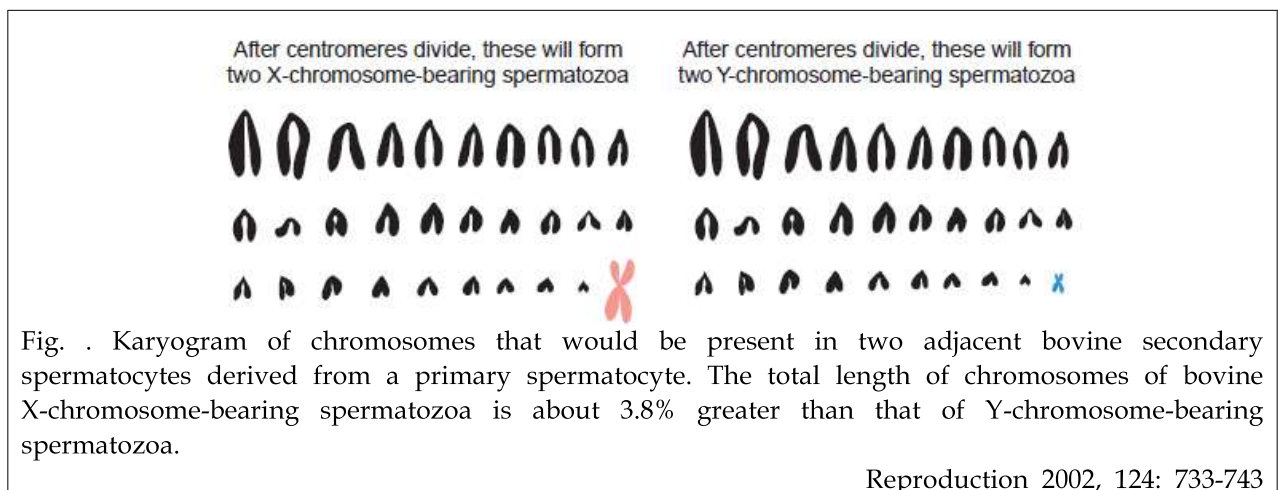
이러한 성분들이 체외에서 생산된 소 단위발생란 및 체외수정란의 배반포기형성을, 총세포수와 내부세포피의 세포수 및 발생유용유전자 발현에 유의한 영향을 미치는 것으로 확인되어 소 수정란 배양 시 새로운 단백질 첨가제로서 이용 가능성을 확인하였음.

관련내용은 국내특허 출원 (출원번호 10-2008-0138099) 및 특허 등록 (제 10-1010077) 되었고, Journal of Reproduction and Development 2011년 57권 346-354에 게재됨. 또한 관련 기술의 우수성을 평가받아 일본 The Society of Reproduction and Development 으로부터 2011 우수논문상을 수상함.

2. 성감별 정자 및 수정란 활용 기술 개발

정자의 성감별은 가축 번식에 매우 유용하며 축산업 분야의 경제적 가치를 향상시킬 뿐만 아니라 성별에 따라 발병되는 질환을 예방함으로써 사람에게도 적용 가능한 기술임.

X 또는 Y chromosome을 운반하는 정자는 소의 경우 약 4% 정도 DNA 함량의 차이를 나타내며 이러한 차이는 정자의 성감별을 가능케 하는 기본 원리임.



최근 브라질의 한 연구팀은 Atomic Force Microscopy를 이용하여 정자의 두부를 관찰함으로써 모양과 크기를 통해 X 또는 Y chromosome의 정자 성감별을 시도한 바 있으나 유의적 차이는 관찰되지 않았음.

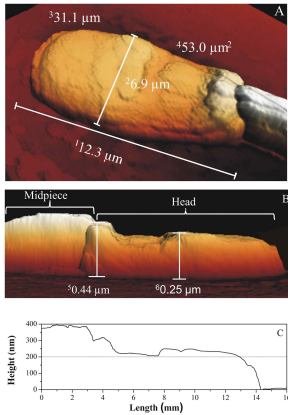


Table 2. Percentage (\pm SE) of two- and three-dimensional measurements of the non-sexed (NS), pool of the sorted for X and Y (SXY), X-bearing sperm (SX) and Y-bearing bovine sperm (SY).

Groups	Measures of structural characteristics			
	Two dimensional		Three dimensional	
	Perimeter (μm)	Area including hole (μm^2)	Surface area (μm^2)	Volume (μm^3)
NS	28.4 \pm 1.55	46.4 \pm 5.0	46.9 \pm 4.97	13.7 \pm 1.44
SXY	28.3 \pm 0.65	46.5 \pm 5.4	47.1 \pm 1.66	13.2 \pm 0.65
SX	29.9 \pm 2.25	49.0 \pm 7.7	49.6 \pm 7.68	14.4 \pm 1.71
SY	28.9 \pm 1.59	48.9 \pm 5.3	49.4 \pm 5.32	14.9 \pm 2.68

Values are an average of at least 400 sperm for each group. There was no difference between groups ($P > 0.05$).

Fig. . Atomic force microscopy (AFM) 3D view images (A and B) and line profile (C), showing different dimensional parameters of the bovine sperm cells containing an X-chromosome. 1. Maximum diameter; 2. Width; 3. Perimeter; 4. Surface area; 5. Maximum height; 6. Average height.

PLOS ONE 2013, 8(3): e59387

정자의 성감별은 ‘Beltsville Sperm sexing Technology’라 불리는 방법으로 정자의 DNA를 형광물질로 염색한 후 DNA 함량에 따른 형광 밝기의 차를 이용하여 Flow Cytometry로 분리함.

여러 보고에 따르면 정자 성감별은 아직 미완성 단계로 분리 효율은 50% 이하이며 그 중 10% 수준의 오차가 발생됨.

Box 2. Typical efficiency of sexing spermatozoa

- Aliquot of stained spermatozoa (100%)
 - (1) Residual loss of spermatozoa in staining tube 10%
 - (2) Losses in sorter tubing between batches, between males and to prevent or correct plugged nozzles 12%
- Spermatozoa that are evaluated (78%)
 - (3) Spermatozoa discarded due to malorientation 30%
 - (4) Spermatozoa discarded due to coincidence 15%
 - (5) Discarded dead spermatozoa 10%
- Potentially sortable spermatozoa (35%)
 - (6) Spermatozoa discarded to maintain purity (Fig. 3) because distributions of X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa fluorescence overlap 12+%
 - (7) Probable aneuploid spermatozoa discarded (Fig. 3) 1%
 - (8) Spermatozoa discarded due to aborts and droplets with both X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa 2%
- Spermatozoa that have been sorted (30%)
 - (9) Spermatozoa lost because of spraying (missing the fluid in the bottom of the collection tube Fig. 2d) 4%
 - (10) Losses of spermatozoa in the supernatant after centrifugation (concentration step) 15%
 - (11) Loss of spermatozoa during filling and sealing straws including incomplete volume of residue in the last straw 4%
- Sorted spermatozoa that are frozen (23%)
 - (12) Use of spermatozoa for quality control (accuracy and motility after thawing) Spermatozoa available for insemination (22%; 11% of each sex at 90% accuracy) 4%

Percentage values in the right column refer to percentages of the respective sub-headings rather than of the starting material.

Table 1

Means (\pm S.E.M.) for rates of embryo cleavage and blastocyst development from unsorted and sex-sorted sperm using ovaries obtained from anonymous donor cows at a commercial abattoir

	Unsorted spermatozoa	Sex-sorted spermatozoa
Total no. of oocytes	3312	1577
No. of replicates	24	19
No. of oocytes per replicate	138	83
Cleavage rate (%)	67.3 \pm 3.5	65.0 \pm 3.6
Blastocyst development rate (%)	20.1 \pm 2.9 a	12.2 \pm 2.3 b

Within a row, means with different letters differ ($P < 0.05$).

Theriogenology 2006, 65: 1007-101

Reproduction 2002, 124: 733-743

또한 분리과정은 sperm에 damage를 주어 운동성을 저하시키고 수정 및 발달율에도 영향을 미침.

Table 3
Main effects (mean \pm S.E.) of post-thaw sperm quality evaluated by CASA during sorting of bull spermatozoa at two pressures using a 70 μ m tip

Pressure (psi)	VAP ^a	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN	Motility (%)
30	58.7 \pm 1.1 a	46.6 \pm 1.0	108.2 \pm 2.0 a	7.6 \pm 0.3 a	22.9 \pm 0.5 a	79.3 \pm 0.6 a	44.5 \pm 0.6 a	29.2 \pm 2.2
50	53.5 \pm 1.1 b	44.3 \pm 1.1	99.1 \pm 2.0 b	4.6 \pm 0.5 b	24.8 \pm 0.5 b	82.4 \pm 0.9 b	46.1 \pm 0.9	8.5 \pm 1.2 b
NSC ^b	60.0 \pm 1.4 a	47.6 \pm 1.2	111.3 \pm 2.6 a	7.0 \pm 0.5 a	21.7 \pm 0.5 a	80.0 \pm 0.6 a	44.5 \pm 0.6 a	33.9 \pm 2.3

Means within columns without common letters differ ($P < 0.05$). No difference was found in sort mode, i.e. between bulk sort and no sort ($P > 0.05$).
^a VAP: average path velocity (μ m/s); VSL: progressive velocity (μ m/s); VCL: track speed (μ m/s); ALH: amplitude of lateral head displacement (μ m); BCF: beat cross frequency (Hz); STR: straightness (% VSL/VAP); LIN: linearity (% VSL/VCL), motility, total motility.
^b NSC: non-sort control.

Theriogenology 2005, 64: 1035-1048

Table 1
In vitro development of bovine embryos fertilized with either conventional, unsorted, or sex-sorted sperm from five bulls and cultured in modified synthetic oviductal fluid + 6 g/L BSA.

	N	R	Day 3		Day 6		Day 8	
			% > 5 Cells		% > Morulae		% Blastocysts	
			Unsorted	Sorted	Unsorted	Sorted	Unsorted	Sorted
Bull 1	776	33	40.3 \pm 5.9 ^{a,x}	26.3 \pm 5.5 ^{b,x}	20.3 \pm 4.5 ^{a,x}	10.2 \pm 4.3 ^{b,x}	17.1 \pm 3.5 ^{a,x}	8.6 \pm 3.3 ^b
Bull 2	1443	22	27.6 \pm 3.5 ^{a,x}	19.1 \pm 3.1 ^{b,x}	15.1 \pm 2.7 ^{a,x}	8.9 \pm 2.4 ^{b,x}	8.6 \pm 2.1 ^{b,y}	4.9 \pm 1.9 ^b
Bull 3	1869	42	26.9 \pm 5.5 ^{a,x}	19.6 \pm 5.2 ^{b,x}	37.2 \pm 4.2 ^{a,y}	26.8 \pm 4.0 ^{b,y}	18.2 \pm 3.3 ^{a,x}	10.0 \pm 3.1 ^b
Bull 4	658	18	16.7 \pm 6.2 ^{a,y}	9.6 \pm 5.5 ^{b,y}	29.6 \pm 4.8 ^{a,y}	21.1 \pm 4.3 ^{b,x,y}	16.5 \pm 3.7 ^{a,x}	8.5 \pm 3.3 ^b
Bull 5	1916	33	14.8 \pm 3.7 ^{a,y}	5.6 \pm 3.6 ^{b,y}	6.4 \pm 2.9 ^z	0	6.2 \pm 2.2 ^y	0

N, number of zygotes cultured; R, replicates (includes the total of replicates for IVF with unsorted and sorted sperm. Superscript letters a and b in the same row, for the same bull and developmental stage, differ statistically ($P < 0.05$); Superscript letters x, y, and z in the same column (among bulls) differ significantly ($P < 0.05$).

Theriogenology 2012, 78: 1465-1475

성감별은 정자뿐만 아니라 수정란 단계에서도 이루어지며 주로 할구를 분리한 후 성염색체 관련 유전자의 발현을 PCR을 통해 확인함.

성감별에 이용되는 성염색체 관련 유전자는 다음과 같음.

Gene name and symbol	Source (GeneBank accession number)	References
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked (<i>DDX3X</i>)	NM_001192962.1	Theriogenology 2012, 77: 1587-1596
Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-linked (<i>EIF1AX</i>)	NM_001025329.1	Theriogenology 2012, 77: 1587-1596
Heat shock transcription factor, Ylinked 2 (<i>HSFY2</i>)	NM_001077006.1	PLoS One 2011, 63: e17790
Sex determining region Y (<i>SRY</i>)	NM_001014385.1	Sex Dev 2009,34: 205-213 Mol Reprod Dev 1997, 482: 246 -250
Testis specific protein, Y-linked 1 (<i>TSPY</i>)	X74028	Theriogenology 2012, 77: 1587-1596
TSPY-like 2 (<i>TSPYL2</i>)	XM_002707327.1	Theriogenology 2012, 77: 1587-1596
Ubiquitin-specific peptidase 9, Xlinked (<i>USP9X</i>)	XM_002700206.1	Theriogenology 2012, 77: 1587-1596
Ubiquitin-specific peptidase 9, Ylinked (<i>USP9Y</i>)	NM_001145509.1	Theriogenology 2012, 77: 1587-1596
Zygote Arrest 1 (<i>ZARI</i>)	NM_001076203.1	PLoS One 2011, 63: e17790
Zinc finger protein, X-linked (<i>ZFX</i>)	NM_177490.1	Theriogenology 2012, 77: 1587-1596
Zinc finger protein, Y-linked (<i>ZFY</i>)	NM_177491.1	Theriogenology 2012, 77: 1587-1596
U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1-like 2 (<i>ZRSR2</i>)	XR_083554.1	Theriogenology 2012, 77: 1587-1596
Zinc finger (CCCH type), RNAbinding motif and serine/arginine rich 2, Y-linked (<i>ZRSR2Y</i>)	GQ426330	Theriogenology 2012, 77: 1587-1596

PCR을 이용한 수정란의 성감별은 고가의 장비와 전문적인 기술을 요하는 반면 loop-mediated isothermal amplification (LAMP)법을 통해서도 수정란의 성감별이 가능함.

2.4. Male-specific primers

Inner primer F:
5'-AGCTATGTGGCATGTGGATCCTTCCTGGAAATGT-
TAAGTG-3'

Inner primer B:
5'-TAAAGCCAGACACAGAGGTCACTTTTGCTTCTCTTC-
CTGCTTC-3'

Outer primer F:
5'-AGCCAAGAAGTGGATGAATC-3'

Outer primer B:
5'-GCAGTGCATTTCTCCTC-3'

Loop primer F:
5'-GGGATGAAACTGTGCAT-3'

Loop primer B:
5'-ATTGCATGTGGAAGAAGTGTAG-3'

2.5. Male-female common primers

Inner primer F:
5'-GAGGAACATTGGCTTCTGGACAAGCTGGGGATT-
GCTCT-3'

Inner primer B:
5'-AGTGAAGCAAAGAACCCACCCAGTGAAGCTCAA-3'

Outer primer F:
5'-AGGCTGCCTCTTGTGT-3'

Outer primer B:
5'-CATGGCCTAGAGACCAATC-3'

Loop primer F:
5'-CCTAGATGAGGTCTATTGGC-3'

Fig. 1. The natural light observation of the reaction tube using digital camera. (a) Colour change after addition of EB – left shows the positive reaction (male) and right the negative reaction (female). (b) Precipitate formation after addition of CuSO₄ – left shows the positive reaction (male) and right the negative reaction (female).

Animal Reproduction Science 2010, 119: 92-96

LAMP 법은 PCR법에 비해 시간이 절약되고 간편하기는 하나 검정에 사용되는 시료의 세 포 수에 따라 정확도가 떨어지는 단점이 있음.

Table 1
Effect of cell number on sensitivity and accuracy of LAMP-based embryo sexing.

Number of blastomeres used for assay	Number of embryos	Number with satellite sequence detected	CuSO ₄ precipitation	EB colouration	Electrophoresis	PCR	Number correctly determined (%)
1	10	6	3M 3F	3M 3F	3M 3F	3M 3F	60
2	12	9	5M 4F	5M 4F	5M 4F	5M 4F	75
3	12	9	6M 3F	6M 3F	6M 3F	6M 3F	75
4	12	12	7M 5F	7M 5F	7M 5F	7M 5F	100
5	12	12	4M 8F	4M 8F	4M 8F	4M 8F	100

EB, ethidium bromide; M, male; F, female; PCR, polymerase chain reaction.

Animal Reproduction Science 2010, 119: 92-96

본 연구팀은 제주흑우 원정액을 Flow cytometer를 이용하여 성감별 실시하였으며 체외 수정을 실시한 결과 X-sperm의 경우 82.4%, Y-sperm의 경우 80%의 높은 수정율을 획득하였고 배양 7일째 배반포기배 발달을 역시 X-sperm의 경우 29.5%와 Y-sperm의 경우 40%로 매우 우수한 결과를 얻음.

수정란 단계에서의 성감별 역시 자체 제작한 primer를 이용하여 PCR을 통해 검증하였고 80% 이상의 정확도를 확인하였으며 이와 관련된 내용을 특허 출원함.

또한 수정란 단계에서의 성감별 방법으로 본 연구팀은 성별 이형성 (Sexual Dimorphism)을 제시함.

이는 앞서 설명된 LAMP 보다 간단하고 임신율을 향상시키는 방법으로 육안으로 sexing 함으로써 blastocyst에 손상을 주지 않고 고가의 장비를 필요로 하지 않는다는 장점이 있음.

3. 제주흑우 수정란 동결 기술 개발 및 이식

체내 수정란 또는 핵이식 기술에 의한 복제동물 생산의 실용화를 위해서는 생산된 수정란의 높은 생존성을 유지하면서 동결시키는 기술의 개발이 필요함.

기존의 수정란 동결기를 이용한 slow freezing 방법은 시간의 낭비가 크고 때로는 생존율이 떨어지는 단점이 있음.

포유동물 수정란의 초자화 동결은 1985년 Rall과 Fahy가 DMSO, acetamide, propylenglycol 및 polyethylene glycol을 함유한 초자화 동결에 성공한 것이 최초이며, 그 후 소 (Massip 등, 1986)에서도 초자화 동결에 성공함.

또한 소의 상실배기에서 초기 배반포기 수정란을 초자화 동결하여 산자를 얻는데는 성공하였으나, 동해방지제로 사용한 glycerol과 1,2-propanediol의 혼합액은 소 배반포의 동결보존에는 비효과적인 것으로 나타남.

이외 체외 수정란 동결 기술로는 1.4 M glycerol 과 0.25M sucrose 그리고 1.8M ethylene glycol을 이용한 rapid-freezing method로 Ethylene glycol은 침투성이 강한 저온 보호물질로써, 수정란이 생식기관에 이식됐을 경우 쉽게 세포질에서 밀려나오고 수정란의 과도한 팽창을 줄일 수 있음. (Theriogenology 1998,49:1051-1058)

특히, 복제수정란은 핵이식 시 세포질과 투명대의 물리적인 손상과 전기충격 등으로 인해 동결하기가 매우 힘들. 실례로 Tecirlioglu 등 (2003) 은 복제수정란을 OPS (open pulled straw) 방법을 이용하여 초자화동결을 실시하였고, 용해는 OPS 스트로에서 희석용 스트로로 다시 옮겨 담은 2-단계로 실시하여 이식함으로써 이식 14두 중 복제소 1두를 획득하였음. Gong 등 (2004) 은 복제수정란을 EFS40 용액에 노출하는 2-단계 방법으로 동결하였고 용해 시 배양접시에 쏟아내어 2-단계로 세척한 후 다시 이식용 스트로에 장착하여 이식함으로써 이식 9두 중 복제소 1두를 생산하였음.

그러나 앞서 소개한 두 방법 모두 필드에서 바로 적용하기는 어려운 실정이어서 본 연구에서 보고한 내용이야말로 처음으로 필드 적용 동결방법에 의한 복제소 생산 예라고 할 수 있음. 본 연구팀은 이식용 스트로우와 Ethylene glycol과 glycerol을 혼합시킨 초자화 동결액을 이용하여 동결을 실시하고 1-단계 용해하여 바로 대리모에 이식하는 최단시간 (1분 요소) 이식 간편법을 개발하여 실제로 세계처음으로 복제송아지를 생산한 바 있음(Reprod Dev Biol 2011, 35(1): 77-83).

4. 제주흑우 유전형질 검출 및 분석

전 세계적으로 광범위하게 분포, 사육되고 있는 다양한 소 품종들은 대부분 품종형성과정에서 고정된 특유의 모색을 나타내고, 모색은 해당 품종의 특성을 설명하는 중요한 표현형질로 간주되며, 품종 식별을 위한 대표적인 질적 형질로 취급됨.

포유동물의 모색은 neural crest로부터 발생과정에서 색소세포 (melanocyte)의 이주 (KIT, KITLG, EDNRB 등)와, melanin생합성을 조절하는 외부 신호전달자와 수용체 (MC1R, ASIP, MITF 등), 세포 내 melanin 생합성 대사 (TYR, TYRP1, DCT 등), melanosome의 생성 (SILV, AP3 등)과 이동 (MYO5A, RAB27A 등) 등 복잡한 여러 단계와 관련 유전자들의 작용에 의해 표현됨.

특히, melanin 생합성에 관여하는 TYR, TYRP1, DCT는 색소세포 특이 효소 유전자로서 두 종류의 melanin 즉, eumelanin (black/brown)과 pheomelanin (red/ yellow) 합성을 담당한다. 마우스를 포함한 여러 포유동물 중에서 melanin 생합성에 관여하는 이들 TYR, TYRP1과 DCT 유전자와 그 기능에 대해 연구가 진행되었는데, 특히 소에서 Guibert 등은 이들 유전자의 cDNA 서열과 여러 품종과 모색에서 발현 수준을 측정하여 보고함. *Dermatol.* 14, 57-65. 2003, *Pigment Cell Res.* 17, 337-345. 2004, *Pigment Cell Res.* 17: 337-345. 2004).

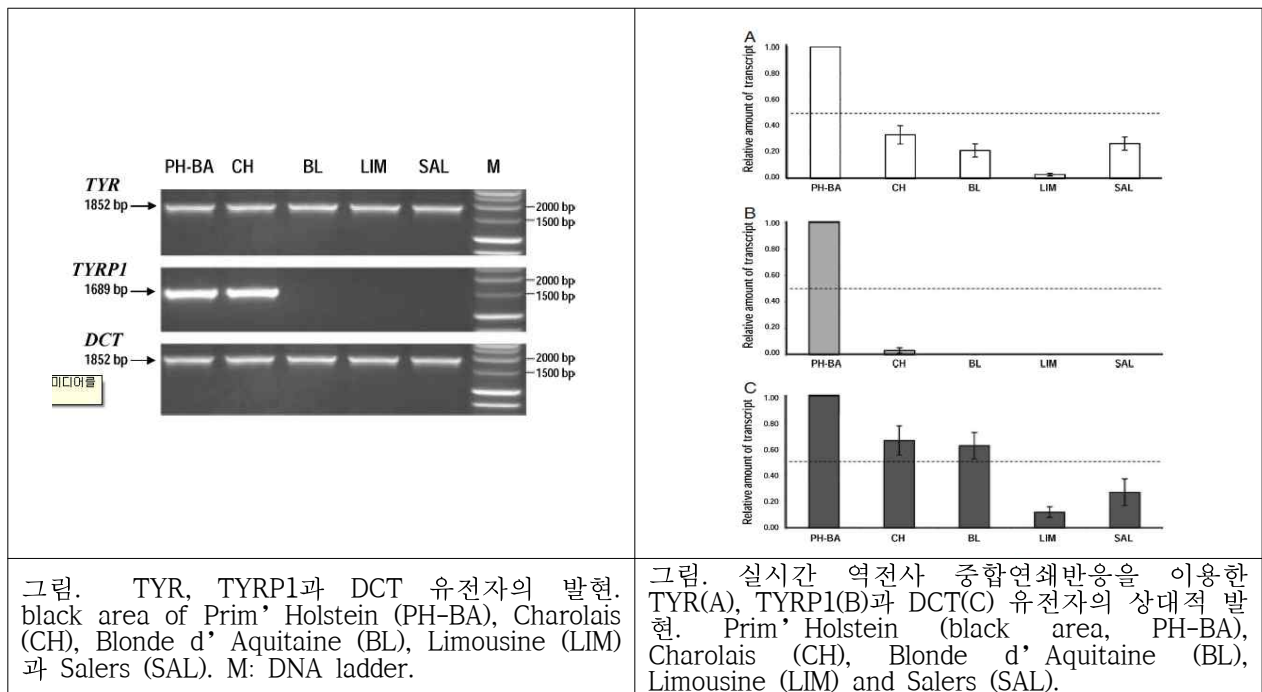


그림. TYR, TYRP1과 DCT 유전자의 발현. black area of Prim' Holstein (PH-BA), Charolais (CH), Blonde d' Aquitaine (BL), Limousine (LIM) 과 Salers (SAL). M: DNA ladder.

그림. 실시간 역전사 중합연쇄반응을 이용한 TYR(A), TYRP1(B)과 DCT(C) 유전자의 상대적 발현. Prim' Holstein (black area, PH-BA), Charolais (CH), Blonde d' Aquitaine (BL), Limousine (LIM) and Salers (SAL).

※Pheomelanin Coat Colour Dilution in French Cattle Breeds is not Correlated with the TYR, TYRP1 and DCT Transcription Levels (*Pigment Cell Res.* 17: 337-345. 2004).

이러한 세계 연구 동향에 따라 본 연구과제에서는 한우, 제주흑우, Holstein에서 모색 발현 양상과 MC1R 유전자형의 분포에 따라 melanin 합성에 핵심적인 과정에 참여하는 3 가지 유전자(TYR, TYRP1, DCT) 유전자들의 발현 수준의 상호 연관관계를 구명하기 위하여 수행됨.

반정량 Real-time RT-PCR 분석을 통하여, 세 가지 유전자의 발현 수준을 MC1R 유전자형이 e/e인 한우의 황갈색 부위, E+/E+인 제주흑우의 야생형 흑색 부위, ED/ED인 Holstein의 우성 흑반과 백반부로 대표되는 4 종류의 피부 조직에서 분석함.

TYR, TYRP1, DCT 유전자 모두 Holstein의 흑반 부위에서 제주흑우의 흑색 부위에 비해 각각 4.5 배, 2.3 배, 2.5 배 이상의 유전자 발현 수준을 나타냄 ($p < 0.001$).

또한, 제주흑우의 이들 3 가지 유전자들의 발현 수준은 한우에 비해 유의적으로 높은 수준을 나타냄 ($p < 0.001$).

이러한 결과들은 한우와 제주흑우, Holstein의 흑색 부위의 모색 발현 양상들이 이들 3 가지 melanin 생합성 유전자들의 전사 수준과 직접적인 연관이 있는 것으로 사료되며, 이는 한우 e/e, 제주흑우 E+/E+ Holstein의 ED/ED 등 서로 상이한 MC1R 유전자형의 관여가 반영된 결과로 추정됨.

결론적으로 본 연구는 MC1R 단백질의 상태가 TYR과 일련의 melanin 합성 주관 유전자들의 전사활성을 유도할 뿐만 아니라 소의 피부에서 총 melanin 함량의 수준을 결정함을 제시하고 있음.

따라서 본 연구에서 제시하고 있는 유전자 발현에 대한 정보는 한우 및 제주흑우, 칠포 등 재래소의 계통의 특성화 연구뿐만 아니라, 소에서 모색 표현의 강약을 조절하는 유전적인 요인을 분석하는 데 있어 중요한 기초 자료가 될 것으로 사료됨.

사람이나 동물의 친자검정은 전통적으로 혈액형이나 혈액단백질 분석방법에서 유전정보를 암호화하는 분자유전학 분석기술의 발달로 유전자 분석이 주를 이루고 있음.

최근 인간의 법의학적 검증에서 DNA 분석기법, 특히 MS의 반복양상에 따른 유전자형 분석이 공식 활용되면서 그 활용영역이 점차 확대되어 가축 품종들의 유연관계, 혈통 증명, 집단 식별 및 개체추적과 친자확인 등에 광범위하게 이용되고 있음.

소의 모색은 품종을 식별하는 중요한 표현형질로 간주되고 있고, 포유류에서 모색의 발현은 eumelanin과 pheomelanin 두 가지 색소의 발현 수준과 색소체 (melanosome)을 함유하고 있는 색소세포 (melanocyte)의 분포에 의해 결정되며, 100여 가지 유전자의 상호작용에 의해 결정됨.

특히, Extension, Agouti 유전자의 다형성은 흑색, 황적색으로 구분되는 기본 바탕색을 결정하는 주요인으로 작용하는 것으로 알려져 있음 (*Pigment Cell Res.* 18, 34-41. 2005, *Pigment Cell Res.* 19: 346-355. 2006).

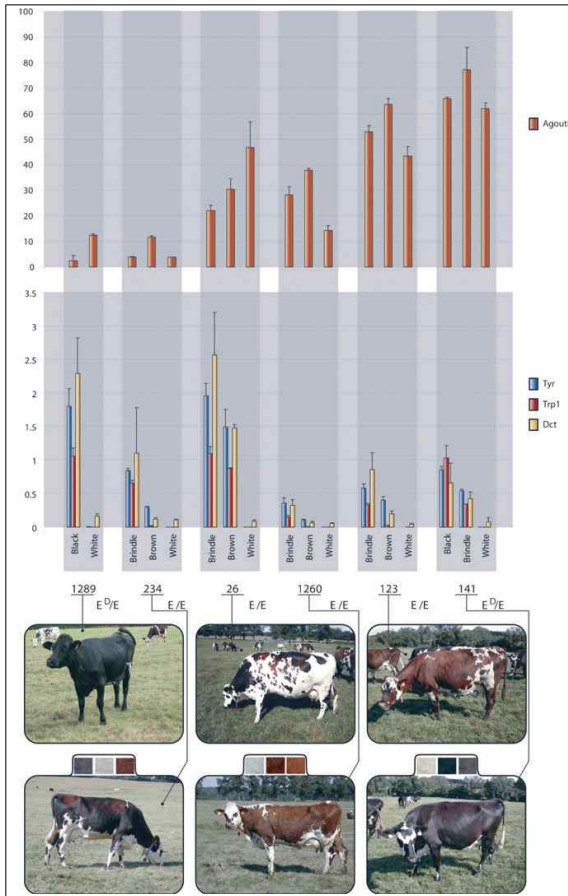


그림. Agouti, Tyr, Tyrp1와 Dct 유전자의 상대적 정량 발현.

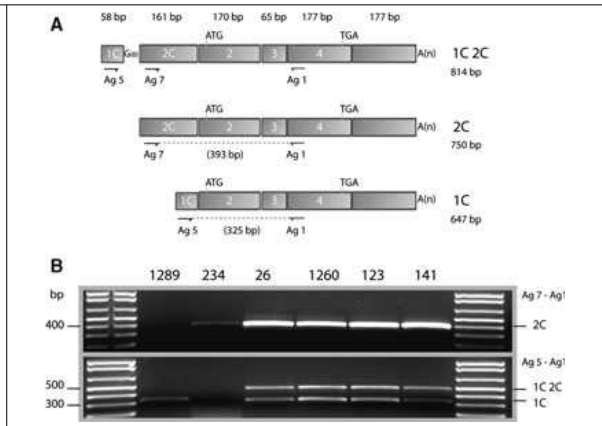


그림 3. Agouti 유전자의 선택적 전사의 발현.

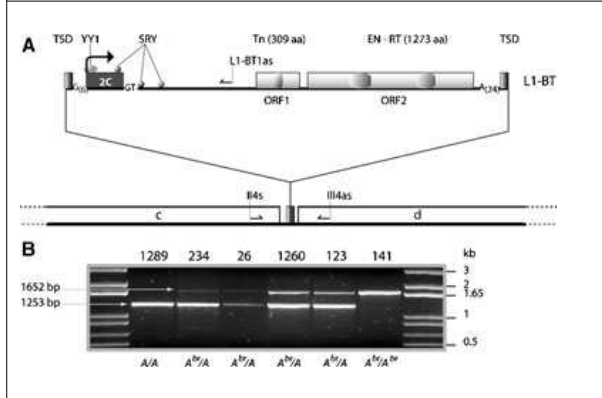


그림. 노르망디 소의 Agouti^{br} 대립형질 조사.

※The insertion of a full-length *Bos taurus* LINE element is responsible for a transcriptional deregulation of the Normande Agouti gene (Pigment Cell Res. 19: 346-355. 2006).

제주흑우의 선별에 있어 Holstein나 Angus×한우 등의 F1과의 구분이 선결과제이며, 아울러 20세기에 제주도에 도입된 Hereford, Simmental 등의 황갈색, 적갈색 품종과 Charolais, Brahman 등의 품종들, 현재 제주도에서 가장 높은 빈도로 사육되고 있는 한우 등과 명확한 구분을 위해서는 MC1R 뿐만 아니라 다양한 유전자 marker에서 수집한 정보의 조합이 필요함.

이에 본 연구과제에서는 기존의 세계 연구 동향보다 앞서 MS 유전자형과 MC1R, ASIP 유전자형 분석결과들의 조합을 통해, 그 동안 제주흑우를 수정란이식이나 인공수정을 통해 공급 받은 농가에서 수집한 흑모색 후보축군을 대상으로 수정란이식, 인공수정에 의해 생산된 제주흑우 후대들을 추적하고자 수행함.

그 결과 MS 다형성 정보와 제주흑우의 유전적 다양성을 알아보고자 MS marker 22종과 MC1R, ASIP 유전자 모두 집단 내에서 다형현상을 나타내었으며, 유전자 친자검정을 분석하고자 총 24종의 유전자 marker들 (MS 22종, MC1R, ASIP)에 대한 분석에서 얻어진 모든 정보를 이용하여 유전자 친자검정을 수행함.

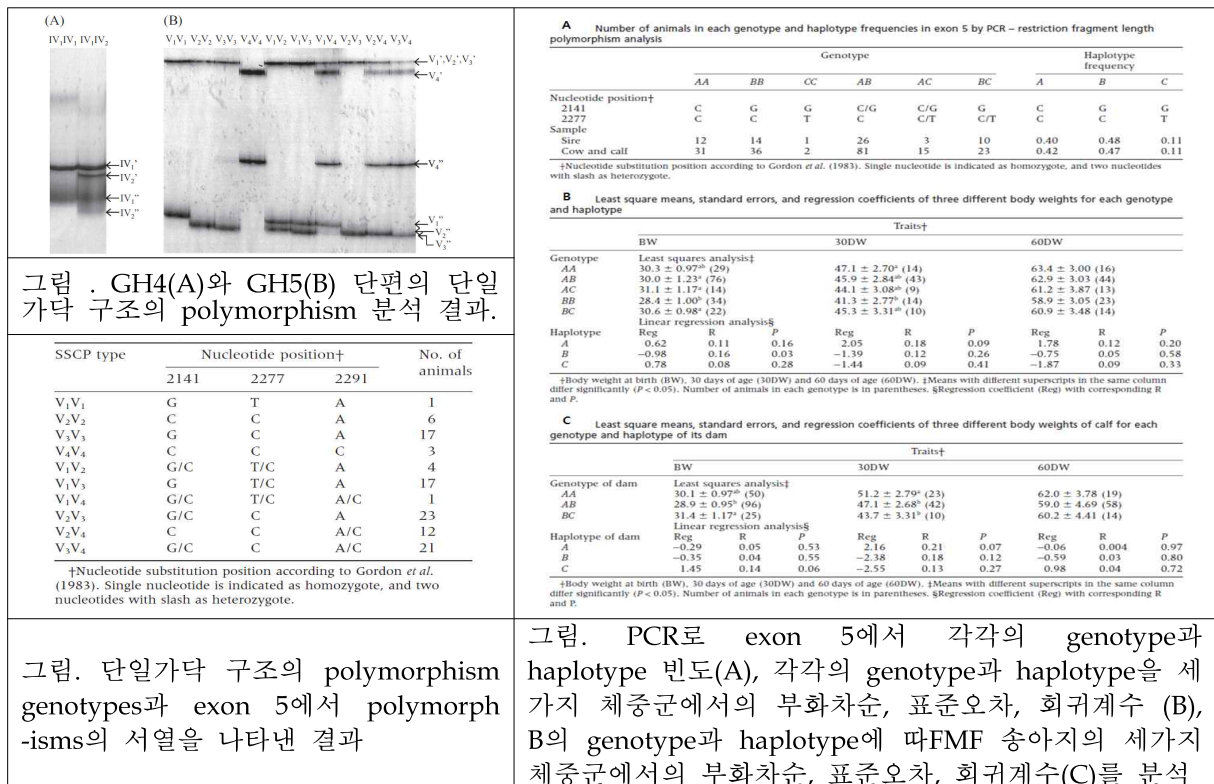
95%의 신뢰수준에 대한 후보측근에 대한 부모확인 과정에서 후보 모가 확인된 경우는 163두(54.6%), 후보 부가 확인되는 경우가 233두 (74.8%)였으며, 부모가 동시에 확인되는 경우는 123두(42.3%)로 확인됨.

본 연구에서 유전자 친자검정을 통해 수정란이식 개체들과 인공수정 개체들을 성공적으로 구분해냄으로써 외형상 제주흑우와 혼란을 일으키는 교잡우 개체들로부터 제주흑우의 보호와 혈통보존에 기여할 것임.

SNP는 DNA 염기서열에서 하나의 염기서열 (A,T,G,C)의 치환을 보이는 유전적 변화 또는 변이를 단일염기다형성(Single Nucleotide polymorphism, SNP)라고 함. pyrimidine 이 purine으로 바뀌는 것은 transversion이라고 하고, 같은 pyrimidine내에서 transition이라고 함.

인구집단에서 1%이상의 빈도로 존재하는 2개의 대립 염기서열이 발생하는 위치를 SNP라고 하며 대립유전자형이 5%이상의 빈도로 존재하는 경우 common polymorphism이라고 하며, 1~5% 인 경우 rare polymorphism이라고 부르기도 함.

이러한 현상으로 유전적 변이를 확인하는데 해당 유전자의 단일 염기다형성을 분석하는 연구들이 활발히 진행되고 있음 (*Journal of Animal Breeding and Genetics*. 125, 45-49. 2008, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 21, 1-5. 2008, *Animal Science Journal*. 81: 623-629. 2010).



※Polymorphisms in growth hormone gene and their associations with calf weight in Japanese Black cattle (*Animal Science Journal*. 81: 623-629. 2010)

위의 연구에서는 상대적으로 적은 양의 샘플 표본은 원시의 genotype 빈도에 영향을 받은 개별효과와 창시자효과의 상대성과 무관하게 분석함.

30일령 된 체중의 집단에서는 어미 소와 송아지의 haplotype B에 의해 부정적인 결과가 나왔고 haplotype A에 의해서는 긍정적인 결과가 나왔지만 유의적인 차이는 보이지 않았음.

동물의 성장은 다양한 성장관련호르몬과 행동과 표현양상에 의해 조절 받으므로 성장단계에서 변화되는 것이 분명함.

SNP의 genotype에 따라 어미 소의 allele이에서 차이나는 염기다형성에 따라 후손의 성장에 따라 영향을 미칠 수 있는 효과를 분석할 수 있는 방법으로 제시될 것임.

5. 제주흑우 우수 유전형질 보존 및 응용기술개발

체세포핵이식 및 복제수정란 생산은 우수 유전형질을 보존하고 형질 개량 효과를 극대화할 수 있는 기술이며 더 나아가 형질전환 동물 생산을 통한 인간 대체 장기 생산 및 생체물질 생산과 유전자 치료 등 인간 질병 치료 기술에 응용 가능함.

핵이식 기법에 의한 복제 수정란 생산에 관한 연구는 1997년 복제 면양이 생산된 이후 다양한 종에 걸쳐 이루어 지며 응용범위 또한 확대되고 있는 실정임.

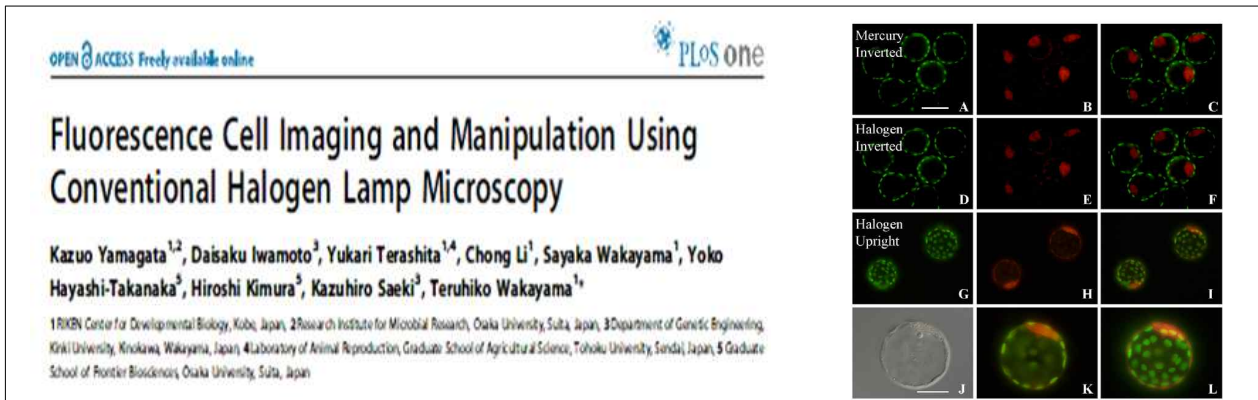
중국의 연구팀은 복제배아의 비정상적인 발달이 메틸레이션과 관련있음을 보고하고 이를 개선하기 위해 5-aza-2'-deoxycytidine을 처리함으로써 후천적 유전이 줄어들음을 보고함.

Group	Manipulated	Surviving after enucleation and injection	Cleaved ^d	8-cell embryos ^d
NT-CB	29	14 (48.3) ^b	3 (21.4) ^b	0 (0) ^b
NT-Aza	64	52 (81.3) ^c	34 (65.4) ^c	17 (32.7) ^d
NT	61	45 (73.8) ^c	22 (48.9) ^c	5 (11.1) ^c

또한 기술적인 개선 방안 중 하나로 형광현미경을 이용한 연구결과가 보고되기도 함.

체세포 핵이식 시 탈핵을 위한 형광현미경의 자극은 표본에 강한 빛을 주어 수정란에 자극을 주게되고 이는 수정란의 발달을 저하시킴.

따라서 일본 연구팀은 필터 시스템을 발전시켜 수은램프와 할로겐램프를 이용하여 형광과 같은 효과를 줌으로써 표본에 손상을 최소화 하고 수정란의 발달을 증진시킴.



본 연구팀은 체세포핵이식 복제 수정란 생산에서, 탈핵 시 기존에 주로 사용하는 Hoechst 염색과 UV 노출은 세포질 손상을 유발하는 것으로 알려져 노출을 극소화할 목적으로 spindle view system(Oocyte imaging) 을 이용하여 세포질 손상 없이 탈핵을 했을 때 복제 효율에 미치는 영향을 처음으로 조사했음.

Oosight imaging system으로 획득된 복제수정란 유전자발현유무를 조사했던 바, 만능성 유전자 Oct4와 착상 관련유전자 interferon-tau 발현이 유의하게 높게 나타났고, 세포사멸 유전자 Caspase-3 와 스트레스 유전자 Hsp70 발현이 유의하게 낮게 나타나 체세포핵이식 복제 수정란의 건강도를 확인할 수 있었음.

따라서, 체세포핵이식 복제수정란 생산 시 탈핵방법으로서 Oosight imaging system을 이용하면 건강한 복제수정란 획득이 가능하며, 이 방법에 의해 제주흑우 씨암소 흑우순이가 2010년 10월 31일 획득되었음. 이상의 관련기술은 Cellular Reprogramming 저널 2012년 14권 305-311에 게재됨.

제 7 장 연구시설 · 장비 현황

연구기자재 및 연구시설	규 격	수량	활용용도	보유기관	비고
Stirrer	set	2	배양액제조	제주대 줄기세포연구센터	
Autoclave	"	1	기기멸균	"	
Centrifuge	"	2	시료침전	"	
High-speed centrifuge		1			
Clean bench	"	4	무균조작	"	
Clean room	5평	1	무균조작	"	
CO2 controller	"	1	CO2 조절	"	
CO2 tank	"	8	세포배양	"	
Deep freezer	"	1	시료보관	"	
Refrigerator	"	4	"	"	
Desiccator	"	2	"	"	
Digital thermometer	"	1	배양기검사	"	
Dry Oven	"	1	초자기구건조	"	
Cell Injector	"	1	핵이식, 유전자주입	"	
Electronic balance	"	3	시료정량	"	
Electrophoresis might	"	1	전기영동	"	
Fluorescent lamp	"	3	세포관찰	"	
CO2 Incubator	"	8	세포배양	"	
LN2 tank	"	7	세포냉동보관	"	
LN2 CONTAINER	"	1	세포냉동보관	"	
Inverted microscope	"	4	수정란관찰	"	
Micro-warm plate	"	1	항온유지	"	
Micropipette	"	11	시료정량	"	
Stereo microscope	"	3	난자회수	"	

연구기자재 및 연구시설	규 격	수량	활용용도	보유기관	비고
Real Time PCR	"	1	유전자분석	제주대 줄기세포연구센터	
pH meter	"	2	배양액 제조	"	
Power supply	"	2	전기영동	"	
Vaccum Pump	"	3	난포란 채취	"	
Shaking incubator	"	1	세포배양	"	
Slide warmer	"	1	세포조작	"	
Sonicator	"	1	세척용	"	
Spectrophotometer	"	1	분자검사	"	
Thermoplate	"	1	배양액 제조	"	
Gel Doc XL System	"	1	유전자분석	"	
Osmometer	"	1	배양액 제조	"	
Vortex	"	3	배양액 제조	"	
Water bath	"	2	시료 항온유지	"	
Water purification system	"	1	배양액 제조	"	
Mupid kit	"	1	분자검사	"	
Chemical balance	"	1	시약정량	"	
Hot plate	"	1	시약용해	"	
Magnetic stirrer	"	1	시료 혼합	"	
Vortex mixer	"	3	"	"	
Micromanipulator	"	3	미세조작	"	
Puller	"	1	"	"	
Microforge	"	1	"	"	
Grinder	"	1	"	"	
Nepa gene	"	1	"	"	
Ultrapure water system	set	1	초순수제조기	"	4차년도 구입
Cell fusion system	"	1	세포융합	"	"

제 8 장 참고문헌

Afanas' ev IB, Dorozhko AI, Brodskii AV, Kostyuk VA and Potapovitch AI(1989): Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol.* 38:1763-1769.

Ainsworth CJ, Nixon B and Aitken RJ(2011): The electrophoretic separation of spermatozoa: an analysis of genotype, surface carbohydrate composition and potential for capacitation. *Int J Androl.* doi:10.1111/j.1365-2605.

Andersen CY and Grinstead J(1997): A new method for the purification of human motile spermatozoa applying density-gradient centrifugation: polysucrose media compared to Percoll media. *J Assist Reprod Genet.* 14(10):624-8.

Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempes MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA and Midura P(1999): Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotechnology.* 17:456-461.

Balasubramanian S, Son WJ, Kumar BM, Ock SA, Yoo JG, Im GS, Choe SY and Rho GJ(2007): Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various developmental stages of in vitro and in vivo preimplantation bovine embryos. *Theriogenology.* 68:265-75.

Baruch E and Weller JI(2008): Estimation of the number of SNP genetic markers required for parentage verification. *Anim Genet.* 39(5):474-9.

Bermejo-Alvarez P, Rizos D, Rath D, Lonergan P, Gutierrez-Adan A(2008): Sex determines the expression level of one third of the actively expressed genes in bovine blastocysts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(8):3394-9.

Bonin A, Bellemain E, Bronken Eidesen P, Pompanon F, Brochmann C and Taberlet P(2004): How to track and assess genotyping errors in population genetics studies *Mol Ecol.* 13(11):3261-73.

Caamano JN, Ryoo ZY and Youngs CR(1998): Promotion of development of bovine embryos produced in vitro by addition of cysteine and beta-mercaptoethanol to a chemically defined culture system. *J Dairy Sci.* 81:369-374.

Carvalho JO, Silva LP, Roberto S and Margot AN(2013): Nanoscale Differences in the Shape and Size of X and Y Chromosome-Bearing Bovine Sperm Heads Assessed by Atomic Force Microscopy. PLOS ONE. 8(3):e59387.

Cho GJ(2004): Parentage testing for thoroughbred horse by microsatellite DNA typing. Kor. J. Anim. Sci. Technol. 46:129-136.

Cho GJ, Yang YJ and Lee KW(2004): Analysis of genetic diversity for cattle parentage using microsatellite markers. Kor. J. Vet. Res. 44:287-292.

Dario C, Carnicella D, Ciotola F, Peretti V and Bufano G(2008): Polymorphism of growth hormone GH1-AluI in Jersey cows and its effect on milk yield and composition. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 21:1-5.

De Vos A, Nagy ZP, Van de Velde H, Joris H, Bocken G and Van Steirteghem A(1997): Percoll gradient centrifugation can be omitted in sperm preparation for intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 12(9):1980-4.

Dimoski P(2003): Development of a 17-plex microsatellite polymerase chain reaction kit for genotyping horses. Croat. Med. J. 44:332-335.

Dochi O, Yamamoto Y, Saga H, Yoshihara N, Kano N, Maeda J, Miyata K, Yamauchi A, Tominaga K, Oda Y, Nakashima T and Inohae S(1998): Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program. Theriogenology. 49:1051-1058.

Girardot M, Guibert S, Laforet MP, Gallard Y, Larroque H and Oulmouden A(2006): The insertion of a full-length Bos taurus LINE element is responsible for a transcriptional deregulation of the Normande Agouti gene. Pigment Cell Res. 19:346-355.

Girardot M, Martin J, Guibert S, Leveziel H, Julien R and Oulmouden A(2006): Widespread expression of the bovine Agouti gene results from at least three alternative promoters. Pigment Cell Res. 18:34-41.

Gong G, Dai Y, Fan B, Zhu H, Zhu S, Wang H, Wang L, Tang B, Li R, Wan R, Liu Y, Huang Y, Zhang L, Sun X and Li N(2004): Birth of calves expressing the enhanced green fluorescent protein after transfer of fresh or vitrified/thawed blastocysts produced by somatic cell nuclear transfer. Mol Reprod Dev. 69:278-288.

Grant SA, Long SE and Parkinson TJ(1994): Fertilizability and structural properties of boar spermatozoa prepared by percoll gradient centrifugation. *J Reprod Fertil.* 100(2):477-83.

Guerin PEI, Mouatassim S and Menezo Y(2001): Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update.* 7:175-189.

Guibert S, Girardot M, Leveziel H, Julien R and Oulmouden A(2004): Pheomelanin coat colour dilution in french cattle breeds is not correlated with the TYR, TYRP1 and DCT Transcription levels. *Pigment Cell Res.* 17:337-345.

Gutiérrez-Adán A, Behboodi E, Murray JD and Anderson GB. (1997): Early transcription of the SRY gene by bovine preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev.* 482:246-250.

Halliwell B and Gutteridge JMC(1989): The chemistry of oxygen radicals and other derived species. In *Free radicals in Biology and Medicine* 2nd edition. J Oxford: Clarendon Press. 22-85.

Hamilton C. K, Combe A, Caudle J, Ashkar F. A, Macaulay A. D, Blondin P and King W.A(2012): A novel approach to sexing bovine blastocysts using male-specific gene expression. *Theriogenology.* 77:1587--1596.

Hamilton CK, Favetta LA, Di Meo GP, Floriot S, Perucatti A and Peippo J(2009): Copy number variation of testis-specific protein, Y-encoded (TSPY) in 14 different breeds of cattle(*Bos taurus*). *Sex Dev.* 34:205-213.

Hamilton CK, Revay T, Domander R, Favetta LA, and King WA(2011): A large expansion of the HSFY gene family in cattle shows dispersion across Yq and testis-specific expression. *PLoS One.* 63:e17790.

Han SH, Cho IC, Kim JH, Ko MS, Jeong HY, Oh HS and Lee SS(2009): A GHR polymorphism and its associations with carcass traits in Hanwoo cattle. *Genes and Genomics.* 31(1);35-41.

Han SH, Cho IC, Ko MS, Jeong HY, Oh HS and Lee SS(2010): Effects of POU1F1 and GH1 genotypes on carcass traits in Hanwoo cattle. *Genes & Genomics.* 32:105-109.

Han SH, Kim YH, Cho IC, Jang BG, Ko MS, Jung HY, and Lee SS(2008): Analysis of the genotype distribution in cattle breeds using a double mismatched primer set that discriminates

the MC1R dominant black allele. Kor. J. Anim. Sci. Technol. 50:633-640.

Han SH, Ko JC, Kim YH, Kim NY, Kim JH, Ko MS, Jeong HY, Cho IC, Yang YH and Lee SS(2010): Verification of ET and AI Derived Offspring Using on the Genetic Polymorphisms of Microsatellite and Coat Color Related Genes in Jeju Black Cattle. Journal of Life Science. 20(3):381-387.

Heyman Y, Chavatte-Palmer P, LeBourhis D, Camous S, Vignon X and Renard JP(2002): Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. Biol Reprod. 66:6-13.

Hosseini M. S, Kim YW, Park SM, Koo OJ, Hashem M. A, Bhandari D. P, Jeong YW, Kim S, Kim JH, Lee EG, Park SW, Kang SK, Lee BC and Hwang WS(2007): Antioxidant Favors the Developmental Competence of Porcine Parthenogenotes by Reducing Reactive Oxygen Species Asian-Aust. J. Anim. Sci. 20(3):334-339.

Im GS, Yang BS, Park SJ, Im SK, Yang BC, Yi YJ and Park CS(2001): Effect of protein supplementation, O₂ concentration and co-culture on the development of embryos produced by nuclear transfer using cultured cumulus cells in Hanwoo(Korean cattle). Asian-Aust J Anim Sci. 14(9):1260-1266.

Ishida T, Umebayashi A, Tsuruta S, Akashi R and Harada H(2010): Polymorphisms in growth hormone gene and their associations with calf weight in Japanese Black cattle. Animal Science Journal. 81:623-629.

Kalinowski ST, Taper ML and Marshall TC(2007): Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Mol Ecol. 16(5):1099-106.

Kim EY, Kim DI, Park NH, Weon YS, Nam HK, Lee KS, Park SY, Yoon SH, Park SP, Chung KS, Lim JH(1999): Systems for production of calves from Hanwoo (Korean Cattle) IVM/IVF/IVC blastocyst III. Vitrification and one-step dilution of Hanwoo blastocyst. Korean J Animal Reprod. 23(4):293-301.

Kim EY, Kim YO, Kim JY, Park MJ, Park HY, Han YJ, Mun SH, Oh CE, Kim YH, Lee SS, Ko MS and Park SP(2010): In vitro development of somatic cell nuclear transfer embryo treated with flavonoid and production of cloned Jeju Black Cattle. Reprod Dev Bio. 34(3):127-134.

Kim EY, Park MJ, Kim JY, Park HY, Noh EJ, Noh EH, Song DH, Oh CE, Kim TH, Mun SH,

Lee DS, Ko MS, Riu KZ and Park SP(2011): Production of Cloned Jeju Black Cattle (Korean Cattle) from SCNT Embryo using Vitrification, One-Step Dilution and Direct Transfer Technique. *Reprod Dev Biol.* 35(1):77-83.

Kim EY, Park MJ, Kim JY, Park HY, Noh EJ, Noh EH, Park KS, Lee JB, Jeong CJ, Riu KZ and Park SP(2012): Improved Cloning Efficiency and Developmental Potential in Bovine Somatic Cell Nuclear Transfer with the Oosight Imaging System. *Cellular reprogramming.* 14(4):305-311.

Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A and Watanabe T(2004): Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology.* 1:62(7):1186-97.

Lee, ER, Kim JH, Kang YJ and Cho SG(2007): The antiapoptotic and anti-oxidant effect of eriodictyol on UV-induced apoptosis in keratinocytes. *Biol. Pharm. Bull.* 30(1):32-7.

Lee SS, Yang YH, Cho IC, Kim NY, Ko MS, Jung HY and Han SH(2009): Relation of Expression Levels of Melanin Synthesis Genes according to the MC1R Genotypes with the Coat Color Patterns in Hanwoo, Jeju Black Cattle and Holstein *Journal of Life Science.* 19(3):384-389.

Lim JM, Liou SS and Hansel W(1996): Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of β -mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. *Theriogenology.* 46:429-439.

Lizuka K, Nakayama J and Nielsen J(1987): Optical fiber fault locator by the step frequency method. *Appl Opt.* 1:26(3):440-3.

Lonergan ACO, Evans E, Boland D, Rozos T, Fair P, Duffy L-Y, Sung F, Du S, Chaubal J, Xu X, Yang and Tian XC(2007): Pregnancy and fetal characteristics after transfer of vitrified in vivo and cloned bovine embryos. *Theriogenology.* 68:1128-1137.

Massip A, Van der Zwalmen P and Ectors F(1986): Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-Letters.* 7:270-273.

Massip A, Van der Zwalmen P and Leroy F(1984): Effect of stage of development on survival of mouse embryos frozen-thawed rapidly. *Cryobiology.* 21:574-577.

Ohshima H, Yoshie Y, Auriol S and Gilibert I(1998): Antioxidant and pro-oxidant actions of

flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion. *Free Radic Biol Med.* 25(9):1057–65.

Park SA, Kim MR, Kim PK, Cho HD, Han GY and Kim CW(2008): Sample preparation method for plasma membrane proteome analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 1;872(1-2):177–80.

Park SP(2008): Industrialization and mass production of Jeju Black Cattle. Annual report on Korea Institute of Planning & Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry & Fisheries.

Peura T, Hyttinen JM, Turunen M, Janne J(1991): Reliable sex determination assay for bovine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. *Theriogenology.* 35(3):547–55.

Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S and Ayares DL(2000): Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature.* 407:86–90.

Rall WF and Fahy GM(1985): Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature.* 313:573–575.

Reis C, Navas D, Pereira M and Cravador A(2001): Growth hormone AluI polymorphism analysis in eight Portuguese bovine breeds. *Arch. Zootec.* 50:41–48.

Sagirkaya H, Misirlioglu M, Kaya A, First NL, Parrish JJ and Memili E(2006): Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Anim Reprod Sci.* 101(3-4):225–40.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA(1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239(4839):487–91.

Sambrook J, Fritsch E. F, and Maniatis T(1989): *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory.

Scott L and Smith S(1997): Mouse in vitro fertilization, embryo development and viability, and human sperm motility in substances used for human sperm preparation of assisted reproduction. *Fertil Steril.* 67:372–81.

- Seide GE. Jr and Garner DL(2002): Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction*. 124:733-743.
- Shim SH, Lee CH, Park YJ, Lee HJ, Park WI and Cho YH(2001): Two inv dup(15) chromosomes in a woman with repeated abortions. *Am J Med genet*. 15; 104(4):303-6.
- Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, Buck S, Murphy K, Lyons L and Westhusin M(2002): A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*. 415:859.
- Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S and Wortsman J(2004): Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol. Rev*. 84:1155-1228.
- Strehler E, Baccetti B, Sterzik K, Capitani S, Collodel G, De Santo M, Gambera L, Piomboni P (1998): Detrimental effects of polyvinylpyrrolidone on the ultrastructure of spermatozoa (*Notulae seminologicae* 13). *Hum Reprod*. 13(1):120-3.
- Sulaimon SS and Kitchell BE(2003): The biology of melanocytes. *Vet. Dermatol*. 14:57-65.
- Suh TK, Schenk J. L and Seidel G. E. Jr(2005): High pressure flow cytometric sorting damages sperm. *Theriogenology*. 64:1035-1048.
- Sun L and Wu KL(2012): Increased cleavage rate of human nuclear transfer embryos after 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. *Reproductive BioMedicine online*. 25:425-433.
- Suzuki T, Yamamoto M, Ooe M, Sakata A, Matsuoka K, Nishikata Y and Okamoto K(1990): Effect of sucrose concentration used for one-step dilution upon in vitro and in vivo survival of bovine embryos refrigerated in glycerol and 1,2-propanediol. *Theriogenology*. 34:1051-1057.
- Takahashi M, Nagai T, Hamano S, Kuwayama M, Okamura N and Okano A(1993): Effect of thiol compounds on in vitro development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biol Reprod*. 49(2):228-32.
- Tatsuda K, Oka A, Iwamoto E, Kuroda Y, Takeshita H, Kataoka H and Kouno S(2008): Relationship of the bovine growth hormone gene to carcass traits in Japanese black cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 125:45-49.
- Tecirlioglu RT, French AJ, Lewis IM, Vajta G, Koorfiatis NA, Hall VJ, Ruddock NT, Cooney MA and Trounson O(2003): Birth of a cloned calf derived from a vitrified hand-made cloned embryo. *Reprod Fert Dev*. 15:361-366.

Trigal E, Gómez J.N, Caamaño M, Muñoz J, Moreno S, Carrocera D and Martín C (2012): In vitro and in vivo quality of bovine embryos in vitro produced with sex-sorted sperm. *Theriogenology* 78:1465–1475.

Vali U, Brandstrom M, Johansson M and Ellegren H(2008): Insertion-deletion polymorphisms (indels) as genetic markers in natural populations. *BMC Genet.* 22(9):8.

Voelkel SA and Hu YX(1992): Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient female. *Theriogenology.* 37:687–697.

Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR and Yanagimachi R(1998): Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature.* 23;394(6691):369–374.

Wang ZG, Yu SD and Xu ZR(2007): Improvement in bovine embryo production in vitro by treatment with green tea polyphenols during in vitro maturation of oocytes. *Anim Reprod Sci.* 100:22–31.

Weller JI and Ezra E(2004): Genetic analysis of the Israeli Holstein dairy cattle population for production and nonproduction traits with a multitrait animal model. *J Dairy Sci.* 87(5):1519–27.

Williams RJ, Spencer JP and Rice-Evans C(2004): Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med.* 1;36(7):838–49.

Wilson RD, Fricke PM, Leibfried-Rutledge ML, Rutledge JJ, Syverson Penfield CM and Weigel KA(2006): In vitro production of bovine embryos using sex-sorted sperm. *Theriogenology.* 65:1007–1015.

Woollard J, Schmitz CB, Freeman AE and Tuggle CK(1994): HinfI polymorphism at the bovine PIT1 locus. *J. Anim. Sci.* 72:3267.

Xian M, Azuma S, Naito K, Kunieda T, Moriwaki K, Toyoda Y(1992): Effect of a partial deletion of Y chromosome on in vitro fertilizing ability of mouse spermatozoa. *Biol Reprod.* 47(4):549–53

Yamagata K, Iwamoto D, Terashita Y, Li C and Wakayama S(2012): Fluorescence Cell Imaging and Manipulation Using Conventional Halogen Lamp Microscopy. *PLoS ONE.* 7(2):e31638.

Yang BC, Im GS, Kim DH, Ko YG, Hwang SS, Nho WG, Kim MJ, Yang BS, Lee SJ and Seong HH(2008): Effects of gestation length and birth weight on survival rate in cloned Korean Native Calves. *Reprod Dev Biol.* 32(1): 51-58.

You GY, Kim GY, Lim GM and Lee E(2010): Anthocyanin stimulates in vitro development of cloned pig embryos by increasing the intracellular glutathione level and inhibiting reactive oxygen species. *Theriogenology.* 74:777-85.

Zoheir K. M, Ahmed A. Allam(2010): A rapid method for sexing the bovine embryo. *Animal Reproduction Science.* 119:92-96.

최근 국내. 외 소 인공수정 및 수정란이식현황과 대책. 대한 수의사회지 2010. 08.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.