

# 최 종 보 고 서

<p>(뒷면)</p> <div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 30px; margin: 20px auto; text-align: center;"> <p>주 의 (편집순서 8)</p> </div> <p style="text-align: center;">(15 포인트 고딕체열)</p> <p style="text-align: center;">↑ 6cm ↓</p>	<p>인 간 유 용 단 백 질 생 산 을 위 한 형 질 전 환 소 의 개 발</p> <p style="text-align: center;">농 림 축 산 식 품 부</p> <p style="text-align: center;">↑ 3cm ↓</p>	<p style="text-align: right;">(앞면)</p> <div style="border: 1px solid black; width: 150px; height: 20px; margin: 10px auto; text-align: center;"> <p>발간등록번호</p> </div> <div style="border: 1px solid black; width: 150px; height: 20px; margin: 5px auto; text-align: center;"> <p>11-1543000-000477-01</p> </div> <p style="text-align: center; margin: 20px 0;">5cm ↓</p> <p style="text-align: center;">인간 유용단백질 생산을 위한 형질 전환 소의 개발 (Production of transgenic cow for secretion of human bio-reactors)</p> <p style="text-align: center; margin: 40px 0;">서울대학교 산학협력단</p> <p style="text-align: center; margin: 20px 0;">↑ 9cm ↓</p> <p style="text-align: center;">농림축산식품부</p> <p style="text-align: center; margin: 20px 0;">↑ 4cm ↓</p>
--	--	--

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “인간 유용단백질 생산을 위한 형질 전환 소의 개발” 과제(세부과제 “인간 유용단백질 생산을 위한 형질 전환 소의 개발에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2014년 04월 09일

주관연구기관명 : 서울대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 장구

세부연구책임자 : 장구

협동연구기관명 : 서울우유협동조합

협동연구책임자 : 장건종

## 요 약 문

### I. 제 목

인간 유용단백질 생산을 위한 형질 전환 소의 개발

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

소 수정란을 이용한 연구는 현재 산업적으로 이용될 수 있을 정도로 발달이 되었고, 최근 미래 축산의 발전을 위하여 형질 전환 연구의 필요성이 대두되었다. 기존에 복제 소가 태어날 시점에는 형질 전환 소 연구는 매우 제한적으로 이루어졌지만, 최근에 유전자 발현 기술의 발달과 수정란 배양 기술의 향상으로 선진국을 중심으로 관련 연구들이 수행되어가고 있다. 하지만 국내에서는 형질 전환 소 연구가 매우 제한적으로 이루어짐에 따라 그 연구 수준이 점점 선진국과 멀어지고 있어 관련 연구의 필요성이 대두되었다. 따라서 본 연구는 수정란 배양 및 생산 효율 향상을 바탕으로 최신 유전자 전달 기술을 적용하여 인간 유용단백질 발현 소 개발을 하려는데 그 목적이 있다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

- 1) 체외 배양 생산 시스템의 최적화를 통한 체외 수정란 및 형질 전환 배아 생산
- 2) 효과적인 유전자 전달 시스템 개발
- 3) 역분화 유전자 발굴 및 적용을 통한 세포 개발
- 4) Reporter형질 전환 소 배아 이식 및 생산
- 5) 인간유용단백질 발현 소 배아 생산 및 이식

### IV. 연구개발결과

- 1) 체외 배양 생산 시스템의 최적화를 통한 체외 수정란 및 형질 전환 배아 생산
  - 무혈청 배지 조성의 변화를 통한 체외 수정란의 배아 발달 향상 및 동결 용해후 생존율 증가를 위한 체외 배양 조건의 개선
- 2) 효과적인 유전자 전달 시스템 개발
  - 소 체세포 및 배아에 효과적인 유전자 전달방법으로 transposon 방법을 적용하였고, 이를 통한 형광 유전자 및 인간 유용단백질 유전자를 효과적으로 체세포에 전달
- 3) 역분화 유전자 발굴 및 적용을 통한 세포 개발
  - 소에서 역분화 줄기세포를 유도할 수 있는 배아 전사 유전자 클로닝을 하여 유전자 발현을 통한 역분화 줄기세포 유도 시스템 확보

4) Reporter형질 전환 소 배아 이식 및 생산

- Reporter유전자를 transposon 시스템에 적용하여 효과적인 형질 전환 배아 생산
- Transposon 유전자를 수정란에 미세 주입하여 형질 전환 배아 생산 및 이식을 통한 형질 전환 소 생산

5) 인간유용단백질 발현 소 배아 생산 및 이식

- 인간 유용 단백질 발현 체세포 확립 및 복제 배아 생산 및 이식
- 인간 유용 단백질 발현 유전자 수정란에 미세주입

**V. 연구성과 및 성과활용 계획**

1) 체외배양 배지 개선을 통한 수정란 배양 시스템의 안정화

- 배양 배지 특허를 준비중이며, 이와 관련 제품화를 계획

2) 외부 유전자를 효과적으로 소의 체세포 및 배아에 전달

- Transposon방법 안정화를 통한 형질 전환 배아 생산 시스템 개발
- 형질 전환 소의 탄생으로 유전자 전달 및 발현 시스템 연구 기반 확립

3) 유용 유전자 발현 시스템 구축으로 형질 전환 배아 생산 연구

- 인간 유용 단백질 유전자 발현 시스템 개발을 통한 형질 전환 소 개발 기반 마련
- 향후 이식을 통한 형질 전환 소개발, 검증을 통한 산업화 준비



## SUMMARY

### (영문요약문)

#### I. Title

Production of transgenic cow for secretion of human bio-reactors

#### II. Objective and Rationale

The necessity of transgenesis in bovine embryos has been raised because in vivo or in vitro fertilized embryos is well developed to date. When the first cloned cattle were born, transgenic research in bovine field is very limited due to low efficiency of gene delivery or understanding gene modification. However, recent rapid gene engineering technologies in bovine cells and in vitro culture improvements enable us to be more close to efficiently generate transgenic cattle. In particular, those research activities have been active in developed countries like USA. However, the research in transgenesis in cattle at our country have been done with limited condition and resulted in increasing scientific gap compared developed countries. Therefore, the need of those related researches has been increased. The aim of this study is to improve the in vitro chemically defined system and high end gene technologies in bovine cells or embryos for producing the transgenic cattle with human bio-reactors.

#### III. Research Contents

- 1) Producing in vitro fertilized embryos or transgenic embryos using Improved in vitro chemically defined media
- 2) Developing effective gene delivery system in bovine cells or embryos
- 3) New approaches for inducing cell lines using embryonic transcription factors
- 4) Producing Transgenic embryos with reporter genes and its transfer
- 5) Producing transgenic embryos with human bio-reactors and its transfer

#### IV. Research Results

- 1) Producing in vitro fertilized or transgenic cloned embryos using improved chemically defined media
  - We improved in vitro culture conditions via modifying defined culture media in terms of blastocyst production and freezing-thawing survival

## 2) Effective gene delivery system

- Transposon gene delivery system were used for effective gene delivery into bovine fibroblasts or embryos

- Confirming the exogenous DNA (reporter or human proteins) in bovine cells

## 3) Cloning bovine embryonic transcription factors and inducing the cell lines

- Obtaining bovine embryonic transcription factors and applied those genes into bovine cells

- Generating the protocols to produce induced pluripotent stem cells

## 4) Producing Transgenic bovine embryos with reporter genes

- Producing transgenic bovine embryos with fluorescence genes

- Generating a transgenic cattle using fluorescence gene microinjected system

## 5) Producing bovine embryos with human proteins and its embryo transfer

- Generating the bovine embryos from microinjected and nuclear transfer with human protein genes

- Bovine embryos with bio-reactors and transfer

## V. Research Achievements and applications

### 1) Improving in vitro chemically defined media

- On going to prepare patency and considering its related commercial items

### 2) Effective gene delivery in bovine embryo or fibroblasts

- Development of transposon gene delivery in bovine cells or embryos

- Producing a mutant cattle and its application

### 3) Developing the transgenic cattle for bio-reactors using effective gene delivery

- Establishing cell lines with human protein genes

- Further mutants embryo transfer and preparing industrial approaches

CONTENTS  
(영 문 목 차)

목 차

Chapter I- Overview of Research projects ----- 9

Chapter II - Current research activities in domestic or foreign countries ----- 11

Chapter III - Research activities and Results ----- 12

Chapter IV - Achievements and Contribution to related era ----- 73

Chapter V - Research outcomes and applications ----- 77

Chapter VI - Scientific informations in the middle of research projects ----- 85

Chapter VII - Current state of research facilities and equipments ----- 86

Chapter VIII - References ----- 87

## 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 -----	9
제 2 장	국내외 기술개발 현황 -----	11
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 -----	12
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	73
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	77
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	85
제 7 장	연구시설·장비 현황 -----	86
제 8 장	참고문헌 -----	87

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 1절 필요성

현재 우리는 무한 경쟁, 국제화 시대에 살고 있다. 국제적으로 무한 경쟁을 하는 이 시점에서 축산업이라는 분야도 이제는 다양한 각도로의 경쟁력 확보가 필요하다. 소에 있어서, 우수한 개체를 번식시키기 위하여 인공 수정 기법을 도입하여 상용화 되었고, 배아 이식등 관련 분야 연구를 통해 초기 배아 유전자 분석 기법을 통하여 성관정이 된 배아를 생산함으로써 암/수를 결정하여 소를 생산할 수 있는 단계에까지 올라왔다. 하지만, 소에 있어서 이런 수정란 관련 연구가 지속적이고 체계적으로 이루어지지 않고 있어, 연구 역량을 가지고 있는 국내 그룹들의 연구실적 상업화 적용이 선진국에 비해 뒤처지고 있다. 이에 최종 결과물 현장 적용이라



그림 1 연구의 필요성 모식도

는 견지 (R & BD)에서 소 수정란 관련 연구 (체외배양, 이식, 동결, 미세조작 및 형질전환)를 체계적이며 일관적으로 진행해야만 하는 시점에 와 있다고 생각된다.

최근에 축산업에도 첨단 분자생물학적 기술이 적용 되어 소, 염소 등의 우유에서의 유용단백질 생산관련 연구가 수행되고 있다. 현재 치료용 재조합 단백질을 생산하는 방법에는 크게 네 가지 방법이 적용되고 있다. E.coli을 이용하는 방법은 가장 먼저 상업화 되었고 효율적이지만, 그 재조합 단백질이 단순한 non-glycosylated proteins이라는 제한점이 있다. 비록 생산 가격은 저렴할지라도, 단백질의 processing과 refolding의 가격이 너무 높다. 그 외에 fungal systems, baculovirus production system등이 있다. 가장 표준적으로 complex glycosylated proteins (예, monoclonal antibody)를 생산하는 방법은 세포 배양 방법이다. 이 방법은 단백질이 적절히 folding되고 변환되지만, 생산 시설에 대한 낮은 양이 문제점으로 지적되고 있다.

연구자들은 재조합단백질을 형질 전환 동물을 이용해서 생산하려는 생각을 하였고, 1997년 복제양 돌리의 탄생은 그 연구에 더욱 박차를 가하게 해주었다. 재조합 단백질을 형질 전환동물을 이용해서 생산해야 하는가? 포유동물의 유선 (the mammary gland)의 주된 기능은 단백질을 생산하는 것이며, 유선은 40g/L의 단백질을 운반하는 우유를 생산할 수 있다고 한다. “이런 자연 단백질 분비 조직”의 독특한 특징을 이용하여 치료용 재조합 단백질을 생산하면 그 효과가 더욱 좋을 것으로 생각되기 때문이다. 현재 분자생물학 연구를 이용함으로써, 원하는 유전자를 운반하는 동물의 우유에서 치료용 단백질의 높은 수준을 발현하는 유전자 구성을 디자인 할 수 있다. 비록 유선의 상피세포에서는 자연적으로 유용 항체 (antibodies)가 발현되지 않지만, 현재는 항체의 heavy or light chain을 fold&assemble할 수 있는 machinery를 상피세포에서 나타내도록 하는 것이 연구되어, 항체의 heavy or light chains을 발현하는 milk specific promoter를 이용함으로써, 세포내 공장은 적절한 folded antibody를 높은 수준으로 생산 할 수 있다. 또한 포유동물의 세포 시스템에는 glycosylation과 gamma carboxylation과 같은 post-translational modifications (PTMs)가 있는데, 이는 재조합단백질들 효과와 약역학 (pharmokinetics)을 높이기 위해서 반드시 선결되어야 하는 부분이다. 이렇게 형질 전환 포유동물에서 재조합 유용 단백질을 생산하는 시스템이 확립되면 경제적 측면, 산업적, 과학적 측면으로 많은 효과를 누릴 수 있을 것으로 생각된다. 이미 GTC biotherapeutics는 재조합단백질을 유산양에서 분리 정제하여 제품이 시판 단계에까지 와 있다.

세계 최초로 양의 복제가 성공된 후 소, 쥐 및 염소 등 다양한 포유동물에서 적용되어, 관련 분야에 큰 과학적 성과를 보여주었는데, 이는 세포의 역분화라는 개념 증명, 유용 동물의 복원 및 가축에서의 형질전환동물 생산 등 산업적 적용 가능성 증진에 무한한 잠재력을 보여주었다. 그 후 세포의 역분화에 대한 연구가 진행되어 2006년 Yamanaka 그룹은 초기 배아 전사 유전자를 이용하여 마우스의 체세포를 역분화 만능세포로 만들었다 (Takahashi et al., 2006). 같은 방법으로 사람에게서도 적용되어서 역분화를 이용한 재생의학이 더욱 부각되었으며, 역분화 과정에 대한 연구가 많은 관심을 갖고 진행되고 있다. 역분화 만능세포의 특징은 ectoderm, endoderm 및 mesoderm으로 분화되고, 이론적으로 체외에서 무한 증식이 가능하며, 배아 줄기 세포와 그 성격이 매우 유사하다는 점이다. 그리고 체세포 복제에 이용하는 공여 세포의 형질 전환 시 항생제 선별과정에 세포가 많은 손상을 받아서 배양이 잘 되지 않는 단점이 있는데, 이 때문에 역분화 만능세포는 소, 돼지와 같은 산업동물에서 형질 전환 동물 생산에 대한 새로운 engine의 역할을 할 수 있을 것으로 생각되어진다. 역분화 만능세포가 소에서 개발되면 그런 점을 해결할 수 있고, 나아가 마우스에서처럼 germ line transmission이 되면 가축에서 형질 전환 동물을 생산할 때 복제 방법이외에도, 키메라 연구를 통해서 성공할 수 있다는 가능성이 있기에 그 연구의 필요성이 절실하다고 생각된다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 국내외 연구 현황

- alpha1-antitrypsin을 면양의 유즙에서 생산 (PPL Therapeutics, 1991).
- 세계 최초의 복제 양 생산 (Wilmut et al., 1997)
- 형질전환 복제 양 생산 (Schnieke et al., 1997)
- GFP 형질 전환 복제돼지 생산 (Park et al., 2001)
- 소의 우유 조성에 변화를 만든 형질 전환 소 생산 (Brophy et al. 2003)
- 이종장기 이식을 위한 형질전환 돼지 생산 (Lai et al., 2002; Kolber-Simonds et al., 2004)
- 유방염 저항성을 가진 복제 소 생산 (Wall et al., 2005)
- prion protein knockout 소 생산 (Kuroiwa et al., 2004; Richt et al., 2007)
- 초기 배아 전사 유전자를 통한 마우스의 역분화 만능세포 개발 (Takahashi et al., 2006)
- Human albumin/lactoferrin 을 생산하는 소의 생산 (Echelard et al, 2008; Yang et al., 2008)
- Generation of Red fluorescent protein transgenic dogs (Hong et al., 2009).
- GFP를 발현하는 형질 전환 한우 생산 연구 (Xu et al., 2013)
- ZFNs을 이용한 유선에서 lysostaphin gene발현 소 생산 및 검증 (Liu et al., 2013)
- TALEN을 이용한 다양한 산업동물에서 유전자 제거 검증 (Tan et al., 2013)
- TALEN을 이용한 소 유전자 변형을 통한 human serum albumin 생산 기반 연구 (Moghaddassi et al., 2014)

### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

#### 제 1절 실험적 접근 방법 및 내용

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
형질 전환 복제 배아 생산 및 검증	체외성숙, 태반 줄기세포 분리, PCR검증	체외 성숙 효과 개선을 위하여 VEGF와 NGF를 이용하여 적용하였으며, 체외 수정란 유래의 배반포로부터 태반 줄기세포를 분리하였고, 이를 복제 배반포에 적용하였다. 복제 배반포 유래의 태반 줄기세포를 이용하여 재 복제 실험을 진행하였고, 생산된 배반포에서 PCR을 통해서 유전자 발현을 검증하였다.
소의 역분화 세포 구축 및 외부 유전자 도입	유전자 클로닝, 발현벡터 완성, 세포 배양	배반포, 난소, 정소등 생식세포로부터 cDNA를 합성을 하고 합성된 cDNA로부터 소의 초기 배아 전사 유전자를 클러울 하고, 나아가 이를 multicistronic expression을 위하여 extension pcr을 실시하여 두가지 이상의 유전자가 발현되는 시스템을 적용한다. 또한 유전자 도입의 효율을 증진시키기 위하여 전기적 유전자 도입을 실시한다.
유전자 발현 시스템 개발	PCR/gateway cloning/EZ cloning/transfection/gene detection/infusion cloning	다양한 유전자 발현 벡터 시스템을 개발하기 위하여 PCR을 수행하였고, 좀 더 효과적인 cloning을 위하여 gateway PCR와 EZ cloning을 도입하여 적용하였다. 나아가 Cre/LoxP시스템과 PhiC31을 동시에 발현시키는 유전자 시스템을 적용하여 한번 두 번의 recombination되는 시스템을 적용하였다. 이렇게 완성된 유전자 발현 시스템은 Fugene을 이용하여 체세포에 도입하였다. 도입된 유전자의 평가는 reporter유전자 (GFP/RFP)의 발현 또는 항생선별, LacZ염색 등을 적용하여 세포를 선별하였다. 새로운 유전자 발현 시스템 검증을 위하여 infusion cloning을 적용하였다. Infusion cloning



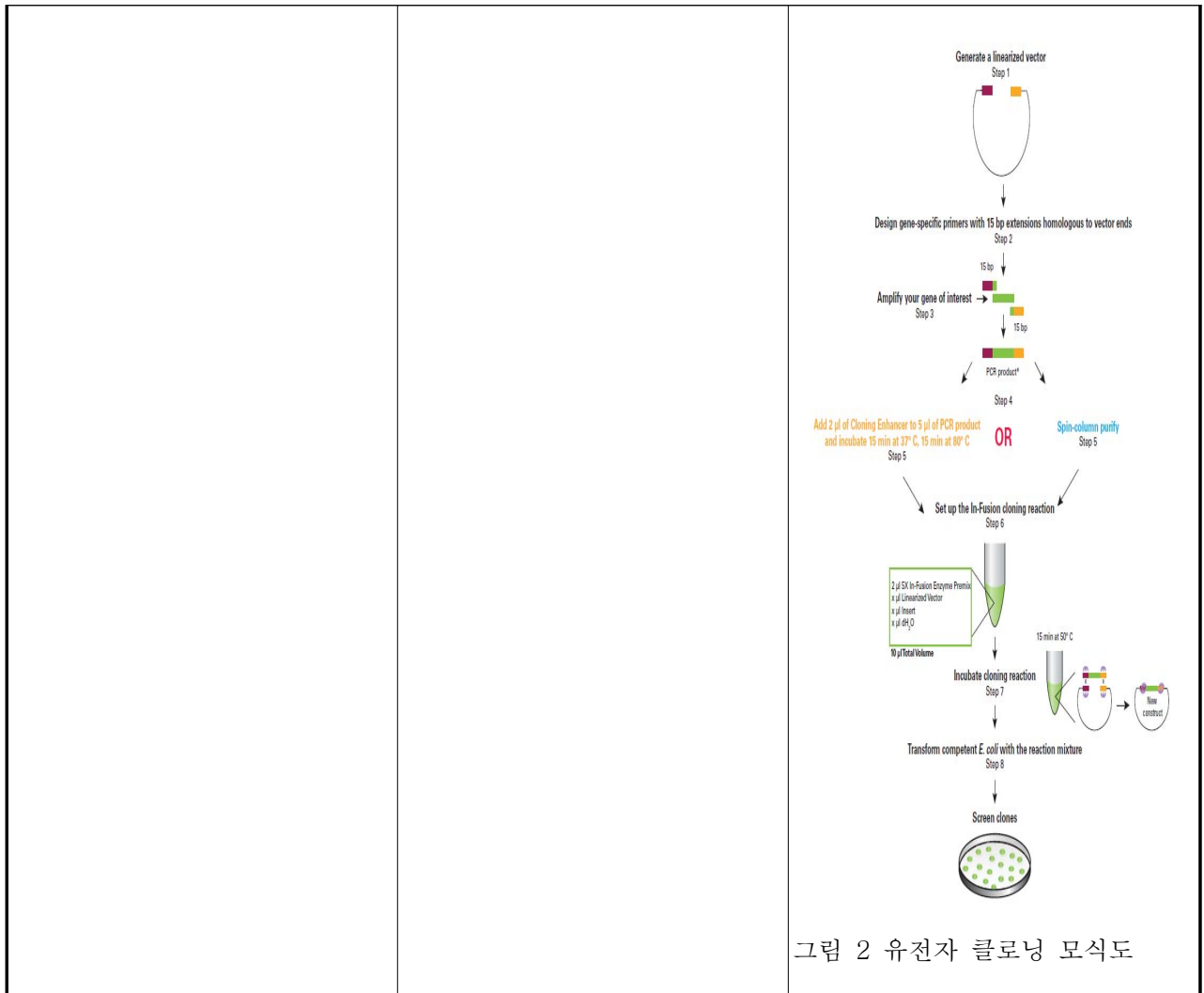
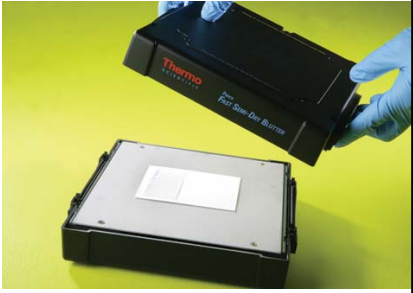


그림 2 유전자 클로닝 모식도

<p>유전자 발현 시스템 검증</p>	<p>Western blot</p>	<p>연구실에서 적용된 western blotting 개요</p> <p>20uL of sample + 5uL of 5x sample buffer</p> <p>↓</p> <p>Mix and spin down at RT</p> <p>↓</p> <p>Denature protein samples by boiling for 7 min at 95-100°C</p> <p>↓</p> <p>Centrifuge at 13000rpm for 10min at 4°C</p> <p>↓</p> <p>Prepare 12% precast gel and Transfer to tank (Bio-Rad)</p> <p>↓</p> <p>Load Protein marker (5-6uL) and Samples (25ul)</p> <p>↓</p> <p>Electrophoresis at 200 volts for 30 mins till the dye front reaches the bottom of the gel</p> <p>↓</p> <p>Transfer of protein from</p>
----------------------	---------------------	---

		<p>SDS-PAGE gel to PVDF membrane</p>  <p>그림 3 단백질 transfer과정</p> <p>Transfer gel on to the pre-activated PVDF membrane placed on the two pieces of pre-wet 3 mm papers kept on the anode platform of the Pierce Fast-Semi dry blotter</p> <p>↓</p> <p>Place two pieces of pre-wet 3 mm papers on the gel and add Pierce Fast-Semi dry transfer buffer</p> <p>↓</p> <p>Place the cathode plate electrode on top and connect to power supply</p> <p>↓</p> <p>Transfer protein to PVDF membrane at 25 volts for 7 mins</p>
<p>배아 이식 및 수란우 평가</p>	<p>배아 이식, 초음파 평가,</p>	<p>배반포를 0.5ml(또는 0.25 ml) straw에 로딩을 한 후에 배란 후 7일째 되는 대리모에 이식을 하였다. 이식을 한 후 약 40일령에 직장검사를 통해서 임신 진단을 한 후 임신이 된 개체에 대해서는 초음파 평가를 진행하였다.</p>
<p>형질 전환 복제 배아 생산 및 이식</p>	<p>체세포 복제, 이식, 동결</p>	<p>여러 가지 세포에서 유전자 도입을 실시하여 완성된 형질 전환 세포를 이용하여 체세포 복제를 실시하였다. 난자를 성숙하고, 성숙된 후 약 20시간에 핵을 제거하고, 형질 전환 세포를 도입하여 전기적으로 융합하고, 화학적으로 배아를 활성화하였다. 활성화된 배아는 무혈청 배지에 two step 배양 시스템을 적용하여 배양되었고, 배반포를 7일째부터 관찰하였다.</p>

		<p>이렇게 완성된 배반포는 대리모가 준비되었을 때 이식을 실시하였다. 이식이 안된 배반포는 세포수를 관찰하거나 동결 후 응해를 평가하기 위하여 동결하여 액체 질소에 보관하였다. 이식 효율을 향상시키기 위하여 Flunixin meglumine을 적용하였다.</p>
<p>형질 전환 복제우 생산 및 관리</p>	<p>초음파 확인, 세포 배양, 유전자 삽입 위치 분석</p>	<p>초음파 평가로 완성된 태아를 무균적으로 회수를 하고, 확보된 조직으로부터 세포 배양을 실시한다. 배양된 세포로부터 유전자가 잘 발현하고 있는지를 형광 현미경을 통하여 검증을 한다.</p>

## 2절 연구결과

### 1. 체외 배양 생산 시스템의 최적화를 통한 체외 수정란 및 형질 전환 배아 생산

#### 가. 체외성숙 개선에 따른 배아 발육 개선

체외 성숙에 미치는 효과를 알아보기 위하여 VEGF와 NGF의 단독 또는 같이 첨가하여 성숙에 미치는 효과를 실험하였다. 아래 표에서 보는 것과 같이 VEGF와 NGF의 처리시 체외 성숙율은 증가하였지만, 배반포 생산 효율은 유의적으로 증가하지 않았다 (그림 4).

Treatment (ng/mL) <sup>a</sup>	Replicate <sup>a</sup>	Total oocytes <sup>a</sup>	Rate of MII (%) <sup>a</sup>
NGF (0) <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	172 <sup>a</sup>	55.06 ± 5.55 <sup>a</sup>
NGF (10) <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	173 <sup>a</sup>	57.40 ± 13.80 <sup>a</sup>
NGF (100) <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	170 <sup>a</sup>	62.75 ± 19.41 <sup>a</sup>
NGF (0) <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>	152 <sup>a</sup>	51.77 ± 3.05 <sup>a,b</sup>
VEGF <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>	147 <sup>a</sup>	56.39 ± 5.75 <sup>a,b</sup>
VEGF + NGF (10) <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>	151 <sup>a</sup>	67.69 ± 11.07 <sup>b,c</sup>
VEGF + NGF (100) <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>	149 <sup>a</sup>	72.24 ± 7.81 <sup>c,d</sup>

Values (mean ± SE) in same column with different superscript a, b, c and d indicate P < 0.05.<sup>a</sup>

VEGF was used at 100 ng/mL.<sup>a</sup>

Treatment (ng/mL) <sup>a</sup>	No. of oocytes <sup>a</sup>	Replicate <sup>a</sup>	Cleavage Rates (%) <sup>a</sup>	Blastocyst Rates (%) <sup>a</sup>
Control <sup>a</sup>	109 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	62.69 ± 4.40 <sup>a,b</sup>	12.03 ± 9.73 <sup>a</sup>
VEGF <sup>a</sup>	108 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	73.50 ± 5.83 <sup>a,b</sup>	16.07 ± 10.26 <sup>a</sup>
NGF <sup>a</sup>	108 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	75.92 ± 7.56 <sup>a,b</sup>	13.01 ± 9.97 <sup>a</sup>
NGF + VEGF <sup>a</sup>	112 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	87.01 ± 4.69 <sup>b</sup>	19.85 ± 8.92 <sup>a</sup>

Values are mean ± SE in same column with different superscript a, b indicate P < 0.05.<sup>a</sup>

VEGF and NGF were used at 100 ng/mL each.<sup>a</sup>

그림 4 VEGF와 NGF을 이용한 체외 성숙 및 배양에 대한 결과

체의 성숙 효율을 증가시킨 유전자 발현 패턴을 보기 위하여 VEGF, NGF관련 유전자 발현 패턴을 리얼 타임 PCR을 이용하여 실시하였고, 그 결과는 아래와 같았다 (그림 5).

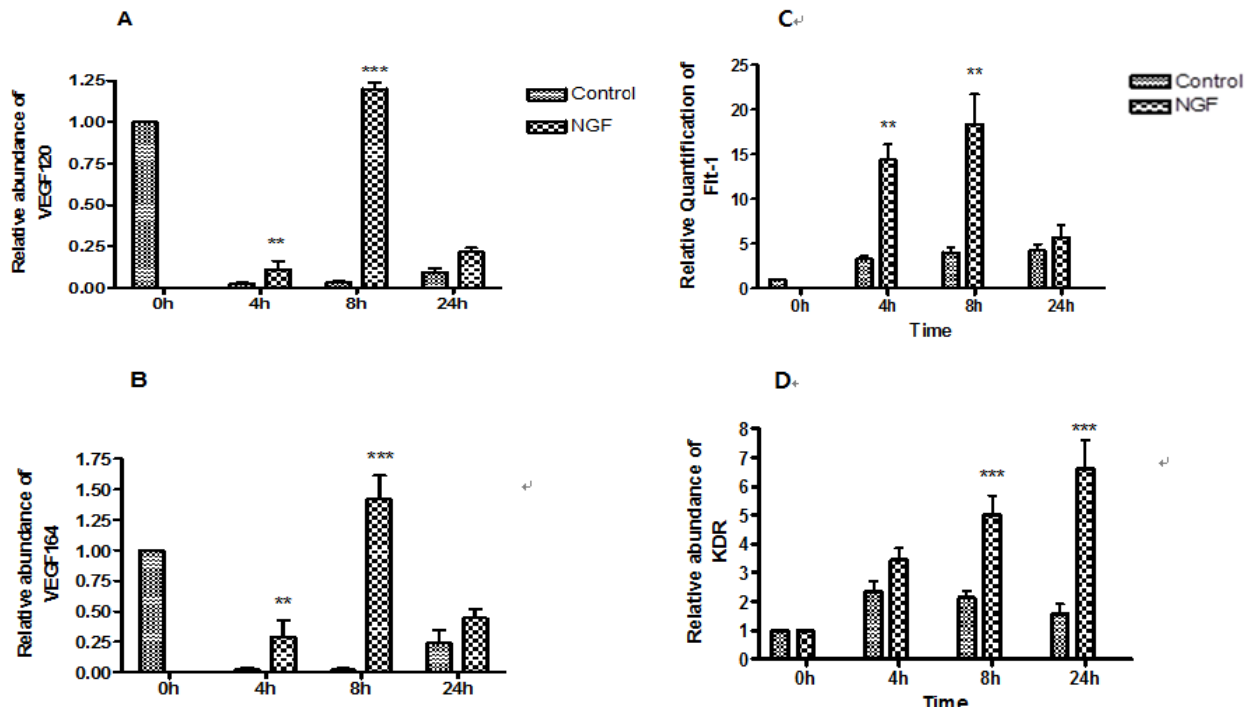


그림 5 Effect of 100 ng/mL NGF on mRNA relative abundance of VEGF120 (A), VEGF164 (B), Flt-1 (C) and KDR (D) in bovine cumulus cells during in vitro maturation. Significantly different from control (P<0.01)\*\*, (P<0.001)\*\*\*

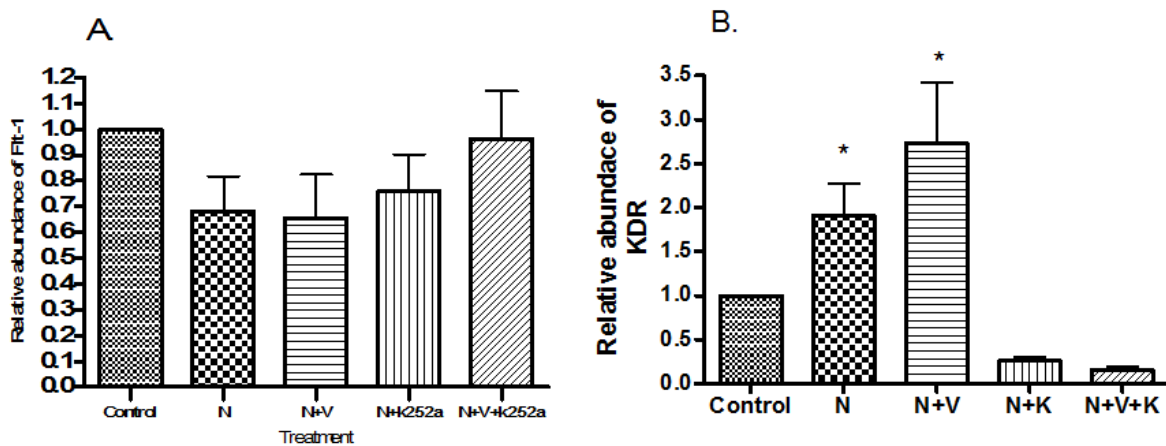


그림 6 Inhibitory effect of TrkA inhibitor (k252a) on mRNA expression of Flt-1 (A) and KDR (B) in cumulus cells 24 h after the beginning of IVM. N: NGF, V: VEGF, K:K252a, TrkA inhibitor.

Significantly different from control (P<0.05)\*

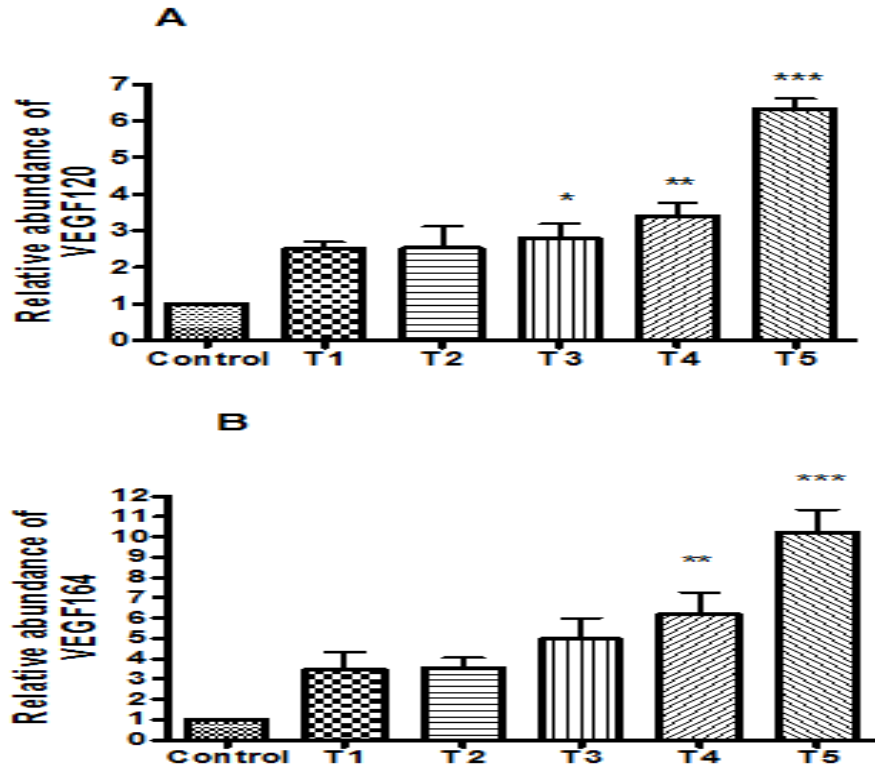


그림 7 Effect of VEGF (100 ng/mL), NGF (0, 10, 100, 200 ng/mL) and their combinations on mRNA expression of VEGF120 (A) and VEGF164 (B) in bovine cumulus cells after 24 h of IVM. T1: VEGF 100ng/mL, T2: NGF 100 ng/mL, T3: VEGF, 100 ng/mL + NGF 10ng/mL, T4: VEGF 100ng/mL + NGF 100 ng/mL, T5: VEGF 100ng/mL + NGF 200 ng/mL

Significantly different from control ( $P<0.05$ )\*, ( $P<0.01$ )\*\*, ( $P<0.001$ )\*\*\*

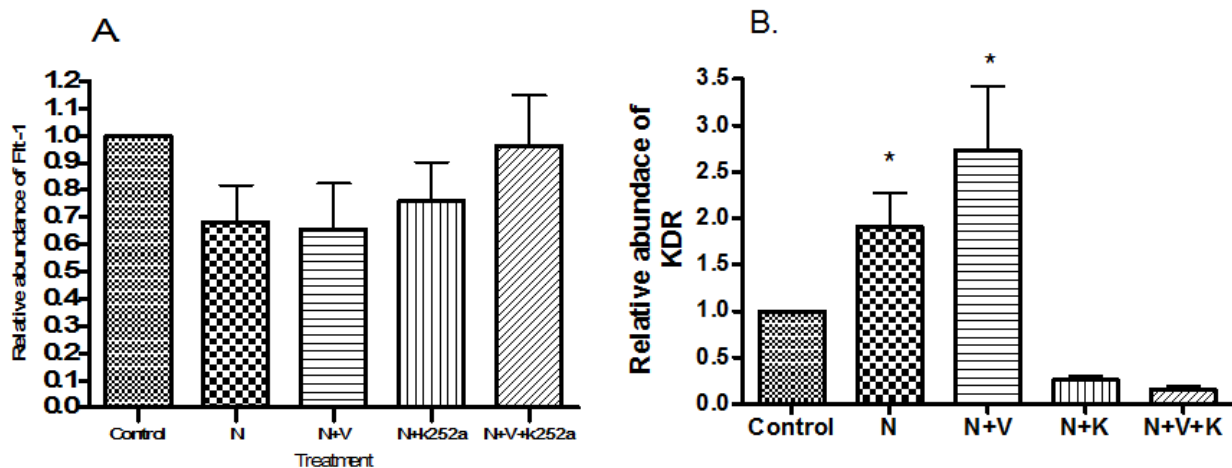


그림 8 Inhibitory effect of TrkA inhibitor (k252a) on mRNA expression of Flt-1 (A) and KDR (B) in cumulus cells 24 h after the beginning of IVM. N: NGF, V: VEGF, K:K252a, TrkA inhibitor. Significantly different from control ( $P<0.05$ )\*

#### 나. 배아의 착상 유전자 연구를 통한 형질 전환 배아에 대한 분자 생물학적 이해

소를 포함한 반추류에서는 Interferon-tau는 착상에 관여하는 매우 중요한 유전자로서, 초기 anti-luteolytic signal을 보내는 것으로 알려져 있다. 배아 발달에 대표적인 모습은 그림 9번과 같다. 형질 전환 복제 배아 생산에 있어서 체외 배양 조건이 중요한데, 연구를 통해서 얻어진 배지에서 자란 배아와 기존에 알려진 배지 (그림 10)에서 자란 배아에서 이 착상 유전자가 어떻게 발현하는지를 연구하였다. 그 결과 interferon tau는 배아 발달 단계 중 stage code 4번부터 발현이 시작하여 그 양이 점차 증가하는 것을 알 수 있었다. (그림 11).

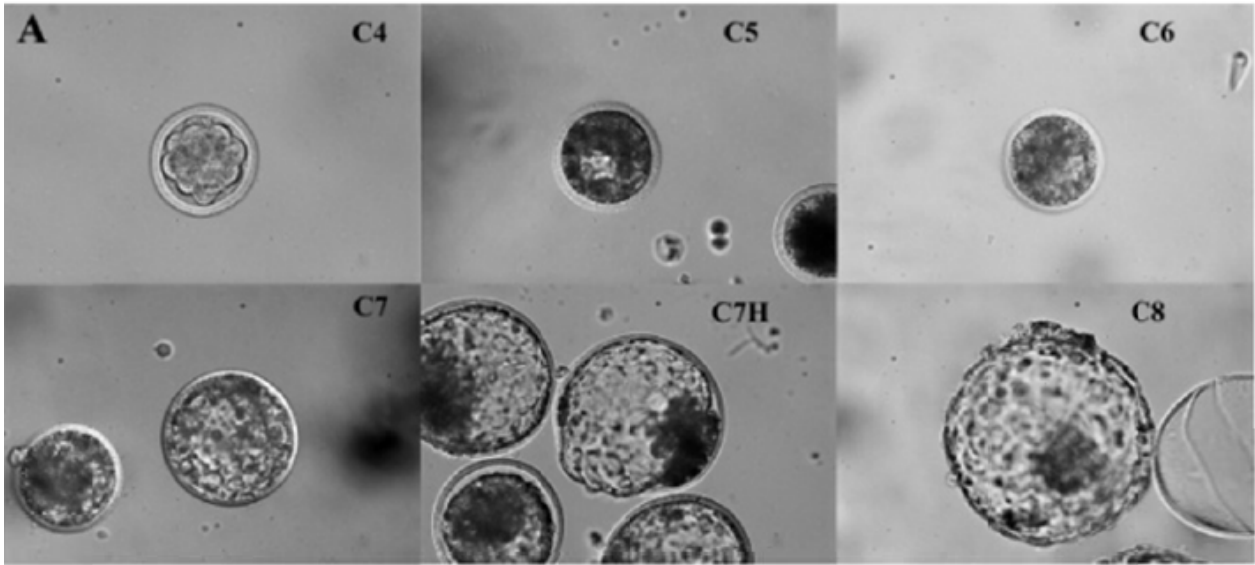


그림 9 배아 발육 단계에 따른 사진. C4: compact morula, C5: early blastocyst, C6: mid blastocyst, C7: expanded blastocyst, C7H: hatching blastocyst, C8: hatched blastocyst

Table 1. Developmental competence and cell numbers of blastocysts produced by somatic cell nuclear transfer (SCNT) using fetal fibroblasts as donor cells

Medium	No. fused SCNT embryos	No. of SCNT blastocysts (%) <sup>*</sup>	No. of cells in blastocysts (mean ± SEM)
mSOF <sup>+</sup>	177	47 (26.6)	118.6 ± 12.2
CDM <sup>++</sup>	142	32 (22.5)	111.7 ± 15.1

<sup>\*</sup> Percentage of SCNT embryos that developed to the blastocysts stage from the number of fused embryos. <sup>+</sup> mSOF: modified synthetic oviduct fluid (Jang et al., 2006), <sup>++</sup>CDM: chemically defined (Lim et al., 2007)

그림 10 기존에 알려진 배양 배지와 연구를 통해 만들어진 배아에서 체세포 핵이식 복제 배아의 배 발달을 및 세포 수의 관계

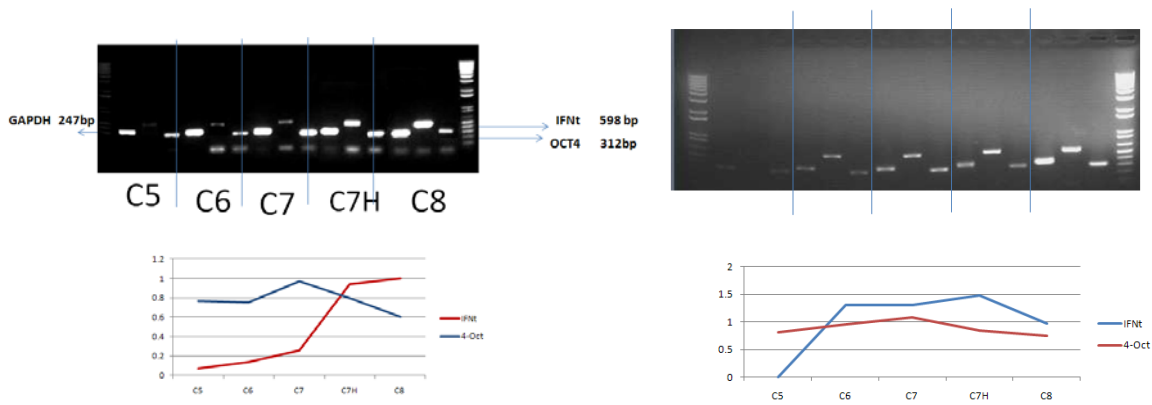


그림 11 두 가지 종류 배지에서 자란 배아의 발달 단계에 따른 착상 유전자와 배아 유전자와의 발현 관계

그림에서 보는 것처럼 배아의 발달 단계를 정확히 구분하여 (그림 9) 그 세포에서 유전자 발현을 분석하였다. 분석에 사용된 유전자는 housekeeping gene으로 GAPDH를 이용하였으며, ETS2, CDX2, Oct4, Nanog, GATA2, GATA3, IFN-tau등이 적용되었다. 초기의 semi-quantitative RT-PCR을 분석하고 (그림 12), 이를 바탕으로 real-time PCR을 실시하여 이들 유전자의 발현 패턴을 비교 분석하였다 (그림 12).

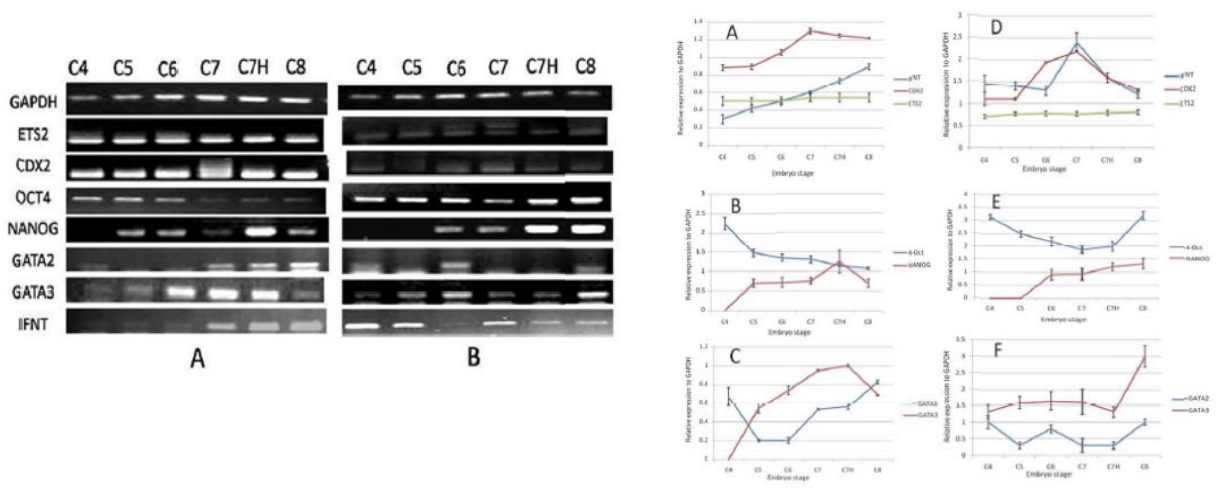


그림 12 배아 발육 단계별 유전자 발현 분석. 왼쪽은 semi-quantitative PCR, 오른쪽은 real-time PCR.



Embryonic development, total blastocyst number and fate of blastocyst after IVC of bovine IVF produced embryos in chemically defined two-steps medium (D1-D2) and mSOF\*

Item	Two-steps culture system				mSOF		
Zygote	184				170		
**Cleaved (%)	144 (78.3)				127 (74.7)		
**Morulae (%)	93 (50.5)				77 (45.3)		
**BL*** (%)	62 (33.7) <sup>a</sup>				32 (18.8) <sup>b</sup>		
**BL hatching (%)	52.3 <sup>a</sup>				33.5 <sup>b</sup>		
BL total cell number	C7	97 ± 9.21			93 ± 8.88		
	C7H	119 ± 11.34			113 ± 6.69		
	C8	140 ± 8.25 <sup>a</sup>			122 ± 6.42 <sup>b</sup>		
RQ*** of gene expression	Embryo stage	IFN $\tau$	OCT4	CDX2	IFN $\tau$	OCT4	CDX2
	C4	1	1	1	1	1	1
	C5	1.16	2.05	0.95	1	0.94	0.99
	C6	2.14	1.86	1.15	2.43	1.45	1.01
	C7	2.89	1.57	1.3	2.45	0.95	1.03
	C7H	3.18	0.65	1.33	2.5	1.37	1.08
	C8	3.59	0.38	0.97	1.28	1.83	1.07

<sup>a, b</sup> Values for different superscripts in the same row are significantly different ( $P < 0.05$ ).

그림 13 배아 발달, 세포수 및 유전자 발현양 비교 표

Relative pixel folds comparison of the analyzed RT-PCR gel photographs of embryos in vitro cultured in the two culture systems

Gene	Two-steps culture system						mSOF medium					
	C4	C5	C6	C7	C7H	C8	C4	C5	C6	C7	C7H	C8
ETS2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CDX2	+	+	+	+++	++	++	+	+	++	+++	+	+
OCT4	+++	++	++	++	+	+	+++	++	++	+	++	+++
NANOG	-	+	+	+	++	+	-	-	+	+	++	+++
GATA2	+	-	-	+	+	++	++	-	++	-	-	++
GATA3	++	+	++	++	+++	++	+	++	++	++	+	+++
Prominent gene/s	OCT4	OCT4	OCT4 GATA3	OCT4 CDX2 GATA3	CDX2 GATA3 NANOG	CDX2 GATA2 GATA3	OCT4	OCT4	OCT4 CDX2 GATA3	CDX2 GATA3	OCT4 NANOG	OCT4 NANOG GATA3
IFN $\tau$	+	+	++	++	+++	++++	+	+	+	+++	++	+

그림 14 배아 발달에 따른 중요 유전자 발현 비교 분석 표

#### 다. 유전자 적중 후 검증을 위한 후기 배아 배양 시스템 개발 및 응용

미세 주입 후 배반포 단계에서 유전자 변형 및 검증을 위하여 후기 배양 배반포 시스템의 필요성이 대두되었다. 이를 위하여 체외수정란이 만들어지는 8일째 부화 배반포 단계에서 배반포를 영양막 세포 위에 올려놓고, 태반 세포가 outgrowth하게 될 때, 그 부분을 기계적으로 분리 배양을 시도하여, 성공적으로 태반 줄기세포를 분리할 수 있었다. 아래 그림은 태반 줄기세포가 성공적으로 분리되어 자라고 있는 모습을 촬영한 사진이다 (그림 15).

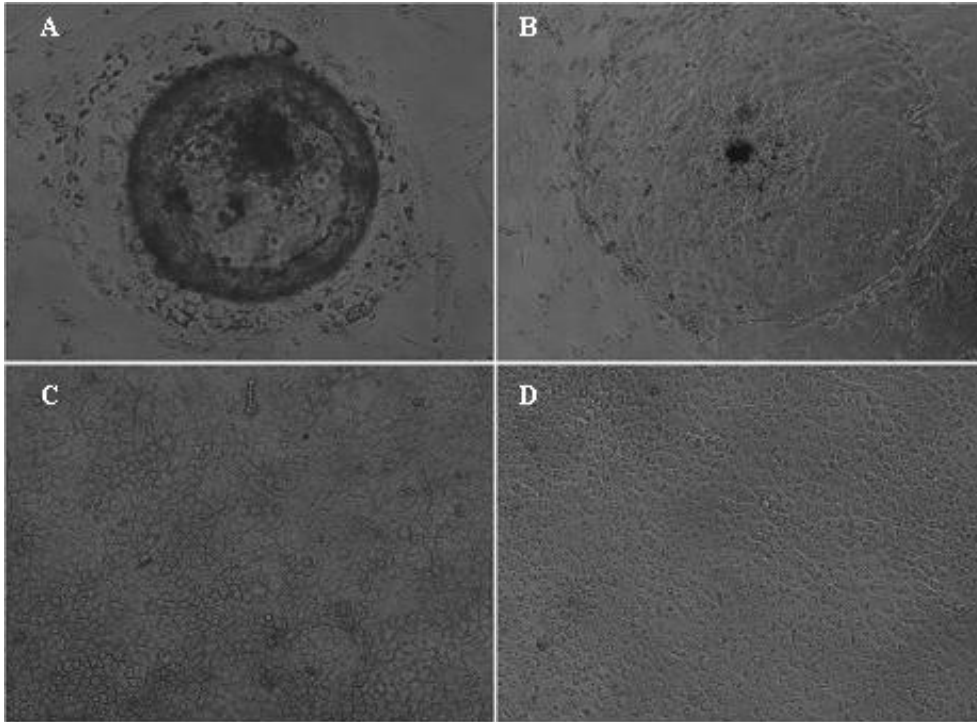
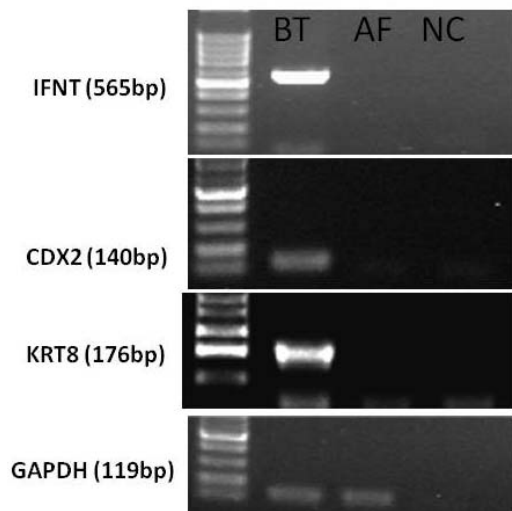


그림 15 후기 배반포 배양 사진. A) 초기 배반포 부착, B) 초기 콜로니 사진, C) 계대후 콜로니 상세 사진, D) 콜로니 모습

그림에서 보는 사진처럼 이 세포가 태반세포의 성격을 가지고 있는지 알기 위하여 가장 중요한 IFN-tau 발현과 관련 유전자를 분석하였다. 옆의 그림에서처럼 태반 줄기세포의 마커인 IFN-tau, cdx, KRT8의 유전자 발현이 잘 이루어지고 있는 것을 관찰 할 수 있었다. 이는 분리된 세포가 태반 줄기세포임을 증명하는 것이다 (그림 16).

나아가 이 태반 줄기세포를 이용하여 복제 배아를 생산하였다. 아직까지 태반 줄기세포를 이용하여 복제 배아를 생산한 동물은 마우스를 제외하고는 그 연구가 수행되지 않았지만, 본 연구를 통해서 우리는

그림 16 태반줄기세포의 유전자 발현 성공적으로 복제 배아를 생산할 수 있었다. 배반포 생산 비율은 성체 섬유아세포의 결과가 큰



차이를 보이지 않아서, 앞으로 태반 줄기세포의 이용가치가 높아질 것으로 판단된다 (그림 17).

Type of donor cell	Total oocytes	Fused oocytes (%)	Cleaved embryos (%)	Monula (%)	Blastocyst (%)
Adult Fibroblast	90	83 (93.1)*	63 (75.9)	24 (28.9)	13 (15.6)
Trophoblast	87	62 (71.3)	49 (79.0)	19 (30.6)	9 (14.5)

그림 17 태반세포와 성체세포를 이용한 형질 전환 배반포 발현 비교

태반 줄기세포를 이용한 형질 전환 배아 분석을 실시하였다.

Gene	Primer sequences (5'----3')	Annealing temperature (C)	Fragment size (bp)	GenBank accession number
<i>IFN<math>\gamma</math></i>	F: TCCATGAGATGCTCCAGCAGT R: TGTTGGAGCCCAGTGCAGA	60	103	X65539
	F*: GACGATCTCTGGGTTGTTAC R*: GTG ATGTGGCATCTTAGTCA	55	565	
<i>OCT4</i>	F: GGTTCTCTTTGGAAAGGTGTTTC R: AACTCGGACCACGTCCTTC	60	314	AF022987
<i>CDX2</i>	F: GCCACCATGTACGTGAGCTAC R: ACATGGTATCCGCCGTAGTC	60	140	DQ126146
<i>KRT8</i>	F: CACCAGTTCCAAGCCTGTGG R: TCAGGTCTCCTGTGCAGATGC	55	176	NM_001033610.1
<i>GAPDH</i>	F: GGCGTGAACCACGAGAAGTA R: CCCTCCACGATGCCAAAGT	60	119	NM_001034034.1

그림 18 태반세포 유래 세포 분석을 위해 사용된 프라이머 정보

배아 분석에 사용된 프라이머 정보는 위의 그림과 같다. 체외 수정란을 기준으로 하여 대표적인 유전자 발현을 분석한 결과는 아래 그림과 같다.

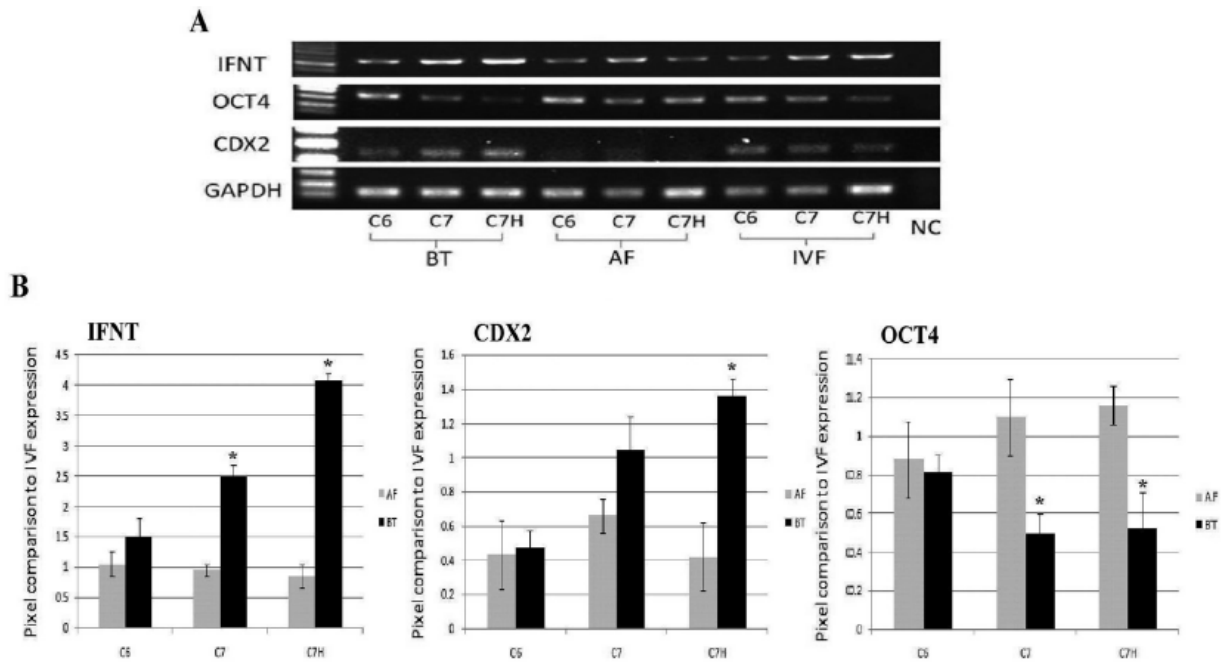


그림 19 . Interferon tau (IFN $\tau$ ), CDX2 and OCT4 expression by (A) reverse transcriptase PCR of blastocysts derived from NT by bovine trophoblasts (BT) and adult fibroblasts (AF) or by in vitro fertilization (IVF); (B) comparison of relative quantitative PCR of IFN $\tau$ , OCT4 and CDX2 in different stages of blastocysts, mid (C6), expanded (C7) and hatching (C7H), in BT- and AF-produced blastocyst. The values (mean $\pm$ SE) are presented as the relative expression to the same stage of IVF-produced blastocysts in arbitrary units. \*The value is significant ( $P\leq 0.05$ ).

## 라. 지방대사 증가 인자를 이용한 체외 배양 배지 연구

소의 배아에서 지방 대사를 향상시켜 배반포 발육 및 품질을 향상시키는 연구를 하였다.

(1) 그 결과 단위 발생을 통한 배반포 효율에서는 차이를 보이지 않았지만, 체세포 수에서는 그 결과가 유의적 차이를 보였다 (그림 20).

**Table 1. Parthenogenesis (PA) of bovine embryo cultured in the absence or presence of L-carnitine**

L-carnitine (mM)	No. embryos	No. Cleaved (%)	No. Blastocysts (%)	No. Cell (%) stage 7
0	552	480	86.96	123.01
5	427	396	92.74	144.88

그림 20 지방 대사 증가를 통한 단위 배아 발생의 배반포 발달 및 체세포 수

(2) 체세포 복제 배아의 경우는 아래와 같은 배발달 율을 보였다 (그림 21).

**Table 2. Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) of bovine embryo cultured in the absence or presence of L-carnitine**

L-carnitine (mM)	No. embryos	No. Cleaved (%)	No. Blastocysts (%)	No. Cell (%) stage 7
0	318	267	84.0	130.3
5	346	285	82.4	170.3

그림 21 체세포 복제 배아 발달 효과

지방 대사 효율의 증가로 배반포에 있는 지방의 양을 염색한 Sudan III으로 염색한 결과 처리군에서 더 낮은 발현을 관찰할 수 있었다 (그림 22).

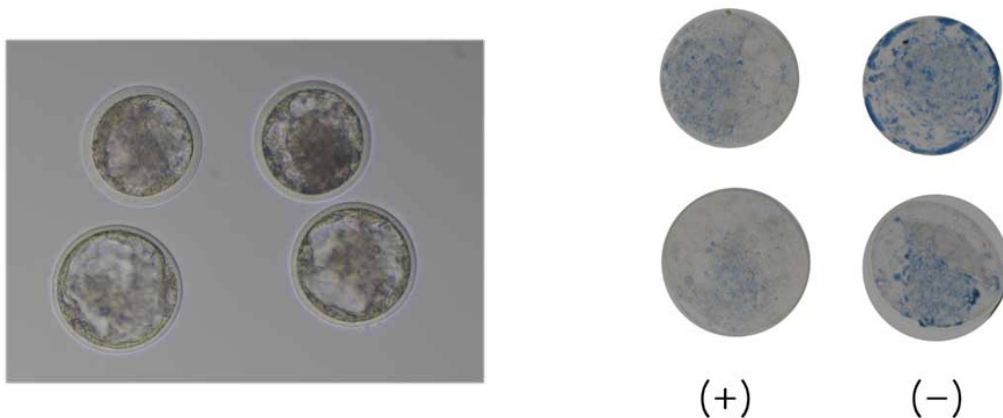


그림 22 지방 대사 효율 증가 처리 배반포 사진과 염색 후 사진

(3) 지방대사 첨가 후 생산된 배반포를 동결 용해 후 생존 (재확장-해빙율) 및 용해율은 아래 표와 같다.

L-carnitine(mM)	No.of blastocyst	No. of (%)			
		Re-expansion		Hatched blastocyst	
0	111	96	(86%)	81	(73%)
5	64	60	(94%)	46	(72%)
total	175	156	(89%)	127	(73%)

**마. 배아 발육 단계별에 따른 수태율 조사**

배아 발육 단계에 따른 배아 이식 후 수태율 검사를 통하여 추후 형질 전환 체세포 핵이식란의 이식 선별에 도움이 되고자 연구를 수행하였다. 배아의 발육단계 코드 4 (상실배), 5 (초기 배반포), 6 (중기배반포), 그리고 7(확장 배반포) 번까지의 수정란은 recipient의 승가허용발정 후 6.5, 7.0, 7.5 그리고 8.0 일에 각각 이식하였으며, 그 결과는 발육단계에 따른 수태율의 차이를 보이지 않았다. 즉 이식할 수정란의 developmental competence가 양호하다는 것을 가정한다면, 수란우에의 이식은 수정란의 발육단계와 수란우 이식시기를 적절히 조정함으로 최적의 수태율을 얻을 수 있다는 것을 의미한다. 향후 형질전환 체세포핵이식수정란의 이식 시에도 배아 선별에 도움을 줄 수 있는 중요한 지표로 이용될 수 있다.

표. Pregnancy rates of transferrable embryos after embryo recovery in Holstein cattle according to embryo developmental stage

Embryo stage code*	No. of		Pregnancy rate (%)
	embryo transfer	recipients conceived	
4	180	108	60.0
5	124	73	58.9
6	166	101	60.8
7	108	56	51.9
Total	578	338	58.5

Within a column, values are not different ( $p > 0.05$ ).

\*Code 4, 5, 6, and 7 means compacted morula, early blastocyst, mid blastocyst, and expanded blastocyst, respectively.

## 바. 형질 전환 배반포 발육을 비교 연구

1) Simple GFP발현 벡터 도입후 생산된 세포를 이용한 배반포 발달 비교

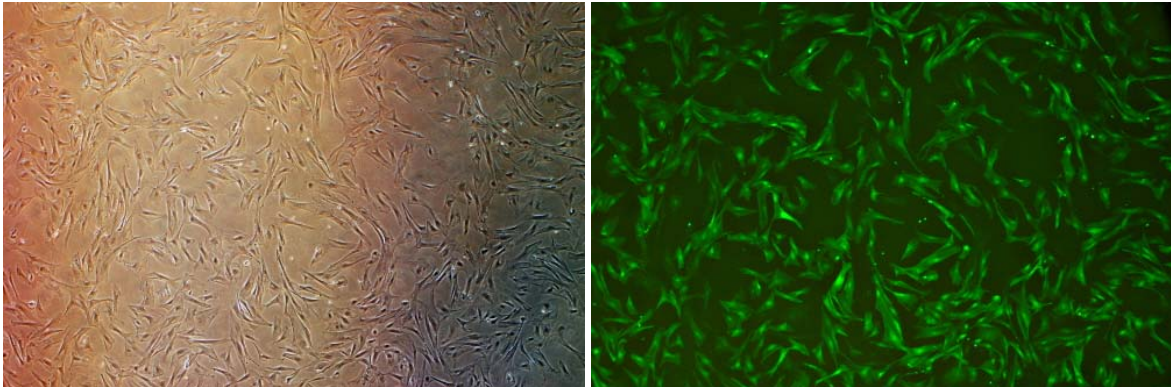


그림 23 항생제와 GFP가 둘다 발현하는 유전자로 완성된 태아 섬유아세포

위의 그림과 같이 GFP 리포터 유전자가 발현된 태아세포를 이용하여 기존 세포와 배아 발육을 비교하였다 (표 12).

	Developmental Competence			Cell number (n = 30)		
	No. of Reconstructed embryos	Cleaved embryos (%)	Blastocysts (%)	ICM	TE	Total
FF*	615	408 (69.3)	180 (29.2)	32.3 ± 14.7	89.7 ± 28.3	122.1 ± 33.5
GFP-FF**	589	408 (66.3)	118 (20.0)	30.6 ± 11.5	86.5 ± 32.2	117.2 ± 39.7

표 12 \*FF: fetal fibroblast, \*\*GFP-FF: green fluorescent protein-fetal fibroblast

2) RFP가 on/off되는 여러 세포에 대한 형질전환 복제 배반포 생산

체세포간에 유전자 발현이 달라지는 것을 분석하기 위하여, RFP가 on/off가 되는 세포를 4개의 다른 섬유아세포로부터 완성을 하였다. 이렇게 완성된 세포에서 모두 RFP가 on/off되는 것을 관찰하였고, 각기 다른 세포를 이용하여 복제를 실시한 결과 배반포 비율은 31.9 ~ 35.3%까지 매우 비슷한 결과를 보여주었다 (그림 24).

cell name	공여난자(개)	분할란(개)	분할률(%)	배반포(개)	배반포율(%)	배반포율(CL%)
2219호♀/FB/RFP	463	378	81.6	153	33.0	40.5
0615호♂/ear/TET_RFP	479	395	82.5	169	35.3	42.8
2880호♂/ear/TET_RFP	94	79	84.0	30	31.9	38.0
5618호♀/ear/TET_RFP	259	230	88.8	90	34.7	39.1
합계	1295	1082	83.6	442	34.1	40.9

그림 24 RFP on/off에 따른 배반포 발육률



(3) 다양한 형광 세포간의 형질 전환 배아 발달을 비교 (그림 25)

기계적으로 분리된 GFP세포, 항생제로 분리된 on/off-RFP, GFP복제태반유래의 세포, 대조군 세포, phiC31 GFP 발현 세포 등 다양한 유전자 발현 세포들간의 배반포율을 비교하였다. 가장 낮은 배반포 비율을 보여준 세포는 성체 피부 섬유아세포에서 18.5%로 관찰되었으며, 가장 높은 비율은 GFP 복제 태반 유래 조직으로부터 분리된 세포 복제 배반포를 생산하였을 때이다 (37.5%). 그 이유는 기계적으로 분리된 GFP세포의 상태가 좋지 않았지만, 복제를 통해서 임신이 되고, 그 임신된 태반 유래의 세포이므로, 이미 세포가 다시 rejuvenation 과정을 거쳤기 때문으로 판단된다.

cell name	공여난자(개)	분할란(개)	분할률(%)	배반포(개)	배반포율(%)	배반포율(/CL%)
GFP	168	134	79.8	31	18.5	23.1
RFP	1295	1082	83.6	442	34.1	40.9
제대세포(GFP)	24	20	83.3	9	37.5	45.0
ear cell	102	76	74.5	19	18.6	25.0
HS-u09 GFP	65	47	72.3	13	20.0	27.7
합 계	1654	1359	82.2	514	31.1	37.8

그림 25 다양한 형광 세포간 형질 전환 배아 발달을

(4) 계대별에 따른 배반포율 비교 (그림 26)

세포의 계대별 배반포율을 비교 실험하기 위하여 보통 체세포 핵이식을 실시하였다. 아래 표에서 보는바와 같이 2~4계대의 세포에서는 배반포율이 29.7%, 5~8계대의 세포에서는 배반포율이 33% 그리고 9~11계대에서는 27.7%를 보여주었다. 그룹간의 큰 차이를 보이지는 않았지만 5~8 계대의 세포를 이용할 때 복제 배반포 생성율이 제일 높은 것으로 관찰되었으며 이를 이용하는 형질 전환 배반포 생산에 도움이 될 것으로 판단된다.

passege	공여난자(개)	분할란(개)	분할률(%)	배반포(개)	배반포율(%)	배반포율(/CL%)
2~4	495	376	76.0	147	29.7	39.1
5~8	874	740	84.7	288	33.0	38.9
9~11	285	243	85.3	79	27.7	32.5
합 계	1654	1359	82.2	514	31.1	37.8

그림 26 세포 계대별에 따른 배반포 발육율

(5) Reporter유전자 발현 형질 전환 배아의 동결 후 융해 생존율

GFP와 RFP를 발현하는 배반포를 동결 후 융해한 결과 융해 48 시간 후에는 86.7%, 86.1%를 보여주었고, 72시간 이상 배양시 해칭율은 66.7, 70.6%의 생존율을 보여주었다.

type	No.of blastocyst	No. of (%)			
		Re-expansion		Hatched blastocyst	
GFP	15	13	(86.7)	10	(66.7)
RFP	36	31	(86.1)	26	(72.2)
total	51	44	(86.3)	36	(70.6)



(6) 체외수정란/체내수정란/복제 배아의 동결 후 융해 생존율

체외 수정란, 실험을 위해 회수한 체내 수정란, 그리고 복제 배반포의 동결 후 융해 생존율은 아래 표와 같다. 표에서 보여주는 것처럼 복제 배반포의 융해후 생존율은 체내 수정란 및 체외 수정란에 비해 생존율이 나쁘지 않음을 관찰 할 수 있었다.

type	vitro/vivo	No.of blastocyst	No. of (%)			
			Re-expansion		Hatched blastocyst	
IVF	vitro	105	91	(86.7)	73	(69.5)
NT	vitro	88	76	(86.4)	63	(71.6)
PA	vitro	66	60	(90.9)	48	(72.7)
FL	vivo	20	19	(95.0)	19	(95.0)

(7) 다양한 세포별 체세포 복제 배아 발달 비교 분석

### Difference of cell type

2012.04~2012.12

name	donor	passage	embryo	cleavage	CL(%)	blastocyst	BL(%)
Jersey	No.2040 ♀	2	37	32	86.49	9	24.32
Jersey	No.2040 ♀	3	99	79	79.80	22	22.22
Jersey	No.2040 ♀	4	133	93	69.92	24	18.05
Jersey	No.2040 ♀	5	100	64	64.00	14	14.00
Jersey	No.2040 ♀	6	144	86	59.72	31	21.53
Jersey	No.2040 ♀	7	56	40	71.43	8	14.29
Jersey	No.2040 ♀	8	18	11	61.11	5	27.78
			587	405	68.99	113	<b>19.25</b>
ear cell	SD0615♂	5	148	130	87.84	47	31.76
ear cell	SD0615♂	6	32	31	96.88	15	46.88
ear cell	SD0615♂	11	55	50	90.91	8	14.55
ear cell	SD0615♂	12	40	31	77.50	10	25.00
ear cell	SD0615♂	13	33	31	93.94	14	42.42
			308	273	88.64	94	<b>30.52</b>
cumulus	cumulus	0	60	49	81.67	12	20.00
cumulus	cumulus	1	52	39	75.00	9	17.31
			112	88	78.57	21	<b>18.75</b>
mCherry TET-RFP	2880	8	60	50	83.33	20	33.33
mCherry TET-RFP	2880	9	23	20	86.96	9	39.13
mCherry TET-RFP	2880	10	59	44	74.58	5	8.47
mCherry TET-RFP	2880	11	54	43	79.63	20	37.04
			196	157	80.10	54	<b>27.55</b>
RFP CABMI T2A	SD0615♂	9	16	13	81.25	2	12.50
RFP CABMI T2A	SD0615♂	11	9	4	44.44	1	11.11
RFP CABMI T2A	SD0615♂	13	83	69	83.13	27	32.53
			108	86	79.63	30	<b>27.78</b>
SD11+PT/BH mCH	SD0615	6	26	21	80.77	6	23.08
SD11+PT/BH mCH	SD0615	7	34	30	88.24	16	47.06
			60	51	85.00	22	<b>36.67</b>
TET-RFP	2880	7	42	37	88.10	13	30.95
TET-RFP	2880	8	54	39	72.22	13	24.07
TET-RFP	2880	9	38	26	68.42	14	36.84
			134	102	76.12	40	<b>29.85</b>
RFP	2880	8	47	30	63.83	17	36.17
RFP	5618	8	52	49	94.23	24	46.15
RFP	cambi	11	15	7	46.67	2	13.33

그림 27 세포별 체세포 복제 배아 발달 비교

(8) 2012년 형질 전환 배아 생산 효율 비교

안정적인 형질 전환 배반포를 생산하기 위하여 월별 형질 전환 배아 생산 효율은 위 표와 같으며 2012년 총 2,177개의 공여난자에서 600개의 배반포를 생산하였고, 평균적으로 27.6% (25-38%)의 배반포 효율을 보여주고 있다.

월	실험횟수	공여난자(개)	분할란(개)	분할률(%)	배반포(개)	배반포율(%)	비고
1월	4	72	58	80.6	27	37.5	
2월	9	126	82	65.1	36	28.6	
3월	11	196	152	77.6	64	32.7	
4월	7	122	94	77.0	45	36.9	
5월	11	212	155	73.1	44	20.8	
6월	12	215	148	68.8	51	23.7	
7월	11	202	150	74.3	42	20.8	
8월	10	148	119	80.4	37	25.0	
9월	14	272	239	87.9	89	32.7	
10월	14	280	238	85.0	70	25.0	
11월	10	210	167	79.5	61	29.0	
12월	5	122	103	84.4	34	27.9	
Total	118	2,177	1,705	78.3	600	27.6	

그림 28 형질 전환 배아 생산 효율 비교

(9) 2013년 다양한 형질 전환 세포를 이용한 배반포 발달

다양한 형질 전환 유래 세포 배반포 발달은 아래의 표와 같았다.

Cell type	Donor	No. of Experiment	No. of Embryo	No. of Cleavage	Rate of CL(%)	No. of Blastocyst	Rate of BL(%)
Homologous recombination	2880HOm	3	59	53	89.8	12	20.3
Control cells	8904Jerf	2	17	12	70.6	2	11.8
pT2/BH EF1a EGFP IL2	8336HOf	15	416	353	84.9	107	25.7
PT2/BH loxp CAG-eGFP	2880HOm	13	253	203	80.2	64	25.3
pT2/BH TET-EF1a EGFP IL2 rtTA	8336HOf	4	97	75	77.3	23	23.7

## 2. 효과적인 유전자 전달 시스템 개발

### 가. 형질 전환 복제 배아를 위한 우수 세포주 확립

#### (1) 세포 확립 및 성별 판정

체세포 핵이식을 확립하기 위해서는 유전형질을 알고 있는 세포 확립을 위하여 대리모에 인공 수정을 실시하였다. 인공 수정을 실시한 후 임신된 대리모를 대상에서 임신 50일령에 무균 수술적으로 태아를 회수하였다. 회수된 태아에서 세포를 분리하기 위하여 머리, 팔, 내장 장기를 제거하고 남은 조직을 잘게 잘라서 트립신에서 한시간 배양 한 후에 배양 접시에 배양을 하였다. 2-3일 후부터 세포가 자라기 시작하여 배양 접시가 완전히 가득찰 때까지 배양하였다 (그림 29). 그 후 확립된 세포를 추후 사용하기 위하여 배양을 하였고, 일부는 성판정을 위하여 PCR과 핵형 검사를 실시하였다 (그림 30). 4개의 세포주를 분리하였다.



그림 29 초음파를 이용한 임신 확인과 수술적으로 태아 회수. A) 초음파를 이용한 임신 확인, B) 수술적으로 태아 회수, C) 회수된 50일령 태아, D) 태아로부터 회수된 세포 사진

그림 30 성판정을 위한 핵형 검사 및 PCR. 세포를 이용한 핵형 검사, XX, 암컷 (왼쪽그림), PCR을 이용한 검사시 난소와 같은 증폭 (오른쪽 그림)

### 나. Transposon방법을 통한 기본 적중 형질 전환 세포 확립

(1) Transposon은 세포내의 유전체에서 여러 장소로 돌아다니는 DNA를 의미하는 것으로, 돌아다니는 과정에서 돌연변이가 생기거나 유전자의 양이 감소 혹은 증가하게 된다. 이 transposon을 이용하면 효과적으로 외부 유전자를 전달할 수 있을 것으로 생각되며, 먼저 그 발현 양상을 리포터 유전자를 이용하여 평가하였다. 리포터 유전자로는 가장 실험적으로 판별하기 쉬운 GFP와 RFP를 이용하였으며, 그 구조는 아래 그림과 같다.

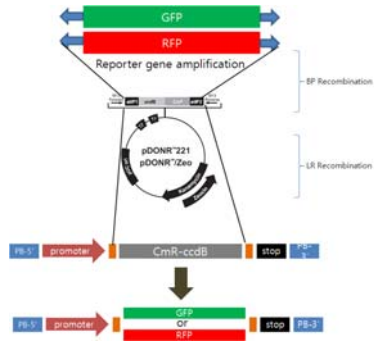


그림 31 Gateway를 이용한 reporter 유전자의 발현 모식도.

Transfection을 이용하여 GFP와 RFP를 집어넣고, 계대 배양을 통해서 GFP와 RFP가 발현하는 세포를 확립하였다.

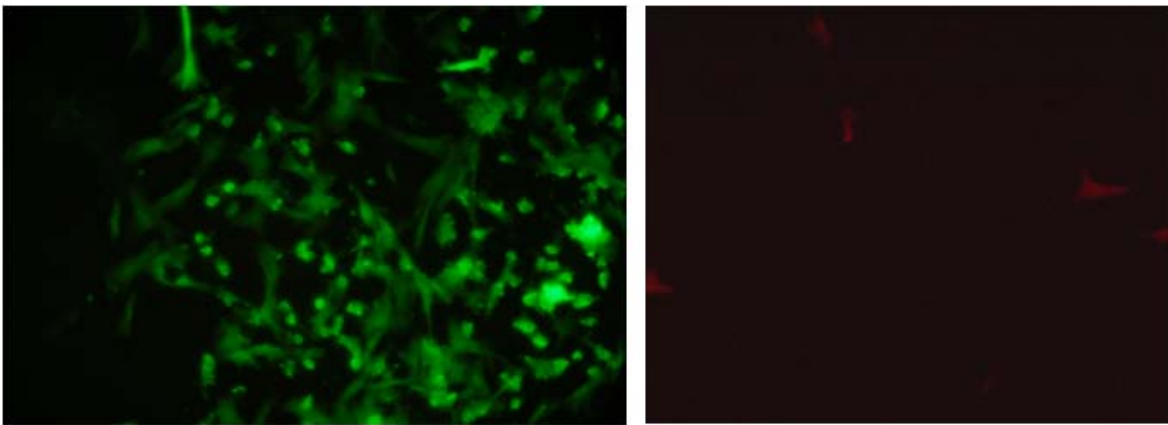


그림 32 GFP (왼쪽)와 RFP (오른쪽)을 발현하는 태아 섬유아세포

(2) 유전자 선별 마커를 위한 항생제 농도 테스트 결과 (그림 33)

항생제 농도 테스트 결과 750~1000ug/mL의 네오마이신 농도가 향후 유전자 선별 세포에 사용될 적정 농도로 판단되었다.

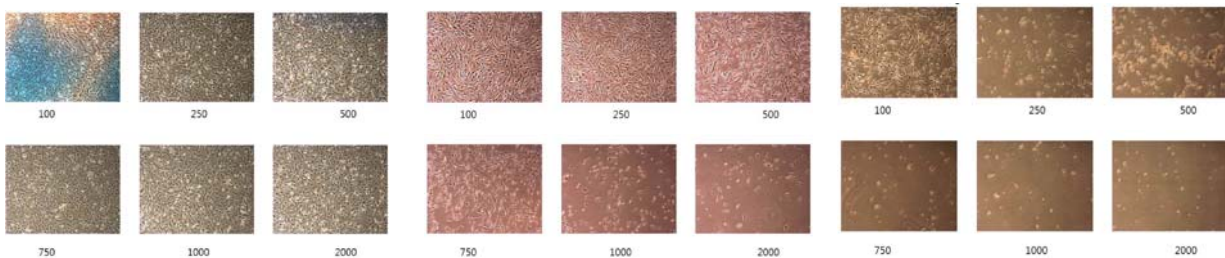


그림 33 네오마이신 농도별 세포 사멸 사진

(3) 유전자 발현 on/off 시스템을 이용한 목적 유전자 발현 시스템 구축

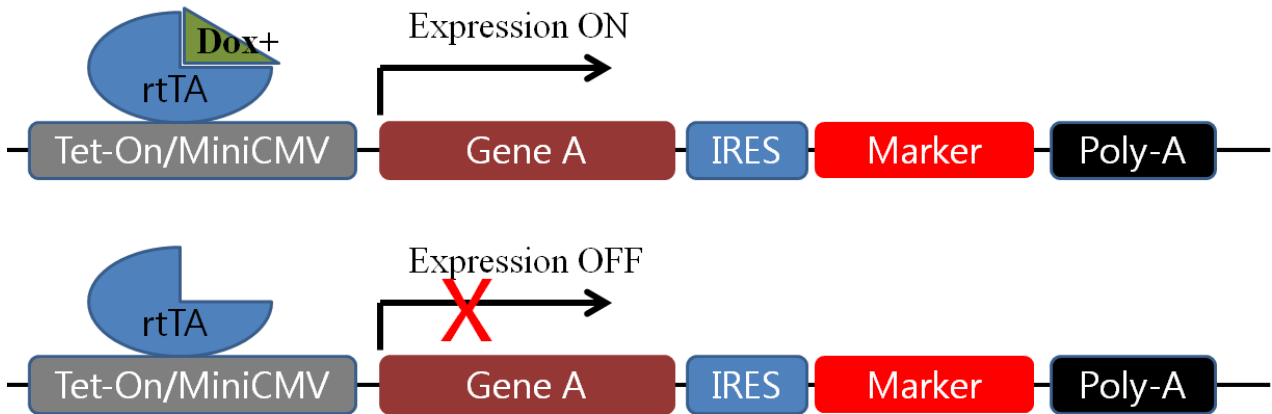


그림 34 유전자 발현 on/off 시스템 구축 모식도

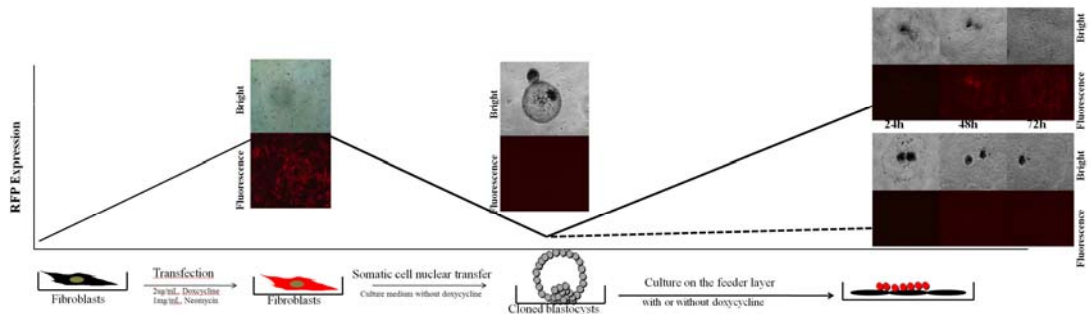


그림 35 목적 유전자 발현 on/off를 이용한 세포 확인 및 배아 확인

위의 그림과 같이 인간 유용유전자 및 형광 유전자 발현 on/off를 확립하고, 이를 이용한 세포 내 확인, 배반포 확인, 후기 배반포 확인으로 검증하였다.



(4) Site-specific gene recombination을 이용한 유전자 발현

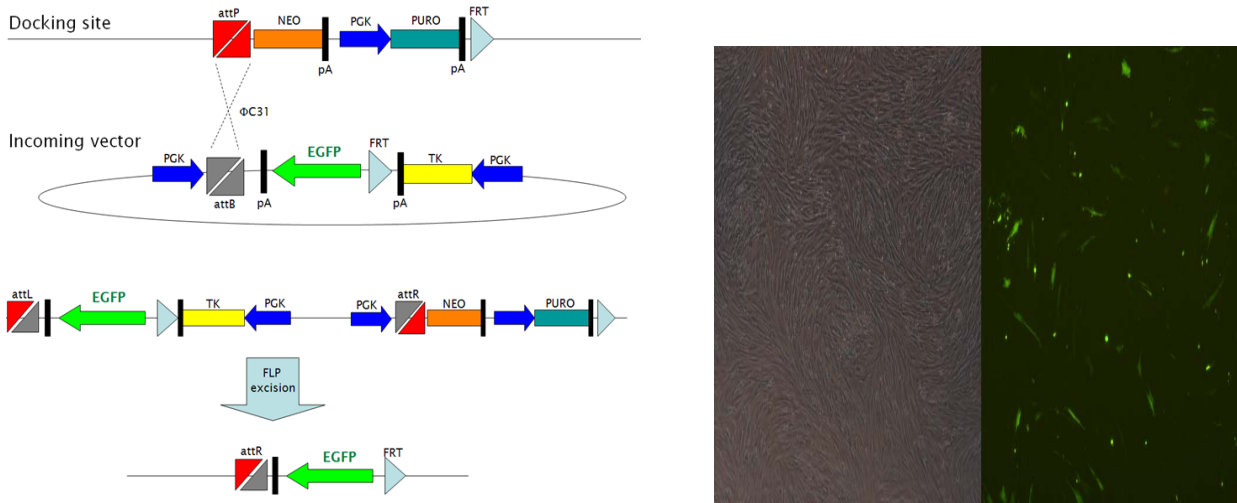
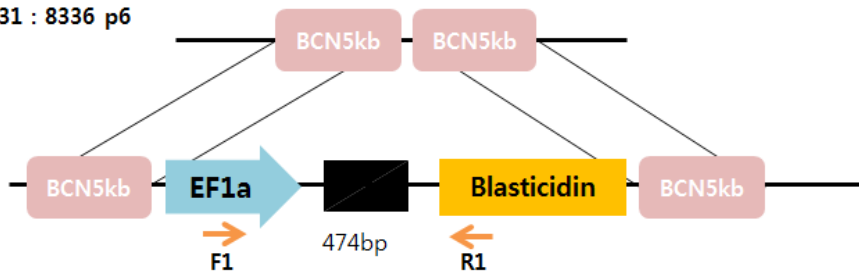


그림 36 Site-specific 유전자 발현 시스템과 예비 실험을 이용한 형광 유전자 발현

위 그림에서 보는 것처럼 체세포에 attP라는 위치 지정 사이트를 집어넣고, 그 위치에 유전자 target이 되도록 하는 recombination을 지정하는 것이다. 그림에서처럼 GFP를 그 위치에 집어 넣는 실험을 하였다. 이렇게 완성된 GFP expression셀을 이용하여 체세포 핵이식을 실시하였고, 그 결과 34개의 난자에서 24개의 2세포기의 핵이식란이 관찰되었다. 그리고 최종적으로 8개의 배반포가 생산되었다.

• HR & PC31 : 8336 p6



- 8336 BCN5kb-EF1a-bla-BCN gDNA detection PCR

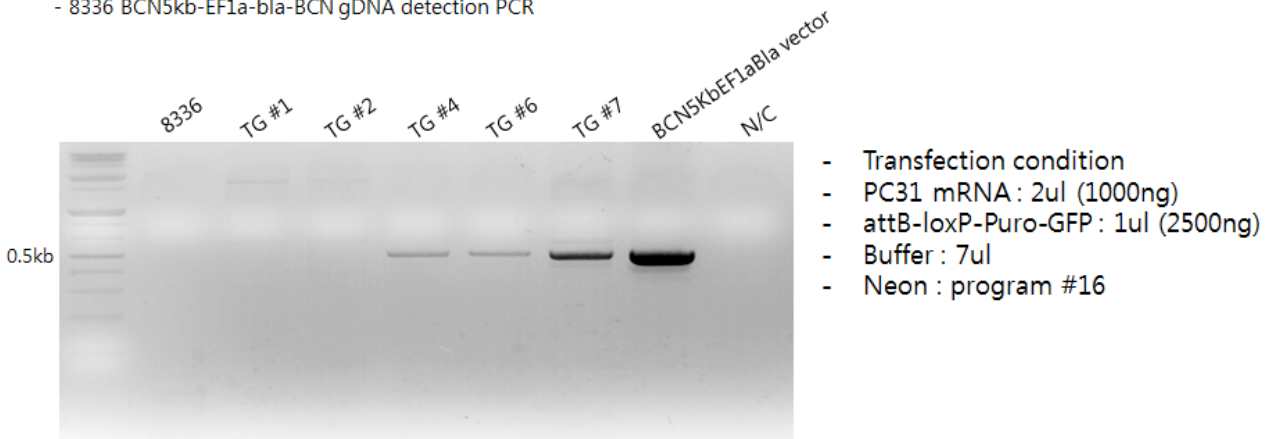


그림 37 유전자 재조합을 이용한 베타 카세인 위치 유전자 Knock-In 및 검증

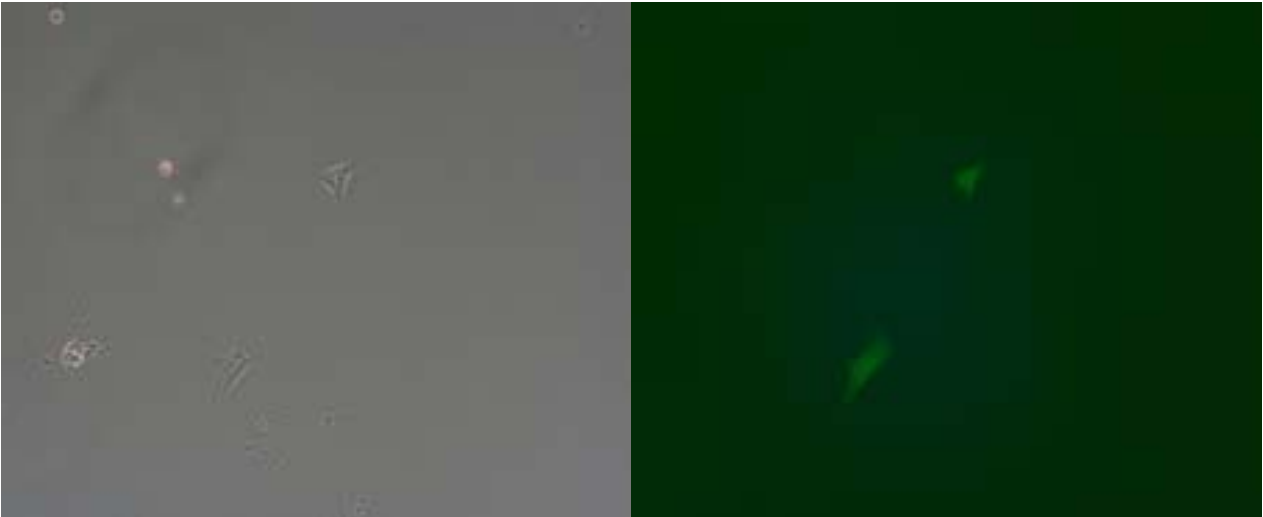


그림 38 유전자 Knock-in 세포 선별 후 site-specific 유전자 발현 세포 확립

(5) Cre-loxp 시스템을 이용한 유전자 발현 시스템 구축

Cre-loxP 시스템을 적용하여 유전자 발현 시스템을 적용하기 위하여, 아래와 같은 벡터를 완성하였고, 그 발현을 세포에서 관찰하였다. 아래 사진은 옆의 그림처럼 두가지 형광 유전자 재조합 인식 사이트로 둘러싸여져 발현시키는 세포사진이다. 유전자 발현 시스템을 적용된 세포로부터 복제 배아를 완성하였다.

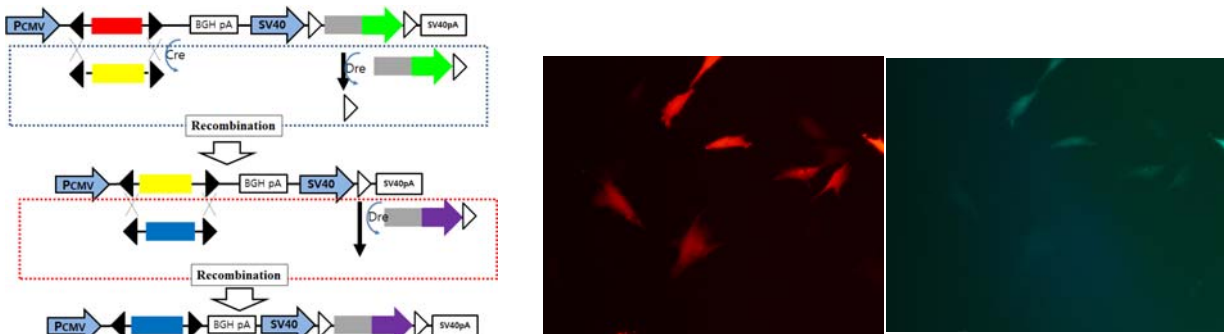
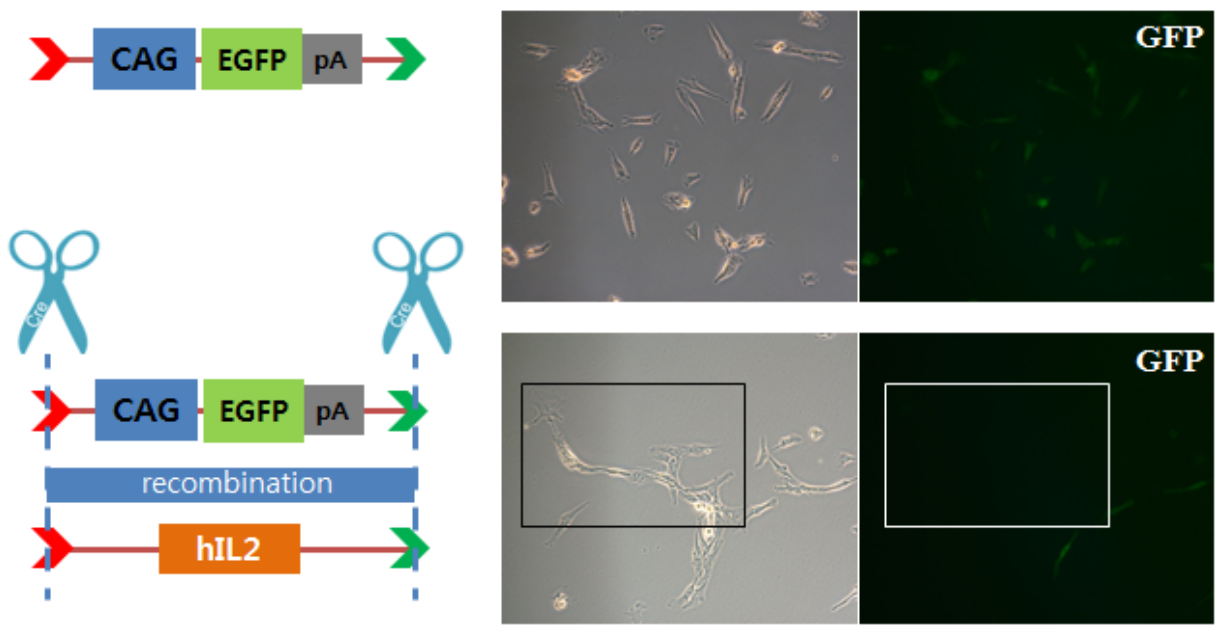
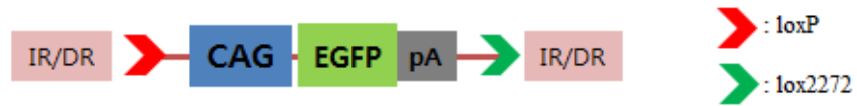


그림 39 Cre-LoxP를 이용한 유전자 발현 시스템 모식도





현재 6well에서 11개 culture 중

그림 40 Cre/loxP를 이용한 site-specific 유전자 발현. 인간 단백질 발현 site-specific하게 작동되도록 먼저 loxP-flanked CAG-EGFP-pA를 세포에 발현시키고, 이렇게 완성된 세포에 Cre recombinase와 hIL를 동시에 co-transfection을 실시하여 eGFP가 사라진 콜로니를 분리하여 분석하여 hIL2가 삽입된 것을 확인하였다.

#### (6) 유전 발현 specific 프로모터 세포 라인 확립

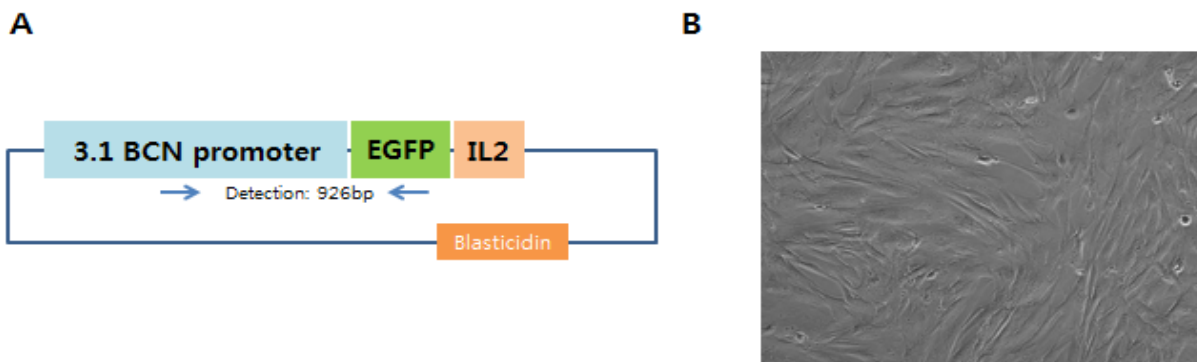


그림 41 Beta-casein specific 유전자 발현을 위하여 위 그림 (A)와 같이 벡터를 완성하였다. 완성된 벡터는 transfection을 한 후에 blastidicin을 이용하여 선별하였고, 확보된 세포는 동결하여 복제 배아 생산을 위해 보관중이다. 나아가 세포의 유전자 integration을 검사하기 위하여 PCR을 수행중이다.



8일 후

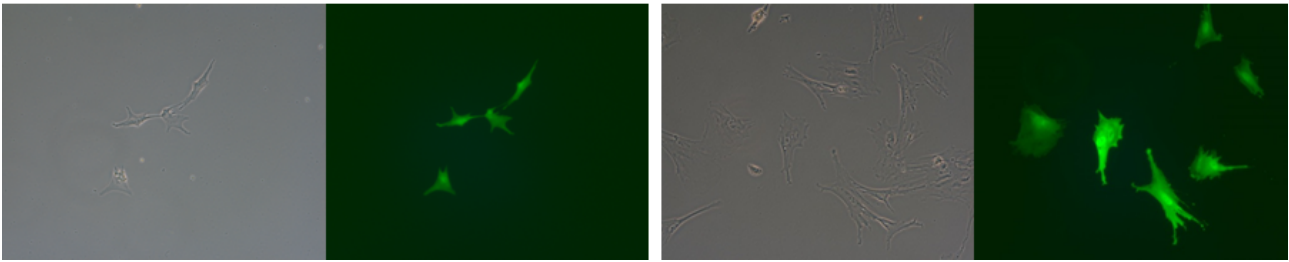


그림 42 형광 선별 유전자와 유선 특이 유전자 발현 벡터 결합을 이용한 유전자 발현 및 검증

(7) Homologous recombination (HR)과 Cre recombination

좀 더 효과적으로 유전자 발현을 위하여 본 연구에서는 HR을 실시하였다. 기존에 random integration을 벗어나기 위하여 beta casein promoter와 exon부분을 처음으로 클로닝을 실시하였다. 여러 번의 클로닝을 통해 벡터를 완성하였고, 완성된 벡터를 적용하기 위한 모식도는 그림 43과 같다.

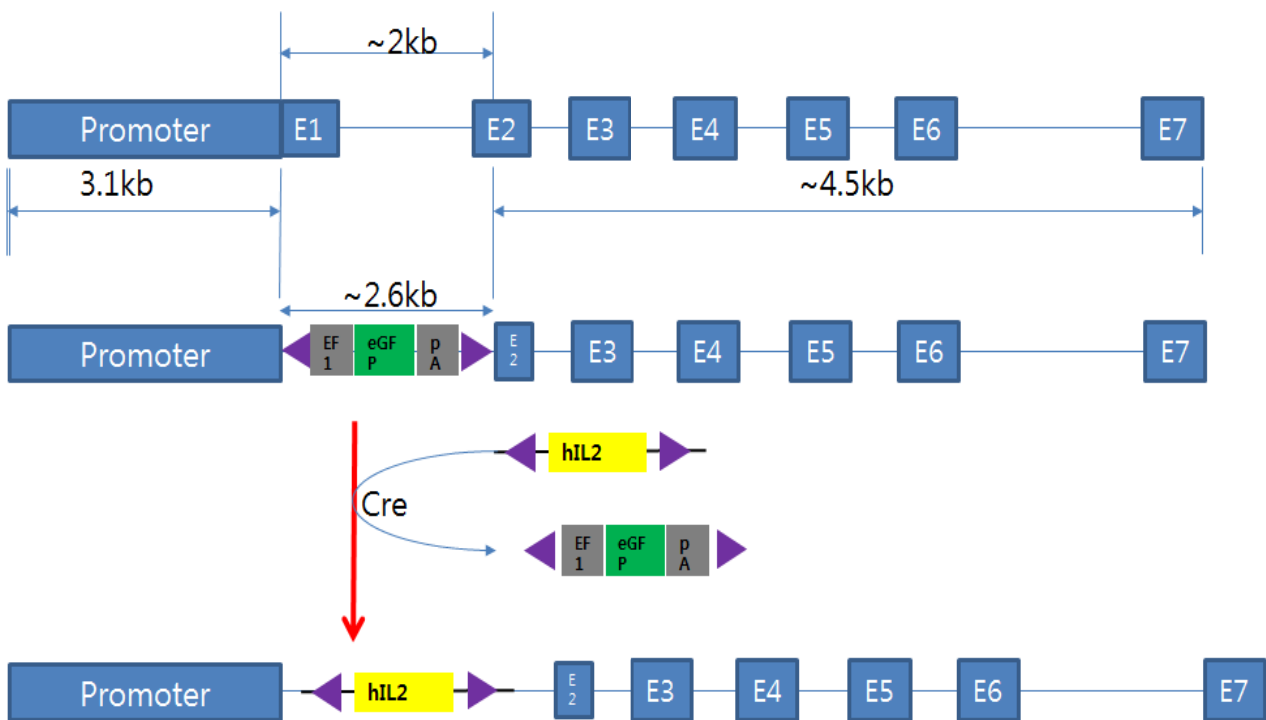


그림 43 beta-casein promoter부분 Knock-In벡터 모식도. bovine beta-casein promoter 유전자 정보 (맨위), Homologous recombination (HR) and Knock-In 벡터 모식도 (중간), Cre-recombinase 후 완성된 human IL2 expression 모식도 (맨 아래)

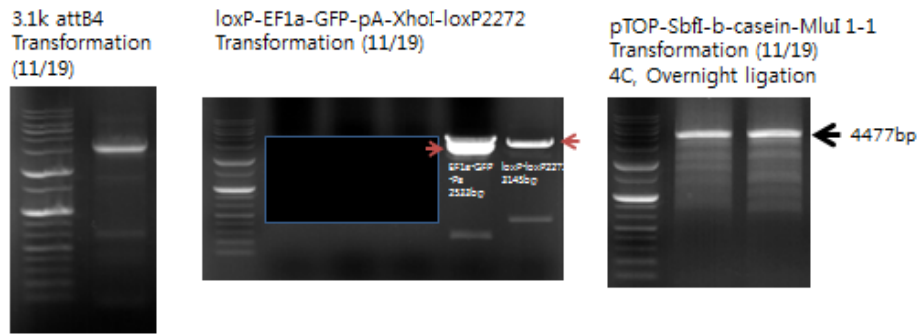


exon2번부터 exon7까지의 Casein 4.5kb에 대한 시퀀싱 결과는 아래와 같다.



그림 45 beta-casein Exon2-exon7번 사이의 4.5kb에 대한 시퀀싱 결과





pTOP-EF1a-GFP-pA 2880 TF (11/19)

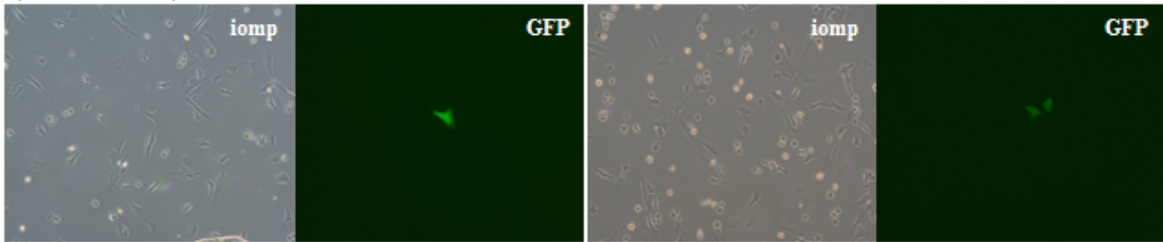


그림 46 HR 과 Knock-In vector 제작을 위한 PCR결과 및 초기 transfection사진. 위 패널의 왼쪽은 beta casein 3.1 promoter부분이 PCR로 클로닝, 중간 사진은 floxed-EF1-eGFP-stop-floxed 클로닝, 오른쪽은 약 4.5kb의 beta-casein부분이 클로닝된 사진. 아래 패널은 소 세포에 transfection을 실시 후에 발현하는 GFP초기 사진

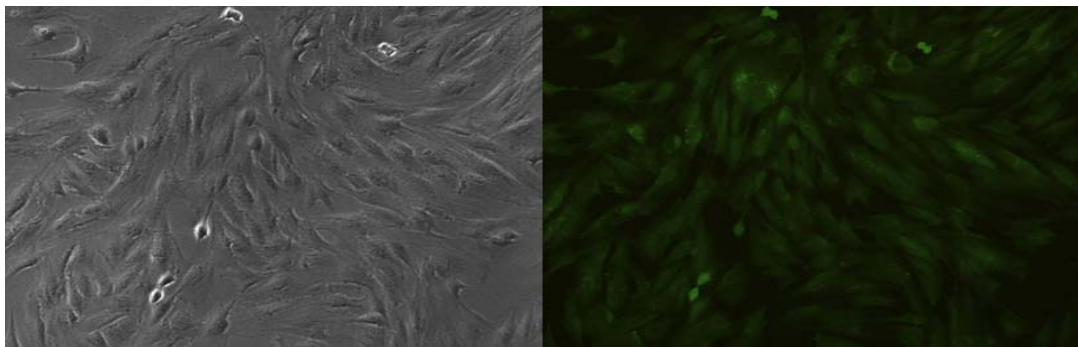


그림 47 소세포에 HR 벡터를 transfection을 한 후에 100%발현 세포 사진. Brightness (왼쪽), 형광사진 (오른쪽)

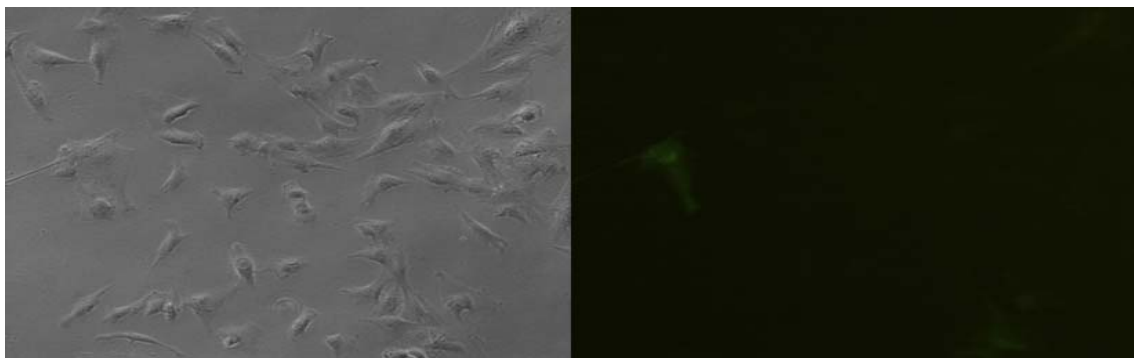


그림 48 EF1-eGFP발현 세포가 Cre recombinase에 의해서 hIL2 유전자가 삽입되면서 GFP signal 이 사라지는 모습. Cre recombinase+ hIL2 transfection을 실시 후 5일째 세포 사진 (Brightness-왼쪽; Fluorescence-오른쪽)

(8) 인간 유용 단백질 발현 벡터 완성 및 세포 완성

현재까지 다양한 유전자 발현 벡터를 완성하였다. 완성된 벡터 시리즈는 다음과 같다.

1. beta-casein promoter-rtTA-stop-Neomycin
2. beta-casein promoter-GFP-stop-Neomycin
3. PB-tet-on-IL-2, -8, -10- IRES-lacZ-Neomycin-stop
4. CMV-loxP-IL-2, -8, -10-loxP-stop-SV40-Neo-GFP-stop
5. beta-casein promoter-IL2,8,10-stop-neomycin-stop

목적 유전자 발현을 검증하기 위한 선택적 마커로서 neomycin을 사용하거나 또는 lac염색이 가능한 betageo유전자를 선정하였고, 염색된 사진은 옆의 그림과 같다 (그림 49).

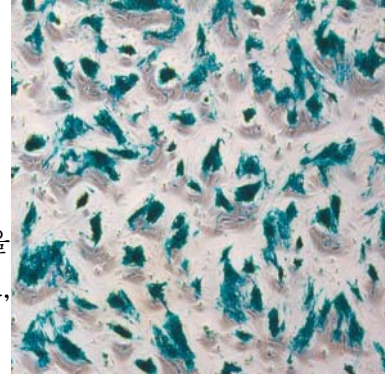
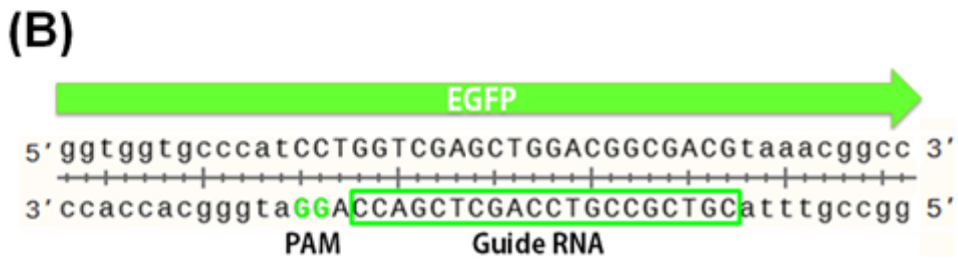
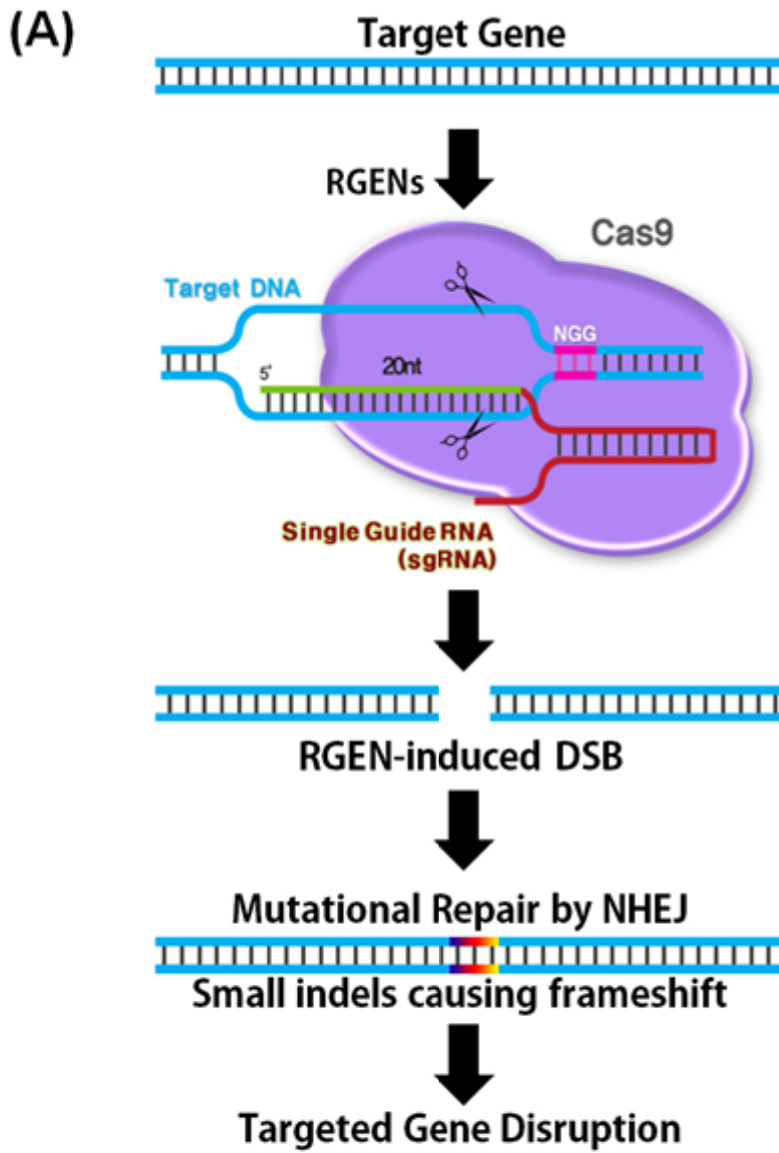
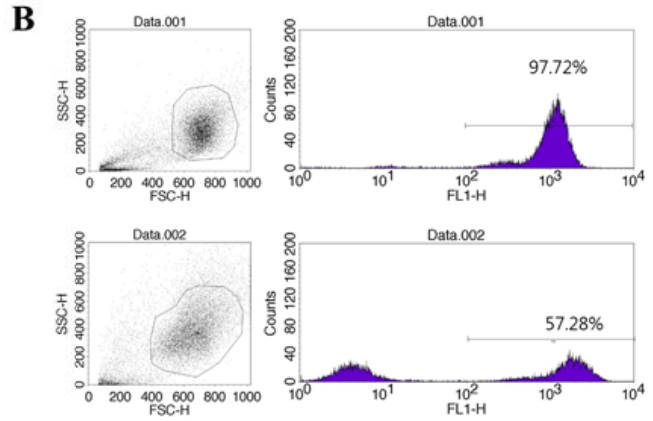
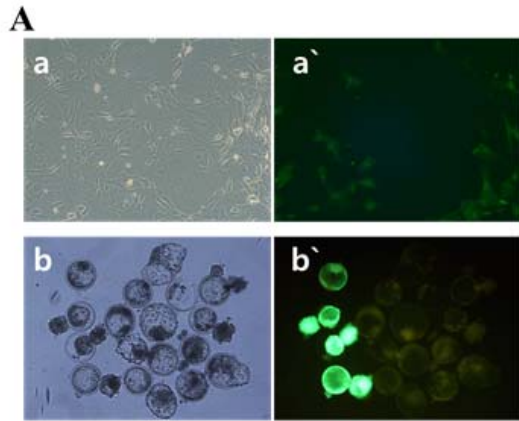


그림 49 유전자 발현을 LacZ 염색으로 확인한 사진

(9)유전자 가위를 이용한 유전자 제거 연구



그럼 50 형질 전환으로 태어난 GFP발현 세포를 제거하는 유전자 가위 모식도



**C**

```

tggtcaccggggtggtgccatcctggtcgagctggacggcgacgtgaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccaccta WT
tggtcaccggggtggtgccatcct-----ggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccaccta 25bp
-----ggacggcgacgtgaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccaccta 203bp
tggtcaccggggtggtgccatc-----gagctggacggcgacgtgaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccaccta 6bp

```

그림 51 유전자 가위를 적용하여 GFP 발현이 사라지는 육안 모습 (A) 과 그 세포를 FACS 를 이용하여 유전자 제거된 비율을 조사한 결과 사진 (B). 유전자 변이가 어떻게 되었는지 시퀀싱을 통해 확인한 모습



(10) 유전자 발현 검증

(가) 형광 발현을 통한 외부 유전자 발현 검증

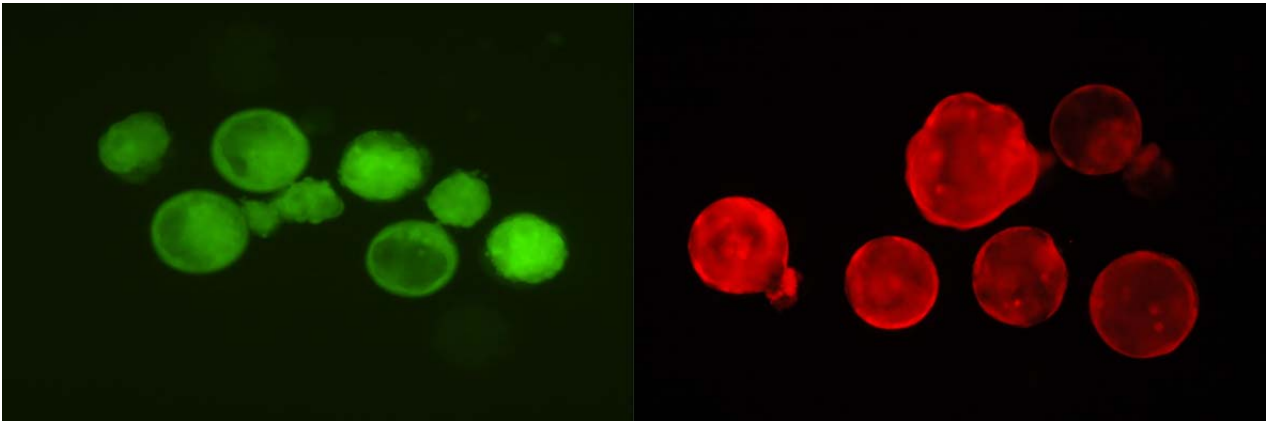
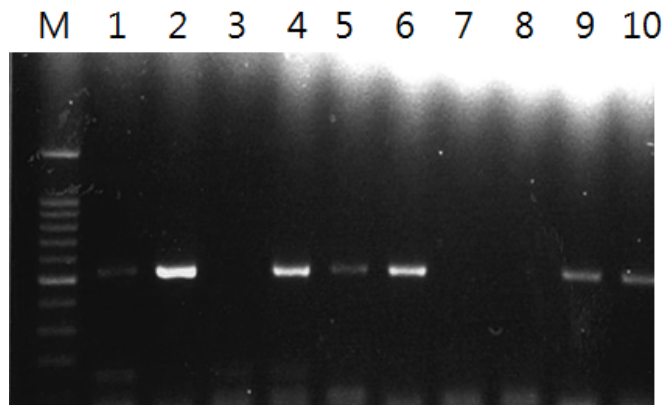


그림 52 외부 형광 유전자 발현을 통한 유전자 검증

(나) PCR을 통한 유전자 발현 검증



1: BL-control, 2: DNA-control, 3~10: treatment Blastocysts

그림 53 PCR을 이용한 배반포에서 인간 유전자 발현 검증

### 3. 역분화 유전자 발굴 및 적용을 통한 세포 개발

#### 가. 소의 역분화 관련 유전자 클로닝

현재 소의 역분화 관련 유전자를 gene database를 바탕으로 하여 클로닝을 하였다. Oct4, sox2, myc, bNanog에 대한 cDNA가 소의 난소를 통해서 클로닝이 되었다. 아래 그림은 다양한 유전자 클로닝 결과 중 선별하여 첨부하였다.

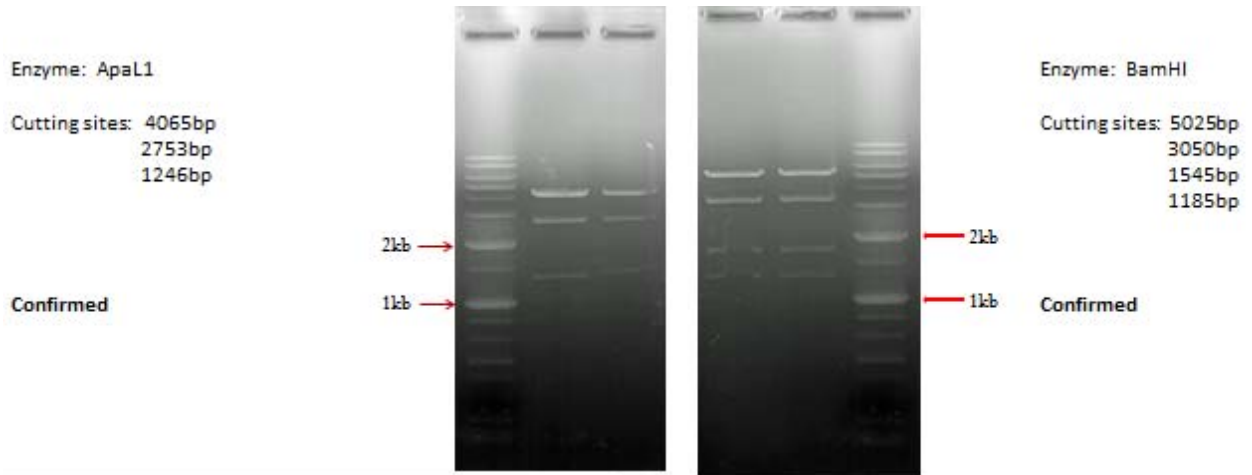


그림 54 PB-CA-bNanog-2A-RFP/PB-TET-bNanog-2A-RFP백터 완성 및 검증

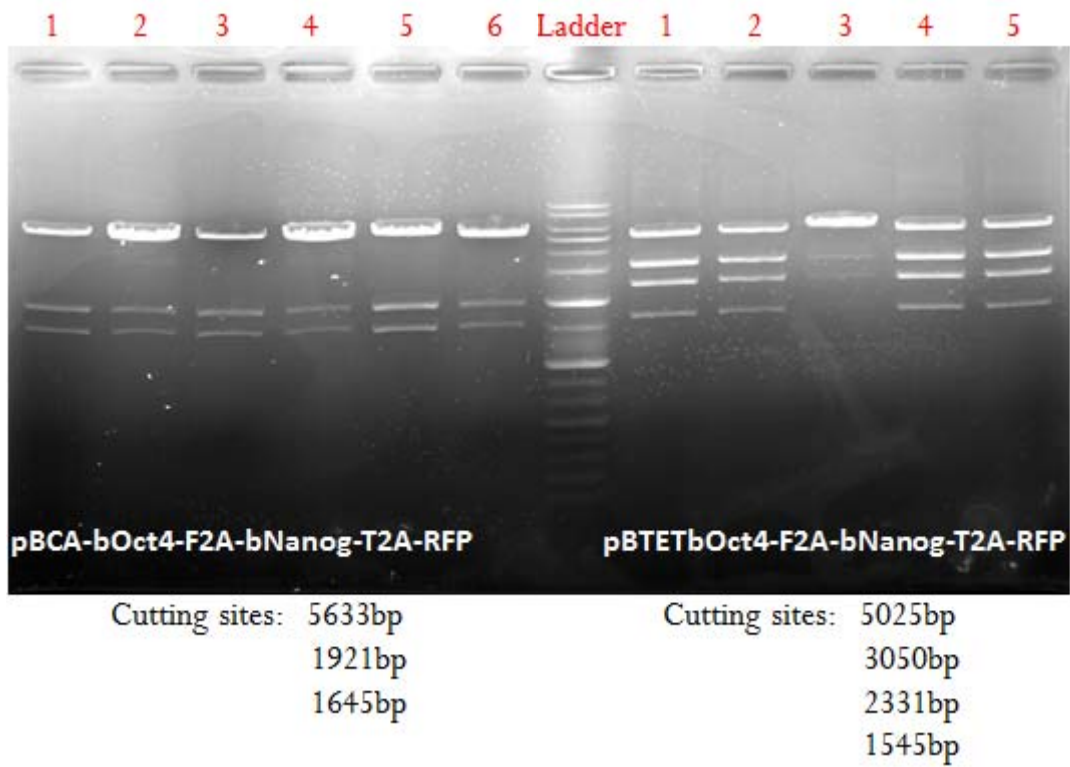


그림 55 PB-CA-bOct4-2A-Nanog-2A-RFP/PB-TET-bOct4-2A-Nanog-2A-RFP  
벡터 완성 및 검증

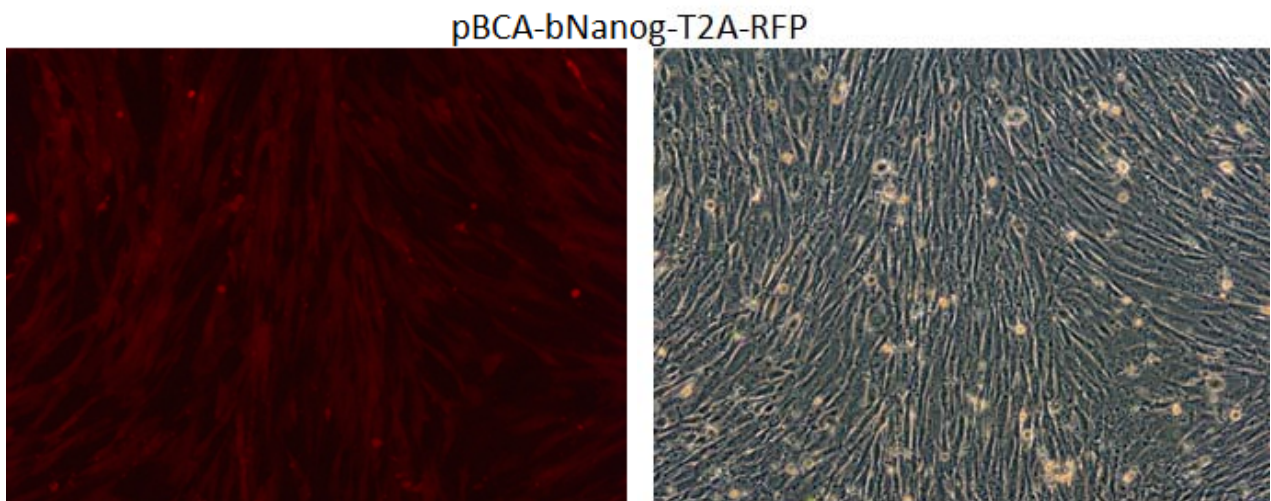


그림 56 CAG promoter에 의하여 Nanog-2A-RFP발현 벡터를 소 태아 섬유아세포에 transfection을 실시 한 후  
에 RFP가 발현하는 사진. 왼쪽 형광사진, 오른쪽 brightness사진

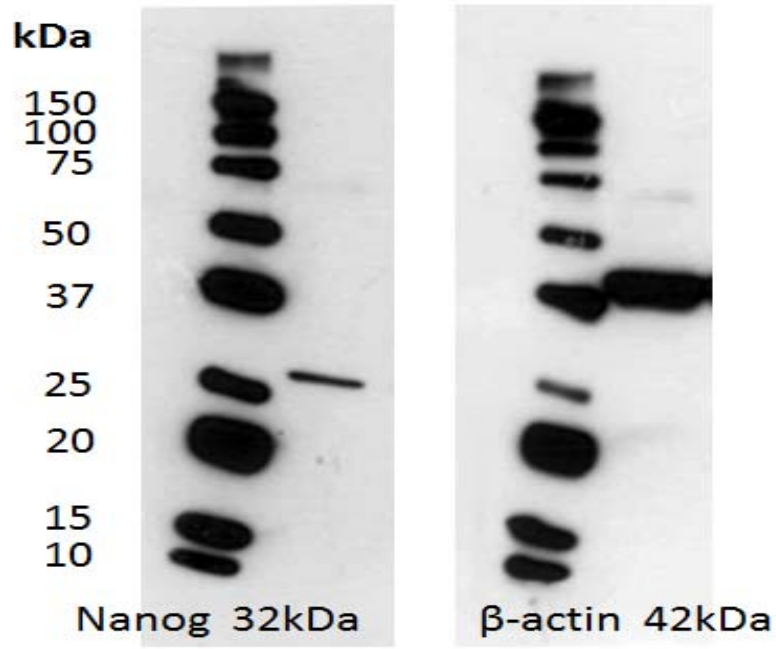


그림 57 western을 이용한 Nanog유전자 발현 사진

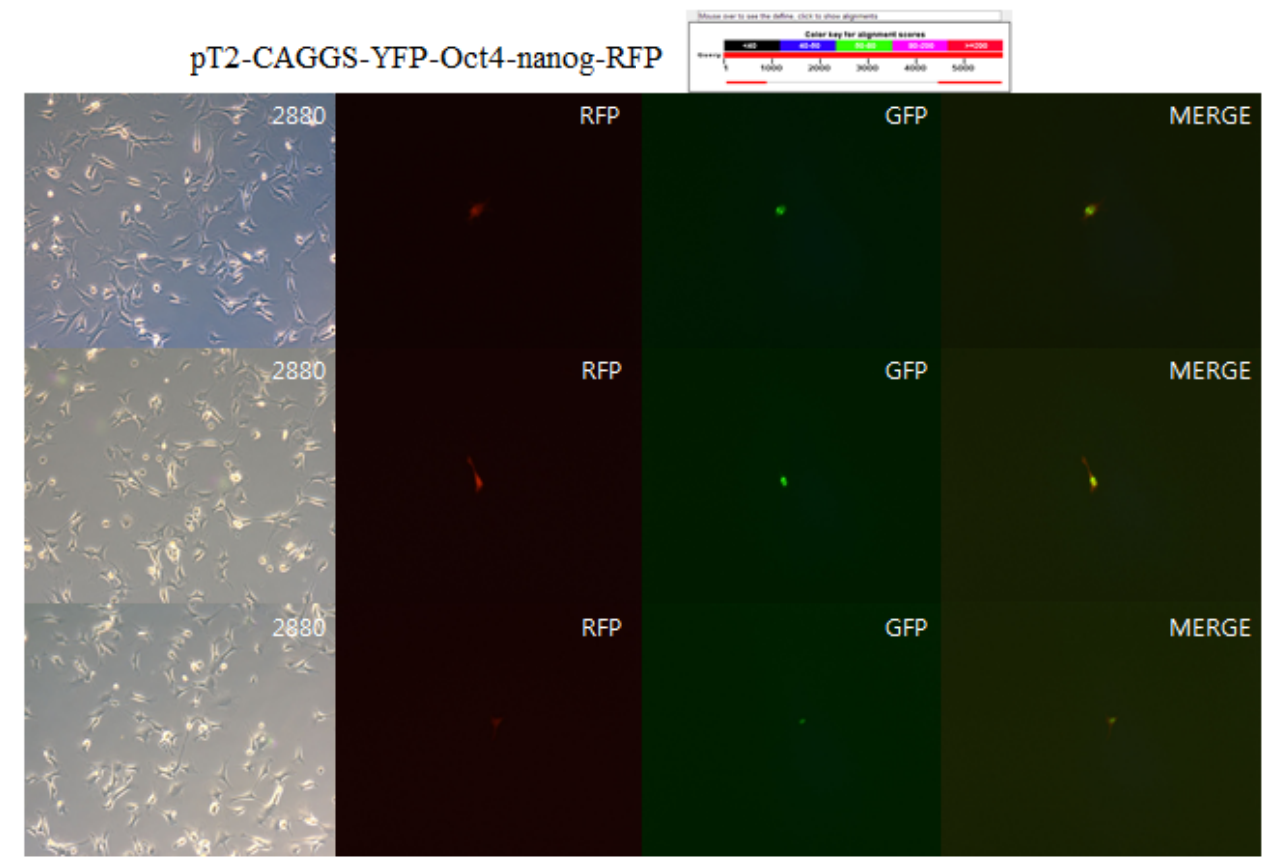


그림 58 벡터 맵 (위 패널), 아래 패널은 세포에서 유전자 발현.

**Enzyme digestion: pTOP-Blunt-V2-cMyc-F2A-Klf4**

**ApaI** : 2941bp  
 : 1469bp  
 : 1246bp  
 : 968bp

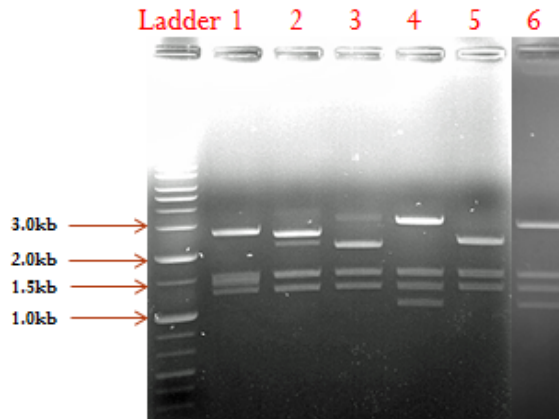


그림 59 bcMyc-2A-Klf4를 PCR로 연결하여 blunt cloning을 완성한 후 엔자임으로 확인한 결과 사진

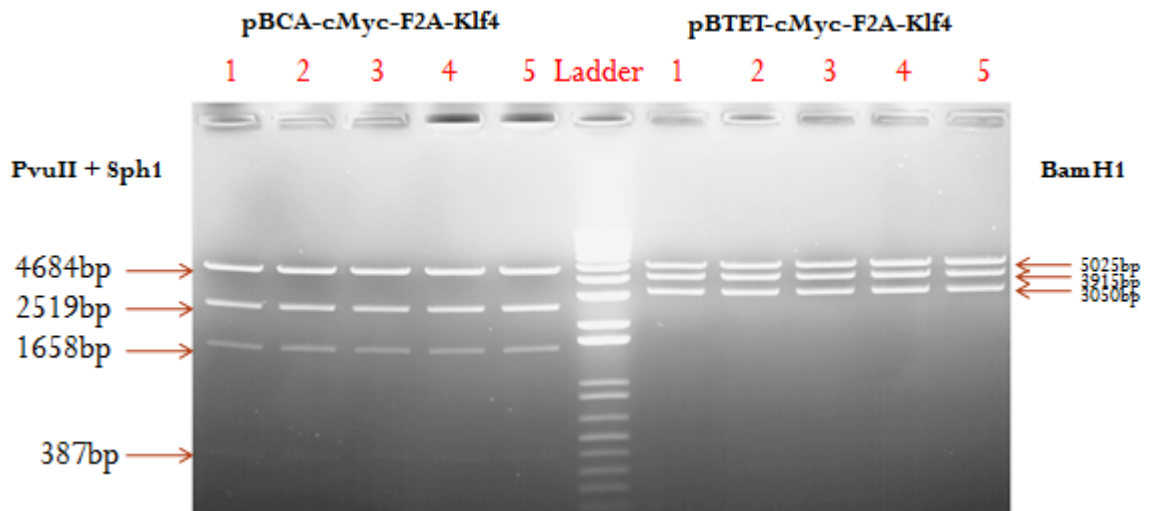


그림 60 Blunt-cloned-cMyc-2A-Klf4를 기초로 하여 완성된 transposon expression vector를 엔자임으로 확인한 결과 사진

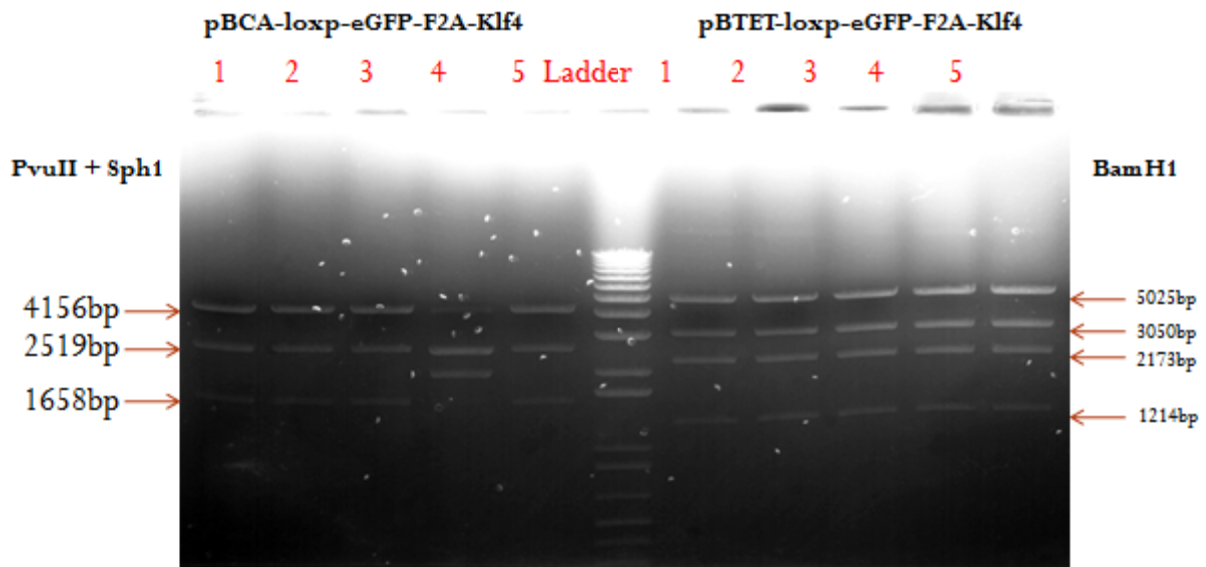


그림 61 eGFP-2A-KLF4가 발현하는 transposon 벡터 확인 사진



## 나. 역분화 유전자를 이용한 역분화 만능세포 유도

소의 역분화 관련 유전자를 클로닝하는 중에, 우리는 이미 잘 알려진 마우스의 역분화 관련 유전자를 이용하여 세포의 역분화를 유도하였다. 역분화에 사용된 벡터는 transposon-oct4, sox2, myc, klf4 유전자이다.

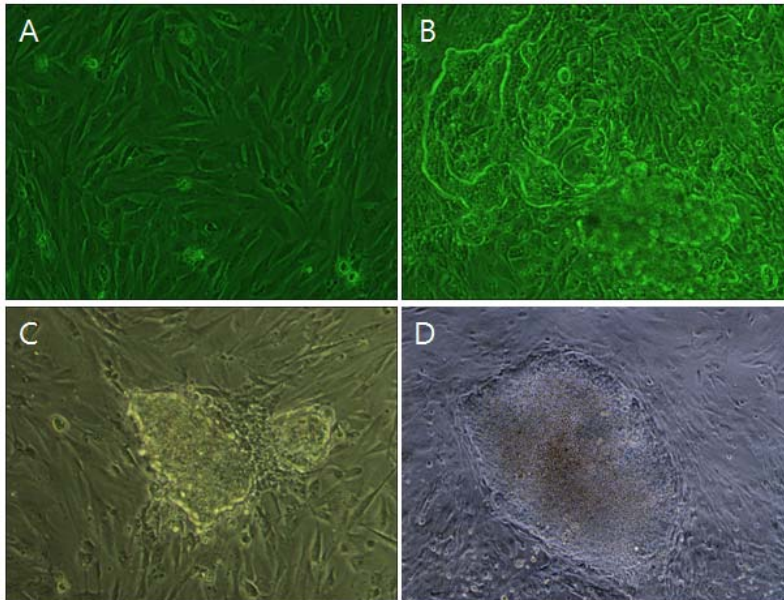


그림 62 마우스 유전자 도입을 통하여 얻어진 소의 유사 역분화 만능세포 사진. A) 체세포 사진, B) 자라는 유사 역분화 만능세포, C) 초기 유사 역분화 만능세포 콜로니, D) 유사 역분화 만능세포의 유지 상태 사진

유전자 도입을 통하여 소의 태아 세포에서 우리는 유사 역분화 만능세포의 분리를 시도하여, 성공하였다. 그림 6에서 제시하는 것과 같이 유사 역분화 만능 세포는 콜로니 형태로 자라고 있다. 현재 2.5개월째 세포를 체외에서 유지하고 있으며, 이에 대한 characterization을 실시하고 있다. 먼저 만능 세포의 마커로 알려진 oct4, sox2의 면역 염색과, SSEA-1, SSEA-4에 대한 염색을 실시하였다. 아래 그림 63과 64은 그 염색 결과로서, 기존에 알려진 소의 유사 배아 줄기세포 (embryonic stem cell-like)와 유사한 결과를 보여주고 있다.

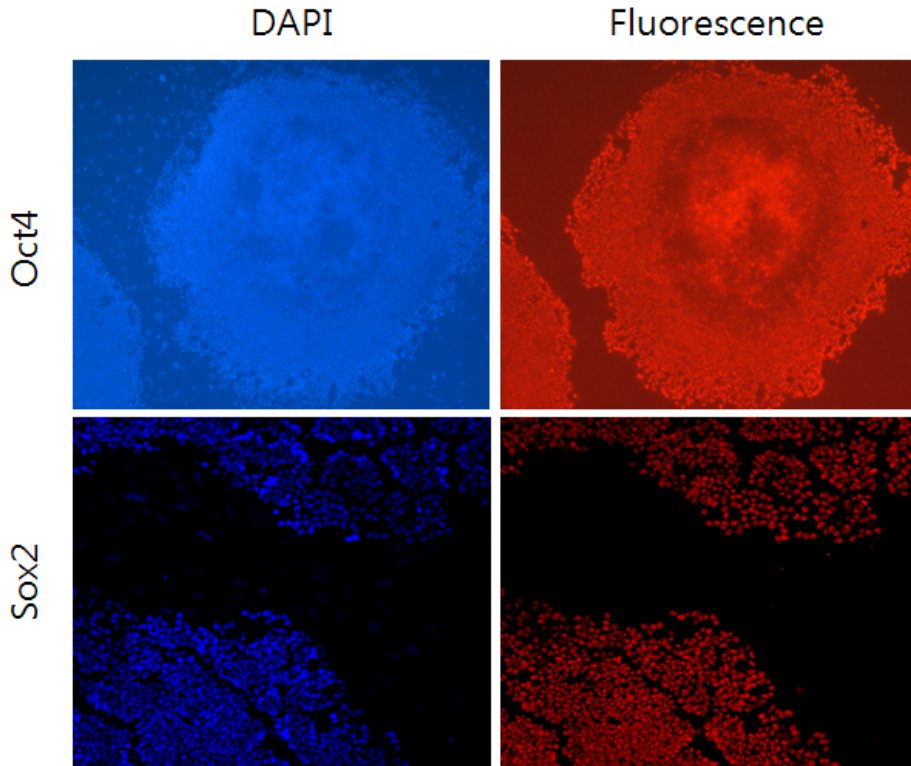


그림 63 Oct4, Sox2에 대한 면역 염색 결과.

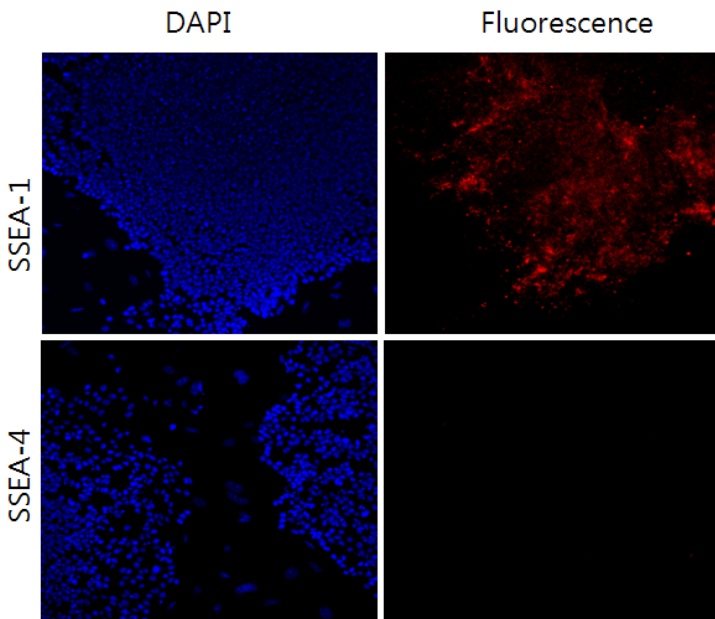


그림 64 배양중인 Colony에 대한 세포 표면 인자 SSEA-1, -4에 대한 면역 염색 결과. SSEA-1에 대해서는 positive, SSEA-4에 대해서는 Negative반응 결과가 나왔다.



### 다. 역분화 만능세포 유지 및 유도

배아 전사 유전자 도입 후 자라나는 콜로니에 대한 염색 결과 그림 65번처럼 AP염색에 positive한 모습을 보여주었다.

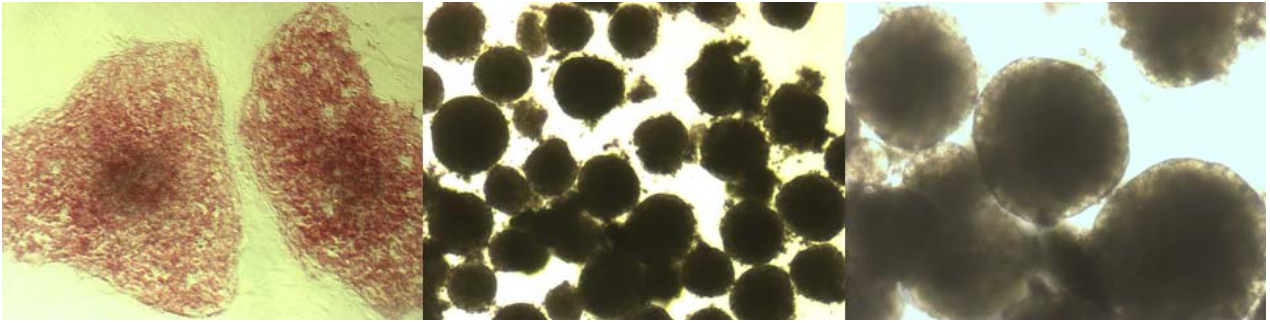


그림 65 AP 염색과 EB body형성 모습의 사진

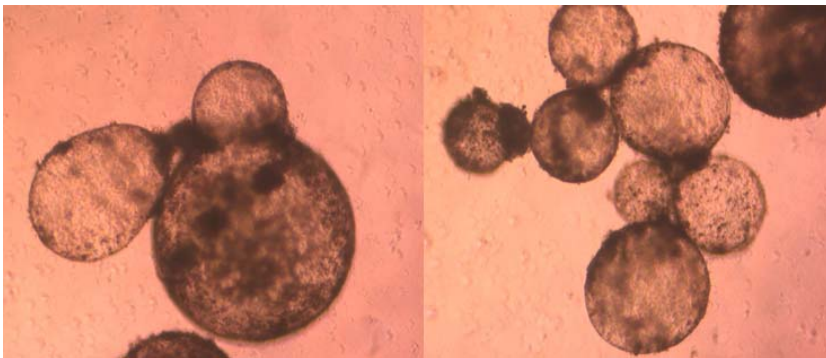


그림 66 Cystic EB body형성 모습

그리고 세포의 분화 실험을 유도하여 신경 세포 분화를 실시한 결과 일부 세포가 신경 세포로 변하였으며 (그림 67), 분화된 세포에서는 beta III tubulin을 염색을 한 결과 세포에서 발현이 잘되는 것을 관찰 할 수 있었다 (그림 68).

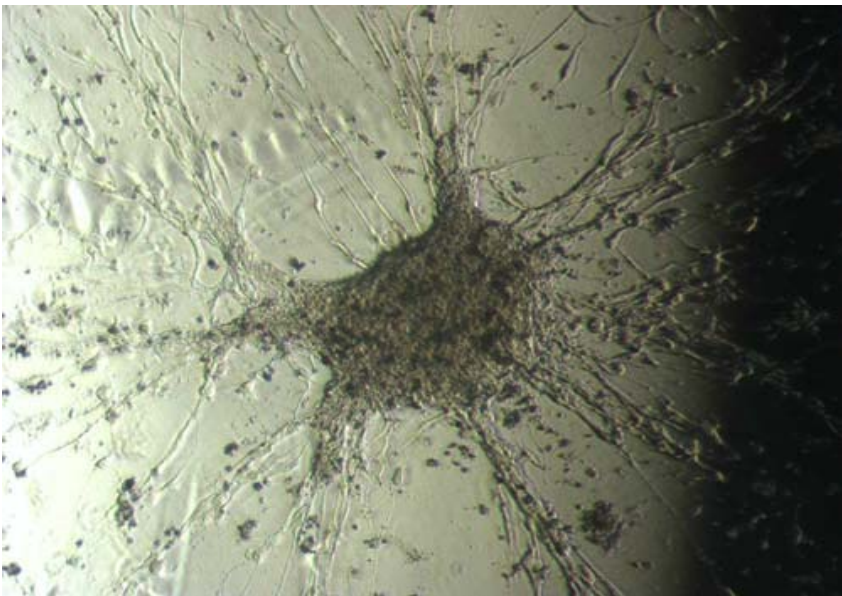


그림 67 신경세포로 분화한 모습

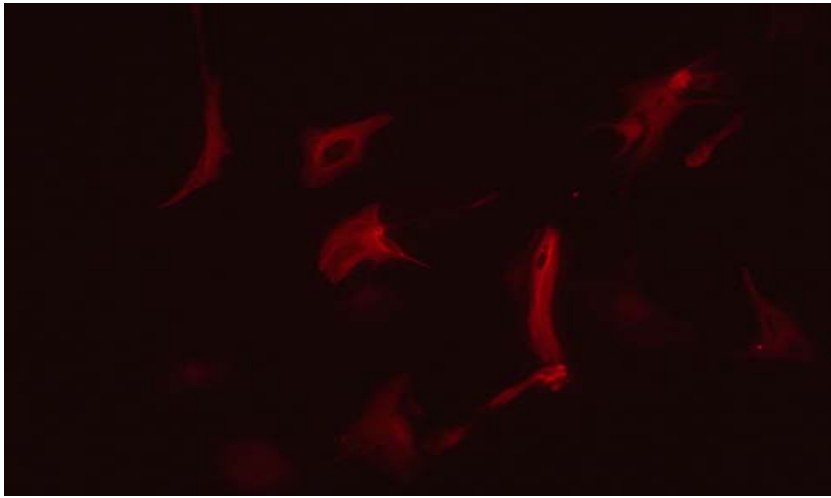


그림 68 beta III tubulin 염색 사진

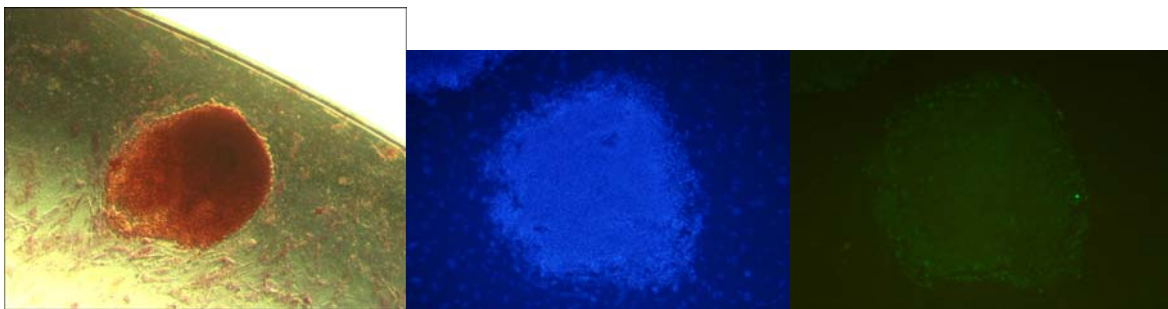


그림 69 초기 콜로니를 AP staining을 한 결과와 Oct면역 염색 결과

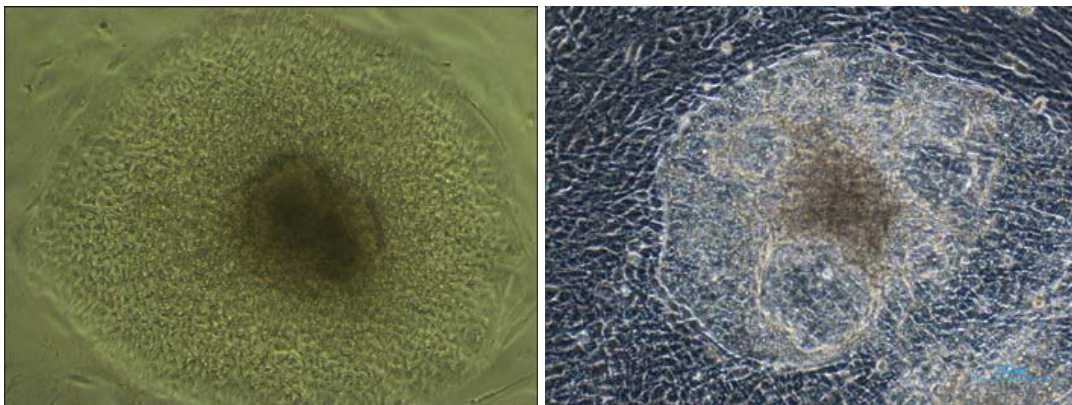


그림 70 줄기세포 배양 계대 및 초기 모습

#### 4. Reporter 유전자 및 인간 유용유전자 형질 전환 소 배아 이식 및 생산

##### 가. 소의 친자 감별 마커 확립

복제 소 검증을 위하여 소의 친자 감별 마커를 주문하여, 목장 현장에 자라고 있는 어미소와 새끼소에서 그 유효성을 검증하였다. 아래 그림을 친자 감별 마커에 대한 PCR조건을 표시한 것이며, 실제 어미소와 새끼 소의 PCR 결과를 나타낸 것이다.

No.	Locus	Dye	Sequence-Forward	Sequence-Reverse	Size Range	AnnalTemp
1	BM1824	HEX	GAGCAAGGTGTTTTCCAATC	CATTCCTCAACTGCTTCCTTG	178-190	55°C
2	BM2113	FAM	GCTGCCITCTACCAAATACCC	CTTCCTGAGAGAAGCAACACC	125-143	55°C
3	CSSM36	HEX	GGA TAA CTC AAC CAC ACG TCT CTG	AAG AAG TAC TGG TTG CCA ATC CTG	181	55-60
4	ETH10	NED	GTT CAG GAC TGG CCC TGC TAA CA	CCT CCA GCC CAC TTT CTC TTC TC	210-226	58°C
5	ETH225	FAM	GAT CAC CTT GCT ACT ATT TCC T	ACA TGA CAG CCA GCT GCT ACT	140-156	55°C
6	ETH3	FAM	CAA CCT GCC TCT CCT GCA TTG G	ACT CTG CCT GTG GCC AAG TAG G	122	59°C
7	HEL1	FAM	CAA CAG CTA TTT AAC AAG GA	AGG CTA CAG TCC ATG GGA TT	101-129	
8	INRA023	HEX	GAG TAG AGC TAC AAG ATA AAC TTC	TAA CTA CAG GGT GTT AGA TGA ACT C	193-225	
9	SPS115	NED	AAA GTG ACA CAA CAG CTT CTC CAG	AAC GAG TGT CCT AGT TTG GCT GTG	235-255	
10	TGLA122	FAM	CCC TCC TCC AGG TAA ATC AGC	AAT CAC ATG GCA AAT AAG TAC ATA	130-164	
11	TGLA126	NED	CTA ATT TAG AAT GAG AGA GGC TTCT	TTG GTC TCT AIT CTC TGA ATA TTC C		
12	TGLA227	FAM	CGA ATT CCA AAT CTG TTA ATT TGC T	ACA GAC AGA AAC TCA ATG AAA GCA	64-115	

그림 71 소 친자 감별에 사용된 마커와 염기 서열 정보

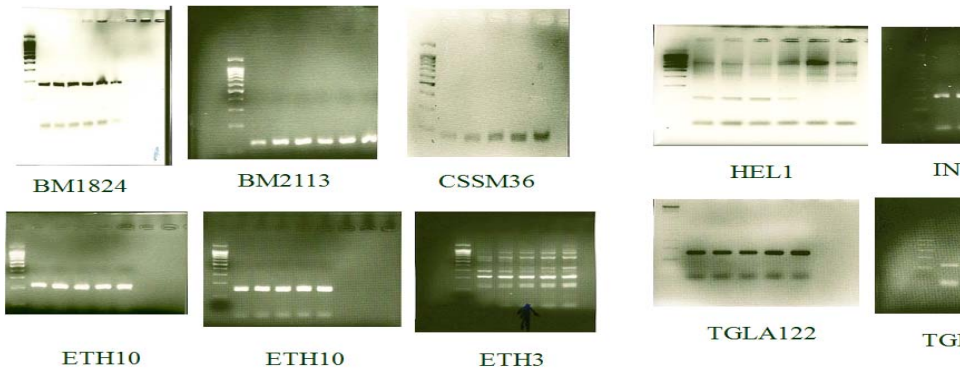


그림 72 각 유전 마커들에 대한 PCR조건 확인

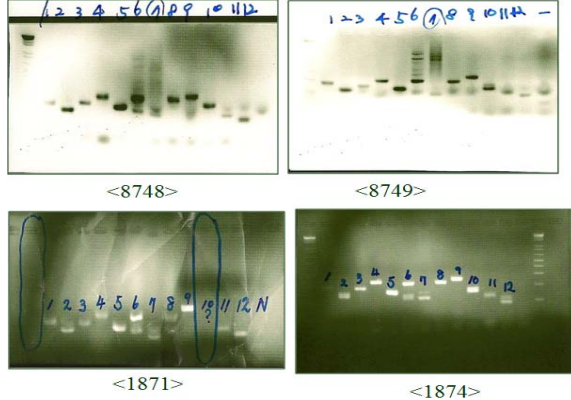


그림 73 두 마리 개체에 대한 친자 감별 마커의 확인 PCR



나. 수란우 검사 및 준비

수란우 선발 시 수태율에 영향을 미칠 수 있는 전염성 질병 4종에 대한 검사를 수행하였다.

우선, 혈청 검사 (구제역/브루셀라)에 대한 항목은 경기도 축산위생 연구소로부터 검사성적을 아래와 같이 통보 (전 두수 음성) 받았으며, 지면 관계상 증빙 공문의 일부만을 발췌하였다.

- 아 래 -

축주명 (농장명)	주 소	축종(품종)	의뢰 가검물	검사항목	검사결과
젖소개량사업소 (서울우유목장)	경기 양평군 단월면 향소리 1017-1	소(젖소)	혈청 28점	브루셀라 구제역	혈청검사성적서 참조

그림 74 관련 증빙 문서

또한, BLV/요네병 검사에 대해서는 민간 병성 감정 기관인 제일바이오에 의뢰해서 그 결과를 아래와 같이 전 두수 음성으로 통보받았다.

(주)제일바이오 www.cheilbio.com Tel : 031-494-8406

가검물 번호 : 10-747	의뢰일자 : 10월28일	의뢰인 : 이우성			
회사명 : 서울우유 생명공학연구소					
10-747	혈청구분	소 백혈병 검사 결과		소 요네병 검사 결과	
		Value(%)	결과	S/P ratio	결과
1	1	1.10	미음성	2.41	미음성
2	2	0.71	미음성	2.64	미음성
3	3	1.10	미음성	2.19	미음성
4	4	1.75	미음성	13.62	미음성
5	5	1.49	미음성	1.74	미음성
6	6	0.45	미음성	3.45	미음성
7	7	5.65	미음성	1.15	미음성
8	8	2.66	미음성	1.89	미음성
9	9	0.45	미음성	0.85	미음성
10	10	0.58	미음성	6.79	미음성
11	11	3.44	미음성	0.78	미음성
12	12	2.66	미음성	7.09	미음성
13	13	1.10	미음성	1.82	미음성
14	14	4.22	미음성	1.37	미음성
15	15	1.23	미음성	1.89	미음성
16	16	0.84	미음성	3.38	미음성
17	17	1.10	미음성	3.82	미음성
18	18	0.06	미음성	0.48	미음성
19	19	0.19	미음성	3.45	미음성
20	20	1.88	미음성	1.52	미음성
21	21	0.71	미음성	1.52	미음성
22	22	1.23	미음성	2.71	미음성
23	23	0.58	미음성	5.61	미음성
24	24	1.23	미음성	2.04	미음성
25	25	0.58	미음성	0.71	미음성
26	26	0.58	미음성	2.71	미음성
27	27	1.36	미음성	0.93	미음성
28	28	1.75	미음성	1.74	미음성

그림 75 수란우의 백혈병 및 요네병 검사 결과

#### 다. Flunixin meglumine 투여를 통한 임신율 제고 평가

형질전환 체세포복제배아 이식의 수태율을 높이기 위해 수정란이식 직전, 수란우에 PGF2 $\alpha$  합성억제제인 flunixin meglumine (1~2mg/kg; 이하 FM)을 근육주사 한 후 이식에 공여함으로써, 수정란이식 수태율 제고인자를 검토하고자 하였다. 그러나 기존에 발표되어진 외국의 연구결과와는 달리, FM 처치가 수태율 향상인자로서 작용되어지지 않았다. 오히려 대조군 (46.1%)에 비해 낮은 수태율 (31.6%)을 보였는데, 이는 다음과 같은 이유로 분석할 수 있다. 우선, 당해 연도 수정란이식 수태율이 예년에 비해 전체적으로 약 10% 정도 하향된 결과를 보인 것은, 반기마다 접종했던 구제역백신의 영향으로 사료되어진다. 본 실험군 뿐만 아니라, 일반 축산 농가에서도 인공수정 및 수정란이식 수태율이 전체적으로 현저한 하향세를 나타내었으며, 특히 처치 전후 각각 30일 사이에 유의적으로 높은 수태율 저하를 보였다. 따라서 당분간 구제역백신 상황 하에서는 인공수정 및 수정란이식 실시일을 이 기간을 피해 진행하는 것이 필요하다고 판단된다. 또 다른 이유는, 본 실험에 공여된 수란우군이 지난 해 (연구 3차년도) 혹서기 때, 변질된 사료를 약 2달 가량 급여 받았던 것으로 확인되었다. 이로 인해 우군의 소화기성 장애 및 유사산의 비율이 예년에 비해 약 2배 이상 증가했던 것으로 보아, 이러한 이유가 수정란이식 수태율 저하의 원인으로 작용했을 것으로 사료된다. 특히 FM 투여군의 이식을 집중적으로 시행했던 하반기에 이러한 현상이 겹쳐, 정상적인 수태율 비교평가가 이루어지지 못한 것으로 생각된다. 따라서 향후 연구에서는 보다 많은 수란우군을 이용하여 전반에 걸친 FM 투여효과를 객관적으로 비교평가 할 필요가 있다고 판단된다.

The effect of flunixin meglumine to surrogate on conception rate of in-vivo frozen embryo derived from dairy cows in 2011

Treatment	No. of Surrogate	Conception (%)
Control	102	47 (46.1)
FM-treated	19	6 (31.6)
Total	121	53 (43.8)

The effect of flunixin meglumine to surrogate on conception rate of in-vivo frozen embryo derived from dairy cows in seoul dairy ET center (2012).

Treatment	No. of Surrogate	Conception (%)
Control	55	28 (50.9)
FM-treated	48	27 (56.3)
Total	103	55 (53.4)

또한 FM 투여와 별도로, 이식배지 내 (intrauterine injection) Dexamethasone 및 hrLIF 첨가를 통한 수태율 제고를 도모하고자 그 효과를 검토하였다. Dexamethasone은 자연적으로 존재하는

cortisol에 비해 약 20배 정도 더 효과적으로 inflammation을 억제하는 물질이며, 이 염증을 억제하기 위해 체내에서 분비되는 물질인 cortisone은  $11\beta$ HSD1에 의해 cortisol로 바뀌게 되며, 이 물질은 염증에 의해 발생하는  $TNF\alpha$ 와 IL-1을 억제하는 역할을 한다. 따라서 dexamethasone을 인위적으로 처치하게 되면 inflammation에 의해 발생하는  $PGF2\alpha$ 를 억제할 수 있다. 한편 LIF (leukemia inhibitory factor)는 배반포가 hatching되어 endometrial cell에 부착될 때 중요하게 작용하며, 배반포의 hatching에도 영향을 미치므로 초기배의 착상 시 중요한 역할을 수행한다.

The effect of flunixin meglumine to surrogate on conception rate of in-vivo frozen embryo derived from dairy cows in seoul dairy ET center.

Treatment	No. of Surrogate	Conception (%)
Control	42	22 (52.4)
Dexamethasone + rhLIF	34	22 (64.7)
Total	76	44 (57.9)

## 라. 형광 복제 배아 이식

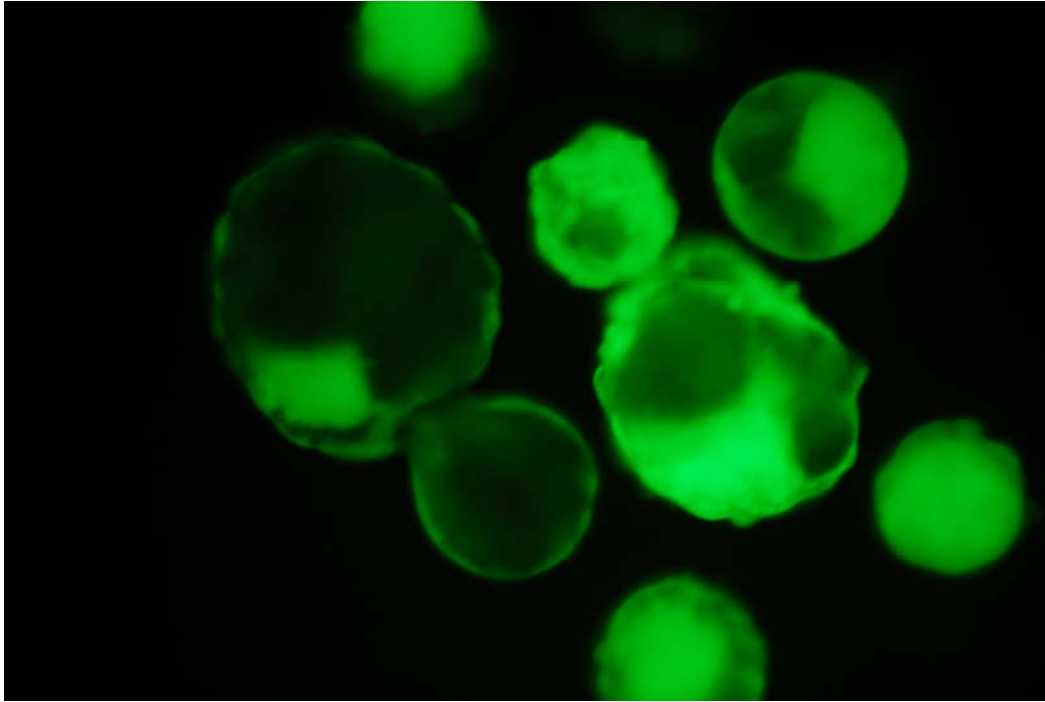


그림 76 Transposon-GFP 세포를 이용하여 생산된 형질 전환 GFP Blastocysts

형광 발현이 잘 되는 배반포를 선별하여 이식을 하였다 (그림 76)

### (1) Simple GFP발현 유전자 전달 시스템을 통한 배반포 이식, 임신 및 발현 검증

Puromycin-GFP발현을 하는 배아를 이식한 결과 임신이 되었고, 임신 6개월령 유산이 되어서 태아를 회수하였지만, 부패가 심하여 세포 배양에는 실패를 하였다. 하지만 일부 남아있는 귀 조직을 현미경으로 관찰한 결과 GFP가 발현이 잘 되는 것을 확인하였다 (그림 77).

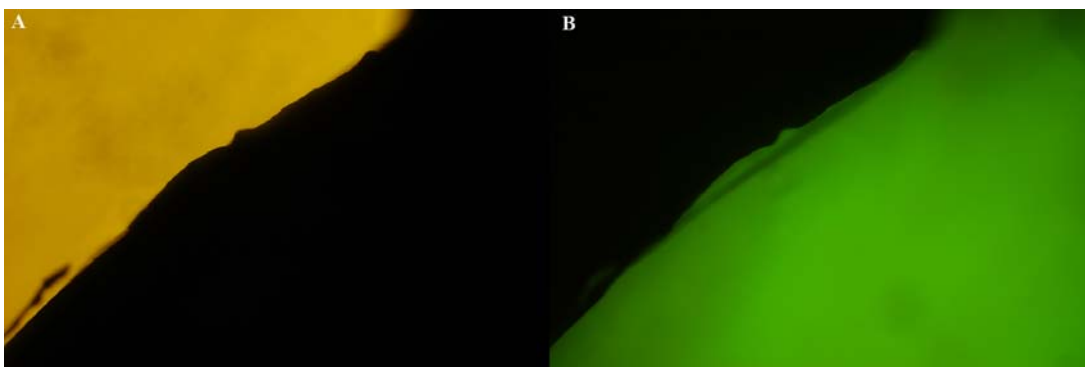


그림 77 그림 A는 brightness에서 찍은 사진이고 그림 B는 형광 상태에서 찍은 사진이다. 오른쪽의 그림은 죽은 조직이지만 아직 GFP단백질이 남아 있어 발현이 잘 하는 것을 관찰 할 수 있었다.

Microsatellite analysis of genomic DNA from the donor cells, surrogate female, aborted twin fetuses

Markers	Donor		ClonedTwin-1		ClonedTwin-2		Surrogate	
	Peak1	Peak2	Peak1	Peak2	Peak1	Peak2	Peak1	Peak2
AGLA293	229	239	229	239	229	239	229	239
TGAL73	117	119	117	119	117	119	117	119
BM1824	179	181	179	181	179	181	189	189
BM2113	125	136	125	136	125	136	123	133
TGLA122	142	149	142	149	142	149	142	142

그리고 태아에서 RNA를 분리하여 여러 기관에서 GFP발현을 테스트 한 결과 쌍둥이 유산 개체 대부분의 장기에서 GFP가 잘 발현되고 있음을 확인 하였다. 이 쌍둥이 유산태아로부터 세포 분리를 시도하였지만 조직의 부패가 심해서 배양이 되지 않았다.

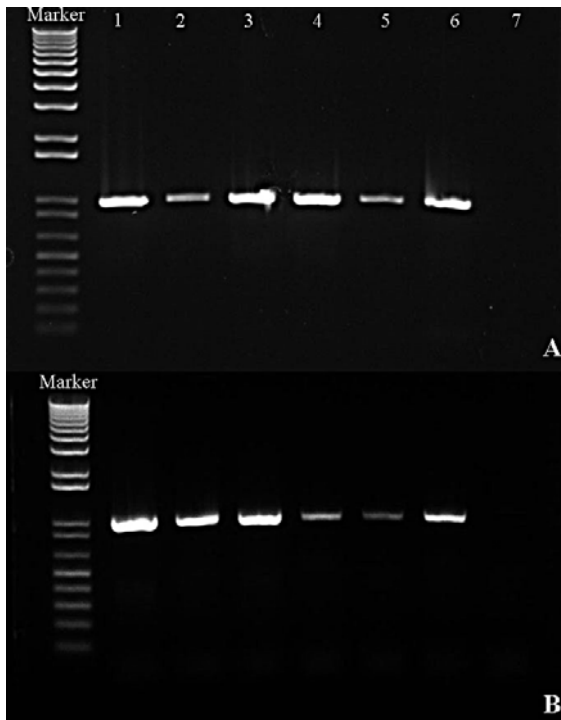


그림 78 Figure 5. Detection of GFP gene with specific primer in cloned twin fetuses. Genomic DNA was extracted from several organs of twin (A, B) aborted cloned fetus. Marker: DNA size 1) Muscle, 2) Heart, 3) Lung, 4) Liver, 5) Spleen, 6) Kidney, 7) Negative



현재 확보된 GFP발현 유전자 발현 DNA로부터 어느 위치에 유전자가 들어가 있는지를 분석중이다. 이를 위하여 splinkerette PCR protocol을 확립중에 있으며, 지금까지 나온 결과에 따르면 유전자가 들어간 위치는 chromosome 32번째로 추정중이지만, protocol이 확립된 후 좀 더 정확한 결과를 얻어질 것으로 생각한다. 두 번째 형질 전환 배아 유래의 유산 태아는 twin이었다. 유산된 태아에서 얻어진 genomic DNA를 가지고 microsatellite분석을 한 결과 유산된 형질 전환 복제 태아는 GFP발현 세포로 얻어진 결과였음을 확인하였다.

(2) Transposon-GFP발현 배아 이식, 임신 및 검증

Piggybac 유전자 발현 시스템을 적용하여 완성된 PB-CA-GFP발현 벡터가 적용된 세포로부터 완성된 배반포를 이식하여 임신이 되었다. 쌍둥이 임신이 되었고, 임신 초기에 초음파 촬영을 한 사진은 아래 그림과 같다. 임신을 관찰하던 중 45일령에 태아의 심박이 관찰이 되지 않아서 수술적으로 태아를 회수하였다.

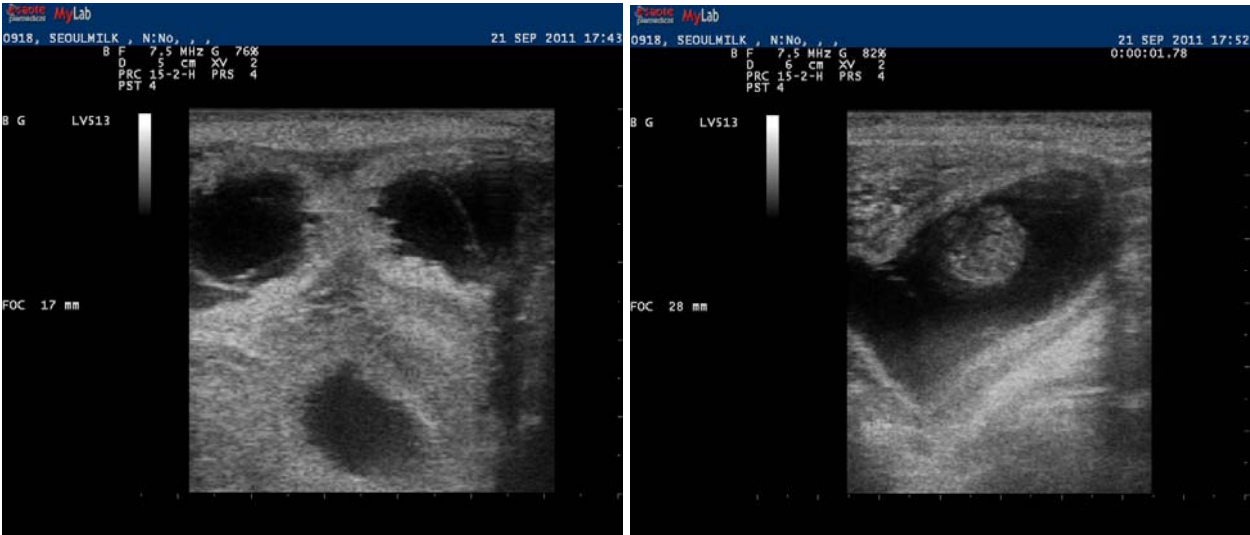


그림 79 초음파 진단을 이용한 임신 확인

초음파를 통해 임신이 확인된 GFP 유래의 태아를 수술적으로 회수하였다. 그림에서처럼 왼쪽 견부를 소독한 후, 미정맥을 통해 마취를 유도하고, 수술한 부분에 리도카인으로 국소마취를 실시하였다.

왼쪽 견부를 절개하고 자궁을 확보하고, 무균적으로 자궁을 절개하고, 멸균된 비어커에 태반과 태아를 회수하였다. 회수된 태아와 태반은 연구실로 옮겨져 세포 배양이 적용되었다.

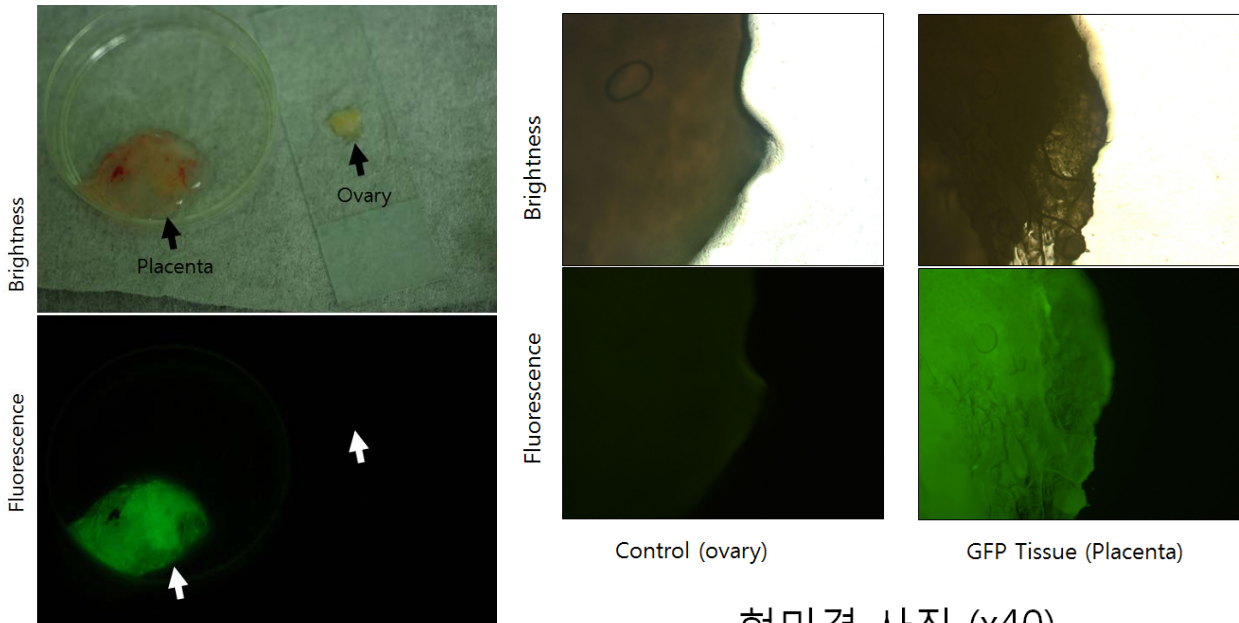


그림 80 수술적으로 대리모에서 태아를 회수하는 모습 사진



그림 81 회수된 양측성 태반 (왼쪽)과 형태가 남아있는 태아 (오른쪽)

이들 태아측 태반에서 GFP가 잘 발현하고 있는지를 관찰하기 위하여 태반과 일반 소의 난소 조직 일부를 같이 GFP 형광 상태에서 관찰한 결과는 아래 그림과 같다. 아래 그림에서 보는 것처럼 전체 태반에서 유전자가 고르게 잘 발현하는 것을 관찰하였다.



현미경 사진 (x40)

그림 82 태반 조직에서 현미경과 형광 고글을 이용한 GFP 발현 사진

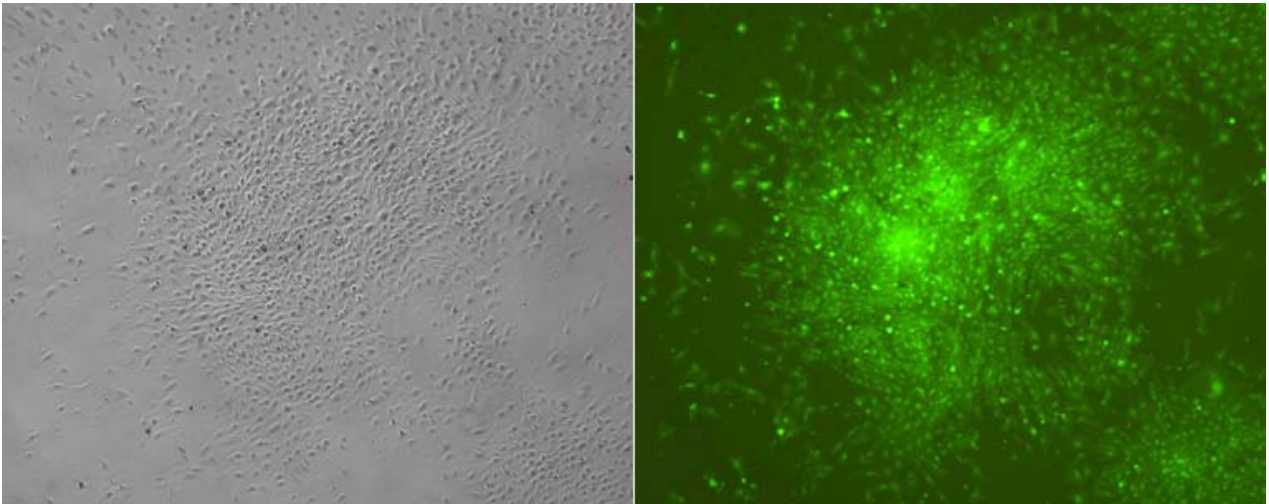


그림 83 태반으로 분리된 세포의 bright 사진 (왼쪽)과 형광사진 (오른쪽)

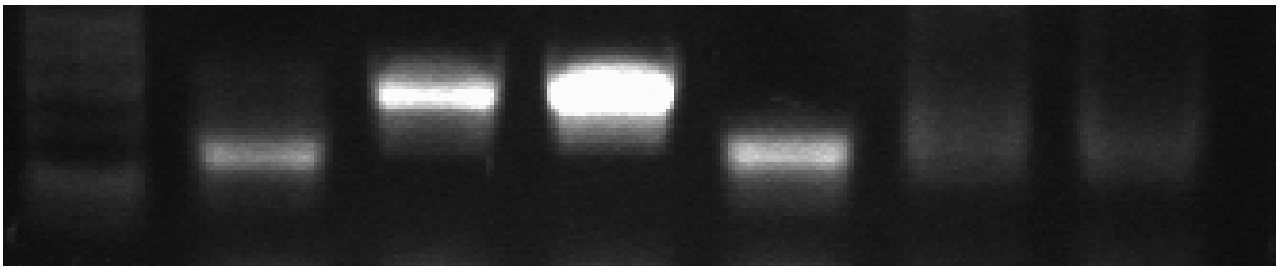


그림 84 GFP세포에서 PCR과 RT-PCR을 이용한 GFP 발현 확인. Lane1: Molecular marker, 2: GAPDH, 3: RT-PCR for GFP, 4: genomic PCR for GFP, 5:GAPDH in control BL, 6: RT-PCR in control BL, 7: genomic PCR in control BL

(3) 항생제 조절 유전자 발현 배아 이식, 임신, 검증

항생제 조절 시스템을 적용하여 유전자 발현 시스템을 이용한 on/off시스템으로 유전자 발현 배아가 이식되어 임신이 관찰되었다. 임신 40일령에 관찰한 사진은 그림 85 같다. 보시는 것과 같이 임신은 되었지만, 태아 형성은 없고 Sac만 형성하였다. 초기 태아 흡수로 판단되었다.

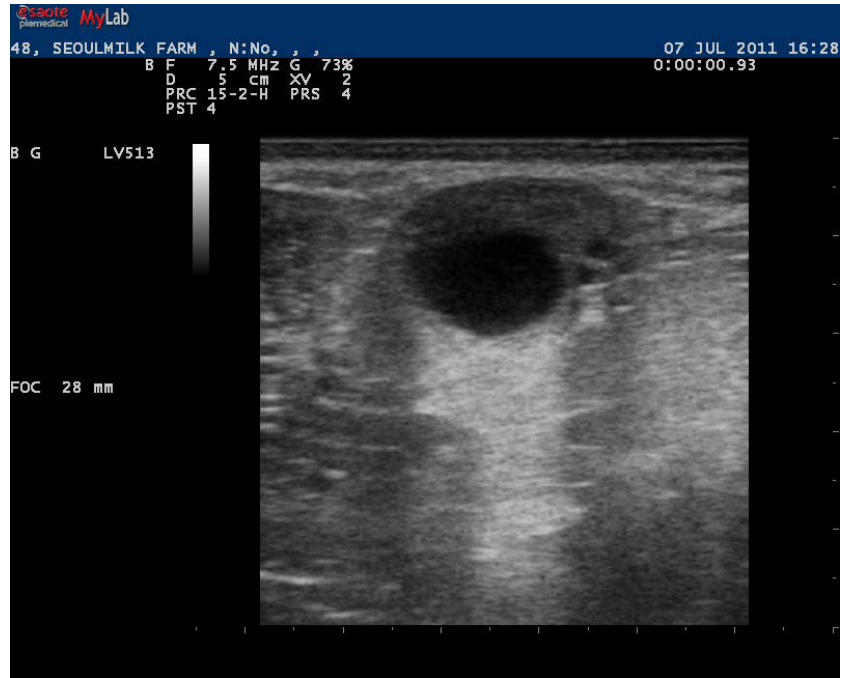


그림 85 항생제 조절 발현 세포를 이용한 복제 배아 임신 사진

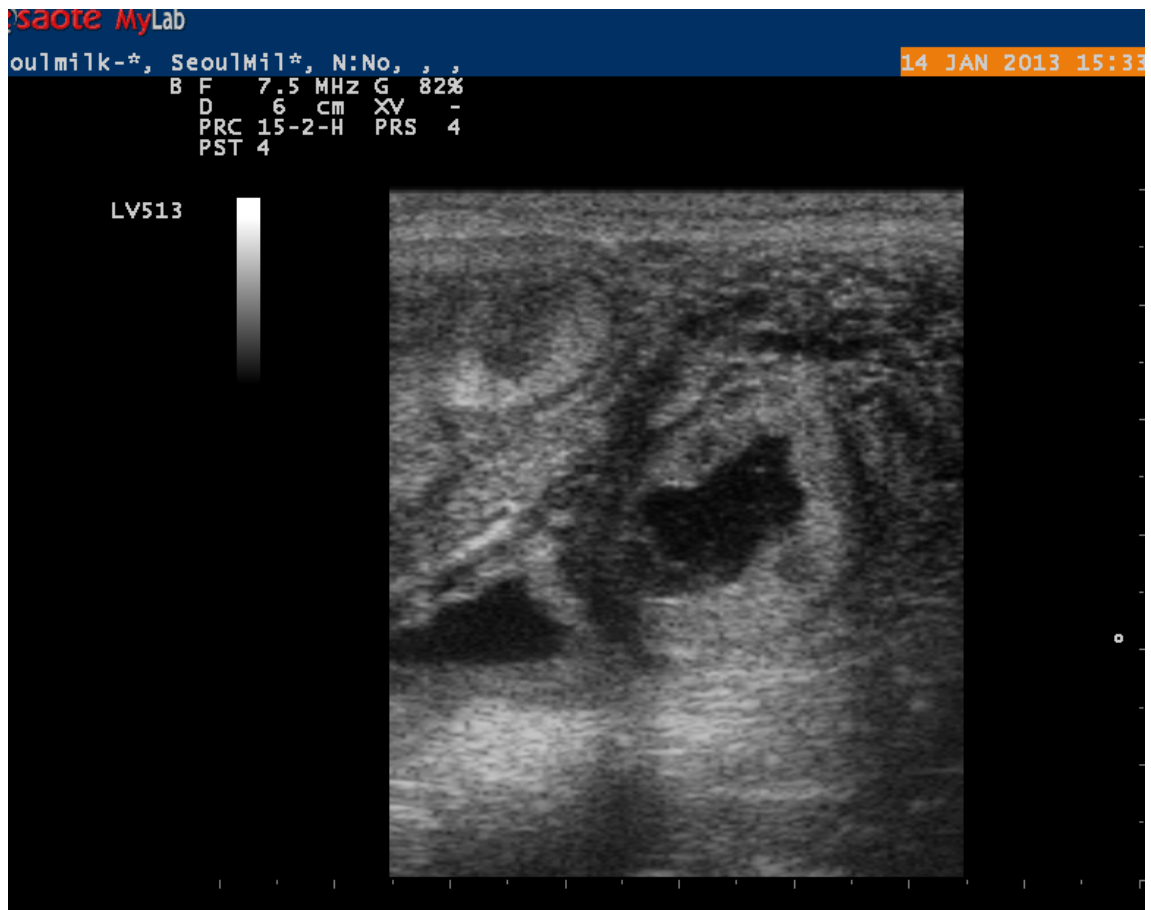


그림 86 복제 수정란 임신 사진. 형질 전환 복제 수정란 이식 후 50일령에 초음파 진단을 하여 임신 여부를 관찰하였다.



이후 추가적인 이식을 실시하여 임신이 확인되었지만, 이번에도 태아는 죽어서 심장이 뛰지 않아서 수술적으로 태반 및 죽은 태아를 확보하였다.



그림 87 대리모의 겹부를 마취 후에 절개 후 자궁을 노출하고 (왼쪽), 임신된 부위를 견인하여 자궁을 절개하고 태아를 회수하고 있다 (오른쪽).



그림 88 임신 50일령에 확보된 수술적 접근에 의한 태반 및 태아 모습 (화살표)

추가 검증을 위하여 doxycycline이 들어간 배지에서 배양한 태반에서는 RFP가 잘 관찰이 되고, 그렇지 않는 태반에서는 관찰되지 않았다. 이런 결과는 소에서 처음으로 항생제 의존하는 배반포가 착상을 하여 태아까지 형성하였다는 결과를 보여주고 있다.

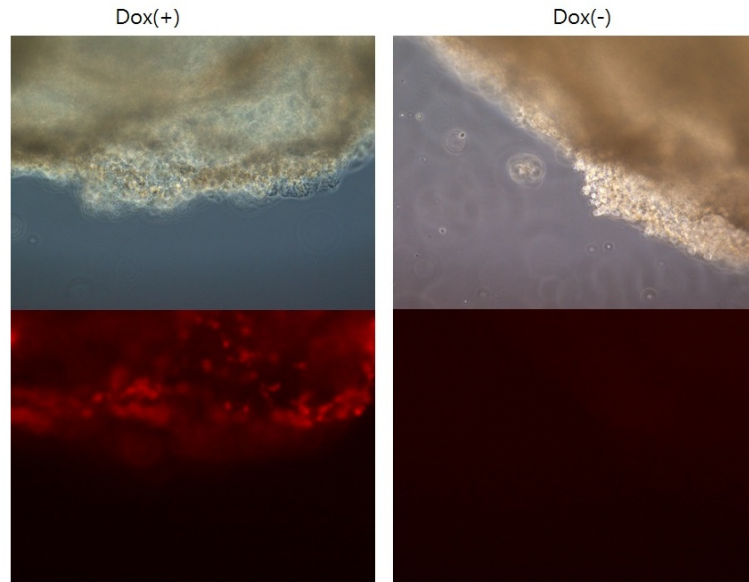


그림 89 Doxycycline이 있는 조직과 없는 조직내에서 발견되는 태반. 왼쪽의 태반에서는 doxycycline의 첨가로 RFP가 잘 발현하고 있다.



마. 형질 전환 세포 및 태아 유래 세포의 염색체 결과

형질 전환 복제 배아에 사용되고 있는 세포의 염색체 검사 정보는 초기 단계에서 배아 발달 단계까지 매우 중요한 부분이 되어서 분석을 실시한 결과 외부 유전자를 집어넣고, 항생제를 선별한 후에도 정상 염색체를 보이고 있었다.

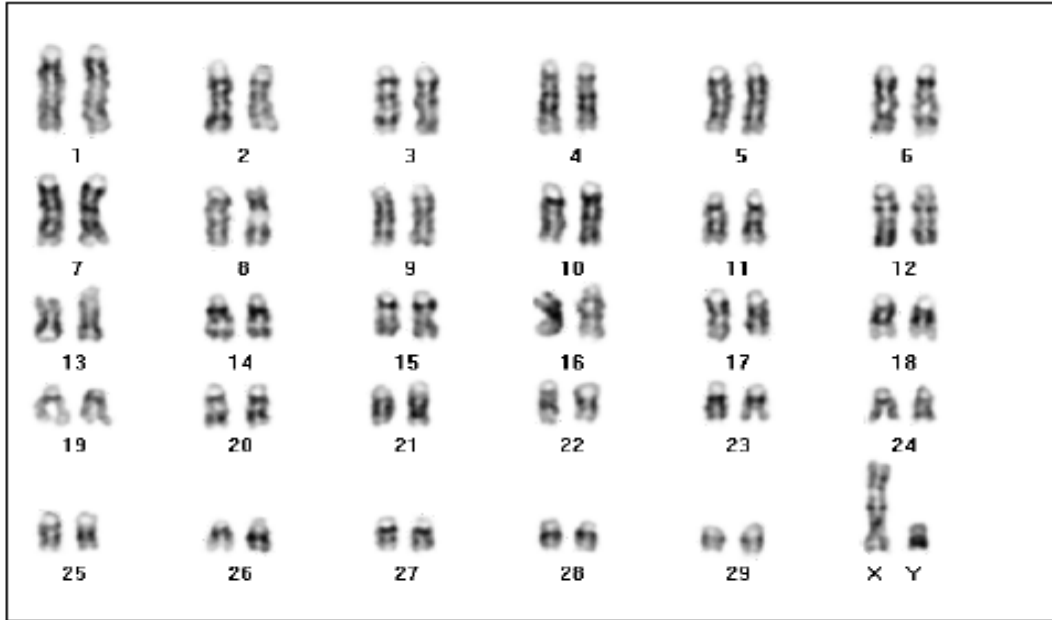


그림 90 형질 전환 소 개발에 사용된 형질 전환 세포의 염색체 평가.  $2n=60$  (XY)

임신 중 회수한 태아 세포 유래의 염색체를 분석한 결과 정상 염색체인  $2n=60$  (XX)가 관찰이 되어 유산된 원인은 염색체 이상은 배제되었다.

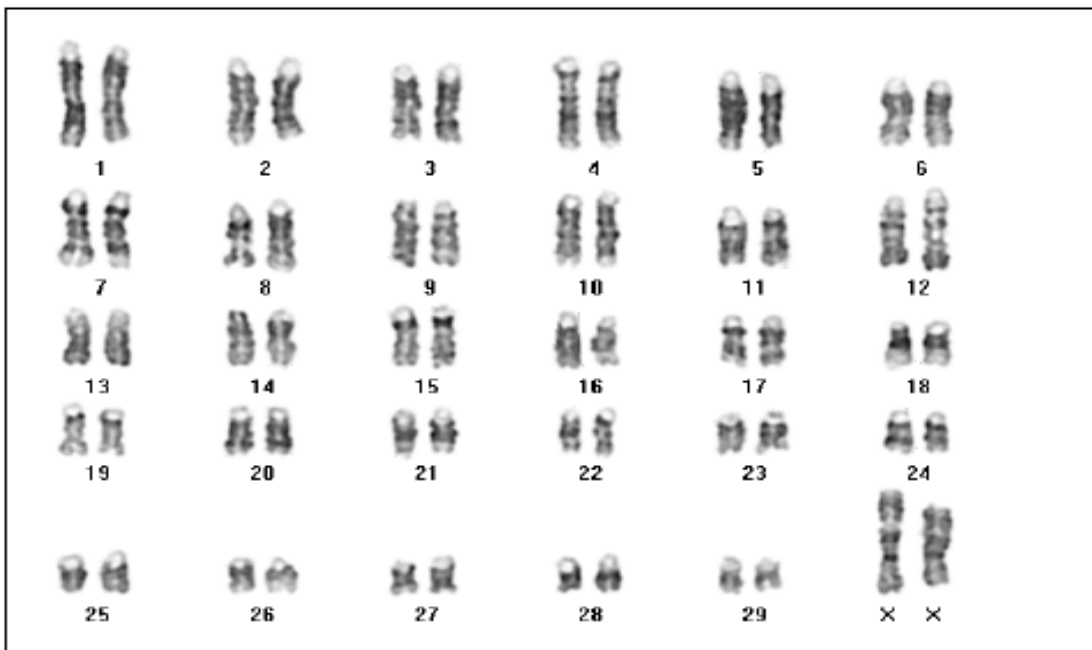
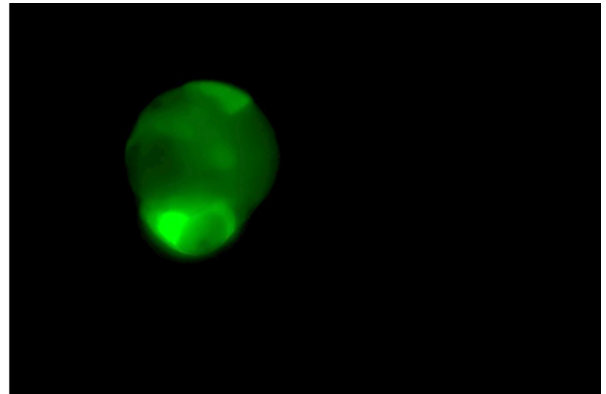
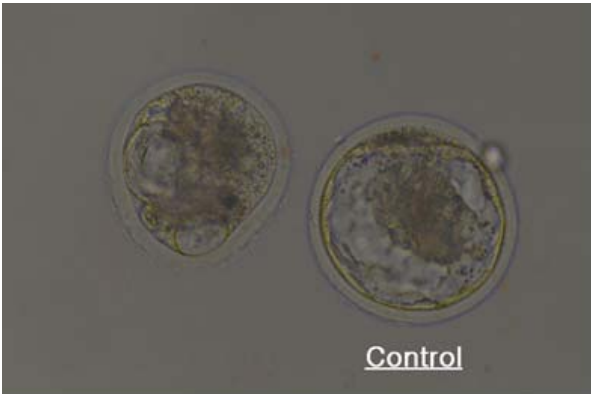


그림 91 형질 전환 태아 유래의 세포 염색체 검사.  $2n=60$  (XX)

바. YFP 발현 소 MicroInjection 수정란 이식 후 소 생산



- ✓ 2013.03.27 : embryo transfer.
- ✓ Recipient : No.2097, by.이원유
- ✓ Corpus luteum condition : R++
- ✓ Day 7
- ✓ Medium : P5



그림 92 Transposon DNA를 미세주입 후 발달한 배반포 사진과 이식 모습

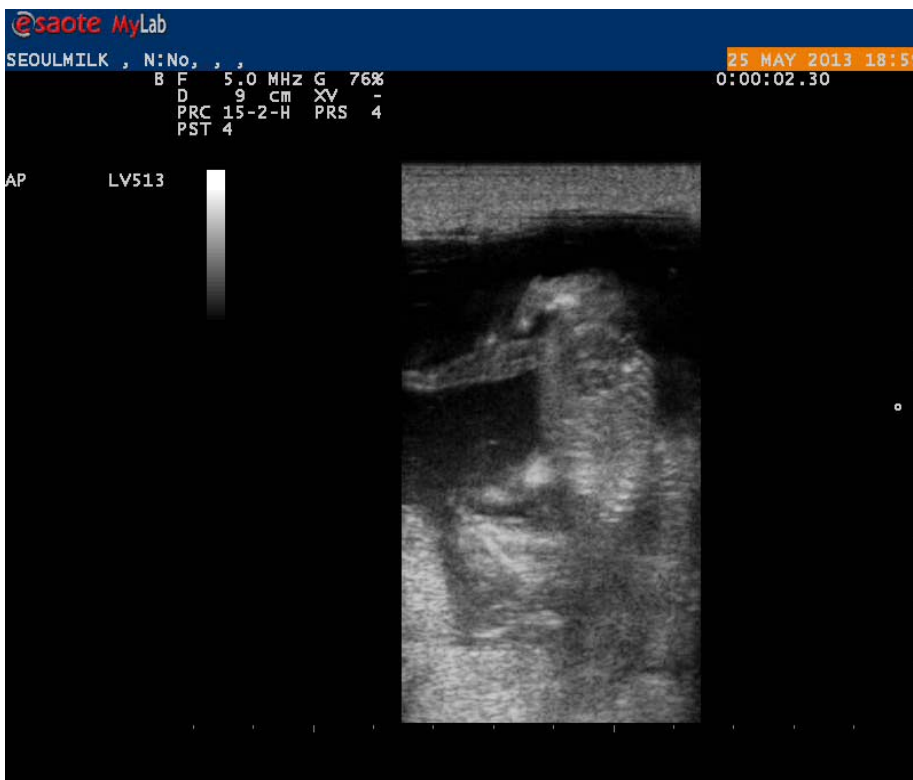


그림 93 임신 50일령 태아 초음파 사진 모습



그림 94 분만 직후 사진 (왼쪽) 및 3개월 사진 모습 (오른쪽)

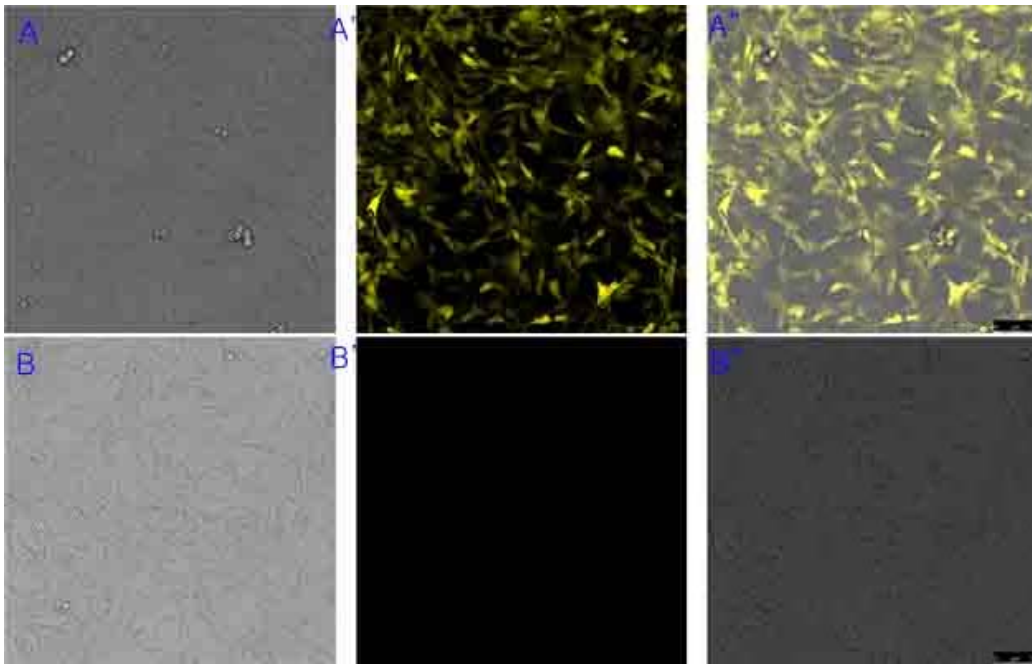


그림 95 태어난 YFP 발현 소 조직 배양을 통해 얻어진 세포의 콘포컬 사진  
위(형질 전환 소 유래 귀 세포), 아래 (대조군 소 유래 귀세포)

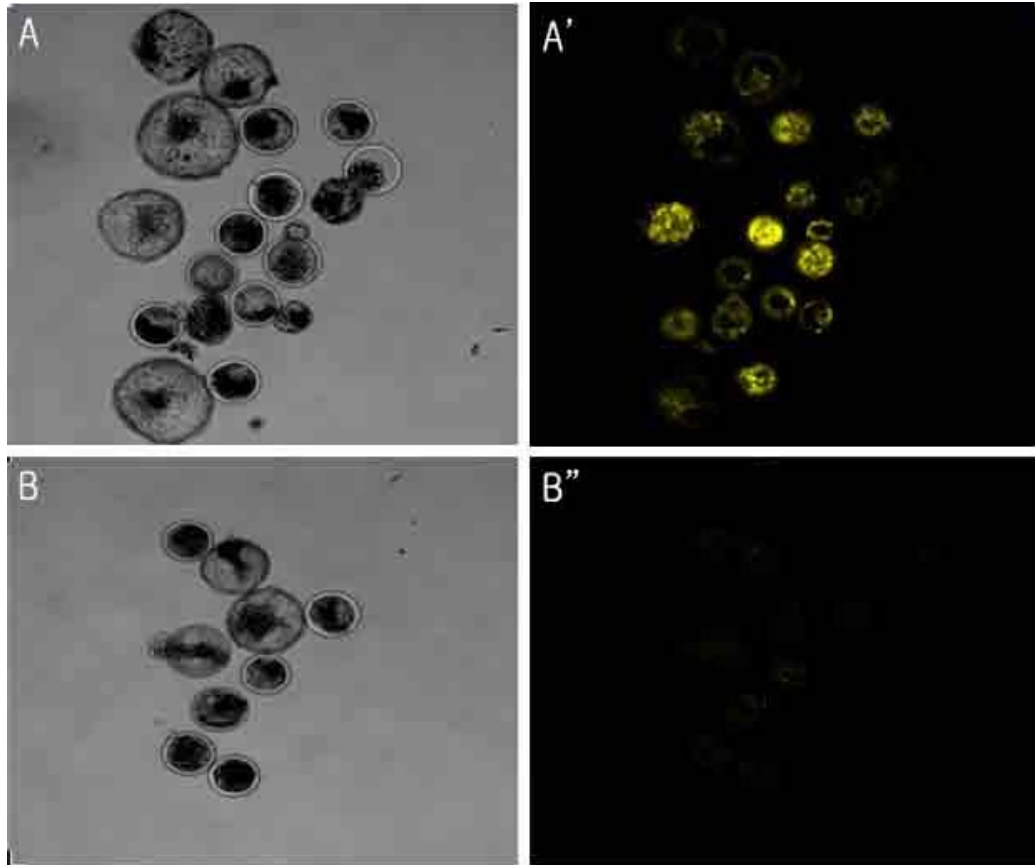


그림 96 형질전환 유래 세포와 대조군 유래 세포를 이용한 복제 배반포 사진 모습 위(형질 전환 소 유래 세포를 이용한 복제 배아 사진), 아래 (대조군 세포를 이용한 복제 배아 사진)



그림 97 대조군 송아지와 형질 전환 송아지를 GFP 필터를 이용하여 같은 조건에서 관찰할 결과 형질 전환 소 (오른쪽)에서는 유전자 발현이 잘 관찰되는 것을 확인되었다.

사. 유전자 재조합 DNA 주입후 발현 배아 이식

유전자 재조합 방식에 의한 DNA을 미세 주입 한 후 발현하는 배반포를 선별하여 이식을 실시하였다 (그림 98). 이식 후 50일령에 초음파를 이용하여 임신 진단을 한 결과 임신이 확인되어 현재 임신 진행중이다 (그림 99).

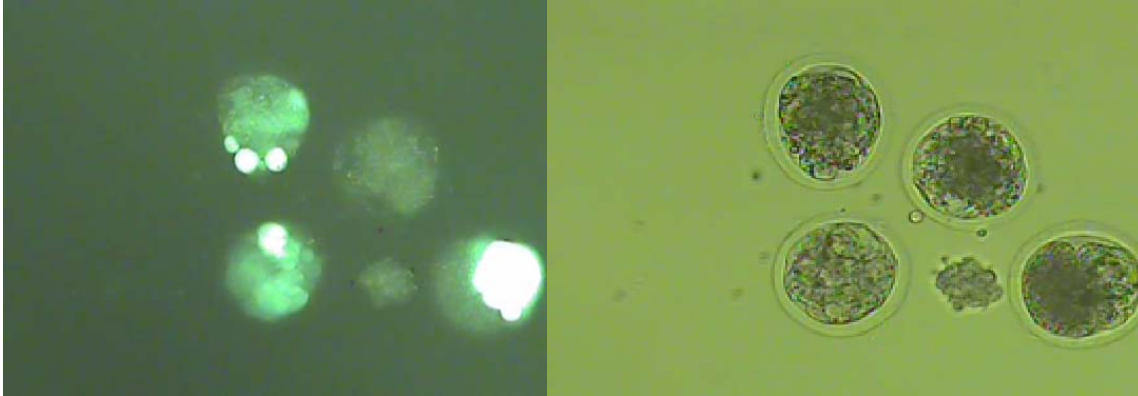


그림 98 유전자 재조합 DNA 미세 주입후 발현하는 사진.



그림 99 이식 후 초음파 진단에 의한 임신 확인 사진

#### 아. 인간 유용 유전자 배아 생산 및 이식

IL-2와 GFP를 결합시킨 유전자를 발현시킨 세포를 이용하여 복제 배아를 생산하고 이식을 하였다. 이식 후 임신에는 실패하였지만, 배반포 발육에는 문제가 없는 것을 확인하였다.

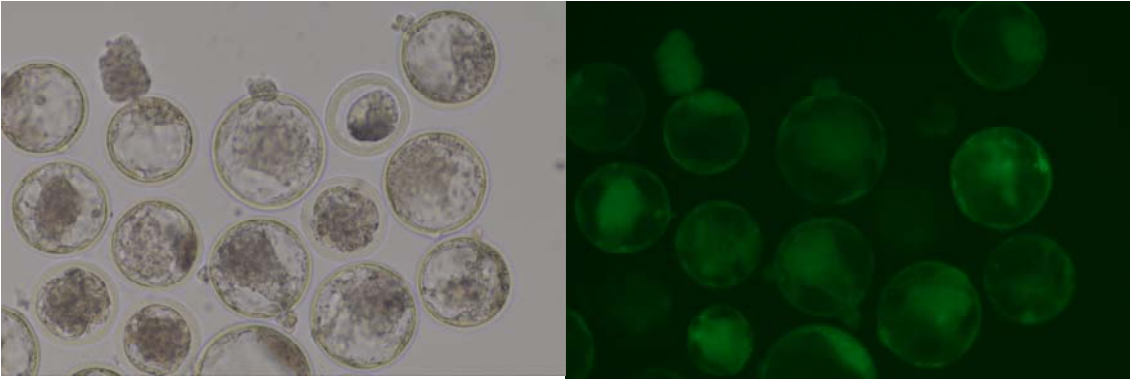


그림 100 인간 유용 유전자가 들어간 체세포를 이용한 복제 배아 생산 사진

자. 형질전환 수정란이식 결과

2012년 형질전환 복제배아의 수정란이식 결과는 아래와 같다.

연번	수란우 내역		수정란 내역		임신유무	비고
	명호	산차	체세포	상태		
1	61	Heifer	RFP	Fresh	Preg.	태아추출
2	69	Heifer	RFP	Fresh	Preg.	조기태아사
3	106	Heifer	RFP	Fresh	Preg.	조기태아사
4	118	Heifer	RFP	Fresh	None	
5	107	Heifer	RFP	Fresh	None	
6	113	Heifer	RFP	Fresh	None	
7	119	Heifer	RFP	Fresh	Preg.	조기태아사
8	114	Heifer	RFP	Fresh	Preg.	조기태아사
9	111	Heifer	RFP	Fresh	Preg.	조기태아사
10	117	Heifer	RFP	Fresh	Preg.	조기태아사
11	130	Heifer	RFP	Fresh	None	
12	136	Heifer	RFP	Fresh	None	
13	4932	Heifer	RFP	Fresh	None	
14	146	Heifer	RFP	Fresh	None	
15	140	Heifer	RFP	Fresh	None	
16	150	Heifer	RFP	Fresh	Preg.	조기태아사
17	158	Heifer	RFP	Fresh	None	



2013년부터 형질 전환 수정란 이식 결과는 아래와 같다.

순번	이식 일	수란우 내역		수정란 내역		임신유무	비고
		명호	산차	체세포	상태		
1	2013.01.23	158호	육성우	RFP(NT)	신선	공태	
2	2013.03.20	150호	육성우	GFP(NT)	신선	수태	조기태아사
3	2013.03.21	154호	육성우	GFP(NT)	신선	수태	조기태아사
4	2013.03.27	160호	육성우	YFP(Micro)	신선	수태	13.12.30분 만
5	2013.05.29	175호	육성우	GFP(NT)	신선	공태	
6	2013.06.12	157호	육성우	GFP(NT)	신선	공태	
7	2013.07.4	163호	육성우	GFP(NT)	신선	수태	조기태아사
8	2013.07.17	189호	육성우	GFP(NT)	신선	공태	
9	2013.07.23	170호	육성우	GFP(NT)	신선	수태	조기태아사
10	2013.07.23	188호	육성우	GFP(NT)	신선	공태	
11	2013.08.21	185호	육성우	GFP(NT)	신선	공태	
12	2013.09.04	182호	육성우	GFP+IL2(NT)	신선	공태	
13	2013.09.05	190호	육성우	GFP+IL2(NT)	신선	공태	
14	2013.09.17	187호	육성우	GFP+IL2(NT)	신선	공태	
15	2013.11.07	189호	육성우	RGRR(Micro)	신선	수태	
16	2013.11.27	170호	육성우	GFP+IL2(NT)	신선	공태	
17	2013.12.05	182호	육성우	GFP+IL2(Micro)	신선	공태	
18	2013.12.05	185호	육성우	GFP+IL2(NT)	신선	공태	
19	2013.12.12	171호	육성우	GFP+IL2(NT)	신선	공태	

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	제1세부 - 형질전환 발현 벡터 개발 및 배아 생산	형질 전환 소 생산을 위한 세포 확립	100%	-대리모 선정, 인공수정 -임신 확인 및 수술적 태아 회수 -세포주확립 및 보존 -세포의 성 판정
		기본 적중 유전자 벡터 생산	100%	- Gateway system 확립 - GFP, RFP-transposon 벡터 생산 - Genbank search
		인간 유용 단백질 후보 유전자 선정 및 클로닝	100%	- IL2, 8, 10 cDNA 및 genomic DNA 확보
		역분화 초기 배아 전사 유전자 복제	100%	- 소의 초기 배아 전사 인자 클로닝 - 초기 배아 전사 유전자의 발현 벡터 완성
	제2 세부 - 형질전환 동물 생산체계 확립 및 분석	기본 적중 유전자 형질 전환 복제 배아 생산	100%	- 핵이식 배양 조건에 배아 생산 효율 비교 - 형질 전환 세포를 이용한 배아 생산
		배아에서 유전자 발현 확인	100%	- 배아에서 유전자 발현 확인
		복제 배아의 유전적 분석	100%	- 복제 배아에서 착상 유전자

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 연도 (2010)	제1세부	인간 유용단백질 발현벡터 검증	100%	- 공여세포 감염성 연구 - 유용단백질 발현벡터 세포내도입 - 세포주확립 - 확립된 세포주에서 단백질 분리 검증
		역분화 만능세포 유지 및 유도	100%	- 소의 배아 초기 전사유전자 도입 및 발현 연구 - 체세포에 초기 전사 유전자 도입 후 세포내의 유전자발현 패턴 분석 - 소의 배아 초기 전사 유전자 발현을 이용한 체세포의 역분화 확인 - 역분화 줄기세포 배양 및 검증
		착상 유전자 발현연구	100%	- 착상 유전자의 발현과 초기 배아 전사 유전자의 발현 관계 연구 - 착상유전자 real-time PCR 연구
		유전자 발현 시스템 개발	100%	- 외부 유전자 발현을 지정하여 단백질 검증 평가 (PhiC31 Integrase 검증) - inducible 유전자발현 시스템구축
		형질 전환 배아에서 단백질 발현 검증	100%	- 배반포 수준에서 외부 유전자 발현 검증
	제2세부	체세포 복제기법 확립	100%	- 수정란을 통한 체외 배양 조건 개선 - 핵이식 배아 배양 조건 개선
		형질 전환 복제 배아 대량 생산	100%	- 형질 전환 배아 생산 동결 시스템을 통한 대량 생산 확립
		배아 이식기법 향상	100%	- 수란우 선발시 전염성 질병 검사 수행 - 수란우의 대리모 이식 상태 조사

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 연도 (2011)	제1세부	형질 전환 복제 배아 생산 및 검증	100%	- 체외 성숙 조건 개선을 통한 배아발육 개선 - 태반줄기세포 분리를 통한 형질 전환 세포 검증 - 유용단백질 형질 전환 복제 배아의 체외 배양을 통한 생산 효율 향상 - 형질 전환 복제 배아에서 유용단백질 발현을 PCR을 통한 분석
		소의 역분화세포 구축 및 외부유전자 도입	90%	- transposon에 있는 초기 배아 전사 유전자의 세포내로 도입 효율 측정 - 두 가지 이상의 세포에 초기 배아 전사 유전자 도입 효율 평가 - 소의 체세포에 역분화 세포 형성 관찰 - 역분화세포에 유전자 도입 - 3배엽 분화 실험
		유전자 발현 시스템 구축	100%	- Site-specific을 이용한 인간 단백질 발현 시스템 구축 (Cre/LoxP) - Male/Female 세포에 conditional 유전자 발현 구축을 이용한 유전 특이 발현 구축
		배아 이식 및 수란우 평가	100%	- 이식 후 임신된 복제 배아의 초음파 평가
	제2세부	형질전환 복제배아 생산 및 이식	100%	- 유용단백질 유전자 삽입 형질전환 체세포핵이식 수정란 생산 - 형질전환 복제배아의 동결융해 후 생존성 검토 - 형질전환 복제배아 이식후 초기 임신평가를 위한 초음파 관찰 - Flunixin meglumine 및 hcG 등의 투여를 통한 임신을 제고 평가
		형질전환 복제우 생산 및 관리	100%	- GFP or RFP 초기 임신 배아로부터 fetal fibroblast 확보 - Reporter gene(GFP or RFP) 삽입 형질전환우 세포 분석

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
4차 연도 (2012)	제1세부	형질 전환 복제 배아 생산 및 검증	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 체외성숙효과 증진에 대한 유전자 분석</li> <li>- 태반 줄기세포를 이용한 형질 전환 배아 생산 및 분석</li> <li>- Site-specific 유전자 발현 시스템 구축</li> <li>- 유용단백질 발현 조절 세포주 개발 및 검증 (세포 수준)</li> <li>- 형질 전환 세포의 염색체 분석</li> </ul>
		소의 역분화 줄기세포 및 유용단백질 생산 배아생산	90%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 소 유래의 배아 전사 유전자 클로닝 완성</li> <li>- 소 유래 배아 전사 인자를 통한 역분화줄기세포 확립 시도</li> <li>- 확립된 세포에 유용단백질 유전자 co-transfection</li> </ul>
		배아 검증 및 유전자 검증	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 임신된 세포유래로부터 형질 전환 세포 채취 및 배양</li> <li>- 유전자 발현 위치 분석을 위한 외부 유전자 위치 분석</li> <li>- 완성된 형질 전환 세포를 이용한 re-cloning 생산</li> </ul>
	제2세부	형질전환 복제배아 생산 및 이식	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 유용단백질 유전자 삽입 형질전환 체세포핵이식 수정란 생산</li> <li>- 형질전환 복제배아 이식후 초기 임신평가를 위한 초음파 관찰</li> <li>- 수란우에의 Flunixin meglumin 투여를 통한 임신을 제고 평가</li> <li>- Transfer media 내 Dexamethasone 및 hrLIF 첨가 효과 검토</li> </ul>
		형질전환 복제우 생산 및 관리	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 형질 전환 배아 이식 30두 이상 수행</li> <li>- GFP or RFP calf로부터 체세포 확보 및 검증</li> <li>- 인간 유용단백질 유전자 삽입 형질 전환 초기 태아로부터의 fetal fibroblast 확보</li> </ul>

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구내용
5차 년도 (2013)	제 1 세부 - 유전자 발현 시스템을 이용한 형질 전환 배아 생산	형질 전환 복제 배아 생산 및 검증	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 체외성숙효과 증진에 대한 유전자 분석</li> <li>- 태반 줄기세포를 이용한 형질 전환 배아 생산 및 분석</li> <li>- Site-specific 유전자 발현 시스템 구축</li> <li>- 유용단백질 발현 조절 세포주 개발 및 검증 (세포 수준)</li> <li>- 형질 전환 세포의 염색체 분석</li> </ul>
		소의 역분화 줄기세포 및 유용단백질 생산 배아생산	90%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 소 유래의 배아 전사 유전자 클로닝 완성</li> <li>- 소 유래 배아 전사 인자를 통한 역분화줄기세포 확립 시도</li> <li>- 확립된 세포에 유용단백질 유전자 co-transfection</li> </ul>
		배아 검증 및 유전자 검증	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 임신된 세포유래로부터 형질 전환 세포 채취 및 배양</li> <li>- 유전자 발현 위치 분석을 위한 외부 유전자 위치 분석</li> <li>- 완성된 형질 전환 세포를 이용한 re-cloning 생산</li> </ul>
	제 1 협동 - 형질 전환 동물 생산체제 확립 및 분석	형질전환 복제배아 생산 및 이식	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 유용단백질 유전자 삽입 형질전환 체세포핵이식 수정란 생산</li> <li>- 형질전환 복제배아 이식후 초기 임신평가를 위한 초음파 관찰</li> <li>- 수란우에의 Flunixin meglumin 투여를 통한 임신율 평가</li> <li>- Transfer media 내 Dexamethasone 및 hrLIF 첨가 효과 검토</li> </ul>
		형질전환 복제우 생산 및 관리	50%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 형질 전환 배아 이식 30두 이상 수행</li> <li>- GFP or RFP calf로부터 체세포 확보 및 검증</li> <li>- 인간 유용단백질 유전자 삽입 형질 전환 초기 태아로부터의 fetal fibroblast 확보</li> </ul>

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

가. 연구개발결과의 성과

(1) 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2010	Calves derived from in vivo frozen-thawed embryos collected from canada holstein friesland cows with high genetic background	이원유	장구	이우성, 김형중, 김봉한, 홍소균, 이병천	Journal of Veterinary Clinics	27(2)	국내	SCOPUS
2010	Gene expression of the in vitro fertilized or somatic cell nuclear transfer embryos cultured in medium supplemented with different proteins or energy substrates	장구	장구	고경희, 전현용, 이병천	Journal of embryo transfer	25(2)	국내	-
2011	Effect of different culture media on the temporal gene expression in the bovine developing embryos.	이슬람	장구	김봉한, 이병천	Theriogenology	75(6)	국외	SCI
2011	Cloned calves derived from somatic cell nuclear transfer	장구	이병천	홍소균	Journal of veterinary science	12(1)	국내	SCIE



	e m b r y o s cultured in chemically defined medium or modified synthetic oviduct fluid.							
2011	Production of transgenic bovine cloned embryos using piggy back transposition.	김수진	장구	이슬람, 최우재, 이송전, 이원유, 김봉한, 한효준, 방두희, 이병천	Journal of veterinary medical science	73(11)	국외	SCI
2012	Influence of factors during superovulation on embryo production in Korean Holstein cattle.	이원유	장구	송길영, 임광택, 이송전, 이병천	Journal of veterinary medical science	74(2)	국외	SCI
2012	Embryonic Development and Implantation related gene expression oocyte reconstructed with bovine trophoblast cells	이슬람	장구	최우재, 베고, 김봉한, 이병천	Journal of reproduction and development	58(4)	국외	SCIE
2013	DsRed gene expression by doxycycline in porcine fibroblasts and cloned embryos using transposon	김수진	장구	문준호, 베고, 이슬람, 강정택, 최지예, 박솔지, 이병천	African Journal of Biotechnology	12(21)	국외	
2013	Roles of Mesenchymal stem cells	팔라샤	장구	윤장원	Journal of Biomedical Research	14(4)	국내	

	(MSCs) in bacterial diseases							
2014	Effect of ectopic OCT4 expression on canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cell proliferation	한상훈, 장구	윤화영	배보경, 한세명, 고예린, 안옥진, 정우성, 강성근, 라정찬, 이희우	Cell Biology International	In press	국외	SCIE

나. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2012	피기백전위를 이용한 소형환배아의 제조법	이병천, 장구, 김수진, 이슬람, 메드샤텔딘, 이송전, 이원유, 김봉한, 최우재	대한민국	10-2012-004022					

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구과제를 수행하면서 해외학회 참석과 연구 논문을 바탕으로 아래와 같은 해외과학기술정보를 수집하였습니다.

### 1. 소의 체외 수정란 배양의 산업화

:남미를 중심으로 체외 수정란의 생산 및 배양 기술의 향상으로 소의 수정란이 산업화로 접어들어 여러 회사들이 중점적으로 기술을 확립하고 있다. 또한 완만 동결 및 초급속 동결의 기술 확립이 점차 안정화 되어가면서 수정란 관련 산업이 활발하게 진행되고 있음을 알 수 있었다.

### 2. 유전자 전달 기술

: 기존에 외부 유전자를 전달하는 방법은 주로 단순한 플라스미드 이용하였다. 이를 극복하기 위하여 바이러스를 이용하는 방법도 계속 사용하고 있었는데, 바이러스를 이용하면 잠재적인 암 유발 유전자 활성화 단점 때문에 제한이 있어왔다. 하지만 본 연구에서 사용된 트랜스포존 방법은 최근에 다양하게 연구가 되면서 효과적으로 외부 유전자를 전달하는 기술로 주목되어 가고 있다.

### 3. 유전자 가위 기술

: 최근 몇 년 사이에 유전자 가위 기술은 유전자 교정 기술로 각광을 받아 왔다. Zinc finger nuclease를 바탕으로 최근에는 Transcription Activator-Like Effector Nuclease와 같은 2세대 유전자 가위 기술을 바탕으로 다양한 식물 및 동물에 적용되어지고 있다. 가장 최근에는 RNA기반으로 이루어지는 유전자 가위 기술이 적용되어져 왔다. 주로 마우스 이하 포유동물 및 식물을 중심으로 이루어지던 유전자 가위 기술이 최근에 돼지 및 소 등에서도 효과적으로 이루어지고 있다. 미국을 중심으로 여러 연구 결과들이 제시되고 있어서 향후 관련 기술의 안정화로 산업동물, 특히 소와 돼지에서 매우 중요한 연구 기술로 지정되어, 산업화 부분에 큰 영향을 줄 것으로 생각한다.

### 4. 동물 관리 및 생산 기술

: 컴퓨터와 네트워크의 발달로 이제 동물의 산업을 관리하는 부분도 급속도로 향상되고 있다. 특히 소에서 건강관리를 위하여 바이오 센서를 이용하여, 동물의 개체별 건강정보를 컴퓨터로 실시간 수집이 되어, 몸의 건강상태를 간접적으로 알려주고 있어, 신속하게 질병 상태를 확인할 수 있다. 나아가 사료 배합 기술과 영양 대사 부분에 대한 연구가 진행이 되어 효과적으로 사료 급여 방식을 통하여 생산성 관련 기술이 빠르게 개발되고 있음을 확인할 수 있었다.

## 제 7 장 연구시설·장비 현황

연구 개발을 위하여 형질 전환 배아 이식 후 임신 진단 및 관리에 대한 연구로서 연구 장비를 구입하였으며, 구입된 장비는 국가연구시설장비관리 시스템에 등록되어 있으며 그 현황은 아래 그림과 같습니다.

장구님 | MY PAGE | MY NTIS | 로그아웃
장비상세검색 | NFEC등록번호검색

국가연구시설장비관리서비스

[소개](#)
[장비등록](#)
[장비관리](#)
[장비이전](#)
[장비통계](#)
[장비제품](#)

---

장비조회

NTIS장비등록번호 : NFEC-2009-12-077621
최종변경일 : 2014-03-26

QR코드 출력
정보출력
관심장비등록

### 초음파임신진단기

Ultrasound system

<b>제작사명/모델명</b>	Esaote/MyLab30 <span style="float: right; font-size: 0.8em; border: 1px solid #ccc; padding: 2px;">상세정보조회</span>	
<b>금액</b>	33,000,000원 ( 구매장비 )	
<b>취득일자</b>	2009-10-30	
<b>보유기관명</b>	서울대학교 산학협력단	
<b>활용범위</b>	단독활용만가능	
<b>단독활용사유</b>	동물임신진단용으로 단독활용	
<b>장비상태</b>	활용	
<b>표준분류</b>	임상의료장비 > 임상진단영상장비 > 임상진단용 초음파장비	

**장비설명**

특징-

초음파 장비

구성및성능

- VET ID screen, including veterinary DICOM fields
- Dedicated VET body marks
- VET measurements and calculations; e.g. fetal age for small and large animals
- Dedicated VET probes
- Built-in USB port allows the user to save images quickly and easily in BMP, AVI, or DICOM file formats for both still images and clips
- Integrated CD-writer
- Data storage in real-time with the embedded MyLab™ Desk data management system
- The images can also be transferred to BioPACS™/ Org@nizer™ mini-PACS architecture in a stand-alone or client-server configuration

활용분야

동물용 임신진단

특징+

초음파 장비

구성및성능

- VET ID screen, including veterinary DICOM fields
- Dedicated VET body marks
- VET measurements and calculations; e.g. fetal age for small and large animals

## 제 8 장   참고문헌

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663-76.

Wright G, Carver A, Cottom D, Reeves D, Scott A, Simons P, Wilmot I, Garner I, Colman A. High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology (N Y)*. 1991 Sep;9(9):830-4.

Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997 Feb 27;385(6619):810-3

Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmot I, Colman A, Campbell KH. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*. 1997 Dec 19;278(5346):2130-3.

Park KW, Cheong HT, Lai L, Im GS, Kühholzer B, Bonk A, Samuel M, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Prather RS. Production of nuclear transfer-derived swine that express the enhanced green fluorescent protein. *Anim Biotechnol*. 2001 Nov;12(2):173-81

Brophy BL, Smolenski G, Wheeler T, Wells D, L'Huillier P, Laible G. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. *Nat Biotechnol*. 2003 Feb;21(2):157-62. Epub 2003 Jan 27.

Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*. 2002 Feb 8;295(5557):1089-92.

Kolber-Simonds D, Lai L, Watt SR, Denaro M, Arn S, Augenstein ML, Betthausen J, Carter DB, Greenstein JL, Hao Y, Im GS, Liu Z, Mell GD, Murphy CN, Park KW, Rieke A, Ryan DJ, Sachs DH, Forsberg EJ, Prather RS, Hawley RJ. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase null pigs by means of nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 May 11;101(19):7335-40

Wall RJ, Powell AM, Paape MJ, Kerr DE, Bannerman DD, Pursel VG, Wells KD, Talbot N, Hawk HW. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nat Biotechnol*. 2005 Apr;23(4):445-51.

Kuroiwa Y, Kasinathan P, Matsushita H, Sathiyaselan J, Sullivan EJ, Kakitani M, Tomizuka K, Ishida I, Robl JM. Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin-mu and prion protein in cattle. *Nat Genet*. 2004 Jul;36(7):775-80.

Richt JA, Kasinathan P, Hamir AN, Castilla J, Sathiyaseelan T, Vargas F, Sathiyaseelan J, Wu H, Matsushita H, Koster J, Kato S, Ishida I, Soto C, Robl JM, Kuroiwa Y. Production of cattle lacking prion protein. *Nat Biotechnol.* 2007 Jan;25(1):132-8.

Liu X1, Wang Y, Guo W, Chang B, Liu J, Guo Z, Quan F, Zhang Y. Zinc-finger nickase-mediated insertion of the lysostaphin gene into the beta-casein locus in cloned cows. *Nat Commun.* 2013;4:2565. doi: 10.1038/ncomms3565

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006 Aug 25;126(4):663-76.

Echelard Y1, Williams JL, Destrempe MM, Koster JA, Overton SA, Pollock DP, Rapiejko KT, Behboodi E, Masiello NC, Gavin WG, Pommer J, Van Patten SM, Faber DC, Cibelli JB, Meade HM. Production of recombinant albumin by a herd of cloned transgenic cattle. *Transgenic Res.* 2009 Jun;18(3):361-76. doi: 10.1007/s11248-008-9229-9.

Yang P, Wang J, Gong G, Sun X, Zhang R, Du Z, Liu Y, Li R, Ding F, Tang B, Dai Y, Li N. Cattle mammary bioreactor generated by a novel procedure of transgenic cloning for large-scale production of functional human lactoferrin. *PLoS One.* 2008;3(10):e3453. doi: 10.1371/journal.pone.0003453.

Hong SG1, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Park JE, Kang JT, Koo OJ, Kim T, Kwon MS, Koo BC, Ra JC, Kim DY, Ko C, Lee BC. Generation of red fluorescent protein transgenic dogs. *Genesis.* 2009 May;47(5):314-22. doi: 10.1002/dvg.20504.

Moghaddassi S, Eyestone W, Bishop CE. TALEN-mediated modification of the bovine genome for large-scale production of human serum albumin. *PLoS One.* 2014 Feb 21;9(2):e89631.

Tan W, Carlson DF, Lancto CA, Garbe JR, Webster DA, Hackett PB, Fahrenkrug SC. Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Oct 8;110(41):16526-31.

Xu YN1, Uhm SJ, Koo BC, Kwon MS, Roh JY, Yang JS, Choi HY, Heo YT, Cui XS, Yoon JH, Ko DH, Kim T, Kim NH. Production of transgenic Korean native cattle expressing enhanced green fluorescent protein using a FIV-based lentiviral vector injected into MII oocytes. *J Genet Genomics.* 2013 Jan 20;40(1):37-43. doi: 10.1016/j.jgg.2012.11.001. Epub 2012 Nov 17.

## 본문작성요령

- 가. 본문의 순서는 장, 절, 1, 가, (1), (가), ①, ㉠ 등으로 하고, 장은 17 포인트 고딕계열, 절은 15포인트 명조계열, 본문은 11 포인트 명조계열로 합니다. 다만, 본문의 내용 중 중요부분은 고딕계열을 사용할 수 있습니다.
- 나. 장은 원칙적으로 페이지를 바꾸어 시작합니다.
- 다. 본문은 11 포인트 횡으로 작성합니다.
- 라. 쪽 번호는 하단 중앙에 표기하되, 11 포인트로 합니다.
- 마. 각주는 해당 쪽 하단에 8포인트로 표기하며, 본문과 구분하도록 합니다.
- 바. 쪽 수는 편집순서 2의 제출문부터 시작합니다. 이 경우 삽입물이 있을 때에는 그 삽입물의 크기에 관계없이 1면을 한 쪽으로 하여 일련번호를 붙입니다.
- 사. 한글·한문·영문을 혼용합니다.
- 아. 뒷면지에 주의문을 넣습니다.
- 자. 참고문헌(reference) 인용의 경우 본문 중에 사용처를 반드시 표시하여야 합니다.



※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업(인간유용단백질 생산을 위한 형질 전환 소의 개발)의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업(인간유용단백질 생산을 위한 형질 전환 소의 개발)의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.

[부 표]

## 인 쇄 내 용

### I. 인쇄규격

1. 크기 : A4 신판(가로 210mm \* 세로297mm)
2. 제본 : 좌철
3. 용 지
  - 가. 표지 200g/m<sup>2</sup> 양면 아트지
  - 나. 내용 80g/m<sup>2</sup> 모조지
4. 인쇄방법
  - 가. 표지 : 바탕 백색,활자 흑색
  - 나. 내용 : 흑색 지정활자
  - 다. 양면인쇄

### II. 편집순서

1. 표 지
2. 제출문
3. 요약문
4. 영문 요약서(Summary)
5. 영문 목차(Contents)
6. 목 차
7. 본 문
8. 뒷면지

### III. 참고사항

전자조판 인쇄 시에는 이에 준한다.