

최 종 보 고 서

편집순서 1 (표지)

<p>(뒷면)</p> <div data-bbox="148 1377 359 1496" style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px auto; width: fit-content;"> <p>주 의 (편집순서 8)</p> </div> <p style="text-align: center;">(15 포인트 고딕계열)</p> <p style="text-align: center;">↑ 6cm ↓</p>	<p style="text-align: center;">112020</p> <p style="text-align: center;">수정란이식의 산업화 적용을 위한 수정란동결기술 개발</p> <p style="text-align: center;">농림축산식품부</p> <p style="text-align: center;">↑ 3cm ↓</p>	<p style="text-align: right;">(앞면)</p> <div style="text-align: center;"> <p>2cm</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 0 auto; width: 100px;"> <p style="text-align: center;">발간등록번호</p> <hr style="border: 0; border-top: 1px solid black; margin: 2px 0;"/> <p style="text-align: center;">11-1543000-000985-01</p> </div> <p>1cm</p> <p style="text-align: right;">5cm</p> <p style="font-size: 1.2em; font-weight: bold;">수정란이식의 산업화 적용을 위한 수정란동결기술 개발</p> <p style="font-size: 1.1em;">Development of Cryopreservation Technology for Industrial Application of Embryo Transfer</p> <p style="font-size: 1.2em; font-weight: bold; margin-top: 20px;">경상대학교</p> <p style="text-align: center;">↑ 9cm ↓</p> <p style="font-size: 1.2em; font-weight: bold;">농림축산식품부</p> <p style="text-align: center;">↑ 4cm ↓</p> </div>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “수정란이식의 산업화 적용을 위한 수정란동결기술 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015년 10월 일

주관연구기관명 : 경상대학교

주관연구책임자 : 공 일 근

세부연구책임자 : 이 정 규

연 구 원 : 진 중 인

연 구 원 : 선 두 원

협동연구기관명 : 경북대학교

협동연구책임자 : 이 동 석

요 약 문

I. 제 목

수정란이식의 산업화 적용을 위한 수정란동결기술 개발

II. 연구성과 목표 대비 실적

성과목표	사업화지표								연구기반지표								
	지식 재산권		기술이전	사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	출원	등록		제품화	기술창업	매출창출	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정채 활용용	홍보진시	
			SCI						비SCI								
최종목표	2	1	1	1						5	6		1			3	
연구기간 내 달성실적	3	2	1	1						11	4	12	4	7		7	
달성율(%)	150	200	100	100						220	66		400			233	

III. 연구개발의 목적 및 필요성(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

- 한/미, 한/EU FTA 체결로 가장 피해가 큰 축산분야에서 경쟁력을 확보하고 지속 가능한 축산업으로 발전하기 위해 개량의 중요성이 가장 클 뿐만 아니라 이제 축산농민들도 그 중요성 인식
- 우량 암소의 선발 및 검정의 중요성과 공란우 선정 시 능력평가 및 후대검정자료의 정확성 필요
- 기존 수정란이식은 신선란 위주 이식함으로써 노력과 비용부담의 문제점 있음
- 암·수 유전능력을 공히 활용함으로써 당대에 개량을 완성할 수 있는 수정란이식의 중요성과 효율성에도 불구하고 산업에 적용되지 못했던 원인은 고능력 수정란의 공급과 수태율 문제였음
- 수정란 동결기술의 개발에 한계점 있었음. 인공수정과 같이 발정 개체에 직접 이식 가능한 동결수정란의 공급기술 개발된다면 수정란이식의 산업화와 개량효율의 극대화를 이룰 수 있을 것임
- 현재의 수정란동결은 실험실 내에서 활용될 수 있는 기술로써 straw에 동결하여 직접이식

가능한 것이 아니라, straw를 조작하거나 straw를 이용하지 않는 동결방법이었음

- 발정개체의 이식여부를 판단하여 용해 후 직접 이식하여 시간과 비용을 획기적으로 절감함과 동시에 수태율 향상과 공태기간을 단축하여 목장의 실질적인 경영측면에 기여할 수 있음
- 직접이식 가능한 수정란동결기술의 개발은 기존 동결정액을 이용한 인공수정에 의한 개량에서 수정란이식에 의한 한우 및 젖소의 개량으로 전환시킬 수 있는 기술임
- OPU유래 수정란생산과 동결수정란기술 접목으로 고능력우의 개량효율을 극대화시켜 FTA 개방화시대에 경쟁력을 확보하여 고부가가치와 지속 가능한 축산업으로 발전시킬 필요성이 강하게 대두됨
- 한국축산업의 경쟁력을 확보하여 축산 강국으로의 발전을 꾀할 필요성 강하게 대두되고 있음

IV. 연구개발 내용 및 범위(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

- Straw 내에 수정란의 동결보존기술 개발
- 동결·용해 수정란의 질적 향상을 위한 최적의 배양조건 확립
- PLL을 이용한 저독성 동결보존액의 개발
- SEM, TEM 전자현미경적 분석에 의한 동결수정란의 질적 수준을 판단하여 최적의 동결보존액 개발
- 자연발정우에 동결수정란을 이용한 직접 이식 가능한 수정란이식으로 개량기술 확립
- 동결보존에 따른 수정란의 유전자발현 차이의 분석에 의한 수정란의 질적 수준 판단기준 정립
- 동결보존에 의한 세포내 소기관 손상 분석을 통한 동결 보존기술의 향상 기준 정립
- 검정 및 평가를 통한 공란우와 대리모의 선발기준 manual 작성
- 동결수정란 생산 시 최적의 교배조합 제시
- OPU 유래 자우의 능력관련 데이터 수집 및 공란우 활용 가능성 검토
- 우량한우의 동결수정란 이식 및 우량한우 밀소의 대규모 집단 구축으로 개량기술의 roll model 제시

V. 연구개발결과(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

- 0.25 ml straw 내벽에 수정란을 부착시켜 최소한의 volume을 생성하는 새로운 개념의 attachment embryo in the straw 방법을 개발
- 동결수정란 생산 시 loading volume 차이에 의한 생존율 및 세포사의 비교 분석
- One-step dilution을 이용한 straw 수정란 동결기술로 현장에 직접 적용 가능한 straw 내 동결기술 개발
- Straw 동결수정란을 이식하기 전 OPU 수정란의 이식 효율을 확인하기 위하여 대리모 50두를 대상으로 신선란 이식을 실시함
- 동결·용해 수정란의 실험에 앞서 수정란에서의 유전자발현을 질적인 평가와 세포소기관(미토콘드리아, 소포체 등)의 비교분석

- 미토콘드리아에만 특이적 형광발현 렌티바이러스를 제작하여 미토콘드리아 형태 분석에 의한 동결융해에 대한 미토콘드리아 손상을 분석
- 3세대 이상의 고등 등록된 우량 암소를 확보하고 공란우 후보들에 대한 혈통 자료를 이용하여 유전능력을 추정 후 유전능력을 바탕으로 개량하고자 하는 형질 선정
- 수란우 관리 농가를 대상으로 수란우 선발기준에 맞는 농가를 선정 및 이식을 실시
- 동결수정란을 현장에서 직접 융해 및 이식하기 위하여 straw 동결방법을 개발
- 동결수정란의 생존율을 향상하기 위하여 PLL을 이용한 수정란 동결기술을 개발
- PLL을 이용한 동결의 효과적인 기술 및 방법을 정립하고 동결효율성을 높이고자 함
- PLL을 이용한 동결방법의 현장적용을 위하여 융해 및 이식 시간을 정립
- 수정란이식의 효율성 및 비교분석을 위하여 신선란, 동결수정란, 동결 staw 직접 이식의 비교분석을 위하여 선별된 대리모에 이식을 실시
- 동결보존액에 따른 동결 수정란의 세포 소기관의 손상정도의 관찰과 관련된 response 조절인자의 발현확인을 통한 수정란 손상 확인
- 신선란과 동결보존·융해 수정란의 세포 소기관(미토콘드리아) 관찰 및 염색을 통한 세포 소기관의 형태학전 변화 확인
- 융해 수정란에서의 형광 발현 및 미토콘드리아의 형태학적인 변화에 따른 dynamic 조절인자의 발현패턴 분석
- 공란우의 수정란 생산 및 후대의 능력을 확인하기 위하여 일반적으로 생산된 자우와의 생시체중을 비교분석
- 생산된 자우가 공란우의 친자인지 검증
- 생산된 자우의 외형적인 모습과 다른 개체와의 체중을 비교분석
- 신선란 및 직접이식 straw 동결수정란을 생산하여 대리모에 이식
- 직접 이식을 위하여 staw 동결수정란의 융해 시 노출시간에 따른 차이를 확인
- 수정란 이식은 10~15분 정도 걸리므로 10, 15분 노출시간에 따른 수태율을 확인
- 2, 3차년도의 straw 동결수정란을 이식한 자료를 토대로 수태율 및 신선란의 결과 비교
- 동결보존액에 따른 동결 수정란의 세포 소기관관련 유전자들의 발현확인
- 동결보존 이후, 신선란과 SCNT의 배아에서 미토콘드리아 dynamics 조절인자의 발현차이 확인
- 토콘드리아 dynamics 조절인자의 발현 및 수정란의 질적 평가와 미토콘드리아 유래 활성산소와의 상관관계 확인
- 자우의 공란우 활용 가능성 검토
- 우량 밀소 집단 구축을 통한 개량효율 극대화

VI. 연구성과 및 성과활용 계획(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

- Straw 내에 수정란의 동결보존기술 개발
- 동결·융해 수정란의 질적 향상을 위한 최적의 배양조건 확립
- PLL을 이용한 저독성 동결보존액의 개발
- SEM, TEM 전자현미경적 분석에 의한 동결수정란의 질적 수준을 판단하여 최적의 동결보

존액 개발

- 자연발정우에 동결수정란을 이용한 직접 이식 가능한 수정란이식으로 개량기술 확립
- 동결보존에 따른 수정란의 유전자발현 차이의 분석에 의한 수정란의 질적 수준 판단기준 정립
- 동결보존에 의한 세포내 소기관 손상 분석을 통한 동결 보존기술의 향상 기준 정립
- 검정 및 평가를 통한 공란우와 대리모의 선발기준 manual 작성
- 동결수정란 생산 시 최적의 교배조합 제시
- OPU 유래 자우의 능력관련 데이터 수집 및 공란우 활용 가능성 검토
- 우량한우의 동결수정란 이식 및 우량한우 밀소의 대량생산으로 대규모 집단 구축으로 개량방법의 roll model 제시

[활용방안]

- 직접 이식 가능한 수정란 동결기술 개발을 통한 산업화로 한우 및 젓소개량에 일대 혁신을 기함
- Straw 내 수정란동결 원천기반기술을 국내특허 등록하여 기본기술 활용과 기술료 확보
- 산업체(GAST)에 기술 이전하여 OPU유래 고능력우 수정란 생산·공급하는 산업화 실시함

[기대성과]

- 암·수의 유전능력을 동시에 활용하는 수정란이식에 의한 개량으로 개량효율의 극대화를 기할 수 있음
- 동결수정란의 직접 이식으로 발정동기화 등의 제반노력과 비용을 절감하여 고능력우 개량 및 산업화 기여
- 동결·융해수정란의 최적화 기술개발은 한우뿐만 아니라 젓소 및 멸종보호동물의 수정란보존방법 제시 가능
- ‘Donor Station’ 도입한 OPU유래 수정란 대량 생산체계를 구축하여 고능력우 수정란생산 및 공급 가능
- 고능력우 사육기반 구축하여 FTA 경쟁력 확보 및 지속 가능한 고부가가치 축산업으로 발전 가능

SUMMARY

(영문요약문)

This study was carried out to apply the direct embryo transfer of OPU derived embryo production and straw cryopreservation that was very similar with artificial insemination (AI) technology. Now domestic Hanwoo industry have increased the crisis by international FTA and also threatened the sustainable livestock (Hanwoo) farming from International open market. And so government and farmer are looking for resolution of this critical obstacle and situation to get the sustainable Hanwoo farming.

So far, AI technology with frozen semen of superior male was used for the genetic improvement, but it needs to long time to do it. To complement of this matter, embryo transfer (ET) technology have been developed by slaughterhouse' s ovaries as well as superovulation embryos. However, both methods have some problems that are inbreeding risk from slaughterhouse ovaries and non-enough embryo production efficiency from superovulation one. However, ovum pick-up (OPU) technology can be produced a lot of transferable embryos by ultrasonograph system that are aspirated immaturated oocytes from live superior cows, and then in vitro fertilized and cultured system. OPU system can be produced higher number of transferable embryo from more selected superior donor cows and so could be got greater competitiveness in Hanwoo (livestock) industry.

Most of ET was used with fresh embryo by synchronization of recipient cows that needed a lot of money and time consume. To overcome this matter, cryopreservation of embryo needed to save time and money as well as adapt of ET technology in Hanwoo' s genetic improvement. When frozen embryo transfer directly can be applied in the field, it can be changed a lot of things that are activity of ET as well as increased genetic improvement. So OPU derived ET technology with straw vitrification for directly transfer are very much effectiveness in the Hanwoo industry and also make a group of superior Hanwoo for very short period, of which should be obtain higher net income. So this study was focused on development of straw vitrification, analysis of gene expression of frozen embryos, analysis of cytoplasmic organelles damage and directly ET technology to apply competitiveness of Hanwoo industry as well as sustainable livestock farming' s development.

Superior donors were selected by 3 generations recording of heredity and economic genetic transformation, and pathogene free as Brucellosis, Johe's, Tuberculosis, Status of antibody of mouth and foot. OPU derived embryo production were carried out 2 times per week by immaturated oocytes OPU session and then developed straw embryo vitrification as well as analysis of gene expression and gene markers from embryos. Comparison of

mitochondria damage from fresh and frozen-thawed embryo were carried out by fluorescence antibody of mitochondria specific to confirm the morphologic analysis of cytoplasmic organelles as well as mitochondria damage from cryopreservation process. Pregnancy after ET obtained 56.3% offspring (31/55 recipients) from fresh embryos in 1st year, 32% offsprings (16/50 recipients) from frozen embryos and 33.3% offspring (3/9 recipients) from straw frozen embryos in 2nd year, and 38.1% offspring (8/21 recipients) from frozen embryos in 3rd year.

The results obtained can be established effectiveness OPU embryo production and transfer system that could be applied in directly ET without any recipient's synchronization, of which should be save the cost and expand ET to produce effectively superior Hanwoo cows.

CONTENTS
(영 문 목 차)

Chapter I - Overview of Research projects	11
Chapter II - Current research activities in domestic or foreign countries	12
Chapter III - Research activities and Result	14
Chapter IV - Achievements and Contribution to related era	56
Chapter V - Research outcomes and applications	62
Chapter VI - Scientific information in the middle of research project	66
Chapter VII - Current state of research facilities and equipments	67
Chapter VIII - Current State of Laboratory Safety Management	68
Chapter IX - References	69

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 및 성과목표	11
제 2 장	국내외 기술개발 현황	12
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	14
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	56
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	62
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	66
제 7 장	연구시설·장비 현황	67
제 8 장	연구실 안전관리 이행실적	68
제 9 장	참고문헌	69

제 1 장 연구개발과제의 개요

1 절. 연구개발의 필요성

전 세계적인 FTA 개방화시대에서 국내 축산업의 위기감은 매우 높아지고 있으며 산업자체의 지속성이 위협받고 있는 실정이다. FTA 개방화시대에 대비하여 관련당국뿐만 아니라 축산농민들도 어떻게 하면 지속 가능한 축산업을 영위할 수 있을 것인가에 대한 많은 고민과 해결책을 찾고 있다.

국내의 한우산업에서 고급육형, 육량의 대형화에 대한 의식변화가 엄청나게 일어나고 있고 궁극적으로 고능력 한우의 개량을 육성해야만 경쟁력을 확보할 수 있다는 것을 이제는 인식하고 있다. 이러한 고능력 한우 개량의 가장효율적인 방법이 수정란이식이라는 것 또한 인식하고 있다. 그러나 현재까지 세계적으로 수정란이식의 산업화에 가장 큰 걸림들은 수태율과 동결수정란의 이식방법의 정립이다. 즉 현재까지 가장 많이 이용되고 있는 신선란의 이식은 많은 한계점을 가지고 있으며 시간적, 공간적 한계점뿐만 아니라 대리모의 발정동기화 등의 과정에 많은 시간과 경제적인 투자가 필요함으로써 궁극적으로 전체적인 비용이 매우 증가한다. 이러한 한계점을 일시에 개선하고 산업화에 기여할 수 있는 기술이 동결수정란의 이식기술 개발이다. 현재 가장 일반적인 개량의 목적으로 활용되고 있는 동결정액의 인공수정과 같이 동결수정란을 자연발정 온 대리모에 직접 용해 후 이식할 수 있는 기술의 정립은 위에서 언급한 한계점을 일시에 극복할 수 있다. 그러나 전 세계적으로 많은 연구자들에 의해 연구되고 있으나 현재까지 그 누구도 현장에서 직접 용해 후 이식하여 수태율을 보장할 수 있는 동결기술을 개발하고 있지 못하다.

국내에서도 많은 단위지자체, 농민 및 정부에서도 이러한 동결기술을 이용한 수정란이식 기술의 개발은 한우의 개량에 절대적인 영향을 미칠 것이라고 판단하고 있다. 본 연구과제에서 이러한 문제점을 해결하고 현장에서 직접 용해 후 이식 가능한 동결방법, 즉 동결정액을 이용하는 것과 같은 방법을 정립하고자 한다. 수정란이식의 산업화를 극대화하기 위해서는 수정란이식의 간편화와 발정동기화를 통한 호르몬 처리 비용 및 공간적, 시간적 제한을 극복하여야 하며 이는 농가의 직접적인 소득 증대와 대량의 우수한 밀소 구축, 호르몬 처리 비용의 절감, 호르몬 처리의 인력 절감 등에서 매우 큰 장점이 있다. 이러한 측면에서 수정란 이식기술을 통한 개량은 축산업 발전을 위해 반드시 해결되어야 할 부분이며, 모든 축산관련업에서 반드시 해결되어야 한다. 또한 지속 가능한 축산업으로 발전시킬 수 있는 직접 이식 가능한 수정란동결기술의 개발의 필요성이 매우 높아지고 있다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1절. 국내기술개발현황

- 초음파유도 난포란 채취를 위한 기본 기술개발: 소의 마취방법과 채란기구의 개발 (1997년)
- 초음파유도에 의한 소 난포란의 채취에 관한 연구: 1. 발정주기, 계절 및 bST 처치 영향에 관하여 조사 (1997년)
- 초음파유도에 의한 소 난포란의 채취에 관한 연구 (1997년)
- 초음파 유도에 의한 소 난포란의 채취에 관한 연구 2. 임신우 유래 난포란으로 부터 산자생 산에 관한 연구 (1998년)
- 한우에서 초음파 및 도축장 유래 난포란을 이용한 체외 수정란 생산에 관한 연구 (1998년)
- 핵이식 기법을 이용한 한우 쌍태생산에 관한 연구: II. Ovum pick-up (OPU) 유래 공여핵 및 활성화 유도 수핵난자의 핵이식 (1998년)
- 핵이식 기법을 이용한 한우 쌍태생산에 관한 연구: I. Ovum pick-up (OPU), 전기적 세포융 합 및 체외배양 기법을 이용한 복제수정란 생산 (1998년)
- 젖소에서 초음파기기를 이용한 난자 채취에 있어서 손가락 축지를 이용한 난포란의 채란 방 법에 관한 연구 (2000년)
- OPU 채란기간이 난자 및 수정란 생산에 미치는 영향에 관한 연구 (2010년)
- 한우에 있어서 초음파기기를 이용한 생체 내 개체별 난자 채취 빈도 및 수정란 생산효율에 관한 연구 (2000년)
- 유전자 분석을 통하여 선발된 한우로부터 초음파 유래 체외수정란 이식에 의한 고품질 한우 생산기술의 실용화 II. DNA 검정우로부터 초음파 유래 체외수정란의 생산에 관한 연구 (2001년)
- 젖소 생체로부터 초음파기기와 간이 난자채취기를 이용한 미성숙 난포란의 채란에 관한 연 구 (2001년)
- 공란우 개체와 채란기간이 Ovum Pick-Up 유래 수정란 생산 효율에 미치는 영향에 관한 연 구 (2010년)
- 초기 임신우의 공란우 활용이 초음파 유도 난자 채취 및 수정란 생산에 미치는 영향에 관한 연구 (2011년)

2절. 국외기술개발현황

- 소 난포 발육과 난자 회복에 있어 반복적인 gonadotropin stimulation과 난포채취의 상관관계 에 관한 연구 (1993년)
- 소 난자로부터 난포와 체외수정란 생산을 위한 Gonadotrophin을 이용한 식이요법 (1994년)
- 일회용 주사바늘을 이용한 초음파유도 체내 소 난포란 채취 방법 개발 (1995년)
- 이탈리아 mediterranean buffalo cow에서 반복적인 OPU에 관한 연구 (1996년)
- 대리모 연령에 따른 난포의 상태 및 체외수정란 생산에 미치는 영향에 대한 보고 (1997년)
- 소의 난구세포-난자 복합체의 형태학적/발달능력에 대한 주사바늘 끝의 비스듬한 각도와 흡 입과정의 영향에 관한 연구 (1997년)

- FSH 처리/ FSH 비처리에 따른 말의 반복적인 transvaginal oocyte aspiration에 관한 연구 (1997)
- 임신한 어린 암소에서 과배란처리가 반복적인 체내유래 난자 회수와 체외수정란 생산에 미치는 영향에 관한 연구 (1997년)
- GnRH 처리 유/무에 따른 난자의 회복에 관한 연구 (1998년)
- 반복적인 체내유래난자의 체란이 소 난자의회복과 난포발달에 미치는 영향에 관한 연구 (1998년)
- 미토콘드리아 분열(fission)을 저해하는 물질인 Mdivi-1을 돼지의 초기배아발달과정에 처리하면 배반포발달율이 감소 (2015)
- 인간의 난자 및 배아를 배양하는 기간에 따라서 전자현미경 TEM을 이용하여 관찰 (2011)
- 배아와 수정란의 품질에 대한 질적 평가의 기준으로써 배아의 발달과정에서 미토콘드리아로부터 생산되는 ATP를 측정하는 방법과 미토콘드리아 DNA의 복제수를 조사하는 방법을 통해서 유추 (2007)
- 마우스 난자를 사용하여 미토콘드리아 융합과 분열을 포함하는 dynamics 메커니즘에 의해 미토콘드리아 형태가 기능에 미치는 영향 (2014)
- 이러한 측면에서 우리의 연구 수행 및 결과는 동결 보존 후 융해되는 수정란의 질적 평가에서 세포소기관 유전자 및 관련 기전(미토콘드리아 dynamic)을 원인으로 하는 수정란의 품질향상 및 평가 기준으로써 정확한 분자생물학적 분석 표지로 충분히 역할을 수행할 것으로 사료된다. 더욱이, 미토콘드리아 dynamics와 수정란의 분열과정에서의 관련성과 미토콘드리아 유래의 활성산소와의 상관관계를 통하여 배아 및 배반포의 품질을 객관적으로 평가하는 기준 및 새로운 원인 메커니즘을 확인하였다. 이러한 품질평가를 기준으로 나누어 동결수정란 및 신선란, 핵치환이후의 발달율에도 적용 가능하다는 결과를 통하여 새로운 극복기전을 통한 해결방안을 제시하였다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 1차년도 연구범위 및 연구수행 방법

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
Straw 내 수정란 동결기술 개발	Attachment embryo in straw의 개발로 direct frozen-thawing system의 구축	<p>-동결용해과정에서 결빙형성에 의한 손상을 최소한으로 줄이기 위해 동결보존액의 용적을 최소한으로 줄임으로서 동결용해 속도를 극대화를 시켜 결빙온도를 무정형상태로 통과시킴으로써 결빙 및 재결빙을 방지할 수 있었음</p> <p>-이를 위해 본 연구팀에서는 0.25 ml straw 내벽에 수정란을 부착시켜 최소한의 volume을 생성하는 새로운 개념의 attachment embryo in the straw 방법을 개발하였음</p>
최적의 volume 비교 분석 및 동결속도 증가를 위한 straw내 loading방법 개발	Conventional straw loading과 attachment에 의한 column, droplet 을 이용한 vitrification을 이용한 volume 비교 분석	<p>-Conventional straw loading, attachment loading, droplet과 같은 다양한 vitrification 방법을 사용하여 최소한의 동결보호제의 첨가를 이용한 동결 보호제의 독성으로부터 보호할 수 있는 loading system을 구축</p> <p>-동결 수정란을 생산 시 불림차이에 의한 생존율 및 세포사의 차이에 대한 분석하였음</p>
직접 이식가능한 수정란 동결 기술 개발	One-step dilution을 이용한 straw 수정란 동결 기술로 field에 적용 가능한 동결 straw 개발	<p>-Straw를 실온에서 5초간 가볍게 shaking한 후 온수에 37℃ 10초간 용해하여 straw 내에 미리 로딩된 0.3 M sucrose media와 수정란을 로딩 시 첨가되어진 vitrification II media가 서로 잘 섞일 수 있도록 2~3번 shaking 하고 5~10분 동안 실온에서 노출 후 수정란의 생존성</p>

		을 검사하였음
OPU 유래 수정란 이식효율을 위한 수정란 이식	Straw 동결수정란을 이식하기 전 OPU 수정란의 이식 효율을 보기위하여 대리모 55두를 대상으로 신선란 이식 실시	-OPU 유래 신선 수정란을 대리모에 이식하여 수태율을 확인하고자 2013.03.22-2013.05.03일까지 총 55두 대한 신선수정란을 실시하였으며 수태율은 54.5% (30두)로 확인되었음
품질에 좋은 것과 나쁜 수정란의 다양한 유전자 발현 비교 분석에 의한 수정란의 질적 평가기술 확립	수정란의 유전자분석에 의한 동결수정란과 일반 수정란의 질적 수준 평가기술 및 방법 확립. 세포의 소기관은 세포가 좋은 상태를 유지하고 적절한 배아발달에 따른 단백질 및 지질을 생산하는 것에 있어서 매우 중요하다. 그래서 본 과제의 동결보존에 따른 유전자 발현 확인 및 세포소기관의 비교분석 단백질 수준에서 확인하기 위한 기술개발이다. 동결*융해 수정란의 실험에 앞서 수정란에서의 유전자발현을 질적인 평가와 세포소기관(미토콘드리아, 소포체 등)의 비교분석함	-수정란의 초기 배아발달과정에서 동결·융해수정란이 일반적인 수정란에서의 유전자 발현 및 표지인자를 찾기 위하여 일반 수정란에서의 품질에 따른 세포소기관의 발현 패턴을 분석하였음 -미토콘드리아 dynamic factor 들의 발현패턴과 단백질 수준에서의 발현분석을 통하여 수정란의 품질평가에 대한 표지인자로서 확인하였음 -초기 배아 발달과정에서의 수정란에 있어서의 품질의 변화를 미토콘드리아 dynamic inhibitor 인 mdivi-1을 이용하여 품질에 따른 평가 인자로서 역할 확인하였음
수정란의 세포소기관의 비교분석기술 확립	신선란과 동결·융해수정란의 세포 소기관의 형태학적 분석을 위한 미토콘드리아에만 특이적 형광발현 렌티바이러스를 제작하여 미토콘드리아 형태 분석에 의한 동결융해에 대한 미토콘드리아 손상을 분석하고자 함	-제작한 렌티바이러스의 발현 및 수정란의 품질변화에 따른 미토콘드리아의 dynamic에 따른 형태학적 변화를 확인하기 위하여 bovine fibroblast에 렌티바이러스 infection하여 stable cell line 구축. 이를 이용한 SCNT를 통하여 수정란의 미토콘드리아의 발현과 bovine fibroblast의 미토콘드리아의 발현분석을 통한 품질 평가확인하였음 -세포소기관인 미토콘드리아의 dysfunction 및 dynamic에 따른 형태학적 변화 (fission과

		fusion) 및 분포도를 확인하기 위한 confocal 이미지데이터 기술 확립하였음
유전/육종가, 선형심사, 후대검정 등에 의한 공란우의 선발 기준 제시(능력평가 및 후대검정)	3계대 이상의 고등 등록된 우량 암소를 확보하고 공란우 후보들에 대한 혈통 자료를 이용하여 유전능력을 추정 후 유전능력을 바탕으로 개량하고자 하는 형질 선정	-공란우를 선정하기 위해서는 먼저 3계대 이상의 고등 등록된 우량 암소를 확보하고 공란우 후보들에 대한 혈통 자료를 이용하여 유전능력을 추정한다. 추정된 유전능력을 바탕으로 개량하고자 하는 형질 선정 및 형질별 가중치(선발지수)를 확정하게 되는데 지수값을 이용하여 순위를 산정하게 된다. 지수값 산정 시 형질들의 표준화 육종가를 이용하여 형질별 가중치는 (2 x 도체중) + (1 x 배최장근단면적) + (-1 x 등지방두께) + (3 x 근내지방도)로 부여하였음 -이러한 과정을 통해 추정된 능력과 후대검정을 통한 평가 및 비교분석의 성적을 토대로 최적화 된 공란우를 선정하게 되며 추정된 능력을 바탕으로 50순위 까지 선정하고 후대축의 성적을 조회하였음
대리모 질병검사, 번식기관 정상성 고려한 선발기준정립	수란우 관리 농가를 대상으로 수란우 선정기준에 적립하여 조건에 맞는 농가를 결정, 이식을 실시	①친자 불일치가 발생하지 않는 농가 ②미경산우 기준 5두 이상의 대상우 보유 농가 ③수정, 분만 신고가 빠르고 정확하며 적극적인 농가 ④개체 이동에 대한 신고가 빠르고 정확한 농가 ⑤자가 인공수정이 가능한 농가 ⑥조합사료 전구간 이용 농가 ⑦첨가제 및 생균제 급여가 가능한 농가 ⑧양질건초 급여 농가 (벚짚 및 곤포는 암모니아와 곱팡이 등으로 난소 및 자궁에 악영향을 미

		칠 수 있음) ⑨신체충실지수(BCS, 1~9)가 4~5 정도로 항상 유지되는 농가 ⑩인공수정 수태율(최초 발정기준)이 70~80% 이상인 농가 ⑪번식위주의 사육농가는 우선 선정하였음
--	--	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------

2. 1차년도 세부연구수행 결과

[제 1세부과제]

○ Straw 내 수정란동결기술 개발

기존의 0.25 ml plastic straw의 column 내에 수정란을 loading하는 방법은 column 내의 보존액의 볼륨이 크기 때문에 동결/용해과정에서 생기는 세포 내/외의 ice-crystal 생성이 크고 ice-crystal에 의한 damage로부터 얻어지는 생존율이 다른 방법 (Dropping, Cryotop, OPS 등)에 비해 낮은 편이다. 기존의 0.25 ml straw를 이용한 동결방법은 vitrification으로 이용하기에는 straw 내경의 용적이 커서 ice-crystal의 데미지를 줄이는 데에는 한계가 있다. 또한 기존의 column loading 방법은 slow freezing 방법으로 이용되며 고가의 동결기가 필요로 하며 0.3~0.8°C/min의 냉각속도로 cooling을 시키므로 시간적인 소모가 많은 편이다. 또한 vitrification방법은 고농도의 동결보호제를 사용하기 때문에 동결보호제의 독성과 높은 삼투압에 노출될 위험이 있으나, 짧은 시간 내에 동결을 하고 간편하게 direct로 액체질소에 침지 가능하므로 쉽고 빠르며 비용적인 측면에서도 slow freezing 방법보다 장점이 있다.

그러나 현장에 적용하기 위해서는 0.25 ml straw에 수정란이 loading 되어져야 수정란이식 시스에 장착이 가능하고 생존율 개선을 위한 vitrification 동결방법을 사용하여야 한다. 본 연구에서는 vitrification에서 최적의 동결보호제 농도와 시간 등을 체크하여 one-step dilution system을 이용한 vitrification 동결방법을 개발하기 위해 straw 내벽에 수정란을 붙이는 attachment embryos loading 방법을 도입하여 vitrification + one-step straw dilution system을 개발하여 우수 종축의 수정란동결 보존기술을 확립하였다.

○ 동결속도 증가를 위한 straw 내 loading 방법 개발 및 최적의 volume 비교 분석

Vitrification 방법은 EDS solution을 사용하여 1~2 µL이하의 소량의 동결보호제를 첨가하는 방식으로 동결에 사용한 동결보호제의 구성은 Holding media (HM): TCM-199 + 20% FBS, Vitrification I: HM + 7.5% DMSO + 7.5% ethylene-glycol Vitrification II: HM + 16.5% DMSO + 16.5% ethylene-glycol을 혼합하여 만들었고 straw의 로딩은 0.3 M sucrose으로 약 7~8 cm의 칼럼을 만들고 vitrification II solution으로 약 0.5 mm의 칼럼을 만들어 sucrose 액과 섞이지 않게 air 칼럼을 사용하였다. 동결방법은 첫 번째로 HM 에서 10분간 incubation하고, 두 번째로 Vitrification I 에서 5분간 평형 후 최종 vitrification II에서 30~60초 사이에 straw 내벽에 수정란과 소량의 미디어를 함께 붙인다. 이 후 Heat sealing하여 액체질소 내에 수직으로 침지하고 straw를 케인에 넣어 -196°C LN₂ 탱크에 보관하였다 (Fig. 1). 본 연구에

사용된 attachment embryos loading (aV) 방법은 다른 방법에 비하여 동결속도를 높여 동결음해 과정에서 발생할 수 있는 damage로부터 보호할 수 있었다. 이방법의 cooling과 warming율은 (-22,800 and -42,000°C/min) column straw dilution과 OPS (cooling rate -4,460 and -16,340°C/min; warming rate, -1,300 and -13,900°C/min) 방법에 비교하여 매우 높게 증가시킬 수 있었다. 그러나 aV loading 방법은 보통 vitrification 시 사용되는 vitrification volume 1~2 µL 보다 훨씬 적은 0.1 µL이하의 극소량의 동결보호제의 첨가로 동결속도를 증가시킬 수 있고 생존율을 향상시킬 수가 있다. Table 1에서 비교군으로 사용한 동결수정란의 conventional column (cV)방법과 droplet (dV) 방법은 동일한 동결보호제를 이용하는 조건으로 loading 방법만 달리하였다. 대조군을 포함한 총 4그룹을 비교 분석한 결과 control, av 그리고 dV그룹은 서로 유의적 차이가 없었으며 (100 vs. 87.7 and 81.8%), cV그룹은 다른 3 그룹에 비하여 유의적인 차이가 낮고 발달율도 낮았다 (26.4 %).

Table 1. Effect of different vitrification methods on the post-thaw survival of blastocysts

Type of loading method	No. of vitrified embryos	No. (%) of embryos recovered	No. (%) of embryos re-expanded
Control	72	-	72 (100) ^a
aV	58	57 (98.3)	50 (87.7) ^a
dV	54	44 (81.5)	36 (81.8) ^a
cV	58	53 (91.4)	14 (26.4) ^b

^{a,b} Values with different superscripts in same column were significantly different ($P < 0.05$). Control, non-vitrified blastocysts; aV, attachment of an embryo in the vitrification straw; dV, droplet vitrification; and cV, column of an embryo in the vitrification straw.

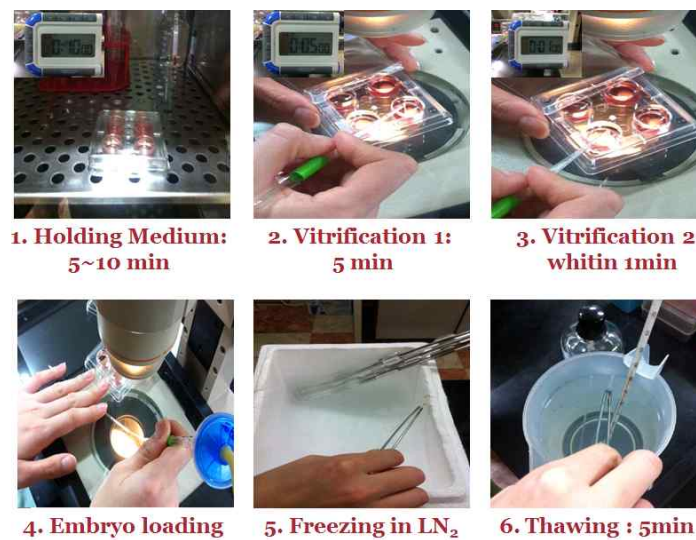


Fig. 1. Methods of an embryo and a column within the vitrification straw.

또한 동결·융해 후 생존한 수정란의 질적평가를 위해 TUNEL staining 방법을 이용하여 각각 4 처리군의 apoptosis와 total cell 수를 체크하여 비교 분석하였다.

Table 2. Effect of different vitrification methods on total and apoptotic cell numbers in post-thaw blastocysts

Type of loading method	No. of embryos counted	No. of nuclei counted (Mean \pm S.E.)*	
		No. of total cells	No. of apoptotic cells
Control	13	134.4 \pm 38.9 ^a	0.4 \pm 1.4 ^a
aV	13	114.0 \pm 48.1 ^a	6.6 \pm 9.5 ^{a,b}
dV	10	105.6 \pm 33.9 ^a	10.9 \pm 9.6 ^b
cV	10	102.0 \pm 35.1 ^a	14.5 \pm 9.5 ^b

^{a,b}Values with different superscripts in same column were significantly different ($P < 0.05$).

*All embryos were stained with TUNEL staining at 24 h post-thaw.

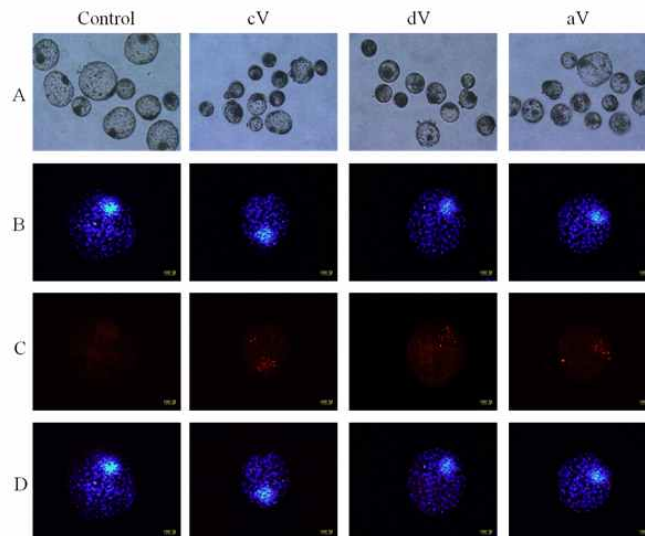


Fig. 2. Representative images of TUNEL-stained blastocysts. Shown are control blastocysts (A), Hoechst 33342-stained cells (B), apoptotic cells (C), and corresponding merged images (200 X).

Total cell 수는 4 처리군이 모두 동일하였으나 세포사가 일어난 cell의 수는 aV, dV 그리고 cv 처리군에서 서로 유의적으로 동일하였고 (6.6 \pm 9.5 vs. 10.9 \pm 9.6 and 14.5 \pm 9.5), control, aV 처리군에서 동일하였다 (0.4 \pm 1.4 vs. 6.6 \pm 9.5). 결과적으로 control과 aV 처리군이 다른 처리군과 비교해 세포사멸이 적게 일어났음을 확인할 수가 있었다.

한편 수정란을 둘러싸고 있는 volume이 크면 클수록 ice-crystal에 의한 damage가 크기 때문에 이러한 이유로 동결 시 동반되는 동결 매디아의 volume 자체를 줄이고자 하는 노력이 필요하다. 본 연구에서는 straw를 이용하여 수정란을 attachment하여 동결 시 동결매디아의 볼륨이 최소한으로 사용될 수 있도록 볼륨의 양을 최소한으로 줄여 데미지를 줄이고자 하였다. 또한 attachment loading 방법을 이용하기 전 동결 할 수정란에 미리 puncture를 하여

수정란의 수분을 줄인 후 동결하는 방법으로 ice crystal으로 부터의 damage를 최소화 하였다 (Table 2).

Table 3. Effect of blastocoele puncture on post-thaw survival and hatching competence

Type of puncture	No. of vitrified embryos	No. (%) of blastocysts developed to	
		Re-expansion at 12 h	Hatching at 24 h
Control	30	28 ± 3.2 (93.3)	21 ± 2.0 (75.0) ^a
Puncture aV	27	23 ± 2.0 (85.2)	17 ± 2.6 (62.9) ^a
Non-puncture aV	35	29 ± 8.5 (82.8)	13 ± 2.8 (37.1) ^b

그러나 Puncture를 aV그룹과 Non-puncture 그룹의 수정란은 control 그룹과 비교하였을 때 각각 re-expansion과 Hatching에서 차이가 없었다.

Table 4. Effect of blastocoel puncture on total and apoptotic cell numbers in post-thaw blastocysts

Type of puncture	No. of embryos counted	No. of nuclei counted (Mean ± S.E.)*	
		No. of total cells	No. of apoptotic cells
Control	10	143.7 ± 37.2 ^a	5.9 ± 5.8 ^a
Puncture aV	10	119.4 ± 19.7 ^a	6.3 ± 4.4 ^a
Non-puncture aV	10	94.5 ± 18.6 ^b	5.3 ± 6.1 ^a

^{a,b} Values with different superscripts in same column were significantly different ($P < 0.05$).

*All embryos were stained with TUNEL staining at 24 h post-thaw.

Puncture 유무에 따른 수정란 세포사에 대한 비교는 TUNEL staining으로 알아본 결과 control 그룹과 puncture aV는 (143.7 ± 37.2 vs. 119.4 ± 19.7) 서로 차이가 없었으나, non-puncture aV (94.5 ± 18.6)와 이 2그룹을 비교하였을 때 유의적으로 높았다. 그러나 세포사멸은 3그룹 모두 유의적인 차이가 없었다(5.9 ± 5.8 vs. 6.3 ± 4.4 and 5.3 ± 6.1).

결론적으로 Table 2에서 소 배반포의 total cell과 apoptotic cell에서 표준편차의 비율이 컸으나 이는 배반포 내 수분을 puncture를 통하여 인위적 제거하여 극복이 되었으며 (Table 4), 수정란의 질적 선별과 형태 등을 고려하여 실험에 사용한다면 보다 평균적인 데이터를 얻을 수 있을 것이다.

○ 직접 이식가능한 수정란 동결기술 개발

직접 이식이 가능한 one-step dilution system은 소를 발정동기화 시키지 않고도 자연발정이 올 때마다 필요시에 수시로 꺼내어 동결정액과 같은 방법으로 용해 후 곧바로 이용이 가능하기 때문에 산업에 적용하기에는 매우 유리한 방법이다. 현장에 곧바로 적용하기 위해서

는 frozen과 thawing 단계가 one-step에서 이루어져야 한다. Straw를 변형시킨 다른 vitrification 방법과 달리 straw 본연의 형태를 그대로 사용하였고 sucrose 용해 매디아를 이용하여 삼투압에 의한 동해방지를 위해 사전에 0.3 M sucrose를 loading하고 동결수정란을 attach하여 용해 시 shaking으로 서로 잘 섞일 수 있도록 하였다. 그다음 5~10분 이상 노출시켜 수정란이 동결보호제의 독성에서 안전한지 체크하여 최소한의 노출시간을 확립할 예정이다. One-step dilution 기술은 특수 우수 축종의 종축 보존과 다량으로 생산된 수정란을 동결하여 장기보존하기 위한 cryopreservation에서 핵심적인 역할을 할 것이라 사료된다.

○ OPU 유래 신선수정란의 이식 및 수태율 조사

OPU유래 신선수정란 이식에 의한 수태율 조사를 위하여 농가의 한우 대리모에 이식을 실시하였다. 2013년 3월 22일부터 2013년 5월 3일까지 총 55개의 수정란을 수란우에 이식을 실시하였으며 수태율 조사를 위한 임신감정은 이식 후 90일 경에 실시할 예정이다. 임신감정은 수정란 이식을 한 시술자가 직접 실시할 예정이며, 또한 수태율 향상을 위해 이식 전 2~3개월부터 수란우에 사료첨가제를 급여하였다.

수정란 이식 및 감정 결과는 다음과 같다.

Table 5. Summary of embryo transfer and pregnancy

No. of farms	No. of recipients transferred	No. of recipients pregnant (%)
15	55	30 (54.5)

OPU유래 수정란이식은 진주축협에서 수란우 관리 및 농가 선정기준의 매뉴얼에 따라 이식농가를 선정하였고, 발정동기화는 GnRH제제의 고나돈, PGF₂α 제제의 루테라이즈를 이용하여 수란우의 발정을 유도하였고, 이식 이전에 수란우 생식기관의 기능 상태를 점검하여 수정란을 이식하였다. 임신감정은 이식 후 3개월이 지난 시기인 6월부터 실시하였으며 30두 (54.5%)에서 수를 확인하였다.

[제1협동과제]

1. IVF 배아발달과정에서의 미토콘드리아 dynamic에 관련된 factor들의 발현확인

-동결 용해 수정란에서의 실험을 수행하기 이전에 돼지의 체외수정 초기배아를 통하여 다양한 미토콘드리아 dynamic에 관련된 factor들의 발현을 품질에 따라 변화를 확인하고자 한다. 품질에 따른 신선란에서의 변화에 이러한 세포 소기관이 미치는 영향을 알아보기 위하여 우리는 수정란의 발달에 중요한 소기관인 미토콘드리아와 관련된 유전자들의 발현을 단백질 수준에서 확인하였다.

Western blotting을 통한 protein level에서의 발현을 확인하기 위해 필요한 살아있는 수정란과 oocyte 개수를 확인하였다. 이를 통하여 돼지는 30개의 oocyte 즉, 1개의 1-cell 상태와 oocyte (M2) 상태의 30개에서 충분히 Drp-1의 protein 발현을 확인하였다. 그러나 소의 경

우는 50개 정도의 난자에서 겨우 detection되는 밴드를 확인하였다. 동결융해 수정란과 신선란의 경우 소동물 모델을 이용하기 때문에 적어도 품질비교를 위한 단백질 수준에서의 확인을 하기 위해서는 최소 50개의 난자가 필요하다는 것을 확인하였다. Fig. 1을 통하여 우선 돼지 난자와 수정란을 이용한 사전실험을 통하여 정확한 western 방법을 확립하였다.

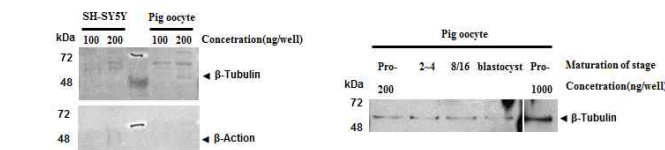


Figure. Expression of pS637Drp-1 during pig oocyte maturation. Immunodetection of beta-tubulin protein. Each lane corresponds to 30 oocytes. The 70 kDa form was detected. Lane 1, pronucleus stage; lane 2, 4-cell stage; lane 3, 8/16-cell stage; and lane 4, blastocyst stage. During oocyte maturation beta-tubulin protein was detected at 55 kDa.

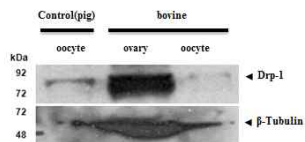


Figure 1. Expression of Drp-1 from bovine oocyte maturation

Immunodetection of Drp-1 and beta-tubulin protein. Each
 1. control lane : porcine oocyte 330 ng/well
 2. lane : bovine ovary tissue 20 ug/well
 3. lane : bovine oocyte 507H/well

During bovine oocyte maturation Drp-1 protein was detected at 75 kDa.

Fig. 1. Pig와 bovine의 oocyte (M2 phase)에서 house keeping gene과 Drp-1 유전자의 protein level에서의 발현확인.

세포의 proliferation에서 mitochondria의 fission관련된 pDrp-1 616의 단백질 수준에서의 변화는 좋은(good quality) 품질의 수정란에서는 증가하지만, 품질이 좋지 않은 (poor quality) 수정란의 배아 발달과정에서는 정반대로 감소하는 결과를 확인하였다(Fig. 2). 세포 소기관에 관련된 유전자의 발현분석과 단백질 수준에서의 인산화에 따른 발현의 차이가 동결 융해 수정란에서의 평가기준으로서 사용되기 위한 marker로 개발할 예정이다.

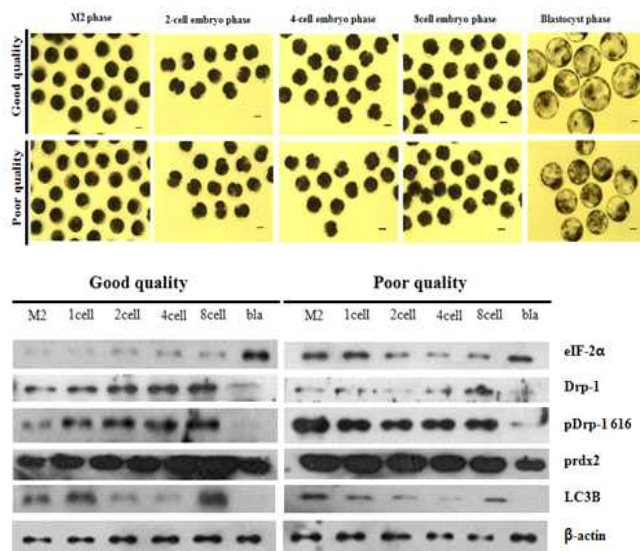


Fig. 2. 체외 수정란의 초기 배아 발달과정에서의 품질에 따른 세포 유전자의 발현 패턴을 western blotting을 통한 protein level 확인.

품질에 따른 유전자의 발현패턴이 정확하게 상반되는 것은 미토콘드리아 dynamic factor 인 Drp-1과 pDrp-1616 뿐만 아니라 autophage에 관련된 인자인 LC3B에서도 품질에 따른 유전자의 발현패턴이 상반되는 것을 확인하였다 (Fig. 2). 이를 통하여 미토콘드리아의 dynamics관련 인자들이 품질에 따른 수정란에서의 발현 차이를 확인하였고 이를 통하여 동결 용해 수정란과 신선란의 품질에 차이를 확인할 수 있는 방법으로서 가능성을 확인하였다.

소포체의 세포 보호기작으로 알려진 UPR signaling의 pathway 중 하나인 eIF-2a는 좋음 품질의 수정란의 배아 발달과정에서는 증가하지만 품질이 좋지 않은 수정란에서는 급격히 감소하는 상반되는 패턴을 확인하였다 (Fig. 2).

2. 세포 소기관인 미토콘드리아 형태학적 비교분석을 위한 미토콘드리아 특이적 발현 렌티바이러스 확립

지금까지 기존의 동결·용해수정란의 손상평가는 단순히 몇 개의 유전자의 mRNA 수준에서의 분석으로 이루어져왔다. 수정란의 질적 평가 기준을 세포소기관과 관련된 신호전달로 확인하는 기술 확립을 위해 세포소기관 중에서도 mitochondria 손상으로 인한 분열 상황을 확인이 필요로 하다는 판단으로 미토콘드리아 dynamics 관찰을 하고 지속적인 레드 형광 발현을 위하여 genome에 삽입이 되는 V5 tagging이 렌티바이러스 벡터를 제작하였다.

우선적으로 동결용해수정란에 바이러스를 확인하기 이전에 세포 수준에서 우리가 제작한 바이러스의 미토콘드리아 특이적 형광발현이 되는지를 확인하였다. 그 결과, 제작한 렌티바이러스를 이용하여 fibroblast에서 안정적으로 미토콘드리아에서 형광레드를 발현하는 세포주를 확립하였다.

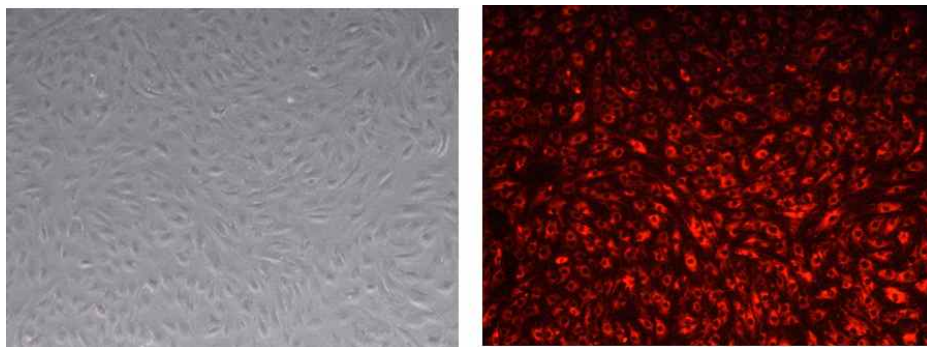
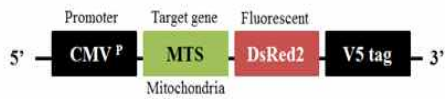


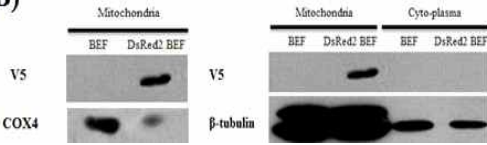
Fig. 3. Mito-DsRed2 렌티바이러스를 이용하여 stable mito-DsRed2 bovine fibroblast 확립.

Fig. 3에서 미토콘드리아에 특이적으로 형광발현이 되는 DsRed2를 삽입한 렌티바이러스를 bovine fibroblast에 infection하였다. fibroblast에 infection 되어 미토콘드리아에 형광이 발현되는 세포들만 blastocidine을 사용하여 selection하여 stable mito-DsRed2 세포주를 확립하였다. 한 편 정확히 미토콘드리아에서 레드형광단백질이 발현하는 것을 확인을 위하여 Fig. 4의 결과와 같이 미토콘드리아 마커인 mitotracker를 이용하여 제작한 렌티바이러스 mito-DsRed2 발현과 정확히 일치하는지를 확인하였다.

(A) Mitochondria targeting vector : mito-DsRed2



(B)



(C)

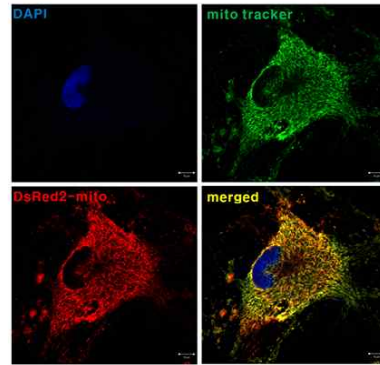


Fig. 4. 마이토콘드리아 마커인 mitotracker를 이용하여 제작한 렌티바이러스 mito-DsRed2 발현 일치하는지를 확인을 western blotting과 형광현미경으로 확인.

Fig. 4의 western data를 통하여 우리가 제작한 렌티바이러스는 마이코콘드리아에 특이적으로 발현한다는 것을 확인할 수 있었고, 이 때, 세포질에 대한 control (beta-tubulin)과 미토콘드리아에 대한 control (COX4)을 이용하여 확인하였고, 렌티바이러스에 tagging되어진 V5는 마이토콘드리아에서 만 특이적으로 발현된다는 것으로 본 연구의 목표인 세포소기관 중에 미토콘드리아 형태학적 손상을 관찰을 할 수가 있는 방법을 확립하였다.

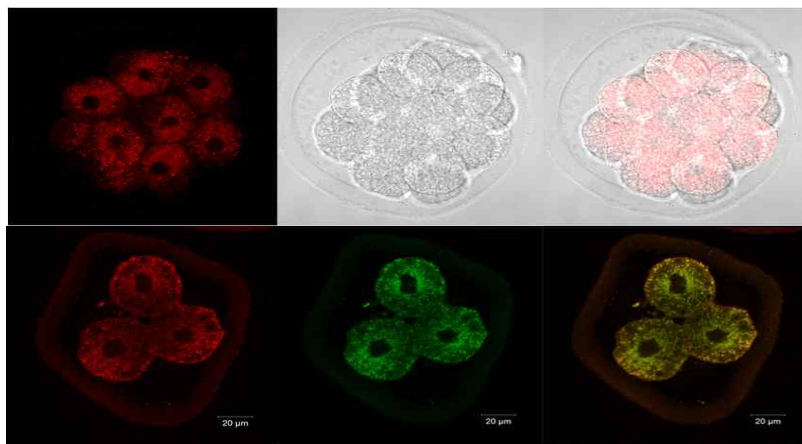


Fig. 5. Mito-DsRed2 stable bovine fibroblast 이용한 소 SCNT수정란 제작 후 2-/8-cell stage 에서 미토콘드리아의 레드 형광발현확인하고 형태적 변화 확인이 가능.

확립한 stable mito-DsRed2 세포주를 통하여 배아발달과정에서 미토콘드리아의 분포도와 형태학적변화를 확인하기 위해 mito-DsRed2 stable bovine fibroblast를 이용한 소의 SCNT 수정란 제작을 통하여 2cell/8cell stage에서 미토콘드리아의 레드 형광발현확인하고 형태적변화 확인이 가능하여, 배아의 동결 용해에 따른 손상평가 기술개발을 위한 사전 실험을 bovine SCNT를 통하여 확인하고자 하였다 (Fig. 5).

특히 배아 발달과정 중에 소의 genome activation stage인 8cell stage에서는 핵주변에 미토콘드리아가 밀집되어있는 양상을 보였다. 이를 통하여 미토콘드리아의 dynamic가 배아발달 과정에서 일어난다는 것을 이미지 데이터와 렌티바이러스의 형광발현을 통하여 확인 되었다 (Fig. 5).

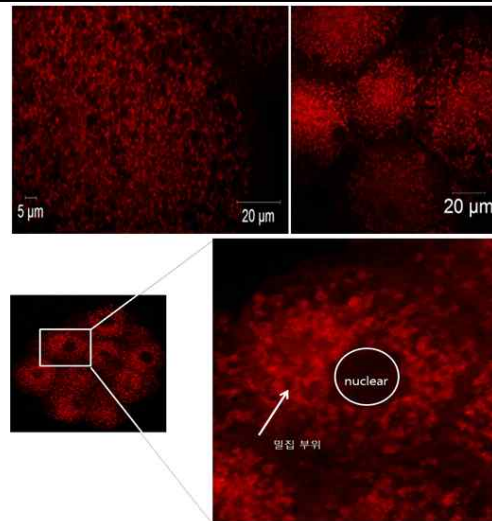


Fig. 6. Mito-DsRed2 SCNT 수정란 제작 후 미토콘드리아의 형태적 변화 확인이 가능.

렌티바이러스를 이용한 형광발현은 기존의 mitotracker와 같은 화학적 처리보다 발현의 세기가 강하고 명확히 보일 뿐만 아니라 세포고정을 위한 고정액에 대한 autofluorescence의 문제점이 없는 장점이 있다. 사진에서 보인 미토콘드리아의 형태학적 분포도와 변화가 더욱 선명하게 관찰되었다. mitochondria dynamic response는 fission과 fusion을 통하여 세포내 균형을 유지한다고 알려져 있다. Fig. 6에서 보이는 것처럼 mitochondria dynamic response에서 fission과 fusion에 따른 형태학적 변화가 관찰된다. 미토콘드리아가 점의 모양으로 짧은 길이로 존재하는 것을 확인하였다.

3. 동결·용해 수정란에서의 미토콘드리아 분포 및 형태학적 변화 확인

동결·용해 수정란에서 미토콘드리아의 분포도를 확인하기 위하여 mitotracker를 사용하여 확인하였다. 이를 통하여 동결 용해 수정란의 배반포에서 분포도를 확인하였다 (Fig. 7). 그러나, 예상과는 달리 동결 용해 후에 정확한 미토콘드리아의 분포 및 손상 정도를 알기 힘들어 동결 고정 및 다양한 연구 방법이 필요하다.

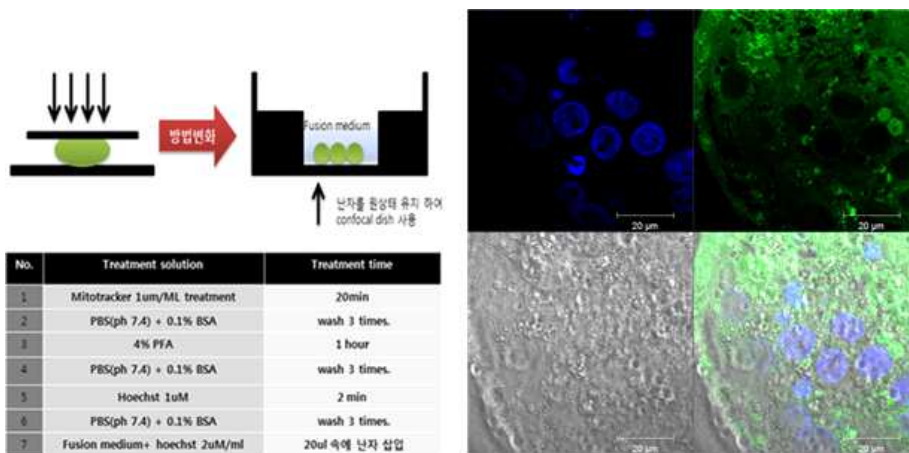


Fig. 7. 동결/용해수정란에서 mitotracker 이용하여 공초점주사전자현미경 confocal로 촬영.

일반적인 세포에서의 세포 염색을 통한 세포를 관찰하기 위한 방법으로는 동결 용해수정란과 같은 수정란에서의 발현이 확인되기 어려웠다. 그래서 우리는 cover glass를 덮지 않고 medium을 이용하여 수정란의 모양을 최대한 유지하여 confocal 이미지 데이터를 구축하고자 방법을 확인했다. 전체적인 수정란의 모양을 유지하면서 확인하였을 때, 보다 수정란의 세포 염색이 깨끗하게 보이는 것을 확인하였다. 이때도 역시 mitotracker를 이용한 화학적 염색 방법은 흐릿하게만 보이고 명확히 보이지 않았다.

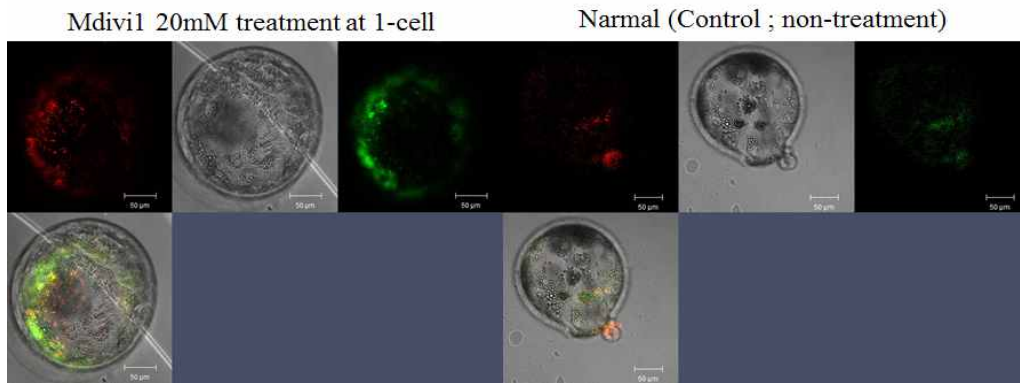


Fig. 8. Mdivil treatment에 따른 돼지의 수정란에서의 품질 비교.

한편 다른 대동물인 돼지 수정란의 배반포 단계에서 살아있는 수정란으로부터 JC-1을 통하여 미토콘드리아 손상여부를 확인하였다. control에서 보다 마이토콘드리아 fission 저해제 mdivi-1을 처리하였을 때 배반포 단계에서의 미토콘드리아의 손상이 더 많은 것을 확인할 수 있다. 이를 통하여 동결용해수정란의 미토콘드리아 손상여부를 신선란과 비교 할 수 있는 방법으로 확인 가능하며, 배반포 단계에서는 미토콘드리아 fission과 같은 현상이 필요한 것으로 판단된다.

위 방법을 통하여 우리는 수정란의 전체적인 모양을 유지된 상태에서의 세포소기관의 형태학적 비교와 분포도를 확인 하였다. 이러한 방법을 통하여 동결용해수정란과 신선란 그리고 동결액에 따른 돼지 수정란에서의 JC-1과 같은 미토콘드리아의 손상여부와 품질에 따른 미토콘드리아를 분석하는 이미지를 구축할 수 있는 방법으로 이용할 계획이다.

[제2협동과제]

1) 공란우 선정 기준

공란우를 선정하기 위해서는 먼저 3계대 이상의 고등 등록된 우량 암소를 확보하고 공란우 후보들에 대한 혈통자료를 이용하여 유전능력을 추정한다. 추정된 유전능력을 바탕으로 개량하고자 하는 형질 선정 및 형질별 가중치(선발지수)를 확정하게 되는데 지수값을 이용하여 순위를 산정하게 된다. 지수값 산정시 형질들의 표준화 육종가를 이용하며 형질별 가중치는 (2 x 도체중) + (1 x 배최장근단면적) + (-1 x 등지방두께) + (3 x 근내지방도)로 부여한다. 이러한 과정을 통해 추정된 능력과 후대검정을 통한 평가 및 비교분석의 성적을 토대로 최적화 된 공란우를 선정하게 되며 추정된 능력을 바탕으로 50순위까지 선정하고 후대축의 성적

을 조회한다. 최종 선정된 공란우는 축산진흥연구소에 Brucellosis, Johes, tuberculosis, 구제역 항체형성여부 등 질병검사를 의뢰하여 음성판정을 받은 개체만을 공란우로 선발하여 활용하였다.

< 1. 혈통자료 확인 및 순위 선정 >

최초순번	농가명 (육장명)	육장주소	귀표번호	머리귀표번호	생년월일	월령	계대	종모우	외조부KPN	외증조부KPN	순위
176	구**(구**)	경남 진주시 사봉면 봉곡리 786번지	KOR-002-007457158	KOR-000-186885255	2008-03-22	51	3	KPN538	KPN493	KPN179	1
163	손**(손**)	경남 진주시 일반성면 운천리135	KOR-002-020095697	KOR-000-182420641	2008-03-22	51	5	KPN505	KPN588	KPN263	2
175	조**(조**)	경남 진주시 미천면 벌당리 벌당리413-1	KOR-000-199774812	KOR-000-179938302	2007-04-26	62	3	KPN538	KPN452	KPN136	3
174	구**(구**)	경남 진주시 사봉면 봉곡리 786번지	KOR-002-007457140	KOR-000-195176764	2008-03-21	51	3	KPN538	KPN387	KPN338	4
171	구**(구**)	경남 진주시 사봉면 봉곡리 786번지	KOR-002-007450658	KOR-000-182394584	2008-03-30	51	3	KPN538	KPN263	KPN141	5
161	김**(김**)	경남 진주시 일반성면 개암리 103	KOR-002-020070125	KOR-000-173270569	2008-01-30	53	3	KPN505	KPN305	KPN310	6
162	유**(유**)	경남 진주시 금곡면 덕거리161-2	KOR-002-026312101	KOR-000-199477140	2008-04-01	51	3	KPN505	KPN460	KPN354	7
80	이**(이**)	경남 진주시 이반성면 길성리 510	KOR-000-192415040	KOR-000-177531901	2006-04-26	74	3	KPN452	KPN279	KPN222	8
136	김**(김**)	경남 진주시 일반성면 개암36	KOR-000-199748912	KOR-000-186888706	2007-01-13	66	3	KPN494	KPN263	KPN334	9
79	강**(강**)	경남 진주시 금곡면 정자리 992-1	KOR-000-196086659	KOR-000-165077725	2005-11-20	79	3	KPN452	KPN263	KPN009	10
172	강**(강**)	경남 진주시 미천면 반지리 향양리414	KOR-002-003526000	KOR-000-167875527	2007-02-28	64	3	KPN538	KPN267	KPN201	11
190	김**(김**)	경남 진주시 일반성면 개암36	KOR-002-007450424	KOR-000-186888706	2008-01-01	54	3	KPN572	KPN263	KPN334	12
189	이**(이**)	경남 진주시 대곡면 덕곡 오곡287-5번지	KOR-002-003543883	KOR-000-182397455	2007-10-04	57	5	KPN572	KPN263	KPN279	13
173	최**(최**)	경남 진주시 이반성면 수성리626	KOR-000-199774829	KOR-000-183937827	2007-04-29	62	3	KPN538	KPN364	KPN102	14
82	문**(문**)	경남 진주시 이반성면 가산리 가산리733	KOR-000-195135990	KOR-000-176124975	2005-07-23	83	5	KPN452	KPN336	KPN200	15
124	김**(김**)	경남 진주시 일반성면 개암36	KOR-002-003529750	KOR-000-183940087	2007-07-30	59	3	KPN493	KPN387	KPN310	15
89	서**(서**)	경남 진주시 금곡면 죽곡리 장재 865번지	KOR-002-003754299	KOR-000-173998470	2007-01-10	66	3	KPN460	KPN334	KPN243	17
121	정**(정**)	경남 진주시 이반성면 밭산리707	KOR-002-007457254	KOR-000-182396328	2008-01-28	53	5	KPN493	KPN310	KPN205	18

< 2. 후대검정 평가 및 비교분석을 통한 순위 선정 >

최초순번	입소개체번호	농장 안소 혈통입력			혈통을 통한 안소의 능력(EBV) 추정치					SI	RANK	후대도축성적							
		아버지	외조부	외증조부	12M-W	CW	EMA	BF	MS			후대1 성별 등급	후대2 성별 등급	후대3 성별 등급	후대3 등급				
176	KOR-002-007457158	KPN538	KPN493	KPN179	10.98	16.2	5.3	0.61	1.43	9.2	1	수	수	수	수	경남 진주시			
163	KOR-002-020095697	KPN505	KPN588	KPN263	14.72	4.79	2.93	-0.99	1.53	9.03	2	암	암	암	암	경남 진주시			
175	KOR-000-199774812	KPN538	KPN452	KPN136	16.1	17.85	5.24	0.44	1.35	9.02	3	암	수	암	암	경남 진주시 미			
174	KOR-002-007457140	KPN538	KPN387	KPN338	13.63	15.53	4.56	0.32	1.39	8.86	4	암	암	암	암	경남 진주시			
171	KOR-002-007450658	KPN538	KPN263	KPN141	13.17	18.53	5.59	-0.21	1.19	8.79	5	암	암	암	암	경남 진주시			
161	KOR-002-020070125	KPN505	KPN305	KPN310	8.09	4.87	2.32	-0.68	1.48	8.32	6	암	수	수	수	경남 진주시			
162	KOR-002-026312101	KPN505	KPN460	KPN354	16.92	10.69	3.14	-1.09	1.21	8.01	7	수	1	수	수	경남 진주시			
80	KOR-000-192415040	KPN452	KPN279	KPN222	7.6	10.12	4.41	-0.31	1.14	7.35	8	암	2	수	1+	경남 진주시			
136	KOR-000-199748912	KPN494	KPN263	KPN334	7.52	10.73	4.48	-1.1	1.02	7.31	9	암	암	암	암	경남 진주			
79	KOR-000-196086659	KPN452	KPN263	KPN009	9.07	9.23	4.75	-0.74	1.04	7.01	10	암	2	수	1++	경남 진주시			
172	KOR-002-003526000	KPN538	KPN267	KPN201	12.4	17.21	5.2	0.25	0.98	7	11	암	암	수	수	경남 진주시 미			
190	KOR-002-007450424	KPN572	KPN263	KPN334	5.97	0.7	3.43	-2.25	0.98	6.56	12	암	암	암	암	경남 진주			
189	KOR-002-003543883	KPN572	KPN263	KPN279	6.79	1.77	3.9	-2.2	0.93	6.5	13	암	수	암	암	경남 진주시 대			
173	KOR-000-199774829	KPN538	KPN364	KPN102	7.68	14.11	3.1	0.65	1.1	6.46	14	암	암	수	수	경남 진주시			
82	KOR-000-195135990	KPN452	KPN336	KPN200	8.95	5.32	4.81	-0.74	0.98	6.41	15	암	수	1+	수	3	경남 진주시 이		
124	KOR-002-003529750	KPN493	KPN387	KPN310	1.27	2	2.13	-0.92	1.17	6.41	15	암	암	암	암	경남 진주			
89	KOR-002-003754299	KPN460	KPN334	KPN243	12.38	16.95	3.31	-0.75	0.82	6.25	17	수	1+	암	수	경남 진주시 금			
121	KOR-002-007457254	KPN493	KPN310	KPN205	3.2	4.16	1.49	-0.71	1.16	6.2	18	수	1++	수	수	경남 진주시			
134	KOR-002-003528933	KPN494	KPN263	KPN205	8.76	11.52	4.39	-0.93	0.84	6.2	18	수	1+	수	수	경남 진주시			
46	KOR-000-195179178	KPN387	KPN334	KPN244	-2.22	-1.43	1.71	-1.43	1.14	6.17	20	암	1+	수	암	경남 진주시			
54	KOR-002-003539983	KPN413	KPN263	KPN338	17.55	13.6	1.86	-0.26	1.02	6.14	21	암	수	수	암	경남 진주			
146	KOR-002-003522935	KPN494	KPN387	KPN263	7.38	7.42	4.38	-1.01	0.88	6.12	22	수	1+	수	암	경남 진주시 사			
147	KOR-002-003523374	KPN494	KPN387	KPN263	7.38	7.42	4.38	-1.01	0.88	6.12	22	암	암	암	암	경남 진주			
238	KOR-002-003641215	KPN676	KPN387	KPN387	9.96	12.59	5.38	-0.92	0.74	6.11	24	수	1++	암	암	경남 진주시 이			
19	KOR-000-182394393	KPN263	KPN481	KPN209	0.34	1.54	2.25	-1.52	1.03	6.1	25	암	수	1	수	1+	1+	경남 진주	
123	KOR-002-003529784	KPN493	KPN387	KPN179	-1.59	2.06	2.97	-0.54	1.1	6.05	26	암	수	수	수	경남 진주			
30	KOR-000-182144967	KPN338	KPN338	KPN179	10.04	13.22	1.96	1.42	1.21	6.04	27	수	수	수	암	2	1	경남 진주시	
133	KOR-002-007452016	KPN494	KPN263	KPN201	8.57	8.83	4.24	-0.95	0.85	5.99	28	수	수	수	수	경남 진주			
195	KOR-002-019999641	KPN572	KPN334	KPN244	7.03	-0.74	2.34	-1.91	1	5.97	29	수	암	수	수	경남 진주시 준			
65	KOR-002-003530172	KPN431	KPN452	KPN336	8.47	6.33	3.44	-0.64	0.96	5.85	30	암	1	수	수	수	경남 진주시 이		
18	KOR-000-186888621	KPN263	KPN338	KPN198	1.07	8.64	2.61	-0.79	0.93	5.84	31	수	1+	수	1+	수	2	1+	경남 진주시

< 3. 선발 지수를 이용한 순위 선정 >

번호	암소개체번호	농장 암소 혈통입력			혈통을 통한 암소의 능력(EBV) 추정치					혈통을 통한 암소의 능력 표준화 육종가					선발지수	순위
		아비KPN	외조부KPN	외증조부KPN	성장형질		도체형질			성장형질		도체형질				
					12개월 체중	도체중	등심단면적	등지방두께	근내지방도	12개월 체중	도체중	등심단면적	등지방두께	근내지방도		
1	KOR-002-007457158	KPN538	KPN493	KPN179	10.98	16.2	5.3	0.61	1.43	0.78	1.34	1.35	0.41	1.73	9.2	1
2	KOR-002-020095697	KPN505	KPN588	KPN263	14.72	4.79	2.93	-0.99	1.53	1.26	0.19	0.61	-0.75	1.87	9.03	2
3	KOR-000-199774812	KPN538	KPN452	KPN136	16.1	17.85	5.24	0.44	1.35	1.44	1.5	1.33	0.29	1.62	9.02	3
4	KOR-002-007457140	KPN538	KPN387	KPN338	13.63	15.53	4.56	0.32	1.39	1.12	1.27	1.11	0.2	1.67	8.86	4
5	KOR-002-007450658	KPN538	KPN263	KPN141	13.17	18.53	5.59	-0.21	1.19	1.06	1.57	1.44	-0.18	1.4	8.79	5
6	KOR-002-020070125	KPN505	KPN305	KPN310	8.09	4.87	2.32	-0.68	1.48	0.41	0.21	0.42	-0.53	1.79	8.32	6
7	KOR-002-026312101	KPN505	KPN460	KPN354	16.92	10.69	3.14	-1.09	1.21	1.54	0.78	0.68	-0.83	1.43	8.01	7
8	KOR-000-192415040	KPN452	KPN279	KPN222	7.6	10.12	4.41	-0.31	1.14	0.35	0.73	1.06	-0.24	1.33	7.35	8
9	KOR-000-199748912	KPN494	KPN263	KPN334	7.52	10.73	4.48	-1.1	1.02	0.33	0.8	1.09	-0.82	1.15	7.31	9
10	KOR-000-196086659	KPN452	KPN263	KPN009	9.07	9.23	4.75	-0.74	1.04	0.53	0.65	1.17	-0.55	1.16	7.01	10

< 4. 순위에 의해 선정된 공란우 확인 >



< 5. 수정란이식 전 농가 상담 >



< 6. 수정란이식 실시 >



< 7. 수정란이식 후 관계 기관 업무 협의 >



< 8. 수정란이식 후 주의사항 농가 설명 >



2) 수정란 생산에 사용되는 정액 선정

수정란 생산에 사용된 정액은 한우개량사업소 정액을 사용하였다. 정액의 선정방법은 씨수소의 냉도체중, 배최장근 단면적, 등지방 두께, 근내지방도를 조사하여 후보군을 선정 한 다음 사전 실험을 통하여 수정란 생산에 문제가 없는 후보군 5개체를 선정하였다. 선정된 정액은 모든 씨수소와 체외수정에 사용하고자 하는 공란우간의 혈연계수가 0.03%이상의 개체는 제외하였고, 공란우를 한우교배계획 프로그램을 이용하여 개량하고자 하는 방향의 도체중, 등심단면적, 등지방두께, 근내지방을 자손의 능력 예측치를 설정하여 개량방향과 일치하는 가장 높은 점수를 받은 정액(KPN 768)을 최종 선정하였다.



KPN 768
본문내용 인쇄

생산지	강원종전			
생년월일	2006-02-19			
등록번호	223238314			
별동	부	KPN387	조부	KPN123
			조모	221185406
	모	221861439	외조부	KPN527
			외조모	221506521
유형				

생산형질 유전능력

구분	냉도체중 (kg)	배최장근 단면적 (cm²)	등지방 두께 (mm)	근내 지방도(%)
EPD	5	1.33	-0.09	1.12
Acc	73	77	77	80

체형 유전능력

구분	-4	-2	0	2	4	EPD(mm)
체고						-0.16
십자						0.06
체장						-0.04
흉심						-0.25
흉폭						-0.34
요각						-0.06
곤폭						0.1
좌골						0.21
고갈						-0.04
종위						-0.7

< 9. 선정된 씨숫소 >

3) 수란우 관리 및 농가 선정기준

수란우 관리 농가를 선정하기 위해서는 다음의 사항에 적합한 농가를 선정한다.

1. 친자 불일치가 발생하지 않는 농가
2. 이식 가능한 수란우(미경산우 및 경산우) 5두 이상의 대상우 보유 농가
3. 수정, 분만 신고가 빠르고 정확하며 적극적인 농가
4. 개체 이동에 대한 신고가 빠르고 정확한 농가
5. 자가 인공수정이 가능한 농가
6. 조합 사료 전구간 이용 농가
7. 첨가제 및 생균제 급여가 가능한 농가
8. 양질 건초 급여 농가
(볏짚 및 곤포는 암모니아와 곱팡이 등으로 난소 및 자궁에 악영향을 미칠 수 있음.)
9. 신체충실지수(BCS, 1~9)가 4~5 정도로 항상 유지되는 농가
10. 인공수정 수태율(최초 발정기준)이 70~80% 이상인 농가
11. 번식위주의 사육 농가는 우선 선정한다.

3. 2차년도 연구범위 및 연구수행 방법

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>직접 이식을 위한 Straw 내 수정란동결기술 개발 및 OPU 유래 수정란 생산, 공급 및 이식을 실시</p>	<p>동결수정란을 현장에서 직접 용해 및 이식하기 위하여 straw 동결방법을 개발하였음</p>	<p>-수정란 이식의 산업화를 위하여 가장 큰 문제는 자연발정우를 대상으로 한 이식이다. 이에 본 연구팀은 attached straw 로딩방법을 개발하여 소수정란의 직접이식 가능한 동결방법을 정립하였음</p> <p>-그러나 attached straw는 표면이 매우 매끄러워 로딩이 쉽지가 않았으며 이러한 문제점을 보완하기 위하여 straw 내벽에 약간의 구조적 변경만으로 동결수정란의 로딩을 더욱 용이하게 하여 동결 효율을 극대화시키기 위한 modified attachment straw를 개발하여 수정란 이식을 실시하였음</p>
	<p>현재까지 개발된 동결수정란의 생존율을 향상하기 위하여 PLL을 이용한 수정란 동결기술을 개발하였음</p>	<p>-일본 Kazuaki 등(2009)이 개발한 PLL 마우스 동결보존 농도에서 modify를 하여 소 수정란의 동결에 사용할 수 있는 세포내성 동결보호제 Ethylene glycol과 세포 외성형태로 세포막 보호 작용하는 PLL과 혼합하여 적정 조성비를 정립하였음</p>
	<p>PLL을 이용한 수정란동결의 효과적인 방법을 정립하고 동결 효율성을 높이고자 하였음</p>	<p>-PLL을 이용한 동결방법은 총 3단계를 거치는데 이 중 vitrification 2 solution의 조성은 PLL과 EG를 각각 1:1의 비율로 희석하였고 Vitrification 1 solution은 vitrification 2 solution의 양에 비례한 절반으로 희석하여 단계적인 동결이 되도록 하여 동결 시 수정란이 입는 데미지를 최소한으로 줄일 수 있도록 하였음</p>

		<p>-노출시간은 5, 10, 15분 동안 vitrification 1의 노출 평형시간을 비교 하였고 vitrification 2에 옮겨 1분 이내에 동결하였음</p>
	<p>PLL을 이용한 동결방법의 현장적용을 위하여 용해 및 이식 시간을 정립하였음</p>	<p>-동결보호제는 분자량이 크고 삼투압이 높기 때문에 warming 되어 있는 환경에서는 더욱 독성이 심하게 나타나고 세포가 입는 데미지 또한 크다 -PLL 혼합 동결보호제는 실온 상태로 사용하여도 무방하다. 회석시간은 소에 직접 이식 시술 시간을 감안하여 2분 이내에 이식할 수 있도록 하였음</p>
	<p>수정란 이식의 효율성 및 비교분석을 위하여 신선란, 동결 수정란, 동결 staw 직접이식의 비교분석을 위하여 선별된 대리모에 이식을 실시하였음</p>	<p>-수정란이식방법에 대한 차이를 확인하기 위하여 대리모에 수정란이식은 2014년 4월부터 실시하였으며 신선란 50개, 동결수정란 50개를 실시하였으며 수태율은 각각 56%(28두), 32%(16두)로 확인되었음 -신선란 및 동결 수정란은 이식을 종료한 후 동결 straw이식을 진행하였다. 동결 straw 이식은 9월까지 자연발정우 대상으로 9두에 이식을 실시하였으며 수태율은 33.3%(3두)로 확인되었음</p>
<p>동결수정란의 질적 평가를 위한 protein level에서의 세포 소기관(미토콘드리아를 중심으로) 관련 유전자들의 발현확인 및 분석</p>	<p>동결보존액에 따른 동결 수정란의 세포 소기관의 손상 정도의 관찰과 관련된 response 조절인자의 발현확인을 통한 수정란 손상 확인하였음 현미경을 이용한 신선란과 동결보존·용해수정란의 세포 소기관(미토콘드리아)관찰 및 염색을 통한 세포 소기관의 형태학전 변화 확인하였음 1차년도에 제작되어진 미토콘</p>	<p>-연구 방법의 확립을 위한 1차년도에 구축한 미토콘드리아 특이적 레드형광 벡터를 체세포에 발현시켜 SCNT를 제작하였을 때, 배아에서 유전자의 지속적인 발현을 확인하였음 -SCNT 수정란을 동결 보존하여 일반적인 동결 보존에 따른 미토콘드리아의 길이변화와 형태학적 변화를 형광을 통하여 이미징 데이터로 분석하였음 -SCNT 초기 배아발달과정에서 미토콘드리아 dynamic 의 대표</p>

	드리아 특이적 레드형광 렌티 바이러스 벡터를 이용하여 동결. 용해수정란에서의 형광 발현 및 미토콘드리아의 형태학적인 변화에 따른 dynamic 조절인자의 발현 패턴 분석	적인 형태 조절인자들의 발현 패턴 분석을 통하여 수정란의 품질 평가 실험을 실행 (protein level 역시 확인) -일반적인 동결 보존액과 처리를 통한 동결 보존액의 차이에 따라서 세포 소기관의 품질평가를 위해서 세포소기관 염색과 western blotting을 실행 -동결보존 수정란을 용해 후 세포소기관의 형태학적 모습과 분포도 확인을 대조군으로 신선란을 염색하여 비교분석하였음
공란우와 대리모의 선발과 자우의 능력을 검정하기 위하여 생시체중 및 친자확인 실시	공란우의 수정란 생산 및 후대의 능력을 확인하기 위하여 일반적으로 생산된 자우와의 생시체중을 비교분석	-전년도 수정란이식을 실시한 공란우의 후대 생산을 확인하였다. 생산된 자우는 총 17두가 생산되었고, 암송아지9두, 수송아지 5두가 생산되었으며 사육 중 유산 및 폐사가 3두로 확인되었다. 생시체중은 OPU유래 수정란이식 아닌 산자와 비교하였을 때 약 3-5 kg정도 우수한 후대 생산되었음 확인하였음
	생산된 자우가 공란우의 친자인지 검증	-전년도 생산된 산자의 친자확인을 실시할 계획에 있으며 타 지역에서 생산된 OPU유래 자우의 친자감별 결과 친자검정결과가 100% 일치함을 확인하였다
	생산된 자우의 외형적인 모습과 다른 개체와의 체중을 비교분석	-생산된 산자는 외형적으로 골격이 크고 우수하였고 다른 자우와 비교하였을 시 생시체중은 3-5 kg 정도 더 많음을 확인하였음

4. 2차년도 세부연구수행 결과

[제 1세부과제]

○ 소수정란 직접 이식 법 개발

기존의 소 수정란을 동결하는 방법은 매우 다양하게 개발되어 왔으나 실험실에서 동결된

수정란을 용해 후 다시 이식 straw에 로딩 해야 하는 번거로움이 많았다. 그리하여 개발된 OPS나 Cryotop과 같은 Cryo tool 등은 동결용해 후 생존율의 성적은 꽤 좋은 편이었으나, 용해 후 다시 straw에 loading 해야 하는 번거로움은 해소하지 못하였다. 그러나 본 연구팀에서 개발한 attached vitrification (aV)로딩 시스템은 straw의 변형 없이도, 즉 기존의 수정란이식 시 활용되는 0.25 ml plastic straw를 이용하여 수정란을 쉽게 로딩할 수 있게 되었다. 그러나 본 연구팀은 attached 로딩 시스템은 한 단계 더 업그레이드 시켜 구조적인 단점을 보완한 modified attachment straw (maV)를 개발하였고 이를 Poly L-Lysin을 이용한 연구에 접목하여 최상의 소 수정란 직접이식 동결 법을 개발 하고자 하였다 (Fig. 1).

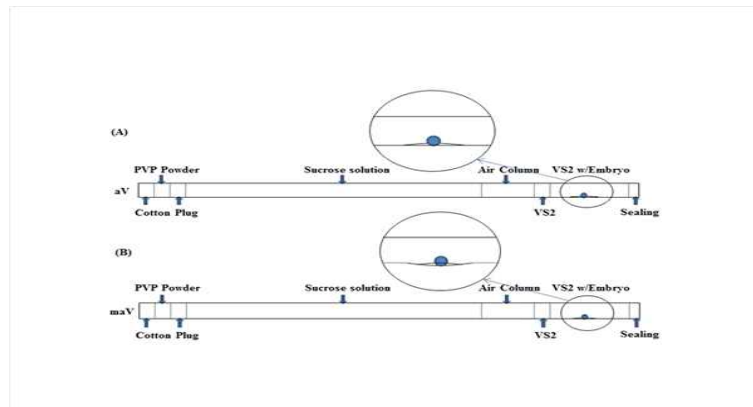


Fig. 1. Schematic diagram showing the attachment of an embryo to the inner surface of a 0.25-ml straw using the aV and maV methods.

Table 1. Comparison of the developmental competence of post-thaw blastocysts among the control, aV, and maV groups.

Groups	No. of blastocysts vitrified	No. (%) of blastocysts recovered	No. (%) of blastocysts re-expanded at 24 h
Control	-	56 (100) ^a	56 (100) ^a
aV	70	66 (94.3) ^b	57 (86.4) ^b
maV	71	68 (95.8) ^{a,b}	60 (88.2) ^b

^{a,b}Values with different superscripts in same column are significantly different ($P < 0.05$).

-Control, non-vitrified blastocysts; aV, attachment of blastocysts to the inner surface of a plastic straw; maV, attachment of blastocysts to the inner surface of a modified plastic straw.

Table 1은 기존의 aV 동결과 modified 된 maV의 vitrification 동결방법을 비교 분석한 결과이다. 동결 후 회수율과 발달율은 동결하지 않은 그룹(control)과 비교하였을 때 유의적인 차이가 났으나 두 그룹간의 유의적인 차이는 보이지 않았다. 또한 이를 세포사멸 염색인 TUNEL staining으로 염색하여 동결 용해 시 받는 데미지를 측정해 본 결과 큰 차이를 볼 수 없었다 (Table 2, Fig 2).

Table 2. Comparison of the quality of post-thaw blastocysts among the control, aV, and maV groups.

Groups	No. of blastocysts counted	No. of nuclei counted (mean \pm SE)	
		Total no. of cells per blastocyst	No. of apoptotic cells per blastocyst
Control	10	142 \pm 21.8 ^a	1.5 \pm 2.1 ^a
aV	10	117 \pm 29.7 ^b	8.9 \pm 10.4 ^b
maV	10	120 \pm 25.2 ^b	9.4 \pm 14.7 ^b

^{a,b} Values with different superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

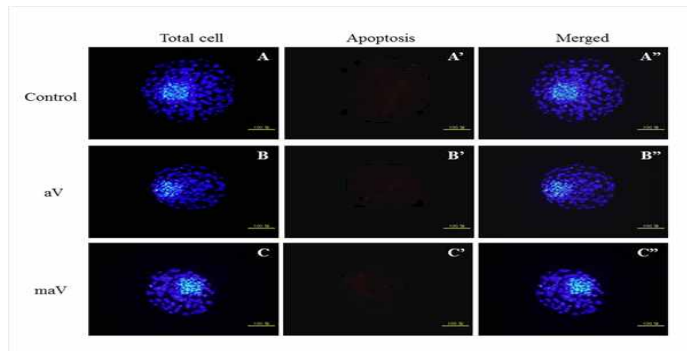


Fig. 2. Representative images of TUNEL-stained blastocysts in the control, aV, and maV groups. Hoechst33342-stained cells (A, B, and C), TUNEL stained (apoptotic) cells (A', B', and C'), and merged images (A'', B'', and C''). Control, non-vitrified blastocysts; aV, attachment of blastocysts to the inner surface of a plastic straw; maV, attachment of blastocysts to the inner surface of a modified plastic straw.

또한 동결수정란의 손상을 확인하기 위하여 골지체와 미토콘드리아 염색을 통하여 confocal 현미경을 이용해 촬영하여 확인해 본 결과 maV 동결방법은 control 그룹과 유사한 양상을 띄며 aV 동결에 비해 골지체의 손상을 줄여주었고 미토콘드리아의 활성화도 또한 높았다 (Fig. 3).

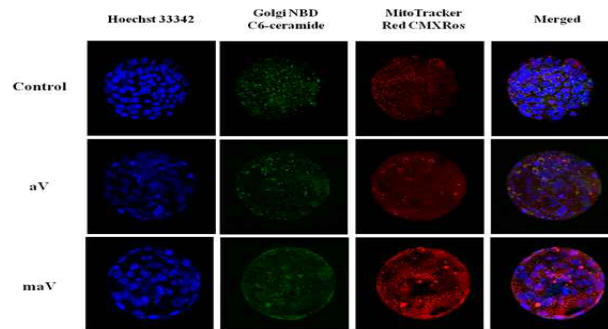


Fig. 3. Confocal microscopy images of Golgi apparatus and mitochondria staining of blastocysts in the control, aV, and maV groups.

또한 동결 수정란의 퀄리티를 유전자 적인 측면으로 분석하기 위하여 수정란의 mRNA를 추출한 유전자 분석을 실시하였다 (Fig 4).

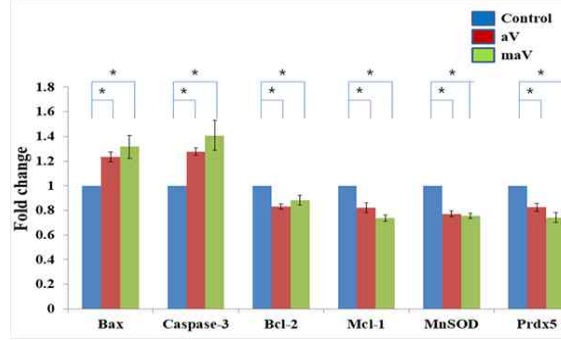


Fig. 4. Relative mRNA levels of various genes in blastocysts in the control, aV, and maV groups. The fold change (mean \pm SE) in expression compared to that of the control group is shown (n = 5). *Significantly different compared to the control group ($P < 0.05$). The mRNA levels of none of the genes significantly differed between the aV and maV groups.

Apoptosis 관련 유전자(Bax3 & caspase-3)의 발현은 증가하였고 anti-apoptosis의 유전자(Bcl-2와 Mcl-1)는 상대적으로 감소하였다. Mitochondria 관련 유전자 (MnSOD와 Prdx5)의 유전자도 감소하였다. mRNA수준에서 세포가 외부 stress (vitrification)로 인하여 apoptosis 유전자의 증가 (단백질 수준에서 감소)와 anti-apoptosis의 유전자의 감소(단백질 수준에서 증가)를 유도하였다고 보여졌다. Apoptosis를 감소시키고 외부의 stress로부터 세포를 보호하는 MnSOD와 Prdx5의 상대적인 mRNA의 양이 감소(단백질 수준에서 증가)한 것을 보여주었다. 이는 apoptosis관련 유전자는 아직 많은 mRNA가 전사가 되지 않은 상태로 남아 있고 mitochondrial activity의 유전자가 상대적으로 많은 mRNA가 전사되어 세포를 보호하는 역할을 하는 것으로 추정을 할 수가 있었다.

각 유전자는 발현량은 control에 대해서 유의적인 차이를 보여주고 있었다. aV와 maV 두 그룹간에 차이가 거의 없지만 대체로 maV에서의 유전자 발현에 variation 조금 더 심하였다. 또한 변화의 폭도 aV에 비해 강하게 나타났다. 모든 데이터는 GAPDH와 Beta-actin으로 normalization하여 오차를 줄였다 (Fig. 4).

○ PLL 동결보존액의 적정 조성조건 정립

PLL동결보존액은 일본에서 Kazuaki 등(2009)에 의하여 stem cell 동결 목적의 동결보호제가 처음 개발되었고, 포유류의 수정란 동결에 있어서는 생쥐수정란을 동결한 바 있다. 본 연구팀에서의 연구는 이러한 PLL동결 보존액의 구성비를 modify하여 소 자궁 내 direct이식에 이용하기 위한 소 수정란의 동결에 적용하였다. 따라서 동결보존액의 적정 조성은 마우스에서 유래한 방법을 인용하여 세포 내성 동결보호제인 ethylene glycol과 세포 표면 membrane을 보호하는 Poly L-Lysine, 그리고 세포 외성 동결보호제 sucrose를 이용하여 구성하였다.

○ 독성영향 최소화위한 PLL노출시간, 농도 조건 정립

기존의 mouse 수정란의 동결방법을 modify하여 PLL의 최종 처리농도를 체크하였다. Vitrification 2의 농도를 15, 20, 30, 40%로 최종 농도를 고정하고 vitrification 1은 그에 따라 절반의 비율로 0.75, 10, 15, 20%로 제조하여 비교하였다. Vitrification 2의 최종농도를 비교분

석하여 24시간 후 발달율을 관찰하였을 때 15, 20%로 희석한 그룹은 생존율이 0%였고, 30% 그룹은 100% 생존하였으며, 40% 그룹은 28.0% 생존하였다 (Table 3). 따라서 PLL동결은 30%의 최종농도로 희석 혼합하였을 때 가장 효율이 좋았다. 그에 비례하여 vitrification 1의 희석 농도는 15%로 사용하였다.

Table 3. Effect of PLL concentration in VS2 on the viability of bovine IVP blastocysts

PLL conc. of VS2 (%)	No. BL vitrified	No. BL recovered	No. BL developed to at 24 h (%)	
			Expanded	Degeneration
15	15	15	-	15 (100)
20	15	15	-	15 (100)
30	30	30	30 (100)	-
40	25	25	7 (28.0)	18 (72.0)

PLL 동결 보존액의 적정 조성비를 구하기 위하여 시간대별로 동결 용해 후 생존율과 degeneration율을 비교하였다. 각 처리군은 5분 간격으로 vitrification 1의 노출시간만 조사하였고 vitrification 2에서는 60초 이내로 수행하였다. 동결 후 24시간까지 생존 및 발달은 5분, 10분, 15분 처리군에서 전체가 생존하였다. Degeneration되는 수정란은 15분 노출한 그룹이 50.0% 가장 높았고 그 다음은 5분 노출한 그룹은 19.0%, 10분 노출 그룹은 9.5%로 있었다 (Table 4). 결과적으로 PLL 동결방법은 holding medium에서 10분, vitrification 1에서 10분 vitrification 2에서 1분에 노출 후 straw에 로딩 하는 것이 가장 효과적 이었다.

Table 4. Effect of exposed times in VS1 on the viability of bovine IVP blastocysts

Exposed times (min.)	No. BL vitrified	No. BL recovered	No. BL developed to at 24 h (%)	
			Expanded	Degeneration
5	21	21	21 (100)	4 (19.0)
10	21	21	21 (100)	2 (9.5)
15	21	21	21 (100)	11 (50.0)

○ 동결 및 용해의 적정 온도 및 희석시간 정립

고분자 동결보호제가 첨가되어 있는 동결 보존액은 따뜻한 온도에서는 damage를 받기가 쉽다. 동결 용해의 적정 온도와 희석시간은 동물의 축종이나 사용되는 동결 매디아에 따라서 매우 틀리다. 마우스의 경우에는 실온과 같은 20~25℃의 온도 내에서 용해를 하고 돼지 같은 경우에는 주로 37℃를 사용한다. 고분자 동결보호제가 첨가되어 있는 동결 보존액은 따뜻한 온도에서는 damage를 받기가 쉽다. 따라서 본 연구에서는 가급적인 동결 상해를 최소화하기 위하여 마우스와 같은 온도로 20~25℃로 설정 하였다. 동결된 straw는 3초간 실온의 공기 중에서 흔들어 압력에 의한 straw의 팽창을 예방하였고 모든 희석 단계는 기본적으로 실험실

내에서 행해지는 노출시간대 10분 내에 회석하여 시스에 장착하는 것으로 하였다. 시간이 노출될수록 수정란의 상태가 나빠지므로 최대한 빠르게 회석 할 수 있도록 하였다.

Straw 내에서 수정란이 오래 노출 될 때 동결 수정란이 입는 데미지의 정도를 판단하기 위하여 액체질소에 침지하지 않고 시간대별로 동결 보호제에 노출 후 toxicity에 대한 검사를 실시하였다.

Table 5. Effect of exposed times in VS1 (Non-frozen) on the viability of IVP blastocyst

Exposed times in VS1 (min.)	No. BL exposed	No. BL recovered	No. BL developed to at 24 h (%)	
			Re-Exp.	Deg.
5	18	18	18 (100)	-
10	18	18	18 (100)	-
15	18	18	18 (100)	-

Vitrification 1단계에 시간대별로 노출 시 수정란의 변화를 관찰한 결과 5분에서 15분까지 5분 단위로 노출 시켰을 때 24시간까지 모두 생존하였으며 degeneration되는 수정란은 없었다 (Table 5).

Table 6. Effect of exposed times in VS2 (Non-frozen) on the viability of IVP blastocyst

Exposed times in VS2 (min.)	No. BL exposed	No. BL recovered	No. BL developed to at 24 (%)	
			Re-Exp.	Deg.
1	10	10	10	-
2	10	10	10	-
3	10	10	9 (90.0)	1 (10)
4	11	11	10 (90.0)	1 (10)
5	10	10	8 (80.0)	2 (20)

또한 Vitrification 2에 1분에서 5분까지 각 1분대로 수정란을 노출 시켰을 때는 큰 차이는 나지 않았으나 3분 이후로는 degeneration되는 수정란이 증가함을 볼 수가 있었다. 따라서 vitrification 1 에서의 노출시간은 크게 데미지를 주지 않았으나 vitrification 2에서는 최소한 2분 이내에 모든 작업을 마쳐야 수정란의 quality를 보존할 수가 있다 (Table 6).

○ OPU 유래 동결수정란 이식 후 착상율과 임신율에 비교

수정란 이식은 2014년 4월부터 신선란 50개, 동결수정란 50개, 동결 straw 직접이식 9개를 순차적으로 실시하였으며 이식 현황은 다음과 같다.

Table 7. Summary of embryo transfer and pregnancy

Types of ET	No. of recipients transferred	No. of pregnancy (%)
Fresh embryo	50	28 (56.0)
Frozen embryo	50	16 (32.0)
Direct ET of straw frozen embryo	9	3 (33.3)

신선란은 매주 화요일에 실시하였으며 총 50두 이식 중 수태율은 56%(28두)로 확인되었다. 동결수정란은 연구실에서 용해하여 농가에 이식을 실시하였으며 수태율은 32%(16두)로 확인 되었으며 이는 신선란이 동결란 보다 수태율이 높음을 확인하였다. 동결수정란 이식 종료 후 동결 straw 직접이식을 실시하였으며 9월까지 계속적으로 동결 straw 직접이식을 실시하여 총 9두를 대상으로 실시하였다. 재발정 발견율은 33.3%(3두)로 확인되었다.

[제1협동]

1. 동결수정란의 용해 직후, 동결수정란의 미토콘드리아 분포도 및 형태학적 변화 확인

동결보존액에 다른 동결 수정란의 용해이후의 수정란 품질 평가확인을 위해서 공초점주사 전자현미경(Confocal)을 이용하여 세포 소기관을 관찰하였다. 세포 소기관 중에서 가장 먼저 미토콘드리아의 분포와 형태학적 모양을 관찰하기 위해서 미토콘드리아 형광염색을 할 수 있는 mitotracker(Green)를 이용하여 염색하였다. 이 염료는 살아있는 세포를 염색하기 때문에, 동결수정란의 용해이후, 처리를 통하여 동결직후의 미토콘드리아 상태를 확인할 수 있다. 이를 통하여 동결 수정란의 배반포(blastocyst) 에서의 미토콘드리아 세포 소기관의 분포를 확인하였다 (Fig. 1).

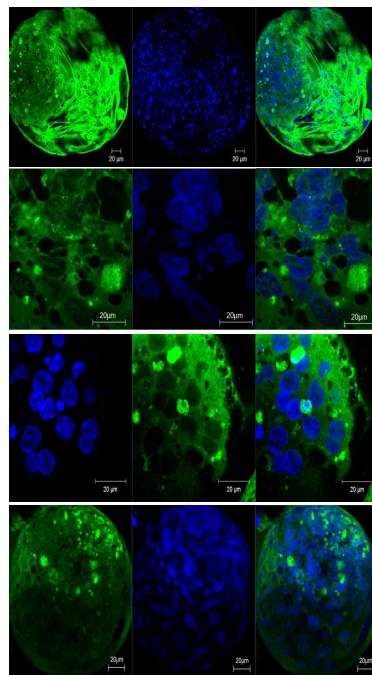


Fig. 1. Mitotracker 염색을 통한 동결 수정란의 세포 소기관 관찰.

동결수정란의 미토콘드리아는 mitotracker에 의해 Green형광으로 염색된다. 그러나 동결보존액에 따른 동결수정란의 세포 소기관과 비교할 만한 Control이 필요하여 기존의 IVF를 통하여 생성된 초기 embryo 단계의 신선란에서 미토콘드리아의 분포도를 확인하였다 (Fig. 2).

일반적인 신선란을 체외수정을 통하여 수정한 다음 early embryo development stage에서 8-cell stage에서 동결수정란과 동일한 방법으로 mitotracker 염색을 하여 관찰하였다. 신선란을 이용한 수정란의 초기 배아 발달 단계에서의 미토콘드리아들은 분할된 할구 전반적으로 골고루 퍼져있는 분포도를 보이며, 형태학적인 모습과 길이가 매우 단편으로 보인다. 그러나 전체적으로 mitotracker(Green)를 이용하여 염색은 확연히 미토콘드리아 세포 소기관의 형태학적 변화를 관찰하기에는 어려움이 있다.

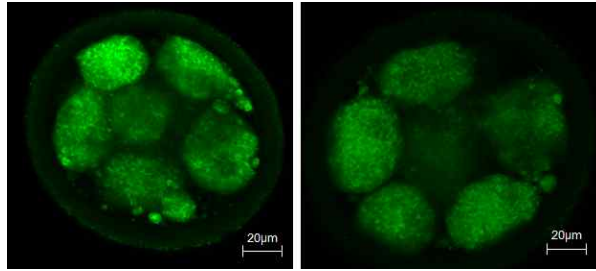


Fig. 2. Mitotracker 염색을 통한 IVF 수정란의 미토콘드리아 관찰.

지금까지 동결 수정란의 품질을 정확하게 확인할 수 있는 방법이 정확하게 구축 되지 않았다. 특히 수정란의 경우, 세포 소기관중 하나인 미토콘드리아는 ATP생산 및 mtDNA copy number 등과 같이 세포가 살아가는 대사(metabolism) 과정에서의 미토콘드리아의 역할에 관한 연구결과가 발표되었다. 그러나 최근의 연구에서 미토콘드리아는 세포의 운명을 조절하는 역할을 한다는 것으로 발표되었다.

미토콘드리아 dynamics response와 관련지어 본 연구진의 확인한 결과 동결 수정란의 미토콘드리아의 길이와 분포적인 특징을 보면 미토콘드리아는 fission과 fusion을 서로 반복하면서 balance regulation을 이루고 있고, 미토콘드리아 분열(fission)은 이동이 용이하며 에너지 공급이 원활하게 하여 증식하는 세포나 분열이 자주 일어나는 세포와 조직에서 관찰되었다. 그러나 이러한 미토콘드리아의 길이의 변화가 계속적으로 일어나면서 균형을 이루고 있기 때문에 세포 손상에 대한 보호기작으로써도 작용한다. 그리고, 세포가 외부의 손상과 자극으로부터 심각한 손상을 입으면 과도한 fission으로 인해 apoptosis까지 이어진다고 알려져 있다(Fig. 3).

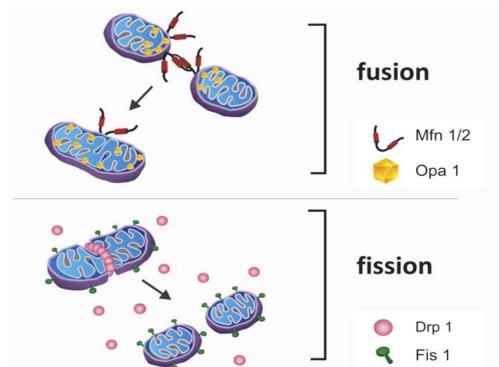


Fig. 3. 미토콘드리아 fission 과 fusion 관련 유전자의 간략한 설명 (*Endocrinology and Metabolism Published 1 July 2012, Vol. 303 no. E31-E39DOI*).

2. 동결수정란에서의 세포소기관 손상을 확인하기 위해서 미토콘드리아 dynamics 형태조절인자 단백질 수준에서의 발현 변화 확인

동결 수정란의 동결되는 stage가 blastocyst라는 점에서 이러한 이미지 분석을 통한 미토콘드리아의 형태학적인 모습을 확인하기 힘들다고 생각하여 protein level에서 확인하게 되었다. 미토콘드리아 dynamics 형태조절인자인 Drp1(fission marker)의 발현을 Western blotting을 통하여 protein level에서 확인하였으나, 이전의 mitotracker를 통한 미토콘드리아의 염색이 동결 수정란에서 세포소기관 손상 여부를 확인하는 효율이 좋지 않아, 1차년도에 구축한 미토콘드리아 specific lenti-virus vector를 이용하여 bovine SCNT에서 미토콘드리아의 형태학적 변화와 분포를 NT 동결수정란에서 먼저 확인하였다 (Fig. 4). 구축된 mito-DsRed2 vector는 미토콘드리아를 Red 형광으로 발현시키는데 NT를 통하여 stable하게 발현이 된다는 장점을 확인할 수 있기 때문에 SCNT 동결 보관 후 융해된 수정란을 통하여 먼저 확인하였다. 일반적인 transfection과는 달리 동결 전후에서 형광발현이 지속적으로 유지되어야 하기 때문에 SCNT동결란을 통하여 사전 실험을 진행하였다.

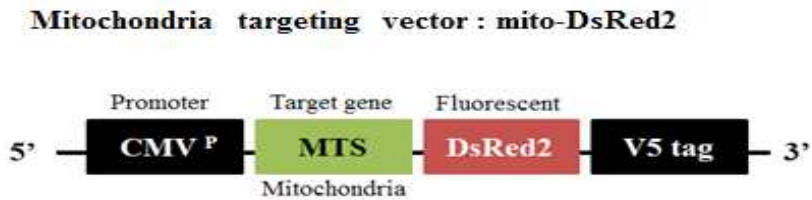


Fig. 4. 미토콘드리아 targeting vector (mito-DsRed2) 모식도.

동결 보존액에 첨가되는 물질이 기존의 동결보존액을 사용한 수정란과 비교하였을 때, 평가할 수 있는 기준으로써 미토콘드리아 dynamics가 적합한지 알아보았다. 가장 먼저, 우리가 구축한 lenti-vector가 발현이 donor cell에서 정확하게 발현하는지를 미토콘드리아 isolation 이후 vector에 tagging된 V5를 protein level에서 확인하였다. Fig. 5A. 그리고 mito-Ds-Red2 SCNT수정란을 일반적인 동결방법으로 일정시간 동결 후에 융해하여 western blotting을 하였다. 이를 통하여 15-20개의 동결수정란을 이용하였을 때 HKG(house keeping gene)과 같은 유전자들의 protein level을 detection하였다 (Fig. 5.)

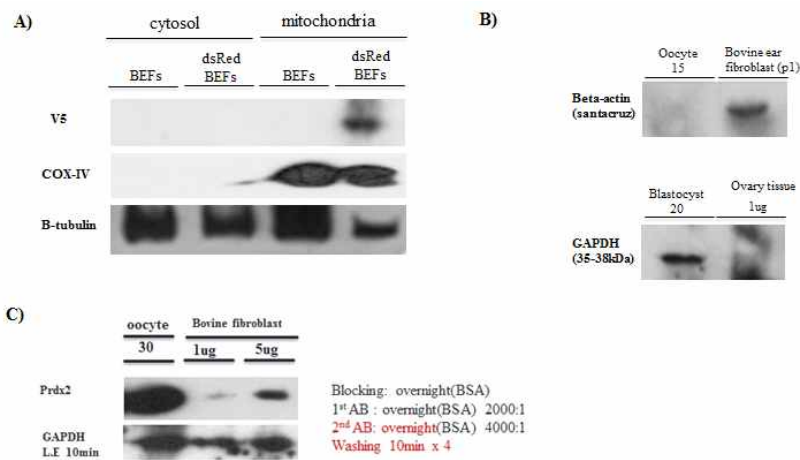


Fig. 5. Lenti-vector의 발현확인 및 bovine 동결수정란(1-cell stage)에서의 house keeping gene (HKG) detection 확인.

각각의 bovine SCNT 수정란의 동결 용해 후, early embryo stage에 따라 1-2cell, 4-8cell 그리고 blastocyst group으로 각각 분리하여 미토콘드리아 dynamics 형태조절인자인 Drp1의 발현을 protein level에서 확인하였다. 각각의 sample은 30개씩 사용하였다. 앞선 선행연구결과 30개의 동결수정란에서는 HKG의 발현이 정확하게 밴드로 확인하였고, 동결방법을 통한 보관으로 30개의 sample을 이용하여 western blotting을 하였다 (Fig. 6).

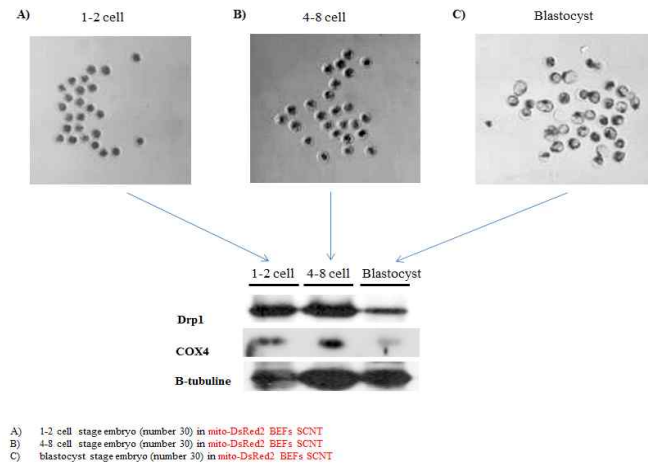


Fig. 6. 동결보존액에 보관하였던 bovine SCNT 수정란의 각 단계에서 Drp1인자의 발현확인.

이와 같이 protein level에서의 유전자들의 발현 수준을 확인하였고, 미토콘드리아의 control gene으로써 COX4를 사용하였다. 이와 같이 동결보존을 통한 동결 수정란에서의 세포 소기관이 품질적 평가 기준으로써 protien level을 확인 할 수 있었다. 그리고 SCNT를 통하여 우리가 제작한 렌티 벡터의 유전자 발현은 지금까지 처리방식과는 달리 stable하게 지속적으로 발현되는 것을 초기배아발달과정 단계별에서 공초점주사전자현미경(Confocal)을 통하여 다시 확인하였다 (Fig. 7).

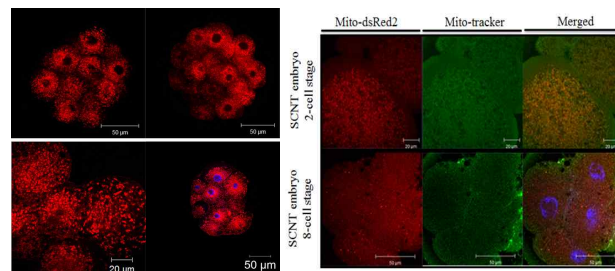


Fig. 7. Bovine SCNT수정란의 각 단계에서 mito-DsRed2의 형광발현을 mitotracker를 통하여 mitochondria의 형광발현이 지속되는 것을 확인.

위와 같은 선행연구 결과를 통하여, 동결보존액에 따른 동결 수정란에서의 세포 소기관 조절인자들의 발현을 western blot을 통하여 확인하였다. 기존에 사용하던 동결 보존액과 PLL물질처리를 한 동결보존액 그리고 각각의 control로써 신선란 IVF의 blastocyst에서 확인하였다 (Fig. 8).

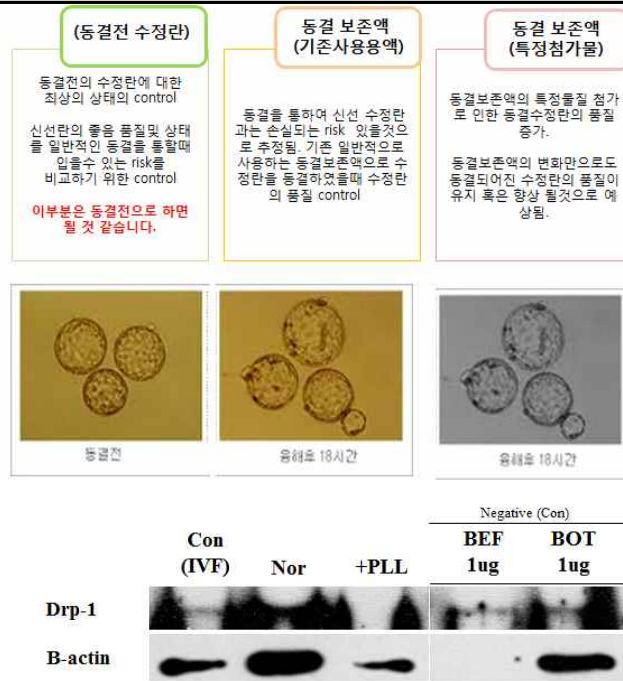


Fig. 8. 동결 보존액에 따른 동결수정란의 control 모식도와 미토콘드리아 dynamics 조절인자인 Drp1의 단백질 수준에서의 발현 확인.

동결수정란의 품질을 확인하기 위해서 IVF 신선란의 blastocyst와 western blotting에서 bovine adult ear fibroblast (BEF)와 bovine ovary tissue lysate를 1 ug/20 ul로 loading 하여 수정란 정량화의 negative Control로 사용하였다. 그 결과, 미토콘드리아 dynamic에서 fission의 대표적인 factor인 Drp-1의 발현이 +PLL처리 시에 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 다른 유전자들의 발현을 확인하여서 fission의 조절인자들의 발현이 기존의 동결 보존액을 사용한 동결 수정란과 품질적인 차이가 있는지를 앞으로 더욱 구체적으로 확인할 계획이다.

[제 2세부]

○ OPU유래 자우의 유전/육종가와 표현형 비교분석

우수한 공란우의 선정으로 우량한 후대의 생산산자 중 일부를 선별(14두)하여 기존(인공수정) 생산되는 개체들과 생시체중을 비교하였을 때 약 3-5 kg 정도 우수한 후대의 생산을 확인하였다. 이러한 자우들의 혈통을 이용한 능력 분석결과 모든 형질에서 지역의 개량방향과 일치하는 것으로 나타났고, 우수한 결과를 나타내었음, 지역의 평균과 비교했을 때 체중과 근내지방도는 OPU유래 자우가 우수한 것으로 나타났고, 등심단면적은 지역평균이 다소 넓었으며 등지방두께는 비슷한 결과를 보였다. 차후 공란우 선정 시 개량방향과 농가선호도를 탄력적으로 반영하여 선정한다면 보다 나은 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

표 1. OPU유래와 타지역과의 자우의 평균능력 비교

번호	개체번호	공란우정보	아버지정보	혈통을 이용한 능력(EBV) 추정결과				
				성장형질		도체형질		
				12개월 체중(kg)	도체중(kg)	등심단면적(cm ²)	등지방두께(mm)	근내지방도(score)
1	2306545881	2003745299	KPN768	9.62	8.02	2.25	-0.42	1.12
2	2307426083	2003745299	KPN768	9.62	8.02	2.25	-0.42	1.12
3	2307426163	2003745299	KPN768	9.62	8.02	2.25	-0.42	1.12
4	2307426171	2003745299	KPN768	9.62	8.02	2.25	-0.42	1.12
5	2307430496	2003745299	KPN768	9.62	8.02	2.25	-0.42	1.12
6	2307430540	2003745299	KPN768	9.62	8.02	2.25	-0.42	1.12
7	2307430558	2003745299	KPN768	9.62	8.02	2.25	-0.42	1.12
8	2307430566	2003745299	KPN768	9.62	8.02	2.25	-0.42	1.12
9	2307430662	2003745299	KPN768	9.62	8.02	2.25	-0.42	1.12
10	2307430679	2062623615	KPN768	6.01	6.34	0.25	-0.38	1.38
11	2307430687	2062623615	KPN768	6.01	6.34	0.25	-0.38	1.38
12	2308027257	2062623615	KPN768	6.01	6.34	0.25	-0.38	1.38
13	2308028547	2062623615	KPN768	6.01	6.34	0.25	-0.38	1.38
14	2308028555	2062623615	KPN768	6.01	6.34	0.25	-0.38	1.38
OPU유래 자우 평균능력				8.33	7.42	1.54	-0.41	1.21
지역평균능력(암소검정사업 참여대상우기준)				7.43	6.77	2.10	-0.42	0.55

○ 자우의 친자감별을 통한 유전능력의 정확한 평가와 등록의 정확성 확보

생산되는 자우에 대해서는 전 두수 친자확인을 실시할 계획으로 있고, 시료에 의한 오류를 줄이기 위하여 생후 5-7개월령에 모근을 채취하여 분석예정, 타지역의 경우 OPU유래 자우의 친자검정결과 100% 일치하는 것으로 나타남.



그림 1. 모근채취 방법.

○ 자우의 표현형 자료 비교분석

기존(인공수정)에 생산되고 있는 개체와 비교했을 때 외형적으로 골격이 크고 우수함, 생시체중은 3-5kg정도의 차이를 보이고 있는 것으로 나타남.

표 2. OPU 유래 자우의 정보와 생시체중

송아지이표번호	생년월일	성별	수란우	공란우	아버지정보	생시체중(kg)
2306545881	2014-02-07	수	2069113041	5429	768	29
2307426083	2014-01-11	수	173654512	5429	768	31
2307426163	2014-01-03	암	2072770720	5429	768	30
2307426171	2014-01-01	암	2072770779	5429	768	30
2307430496	2014-01-18	암	2058800990	5429	768	26
2307430540	2013-12-30	암	2056686983	5429	768	28
2307430558	2014-01-05	암	2067004989	5429	768	29
2307430566	2013-12-26	암	2069125961	5429	768	28
2307430662	2014-01-20	수	183948304	5429	768	32
2307430679	2014-01-27	수	2048087564	2361	768	28
2307430687	2014-02-28	암	2039109904	2361	768	33
2308027257	2014-02-16	암	2069121151	2361	768	28
2308028547	2014-01-08	암	2069118666	2361	768	28
2308028555	2014-01-10	수	2069126807	2361	768	30
수송아지평균						30
암송아지평균						29
전체평균						29

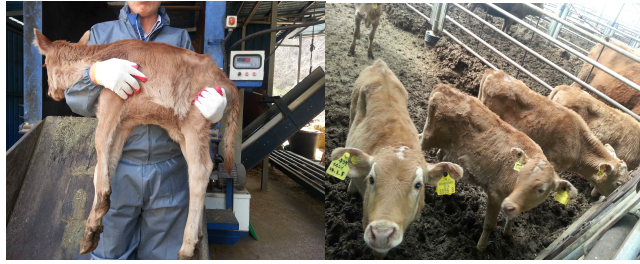


그림 2. OPU유래 수정란 이식으로 생산된 자우.

5. 3차년도 연구범위 및 연구수행 방법

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
인공수정같이 자연발정대리모에 직접이식방법 최적화	신선란 및 직접이식 straw 동결수정란을 생산하여 대리모에 이식	-자연발정 대리모에 직접이식을 위하여 신선란과 동결 straw 수정란을 생산하였다. 신선란은 22회 채란하여 236개의 난자를 회수하여 67개(28.3%)의 수정란을 생산, 동결 staw 수정란은 7회 채란하여 86개의 난자를 회수하여 27(31.3%)개의 수정란을 생산하였다 -신선란은 대리모의 발정동기화 후 이식을 실시하였으며 동결 straw 수정란은 자연발정우를 대상으로 실시하였음
직접이식을 위한 용해 후 희석방법의 정립	직접 이식을 위하여 staw 동결 수정란의 용해 시 노출시간에 따른 차이를 확인	-Straw loading하여 용해할 때 연구실에서 stepwise 용해방법과 달리 1 step dilution 방법을 사용할 수밖에 없다. 그래서 고농도의 vitrification 및 dilution solution의 독성의 영향을 확인하기 위하여 외기 노출시간을 5분, 10, 15분으로 용해 후 24시간 배양 하였을 때 활력도가 가장 높은 방법을 찾고자 하였다. 그 결과 모든 그룹에서 생존하였으나 10분 처리구에서 높은 부화율(90.5%)를 확인하였음
용해 후 이식까지 노출시간에 따른 수태율 조사	수정란 이식은 10~15분 정도 걸리므로 10분과 15분 노출시간에 따른 수태율을 확인	-고농도의 vitrification 및 dilution solution에 노출 시 damage를 입을 수 있을 것이다.

		<p>수정란 용해 후 이식까지의 10~15분 정도 걸리는데 시간에 따른 수태율을 확인하기 위하여 10분, 15분으로 나누어 이식을 실시한 결과 10분 노출에서 30.0%의 수태율을 확인하였다. 15분 노출에서 13.3%의 수태율을 확인한 결과와 비교하여 최소한의 노출시간을 가지는 것이 이식 후 임신율에 직접적인 영향을 미칠 것으로 판단됨</p>
<p>동결수정란 이식숫자 / 수태율 상관관계 비교분석</p>	<p>2차년도와 3차년도의 straw 동결수정란을 이식한 자료를 토대로 수태율 및 신선란과의 결과 비교</p>	<p>-동결 Straw 수정란을 이식한 결과는 2차년도와 3차년도의 재발정율은 각각 55.5%, 52.3%로 확인되었다. 수태율은 2차년도 3두 (33.3%), 3차년도 8두 (38.1%)의 결과를 확인하였다. 신선란 이식과 비교 시 신선란 56.0%, 동결 straw 수정란이 38.1%로 확인되었다. 이상의 결과로 보아 동결 staw 수정란은 신선란에 비하여 수태율이 낮은 것을 확인하였으며 차후 연구를 통하여 동결 straw 직접이식의 수태율을 향상 시킬 수 있을 것으로 사료됨</p>
<p>동결수정란 및 초기배아발달 과정의 품질평가를 위한 세포 소기관관련 유전자들의 발현 확인 및 미토콘드리아 조절 인자와의 상관관계 확인</p>	<p>동결보존액에 따른 동결 수정란의 세포 소기관관련 유전자들의 발현확인 동결보존 후, 신선란과 SCNT의 배아에서 미토콘드리아 dynamics 조절인자의 발현차이 확인. 돼지의 수정란에서 초기배아 발달과정동안 미토콘드리아 fission 유도 시, 미토콘드리아</p>	<p>-본 연구과제의 주요연구인 +PLL처리를 통한 동결 보존액과 기존의 동결보존액의 차이에 따른 동결수정란의 세포소기관을 이용한 품질평가를 western blotting 분석으로 수행. 동결보존액에 따른 배반포에서 소포체와 관련된 소포체스트레스 마커의 발현변화를 확인하기 위해, 동결 보존 수정란을 용해한 다음 western blot 분석기법을 이용하여 대조군인 신선란(IVF를 통해 생산된 배반포)과의 발현 패턴을 비교 분석하였음 -동결보존한 다음 용해된 IVF과</p>

	dynamics 조절인자의 발현 및 수정란의 질적 평가와 미토콘드리아 유래 활성산소와의 상관관계 확인	SCNT을 이용해서 미토콘드리아 dynamics 조절인자 Drp-1의 발현을 단백질 수준에서 확인 -또한, 미토콘드리아 fission은 미토콘드리아 유래의 활성산소의 증가를 원인으로 발생할 수 있기 때문에 이를 검출할 수 있는 형광염색시약을 사용하여 돼지의 신선란과 TA9을 처리를 통해 유도한 배아에서의 발현차이를 이미지 데이터로 분석함
OPU 유래 수정란이식에 의해 생산된 송아지의 공란우 후보축 활용 가능성 검정	자우의 공란우로서의 활용 가능성 검정	-OPU 유래 자우의 능력의 유전력을 확인하고 암소의 공란우 활용능력을 검정하여 차후 공란우로 사용 할 수 있는지 검정을 통하여 비교분석하였음
	우량 밀소 집단 구축을 통한 개량효율 극대화	-OPU 유래 수정란 이식을 통해 생산된 자우의 육종가 및 유전력을 분석하여 우량 밀소 집단을 구축하였음

6. 3차년도 세부연구수행 결과

[제 1세부과제]				
1. 인공수정같이 자연발정대리모에 직접이식방법 최적화				
자연발정대리모를 대상으로 동결수정란을 직접이식 하는 방법은 기존의 동결방식을 수정란 로딩을 실험실 내에서 제한적으로 사용되었으나 본 연구에서는 인공수정과 같이 자연발정대리모를 대상으로 직접 이식을 위하여 신선란 및 동결수정란을 생산하였다. 수정란 생산은 2015년 3월부터 실시하였으며 수정란 생산 및 동결 결과는 다음과 같다.				
Table 1. Production efficiency of OPU derived embryo				
No. of OPU sessions	No. of oocytes collected	No. of embryos cleaved (%)	No. of blastocysts (%)	
22	236	115 (48.7)	67 (28.3)	
Table 2. Production of straw frozen embryo for direct embryo transfer				
No. of OPU sessions	No. of oocytes collected	No. of embryos cleaved (%)	No. of blastocysts (%)	No. of blastocysts frozen (%)
7	86	37 (43.0)	32 (37.2)	27 (31.3)

동결수정란은 7회 채란하여 난자 68개 중 32개(37.2%)의 수정란이 생산되었으며, 낮은 등급의 수정란을 제외한 27개(31.3%)의 동결수정란을 제작하였다. 생산된 수정란 중 신선란은 발정동기화 과정을 실시 한 후 이식을 실시하였으며, 동결수정란은 LN₂ 탱크에 보관하여 자연발정우를 대상으로 이식을 실시하였다.

2. 직접이식을 위한 용해 후 희석방법의 정립

직접 이식을 위하여 동결된 staw의 용해방법을 정립하였다. 동결수정란의 직접 이식은 Straw loading 하여 용해할 때 연구실에서 stepwise 용해방법과 달리 1 step dilution 방법을 사용할 수밖에 없다. 이를 위하여 2차년도 연구결과에서 제시된 최적의 농도를 설정하여 동결 용해 후 외기의 노출시간에 따른 결과를 확인하였다.

Table 3. Effect of exposed times on the viability of vitrified embryos

Exposed times (min.)	No. of embryos frozen/thawed	No. of blastocysts developed to at 24 h	
		Re-expanded (%)	Hatched (%)
5	30/30	30 (100)	24 (80.0)
10	30/30	30 (100)	27 (90.5)
15	30/30	30 (100)	15 (50.0)

동결용해 후 24시간까지의 생존 및 발달은 모든 처리구에서 생존 하였으나 부화율은 10분 노출 그룹이 90.5%로 가장 높았고, 5분 노출한 그룹이 80.0%, 15분 노출한 그룹이 50.0%로 매우 낮았다. 이러한 결과를 바탕으로 수정란 용해 후 희석에서 이식시간까지 10분으로 설정하였다.

수정란의 생존성을 극대화하기 위하여 slow freezing system을 이용하여 vitrification 방법과 비교 분석하였다. 동결 방법은 straw에 직접 동결하였으며 vitrification 방법은 전년도 연구방법으로 실시하였고, slow freezing을 이용하여 생산하였다. Slow freezing 방법은 저온동결기를 이용하는데 CryoLogic사의 CryoPreservatio System (Fig. 1) 장비를 이용하여 실시하였다.



Fig. 1. FREEZE CONTROL® systems.

동결방법은 0.5% BSA + D-PBS에 5분간 평형을 시킨 후 1.8 EG + 0.3 M sucrose에 10분간 처리한다. 수정란 개수에 따라 loading 시간을 측정하여 실시하였으며 5분 후 기계를 작동하였다. Loading 시간은 10분 안에 처리 하였다. Straw는 다음과 같은 방법으로 용해를 실시하였으며 0.5 BSA + D-PBS를 37°C에서 warming을 실시하였으며 상온에서 5-10회 정도 흔들어진 후 straw 안의 용액이 완전히 섞이도록 하였다. 수정란 이식 전 생존율 및 부화율을 확인하기 위하여 실험실에서 용해 후 배양액에 넣어 48시간 배양하였다. 생존율과 부화율은 다음과 같다.

Table 4. Effect of freezing methods on the viability of post-thaw embryos

Types of freezing	No. of embryos frozen/thawed	No. of blastocysts developed to at 48 h	
		Re-expanded (%)	Hatched (%)
Vitrification	100/100	50 (50.9)	22 (22.0)
Slow Freezing	150/150	63 (42.0)	22 (14.6)

Vitrification과 slow freezing 수정란을 비교한 결과 생존율은 각각 50.9%와 42.0%로 확인되었다. 부화율은 vitrification 22%, slow freezing 14.6%로 생존율에서는 비슷한 결과를 확인하였으나 부화율에서는 vitrification이 더 높은 것으로 확인되었다.

3. 용해 후 이식까지 노출시간에 따른 수태율 조사

동결 straw 수정란 직접이식은 고농도의 vitrification 및 dilution solution에 노출 시 damage를 입을 수 있다. 이를 위하여 2차년도에는 동결시간에 따른 생존율을 분석하였다. 그 결과 용해 후 10분이 가장 좋았으며 수정란 이식은 장착 후 이식시간이 약 10~15분 정도 소요된다. 이를 바탕으로 직접이식 시간을 용해 후 이식까지의 시간을 10분, 15분으로 설정하여 이식을 실시하였다. 결과는 다음과 같다.

Table 5. Effect of exposed time of post-thaw embryos on the pregnancy rate

Exposure time (min)	No. of recipients transferred	No. of pregnancy (%)
10	11	5 (45.4)
15	10	3 (30.0)

수정란 이식 후 수태율을 조사한 결과 10분 노출이 15분 노출에 비하여 각각 45.4%, 30.0%의 결과를 나타내었으며 10분 노출이 수태율이 높았으며, 이상의 결과로 볼 때 용해 후 10분 안에 이식을 실시하는 것이 수태율을 높일 수 있는 방법으로 확인되었다.

4. 동결수정란 이식숫자/수태율 상관관계 비교분석

동결수정란 이식의 효율성 분석을 위하여 신선란 이식과 동결수정란 이식을 비교분석이 필요하다. 2차년도의 결과를 바탕으로 연차별 동결 straw 수정란 직접이식의 결과를 바탕으로 3차년도에도 자연발정우를 대상으로 2015년 5월부터 실시하였으며 결과는 다음과 같다.

Table 6. Summary of frozen embryo transfer for 2nd and 3rd years

Years	No. of recipients transferred	No. of pregnancy (%)	No. of offspring (%)
2 nd	9	3 (33.3)	2 (22.2)
3 rd	31	8 (38.1)	-
Total	30	11 (36.6)	-

* Delivery data of 3rd year was not retrieved yet.

2차년도 9두와 3차년도 21두를 동결 straw 수정란 직접이식 결과 수태율은 각각 33.3% 와 38.1%로 확인 되었으며 산자는 2차년도 2두가 생산되었다. 3차년도 결과는 내년 하반기에 확인 할 예정이다. 이와 함께 3차년도에 신선란 이식을 병행하여 실시하였으며 straw 동결 수정란과 비교한 결과는 다음과 같다.

Table 7. Comparison of pregnancy rate of fresh embryo transfer with frozen one

Types of embryo transferred	No. of recipients transferred	No. of pregnancy (%)
Fresh	250	140 (56.0)
Direct frozen embryo transfer	21	8 (38.1)

신선란은 주 2회 화요일, 금요일에 실시하였으며 총 250두 이식하였다. 수태율은 56.0%(145두)로 확인되었으며 동결란은 LN₂ 탱크에 넣어 지방 수정사들에게 공급하였다. 동결 straw 직접이식은 자연발정우를 대상으로 실시하였으며, 현재까지는 21두에 이식을 실시하여 8두에서 수태를 확인하였다. 이상의 결과로 보아 동결 staw 수정란은 신선란에 비하여 수태율이 낮은 것을 확인하였으며 차후 연구를 통하여 동결 straw 직접이식의 수태율을 향상 시킬 수 있을 것으로 사료된다.

[제1협동]

1. 동결수정란의 품질평가분석을 위한 세포소기관 특정 유전자들의 발현 확인.

동결보존 수정란의 품질평가분석을 위해서 특정 세포소기관 스트레스 유도 관련된 유전자들의 발현을 단백질수준에서 확인하는 실험을 진행하였다. 먼저, 우리는 PLL이 첨가된 동결 용해액을 통하여 용해되어진 배반포 단계의 수정란을 이용하여 western blot 분석을 통하여 단백질 수준에서의 발현차이를 확인하고자 하였다. 앞서, 2차 년도 연구수행을 통하여 Drp-1이라는 미토콘드리아 dynamics 조절인자의 발현 및 인산화를 확인하였고, 이번 년도 연구에서는 소포체 스트레스의 스트레스 마커로 알려진 Grp78/Bip 유전자의 발현을 확인하는 시도를 하였다. 일반적인 체외수정 이후의 신선란인 IVF를 통해 생산된 배반포와 일반적인 배지를 사용하여 동결 보존하여 용해된 normal 배지의 배반포와 PLL 물질처리를 통하여 용해되어진 배반포 총 3가지 그룹으로 나누어 배반포로부터 소포체스트레스의 스트레스 마커로

알려진 Grp78/Bip 유전자의 발현 변화를 확인하였다. 그 결과, 일반적인 체외수정 이후의 IVF 배반포에서 다소 증가하였고, 나머지 두 group에서는 감소하는 것을 확인하였으며, 그 두 group간의 발현의 정도는 거의 차이가 없다고 보여, 소포체 스트레스의 마커들 보다는 배아 및 배반포의 동결과정과 융해과정에서는 미토콘드리아 관련된 미토콘드리아 dynamics 의 조절인자 및 관련 메커니즘이 중요하게 작용될 것으로 유추되어진다. 또한, 실험의 결과를 통해서 미토콘드리아 dynamics 의 조절인자의 발현 패턴의 변화가 동결수정란의 품질을 확인할 수 있는 지표로써 사용될 수 있는 가능성을 확인하였다.

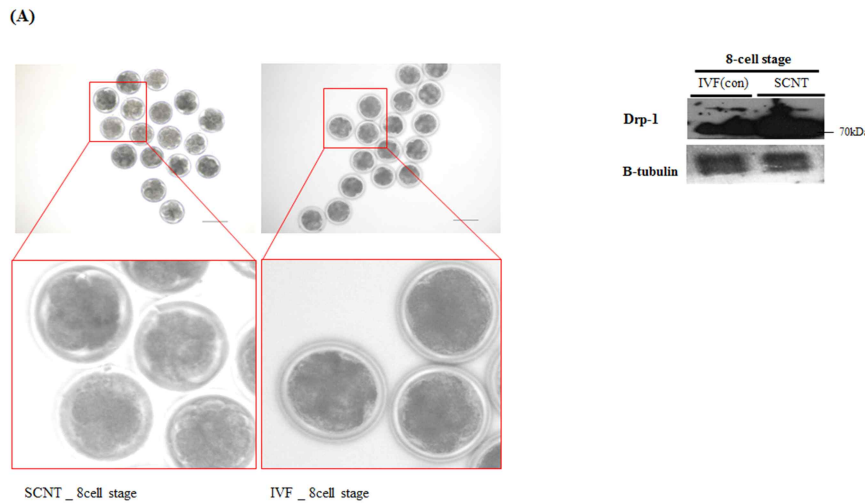


Fig. 1. IVF와 SCNT 8cell 배아의 동결융해 후, 미토콘드리아 dynamics 조절인자인 Drp-1의 발현 확인.

유전자의 발현 패턴의 변화가 동결수정란의 품질을 확인할 수 있는 지표로써 사용될 수 있는 가능성을 확인하고자 초기배아 발달과정 중 8-cell 단계에서 동결보관을 2주간 뒤 융해하고 미토콘드리아 dynamics 반응 중 fission의 조절인자인 Drp 1의 단백질 수준에서의 발현을 조사하였다. 이때, 소의 귀 섬유아세포를 이용하여 핵치환 이후의 somatic nuclear transfer (SCNT) 8-cell 단계의 배아와 일반적인 체외수정을 통한 IVF 배아에서 각각의 발현을 조사하였다. 동결융해 후 배아의 현미경관찰을 통하여 동결전후의 변화가 거의 없이 유지되는 것을 확인하였다. 이때, 사용된 배지는 특정 물질이 들어가지 않은 일반적인 normal 배지를 통하여 동결 융해한 것을 사용하였다. 그 결과, 두 group 의 8-cell 단계의 배아는 비슷한 발현정도의 Drp-1의 발현을 나타내었다 (Fig. 1). 이러한 결과를 통하여 SCNT와 IVF 같은 배아 및 배반포에서도 미토콘드리아 dynamics의 조절인자인 Drp 1이 품질 및 상태를 확인할 수 있는 표지 인자로써의 적용이 충분히 가능하다고 사료된다. 이는 미토콘드리아 dynamics의 조절인자인 Drp 1가 핵치환, 미세주입 및 종에 따른 다양한 수정란의 품질을 확인하는 기준으로써의 역할이 가능하다고 여겨진다.

기존의 동결융해 수정란의 발생능력은 배양 후 hatching 을 및 apoptosis 할구 수와 유전자 발현 등으로 한정되었지만, 세포 내부의 damage 여부를 확인할 수 있는 TEM, SEM전자현미경 사진으로 보다 더 정밀하게 확인하는 방법의 정립이 필요할 것으로 판단된다. 본 연구

과제에서 이러한 부분을 완벽하게 해결하지 못하여 차후 추가적인 연구로 완성된 결과를 얻고자 한다.

2. 초기배아 발달과정에서 수정란과 배반포 품질과 미토콘드리아 fission의 상관관계확인

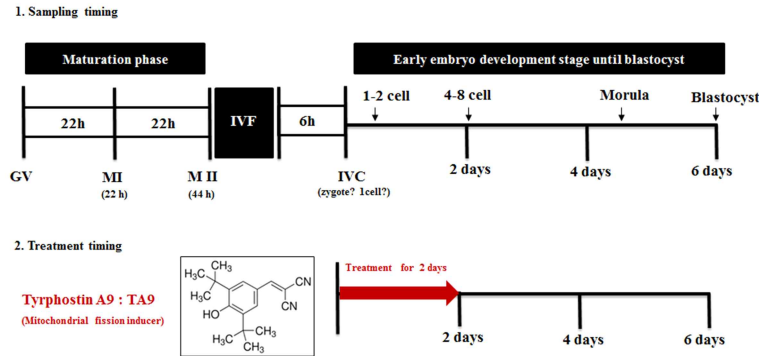


Fig. 2. TA9처리를 통한 돼지의 초기배아 발달과정에서 미토콘드리아 fission을 유도하는 실험적 방법 sample 확립의 모식도.

이전 연구 결과를 통해서, 수정란 및 배반포의 품질에 따라 미토콘드리아 dynamic중에서 fission의 조절인자로 알려진 Drp1의 발현 패턴을 분석하였다. 수정란의 할구 분열과 같은 세포분열과정에서 발현이 증가된다고 알려진 Drp1을 패턴을 돼지의 초기 배발달과정에서 확인하였다. 특히 미토콘드리아 fission을 유도하는 역할을 가진다고 알려진 TryphostinA9 (TA9) 물질을 처리하여 유도하였을 때, Drp1의 발현변화를 조사하였다. 실험의 진행은 Fig. 2의 모식도와 같이 수행하였다.

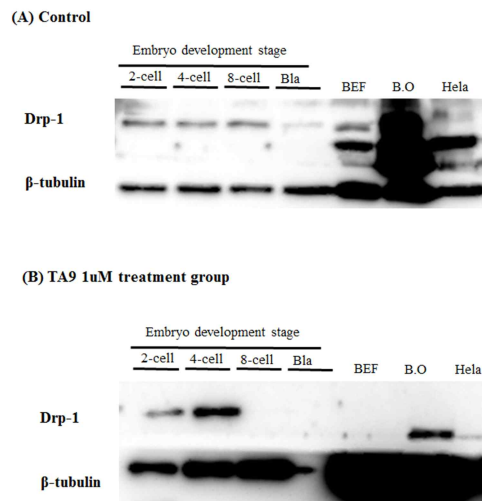


Fig 3. TA9 처리에 따른 초기배아의 단백질 수준에서의 Drp-1의 발현 변화 확인.

위 모식도와 같은 방법으로 배지에 TA9처리를 이틀 동안 하였고, 수정이 후 배반포 단계까지의 체외생산과정을 진행하였다. 이 후, 생산된 배반포를 이용하여 western blotting 분석을

통하여 미토콘드리아 fission의 마커인 Drp1의 발현을 단백질 수준에서 확인하였다. 그 결과, 우리는 미토콘드리아 fission을 유도하는 TA9 (1 uM)를 배지에 처리하였을 때, 배지속의 수정란 및 배아의 미토콘드리아 fission 조절인자인 Drp-1의 발현이 증가한 것을 확인하였다. 그러나 2일 동안의 처리에도 불구하고 8-cell 단계 이후에서의 발현은 전혀 증가하지 않았다. TA9 (1 uM)를 처리한 군에서는 수정 이 후, 배반포 발달율이 그렇지 않은 비교군에 비해서 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 연구수행의 결과를 통해서 체외수정 및 배양과정에서의 미토콘드리아 dynamic 반응의 균형은 중요하며, 물질처리를 통하여 미토콘드리아 fission을 유도하였을 때, 배반포 단계까지 수정란의 발달율이 감소되면서 Drp-1의 발현이 동시에 증가한다는 사실을 확인하였다. 이는 Drp-1의 발현 증가는 배반포의 발달율과 배아의 품질과 직접적인 관련이 있다고 사료된다.

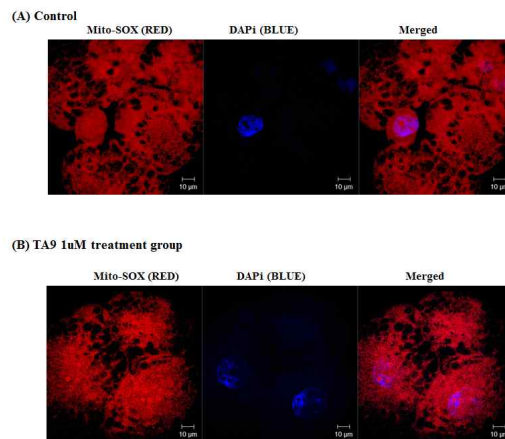


Fig 4. TA9 처리에 따른 4-8cell 단계의 배아에서 미토콘드리아 유래의 활성산소 확인.

초기배아 발달과정 및 동결전후의 배아의 품질평가를 위해 미토콘드리아 fission의 조절인자 Drp1의 발현의 변화를 이전의 연구수행을 통하여 관련성이 있다는 사실을 확인하였다. 미토콘드리아는 세포내에서 생체에너지로 알려진 ATP의 생산을 담당하는데, 이러한 과정에서 미토콘드리아는 활성산소를 생산하는 것으로 알려져 있다. MitoSOX™ Red reagent를 이용하여 살아있는 세포의 미토콘드리아 유래의 superoxide를 MitoSOX™ Red reagent 산화를 통하여 적색 형광으로 표적할 수 있다. 우리는 이 염색 기법을 이용하여 돼지의 초기 배아 4-8cell 단계에서 미토콘드리아 유래의 ROS인 superoxide를 변화를 확인하였다. 미토콘드리아 dynamics중에서 fission을 유도하는 TA9를 처리한 배아와 처리하지 않은 비교군의 배아에서 각각의 염색을 진행하였다(Fig 4). 그 결과, 미토콘드리아 fission을 유도하여 Drp-1의 단백질 수준의 발현이 증가되었던 처리군에서는 MitoSOX™ Red 형광이 증가한 것을 확인하였다. 이러한 결과를 통하여 미토콘드리아 유래의 활성산소의 증가를 통해서 미토콘드리아 fission이 유도되면서 Drp-1이 증가 되었을 것으로 유추할 수 있다. 또한, 미토콘드리아 dynamic중 fission의 조절인자인 Drp-1의 발현차이가 미토콘드리아 유래의 활성산소에 영향을 받는다는 결과를 얻을 수 있었다.

연구수행을 통하여 우리는 돼지와 소의 초기 배아발달과정 및 동결전후의 품질을 평가하는 기준으로써의 미토콘드리아 dynamic 조절인자인 Drp-1의 발현을 단백질 수준에서 비교하

었다. 세포소기관 중 소포체에서 발생하는 소포체스트레스의 스트레스 마커인 Grp78/Bip의 발현은 동결배양액 및 용해액에 PLL이 첨가되었을 때, 유의적인 차이를 보인 Drp-1유전자 발현 패턴과 달리 일반적인 배양액을 사용한 배반포에서는 발현 차이가 없음을 확인하였다.

또한, 3년차 연구에서는 TA9 물질처리를 통하여 미토콘드리아 dynamic중 fission을 유도하였을 때, Drp-1 유전자의 발현 증가를 통해서 배양액에 처리하여도 배아와 배반포 자체의 단백질적 변화를 일으킨다는 사실을 확인하였다. 미토콘드리아 fission의 조절인자 Drp-1의 발현의 변화가 배아 및 동결수정란의 품질평가에 미치는 구체적인 메커니즘을 확인하고자 미토콘드리아 유래의 ROS의 발현을 형광염색을 통하여 진행하였다. 이를 통해서 동결수정란 및 초기배아의 발달과정에서는 미토콘드리아 유래의 활성산소 및 미토콘드리아 dynamic의 균형이 유지되어야 하며, 이를 Drp-1이라는 유전자의 발현을 통하여 확인할 수 있었다. 이러한 연구 수행의 결과를 기반으로, 초기배아와 동결전후의 동결수정란에서의 품질 평가에서 Drp-1의 유전자의 발현, 미토콘드리아의 분포도 및 미토콘드리아 유래의 활성산소가 새로운 평가기준으로써의 역할이 충분히 가능하다고 사료된다.

[제 2세부]

○ OPU유래 자우의 유전/육종가와 표현형 비교분석

- 2차년도에 우수한 공란우의 선정으로 우량한 후대 생산(총 16두의 자우를 생산하였으나 관리소홀로 인하여 4두가 유산 및 폐사, 분만실패하고 암송아지 7두, 수송아지 5두 사육하고 있음, 생시체중이 기존(인공수정) 생산되는 개체들(25-27 kg)과 비교했을 때 약 3-7 kg정도 우수한 후대 생산

- 혈통을 이용한 능력 분석결과 12개월령 체중은 상대적으로 낮게 추정 되었지만 나머지 형질에서는 지역의 개량방향과 일치하는 것으로 나타났고, 우수한 결과를 나타내었음, 지역의 평균과 비교했을 때 도체중과 등심단면적, 등지방두께, 근내지방도 등 형질에서 OPU유래 자우가 매우 우수한 것으로 나타났고, 이는 공란우 및 씨수소의 선발시에 중점적으로 고려한 결과로 사료된다. 해당 개체들은 등심단면적과 근내지방도의 개량에 우선 순위를 두고 공란우 선발 및 계획교배를 실시하였다. 차후 공란우 선발 시에도 개량방향과 농가에서 우선적으로 요구하는 사항을 잘 고려하여 선발 및 계획교배를 실시할 필요가 있을 것으로 사료된다.

Table 1. OPU유래와 타 지역 자우의 평균능력 비교

번호	개체 번호	공란우정보	아버지 정보	혈통을 이용한 능력(EBV) 추정결과				
				성장형질 12개월 체중(kg)	도체형질			
					도체중 (kg)	등심단면 적(cm ²)	등지방두 께 (mm)	근내지방도 (score)
1	002095916651	000201103326	KPN881	-3.356	8.914	9.856	-1.428	1.312
2	002095921278	000201103326	KPN881	-3.356	8.914	9.856	-1.428	1.312
3	002095921497	000201103326	KPN881	-3.356	8.914	9.856	-1.428	1.312
4	002095921501	000201103326	KPN881	-3.356	8.914	9.856	-1.428	1.312
5	002099234933	002026147241	KPN828	18.154	22.156	8.435	-1.537	1.214
6	002099234941	002063493017	KPN881	3.388	18.340	11.256	-1.285	1.627
7	002099240501	000201103326	KPN881	-3.356	8.914	9.856	-1.428	1.312
8	002099240510	002054473555	KPN881	7.669	20.392	10.659	-0.580	1.658
9	002099241432	000201103326	KPN881	-3.356	8.914	9.856	-1.428	1.312
10	002099241465	000201103326	KPN881	-3.356	8.914	9.856	-1.428	1.312
11	002099241631	002063493017	KPN881	3.388	18.340	11.256	-1.285	1.627
12	002099241640	002063493017	KPN881	3.388	18.340	11.256	-1.285	1.627
OPU유래 자우 평균능력				1.041	13.331	10.155	-1.331	1.411
지역평균능력 (암소검정사업 참여 대상우 기준)				8.427	8.283	2.683	-0.381	0.664

○ 자우의 친자감별을 통한 유전능력의 정확한 평가와 등록의 정확성 확보

- 생산되는 자우에 대해서는 친자감정을 실시하였고, 진주를 비롯한 수정란이식 사업을 진행한 다른 지역의 친자감정결과를 함께 살펴본 결과 100% 일치하는 것으로 나타남.



Fig. 1. 모근채취 방법.

○ 자우의 표현형 자료 비교분석

- 기존(인공수정)에 생산되고 있는 개체와 비교했을 때 외형적으로 골격이 크고 우수함, 생시 체중은 3 ~ 7kg정도의 차이를 보이고 있는 것으로 나타남

Table 2. OPU 유래 자우의 정보와 생시체중

송아지이표번호	생년월일	성별	수란우	공란우	아비정보	생시체중 (kg)
002095916651	2015-02-12	수	002076922193	000201103326	KPN881	32
002095921278	2015-03-13	암	002076928973	000201103326	KPN881	30
002095921497	2015-02-03	암	002076929710	000201103326	KPN881	29
002095921501	2015-02-07	수	002060368940	000201103326	KPN881	33
002099234933	2015-04-17	수	002079454094	002026147241	KPN828	35
002099234941	2015-04-15	암	002076928211	002063493017	KPN881	29
002099240501	2015-03-08	암	002079485973	000201103326	KPN881	29
002099240510	2015-03-09	암	002063485092	002054473555	KPN881	28
002099241432	2015-04-05	수	002071772171	000201103326	KPN881	33
002099241465	2015-04-05	암	002076933389	000201103326	KPN881	28
002099241631	2015-03-30	수	002086528889	002063493017	KPN881	33
002099241640	2015-03-25	암	002079475009	002063493017	KPN881	28
수송아지평균						33.2
암송아지평균						28.7
전체평균						30.5



Fig. 2. OPU유래 수정란 이식으로 생산된 자우.

○ 자우의 공란우로서의 활용 가능성 검토

1차년도에 수정란이식으로 태어난 암송아지 9두의 혈통을 이용해서 추정된 유전능력은 지역의 평균보다 우수한 수준으로 공란우 대상우로 지정하여도 무방할 것으로 사료되고 표현형적으로도 또래집단보다 체장 및 체고 등의 성장 상태가 우수한 것으로 나타나고 있다. 아직 20개월령 미만의 개체이기 때문에 발육 및 성장상태를 좀 더 두고 봐야 할 것으로 사료되지만 현재의 동기그룹에서는 공란우로서의 가능성은 충분할 것으로 사료됨.

또한 현재 생산된 자우들은 혈통의 정확성도 확보가 가능하고 현재 생산되고 있는 우수한 씨수소를 선정하여 적절한 계획교배를 실시한다면 우수한 후대생산이 가능할 것으로 사료됨.

Table 3. OPU유래 자우의 평균능력 비교

번호	개체번호	공란우정보	아버지정보	혈통을 이용한 능력(EBV) 추정결과				
				성장형질	도체형질			
				12개월 체중(kg)	도체중(kg)	등심 단면적(cm ²)	등지방 두께(mm)	근내지방도(score)
1	2307426163	2003745299	KPN768	9.62	8.02	2.25	-0.42	1.12
2	2307426171	2003745299	KPN768	9.62	8.02	2.25	-0.42	1.12
3	2307430496	2003745299	KPN768	9.62	8.02	2.25	-0.42	1.12
4	2307430540	2003745299	KPN768	9.62	8.02	2.25	-0.42	1.12
5	2307430558	2003745299	KPN768	9.62	8.02	2.25	-0.42	1.12
6	2307430566	2003745299	KPN768	9.62	8.02	2.25	-0.42	1.12
7	2307430679	2062623615	KPN768	6.01	6.34	0.25	-0.38	1.38
8	2307430687	2062623615	KPN768	6.01	6.34	0.25	-0.38	1.38
9	2308027257	2062623615	KPN768	6.01	6.34	0.25	-0.38	1.38



Fig. 3. OPU유래 수정란 이식으로 생산된 자우들의 육성기간 모습.

○ 우량 밀소 집단 구축을 통한 개량효율 극대화

OPU유래 수정란 이식을 실시한 농가 중 몇몇 농가를 선별하여 1차년도에 14두, 2차년도에 12두의 송아지의 암수비율을 확인하였으며 암수 비율은 암송아지가 16두, 수송아지가 10두로 나타났다. 현재 생산된 암송아지를 잘 관리하여 관외로의 유출을 막고 지역에서 잘 활용한다면 기존에 가지고 있는 개량된 집단과 더불어 우량 밀소 집단을 구축하는데 많은 도움이 될 것으로 사료된다. 하지만 아직 우량 밀소의 기반이 턱없이 부족한 상황으로 지속적인 개량사업을 통하여 우량 밀소 생산 시스템을 잘 구축해 놓을 필요가 있고 수정란이식을 통하여 빠른 시일내에 집단을 구축하는 방법과 우수한 씨수소의 수급을 통한 적절한 계획교배가 이루어져야 할 것으로 사료된다. 이러한 시스템이 정착된다면 개량의 속도 및 효율이 극대화될 것으로 사료됨.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

가. [1년차]

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2012) :	직접 이식을 위한 Straw 내 수정란 동결기술 개발 및 OPU유래 수정란 생산 공급	Straw 내 수정란 동결기술 개발	100	-Attachment embryo in straw 방법을 개발하여 동결보존액의 용적을 최소한으로 줄임으로써 동결용해속도를 극대화를 시킴과 동시에 0.25 ml straw 내에 loading 시킴으로서 직접 이식이 가능한 동결보존방법을 개발하였음
		동결속도 증가를 위한 straw 내 loading방법 개발과 최적의 volume 비교분석	100	-Conventional straw loading과 attachment straw loading, droplet 방법을 이용한 동결 수정란의 생존율 및 발달능력의 비교. Re-expanded embryos의 total cell증가와 apoptosis에 관한 데이터 분석하였음
		직접 이식가능한 수정란 동결기술 개발	90	-0.3 M sucrose 용액과 수정란을 포함한 vitrification II 의 straw 내 one-step dilution을 이용한 straw 수정란 동결기술로 field에 direct 이식 가능한 동결 straw 개발하였음
		OPU 유래 수정란 이식효율을 위한 수정란 이식	100	-OPU 유래 수정란 이식효율을 알아보기 위하여 대리모 50두를 대상으로 수정란 이식을 실시하였음
	유전자발현과 세포 소기관 형태학적 비교 분석에 의한 동결수정란의 질적 향상 및 평가기준 정립	수정란의 유전자 분석에 의한 질적 수준 평가기술 확립	100	-품질에 좋은 것과 나쁜 수정란의 다양한 유전자 발현 비교 분석에 의한 수정란의 질적 평가기술 확립하였음
	공란우와 대리모의 선발과 자우의 능력 검정	수정란의 세포 소기관의 손상 평가기술 확립	100	-동결 용해 후 수정란의 세포 소기관의 비교분석기술 확립하였음
		유전/육종가, 선형심사, 후대검정 등에 의한 공란우의 선발기준 제시(능력평가 및 후대검정)	100	-3계대 이상의 고등 등록된 우량 암소를 확보하고 공란우 후보들에 대한 혈통 자료를 이용하여 유전능력을 추정하였음

	대리모 질병검사, 번식기관 정상성을 고려한 선발기준정립		-수란우 관리 농가를 선정하기 위해서는 기준에 의거하여 결정하였음
--	--------------------------------	--	--------------------------------------

나. [2년차]

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2014)	직접 이식을 위한 Straw 내 수정란동결기술 개발 및 OPU 유래 수정란 생산공급	소수정란 직접 이식 법 개발	100	-본 연구팀은 attached straw 로딩방법을 개발하여 소수정란의 직접이식 가능한 동결방법을 정립하였다. 그러나 attached straw는 표면이 매우 매끄러워 로딩이 쉽지가 않았음 -이러한 문제점을 보완하기 위하여 straw 내벽에 약간의 구조적 변경만으로 동결수정란의 로딩을 더욱 용이하게 하여 동결효율을 극대화시키기 위한 modified attachment straw를 개발하였음
		PLL 동결보존액의 적정 조성 조건 정립	100	-일본 Kazuaki 등(2009)이 개발한 PLL 마우스 동결보존 농도에서 modified하여 소수정란의 동결에 사용할 수 있는 세포 내성 동결보호제 Ethylene glycol (EG)과 세포 외성형태로 세포막을 보호작용하는 PLL과 혼합하여 적정 조성비를 정립하였음
		독성영향 최소화위한 PLL노출시간, 농도 조건 정립	100	-PLL 동결은 총 3단계를 거치는데 이 중 vitrification 2 solution의 조성은 PLL과 EG를 각각 1:1의 비율로 희석하였고 Vitrification 1 solution은 vitrification 2 solution의 양에 비례한 절반으로 희석하여 단계적인 동결이 되도록 하여 동결시 수정란이 입는 데미지를 최소한으로 줄일 수 있도록 하였음 -노출시간은 5, 10, 15분 동안

				vitrification 1의 노출 평형시간을 비교 하였고 vitrification 2에 옮겨 1분 이내에 동결하였음
		동결 및 용해의 적정온도 및 희석시간 정립	100	-동결보호제는 분자량이 크고 삼투압이 높기 때문에 warming 되어 있는 환경에서는 더욱 독성이 심하게 나타나고 세포가 입는 데미지 또한 큼 -PLL 혼합 동결보호제는 실온 상태로 사용하여도 무방하다. 희석시간은 소에 직접 이식 시술 시간을 감안하여 2분 이내에 이식할 수 있도록 하였음
		OPU유래 동결수정란 이식 후 착상율과 임신율에 비교	90	-수정란 이식은 2014년 4월부터 실시하였으며 신선란 50개, 동결수정란 50개를 실시하였으며 수태율은 각각 56%(28두), 32%(16두)로 확인되었다. 동결 straw 이식은 9월까지 자연발정우 대상으로 9두에 이식을 실시하였으며 수태율은 33.3%(3두)로 확인되었음
동결보존액에 따른 수정란 질적 평가를 위한 유전자발현과 세포 소기관 손상 극복도 비교분석		공초점 형광현미경을 이용한 동결보존방법에 따른 수정란의 질적 평가를 위한 세포 소기관의 형태학적 변화 확인 및 비교 분석.	100	-동결수정란의 세포 소기관 (미토콘드리아) 관찰하기 위해서 mito -tracker를 이용하여 미토콘드리아를 염색하여 공초점주사전자현미경(Confocal)을 통하여 확인. 미토콘드리아의 길이와 형태학적 변화에 분석을 통하여 손상 극복 메커니즘을 통한 평가기준을 확립
		동결보존방법에 따른 동결수정란에서의 세포소기관 손상을 확인하기 위해서 western blotting을 이용하여 단백질 수준에서의 발현 변화 확인.	100	-수정란의 품질에 따른 미토콘드리아 dynamic factor들의 발현 패턴 확인. (fission과 fusion의 다양한 marker들의 발현을 확인함으로써 인해서 극복 메커니즘과 미토콘드리아와의 길이의 분석평가)
공란우와 대리모의 선발과 자우	OPU유래 자우의 유전/육종가와 표현형 비교분석		100	-우수한 공란우의 선정으로 우량한 후대 생산(총 17두 생산,

의 능력 검증			100	암송아지9두, 수송아지5두 사육 중, 3두 유산 및 폐사) -생시체중이 약 3-5 kg정도 우수한 후대 생산
		자우의 친자감별을 통한 유전능력의 정확한 평가와 등록의 정확성 확보	100	-자우 친자확인을 실시 계획 -타지역의 경우 OPU유래 자우의 친자검정결과 100% 일치
		자우의 표현형 자료 비교분석	100	-외형적으로 골격이 크고 우수함 -생시체중은 3-5 kg정도의 차이 나타남

다. [3년차]

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 년도 (2014)	직접 이식을 위한 Straw 내 수정란동결기술 개발 및 OPU 유래 수정란 생산공급	인공수정같이 자연발정대리모에 직접이식방법 최적화	100	-대리모에 수정란을 이식하기 위하여 신선란 67개, 동결 straw 수정란 27개를 생산하여 대리모에 이식을 실시하였음 -신선란은 동기화 처리군에, 동결 straw 수정란은 자연방정우군에 이식을 실시하였음
		직접이식을 위한 용해 후 희석방법의 정립	100	-vitrification solution 및 dilution solution의 독성의 영향을 확인하기 위하여 외기 노출시간을 5분, 10, 15분으로 용해 후 24시간 배양하였음 -그 결과 모든 그룹에서 생존하였으나 10분 처리구에서 높은 부화율(90.5%)를 확인하였음
		용해 후 이식까지 노출시간에 따른 수태율 조사	90	-수정란 용해 후 이식까지의 10~15분 정도 걸리는 시간을 감안하여 10분, 15분으로 나누어 이식을 실시하였음 -그 결과 10분 노출에서 45.4%, 15분 노출에서 30.0%의 수태율을 확인한 결과와 비교하여 최소한의 노출시간을 가지는 것이 이식 후 임신율에 직접적인 영향을 미칠 것으로 판단됨
		동결수정란 이식숫자/수태율	90	-동결 Straw 수정란을 이식한

		상관관계 비교분석		<p>결과 2차년도 9두 중 수태율 3두(33.3%), 3차년도 21두 중 8두(38.1%)의 결과를 확인하였음</p> <p>-신선란 이식과 비교 시 신선란 56.0%, 동결 straw 수정란이 38.1%로 확인하였음</p> <p>-동결 staw 수정란은 신선란에 비하여 수태율이 낮은 것을 확인하였으며 차후 연구를 통하여 동결 straw 직접이식의 수태율을 향상 시킬 수 있을 것으로 사료됨</p>
동결보존액에 따른 동결. 용해 수정란의 품질 평가를 세포 소기관 관련 유전자의 단백질 수준에서의 발현 패턴 분석 및 미토콘드리아 유래의 활성산소와의 상관관계 확인.		<p>기존 동결 보존액, 그리고 PLL처리동결보존액에서의 동결수정란의 품질평가분석을 위해서 미토콘드리아 dynamics 조절인자 및 세포 소기관 관련 유전자들의 발현을 확인</p>	100	<p>-동결수정란의 세포 소기관 (소포체) 관련 유전자의 발현을 관찰하기 위해서 소포체스트레스 마커유전자의 발현을 단백질 수준에서 확인하였음</p> <p>-신선 SCNT의 동결 보존, 용해 이후 수정란으로부터의 세포 소기관 (미토콘드리아 dynamic 조절인자)의 발현을 western blotting 분석으로 질적 평가를 위한 기준을 확립하였음</p>
		<p>동결 보존 이후, 신선란 (IVF)과 SCNT의 배아에서 미토콘드리아 dynamics 조절인자의 발현차이 확인 및 배반포 생산과정에서의 배아품질과 미토콘드리아 fission의 상관관계확인</p>	100	<p>-미토콘드리아 dynamics가 수정란의 품질평가기준으로써의 역할을 입증하기 위해서 미토콘드리아 fission을 돼지의 초기 배아발달과정에서 유도하여 미토콘드리아 유래의 활성산소 증가</p> <p>-이를 통해서 수정란의 미토콘드리아 dynamic 조절인자의 발현은 미토콘드리아유래의 활성산소를 통한 새로운 품질 평가 기준으로써의 역할 규명 및 가능성 확인하였음</p>
공란우와 대리모의 선발과 자우의 능력 검정		자우의 공란우로서의 활용 가능성 검정		<p>-1차년도에 수정란이식으로 태어난 암송아지 9두의 혈통을 이용해서 추정된 유전능력은 지역의 평균보다 우수한 수준으로 공란우 대상으로 지정하여도 무</p>

			<p>방할 것으로 사료되고 표현형적으로도 또래집단보다 체장 및 체고 등의 성장 상태가 우수한 것으로 나타남. 20개월령 미만의 개체이기 때문에 발육 및 성장상태를 좀 더 두고 봐야 할 것으로 사료되지만 현재의 동기 그룹에서는 공란우로써의 가능성은 충분할 것으로 사료됨</p>
		<p>우량 밀소 집단 구축을 통한 개량효율 극대화</p>	<p>100</p> <p>-OPU유래 수정란 이식을 실시한 농가 중 몇몇 농가를 선별하여 1차년도에 14두, 2차년도에 12두의 송아지의 암수비율을 확인하였으며 암송아지가 16두, 수송아지가 10두로 나타났다. 현재 생산된 암송아지를 잘 관리하여 관외로의 유출을 막고 지역에서 잘 활용한다면 기존의 개량 집단과 더불어 우량 밀소 집단을 구축하는데 많은 도움이 될 것으로 사료됨</p>

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1절. 연구개발의 성과

1. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내 외 구분	SCI구 분
		주저자	교신저 자	공동저자				
2013	Testicular hyperthermia induces Unfolded Protein Response signalling activation	Jun-Hak Kim, Sun-Ji Park	Dong-S eok Lee	Tae-Shin Kim, Hyo-Jin Park, Junghyung Park, Bo kyung Kim	Biochemical and Biophysical Research Communications (BBRC)	434(4) 861-866	국외	SCI
2013	Peroxiredoxin I is a ROS/p38 MAPK-dependent inducible antioxidant that regulates NF- κ B-mediated iNOS induction and microglial activation.	Sun-Uk Kim, Young-Ho Park, Ju-Sik Min,	Sang-H o Lee, Dong-S eok Lee	Hu-Nan Sun, Ying-Hao Han, Jin-Mei Hua, Tae-Hoon Lee, Sang-Rae Lee, Kyu-Tae Chang, Sang Won Kang, Jin-Man Kim, Dae-Yeul Yu	Journal of Neuroimmunology	259(1-2): 26-36	국외	SCI
2013	Development of New Vitrification Method for Preimplantation Mouse Embryo	A-Na Ha	Il-Keun Kong	Md. Fakruzzaman, Kyeong-Lim Lee, Er-Dan Wang, Jae-Ik Lee, Chan-Sik Min	Journal of embryo transfer	28(2): 141-147	국내	비SCI
2013	Mitochondrial content and gene expression profiles in oocyte -derived embryos of cattle selected on the basis of brilliant cresyl blue staining	Md. Fakruzz aman	Il-Keun Kong	Jae-Il Bang, Kyeong-Lim Lee, Seong-Su Kim , A-Na Ha, Nasser Ghanem, Chang-Hee Han, Kyu-Woan Cho, Kenneth L. White	Animal reproduction science	142(1): 19-27	국외	SCI
2013	Coculturing cumulus oocyte complexes with denuded oocytes alters zona pellucida ultrastructure in in vitro matured bovine oocytes	Byung-H yun Choi	Il-Keun Kong	Jae-Il Bang, Jin-Jong In, Seong-Su Kim, Hyun-Tae Jo, Gautam Kumar Deb, Nasser Ghanem, Kyu-Woan Cho	Theriogenology	80(9): 1117-23	국외	SCI
2014	OPU 유래 한우 수정란 생산 및 이식	Jin-Jong In	Il-Keun Kong	Byung-Hyun Choi, Seong-Su Kim, Hyun-Tae Jo, Du-Won Sun, Hyun-Tae Lim, Jung-Gyu Lee, Chan-Sik Min	Journal of embryo transfer	29(3): 273-281	국내	비SCI
2014	Metalloproteinase 2	Kyeong-	Il-Keun	Er-Dan Wang,	Journal of	48(3):	국내	비SCI

	and -9 in Medium Improve the Development Competence and Expression of Target Genes of Bovine in vitro Produced Embryos	Lim Lee, Md. Fakruzzaman	Kong	Seong-Su Kim, A-Na Ha, Chan-Sik Min	Agriculture & Life science	121-130		
2014	Effects of Flunixin Meglumine and Prostaglandin F2a Treatments on the Development and Quality of Bovine Embryos in vitro	Seong-Su Kim	Il-Keun Kong	Jae-Il Bang, Md. Fakruzzaman, Kyeong-Lim Lee, Dae-Hwan Go, Nasser Ghanem, Zhongde Wang	Reproduction in Domestic animals	49(6): 957-963	국외	SCI
2014	mLTC-1 세포에 hCG 처리에 의해 유도된 소포체 스트레스가 IRE1/XBP1 경로의 활성화 유발	Sun-Ji Park	Dong-Seok Lee	Tae-Sin Kim	Journal of life science	24(10): 1039-45	국내	비SCI
2014	Development of a modified straw method for vitrification of in vitro-produced bovine blastocysts and various genes expression in between the methods	A-Na Ha	Il-Keun Kong	Sang-Ryeul Lee, Jeong-Seon Jeon, Han-Seul Park, Sang-Ho Lee, Jong-In Jin, Benjamin R. Sessions, Zhongde Wang, Kenneth L. White	Cryobiology	68(1): 57-64	국외	SCI
2014	Postthaw survival of in vitro-produced bovine blastocysts loaded onto the inner surface of a plastic vitrification straw	A-Na Ha	Il-Keun Kong	Han-Seul Park, Jin-Jong In, Sang-Ho Lee, Dae-Hwan Go, Dong-Seok Lee, K.L. White	Theriogenology	81(3): 467-473	국외	SCI
2014	Dominant Role of Peroxiredoxin/JNK Axis in Stemness Regulation During Neurogenesis from Embryonic Stem Cells	Sun-Uk Kim,	Dong-Seok Lee	Young-Ho Park, Jin-Man Kim, Hu-Nan Sun, In-Sung Song, Song Mei Huang, Sang-Hee Lee, Jung-Il Chae, Su Hong, Sung Sik Choi, Seung-Cheol Choi, Tae-Hoon Lee, Sang Won Kang, Sue Goo Rhee, Kyu-Tae Chang, Sang Ho Lee4, Dae-Yeul Yu*	Stem cells	32(4): 998-1011	국외	SCI
2014	Unfolding protein response signaling is involved in	Hyo-Jin Park,		Deog-Bon Koo, Il-Keun Kong, Min Kyu Kim, Jin-Man Kim,	Biochemical and Biophysical	441(2): 344-350	국외	SCI

	development, maintenance, and regression of the corpus luteum during the bovine estrous cycle	Sun-Ji Park	Dong-S eok Leec,	Myung-Sook Choi, Young-Ho Park, Sun-Uk Kim, Kyu-Tae Chang, Choon-Keun Park, Jung-Il Chae	Research Communications(BBRC)			
2015	Loss of mitofusin 2 links beta-amyloid-mediated mitochondrial fragmentation and Cdk5-induced oxidative stress in neuron cells	Jung-hy ung Park	Dong-S eok Lee	Hoon-sung Choi, Ju-Sik Min, Bo-Kyung Kim, Sang-Rae Lee, Jong-Won Yun, Myung-Sook Choi, Kyu-Tae Chang	Journal of Neurochemistry	132(6): 687-702	국외	SCI
2015	Mitochondrial ROS govern the LPS-induced pro-inflammatory response in microglia cells by regulating MAPK and NF- κ B pathways	Jung-hy ung Park	Dong-S eok Lee	Ju-Sik Min, Bokyung Kim, Un-Bin Chae, Jong-Won Yun, Myung-Sook Choi, Il-Keun Kong, Kyu-Tae Chang	Neuroscience letters	584: 191-196	국외	SCI

2. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2013.09	유리화동결을 위한 변형된 스트로우 로딩방법 및 이의 이용	공 일 근, 하 아 나, 김 성 수, 박 한 슬, 이경림	대한민국	10-2013-0108028	2014.04	미토콘드리아 특이적으로 형광능이 부여된 퇴행성 뇌질환에 대한 약물 검출용 형질전환체 및 이를 이용한 약물 검출 방법	이 동 석, 김 정 학, 최 훈 성, 박 정 형, 민주식, 박 선 지	대한민국	10-1390158
2015.05	체세포 핵치환에 의한 클로닝 배아 줄기세포에 지속적 미토콘드리아 표적 형광 및 V5 표지된 단백질 발현 방법 및 분포 분석방법 개발	이 동 석, 민 성 훈, 박 효 진, 구 덕 본	대한민국	10-2015-0067976	2015.04	유리화동결을 위한 변형된 스트로우 로딩방법 및 이의 이용	공일근, 하아나, 김성수, 박한슬, 이경림	대한민국	10-1510946

2014.06	항산화효소 피옥시데독신 II 제거 배아줄기세포를 이용한 신경세포 분화기술	이 동 석 , 박 영 호 , 김 선 욱	대한민국	10-2014-0072382					
---------	------------------------------------------	-----------------------	------	-----------------	--	--	--	--	--

2절. 성과 활용 계획

- 우량한우 집단구축으로 고부가가치 창출 및 지속 가능한 한우산업 육성기반 구축
- 우량한우 Donor Station 구축하여 고급육 수정란 생산 및 공급 체계 구축
- 우량한우 수정란의 대량생산으로 Embryo Banking 가능할 뿐만 아니라 유전자 보존 가능
- 동결·융해수정란의 수정 최적화 및 불량 수정란의 제거 기술 개발은 본 연구의 대상인 한우 뿐 만아니라 멸종 및 보호 동물의 수정란의 보존방법을 제시 가능.
- 우량한우 수정란을 대량 생산 및 동결수정란 등의 저장기술을 활용하여 전국적인 공급체계 구축하여 수정란 공급센터 체계 구축
- 단위지자체, 축협 및 지역별 한우사업단의 특징적 유전자원 한우집단구축으로 특화된 브랜드 정착
- 직접 이식 가능한 수정란동결기술 국내특허등록으로 기술이전료 확보 및 저비용 수정란 이식 산업화
- 수정란 국제무역: 고능력우 젖소의 국제 수출 가능함. 아시아권의 경제성장 및 우유소비 확대에 따른 젖소 사육두수 급격히 증가. 주문형 수정란 생산 및 수출위한 동결기술 활용 용이할 것임

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당사항 없음.

제 7 장 연구시설·장비 현황

- 해당사항 없으며 모두 기존 장비로 연구하였음

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

1. 실험실 안전점검 실시

「연구실 안전 환경 조성에 관한 법률」에 의거 일상점검, 정기점검, 특별안전점검, 정밀안전진단을 실시

1) 일상점검

연구개발활동 전 연구 개발활동에 사용되는 실험 약품 및 장비의 이상 유무 점검

- 기간: 년 중
- 실시자: 연구 활동 종사자
- 내용: 실험실별 특성에 맞는 점검표 작성 후 점검 실시

2) 정기점검

실험실 안전점검 체계에 따라 매년 정기점검실시

- 기간: 매월 첫 주 수요일
- 실시자: 연구실 책임자 및 담당자
- 내용: 실험실 안전점검 프로그램을 사용하여 분야별 항목 점검

3) 특별안전점검

폭발사고, 화재사고 등 연구 활동 종사자의 안전에 치명적인 위험을 야기할 가능성이 있을 것으로 예상되는 경우에 연구실 책임자의 지시에 의해 실시

- 기간: 년중 필요시
- 실시자: 연구실 책임자
- 내용: 위험요인별 점검

4) 정밀안전진단

정기점검 실시 후 도출된 위해요인에 대하여 외부 전문기관에 진단을 의뢰하여 위해요인의 개선방향 및 안전관리방안 수립

- 기간: 2014년 11월
- 실시자: 외부전문 진단기관
- 내용: 정기점검 후 선정된 중점 점검항목 및 연안법에 규정된 점검항목 진단

제 9 장 참고문헌

1. Armstrong DT, Irvine BJ, Earl CR, McLean D and Seamark RF. 1994. Gonadotrophin stimulation regimens for follicular aspiration and *in vitro* embryo production from calf oocytes. *Theriogenology* 42: 1227-36.
2. Bols PEJ, Vandenheede JMM, Van Soom A and de Kruif A. 1995. Transvaginal ovum pick up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. *Theriogenology* 43: 677-87.
3. Boni R, Roviello S and Zicarelli L. 1996. Repeated ovum pick up in Italian mediterranean buffalo cows. *Theriogenology* 46: 899-909.
4. Bruck I, Synnestvedt B and Greve T. 1997. Repeated transvaginal oocyte aspiration in unstimulated and FSH-treated mares. *Theriogenology* 47: 1157-67.
5. Fry RC, Simpson TL and Squires TJ. 1998. Ultrasonically guided transvaginal oocyte recovery from calves treated with or without GnRH. *Theriogenology* 49: 1077-82.
6. Garcia A and Salaheddine M. 1998. Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. *Theriogenology* 50: 575-85.
7. Guyader Joly C, Ponchon S, Thuard JM, Durand M, Nibart M, Marquant-Le Guienne B and Humblot P. 1997. Effect of superovulation on repeated ultrasound guided oocyte collection and *in vitro* embryo production in pregnant heifers. *Theriogenology* 47: 157.
8. Irvine B, Armstrong DT, Earl C, McLean D and Seamark RF. 1993. Follicle development and oocyte recovery from calves with repeated gonadotropin stimulation and follicular aspiration. *Theriogenology* 39: 237.
9. Martino A, Songsasen N and Leibo SP. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes by ultra-rapid cooling. *Biol. Reprod.* 54: 1059-69.
10. Schenk JL, Suh TK, Cran DG and Seidel GE Jr. 1999. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology* 52(8): 1375-91.
11. Spikings EC, Alderson J and St John JC. 2007. Regulated mitochondrial DNA replication during oocyte maturation is essential for successful porcine embryonic development. *Biol. Reprod.* 76: 327-335.
12. Suh TK, Schenk JL and Seidel GE Jr. 2005. High pressure flow cytometric sorting damages sperm. *Theriogenology* 64(5): 1035-48.
13. Vajta G, Booth PJ, Holm P, Grave T and Callesen H. 1997. Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. *Cryo-letters* 18: 191-5.
14. Van Blerkom J. 2011. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. *Mitochondrion* 11: 797-813.
15. Vincent C, Garnier V, Heyman Y and Renard JP. 1989. Solvent effects on cytoskeletal

- organization and *in-vivo* survival after freezing of rabbit oocytes. J. Reprod. Fertil. 87: 809-20.
16. Wakai T, Harada Y, Miyado K, Kono T. 2014. Mitochondrial dynamics controlled by mitofusins define organelle positioning and movement during mouse oocyte maturation, Molecular Human Reproduction 20: 1090-1100.
 17. Yeon JY, Min SH, Park H, Kim JW, Lee YH, Park SY, Jeong PS, Park H, Lee DS, Kim SU, Chang KT, Koo DB. 2015. Mdivi-1, mitochondrial fission inhibitor, impairs developmental competence and mitochondrial function of embryos and cells in pigs. The Journal of reproduction and development 61: 81-89.
 18. 박성재, 양보석, 임기순, 성환후, 양병철, 장원경, 정일정, 정기화, 심보웅, 양별철. 2000, Effect of Ovum Pick-up Frequency on *In Vitro* Production of Embryos in Hanwoo Cattle. Korean J. Emb. Trans. 15: 1-8.
 19. 박희성, 이지삼, 진동인, 박준규, 홍승표, 이명열, 정장용. 2001. Practical Applications of DNA Marker-Assisted Selection and OPU-Derived IVF Embryo Transfer for the Production of High Quality Meat in Hanwoo II. Production of IVF Embryos Derived Transvaginal Ovum Pick-up from DNA Marker-Proved Hanwoo. Korean J. Emb. Trans. 16: 193-201.
 20. 손우진, 강태영, 조성근, 심보웅, 최민철, 최상용, 박충생, 이효중. 1998. Study on *In Vitro* Bovine Embryo Production with Follicular Oocytes Obtained via Ultrasound-guided Ovum Pick-up (OPU) and Slaughterhouse-derived (SHD) Ovary Aspiration in Korean Native Cows. Korean J. Emb. Trans. 13: 107-15.
 21. 윤기영, 이병천, 황우석, 김현일, 노상호, 이강남. 1997, Transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in cattle. 대한수의학회지. 37: 917-24.
 22. 이병천, 윤기영, 김현일, 노상호, 이강남, 황우석. 1997. Clinics: Transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in cattle: 1. Effects of estrus cycle, season and bST treatment on ovum pick-up in cattle. 대한수의학회지. 37: 917-9.
 23. 이병천. 1998. Transvaginal Ultrasound-guided Ovum Pick-up (OPU) in Cattle 2. First OPU-IVF Derived Calves Born from Pregnant Cow in Korea. Korean J. Emb. Trans. 13: 77-86.
 24. 진종인, 권태현, 최병현, 김성수, 조현태, 공일근. 2010. Effect of OPU (Ovum Pick-Up) Duration on the Rate of Collected Ova and *In Vitro* Produced Blastocyst Formation. Korean J. Emb. Trans. 25: 15-20.
 25. 진종인, 홍승표, 정장용, 이지삼, 박희성. 2000. Study on Ovum Pick-up (OPU) with Finger-Sensibility using Oocyte Recovery in Holstein Heifers. Korean J. Emb. Trans. 15: 279-86.
 26. 최민철, 조성근, 강태영, 박준규, 손우진, 이효중. 1997. Development of basic techniques for ultrasound-guided follicular aspiration; anesthetic methods and development of a disposable simplified needle guidance system for ovum pick-up. Korean J. Emb. Trans. 12: 211-8.
 27. 황우석, 신태영, 노상호, 박종임, 이병천. 1998. Clinics : Induction of twinning in Korean native cattle by transfer of nuclear transplanted embryos: 2. Nuclear transfer using donor

embryos originated from ovum pick-up (OPU) and activated recipient cytoplasts. 대한수의
학회. 16: 145-52.

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 중요부문은 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.
- 차. <첨부>자료는 협약 시 연구계획서 별첨으로 제출한 특허, 논문 및 시장분석보고서를 기준으로 연구 완료 후 변동 내용을 작성하시기 바랍니다.

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 수정란이식의 산업화 적용을 위한 수정란 동결기술 개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 수정란이식의 산업화 적용을 위한 수정란 동결기술 개발의 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/m² 양면 아트지
 - 나. 내용 80g/m² 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.