

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001361-01

농가 맞춤형 신개념 수정란
이식 기술 프로그램 개발 및 산업화
Development of New Embryo
Transfer Program for Livestock Farmers

충북대학교 산학협력단

농림수산식품자료실



0003896

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “농가 맞춤형 신개념 수정란 이식 기술 프로그램 개발 및 산업화에 관한 연구” 과제 (세부과제 “농가 맞춤형 신개념 수정란 이식 기술 프로그램 개발 및 산업화”와 협동과제 “고효율의 체외수정란 생산 및 수태율 향상 이식기술 개발”에 관한 연구)의 보고서로 제출합니다.

2012년 4월 9일

주관연구기관명 : 충북대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 김 남 형

세부연구책임자 : 김 남 형

연 구 원 : 김 관 석

연 구 원 : 황 규 찬

연 구 원 : 김 영 훈

연 구 원 : 허 영 남

연 구 원 : 박 원 준

연 구 원 : 이 승 은

연 구 원 : 이 영 화

연 구 원 : 이 성 현

연 구 원 : 왕 경 령

연 구 원 : 최 현 용

연 구 원 : 이 슬 기

연 구 원 : 고 위 위

연 구 원 : 이 지 선

협동연구기관명 : 공주대학교 산학협력단

협동연구책임자 : 이 종 완

연 구 원 : 윤 도 중

연 구 원 : 신 옥 희

요 약 문

I. 제 목

농가 맞춤형 신개념 수정란 이식 기술 프로그램 개발 및 산업화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 농가에서 필요로 하는 최적 수정란 이식 기술 개발을 하고자 첨단 생명공학 기술과 전통 번식기술을 결합하여 수정란이식 프로그램을 개발하고자 한다.

1. 경제적 측면

한우 산업은 우리나라 전체 축산물 생산액의 30% 이상으로 경제적 부가가치가 높은 산업으로 농가 소득 및 농촌경제에 주요 기간산업이고 현재 FTA, 미국산 쇠고기 및 외국 소 수입, 소비자들의 식품 안정성 및 고급육의 선호도 증가에 따른 한우의 국제 경쟁력 제고가 절실한 실정이다. 유우사육농가의 경우 현재 난관에 봉착해있는 낙농산업에 한우 수정란을 이식하여 낙농가들의 수익을 증대시킬 방법으로 품질 보증된 한우 체외수정란의 이식이 필요한 실정이지만 체계적인 수정란 이식 프로그램의 부재로 말미암아 수정란 이식 효율이 외국에 비해 현저히 낮고, 우량 한우 생산 체계가 미흡한 실정이다.

2. 산업적 측면

기존의 낙농산업의 후퇴와 함께 젓소에 한우수정란을 이식하여 농가의 소득 증대를 도모하고 있지만, 영세 수정란 이식소의 난립과 지방 축산 연구 기관의 주먹구구식인 수정란 이식 기술 보급으로 농가의 수입 증대에 크게 기여하고 있지 않으며 2004년도 한우 사육농가 설문조사 결과 조속해결 요구사안 과제로 수정란 이식기술의 효율성향상이 시급히 요청되고 있고 또한 수정란 이식 기술과 함께 청정 보증 수정란 제도 도입이 시급히 요청되고 있는 상황에서 무분별한 체외수정란의 생산으로 한우의 혈통관리와 개량이 혼선을 빚을 우려가 있다.

3. 기술적 측면

우량한 유전형질을 갖춘 개체의 체외수정란 생산 시 생산효율을 높이고 건강한 수정란을 생산하기 위해 체외수정 과정과 방법들을 비교하여 최적의 우량 수정란 생산 체계 마련이 시급하고 수정란 이식에서 수정란의 발육단계와 수란우의 적절한 조합, 이식방법의 재조명, 수정란 이식 시 이식된 수정란의 착상에 저해되는 수란우의 체내반응을 감소 내지 제거하여 착상율을 증대시키는 방법을 확립하여 안정적인 수태율과 분만율의 확립 표준화된 수정란 이식 프로그램 개발이 절실히 요구된다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 과제의 특성상 보증 수정란 생산체계 확립 (연구실 차원)과 수태율 향상을 위한 프로그램 개발 (농가현장중심)으로 나누어 추진하지만 신개념 수정란 이식 개발 프로그램 확보 차원으로 통합 조율하면서 추진하려한다.

1. 보증 수정란 생산 체계 확립

- 난자의 유전자 발현을 조사하여 착상률 극대화된 수정란 생산
- 소복제 수정란의 제외배양
- 육량, 육질관련 우량 보증 한우 수정란 생산
- 간편 유전자 검사 기술 확보 및 유전자 진단에 의한 보증 한우 수정란 생산
- 난소의 유전자 검사에 의한 한우품종 보증 수정란 생산
- 수정란 성감별에 의한 맞춤 쌍태 유기 기술 개발

2. 수태율 향상을 위한 프로그램 개발

- 체외수정란 생산방법 중 최상의 체외수정방법 확립
- 수란우의 안정을 위한 호르몬 및 약제 투여에 의한 착상률 향상 프로그램
- 최고의 수태율과 분만율을 얻기 위한 이식수정란의 수 결정
- 이식용 용액의 최적조건 결정
- 인위적 쌍태유기로 농가소득 증대방법 개발

IV. 연구개발결과

1. 난자의 유전자 발현을 조사하여 착상률 극대화된 수정란 생산 및 소복제 수정란의 제외배양

- 배분활율과 배달달율에 대한 조사
- 세포수와 세포사멸에 대한 조사
- 세포사멸 및 분화관련 유전자 발현의 분석
- microRNA 분석
- 면역형광염색법 분석

2. 육질관련 우량한우 수정란 생산(육질 관련 유전자 마커 (Fatty acid synthase FASN) 을 이용한 우량 한우 품질 보증 수정란 생산에 대한 결과

- 소의 FASN 유전자 염기서열 분석
- 한우 및 젖소의 난소로부터 유전자 분석을 실시

3. 최외 배양 조건 개선을 통한 수정란 생산 효율 개선에 대한 결과

- FBS, FAF-BSA를 배양액에 첨가 시 초기 발생을 조사
- 발생배양 후 확장 배반포까지 발육을 비교분석

- 혈청 첨가에 따른 발육된 배반포 동결 및 융해 후 생존율을 비교
4. 간편 유전자 검사 기술 확보 및 유전자 진단에 의한 보증 한우 수정란 생산
 - E-Prep을 이용한 DNA 분리 및 진단기술 개발
 - E-Prep으로 DNA분리하여 Real-time RT-PCR 기법으로 유전자 발현 조사
 5. 체외 배양 조건 개선에 의한 최적의 수정란 생산 기반 구축
 - 혈청 배지로부터 유래된 문제점들 분석
 - 시험 디자인과 mRNA 증폭과정 분석
 - IVD101과 CR1aa에서 차이 나게 발현되는 유전자들의 동정분석 및 분류
 6. 수정란 성감별에 의한 맞춤 쌍태 유기 기술 개발
 - Amelogenin PCR 방법을 이용한 성감별법 구축
 - 수태율 향상을 위한 황체영양물질 주사에 따른 이식기술 개선결과분석
 7. 수태율 향상을 위한 황체영양물질 주사에 따른 이식기술 개선결과
 - 황체영양물질(hCG, FM)을 젖소 처녀우를 대상으로 한우 체외수정란의 이식에 적용한 연구 결과분석
 - 발정제 귀울에서 hCG처리군의 개체들이 FM처리군과 대조군에 비교해 다른 양상분석
 - 수정란 이식시에 Lidocane을 처리하고 또한 FM처리를 하여 두 군간 수태율을 비교분석
 8. 수태율향상을 위한 이식용액의 개발과 이식수정란의 수 결정과 농가수익을 위한 인위적 쌍자생산
 - 수태율향상을 위한 이식용액의 개발
 - 수태율과 분만율 향상을 위한 유우 경산우 및 처녀우에 따른 이식수정란의 수 결정
 - 농가소득을 높이기 위한 한우 경산우에서 인위적 쌍자 생산

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 과제는 2009년 6월에 시작한 과제로써, 3차년도로 진행한바 다음과 같이 국내 연구 논문 3편(한국수정란이식학회지)와 국외논문(cloning and Stem cells, 출간) 1편의 연구 성과를 얻었다. 일부 연구 성과는 본 과제가 시작되기 전에 수행한 예비연구결과가 포함되어 있으나 본 과제의 지원을 통해 완성되었음을 밝혀둔다. 본 연구에서 얻어진 결과들은 이미 국제 SCI 학술 저널지에 등재되어 국내외로 활용할 수 있다.

SUMMARY

(영문요약문)

The Object of This Research

The roles and expectations for embryo transfer can be accomplished by using the best method to greatly proliferate females with excellent genetic abilities. Therefore, embryo transfer (ET) derived from *in vivo* and *in vitro* has great effect on animal improvement and superagencies reproduction. For this reason, *in vitro* fertilization (IVF) has been extensively studied and applied, but the *in vitro* produced bovine embryos are not up to that of *in vivo* produced embryos in many respects. In many species, production of *in vitro* fertilized embryo is dependent on the intrinsic quality of oocyte and the culture environment of the fertilized oocyte, and thus the research of culture media is one of the most important parts. And, in the field, the pregnancy rate of ET with *in vitro* fertilized (IVF) embryos is low compared to artificial insemination. Also, an increase in pregnancy rates by using external corpus luteum (CL)-affecting substances may considerably contribute to the roles and expected results of ET. Moreover, trials of ET in the field would be the worst through whole applications of ET. Moreover, security and proliferation of the cows that have superior gene and certified of Hanwoo characteristics would be maximized results of ET, and on the basis of this results, if there is the applications of transformed animal production for new drugs and organ, the value of hope will be such things as we cannot even imagine.

In this research, we substituted BSA for serum which has been conventionally used for the bovine IVF culture solution and produced IVF Hanwoo (Korean native beef cattle) embryos within a simple culture solution excluding the nutrients such as hormones, growth factors and essential and nonessential amino acids. In this process, we compared the development ratio (to 4cells), blastocyst formation rate, and pregnancy rate after ET depending on the culture conditions as well as the abnormality ratio of the newborn calf and post-thaw survival ratio of the frozen blastocysts. This study was performed to find and confirm convenient and appropriate culture methods to avoid the complications such as the overweight calf syndrome which is known to be caused from serum addition, to enhance the quality and production efficiency of the blastocyst, and to increase the pregnancy rate.

And, this research were to find methods that are able to increase pregnancy rates

following ET. Thus, this study compared pregnancy rates and sought to establish a method for increasing final pregnancy rate by increasing plasma P4 concentration with hCG treatment and inhibiting the production and secretion of PGF_{2α} by FM treatment. Also, on the expectation of increased pregnancy rates, we compared pregnancy rates following FM and Lidocaine treatment in order to establish the clinical viability of our method.

Finally, this research was conducted with the purpose of exploring ways to increase the results of ET in the actual use of Hanwoo (Korean native cattle) IVF embryos with Holstein cows (multiparae), heifers (nulliparae) and Hanwoo cows. That is, to discover a suitable number of embryos that positively influences the pregnancy rate of ET, a method of artificial induction of twins. Accordingly, the transfer of fresh embryos is an important tool to increase the probability of pregnancy of lactating Holstein cows because it can bypass the negative effects of milk production and low P4 on the early embryo. In addition, there is the added purpose of comparing the PR according to the state of the uterus and ovaries(i.e. corpus luteum; CL), in order to reveal how the state of these affects the pregnancy rate.

The Results of This Research

1. Investigation of Gene Revelation, production of Embryos maximized Productivity, and *in vitro* Culture of Cloned Embryos.

1). Investigation of the percentage of cell differentiation and blastocyst formation.

There is no difference in differentiation rates when the TSA-treated group is compared with non-treated groups that consist of the IVF group, NT group and the pathenogenesis group. There were also no differences in development when the TSA-treated group was compared to IVF embryos, with a range from 31 to 36%. However, the forming rate of blastocysts was significantly higher in the pathenogenesis group (47%) than in the other groups.

2). Analysis of apoptosis and the revelation of the gene related to differentiation

The expression of four apoptosis-related genes was measured: Bcl-xL, Bax, Casp3, and surviving. Finally, expression of the four apoptotic-related miRNA-15, -16, -21, and -34 genes was determined. We found that expression of apoptotic-related genes changed according to TSA treatment (Fig. 4B). High expression of the anti-apoptotic gene Bcl-xL and low expression of the pro-apoptotic gene Bax may contribute to reduced apoptosis of total and ICM cells in NT-TSA blastocysts compared to those in NT embryos.

2. Production of Superior Hanwoo Embryos related Meat Quality (by Fatty acid synthase FASN)

Fatty acid composition of meat is becoming more important due to consumer demand for high quality and healthy foods. The present study evaluated the associations of five candidate genes (FABP4, FASN, NR1H3, GH and SCD) with fatty acid composition in Korean cattle (Hanwoo). The g.3691G > A single nucleotide polymorphism (SNP) in the FABP4 gene had significant effects on high myristic acid (C14:0; $P < 0.01$) and palmitic (C16:0; $P < 0.05$) in animals having the GG genotype, and high arachidonic acid (C20:4; $P < 0.05$) in the AA genotype of Hanwoo. The FASN SNP at position g.17924G > A was also significantly associated with myristic acid ($P < 0.01$). In case of the SCD gene, a significant effect was only observed in myristoleic acid (C14:1; $P < 0.01$). However, SNPs in GH and NR1H3 genes showed no effects on fatty acid composition. The results indicate that SNPs in three candidate genes, FABP4, FASN and SCD, may be influential in breeding design for fatty acid composition in Hanwoo. The FASN gene in cows is located on the 19th chromosome and consists of 42 exons and 41 introns. We carried out a sequence analysis with ovaries from Hanwoo or dairy cows from a slaughter house. As with the results preceding this research, we found 15 SNP from ovary samples from Hanwoo or dairy cows. When we compared the results of the sequence analysis of FASN with that had been reported previously in <http://www.ensembl.org/> and <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>, 9 SNP was confirmed as newly founded. Therefore, we will use the 9 SNP for the production of guaranteed Hanwoo embryos, and have a reduced analysis time (less than 12h), and there will be an inquiry into the lineage of registered or unregistered cows at the time of the next phase of research.

3. Production of HANWOO IVF Embryos with Serum-free Media

When using serum or BSA-containing culture media as the initial culture media for immature oocytes, it is regarded as inappropriate to add only BSA to the culture solutions from maturation of the immature oocytes to development 4-cell stage culture, but serum still needs be added though there is no significant difference in the concentration with a change from 5% to 10%. The results of culturing IVF embryos after development (4-cell stage) in the Medium199 solutions containing BSA instead of serum (FBS) showed that 0.3% BSA concentration is not optimal and 0.5% or higher BSA concentration has no significant difference among 0.5%, 0.7%, 1% and 2% ($p > 0.05$). The post-freezing survival ratio after development in 5% FBS-Medium199 showed that 1% BSA concentration of the culture solution is the most suitable in the BSA concentrations of 0.3% (51%), 0.5% (67%), 0.7% (69%), 1% (77%) and 2% (75%).

The pregnancy rates of the transplanted fresh(not frozen) blastocyst had no significant concentration dependency ($p>0.5$), and the average pregnancy rate was 63.8%. 14% of overweight calves were found among the calves given birth to by the transfer of IVF blastocysts cultured in the serum-added culture solution, but none was found in the experimental groups in which BSA was added instead of serum.

4. Security of Simple Gene Analysis Technique and Production of Assured Hanwoo Embryo with Gene Diagnosis

The verification process of genes that are revealed to be differential expression with E-prep and utilized by RT-PCR application are as follows: Because the quantum of mRNA separated from the ovaries is limited, then it is impossible that we can confirm the genes by the Northern Blot method. We verified the DEGs from the embryos cultured with serum free media (IVD101) and serum media (CR1aa) by RT-PCR. In the results that we verified, 9 up-regulating genes (*HMT*, *CTGF*, *HOXA9*, *CLGN*, *ARHGAP24*, *NUDT11*, *COL27A1*, *NDAJC12* and *NRG1*) and 22 down-regulating genes (*DHDH*, *PGK1*, *BNIP3*, *PLEKHO2*, *ACAT2*, *DLX4*, *HNF4A*, *CLN8*, *ASS1*, *HMGCS1*, *IMMP2L*, *ENPP3*, *DHCR24*, *PDZK1*, *NID1*, *CYP551A1*, *BOLA*, *CDKN1C*, *LDHA*, *SCD*, and *CAV1*) in IVD101 samples by RT-PCR were recorded, there are some differences in the grade compared with microarray, but there is reappearance in the revelation of DEGs. Consequently, in this research, we were able to confirm that the DEGs obtained with microarray have a valuable meaning.

5. Global Gene Expression in Bovine Fertilized Embryos and Parthenotes

We found 42 genes with more highly expression in IVD samples than CR1aa samples, while 65 genes were more highly expressed in CR1aa samples. *BHMT* (betaine-homocysteine methyltransferase) and *CTGF* (connective tissue growth factor) are two particularly interesting genes highly expressed in IVD embryos but not CR1aa embryos. this research results showed that electron binding-related genes and cytoskeleton-related genes could be used to indicators to assess quality of bovine pre-implantation embryo before embryo transfer. Among up-regulated genes in IVD blastocyst embryos, *BHMT* and *CTGF* are important candidates and indicators to assess quality for *in vitro* development of bovine pre-implantation embryos.

6. Development of Technology for Artificial Twins Induction following Embryos Sexing

Establish of embryo sexing with amelogenin PCR

An examination of the two groups that are classified with sexual dimorphism would result in different expectations and be correct when they are sorted by PCR. Genomic

DNA was classified from the two groups where a morphological difference was seen: the XX-blastocyst candidate and XY-blastocyst candidate. The sexing method was used for verification with Amelogenin PCR for a more accurate PCR sexing.

Moreover, blastocyst stage embryos of 7d after IVF were transferred and they were grouped into two classes of the XX-embryo candidate and the XY-embryo candidate with sexual dimorphism. In the results, high pregnancy rates were expected with 12 (23.1%) out of 52 for the XX-embryo and 25 out of 64 embryos expected for the XY-embryo.

7. Methods enhancing Pregnancy Rates with hCG, FM and lidocaine

30-day pregnancy rate was 76.7% in the hCG-treated group and 75.7% in the FM-treated group. Both rates were higher than the 70% rate for the control group. 42-day pregnancy rate was 76.7% in the FM-treated group. This was higher than 66.7% recorded for both the hCG-treated and control groups. The pregnancy rate of the hCG-treated group was high at Day 30 (76.7%) but low at Day 40 (66.7%), and there were no differences from the FM-treated and control groups. The recurrent estrus rate of infertile individuals at 2 weeks after ET was 36.4% in the hCG-treated group, under 71.4% in the FM-treated group and 80.0% in the control group. The non-pregnancy rate of individuals without recurrent estrus was 18.2% in the hCG-treated group, which was higher than the 0% rate in both the FM-treated and control groups. The pregnancy rates were higher in the FM-treated group than the Lidocaine-treated group with 72.3% versus 67.5% in the heifers and 48.9% versus 43.6% in the cows.

8. ET trials of HANWOO IVF Embryos for Farmers

The conception rate according to the number of embryos transferred from cows was 36.8%, 53.0%, 50.5% for 1, 2, and 3 embryos respectively, and although there was a higher frequency of twin calves with 3 embryos than with 2, the calving rate was the highest with 2 embryos. In case of heifers, the transfer of 1 embryo showed the best success and calving rate, and although the conception rate was similar with 2 embryos (67.7 versus 66.4), in case of 2 embryos transferred there was high frequency of embryonic loss(6.1%) occurred when a cow was diagnosed at 28 and 53d after ET, total loss (21.3%; sum of fetal death, abortion and stillbirth after pregnant diagnosis at 60day). According to the type transfer medium, in case of time over 1h required the conception rate was 7.8%, 58.1%, 46.8%, 52.2% for 10% FBS, 20% FBS, 0.5% BSA, and 0.7% BSA respectively, showing the best conception rate with 20% FBS.

CONTENTS

Chapter 1. Summary of Research	14
The economical side	14
The industrial side	14
The technical side	15
 Chapter 2. The Present State of Development of ET Technology of Inside and Outside the Country	16
The present state related technique of inside the country	16
The present state related technique of outside the country	16
 Chapter 3. Contents and Results of Research	19
Section 1. Contents of Research	19
1. Production of embryo maximized productivity with investigation of gene revelation	19
2. Production of superior Hanwoo embryo with the gene associated to meat quality (by Fatty acid synthase FASN)	21
3. Improvement of production efficiency for IVP or cloned embryo by improvement of in vitro culture conditions	22
4. Security of simple gene diagnosis technique and production of assured Hanwoo embryo with gene diagnosis	23
5. Global gene expression in the bovine IVF embryos and the Parthenotes	24
6. Development of technology for twins induction with embryo sexing	25
7. Research for methods enhancing PR with luteotrophins treatment	25
8. ET trials of Hanwoo IVF embryos for farmers	25
Section 2. Results of Research	26
1. Investigation of gene revelation, production of embryo productivity maximized, and in vitro culture of cloned embryo	26
2. Results of research for production of superior Hanwoo embryo with the gene associated to meat quality (by Fatty acid synthase FASN)	30
3. Results of research for improvement of production efficiency for embryo by improvement of in vitro culture conditions (Production of Hanwoo IVF Embryos	

with Serum-free media)	31
4. Security of simple gene diagnosis technique and production of assured Hanwoo embryo with gene diagnosis	33
5. Global gene expression in the bovine IVF embryos and the parthenotes	35
6. Development of technology for twins induction with embryo sexing	49
7. Results of research for methods enhancing PR with luteotrophin treatment	51
8. Development of transfer-medium for PR improvement, determination of adequate number of transferred embryo and artificial twins induction for farmers income	54
 Chapter 4. Attainments and Contribution of This Research	 57
 Chapter 5. Results of Research and Plan of Application	 59
 Chapter 6. Information of Overseas Scientific Technique collected in Research	 60
 Chapter 7. Reference	 60

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	14
경제적 측면	14
산업적 측면	14
기술적 측면	15
제 2 장 국내외 기술개발 현황	16
국외 관련기술 현황	16
국내 관련기술 현황	16
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	19
제1절 연구개발수행 내용	19
1. 난자의 유전자 발현을 조사하여 착상률 극대화된 수정란 생산	19
2. 육질관련 우량한우 수정란 생산육질관련 유전자 마커 (Fatty acid synthase FASN, Calpain)을 이용한 우량 한우 품질 보증 수정란 생산	21
3. 체외 배양 조건 개선을 통한 수정란, 소 복제 수정란의 생산 효율 개선	22
4. 간편 유전자 검사 기술 확보 및 유전자 진단에 의한 보증 한우 수정란 생산	23
5. 체외 배양 조건 개선에 의한 최적의 수정란 생산 기반 구축	24
6. 수정란 성감별에 의한 맞춤형 쌍태 유기 기술 개발	25
7. 수정란 이식시 황체영양물질의 처리에따른 수태율 향상방법 연구	25
8. 한우체외수정란의 실제 농가에의 이용 연구	25
제2절. 연구개발수행 결과	26
1. 유전자 발현 조사 및 착상률 극대화된 수정란 생산 및 소 복제 수정란의 체외배양 ...	26
2. 육질관련 우량한우 수정란 생산육질 관련 유전자 마커 (Fatty acid synthase FASN)을 이용한 우량 한우 품질 보증 수정란 생산)에 대한 결과	30
3. 체외 배양 조건 개선을 통한 수정란 생산 효율 개선에 대한 결과	31
4. 간편 유전자 검사 기술 확보 및 유전자 진단에 의한 보증 한우 수정란 생산	33
5. 체외 배양 조건 개선에 의한 최적의 수정란 생산 기반 구축	35
6. 수정란 성감별에 의한 맞춤형 쌍태 유기 기술 개발	49
7. 수태율 향상을 위한 황체영양물질 주사에 따른 이식기술 개선결과	51
8. 수태율 향상을 위한 이식용액의 개발과 이식수정란의 수 결정과 농가수익을 위한 인위	

적 쌍자 생산	54
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	57
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	59
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	60
제 7 장 참고문헌	60

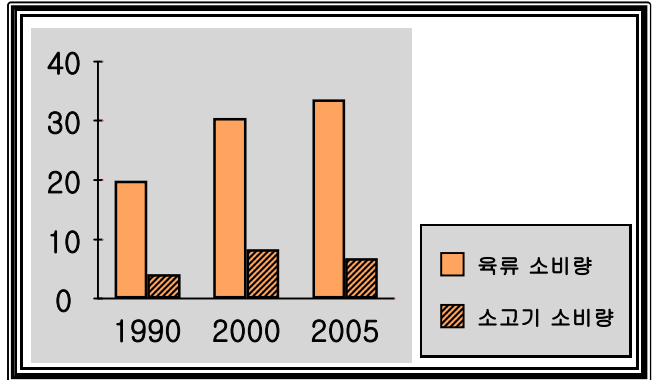
제 1 장 연구개발과제의 개요

<경제적 측면>

- 한우 산업은 우리나라 전체 축산물 생산액의 30% 이상으로 경제적 부가가치가 높은 산업으로 농가 소득 및 농촌 경제에 주요 기간산업임

동물성 식품 비율 (1인당 소비량)

- 최근 식문화의 서구화와 국민소득의 증가에 따라 동물성 식품의 비율이 우리들의 식단에서 더욱 높아지고 있는 추세이며 1990년대 1인당 육류 소비량을 살펴보면 1990년에 19.9kg, 2000년에는 30.5kg 2005년도 32.2 kg으로 꾸준한 증가를 보이고 있으며 이 중 또한 쇠고기 소비량도 1990년에 4.1kg에서, 2000년에는 8.4kg, 2005년에는 9.1kg 으로 증가되고 있음



- FTA, 미국산 쇠고기 및 외국 소 수입, 소비자들의 식품 안정성 및 고급육의 선호도 증가에 따른 한우의 국제 경쟁력 제고가 절실함

- 유우사육농가의 경우 현재 난관에 봉착해있는 낙농산업에 한우 수정란을 이식하여 낙농가들의 수익을 증대시킬 방법으로 품질 보증된 한우 제외수정란의 이식이 필요함

- 한우의 효율적이고 지속적인 개량 및 농가소득 증대를 위해서는 수정란 이식기술의 활용도 및 효율성을 높이고, 이와 함께 첨단 유전체 기술 (DNA 마커)의 적용이 필요함. 즉 유전형질을 검사하여 높은 유전형질을 갖춘 수정란을 생산하고 이를 이식함으로써 농가 수익증대에 기여

- 성감별 수정란의 생산으로 농가의 수익을 증대시킬 밑소의 증식이 필요하고 더불어 유전적으로 높은 형질을 갖춘 한우의 증식이 필요함

- 하지만, 체계적인 수정란 이식 프로그램의 부재로 말미암아 수정란 이식 효율이 외국에 비해 현저히 낮고 우량 한우 생산 체계가 미흡한 실정임

<산업적 측면>

- 기존의 낙농산업의 후퇴와 함께 젖소에 한우수정란을 이식하여 농가의 소득 증대를 도모하고 있지만, 영세 수정란 이식소의 난립과 지방 축산 연구 기관의 주먹구구식인 수정란 이식 기술 보급으로 농가의 수입 증대에 크게 기여하고 있지 않음

- 2004년도 한우 사육농가 설문조사 결과 조속해결 요구사안 과제로 수정란 이식기술의 효율성향상이 시

급히 요청되고 있음

- 또한 수정란 이식 기술과 함께 청정 보증 수정란 제도 도입이 시급히 요청되고 있음
- 무분별한 체외수정란의 생산으로 한우의 혈통관리와 개량이 혼선을 빚을 우려가 있음

<기술적 측면>

- 세계적으로 생명공학기술의 급속한 발전으로 저렴한 비용으로 유전자 분석을 통한 가축의 형질을 파악할 수 있음. 인간게놈프로젝트 및 가축생산에 관련된 유전체학 분야의 급속한 발전으로 가축의 주요 경제형질에 관련된 유전자 기능을 구명하여 해당 유전자를 산업에 적용하는 사례가 축산 분야에 주요 관심사임
- 축산 선진국의 경우 육량·육질 관련 유전자를 발굴하기 위하여 지난 십수년간 막대한 예산을 투입하여 실용화 할 수 있는 DNA 마커들을 지속적으로 발굴해왔으며, 이들을 이용할 경우 수정란이식 기술을 체계적으로 개선할 수 있을 것임
- 우량한 유전형질을 갖춘 개체의 체외수정란 생산 시 생산효율을 높이고 건강한 수정란을 생산하기 위해 체외수정 과정과 방법들을 비교하여 최적의 우량 수정란 생산 체계 마련이 시급함
- 수정란 이식에서 수정란의 발육단계와 수란우의 적절한 조합, 이식방법의 재조명으로 수정란 이식이 최우선으로 해결해야 할 높고 안정적인 수태율과 분만율의 확립
- 수정란 이식 시 이식된 수정란의 착상에 저해되는 수란우의 체내반응을 감소 내지 제거하여 착상율을 증대시키는 방법 관찰 및 확립
- 수정란이식에 이용되는 적절한 이식용 용액을 정립하여 표준화된 수정란 이식 프로그램 개발이 절실히 요구됨
- 이식한 수정란이 수란우의 자궁에 적응하여 착상이 되는 것은 수정란 이식의 성패를 좌우하는 중요한 요인이다. 따라서 수정란과 수란우의 발정일 차이는 중요하다. 일반적으로 발정일차가 ± 1 일의 범위로 수란우를 공용하고 있지만, 농가 맞춤형 수정란 이식 체계를 향상 시키면, 수정란 이식후 산자 생산율의 획기적인 향상을 얻을 수 있음
- 최근의 생명공학분야의 발전을 토대로 축산업계 또한 무한경쟁 체제에 돌입하였으며 이러한 새로운 환경에 보다 능동적으로 대처하기 위하여 다양한 신기술의 산업적인 적용이 필수라고 사료된다. 본 연구는 산업화 적용과 관련된 농가에 필요한 한국형 수정란 이식 프로그램을 수립코자 하고 본 프로그램 개발이 순조롭게 이루어지면 농가 소득 증대에 크게 기여 할 것임

제 2 장 국내외 기술개발 현황

<국외 관련기술 현황>

- 소 수정란 이식은 1970년대 초 캐나다에서 실용화 된 후, 북미와 유럽을 중심으로 많은 발전을 이루어 왔다. 소에서 수정란 이식은 유전적인 능력개량의 수단으로 폭 넓게 활용되었다. 즉 능력이 우수한 공란우를 과배란 처리, 수정란을 회수하여 능력이 낮은 집단에 이식, 우수한 능력을 보유하고 있는 송아지를 일시에 다량 생산하여 집단의 능력을 조기에 개량하는 MOET(Multiple Ovulation and Embryo Transfer)방법이 이용되고 있다.

- 미국 Holstein 협회에서 발행되는 Sire Summary에 상위 100위 이내 종모우 중에서 수정란 이식산 종모우가 약 70%를 차지하고 있듯이 수정란이식기술은 젖소에서 능력개량에 활용도는 매우 높다.

수정란 이식은 다음과 같은 장점이 있다.

- 1) 초우량 형질을 갖은 자성개체로부터 많은(열 마리 이상/년) 자축을 얻을 수 있다.
- 2) 혈통을 잃지 않고 질 높은 유전자의 판매를 늘려 이익을 획기적으로 증대시킬 수 있다.
- 3) 생산수명이 다한 우량축의 보존과 후대에 의해 우량생산성을 확대시킬 수 있다.
- 4) 농장군의 획기적인 개량이 가능하다.

- 수정란이식 후 수태율에 영향을 미치는 요인으로써 수정란의 발육 단계와 질(Linder and Wright, 1983; Humblot등, 1987), 발정동기화(Looney등, 1984), 수란우의 신체 충실도(Mapletoft 등, 1986) 및 이식 기술 등의 많은 요인이 관계되는 것으로 보고되어지고 있는데 이에 대한 연구와 현장에 적용할 수 있는 방법들의 정립이 미흡한 편이다.

<국내 관련기술 현황>

- 우리나라의 전통 한우에서도 마찬가지로 그 활용도 또한 대단히 높는데, 인공수정이 부계만의 능력을 전달하는 효과를 갖는 반면에 수정란 이식은 모계의 우수한 형질을 단기간 내에 다수의 후대에 전달하여 가축 개량효과를 극대화시킬 수 있는 기술이다. 이는 유전적 능력을 확인할 때까지 후대검정에 비해 4~6년 정도 단축할 수 있고 선발강도 또한 형매 검정법을 통해 높일 수 있다.

- 우리나라의 소 수정란이식은 1979년부터 고등(1981)에 의해 한우에서 비외과적으로 수정란의 채취와 이식시험이 이루어졌다. 젖소에서는 구와 정(1982)에 의해 1981년부터 수정란 회수와 이식시험을 실시하여 1두가 임신되었다고 보고 한 바가 있다.

- 수정란이식에 의해 최초의 송아지 생산은 정 등(1983)에 의해 1982년 11월 15일 샤로레 수란우에서 샤로레 송아지가 분만된 것이었다. 국내에서는 1980년대 초 과배란 유기에 대한 난소의

반응, 비외과적 수정란 회수와 이식시험이 집중적으로 이루어져 왔고, 국립종축원 등에서는 젖소의 능력개량 수단으로 외국으로부터 수정란을 도입하여 이식시험을 실시하여 왔으며, 1980년대 중반부터는 수정란의 동결시험이 이루어져 국내에서 소에서 채취한 수정란을 동결 보존하였다가 용해하여 이식한 수정란으로 송아지가 생산되기 시작하였다.

- 현재 국내 수정란이식 현황으로 농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장에서 산출한 2007년 도 자료는 수정란 이식 에 의한 한우 및 젖소 생산은 다음과 같다. 2007년도 국내에서 실시된 한우 및 젖소의 수정란이식 실태를 보자면, 한우 및 젖소의 수정란이식을 실시하고 있는 기관은 국립기관 2개소, 지방자치단체 9개소, 대학 1개소, 생산자단체 4개소, 개인시술소 162개소로 전체 178개소이었다.

표 1. 한우 및 젖소 수정란 생산 및 이식 기관 (국립 축산과학원, 2007)

국립기관	지방 자치단체	대학	생산자 단체	개인 시술소	합계
2	9	1	4	162	178

- 과배란 처리된 한우 645두 및 젖소 175두에서 수정란을 채란한 한우 561두 및 젖소 165두로부터 회수된 이식가능 수정란은 각각 3,098개 및 788개로 두당 평균 각각 5.55개 및 4.8개였다. 도축한우의 난소를 채취하여 체외수정으로 생산된 이식가능 수정란수는 27,889개 이었으며, 복제수정란도 1,203개를 생산하였다. 수정란이식에서 한우 수정란은 체내수정란 1,601두, 체외수정란 6,384두, 복제수정란 42두를 이식하였으며, 젖소 수정란은 체내수정란을 380두 이식하였다 (2007년 통계).

표 2. 체내 수정란 생산 현황

품종	채란우(두)	이식가능한 수정란(개)	평균(개)
한우	561	3,098	5.55
젖소	165	788	4.8

표 3. 한우 수정란 이식 현황(두)

체내 수정란	체외 수정란	복제 수정란
1,601	6,384	42

- 수정란의 상태별로 신선수정란 7,173두, 동결수정란 1,234두가 이식되었다. 수란우 품종에 따른 수정란이식은 한우 수정란을 한우 수란우에 1,964두, 젖소 수란우 6,063두가 이식되었고, 젖소 수정란은 젖소 수란우에 380두가 이식되었다. 수정란이식 형태별로는 수정란 1개 이식이 4,972두, 2개 이상 이식 3,160두, 인공수정 후 수정란 추가이식 275두 이었다.

표 4. 수정란 상태별 이식 현황(두)

신선 수정란	동결 수정란
7,173	1,234

표 5. 수란우 품종에 따른 수정란 이식 현황(두)

수란우	한우 수정란	젖소 수정란
한우	1,964	-
젖소	6,063	380

- 수정란이식 수태율은 체내 신선수정란 44.2%, 동결수정란 44.3%이었고, 체외수정란에서는 신선수정란 55.0%, 동결수정란 34.2%이었다. 따라서 2007년도 소 수정란 이식은 8,407두가 실시되었으며, 그 중 한우 수정란의 이식이 95.5%, 체외수정란이 75.9%, 한우 수정란을 젖소 수란우에 이식이 72.1%, 수정란 1개 이식은 59.1%이었으며 체외 신선수정란의 이식에서 수태율이 높게 나타났다.

표 6. 수정란 이식 후 수태율(%)

	체내 수정란	체외 수정란
신선 수정란	44.2	55.0
동결 수정란	34.3	34.2

- 이상에서 보는 바와 같이 국내 수정란 이식에서 수태율은 아직 30%대로 외국의 60-70%대와는 거리가 먼 형편이다. 체외수정란의 생산과정 및 이식과정에서 연구하고 개발해야 할 부분들이 아직 많다고 하겠다.

- 이런 활용도를 충족시키기 위해서는 우수한 수정란의 다량 확보가 필수적이므로 실험실에서 수정란의 다량 생산이 가능한 체외수정란 생산체계의 적용이 적극적으로 검토되어지고 있다. 또한 성감별 된 수정란의 이식은 수정란 단계에서 성을 판정하여 이식하기 때문에 축산 농가가 원하는 산자를 얻을 수 있어 가축의 생산성을 향상시킬 수 있으며 축산 경영의 효율성을 도모할 수 있는 획기적인 방법 중 하나이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 연구개발수행 내용

1. 난자의 유전자 발현을 조사하여 착상률 극대화된 수정란 생산

가. 체외성숙란의 체외수정

실험에 사용될 정액은 동결정액을 사용하며, 용해 후 운동성이 80%이상이고 기형율이 20%이하의 것만을 공시하였다. 소정자의 capacitation은 heparin 처리법으로 유도하기 위하여 원심분리를 하고, 배양기에서 10분간 swim-up방법을 이용하여 수정능 획득을 유도하였다. 체외성숙이 완료된 난포란은 수정능이 획득된 정자를 이용하여 수정을 유도하는데 이때 정자의 농도는 모두 5×10^5 /ml로 조절하며 이들 정자의 운동성은 80%이상의 것만을 사용하였다. 수정 후 18-20시간째에 난포란을 회수하여 신선 배양액으로 세척한 다음 체외배양용 배양액으로 옮겨 배발생을 유도하였다. 수정란의 배양은 기존의 배양액 Rosenkrans 등(1993)에 필수 및 비필수 아미노산을 첨가한 CR_{1aa}배양액을 이용하여 수정란의 배발달을 유도하면서 Leukemia Inhibiting Factor와 FBS의 첨가효과를 조사하였다.

나. 수정란 내 유전자 발현 확인

Messenger RNA 추출 및 cDNA 합성

Messenger RNA 추출은 Wrenzycki et al(1999)의 방법으로 Dynabeads mRNA Direct Kit를 사용하였다. 간략하게 설명하면 난자 또는 배아를 PBS에서 세척한 후 액체질소 또는 -80℃에 보관하였다가 사용하였다. 시료에 Lysis/Binding Buffer(100mM Tris-HCl, pH 7.5, 500mM LiCl, 10mM EDTA, 1% LiDS, 5mM DTT) 150 μ l를 넣어 세포를 용해시켰다.

다. 소의 귀(ear)로부터 세포를 분리하여 체세포 주를 확립하는 단계

성체의 귀 선단에서 떼어 낼 부위 주변의 체모를 깎고 소독용 알코올과 베타딘으로 소독한다. 멸균된 기구로 1~2cm 넓이의 피부 조직을 절제한 다음, 50ml 시험관에 PBS용액을 준비하여 절제된 조직을 넣어 4℃로 냉장 보관하여 실험실로 운반하였다. 실험실로 가져와서 다시 PBS용액으로 세정한 다음, 멸균된 집게로 고정한 후, 체모를 포함한 피부와 연골조직을 멸균된 가위나 칼날(blade)로 분리하여, 연골조직과 연한 피부내측 조직을 채취한다. 조직편을 다시 PBS용액으로 세정 후 칼날(blade)로 세절한 다음, trypsin-EDTA용액을 첨가하여 39℃, 5% CO₂의 포화습도 배양기 내에서 배양한다. 정치 후, 원심 분리용 시험관에 옮겨 와동(vortexing)과 피펫작업(pipetting) 후, PBS용액을 첨가하여 100xg에서 5분간 원심 세정한다. 최종 원심세정 후, 침전 세포를 10% FBS(GIBCO BRL사, Cat. No.:16141-079)가 첨가된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagles Medium, GIBCO BRL사, Cat. No.:12100-046)에 부유시킨 후, 세포 배양용 페트리디쉬로 옮겨 39℃, 5% CO₂의 포화습도 배양기 내에서 배양하였다. 세포가 배양접시 바닥면에 부착하여 분열 증식하여 단층이 형성되면 이를 1차 세포주의 성립으로 간주한다. 단층이 형성된 1차 세포주는 계대배양을 다음과 같이 실시한다. 페트리디쉬의 배양액을 버리고, 0.25% 트립신, 1 mM EDTA 용액을 첨가하여 3분 동안 정치 후, 10% FBS(GIBCO BRL사, Cat.

No.:16141-079)가 첨가된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagles Medium, GIBCO BRL사, Cat. No.:12100-046)이 들어있는 원심분리용 시험관으로 옮겨 800xg에서 5분간 원심분리 시킨다. 상등액을 버리고 새로운 DMEM(Dulbecco's Modified Eagles Medium, GIBCO BRL사, Cat. No.:12100-046)용액을 넣어 재부유시킨 후 적당량을 새로운 페트리디쉬에 분주한 후 배지를 첨가하여 39°C, 5% CO₂의 포화습도 배양기 내에서 배양하였다.

라. 난구세포 제거와 탈핵을 실시하는 단계

성숙시킨 난구세포로 둘러싸여 있는 수핵 난자는 미세조작을 위해 하이알루로니데이즈를 이용하여 난구세포를 제거해주었다. 탈핵을 위해 TCM199(GIBCO BRL사, Cat. No.: 12340)에 10% FBS(GIBCO BRL사, Cat. No.:16141-079)를 첨가한 배지로 작업용 디쉬에 미소적을 만든다. 작업용 디쉬를 조작판위에 위치하도록 놓은 다음, 고정용 피펫은 9시 방향에 위치시키고, 탈핵용 피펫은 3시 방향에 위치시킨다. 고정용 피펫을 흡입하여 난자를 약간 고정시킨 후, 조동나사와 미동나사를 이용하여 난자의 초점을 맞춘다. 탈핵용 피펫을 상하로 움직여 제 1극체와 초점이 같도록 맞춘다. 탈핵용 피펫을 투명대를 통해 찢러 넣어 제 1극체와 주변의 약간의 세포질을 흡입하여 제거하였다.

마. 미리 준비해 둔 공여세포를 탈핵된 난자에 이식하는 단계

이식을 위해 TCM199(GIBCO BRL사, Cat. No.: 12340) 배지로 작업용 디쉬에 미소적을 만들어 배양기에 넣어 놓는다. 탈핵이 끝나면 세정용 피펫을 이용하여 탈핵된 난자들을 이식용 배지로 옮긴다. 탈핵용 피펫을 이식용 피펫으로 바꾼 후, 7~8개의 공여세포를 주입한다. 탈핵시킬 때와 같은 방법으로 탈핵 시 생긴 절단부위를 3시 방향에 맞춘다. 이식용 피펫을 절단부위로 넣어 유압을 걸어 1개의 공여세포를 주입시킨다. 이식이 끝난 난자들을 전기융합 시까지 3회 세척 후 체외배양 배지에 넣어 정치시켰다.

바. 재구성란의 융합 및 활성화 단계

전기융합에는 만니톨 배지를 이용한다. 2개의 전극이 있는 작업용판(1mm chamber)에 만니톨을 60ul를 넣고 BTX-세포조작기와 연결시킨다. 세포융합은 직류전압으로 전압은 200V/mm이며, 횡수는 1회, 시간은 40us의 조건으로 융합시킨다. 융합시킨 난자들은 활성화시킬 때까지 체외배양 배지에서 배양시킨다. 융합 후 1시간째에 재구성된 난자들은 20mM 6-DMAP가 들어있는 체외배양배지에서 3시간동안 배양시켜 활성화시켰다.

사. 수정란 내 유전자 발현 확인

시료에 1pg의 rabbit globin mRNA를 본질적인 표준으로써 각각 넣어준다. 실온에서 5분동안 섞어준 후 Dynabeads Oligo (dT)25를 20 μ l를 용해된 세포가 들어있는 튜브에 각각 넣어주고 실온에서 5분 동안 상보적 결합을 이루어지도록 섞어준다. Beads는 Dynal MPC-S magnetic particle concentrator에 의해 분리되며, Washing bufferA(10mM Tris-Hcl, pH 7.5, 0.15M LiCl, 1mM EDTA, 0.1% LiDS)300 μ l로 두번 washing을 해주고 washing buffer B(10mM Tris-Hcl,

pH 7.5, 0.15M LiCl, 1mM EDTA) 150 μ l로 한번 washing을 해준다. Poly(A) RNAs는 65 $^{\circ}$ C에서 2분 동안 10 μ l의 Tris-HCl(10mM Tris-HCl, pH 7.5)과 함께 반응시킨 후 beads로부터 용출한다. 그리고 이 용출액은 역전사를 위해 즉시 사용되었다. 역전사는 0.5 μ g/ μ l oligo(dT) 12 18, 10XRT buffer(200mM Tris-HCl; pH 8.4, 500mM KCl), 25mM MgCl₂, 0.1M DTT, 10mM dNTPS Mix 그리고 Superscript II RT로 최종 볼륨 20 μ l에서 42 $^{\circ}$ C, 50분 동안 수행하였다.

아. 세포사멸 및 분화관련 유전자 발현의 분석

PCR Amplification 다중합 효소 연쇄 반응은 RT product 5 μ l로 수행되었다. 반응은 10XPCR buffer, Taq DNA polymerase 2.5units, 10mM dNTP, 10pM sequence-specific primers를 최종농도 50 μ l에서 GeneAmp PCR System 2700에서 수행한다. PCR cycle은 35 cycle이고 95 $^{\circ}$ CX5', 95 $^{\circ}$ CX30", 55 $^{\circ}$ CX1'30", 72 $^{\circ}$ CX1'30"이다. RT-PCR products는 1 μ l/ml ethidium bromide가 들어있는 1XTAE buffer로 1.5% agarose gels을 만들어 ultraviolet lightdkfo에서 관찰하였다. 각 band의 intensity는 image analysis program을 사용하여 densitometry로 측정하였다. mRNA의 상대적인 양은 globin을 standrd로 해서 상대적인 양을 구한다. 우리는 세포사멸에 관련된 유전자 Bcl-xL, Survivin, Bax 및 Caspase3 와 분화관련 유전자 Oct3/4, Sox2, Cdx2 및 c-fms의 유전자 발현을 조사하였다.

자. 세포수와 세포사멸에 대한 조사 및 microRNA 분석

Oct3/4 및 TUNEL assay를 동시에 수행하여 ICM, TE의 세포수와 세포사멸을 각각 조사하고 세포사멸에 관련된 microRNA mir-15, mir-16, mir-21과 mir-34a를 분석하였다.

2. 육질관련 우량한우 수정란 생산(육질관련 유전자 마커 (Fatty acid synthase FASN, Calpain) 을 이용한 우량 한우 품질 보증 수정란 생산)

가. 샘플 채취 및 DNA 추출

일반 한우 사육 농가에서 냉도체 판정 후 난소 조직에서 샘플을 채취하여 Gnomix DNA Prep Kit를 이용하여 DNA를 추출하였다. 조사된 형질로는 한우 등급판정결과의 도체형질인 도체중, 등지방두께, 육량지수, 육량등급, 육색, 지방색, 조직감, 성숙도, 육질, 육량 등급 등 항목에 대하여 실시하였다.

나. FASN 유전자 변이 탐색을 위한 PCR 및 염기서열분석

DNA증폭을 위해서 사용된 PCR 기계는 PTC-200 thermocycler 이며 DNA중합효소는 h-Taq polymerase를 사용하였다. PCR 반응조건은 최초 95 $^{\circ}$ C에서 15분간 예열가열 한 후 95 $^{\circ}$ C에서 20초 동안 변성시키고 각 primer에 대응하는 annealing 온도에서 20초 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 30초 합성 시키는 총 40사이클 반복증폭하고 72 $^{\circ}$ C에서 5분 마지막 합성단계를 수행하고 DNA 증폭을 중단한다. 증폭한 산물은 전기영동을 통하여 확인 한 후 GeneClean turbo Kit를 이용하여 정제한후 Applid Biomedicals 3730 DNA sequencer를 이용하여 염기서열 분석을 수행하였다.

다. High Resolution Melt (HRM) 시스템을 이용한 유전자형 결정

PCR 반응조건은 염기서열 분석을 통해 유전자형 알고 있는 Control DNA 3두와 유전자형을 모르는 주형 DNA 50ng, primer 0.1 uM, 2XSensiMix HRMTM 10 ul, 그리고 EvaGreen 0.5 ul 를 넣어 최종 반응액 20 ul을 이용하였다. 반응조건은 최초 95°C에서 15분간 예비가열 한 후 95°C에서 30초 동안 변성시키고 각 Primer에 대응하는 annealing 온도에서 30초 그리고 72°C에서 40초 합성 (extension)시키는 총 40 사이클 반복증폭하고 72°C에서 5분 마지막 합성단계 (final extension)를 수행하고 HRM 시스템을 이용하여 유전자형 결정을 하였다.

3. 최외 배양 조건 개선을 통한 수정란, 소 복제 수정란의 생산 효율 개선

가. COCs의 채취

한우의 난소를 도축장에서 바로 실험실로 운반하여 25°C의 생리식염수로 5회 이상 세척하고 같은 온도의 생리식염수에 담아 COCs(Cumulus Ooperus Complexs; 난자난구세포 복합체)의 채취를 준비하였다. COCs의 채취는 일회용 주사기(18G Needle)의 내통을 난자 세척용 용액으로 씻어서 내통안의 윤활제를 제거하고 직경2~7mm의 난포액을 흡입하였다. 흡입된 난포액은 10분 동안 정지하여 침전 시켰으며 상층액을 제거한 침전물을 난자세척용 용액이 담긴 60∅ Petri dish에 옮겨 세포질이 극히 저하된 COCs는 제외하고 나화난자를 포함하여 모든 COCs를 회수 하였다.

나. 미성숙 난자의 성숙

회수된 COCs는 세척액으로 3회 세척하면서 불필요한 난구세포를 제거한 후 성숙배지에 옮겨져 배양되었으며 배양조건은 38.5°C, 5%CO₂, 최대 습도화 된 공기 중에서 배양되었다. 성숙배지는 호르몬과 영양성분을 제외한 간단한 배양액을 사용하였는데 4Well dish(Nunc)에 900μl의 배양액을 넣고 250μl의 Mineral Oil을 덮어 사용하였으며 회수된 미성숙 COCs는 Well당 80~100개씩 넣어 이 성숙배지에서 22시간 배양되었다. 이때 사용한 배양액은 Medium199(Gipco)에 5%FBS와 Libostamycin 0.1mg/ml를 첨가하여 회수와 세척과정에 사용하였고 동 배양액에 EGF 30ng/ml(Sigma E4127)을 첨가하여 성숙배지에 사용하였다.

다. 체외수정

수정배지는 Brackett(1975)등과 같은 BO용액을 변형하여 사용하였는데 그 조성은 112.0mM NaCL, 4.02mM KCl, 2.25mM CaCl₂, 0.83mM NaH₂PO₄, 0.52mM MgCl₂·6H₂O, 25.0mM NaHCO₃, 1.25mM Na-Pyruvate, 13.9mM glucose, 10mg BSA(A3294)/ml였으며, 인체용 Libostamycin 100μg/ml를 첨가하여 사용하였다. 이 BO 액에 heparin 10μg/ml과 Caffeine 5mM/ml 첨가하여 수정용 BO액으로 사용하였고, COCs는 수정용 BO액에 3회 씻어 수정배지에 넣었다. 용해된 정액은 이 BO액에 10배 희석하여 1,600rpm으로 5분씩 3회 세척하여 수정배지에 넣었으며 수정배지내 활력있는 정충수를 1x10⁶/ml이 되게 하였다. 8시간 수정배지에서 배양된 난자는 5% FBS가 첨가된 Medium199 용액에서 3회 세척 한 후 미리 성숙용 배양액으로 50% 교환된 성숙배지에 다시 넣어 배양하였다.

라. 발생 후 수정란의 배양

수정 48시간 후에 4세포 이상 분할된 수정란만을 골라 각 실험에 따른 용액으로 교환된 배지에 넣어 배양되었고 48시간마다 농도별 배양액을 50%씩 교환해 주었으며 배양액의 종류별로 일령에 따른 성장상태를 기록하였다. 모든 수정란의 판별은 IETS(International Embryo Transfer Society) Guideline 에 근거 하였으며 배반포 이상으로 성장한 수정란은 바로 수란우에 이식하거나 동결하여 보관하였다.

마. 배반포수정란의 동결 및 용해 후 배양

수정 후 6~10일 사이에 정상적으로 발육한 배반포는 용해 후 생존율 실험을 위해 동결하였는데 동결액은 D-PBS에 Ethylene Glycol을 1.5M 농도로 넣어 사용하였다. 동결방법은 수정란을 상온에서 동결액에 10분 동안 정치하고 0.25ml straw에 5~10개의 배반포를 넣어 -7℃의 알콜 동결기에 바로 넣어 식빙한 후 -0.3℃/min 속도로 -30℃까지 냉각하여 액체질소에 침지하였다. 용해 후 생존율 검사를 위해 동결수정란은 35℃ 온수에서 30초 용해하여 20% FBS가 첨가된 Medium199 용액에서 3회 세척하고 같은 용액에 1시간 정치한 후 각기 동결 전 배양되었던 배양용액에 72시간 배양하면서 탈출 배반포에 도달하는 것을 관찰하였다.

4. 간편 유전자 검사 기술 확보 및 유전자 진단에 의한 보증 한우 수정란 생산

가. E-Prep을 이용한 DNA 분리 및 진단기술 개발

수정란으로부터 유전자 검사 시간 단축 (3-5시간 내)을 위해 E-Prep을 이용한 DNA 분리 및 진단기술로 진단함은 수정란의 생존율 및 단시간에 우수 수정란 확보에 여러 이익점이 있다. 특히 SNP maker 를 이용한 한우 품질 보증 수정란 생산 체계 구축을 위해 PREPGENE의 E-Prep을 이용한 DNA 분리 및 PCR 기법을 활용하여 검사하는 방법은 아래와 같다.

- (1) 1.5ml 원심분리관에 조직은 E-Prep 용액의 1/10 vol' 또는 혈액 20 μ l를 넣는다.
- (2) 멸균 증류수를 1ml 넣은 후 10초간 강하게 흔든 후 10분간 실온에 방치, 다시 10초간 강하게 흔들어 준다.
- (3) 최고 속도에서 2분간 원심 분리 후 상층액을 완전하게 제거한다.
- (4) 각각의 침전된 시료에 E-Prep® 200 μ l와 ProteinaseK 10mg/ml 15 μ l를 첨가한 후 56℃ water bath에서 1시간 반응시킨다.
- (5) 85℃ water bath로 옮기고 45min 반응시킨 후 최고 속도로 3분간 원심분리하고 상층액 100 μ l을 새로운 1.5ml 원심분리관에 옮긴다.
- (6) Agarose gel 전기영동 및 자외선 발색법으로 DNA 정성 및 정량, 그 다음 1/20 vol'으로 PCR에 주형으로 사용한다.

나. E-Prep으로 DNA분리하여 Real-time RT-PCR 기법으로 유전자발현조사

RNA 시료를 Superscript RT-PCR kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 cDNA로 역전사하였다. Real-time RT-PCR은 Taq polymerase가 포함된 SYBR Green PCR master mix을 사용하여 수행하였다. PCR에 사용된 primer 염기서열은 Table 1과 같다. PCR 반응은 95℃에서 10분간 전변성시킨 후, 94℃에서 10초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초의 PCR cycle을

40회 반복하였다. 각각의 유전자의 발현량은 각각의 표준곡선으로부터 얻어지며, 이들 유전자의 상대 정량치 (fold change)는 기준 유전자인 H2a비로 산출하였다. 유전자 표현의 확인을 위한 모든 검체의 상대정량은 동일한 cDNA를 사용하여 각각 3회씩의 독립된 real-time PCR로부터 얻은 결과의 평균으로 평가하였다.

5. 체외 배양 조건 개선에 의한 최적의 수정란 생산 기반 구축

가. 혈청 배지로부터 유래된 문제점들

포유 난자의 체외수정과 배양조건의 확립은 연구, 산업, 그리고 진단과 같은 여러 분야에서 난자의 활용을 가능케 했다. 하지만, 혈청 대신에 필요한 성분만 넣은 serum-free medium에 비해 혈청배지로부터 많은 문제점들이 나타나고 있다. 이들 문제점들은 배반포 발달의 저하, 조산, 거대산자의 생산 등이 높게 나타나고 있다. 이들 배지 (serum-free medium, IVD; serum medium, CR1aa)간의 난자 발달율을 비교하였다.

나. 시험 디자인과 mRNA 증폭과정

혈청 배지에서 배양된 난자들의 문제점에 대한 원인들을 알아보기 위해 혈청배지 (CR1aa)와 무혈청배지 (IVD101)에서 자란 난자들간에 유전자 발현의 차이, 특히 생존과 관련된 유전자들 그리고 신호전달에 관련된 유전자들이 달리 발현되어 문제점들을 야기한다고 가설을 세웠다. 따라서, 이들간의 차이나게 발현되는 유전자들을 동정하고 특성을 규명하기 위해 microarray 기법을 활용하였다. 각각의 실험군에서 100개 배반포 난자를 준비하였고, 이들로부터 mRNA만을 분리하기 위해 Dynabead mRNA direct kit를 사용하였다. 분리되는 mRNA의 양이 매우 적으므로 RiboAmp HS RNA amplification kit를 활용하여 microarray에 사용될 probe를 증폭과정을 거쳐 제작하였다.

다. IVD101과 CR1aa에서 차이나게 발현되는 유전자들의 동정

혈청배지에서 자란 배반포 난자 (IVD-1, IVD-2, 그리고 IVD-3)들을 각각 100개씩 나누어 3개 군으로 준비하였고 또한, 무혈청배지에서 자란 배반포 난자 (CR1aa-1, CR1aa-2, 그리고 CR1aa-3)들도 3개 군으로 나누어 각각 (IVD-1, IVD-2, IVD-3, CR1aa-1, CR1aa-2, 그리고 CR1aa-3)에서 microarray용 probe로 제작후, Affymetrix GeneChip Bovine Genome oligonucleotide array를 활용하여 차이나는 유전자들을 비교 분석하였다.

라. 차이나게 발현되는 유전자들의 분류

그 결과 2배 이상 차이나게 발현되는 107개 유전자들을 동정하였고, 이들중 65개 유전자들이 CR1aa 샘플들에서 높게, 그리고 42개 유전자들이 IVD101 샘플들에서 높게 발현됨을 확인하였다. 그중 2배 이상 발현의 차이가 있는 107개 유전자들은 DAVID web-based tool를 활용하여 molecular function과 biological process에 따라 분류하였다. 또한 이들 유전자들은 또 다시 KEGG pathway database를 활용하여 분류하였다.

6. 수정란 성감별에 의한 맞춤형 유기 기술 개발

소의 amelogenin sequence로부터 specific primer는 AMELX (Genbank accession no: NM_001014984)와 AMELY (GenBank accession no: NM_174240)를 ClustalW 프로그램으로 alignment하여 Y-chromosome의 amelogenin에서 63 bp가 deletion된 부위를 활용하여 forward primer (5'-CAG CAA CCA ATG ATG CCA GTT C-3')과 reverse primer (5'-GTC TTG TCT GTT GCT GGC CA-3')를 design한다. 이들 primer로 PCR하게 되면 367 bp X-amplicons와 304 bp Y-amplicons를 얻을 수 있다. Blastocyst로부터 genomic DNA의 분리는 DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, USA)를 활용하여 분리한다. Kit에 제공된 100ul lysis buffer는 blastocyst가 들어 있는 각각의 1.5ml tube에 첨가한 후 65°C에서 10분 동안 incubation하여 blastocyst를 lysis 시킨다. Lysis buffer를 neutralization한 후, PCR 증폭은 Saiki 등(1988)에 의해 보고된 방법과 소의 수정란에서 실시한 Peura 등 (1991)의 방법을 보완하여 95°C에서 10분간 1 cycle하였고 그 다음 95°C에서 30초, 62°C에서 30초, 그리고 72°C에서 30초로 총 35 cycles를 실시하며, 마지막 cycle에서는 72°C에서 10분간 extension을 실시한다. 대조구로 사용될 수컷과 암컷의 체세포 DNA의 증폭은 수정란 DNA를 증폭시키는 방법과 동일한 조건에서 실시한다. 증폭된 산물은 2.5% agarose gel 전기영동을 실시하여 EtBr로 염색을 하여 UV빛 하에서 예상된 길이의 DNA band 유무로 성관별을 한다. 또한 이들 PCR 산물이 예견된 염기배열을 갖고 있는지를 알기 위하여 pGEM T-easy vector에 cloning한 후 T7 혹은 SP6 sequencing primer를 활용하여 sequencing을 수행하여 일치 여부를 확인하였다.

7. 수정란 이식시 황체영향물질의 처리에 따른 수태율 향상방법 연구

황체퇴행물질(ProstaglandinF2 α , PGF2 α)의 황체퇴행작용을 줄여 수정란의 발달 및 착상, 임신 유지에 저해작용을 줄여 수태율을 높이기 위한 방법과 부속황체의 생성 및 부속황체에서 생성되는 Progesterone의 혈청농도를 증가시켜 수태율을 높이는 방법을 비교 연구.

수정란 이식시 주입기 조작중 자궁의 축진에서 오는 자극에 의해 자궁내막으로부터 생성되어 자궁내로 분비되는 황체퇴행물질(ProstaglandinF2 α , PGF2 α)의 황체퇴행작용을 줄이는 Flunixin Meglumine(FM)과 Progesterone의 혈청농도를 증가시켜 수태율을 높인다고 알려진 황체영향물질 human chorionic gonadotrophin (hCG)을 젓소 처녀우에 처리하여 수태율과 발정재귀율을 연구하였다.

8. 한우체외수정란의 실제 농가에의 이용 연구

최상의 수태율을 얻을 수 있는 이식용액과 경산우와 처녀우를 대상으로 이식시 최상의 수태율과 분만율을 얻을 수 있는 이식수정란의 수를 결정하기위한 연구와 인위적인 쌍자를 유기하여 공태기간을 줄이고 농가소득을 증진할 수 있는 방법을 연구하였다.

제2절. 연구개발수행 결과

1. 유전자 발현 조사 및 착상률 극대화된 수정란 생산 및 소 복제 수정란의 체외배양

가. Table 1. List of Primers Used for Real-Time RT-PCR

Gene	Accession No.	Primer sequence	Product size
<i>Gapdh</i>	NM_001034034	F: GGGTCATCATCTCTGCACCT R: GGTCAATAAGTCCCTCCACGA	176
<i>Bcl-xL</i>	AF245487	F: CTCAGAGTAACCGGGAGCTG R: CCATTCACAGCAGGGCTATC	196
<i>Survivin</i>	AY606044	F: CCTGGCAGCTCTACCTCAAG R: TAGGGTCGTCATCTGGTTCC	195
<i>Bax</i>	NM_173894	F:TCTGACGGCAACTTCAACTG R:TGGGTGTCCCAAAGTAGGAG	205
<i>Casp3</i>	NM_001077840	F: TACTTTTCTGGCGAAATGC R: TTGCATGAAAAGCAGAATCG	169
<i>Oct4</i>	NM_174580	F: GTTTTGAGGCTTTGCAGCTC R: CTCCAGGTTGCCTCTCACTC	182
<i>Sox2</i>	NM_001105463	F: CACAACCTCGGAGATCAGCAA R: CATGAGCGTCTTGGTTTTCC	162
<i>Csf1r</i>	NM_001075403	F: GTGGCTGTGAAGATGCTGAA R: CCTTCCTTCGCAGAAAGTTG	199
<i>Cdx2</i>	XM_871005	F: AAGACAAATACCGGGTCGTG R: CTGCGGTTCTGAAACCAAAT	157

나. 배분할율과 배달달율에 대한 조사.

체외수정군, 단위발생군, 핵이식군, 핵이식 후 TSA처리군을 비교하였을 때 배분할율은 차이가 없었다. 발달율을 단위발생군 그룹에서 다른 그룹보다 유의하게 높은 수치를 나타냈다(그림 1).

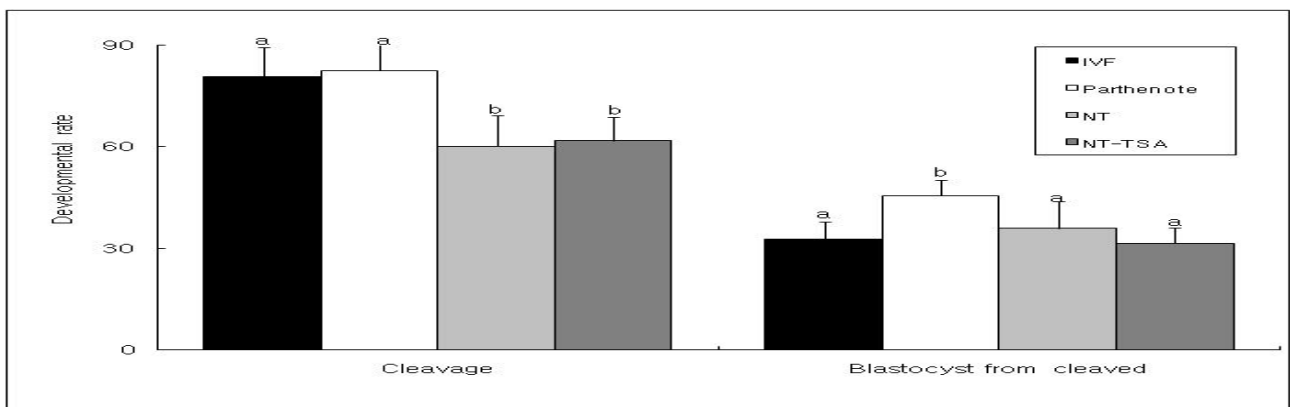


Fig 1. The development of fertilization (IVF)-, parthenogenetic activation (parthenote)-,

nuclear transfer (NT)-, and trichostatin A-treated NT (NT-TSA)-derived zygotes to the two-cell and blastocyst stage. Bars with different letters differ from each other statistically ($p < 0.05$).

다. 세포수와 세포사멸에 대한 조사

Oct3/4 및 TUNEL assay를 동시에 수행하여 ICM, TE의 세포수와 세포사멸을 각각 조사하였는데 핵이식-TSA 처리군에서 높은 세포수와 높은 ICM수를 나타냈고, NT 그룹에서는 ICM수와 ICM:TE 비율이 모두 낮음을 나타냈다. 또한 단위발생군은 세포사멸이 적게 일어났으며 ICM에서의 세포사멸도 적게 일어났다, 반면에 NT 군은 ICM에서의 세포사멸도 높게 나타났고, 세포사멸에서의 ICM:TE 비율도 높게 나타남을 알 수 있었다(그림 2).

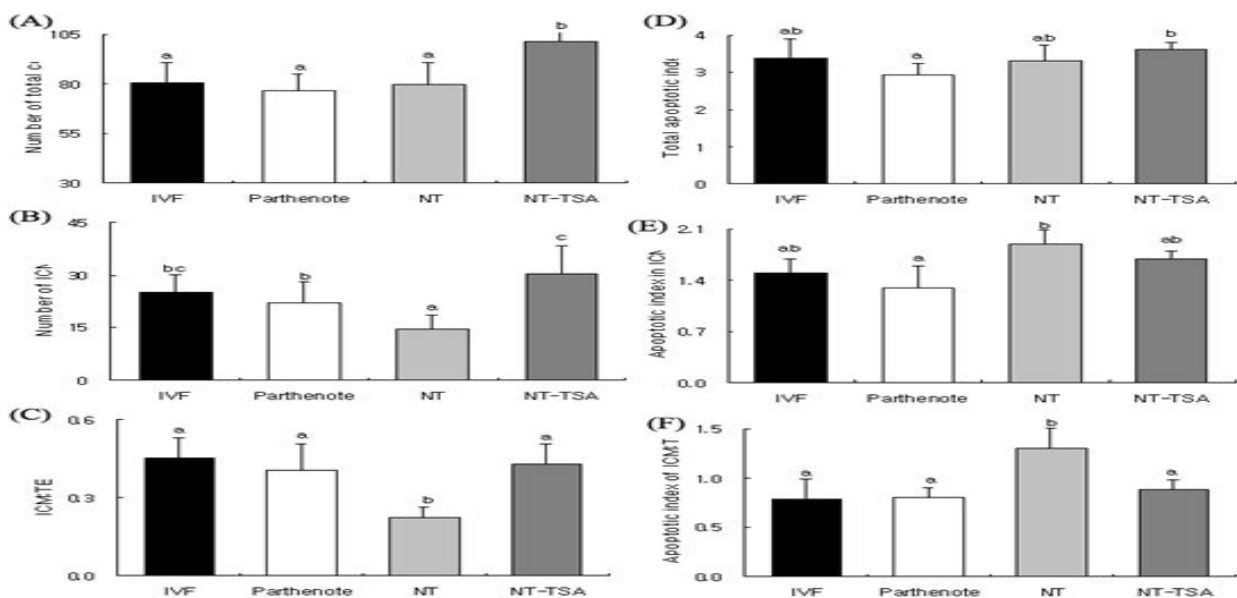


Fig 2. Total cell (A), TUNEL/total cells (D); ICM cell (B), TUNEL in ICM/total ICM (E), and the ratio of ICM:TE cell (C), TUNEL in TE/total TE (F) in fertilization (IVF, black bar)-, parthenogenetic activation (parthenote, white bar)-, nuclear transfer (NT, light gray bar)-, and trichostatin A-treated NT (NT-TSA, gray bar)-derived blastocysts. The blastocysts were 60, 68, 61, and 62 in IVF, parthenote, NT, and NT-TSA groups, respectively. Bars with different letters differ from each other statistically ($p < 0.05$).

라. 세포사멸 및 분화관련 유전자 발현의 분석

세포사멸에 관련된 유전자 Bcl-xL, Survivin, Bax 및 Caspase3와 분화관련 유전자 Oct3/4, Sox2, Cdx2 및 c-fms의 유전자 발현을 조사한 결과 Survivin, Oct3/4 및 c-fms의 유전자 발현은 네 개 그룹에서 차이가 나타나지 않았다. 그러나 Bcl-xL 및 Cdx2는 핵이식-TSA 처리군에서 유의하게 높게 발현되었으며 단위발생군에서는 Caspase3가 적게 발현되는 반면에 Sox2와 Cdx2가 높게 발현되었다 (그림 3).

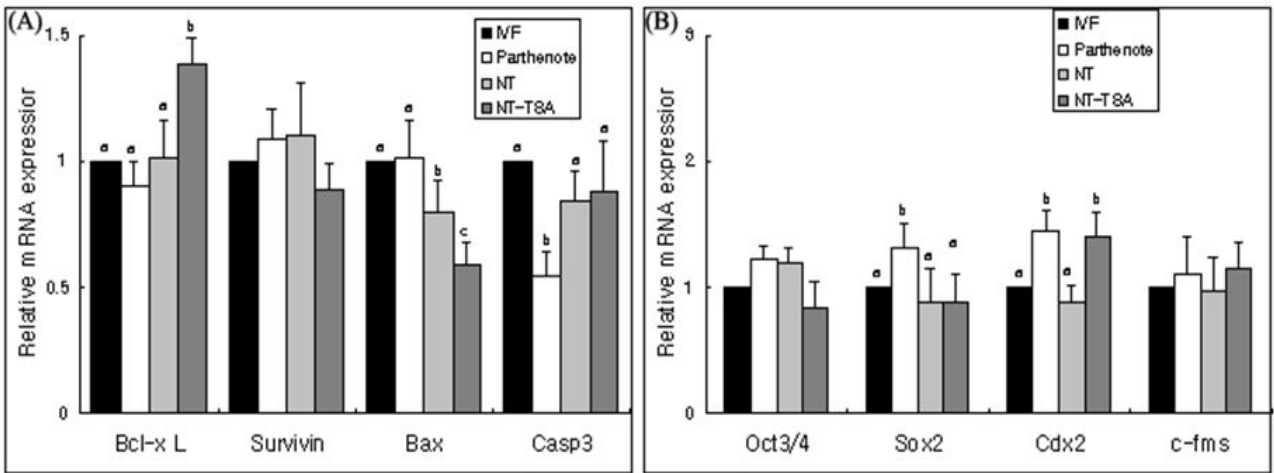


Fig 3. Real-time RT-PCR determination of the relative expression levels of pluripotency or differentiation (A)- and apoptotic (B)-related genes. Bovine Gapdh mRNA expression was used as the internal control, and the IVF embryo expression level was arbitrarily set to onefold. Bars with different letters differ from each other statistically ($p < 0.05$).

마. microRNA 분석

세포사멸에 관련된 microRNA mir-15, mir-16, mir-21과 mir-34a를 분석하였다. 체외수정란군, 단위발생난군, 핵이식군, 핵이식-TSA처리군에서 mir-16과 mir-34a는 차이가 없었으나 mir-15는 핵이식-TSA처리군에서 높게 나타났고, mir-21은 단위발생난군에서 높게 나타났다(그림 4).

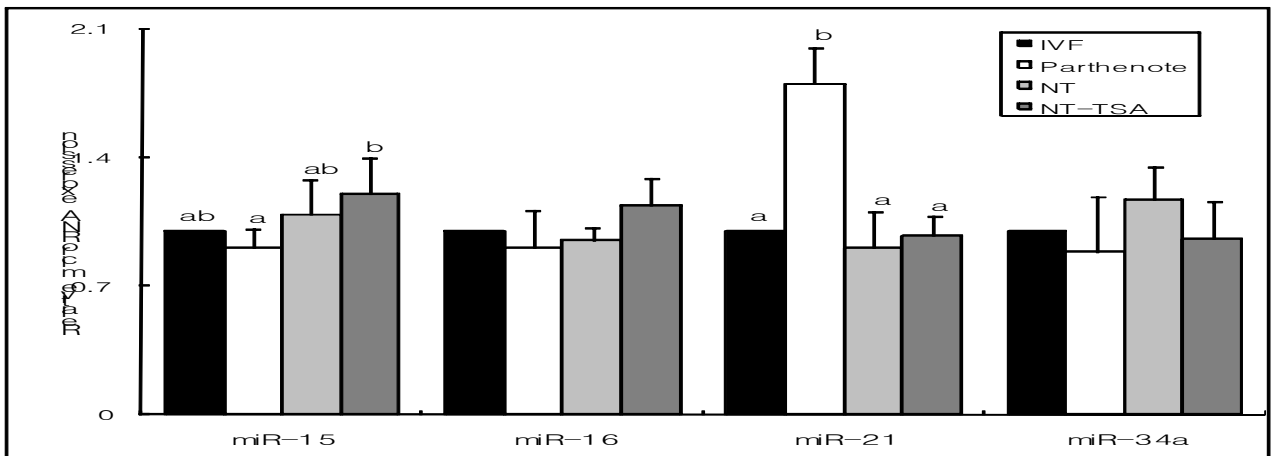


Fig 4. Analysis of relative expression of apoptotic-related microRNAs using TaqMan realtime RT-PCR. Bovine Gapdh mRNA expression was used as the internal control, and the IVF embryo expression level was arbitrarily set to onefold. Bars with different letters differ from each other statistically ($p < 0.05$).

바. 면역형광염색법 분석

TSA가 H3K9의 아세틸화와 메틸화에 대한 영향을 조사하기 위하여 면역형광염색법을 실시(그림 5) 하였으며 프로그램을 이용하여 정량화하였다(그림 6). 50nM의 TSA는 H3K9의 메틸화

및 아세틸화에 영향이 없음을 발견하였다.

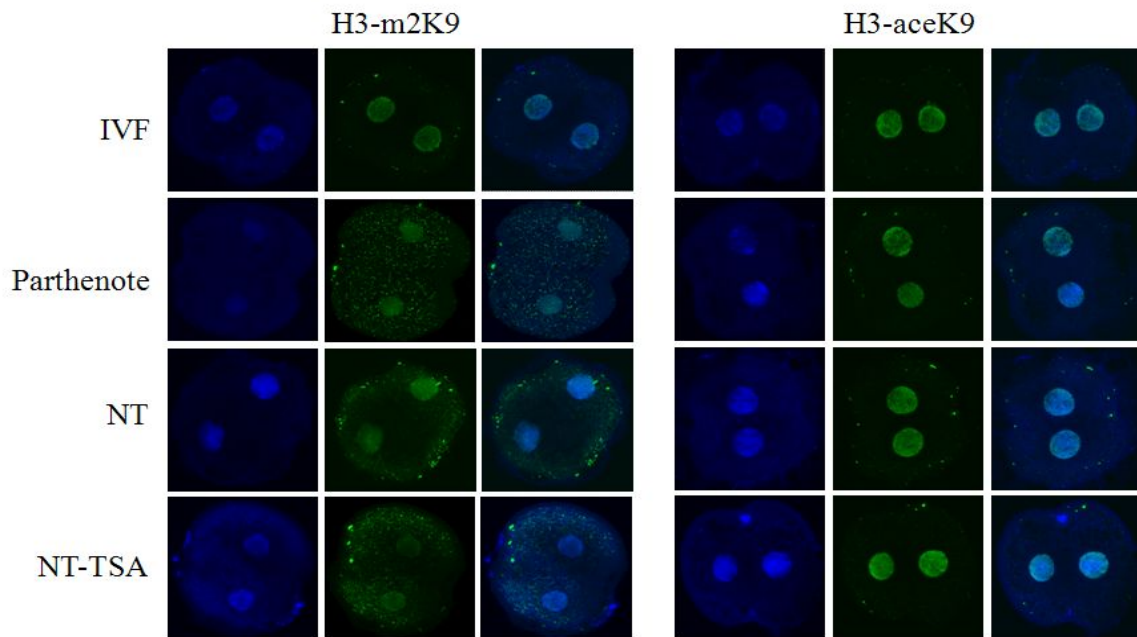


Fig 5. Laser scanning confocal microscopy images of methylation (left) and acetylation (right) of histone H3K9 in two-cell stage embryos.

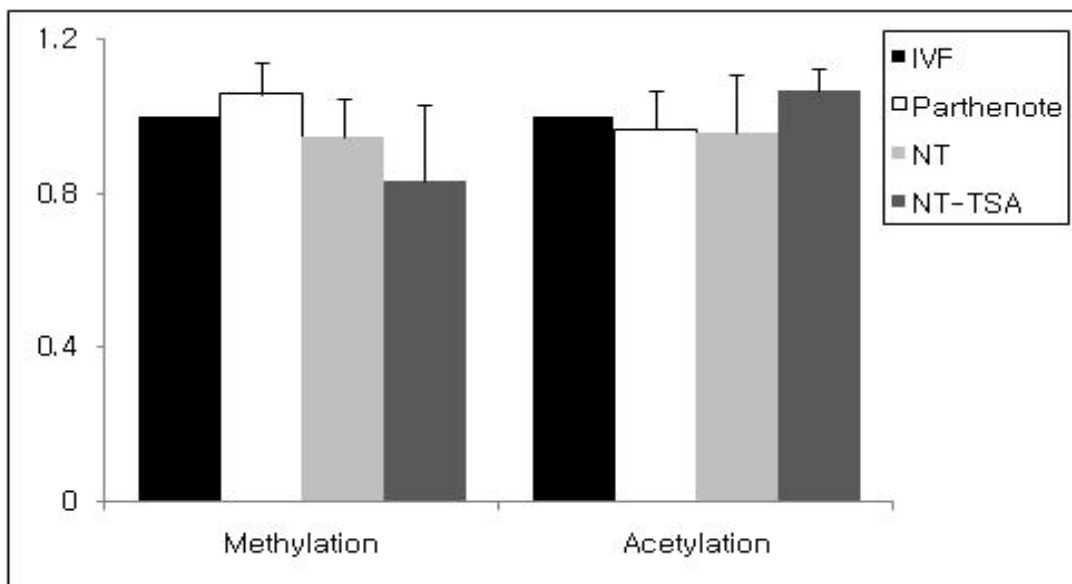


Fig 6. Described intensity of histone H3-m2K9- and H3-aceK9 - specific green fluorescence and UV intensity for chromatin were scored in two-cell [treatment of NT embryos with 50nM TSA for 10h].

2. 육질관련 우량한우 수정란 생산(육질 관련 유전자 마커 (Fatty acid synthase FASN)을 이용한 우량 한우 품질 보증 수정란 생산)에 대한 결과

가. 표 Primer used in these experiments

Primer Name	Primer Sequence (5'-3')	Annealing TM	Product Size(bp)
FASN-9-1804-F	CCCAACCTGCACTTCCACAAC	60	844
FASN-9-1804-R	CGTCCTTCCGATGCCTGTC		
FASN-12-15-F	ATCGGAAGGACGCAGGAGACC	62	1171
FASN-12-15-R	GCCCACGTTGCTGAGGAAGA		
FASN-16-19-F	TCTCAGGCGTCTCCAAGGTCT	62	1105
FASN-16-19-R	CGGAGCTGGCCTCAAGGATA		
FASN-20-22-F	CATCACCGCCATCTACATCCA	60	1448
FASN-20-22-R	AAGGCCACCCACCGATT		
FASN-23-26-F	GACGTGAGGTCGCCCAACTC	60	1000
FASN-23-26-R	AGGAATCGGCCAGGATGTTCT		
FASN-27-30-F	TGGACTGAGAGGGCAAGA	58	972
FASN-27-30-R	CGGCTGACCCTGGCAGAG		
FASN-31-34-F	CACCATCCGCCTGTATCCTCA	58	944
FASN-31-34-R	CCGRCGGGCAARRCACCT		
FASN-36-38-F	TGCGGTCCCACCCTCATAAC	58	904
FASN-36-38-R	CAGATGGACAAGCCCTGT = ACCT		

본 과제의 선행 연구 결과를 통해 소의 FASN 유전자는 19번 염색체에 위치하고 있으며 염기서열 상으로 볼 때 FASN은 42개의 exon과 41개의 intron 으로 이루어졌음을 알 수 있었다 (동물자원 과학회지 2009, 51:1850).

나. 표. HRM 분석에 의한 Primer 디자인

Primer Name	Primer Sequence (5'-3')	Annealing TM	Product Size(bp)
FASN-18-F	TGAGAATGGCAACCTGATCGC	55	180
FASN-18-R	AGAGCTTGGGGTTGGGATCT		
FASN-21-F	CCACAGTGGCCGACGTG	55	135
FASN-21-R	AACTTCTCCAGGATGGGCACC		
FASN-24-F	GCCCTGACCCCTCAAC	55	149
FASN-24-R	GCAGGAACATTGGGCTGTCAA		
FASN-39-F	ACCTTGACACGGCTCAACTC	58	132
FASN-39-R	CACTGTGGCCATAGGTGGG		

* The four SNPs were HRM genotyped in the Hanwoo for association analysis (n=100)

본 연구에서는 FASN 유전자내의 염기서열에서 도축장에서 얻은 한우 및 젖소의 난소로부터 유전자 분석을 실시하였다. 선행 연구에서 밝혀진 바와 동일하게 모두 한우 및 젖소의 난소 샘플에서 15개의 SNP 를 발견하였다. 본 실험에서 수행한 소 FASN 유전자 염기서열 결과를 기존에 보고된 염기서열을 <http://www.ensembl.org/>과 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>에서 비교 하였을 때 6개의 SNP는 이미 보고되었던 SNP 인 것을 확인하였고, 나머지 9개의 SNP 들은 새로 발굴된 것으로 확인되었다. 따라서 이러한 차이는 SNP 확인을 통해, 보증수정란을 생산하였고 이식을 실시하였다.

3. 체외 배양 조건 개선을 통한 수정란 생산 효율 개선에 대한 결과

가. Medium199에 FBS를 5%, 10% 첨가한 2가지 방법과 TCM199에 FAF, BSA(Sigma A8806)를 0.5%, 1% 첨가한 2가지 방법, 총 4가지 배양액에서의 발생율을 관찰하였는데 이에 대한 초기 발생율의 결과는 표1과 같다.

Table 1. Comparison of differentiation rates to 4-cell stage in different medium

Sort of medium (in medium199)	No. of oocytes	No. of fertilized Ova.	No. of 4 cell (%)
3%FBS	480	378	128 (33.8) ^b
5%FBS	480	390	192 (49.2) ^a
10%FBS	480	389	194 (49.8) ^a
0.5%%BSA	480	386	29 (7.5) ^c
1%BSA	480	388	30 (7.7) ^c

^{a-c} Values with different superscripts are different ($p<0.05$).

이 실험결과로 볼 때 발생과정까지의 환경은 표1에서와 같이 보는바와 같이 FBS를 첨가하는 것이 BSA를 첨가한 경우보다 좋았으며, FBS 농도별 발생율은 3%에서 낮았고 5%와 10%농도에서 높았으며($P<0.05$) 5%와 10%에서는 큰 차이가 없었다($P>0.5$). 10% FBS에서는 난구세포의 발육이 5% FBS에서보다 왕성하였으나 배반포 생산율은 차이가 없었다.

나. 발생배양 후 확장 배반포까지 발육을 비교하기 위해 Medium199+5% FBS에서 발생된 4세포기 수정란을 Medium199+0.3%BSA, +0.5%BSA, 0.7%BSA, +1%BSA, +2%BSA 용액 내에서 8일간 배양하였으며, Medium199+10%FBS에서도 같은 방법으로 배양하여 배반포의 발생율과 배지내의 환경을 비교하였다. 이에 대한 배반포 생성율의 결과는 표2, 표3과 같다.

Table 2. Developmental rates of Hanwoo IVF embryos cultured in different media (Cultured in 5%FBS-Medium199 to 4-cell stages)

Concentrations of BSA (in medium199)	No. of 4 cell	No. of expanded blastocysts at				Total (%)
		D6	D7	D8	D9	
0.3%BSA	392	9	62	52	28	149 (38.0) ^a
0.5%BSA	408	11	64	68	33	176 (43.1) ^b
0.7%BSA	397	10	65	67	37	179 (45.0) ^b
1%BSA	388	8	65	70	35	178 (45.8) ^b
2%BSA	399	8	59	66	40	173 (43.3) ^b

^{a,b} Values with different superscripts are different ($p<0.05$).

Table 3. Developmental rates of Hanwoo IVF embryos cultured in different media (Cultured in 10%FBS-Medium199 to 4-cell stages)

Concentrations of BSA (in medium199)	No. of 4 Cell	No. of Expanded Blastocysts at				Total (%)
		D6	D7	D8	D9	
0.3%BSA	395	12	59	57	26	155 (39.2) ^a
0.5%BSA	389	13	64	66	33	169 (43.4) ^b
0.7%BSA	393	13	64	63	36	176 (44.8) ^b
1%BSA	396	12	64	66	41	183 (46.2) ^b
2%BSA	389	12	58	60	43	170 (43.7) ^b

^{a,b} Values with different superscripts are different ($p<0.05$).

표2 표3에서 보는바와 같이 발생 후의 일령과 BSA농도에 따른 배반포의 생성율은 발생까지의 배양액인 5%FBS, 10%FBS 두 실험군의 차이가 없는 것으로 나타났다. BSA농도는 표에서 보는바와 같이 0.3%BSA농도에서는 낮았으나 0.5%이상 농도가 높아질수록 좋은 결과를 얻었고 1%이상의 BSA농도에서는 차이가 없었다.

다. 위의 각 방법으로 발육된 배반포를 동결하고 용해 후 생존율을 비교하였다. 각 실험군에서 얻은 배반포의 동결 용해 후 생존율은 표4와 같다.

Table 4. Re-expansion and hatching rates of frozen-thawed Hanwoo IVF blastocysts cultured in different medium (Cultured in 5% FBS-TCM199 to 4-cell stages) from 4-cell stage to blastocyst

Culture medium (in medium 199)	No. of thawed embryos	No. of re-expanded embryos (%)	No. of hatched embryos (%)	*No. of restricted embryos (%)
0.3%BSA	95	51 (53.7) ^a	23 (24.2) ^a	8 (8.4)
0.5%	102	67 (65.7) ^b	34 (33.3) ^b	5 (4.9)
0.7%	97	69 (71.1) ^c	35 (36.1) ^c	3 (3.1)
1%	98	77 (78.6) ^d	40 (40.8) ^d	1 (1.1)
2%	95	75 (78.9) ^d	38 (40.0) ^d	1 (1.1)
5%FBS	89	56 (62.9) ^e	17 (19.1) ^e	6 (6.7)
10%FBS	99	66 (66.7) ^b	25 (25.3) ^a	3 (3.0)

^{a~e} Values with different superscripts in same column are different ($p<0.05$).

*Number of restricted embryos of hatched embryos.

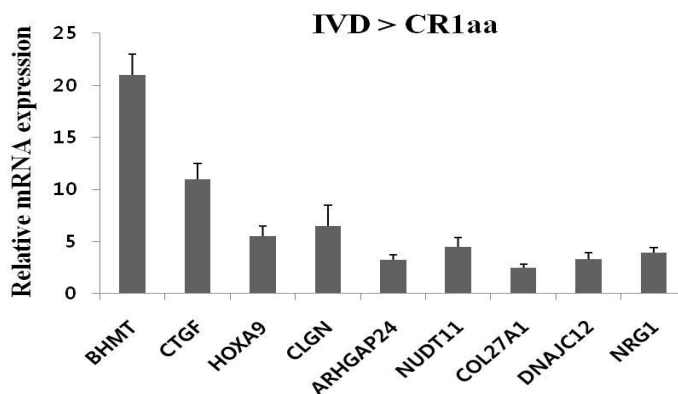
위의 표에서 보는바와 같이 혈청이 함유된 배지에서 배양된 수정란보다 BSA를 함유한 배지에서 배양된 수정란의 동결 후 생존율이 0.7, 1, 2%BSA농도에서 높았고, BSA의 농도가 높을수록 탈출 배반포로의 발육이 좋았다.

4. 간편 유전자 검사 기술 확보 및 유전자 진단에 의한 보증 한우 수정란 생산

가. E-Prep을 이용한 DNA 분리 및 진단기술 개발 (12 시간 이내)

유전자 검사 시간 단축 (12시간 내)은 수정란의 생존율 및 단시간에 우수 수정란 확보에 여러 잇점이 있다. 특히 SNP maker 를 이용한 한우 품질 보증 수정란 생산 체계 구축, 육량 및 육질관련 우량 보증 한우 수정란 생산, 난자의 유전자 발현을 조사하여 착상을 극대화된 수정란 생산, 그리고 수정란 성감별에 의한 맞춤 쌍태 유기 기술개발에 활용할 수 있다. 이러한 목적으로 PREPGENE의 E-Prep을 이용한 DNA 분리 및 PCR 기법을 활용하였다.

나. 우수 수정란의 marker를 찾기 위해 여러 문제점이 있는 혈청배지 유래 난자와 무혈청배지 유래 난자에서 차이나게 발현되는 유전자들을 동정하여 본 E-prep으로 DNA를 분리하여 Real-time RT-PCR 기법을 활용한 차이나게 발현되는 유전자들을 검증하는 과정은 다음과 같다. 난자로부터 분리할 수 있는 mRNA 양이 한정되어 있으므로 northern blot에 의한 확인은 불가능하므로, real-time RT-PCR 기법을 활용하여 serum-free medium (IVD101)과 serum medium (CR1aa)로부터 이들 차이나게 발현되는 유전자들 (DEGs)을 검증하였다. 이들 DEGs 중 IVD101 샘플에서 up-regulation되는 9개 유전자 (*HMT*, *CTGF*, *HOXA9*, *CLGN*, *ARHGAP24*, *NUDT11*, *COL27A1*, *NDAJC12* 그리고 *NRG1*) 그리고 down-regulation되는 22개 유전자 (*DHDH*, *PGK1*, *BNIP3*, *PLEKHO2*, *ACAT2*, *DLX4*, *HNFAA*, *CLN8*, *ASS1*, *HMGCS1*, *IMMP2L*, *ENPP3*, *DHCR24*, *PDZK1*, *NID1*, *CYP551A1*, *BOLA*, *CDKN1C*, *LDHA*, *SCD*, 그리고 *CAVI*)를 real-time RT-PCR로 정량해 본 결과 microarray와 비교하여 값의 차이는 약간 있었으나, 동일하게 재현됨을 알 수 있었다. 따라서 microarray 기법으로 얻은 차이나게 발현되는 유전자들이 대부분 의미가 있음을 확인할 수 있었다 (Figure 1, Figure 2, Table 1).



*When DEGs expression in CR1aa samples is 1, relative DEGs expression in IVD samples show.

Figure 1. Relative expression of up regulated genes in IVD sample (IVD-1, IVD-2, and IVD-3) compared to CR1aa sample (CR1aa-1, CR1aa-2, and CR1aa-3) using real-time RT-PCR technique. All RT-PCR reactions were conducted in triplicate, and normalized for GAPDH mRNA expression. Each of these relative values was further divided by that of the calibrator (control), and relative expression is presented as an n-fold expression

difference, compared to the calibrator.

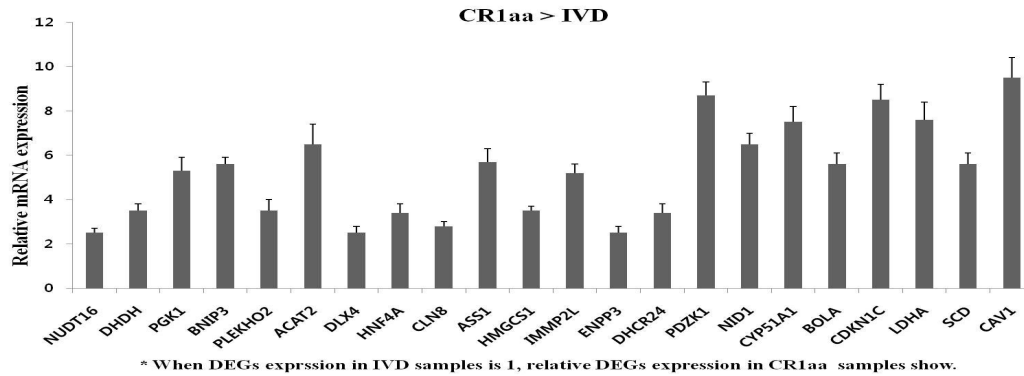


Figure 2. Relative expression of up regulated genes in CR1aa sample (CR1aa-1, CR1aa-2, and CR1aa-3) compared to IVD sample (IVD-1, IVD-2, and IVD-3) using real-time RT-PCR technique. All RT-PCR reactions were conducted in triplicate, and normalized for GAPDH mRNA expression. Each of these relative values was further divided by that of the calibrator (control), and relative expression is presented as an n-fold expression difference, compared to the calibrator.

Table 1. Primer sequence and conditions used for real-time RT-PCR (IVD vs. CR1aa)

Gene	GenBank ac.no.	Forward (5'--3')	Reverse (5'--3')	bp
<i>BHMT</i>	CK847269	CTTGCCACAGTGTATTTCCT	GGGCCACAGTTCAAAACTA	231
<i>CTGF</i>	NM_174030.2	AGCTGACCTGGAGGAGAACA	TTCTTCATGACCTCCCCATC	216
<i>HOXA9</i>	CK845980	TGGTCAGTAGGCCCTTGAGGT	TTTTGCACCAAACAGTGAGG	258
<i>CLGN</i>	CB531852	CAGCGTGCTGCATGTTATTT	AGCACAGGATCTGGAGATGG	378
<i>ARHGAP24</i>	CB452370	TATGCCTTCCCAGCTAGAA	GGGCAAAAGAAGATGCAGAG	255
<i>NUDT11</i>	CB437887	GGGGCAGAATATGCAAGA	TTCCATGCTTCCAAGGAGAC	241
<i>COL27A1</i>	AV617451	AGTCGGAGAGAGGGAGAGGT	AGCCTGTGGCAGAATGGTAG	174
<i>DNAJC12</i>	NM_174096.2	CGGTGAAAATGTCAATGCAC	CAAGTTGGCAGCACAAGAAA	378
<i>NRG1</i>	NM_174128.2	CCCCTTGGAAAGAGATGAAG	ACAATGGTGATGTTGGCAGA	280
<i>NUDT16</i>	CK972227	GCTCCAGGGTCAAGAGCTTA	ATGCGTAGGCTTGAGCTGTC	346
<i>DHDH</i>	CB167230	ATGCCCTGAGGCTTACAAGA	AGTGAGCTCCTGGCTGACAT	209
<i>PGK1</i>	CK849264	CTTCATCTCCCTCCGTACCA	GTTCTGTGCATAGCCCCTA	381
<i>BNIP3</i>	CK955421	GGAGGAGACAGTGGTTGTCC	GAATGCCGACACTAGGAGGA	275
<i>PLEKHO2</i>	CK770947	CTGCCACTACCCTCAAGAGC	TGTGGGAGTAGGAGCAGCTT	213
<i>ACAT2</i>	CK773538	TTTCCACCCTCACTTTGGTC	CGGATTCTTGTCACCCTGTT	223
<i>DLX4</i>	CK847466	TTTGCACTGAGACGGCTATG	CCTCTTTCCCCCGTATCTTC	257
<i>HNF4A</i>	AY318752.1	ATTGCCACACAGGAACACA	GCCCACTTTCAGAAGTCTC	380
<i>CLN8</i>	CB448765	CACATTCGTGGCAAGAAAAA	TTGTGAGGCTCTGTGACAC	234
<i>ASS1</i>	NM_173892.2	CGCCAGAAAAGAACTTTG	TGCTTCGCATACTCCATCAG	384
<i>HMGCS1</i>	CK976192	CATCAGTAACGGGGAGCATT	GCTTTCCTCACCAGAAGTGC	355
<i>IMMP2L</i>	CK942464	GCATTTTGGGGACATGAAAC	AAGCGCTGGCAGAAATTAGA	297
<i>ENPP3</i>	NM_001075923	ACACATTCAACCAGCACCAA	CAGGGCTCCTTGTTCTTCTG	294
<i>DHCR24</i>	NM_001103276	AAAGCTGTGGTGGGTAATGC	GACAAGTGATGGCAGAGCAA	232
<i>PDZK1</i>	CK849330	TGTGGGCTCGTCTCTTTCT	AGGTGGTGGCAGAAATCCAG	207
<i>NID1</i>	CK849037	CTCATGTGTTCCCAAACT	GGAAAACCAAGAGGAAGGA	327
<i>CYP51A1</i>	CK961820	GAGCTCATCGGGAGATCAAG	CCATCCAGGCACTGGTAGTT	207
<i>BOLA</i>	CK849540	TCTGCTGGAACAGGACAGTG	CCTTGTGGGGACTGAGTGAT	203
<i>CDKN1C</i>	NM_001077903	AGAGCCTCGTGCTCAAAGAG	CCTTACACCTTGGGGCCAGT	224
<i>LDHA</i>	NM_174099.2	TGGCAGCCTTTTCTTAGAA	TGGATTGGAAACAACAAGCA	217
<i>SCD</i>	AY241933.1	CAGGTGGTCAGTCATTGGTG	AGGGAGCATACTGGGTGATG	373
<i>CAV1</i>	CK848618	TGTCATGCCAGTGTCTGTT	GGACTTAAGCCAAGCGTCAC	366

5. 체외 배양 조건 개선에 의한 최적의 수정란 생산 기반 구축

가. 혈청 배지로부터 유래된 문제점들

포유 난자의 체외수정과 배양조건의 확립은 연구, 산업, 그리고 진단과 같은 여러 분야에서 난자의 활용을 가능케 했다. 하지만, 혈청 대신에 필요한 성분만 넣은 serum-free medium에 비해 혈청배지로부터 많은 문제점들이 나타나고 있다(Figure 1). 이들 문제점들은 배반포 발달의 저하, 조산, 거대산자의 생산 등이 높게 나타나고 있다. 이들 배지 (serum-free medium, IVD; serum medium, CR1aa)간의 난자 발달율을 비교해 본 결과 2세포기 혹은 배반포 난자의 발달율은 IVD 배지에서 73% 혹은 52%로 CR1aa 25% 혹은 15%보다 높았다 (Table 1).

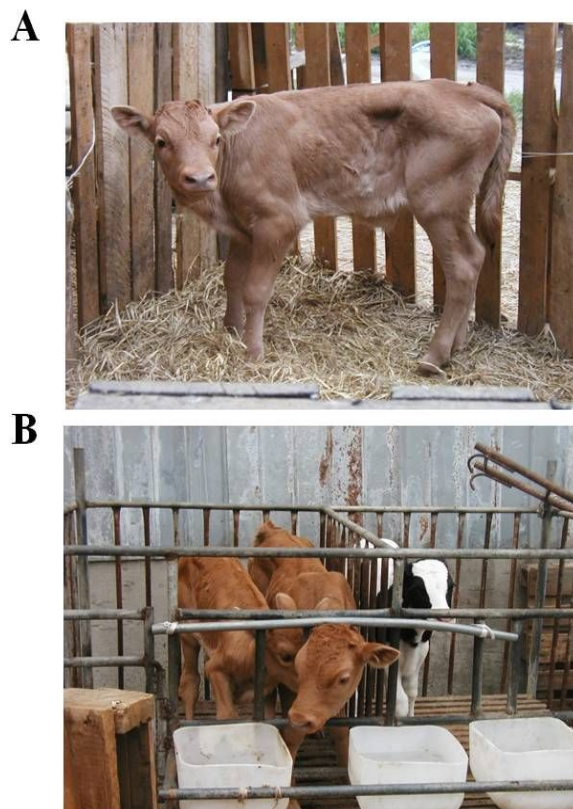


Figure1. Large offspring syndrome of side effects derived from serum medium. A, female calf with 53 kg body weight at birth. B, comparison between normal calf (left Hanwoo) and abnormal calf (right Hanwoo) in size.

Table 1. Number of Blastocyst in different medium Treatment

Treatment	No. of Oocytes	No. of 2C embryos	No. of Blastocyst
IVD	2,212	1,639 (73)	407 (25)
CR1aa	4,970	2,581 (52)	384 (15)

나. 시험 디자인과 mRNA 증폭과정

혈청 배지에서 배양된 난자들의 문제점에 대한 원인들을 알아보기 위해 혈청배지 (CR1aa)와 무혈청배지 (IVD101)에서 자란 난자들간에 유전자 발현의 차이, 특히 생존과 관련된 유전자들 그리고 신호전달에 관련된 유전자들이 달리 발현되어 문제점들을 야기한다고 가설을 세웠다. 따라서, 이들간의 차이나게 발현되는 유전자들을 동정하고 특성을 규명하기 위해 microarray 기법을 활용하였다. 각각의 실험군에서 100개 배반포 난자를 준비하였고, 이들로부터 mRNA만을 분리하기 위해 Dynabead mRNA direct kit를 사용하였다. 분리되는 mRNA의 양이 매우 적으므로 RiboAmp HS RNA amplification kit를 활용하여 microarray에 사용될 probe를 증폭과정을 거쳐 제작하였다 (Figure 2 & 3).

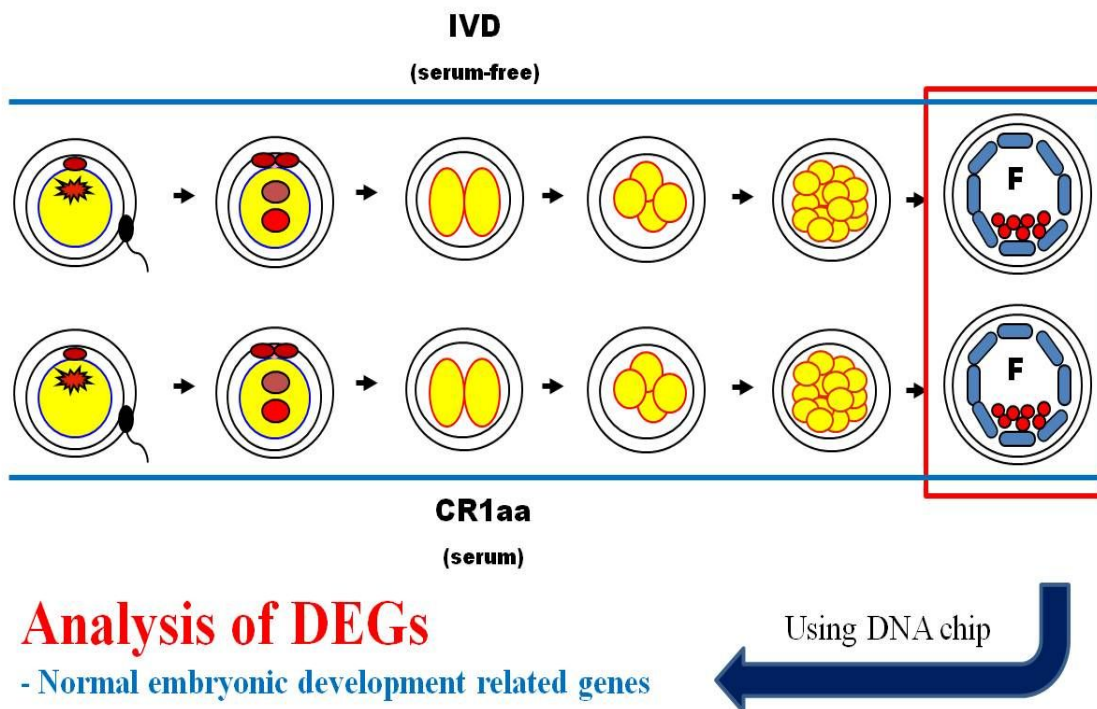


Figure 2. Experimental design to screen differentially expressed genes (DEGs). Differentially expressed genes (DEGs) between blastocyst embryos cultured in serum-free medium condition (IVD) and in serum medium condition (CR1aa) were found using microarray technique.

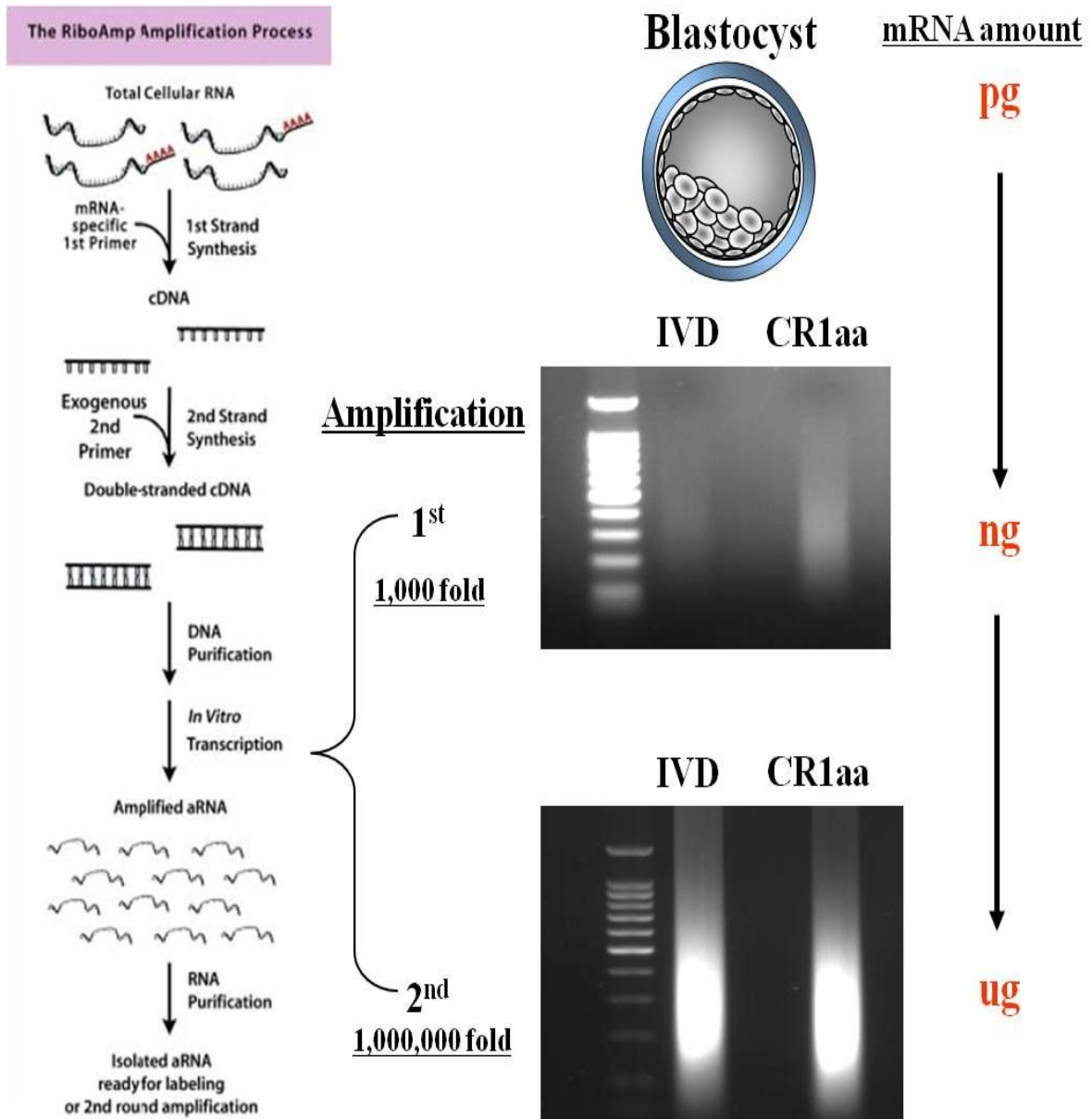


Figure 3. Extraction and amplification of mRNA. The mRNA from pools of 100 blastocysts was extracted using RNeasy Micro Kit columns as described by the manufacturer (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Due to the low concentrations of the extracted mRNAs, the integrity and purity of the preparations could not be verified. Briefly, total RNA from each sample was converted to double-strand cDNA Using oligo(dT) primer incorporating a T7 promoter. Subsequently, a double stranded cDNA was synthesized oligo(dT) primer incorporating a T7 promoter. IVD; blastocyst embryos cultured in serum-free medium condition, CR1aa; blastocyst embryos cultured in serum (5% FBS) medium condition

다. IVD101과 CR1aa에서 차이나게 발현되는 유전자들의 동정

(혈청배지에서 자란 배반포 난자 (IVD-1, IVD-2, 그리고 IVD-3)들을 각각 100개씩 나누어 3개 군으로 준비하였고 또한, 무혈청배지에서 자란 배반포 난자 (CR1aa-1, CR1aa-2, 그리고 CR1aa-3)들도 3개 군으로 나누어 각각 (IVD-1, IVD-2, IVD-3, CR1aa-1, CR1aa-2, 그리고 CR1aa-3)에서 microarray용 probe로 제작후, Affymetrix GeneChip Bovine Genome oligonucleotide array를 활용하여 차이나는 유전자들을 비교 분석하였다. 그 결과 2배 이상 차이나게 발현되는 107개 유전자들을 동정하였고, 이들중 65개 유전자들이 CR1aa 샘플들에서 높게, 그리고 42개 유전자들이 IVD101 샘플들에서 높게 발현됨을 확인하였다 (Figure 4). IVD101 샘플에서 높게 발현되는 유전자들은 다음과 같다. electron binding-related gene (*ZNF642*, *ADAMTS4*, *RNF128*, *MARCH3*, *PRNP*, *CHI3L2*, *CD69*, *PCDH10*, *CABYR*, *CLGN*, 그리고 *EFHD1*), cytoskeleton-related gene (*SFRP2*, *NEFL*, *COL12A1*, *KRT6A*, *DST*, *MOSPD1*, 그리고 *ABLIM1*), transcription activator-related gene (*HOXA9* 그리고 *TSHZ1*), receptor 또는 protein binding-related gene (*OLR1*, *TNC*, *MAGI2* 그리고 *FBXO32*), 그리고 transporter 또는 transferase-related gene (*SLC30A2*, *BHMT* 그리고 *MAP3K8*). 그리고 IVD101 샘플에서 낮게 발현되는 유전자들은 다음과 같다. electron binding-related gene (*CA4*, *CPPE1*, *CPPE1*, *ENPP3*, 그리고 *DPYS*), cytoskeleton-related gene (*SCIN*, *NID1*, 그리고 *KRT19*), transcription activator-related gene (*TFAP2A*, *HNF4A*, *DLX4* 그리고 *VGLL1*), receptor 또는 protein binding-related gene (*SUSD2*, *PLA2R1*, *LDLR*, *MID1IP1*, *MTTP*, *INSIG1*, *CCND2*, *CAV1*, *ENO1* 그리고 *TPH1*), transporter 또는 transferase-related gene (*FABP5*, *SLC25A33*, *LOC783399*, *PDZK1*, *SLC7A7*, *COMT*, *LOC510369*, *B4GALNT2*, *ACAT2*, *CCBL1*, *PSAT1*, *HMGCS1*, *BCAT2*, *CHPT1*, *TGM1* 그리고 *CDKN1C*), oxidoreductase-related gene (*CYP2C87*, *AASS*, *P4HAI1*, *DHDH*, *DHCR7*, *MTHFD2*, *ALDH1A3*, *AKR1A1*, *DHCR24*, *SQLE*, *CYP51A1*, *LDHA* 그리고 *SCD*) (Table 2a, 2b, 2c, 3, 4, 5, 6, 7, & 8).

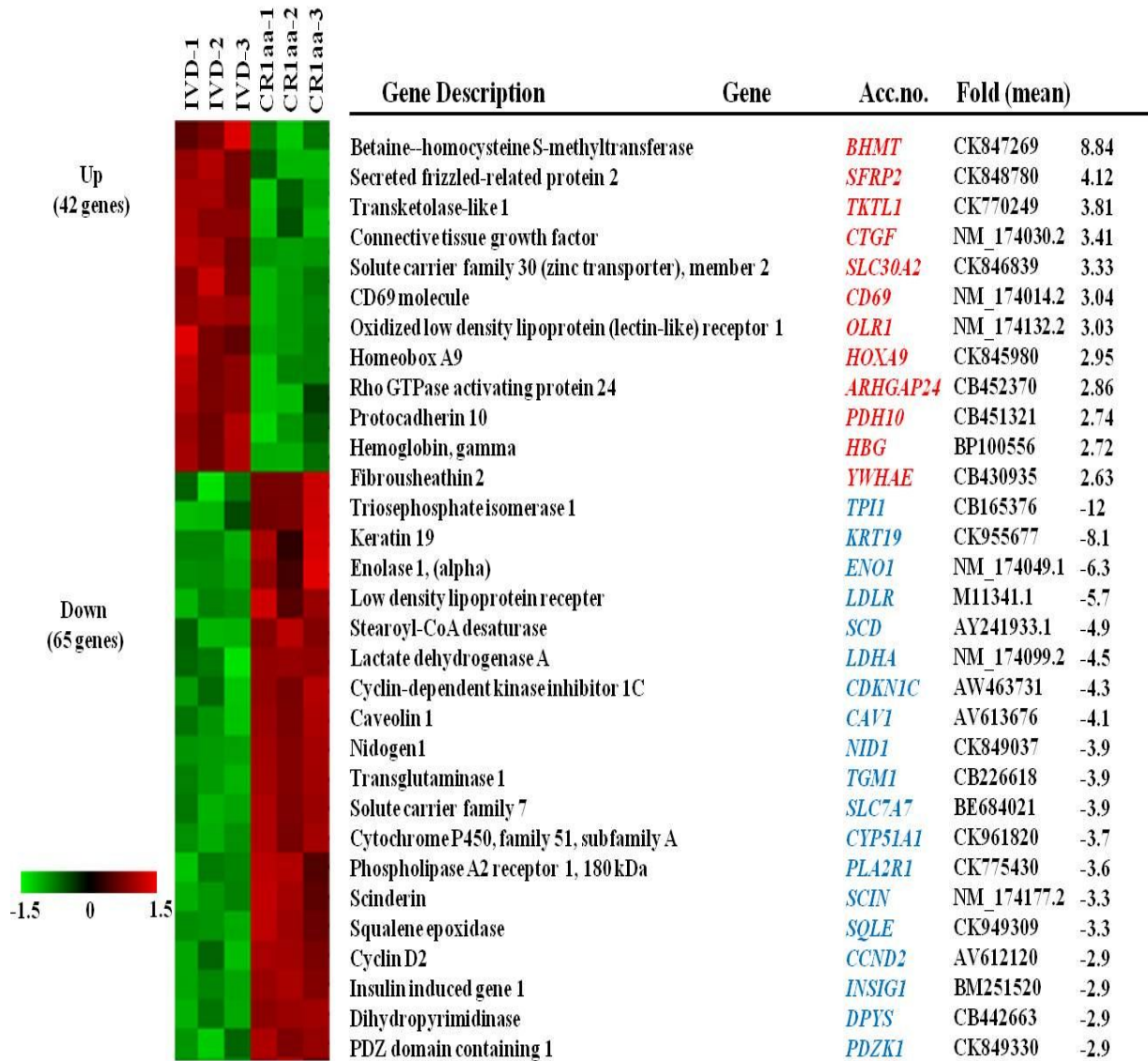


Figure 4. Microarray analysis of IVD and CR1aa. Individual IVD-1, IVD-2, and IVD-3-derived Cy-5-labeled (Red) cDNAs were independently mixed with CR1aa-1, CR1aa-2, and CR1aa-3-derived Cy3-labeled (Green) cDNA to minimize the variation between IVD and CR1aa group. The analysis of genes expressed more than two fold above, or below the median fold-value in IVD (IVD-1, IVD-2, and IVD-3), compared to CR1aa group. A: The colors indicate the relative expression levels of each gene, with red indicating the highest expression above the median value and blue indicating the lowest expression below the median value. The 107 differentially down-regulated genes were organized according to cellular component (B), molecular function (C), and molecular pathway (D).

Table 2a. DEGs between IVD and CR1aa (>2 Fold, n=42ea, p-value<0.05)

GenBank acc.no.	Gene	Gene Description	Fold (mean)	P-value	Molecular Function
CK847269	<i>BHMT</i>	betaine--homocysteine S-methyltransferase	8.84	0.00031	transferase activity
CK848780	<i>SFRP2</i>	secreted frizzled-related protein 2	4.12	0.01665	structural molecule activity
CK770249	<i>TKTL1</i>	transketolase-like 1	3.81	0.01985	catalytic activity
NM_174030.2	<i>CTGF</i>	connective tissue growth factor	3.41	0.00009	growth factor activity
CK846839	<i>SLC30A2</i>	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 2	3.33	0.00454	transporter activity
NM_174014.2	<i>CD69</i>	CD69 molecule	3.04	0.00528	binding (calcium ion)
NM_174132.2	<i>OLR1</i>	oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	3.03	0.03849	receptor binding
CK845980	<i>HOXA9</i>	homeobox A9	2.95	0.00188	transcription activator activity
CB452370	<i>ARHGAP24</i>	Rho GTPase activating protein 24	2.86	0.01962	GTPase activator activity
CB451321	<i>PCDH10</i>	protocadherin 10	2.74	0.02106	binding (calcium ion)
BP100556	<i>HBG</i>	hemoglobin, gamma	2.72	0.02882	heme binding oxygen binding
NM_181667.1	<i>ADAMTS4</i>	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 4	2.66	0.00089	binding (zinc ion)
CB430935	<i>CABYR</i>	fibrousheathin 2	2.63	0.00083	binding (calcium ion)
CB456263	<i>ZNF642</i>	zinc finger protein 642	2.54	0.01517	binding (zinc ion)
BP109120	<i>SLPI</i>	secretory leukocyte peptidase inhibitor	2.52	0.00246	catalytic activity
NM_174121.1	<i>NEFL</i>	neurofilament, light polypeptide	2.49	0.00996	structural molecule activity
CB165401	<i>TNC</i>	tenascin C	2.47	0.00158	receptor binding
AB099883.1	<i>COL12A1</i>	collagen, type XII, alpha 1	2.41	0.01607	structural molecule activity
CK849322	<i>RNF128</i>	ring finger protein 128	2.37	0.01347	binding (zinc ion)
CB427663	<i>MAGI2</i>	membrane associated guanylate kinase	2.35	0.00426	protein binding
CK772138	<i>NUDT10</i>	nudix-type motif 10	2.30	0.00924	catalytic activity
CB531852	<i>CLGN</i>	calmegin	2.28	0.00115	binding (calcium ion)
AV618625	<i>KRT6A</i>	keratin 6A	2.26	0.01431	structural molecule activity
CK950561	<i>DST</i>	dystonin	2.24	0.01305	structural molecule activity
CK962924	<i>MAP3K8</i>	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	2.23	0.00217	transferase activity
AW345360	<i>HAL</i>	histidine ammonia-lyase	2.23	0.01472	catalytic activity
CK775396	<i>MOSPD1</i>	motile sperm domain containing 1	2.19	0.02540	structural molecule activity
CB437887	<i>NUDT11</i>	nudix-type motif 11	2.19	0.00199	hydrolase activity
CK772698	<i>FBXO32</i>	F-box protein 32	2.17	0.01499	protein binding
CB448342	<i>TSHZ1</i>	teashirt zinc finger homeobox 1	2.15	0.01999	transcription activator activity
NM_181015.1	<i>PRNP</i>	prion protein	2.13	0.00512	binding (metal ion)
NM_174128.2	<i>NRG1</i>	neuregulin 1	2.12	0.00012	growth factor activity
BI849604	<i>MARCH3</i>	membrane-associated ring finger (C3HC4) 3	2.11	0.00165	binding (zinc ion)
CK849256	<i>CHI3L2</i>	chitinase 3-like 2	2.09	0.04862	binding (cation)
CK975731	<i>NCEH1</i>	neutral cholesterol ester hydrolase 1	2.08	0.03215	binding (phosphate)
BM254635	<i>IQCB1</i>	IQ motif containing B1	2.08	0.00579	binding (calmodulin)
CK774362	<i>ARHGEF6</i>	Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6	2.07	0.00494	GTPase activator activity
CB433710	<i>DSE</i>	dermatan sulfate epimerase	2.05	0.03042	isomerase activity
BM435611	<i>ABLIM1</i>	actin binding LIM protein 1	2.02	0.00196	structural molecule activity
CK971790	<i>HIST2H2BE</i>	histone cluster 2, H2be	2.02	0.00647	binding (DNA)
BE755226	<i>RBM24</i>	RNA binding motif protein 24	2.02	0.01168	RNA binding
CK848753	<i>EFHD1</i>	EF-hand domain family, member D1	2.01	0.00985	binding (calcium ion)

Table 2b. DEGs between IVD and CR1aa (< 2 Fold, n=65ea, p-value<0.05)

GenBank acc.no.	Gene	Gene Description	Fold (mean)	P-value	Molecular Function
CB442129	<i>CYP2C87</i>	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 87	-2.00	0.00095	oxidoreductase activity
CK778002	<i>PPIF</i>	peptidylprolyl isomerase F	-2.00	0.00100	isomerase activity
CK948802	<i>LGALS4</i>	lectin, galactoside-binding, soluble, 4	-2.01	0.03535	binding (sugar)
BE682224	<i>AASS</i>	aminoadipate-semialdehyde synthase	-2.02	0.01261	oxidoreductase activity
NM_174299.2	<i>CXCL2</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	-2.03	0.02569	cytokine activity
NM_174315.2	<i>FABP5</i>	fatty acid binding protein 5	-2.03	0.01741	transporter activity
BM090297	<i>MIDI1P1</i>	MIDI1 interacting protein 1	-2.03	0.00138	protein binding
NM_174557.2	<i>IGFBP4</i>	insulin-like growth factor binding protein 4	-2.06	0.00233	growth factor binding
NM_174578.2	<i>PLA2G7</i>	phospholipase A2, group VII	-2.07	0.00519	hydrolase activity
CA035668	<i>P4HAI</i>	prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide I	-2.09	0.03311	oxidoreductase activity
AU278870	<i>CPPE1</i>	calcineurin-like phosphoesterase domain containing 1	-2.09	0.02260	binding (metal ion)
CB535604	<i>SUSD2</i>	sushi domain containing 2	-2.09	0.00389	receptor binding
CK769641	<i>COMT</i>	catechol-O-methyltransferase	-2.11	0.00698	transferase activity
M76478.1	<i>IGFBP3</i>	insulin-like growth factor binding protein 3	-2.12	0.04535	growth factor binding
CB420144	<i>LOC510369</i>	similar to hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	-2.13	0.01022	transferase activity
NM_173935.1	<i>MDK</i>	midkine (neurite growth-promoting factor 2)	-2.13	0.02327	growth factor activity
CB167230	<i>DHDH</i>	dihydrodiol dehydrogenase (dimeric)	-2.15	0.00039	oxidoreductase activity
BP106791	<i>RPL32</i>	Ribosomal protein L32	-2.17	0.01073	structural constituent of ribosome
CK958906	<i>IDII</i>	isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1	-2.17	0.01772	hydrolase activity
CB433623	<i>TFAP2A</i>	transcription factor AP-2 alpha	-2.22	0.01129	transcription activator activity
NM_173897.1	<i>CA4</i>	carbonic anhydrase IV	-2.22	0.00297	binding (zinc ion)
BF602415	<i>SLC25A33</i>	solute carrier family 25, member 33	-2.24	0.04055	transporter activity
CB171376	<i>LOC783399</i>	major allergen Equ c 1-like	-2.26	0.03104	transporter activity
CK849264	<i>PGK1</i>	phosphoglycerate kinase 1	-2.26	0.00148	kinase activity
BE684608	<i>PRSS8</i>	protease, serine, 8	-2.27	0.01222	peptidase activity
CB464349	<i>B4GALNT2</i>	Beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 2	-2.29	0.01976	transferase activity
BF776610	<i>DHCR7</i>	7-dehydrocholesterol reductase	-2.30	0.00220	oxidoreductase activity
CK959652	<i>PMVK</i>	phosphomevalonate kinase	-2.31	0.01445	kinase activity
AY318752.1	<i>HNF4A</i>	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	-2.34	0.00009	transcription activator activity
CK847466	<i>DLX4</i>	distal-less homeobox 4	-2.35	0.00012	transcription activator activity
CK773538	<i>ACAT2</i>	acetyl-CoA acetyltransferase 2	-2.36	0.00165	transferase activity
CK772178	<i>CCBL1</i>	cysteine conjugate-beta lyase, cytoplasmic	-2.37	0.03975	transferase activity

Table 2c. DEGs between IVD and CR1aa (< 2 Fold, n=65ea, p-value<0.05)

GenBank acc.no.	Gene	Gene Description	Fold (mean)	P-value	Molecular Function
CF763176	<i>PSAT1</i>	phosphoserine aminotransferase 1	-2.38	0.01475	transferase activity
AW266953	<i>MTHFD2</i>	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2	-2.39	0.00011	oxidoreductase activity
BE485574	<i>ALDH1A3</i>	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	-2.42	0.00764	oxidoreductase activity
CK953132	<i>AKR1A1</i>	aldo-keto reductase family 1, member A1	-2.48	0.00954	oxidoreductase activity
CK976192	<i>HMGCS1</i>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble)	-2.50	0.00101	transferase activity
CK848048	<i>VGLL1</i>	vestigial like 1 (Drosophila)	-2.53	0.00781	transcription activator activity
CK951109	<i>BCAT2</i>	branched chain amino-acid transaminase 2, mitochondrial	-2.68	0.00400	transferase activity
CK777018	<i>CHPT1</i>	choline phosphotransferase 1	-2.69	0.00234	transferase activity
NM_173892.2	<i>ASS1</i>	argininosuccinate synthase 1	-2.70	0.00161	binding (nucleotide)
CK950056	<i>DNASE1L3</i>	deoxyribonuclease I-like 3	-2.79	0.00813	binding (DNA)
CK942464	<i>IMMP2L</i>	IMP2 inner mitochondrial membrane peptidase-like (S. cerevisiae)	-2.79	0.00025	peptidase activity
BM432596	<i>ENPP3</i>	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3	-2.81	0.00270	binding (metal ion)
CK776537	<i>MTTP</i>	microsomal triglyceride transfer protein	-2.87	0.01450	protein binding
BI773879	<i>DHCR24</i>	24-dehydrocholesterol reductase	-2.88	0.00029	oxidoreductase activity
CK849330	<i>PDZK1</i>	PDZ domain containing 1	-2.88	0.00007	transporter activity
CB442663	<i>DPYS</i>	dihydropyrimidinase	-2.90	0.00967	binding (metal ion)
BM251520	<i>INSIG1</i>	insulin induced gene 1	-2.91	0.04747	protein binding
AV612120	<i>CCND2</i>	cyclin D2	-2.95	0.00323	protein binding
CK949309	<i>SQLE</i>	squalene epoxidase	-3.31	0.01418	oxidoreductase activity
NM_174177.2	<i>SCIN</i>	scinderin	-3.33	0.00348	structural molecule activity
CK775430	<i>PLA2R1</i>	phospholipase A2 receptor 1, 180kDa	-3.56	0.00325	receptor binding
CK961820	<i>CYP51A1</i>	cytochrome P450, family 51, subfamily A, polypeptide 1	-3.74	0.00330	oxidoreductase activity
BE684021	<i>SLC7A7</i>	solute carrier family 7 ,member 7	-3.85	0.01347	transporter activity
CB226618	<i>TGMI</i>	transglutaminase 1	-3.90	0.00515	transferase activity
CK849037	<i>NIDI</i>	nidogen 1	-3.95	0.00107	structural molecule activity
AV613676	<i>CAV1</i>	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa	-4.05	0.00921	protein binding
AW463731	<i>CDKN1C</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	-4.29	0.00104	transferase activity
NM_174099.2	<i>LDHA</i>	lactate dehydrogenase A	-4.46	0.00006	oxidoreductase activity
AY241933.1	<i>SCD</i>	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	-4.90	0.00000	oxidoreductase activity
M11341.1	<i>LDLR</i>	low density lipoprotein receptor	-5.69	0.00658	receptor binding
NM_174049.1	<i>ENO1</i>	enolase 1, (alpha)	-6.27	0.00381	protein binding
CK955677	<i>KRT19</i>	keratin 19	-8.05	0.00501	structural molecule activity
CB165376	<i>TPI1</i>	triosephosphate isomerase 1	-12.41	0.00278	protein binding

Table 3. Electron Binding-related genes (IVD vs. CR1aa)

GenBank acc.no.	Gene	Gene Description	Fold (mean)	P-value	Molecular Function
CB456263	<i>ZNF642</i>	zinc finger protein 642	2.54	0.01517	binding (zinc ion)
NM_181667.1	<i>ADAMTS4</i>	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 4	2.66	0.00089	binding (zinc ion)
CK849322	<i>RNF128</i>	ring finger protein 128	2.37	0.01347	binding (zinc ion)
BI849604	<i>MARCH3</i>	membrane-associated ring finger (C3HC4) 3	2.11	0.00165	binding (zinc ion)
NM_173897.1	<i>CA4</i>	carbonic anhydrase IV	-2.22	0.00297	binding (zinc ion)
NM_181015.1	<i>PRNP</i>	prion protein	2.13	0.00512	binding (metal ion)
AU278870	<i>CPPED1</i>	calcineurin-like phosphoesterase domain containing 1	-2.09	0.02260	binding (metal ion)
BM432596	<i>ENPP3</i>	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3	-2.81	0.00270	binding (metal ion)
CB442663	<i>DPYS</i>	dihydropyrimidinase	-2.90	0.00967	binding (metal ion)
CK849256	<i>CHI3L2</i>	chitinase 3-like 2	2.09	0.04862	binding (cation)
NM_174014.2	<i>CD69</i>	CD69 molecule	3.04	0.00528	binding (calcium ion)
CB451321	<i>PCDH10</i>	protocadherin 10	2.74	0.02106	binding (calcium ion)
CB430935	<i>CABYR</i>	fibrousheathin 2	2.63	0.00083	binding (calcium ion)
CB531852	<i>CLGN</i>	calmegin	2.28	0.00115	binding (calcium ion)
CK848753	<i>EFHD1</i>	EF-hand domain family, member D1	2.01	0.00985	binding (calcium ion)

Table 4. Cytoskeleton-related genes (IVD vs. CR1aa)

GenBank acc.no.	Gene	Gene Description	Fold (mean)	P-value	Molecular Function
CK848780	<i>SFRP2</i>	secreted frizzled-related protein 2	4.12	0.01665	structural molecule activity
NM_174121.1	<i>NEFL</i>	neurofilament, light polypeptide	2.49	0.00996	structural molecule activity
AB099883.1	<i>COL12A1</i>	collagen, type XII, alpha 1	2.41	0.01607	structural molecule activity
AV618625	<i>KRT6A</i>	keratin 6A	2.26	0.01431	structural molecule activity
CK950561	<i>DST</i>	dystonin	2.24	0.01305	structural molecule activity
CK775396	<i>MOSPD1</i>	motile sperm domain containing 1	2.19	0.02540	structural molecule activity
BM435611	<i>ABLIM1</i>	actin binding LIM protein 1	2.02	0.00196	structural molecule activity
NM_174177.2	<i>SCIN</i>	scinderin	-3.33	0.00348	structural molecule activity
CK849037	<i>NID1</i>	nidogen 1	-3.95	0.00107	structural molecule activity
CK955677	<i>KRT19</i>	keratin 19	-8.05	0.00501	structural molecule activity

Table 5. Transcription activator-related genes (IVD vs. CR1aa)

GenBank acc.no.	Gene	Gene Description	Fold (mean)	P-value	Molecular Function
CK845980	<i>HOXA9</i>	homeobox A9	2.95	0.00188	transcription activator activity
CB448342	<i>TSHZ1</i>	teashirt zinc finger homeobox 1	2.15	0.01999	transcription activator activity
CB433623	<i>TFAP2A</i>	transcription factor AP-2 alpha	-2.22	0.01129	transcription activator activity
AY318752.1	<i>HNF4A</i>	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	-2.34	0.00009	transcription activator activity
CK847466	<i>DLX4</i>	distal-less homeobox 4	-2.35	0.00012	transcription activator activity
CK848048	<i>VGLL1</i>	vestigial like 1 (Drosophila)	-2.53	0.00781	transcription activator activity

Table 6. Receptor or protein binding-related genes (IVD vs. CR1aa)

GenBank acc.no.	Gene	Gene Description	Fold (mean)	P-value	Molecular Function
NM_174132.2	<i>OLRI</i>	oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	3.03	0.03849	receptor binding
CB165401	<i>TNC</i>	tenascin C	2.47	0.00158	receptor binding
CB535604	<i>SUSD2</i>	sushi domain containing 2	-2.09	0.00389	receptor binding
CK775430	<i>PLA2R1</i>	phospholipase A2 receptor 1, 180kDa	-3.56	0.00325	receptor binding
M11341.1	<i>LDLR</i>	low density lipoprotein receptor	-5.69	0.00658	receptor binding
CB427663	<i>MAGI2</i>	membrane associated guanylate kinase	2.35	0.00426	protein binding
CK772698	<i>FBXO32</i>	F-box protein 32	2.17	0.01499	protein binding
BM090297	<i>MIDI1P1</i>	MID1 interacting protein 1	-2.03	0.00138	protein binding
CK776537	<i>MTTP</i>	microsomal triglyceride transfer protein	-2.87	0.01450	protein binding
BM251520	<i>INSIG1</i>	insulin induced gene 1	-2.91	0.04747	protein binding
AV612120	<i>CCND2</i>	cyclin D2	-2.95	0.00323	protein binding
AV613676	<i>CAV1</i>	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa	-4.05	0.00921	protein binding
NM_174049.1	<i>ENO1</i>	enolase 1, (alpha)	-6.27	0.00381	protein binding
CB165376	<i>TPII</i>	triosephosphate isomerase 1	-12.41	0.00278	protein binding

Table 7. Transporter or transferase-related genes (IVD vs. CR1aa)

GenBank acc.no.	Gene	Gene Description	Fold (mean)	P-value	Molecular Function
CK846839	<i>SLC30A2</i>	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 2	3.33	0.00454	transporter activity
NM_174315.2	<i>FABP5</i>	fatty acid binding protein 5	-2.03	0.01741	transporter activity
BF602415	<i>SLC25A33</i>	solute carrier family 25, member 33	-2.24	0.04055	transporter activity
CB171376	<i>LOC783399</i>	major allergen Equ c 1-like	-2.26	0.03104	transporter activity
CK849330	<i>PDZK1</i>	PDZ domain containing 1	-2.88	0.00007	transporter activity
BE684021	<i>SLC7A7</i>	solute carrier family 7 ,member 7	-3.85	0.01347	transporter activity
CK847269	<i>BHMT</i>	betaine--homocysteine S-methyltransferase	8.84	0.00031	transferase activity
CK962924	<i>MAP3K8</i>	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	2.23	0.00217	transferase activity
CK769641	<i>COMT</i>	catechol-O-methyltransferase	-2.11	0.00698	transferase activity
CB420144	<i>LOC510369</i>	similar to hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	-2.13	0.01022	transferase activity
CB464349	<i>B4GALNT2</i>	Beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 2	-2.29	0.01976	transferase activity
CK773538	<i>ACAT2</i>	acetyl-CoA acetyltransferase 2	-2.36	0.00165	transferase activity
CK772178	<i>CCBL1</i>	cysteine conjugate-beta lyase, cytoplasmic	-2.37	0.03975	transferase activity
CF763176	<i>PSAT1</i>	phosphoserine aminotransferase 1	-2.38	0.01475	transferase activity
CK976192	<i>HMGCS1</i>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble)	-2.50	0.00101	transferase activity
CK951109	<i>BCAT2</i>	branched chain amino-acid transaminase 2, mitochondrial	-2.68	0.00400	transferase activity
CK777018	<i>CHPT1</i>	choline phosphotransferase 1	-2.69	0.00234	transferase activity
CB226618	<i>TGMI</i>	transglutaminase 1	-3.90	0.00515	transferase activity
AW463731	<i>CDKN1C</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	-4.29	0.00104	transferase activity

Table 8. Oxidoreductase-related genes (IVD vs. CR1aa)

GenBank acc.no.	Gene	Gene Description	Fold (mean)	P-value	Molecular Function
CB442129	<i>CYP2C87</i>	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 87	-2.00	0.00095	oxidoreductase activity
BE682224	<i>AASS</i>	aminoadipate-semialdehyde synthase	-2.02	0.01261	oxidoreductase activity
CA035668	<i>P4HA1</i>	prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide 1	-2.09	0.03311	oxidoreductase activity
CB167230	<i>DHDH</i>	dihydrodiol dehydrogenase (dimeric)	-2.15	0.00039	oxidoreductase activity
BF776610	<i>DHCR7</i>	7-dehydrocholesterol reductase	-2.30	0.00220	oxidoreductase activity
AW266953	<i>MTHFD2</i>	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2	-2.39	0.00011	oxidoreductase activity
BE485574	<i>ALDH1A3</i>	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	-2.42	0.00764	oxidoreductase activity
CK953132	<i>AKR1A1</i>	aldo-keto reductase family 1, member A1	-2.48	0.00954	oxidoreductase activity
BI773879	<i>DHCR24</i>	24-dehydrocholesterol reductase	-2.88	0.00029	oxidoreductase activity
CK949309	<i>SQLE</i>	squalene epoxidase	-3.31	0.01418	oxidoreductase activity
CK961820	<i>CYP51A1</i>	cytochrome P450, family 51, subfamily A, polypeptide 1	-3.74	0.00330	oxidoreductase activity
NM_174099.2	<i>LDHA</i>	lactate dehydrogenase A	-4.46	0.00006	oxidoreductase activity
AY241933.1	<i>SCD</i>	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	-4.90	0.00000	oxidoreductase activity

라. 차이나게 발현되는 유전자들의 분류

2배 이상 발현의 차이가 있는 107개 유전자들은 DAVID web-based tool를 활용하여 molecular function과 biological process에 따라 분류하였다. 또한 이들 유전자들은 또 다시 KEGG pathway database를 활용하여 분류하였다. 그 결과 cellular component 분류에는 membrane에 관련된 유전자들이 29.9%로 가장 많았고, molecular function에서는 "ion binding" (15.8%), "transferase activity" (12.1%), "oxidoreductase activity" (12.1%), "structural molecule activity" (10.2%), and "transcription activator" (5.6%)로 나타났다. 그리고 molecular process에서는 "developmental process" (27.1%), "metabolic process" (11.2%) and "oxidation reduction" (10.2%)에 관련된 유전자들이 많이 발현됨을 분류를 통해 알 수 있었다 (Figure 5-7).

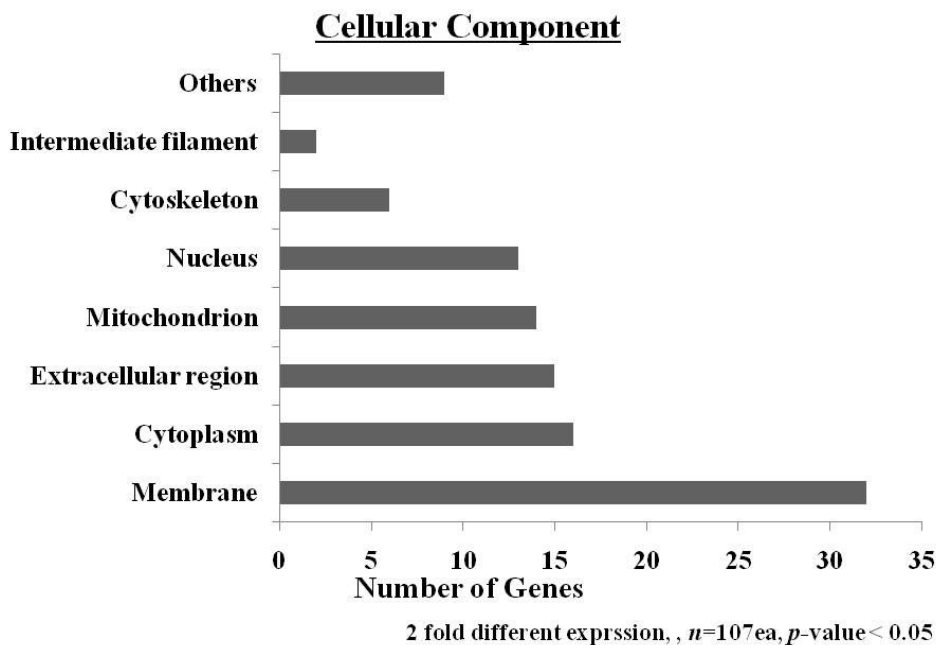


Figure 5. Microarray analysis of IVD and CR1aa (Cellular Component). Individual IVD-1, IVD-2, and IVD-3-derived Cy-5-labeled (Red) cDNAs were independently mixed with CR1aa-1, CR1aa-2, and CR1aa-3-derived Cy3-labeled (Green) cDNA to minimize the variation between IVD and CR1aa group. The analysis of genes expressed more than two fold above, or below the median fold-value in IVD (IVD-1, IVD-2, and IVD-3), compared to CR1aa group. A: The colors indicate the relative expression levels of each gene, with red indicating the highest expression above the median value and blue indicating the lowest expression below the median value. The 107 differentially down-regulated genes were organized according to cellular component, molecular function, and molecular pathway

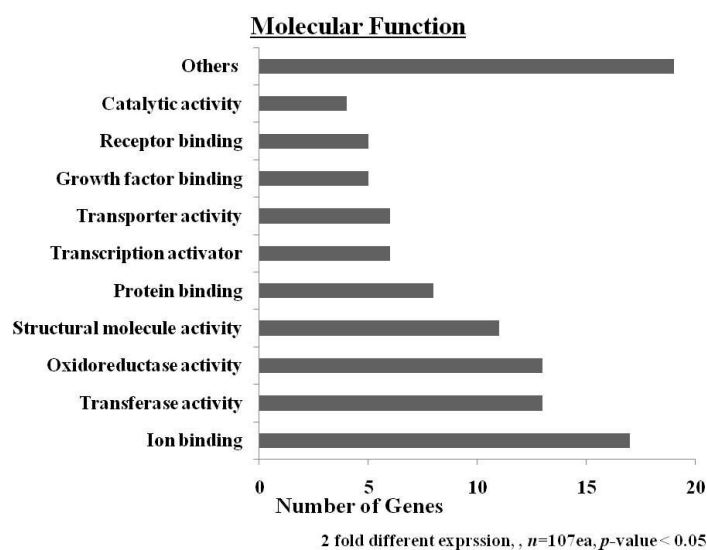


Figure 6. Microarray analysis of IVD and CR1aa (Molecular Function). Individual IVD-1, IVD-2, and IVD-3-derived Cy-5-labeled (Red) cDNAs were independently mixed with CR1aa-1, CR1aa-2, and CR1aa-3-derived Cy3-labeled (Green) cDNA to minimize the variation between IVD and CR1aa group. The analysis of genes expressed more than two fold above, or below the median fold-value in IVD (IVD-1, IVD-2, and IVD-3), compared to CR1aa group. A: The colors indicate the relative expression levels of each gene, with red indicating the highest expression above the median value and blue indicating the lowest expression below the median value. The 107 differentially down-regulated genes were organized according to cellular component, molecular function, and molecular pathway

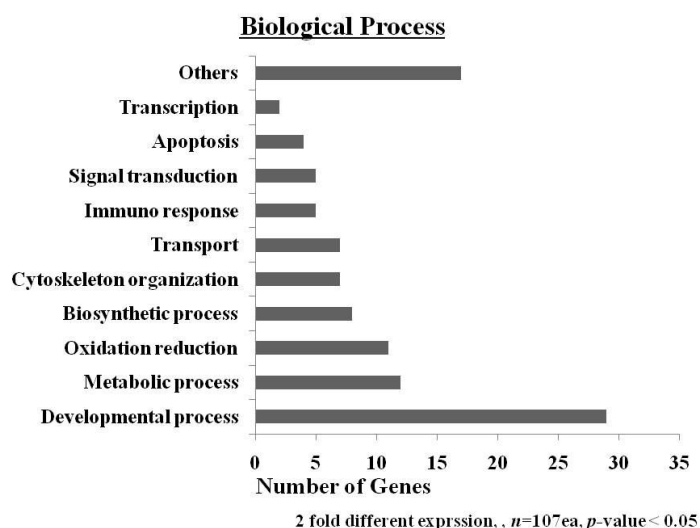


Figure 7. Microarray analysis of IVD and CR1aa (Biological Process). Individual IVD-1, IVD-2, and IVD-3-derived Cy-5-labeled (Red) cDNAs were independently mixed with CR1aa-1, CR1aa-2, and CR1aa-3-derived Cy3-labeled (Green) cDNA to minimize the variation between IVD and CR1aa group. The analysis of genes expressed more than two fold above, or below

the median fold-value in IVD (IVD-1, IVD-2, and IVD-3), compared to CR1aa group. A: The colors indicate the relative expression levels of each gene, with red indicating the highest expression above the median value and blue indicating the lowest expression below the median value. The 107 differentially down-regulated genes were organized according to cellular component, molecular function, and molecular pathway.

이들 결과로 미루어 볼 때, 이번 연구는 serum-free medium인 IVD101 샘플에서는 serum medium 샘플인 CR1aa와 비교하여 Ion binding과 cytoskeleton related gene들이 많이 발현되었고, transcription, receptor, transport, 그리고 redox-related gene들은 낮게 발현됨을 알 수 있었다. 이것은 serum에 들어 있는 불필요한 많은 활성인자 (호르몬, cytokine 등등)들에 의해 membrane-protein들이 활성화 되었고 많은 신호전달들이 핵에 전달되어 오히려 난자 발달을 저해하였을 것으로 사료된다 (Figure 8).

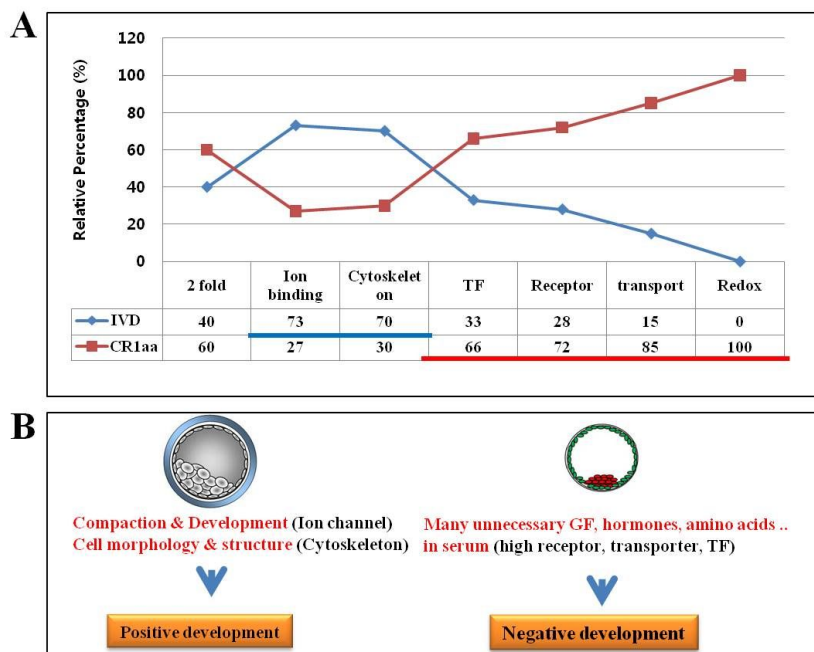


Figure 8. Expected mechanism to improved survival of serum-free medium (IVD) than serum-supplemented medium (CR1aa).

6. 수정란 성감별에 의한 맞춤 쌍태 유기 기술 개발

Amelogenin PCR 방법을 이용한 성감별법 구축

- 소의 amelogenin sequence로부터 specific primer는 AMELX (Genbank accession no: NM_001014984)와 AMELY (GenBank accession no: NM_174240)를 ClustalW 프로그램으로 alignment하여 Y-chromosome의 amelogenin에서 63 bp가 deletion된 부위를 활용하여 forward primer (5'-CAG CAA CCA ATG ATG CCA GTT C-3')과 reverse primer (5'-GTC TTG TCT GTT GCT GGC CA-3')를 design한다. 이들 primer로 PCR하게 되면 367 bp X-amplicons와 304 bp Y-amplicons를 얻을 수 있다.

Sexing를 위한 가장 최근의 방법은 LAMP 시스템으로 PCR 방법보다 많은 기기가 필요없고 성별에 소요되는 시간이 1시간이내에 매우 짧다는 것이 장점이다. 하지만, 이 두 시스템은 성별을 확인하는데 매우 정확하다 할지라도, template로 사용될 genomic DNA가 필요하며 이것은 배반포 난자로부터 유래됨으로 결국 배반포 난자에 상처를 주게 된다. 상처를 받은 배반포 난자는 그렇지 않은 배반포 난자에 비해 발달율이 저하 될 것이고 난자가 매우 귀한 한우의 경우에는 적합한 sexing 방법이 아니라 사료된다. 또한, flow cytometer를 활용한 sorted X-sperm 혹은 sorted Y-sperm의 경우 unsorted sperm을 사용하였을 때와 비교할 때 원활하지 않은 capacitation과 sex-sorted sperm의 degradation으로 낮은 수정능과 난자 발달의 저하를 초래하므로 원하는 배반포 난자를 얻기 위해서는 많은 한우 난자가 필요하다. 따라서, 최근에 성별에 따라 배반포 난자의 발달율과 형태 및 cytoplasm의 투명도가 다르다는 사실이 보고되었다(Bermejo-Alvarez; 2010). 전반적으로 IVF 7일후 배반포 난자들은 크게 두 가지 그룹으로 부분된다. 크기, inner cell mass의 위치 그리고 세포질 투명도의 차이로 구분할 수 있는데, 본 실험에서는 XX-blastocyst 그룹(크기가 평균보다 작고, inner cell mass가 균질하지 않으며 세포질에 흩어져 있는 모습으로 투명도가 낮음)과 XY-blastocyst 그룹 (발달율이 좋아 크기가 평균보다 높고, inner cell mass가 TE와 뚜렷이 구분되며 세포질의 투명도가 뛰어남)으로 나누어 구분하였으며, 이러한 형태적 차이는 sexual dimorphism에 기인하는 것으로 사료된다. Sexual dimorphism으로 분류된 두 그룹이 실제 PCR sexing을 했을 때 기대치와 얼마나 차이를 보이고 정확한지를 알아보기 위해 형태적으로 차이를 보이는 두 그룹인 XX-blastocyst candidate 그리고 XY-blastocyst candidate로부터 genomic DNA를 분리하였다 (Fig. 1). 좀 더 정확한 PCR sexing을 위해 Amelogenin PCR 방법을 이용한 성감별법을 활용하여 검증하였다 (Fig. 2)

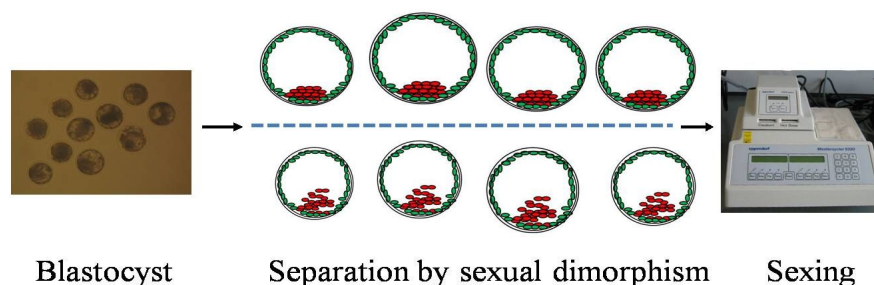


Fig. 1. Verification of sexing by PCR technique with bovine blastocysts separated using sexual dimorphism.

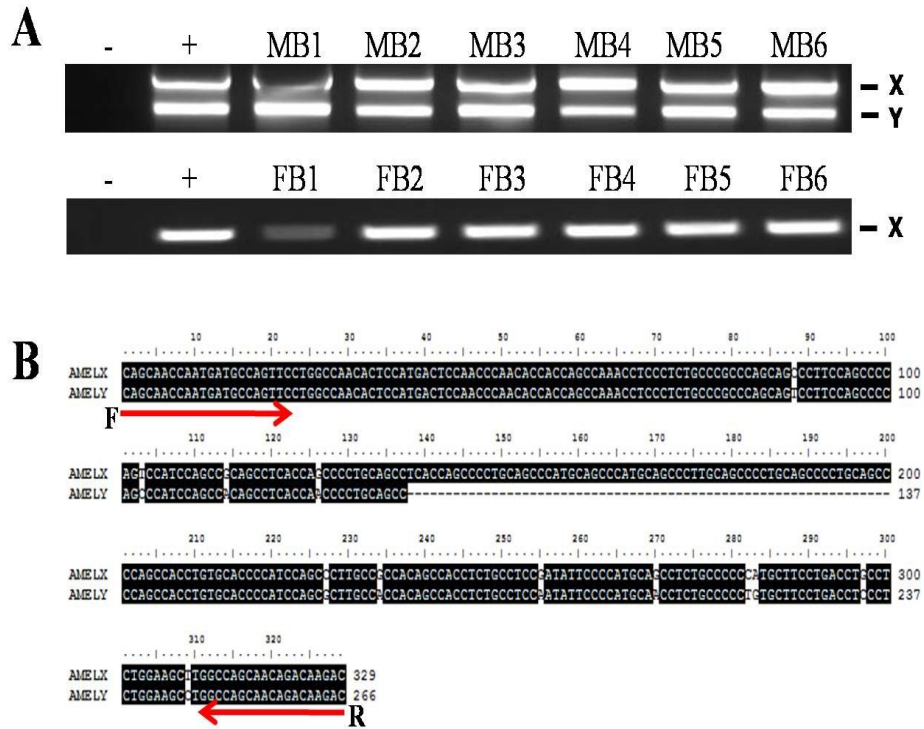


Fig 2. Representative amelogenin PCR product from genomic DNA of male-blastocyst candidates (MB1~MB6) or female-blastocyst candidates (FB1~FB6). A, Male genomic DNA produces a 329 bp X-amplicon and a 266 bp Y-amplicon. Female genomic DNA produced only the 329 bp X-amplicon. - indicates negative control, water instead of genomic DNA and + indicates positive control (genomic DNA of bull or cow). B, The bovine amelogenin sequences (AMELX, GenBank accession no: NM_001014984; AMELY, GenBank accession no: NM_174240) were aligned using ClustalW program to identify the 63 bp deletion to which flanking PCR primers were designed. F indicates forward primer of amelogenins (AMELX or AMELY; 5'-CAG CAA CCA ATG ATG CCA GTT C-3') and R indicates reverse primer of amelogenins (AMELX or AMELY; 5'-GTC TTG TCT GTT GCT GGC CA-3').

또한, IVF 7일후 배반포 난자들을 sexual dimorphism을 활용하여 XX-embryo candidate와 XY-embryo candidate로 나누어 수정란 이식을 수행하였다. 이식을 진행한 결과 현재 expected XX-embryo에서는 52두중 12두가 확인되어 23.1%의 임신율이 확인되었고 expected XY-embryo에서는 64두중 25두가 확인되어 39%의 높은 임신율을 확인하였다(Table1).

Grouping by sexual dimorphism	No. of transferred recipient	Pregnancy	Pregnant rate (%)
Expected XX-embryos	52	12	23.1
Expected XY-embryos	64	25	39

Table 1. Pregnancy rate after transferring in vitro produced bovine blastocysts using sexual dimorphism

7. 수태율 향상을 위한 황체영향물질 주사에 따른 이식기술 개선결과

수정란 이식시에 직장을 통해 주입기를 자궁각 깊이 위치시키기 위한 조작 중 자궁을 촉진함으로써 생기는 자극에 의해 자궁내막으로부터 생성되어 자궁내로 분비되는 황체퇴행물질 (ProstaglandinF2 α , PGF2 α)의 황체퇴행작용을 줄여 수정란의 발달 및 착상, 임신유지에 저해작용을 줄여 수태율을 높이기 위한 방법과 부속황체의 생성 및 부속황체에서 생성되는 Progesterone의 혈청농도를 증가시켜 수태율을 높인다고 알려진 황체영향물질을 젖소 처너우를 대상으로 한우 체외수정란의 이식에 적용하여 연구 한 바 다음과 같은 결과를 얻었다. 이들 황체영향물질로는 human chorionic gonadotrophin (hCG)과 Flunixin Meglumine (FM)을 사용하였고, 실험은 각군 6두씩 5회 반복 실험하였으며 그 결과는 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Comparison of Pregnancy Rates following Luteotrophic Substances Treatments

Substance	No. of heifers transfered	No. of pregnant hifers at day23 post-ET(%)	No. of pregnant hifers at day35 post-ET(%)	No. of heifers showing early fetaldeath
hCG	30	24(80.0%) ^a	19(63.3%) ^c	5(16.7%) ^g
FM	30	23(76.7%) ^a	23(76.7%) ^d	0(0.0%) ^h
Control	30	18(60.0%) ^b	17(56.7%) ^f	1(3.3%) ^h

^{a-h} Values with different superscripts in same column are different($p < 0.05$). Hifers were assigned to one of three treatments and experiments were repeated three times; FM-treated hifers were given mg of flunixin meglumine(FM) at the time of ET; HCG-treated hifers were given 1500IU of hCG at the time of ET; Control hifers received no treatments; Pregnant diagnosis were carried out at day23 and at day35 post-ET by ultrasuound divice

이 결과로 hCG와 FM을 주사 후 수정란을 이식하였을때 42일령(이식후 35일)에 임신진단 한 결과, FM주사 후 이식 하였을때 76.7%로 가장 높은 수태율을 보였고, hCG주사군과 대조군도 63.3%와 56.7%로 hCG처리군에서 높은 결과를 보였다($p < 0.05$). 30일령(이식후 23일)과 42일령(이식후 35일)에 초음파 진단기로 임신진단한 결과 임신된 태아의 임신유지율은 30일령 진단에서는 hCG처리군과 FM처리군에서 24두(80.0%)와 23두(76.7%)로 높게, 그리고 대조군에서는 17(56.7%)두로 낮게 나타났으나, 42일령 진단에서는 hCG주사군에서 5두(16.7%)가 태아의 조기 사망으로 진단되어 임신유지에 좋은 영향을 미친다고 볼 수 없었으며($p < 0.05$), FM주사군과 대조군에서는 조기 사망한 태아가 0두(0.0%), 1두(3.3%)로 나타나 유의성 없이($p > 0.5$) 임신이 유지되었다. 결과로 수정란 이식에 있어서 수태율을 높이고 태아의 임신상태를 유지시키는 방법으로 이식전 FM주사가 hCG주사방법이나 대조군보다 좋다는 결과를 얻었다.

수정란 이식시에 수란우에 군별 처치(FM, hCG, 무처리)를 하였을때 임신율에 대한 발정재귀율을 비교하였는데 그 결과는 Table 2.와 같다.

Table 2. Effects of Luteotropic Substances on return to the estrus

Substance	No. of Heipers transfered	No. of hifers return to the estrus at 2weeks post-ET(%)	No. of hifers return to the estrus from 17days to 5weeks post-ET(%)	No. of non-pregnant hifers at 35days(%) post-ET
hCG	30	2(6.6%) ^a	5(16.7%) ^d	4(13.3%) ^f
FM	30	4(13.3%) ^b	2(6.6%) ^e	1(3.3%) ^g
Control	30	10(33.3%) ^c	2(6.6%) ^e	1(3.3%) ^g

^{a-g} Values with different superscripts in same culumn are different(p<0.05). Hifers were assigned to one of three treatments and experiments were repeated three times; FM-treated hifers were given mg of flunixin meglumin(FM) at the time of ET; HCG-treated hifers were given 1500IU of hCG at the time of ET; Control hifers received no treatments; Pregnant diagnosis were carried out at day35 post-ET by ultrasuound divice

Table 2.에서 보는바와 같이 발정 재귀율에서 hCG처리군의 개체들이 FM처리군과 대조군에 비교해 다른 양상을 보였다. 3주의 번식주기를 갖는 소의경우 이식 후 2주후에는 불임한 개체가 재귀한 발정과정 중에 있어야 하는데, 정상적인 주기에 발정이 재귀한 개체가 hCG처리군에서 2두(6.6%), FM처리군에서 4두(13.3%) 그리고 대조군에서 10두(33.3%)를 보여 hCG처리군에서 높은 임신 기대치를 보였다. 그러나 주기에 맞지 않게 발정에 재귀하는 개체수가 hCG처리군에서 5두(16.7%)로 FM처리군의 2두(6.6%)와 대조군의 2두(6.6%)보다 높게 나타났고, 임신진단시까지 발정에 재귀하지 않은 개체도 4두(13.3%)로 FM처리군의 1두(3.3%) 대조군의 1두(3.3%)보다 높게 나타났다. 이는 hCG 주사시에 부속황체의 형성과 이 부속황체로부터 Progesterone(p-4)분비를 더하여 혈중내 P4농도를 높이고, 높아진 P4농도가 착상과 임신유지에 좋은 영향을 미친다는 여러 연구결과들이 있는데, 반면에 임신하지 않은 개체가 자연스럽게 발정에 재귀하는 생리적인 현상을 저해하는 작용이 있음이 본 실험에서 나타났다. 결과적으로 수정란 이식시 hCG주사는 수태율을 높이는 효과가 있지만, 미임신 개체의 발정재귀가 늦어 공태기간이 길어지는 결과를 가져오므로 바람직하지 않다는 결과를 얻었다. FM처리군에서는 높아진 수태율과 더불어 미임신 개체들의 발정재귀도 자연스럽게 이루어져 수태율 향상과 농가 수익에 좋은 영향을 미친다는 결과를 얻었다.

수정란 이식시에 사용하는 수태율 개선방법으로 국부 마취제인 Lidocaine을 사용해서 좋은 결과를 얻었다는 보고가 있었던 바 본 실험에서도 수정란 이식시에 Lidocane을 처리하고 또한 FM처리를 하여 두 군간 수태율을 비교하였는데 그 결과는 Table 3.과 같다.

Table 3. Comparison of pregnancy rate between FM and lidocaine treatments

Sort	No. of heifers transfered	No.of pregnants at 35days post-ET(%)
FM	112	81(72.3) ^a
Lidocaine	108	73(67.5) ^b

^{a,b} Values with different superscripts in same column are different($p < 0.05$). FM-treated hifers were given mg of flunixin meglumin(FM) at the time of ET; Lidocane-treated heifers were given 5ml lidocain for epidural anesthesia; Pregnant diagnosis were carried out at days35 post-ET by ultrasuound divice.

수란우의 주입기 자극으로 인한 통증을 없애고 수란우들을 안정시키기 위한 방법으로 Lidocane에 의한 미추경막외마취를 하고 수정란을 이식하였을때 수태율은 67.5%로 FM을 주사하고 이식 하였을때의 수태율 72.3%에 비해 낮은 결과를 얻었다. 이는 미추경막외마취를 하는 것으로 인하여 수란우의 안정성이 좋아져 이식시 시술자의 주입기 조작이 용이함은 있었으나 자궁축진으로 인한 자극으로부터 오는 황체퇴행물질의 생성을 억제하는 작용은 없어 수태율 개선에 도움이 되지 않는 것으로 판단된다. 수정란 이식시에 수태율을 높이기 위한 목적으로 수란우에 약제를 주사하는 경우에 주사시 통증에 의한 자극과 이에 따른 흥분으로 인하여 오히려 수태율이 좋아지지 않는다는 연구결과도 있지만, 수란우를 안정시키면서 원하는 위치에 수정란을 이식할 수 있는 숙련된 시술자에게는 Lidocane을 사용한 경막외마취 방법보다 황체퇴행물질의 생성을 억제하는 FM을 처리하는 방법이 수태율을 높일 수 있다는 결과를 얻었다.

결론적으로 수정란 이식의 수태율을 높이기 위해 황체기능 향상물질인 hCG와 황체퇴행물질의 생성을 억제하는 FM 및 수란우의 안정을 목적으로 lidocane을 이식전 주사 하였을 때, FM을 주사한 개체들에서 높은 수태율과 임신하지 않은 개체들의 자연스런 발정재귀가 나타남으로써 수정란의 이식시 FM을 주사하는 것이 수태율을 높이는 좋은 방법이라는 결과를 얻었다.

8. 수태율 향상을 위한 이식용액의 개발과 이식수정란의 수 결정과 농가수익을 위한 인위적 쌍자생산

가. 수태율향상을 위한 이식용액의 개발

Table 1. Comparison of Pregnancy Rates referred to Transfer Mediums and The Time Required

Transfer Mediums*	Pregnancy rate following time required (No. of conceptions/No. of recipients)		
	within 30min	between 30min and 1h	more than 1h
10%FBS	21.1(11/52)	14.9(13/87)	7.8(3/38)
20%FBS	58.7(138/235)	60.4(171/283)	58.1(103/177)
0.5%BSA	51.5(68/132)	47.6(61/128)	46.8(44/94)
0.7%BSA	53.6(103/192)	54.3(126/232)	52.2(82/157)

*; Mediums containing embryos from Laboratory to recipients uterus

높은 수태율을 얻기위해 실험실에서부터 수란우의 몸속에 주입 될 때 까지 수정란이 담겨있는 이식용액의 종류에 따른 수태율과 소요되는 시간에 따른 수태율을 비교하였는데 그 결과는 Table 1)와 같다. 기본용액은 TCM199으로 하여 20%FBS, 10%FBS, 0.7%BSA, 0.5%BSA를 첨가하여 수태율을 비교하였는데 20%FBS를 첨가한 경우에 가장높은 수태율을 보였고 소요되는 시간에 따라 변화없는 수태율을 보였다. 10%FBS를 첨가하여 사용하는 경우에는 근거리에서도 낮은 수태율을 보였지만 소요되는 시간이 많아질수록 더 나쁜 결과를 보였다. 수정란이 배양되었던 배지와 같은 농도인 0.7%BSA를 첨가한 경우도 20%FBS를 첨가한 경우보다 낮았는데, 수정란이 이동되는 시간중에는 수정란이 배양되던 배지농도보다 약간 높은 농도가 수정란에 덜 나쁜영향을 미치는 것으로 사료된다. 실험실로부터 수란우의 체내에 이식될때까지 수정란을 담고있는 용액은 시간이 지남에 따라서 Ph의 변화를 가져오는데 20%FBS를 첨가한 경우에는 이 변화가 상대적으로 적은 것으로 나타났다. 결과적으로 수정란 이식시 수정란 이식용 용액으로는 수태율에서 더 좋은 결과를 얻음으로써 20%FBS가 적합하다고 사료되고, 또한 배양액과 이식용 용액에 관한 적합한 농도의 차이는 더 연구할 가치가 있다고 본다.

나. 수태율과 분만을 향상을 위한 경산우에 따른 이식수정란의 수 결정

Table 2. Pregnancy rate and rate of birth to twins following number of embryos transferred

No. of transferred embryos	No. of recipients*	No. of Pregnant	No. of birth to twins	No. of birth to triplets
1	38	14(36.8%)		

2	162	86(53.0%)	13(15.1%)	
3	87	44(50.5%)	28(63.6%)	3

*;normal estrus, clean reproduct organ,

정상적인 유우 경산우에서 고가의 한우송아지를 얻기위해 한우 체외 수정란을 이식함에 있어서 이식하는 수정란의 개수가 수태율과 쌍둥이 분만율에 미치는 영향을 조사 하였다. 결과는 Table 2)에 나타내었다. 수정란을 1개, 2개, 3개 이식하였을 때 수태율은 36.8%, 53.0%, 50.5%로 2개를 이식하였을 때와 3개를 이식하였을 때가 높았고, 쌍둥이 출현율은 63.6%로 3개를 이식한 경우에 가장 높았다. 배사망율과 유산율은 별 차이가 없었고 분만율에서도 차이가 없는 것으로 나타났다. 수익의 증대를 목적으로 유우 경산우에 한우 수정란을 이식하였을 때 수정란의 수는 3개를 이식하는 것이 수태율, 배사망율, 유산율, 분만율, 쌍자생산을 모든면에서 가장 좋았다. 하지만 쌍자생산에서 암수가 같이 임신되었을 때 발생하는 Freemartin은 번식기능의 상실이라는 아쉬운점이 있지만 농가의 수익증대엔 상당한 기여를 하는 것으로 사료된다

Table 3. Effects of one or two embryos transferred to heifers*

No. of embryos transfered	No. of heifers	No. of Pregnant at 35days(%)	No. of Pregnant at 60days(%)	No. of heifers showing loss**(%)	rate of calving	rate of twining
1	186	131 (70.4%)	126 (67.7%)	3 (2.38%)	97.6% (123/126)	
2	197	143 (72.5%)	131 (66.4%)	28 (21.3%)	78.6% (103/131)	6.1% (8/131)

*; nulliparous dairy cows

loss**; fetal death, abortion, stillbirth after pregnancy diagnosis at 60day

미경산우의 이식에도 이식란을 1개하는 경우와 2개하는 경우를 비교하였다. 임신율은 Table 3)과 같이 1개를 이식하였을 때와 2개를 이식하였을 때 큰 차이가 없었다. 그러나 사고율(배사망, 유산, 난산에 이은 사산)이 21.3%로 나타나 1개를 이식하였을 때의 2.3%보다 높았다. 또한 임신한 개체들의 분만율이 수정란1개를 이식하는 경우와 2개를 이식하는경우가 각각 97.6%와 78.6%로 나타났다. 결과적으로, 유우 처녀우에 한우 체외수정란을 이식하여 많은 건강한 송아지를 얻기 위해서는 1개를 이식하는 것이 가장 좋은 방법이고, 2개를 이식하는 것은 좋은 점이 전혀 없다는 결과를 얻었다.

다. 농가소득을 높이기 위한 한우 경산우에서 인위적 쌍태유기

Table 4. Twins effects following transfer method

Method	No. of Cows	No. of Pregnant	No. of Twins for Pregnants
*2embryos with A.I.	52	43(82.6)	27(62.7) ^a
**2embryos without A.I.	46	29(63.0)	11(37.9)
**3embryos without A.I.	43	27(62.7)	17(62.9) ^a

*;embryos were transferred at contralateral uterus of CL after A.I.

**;embryos were only transferred at ipsilateral uterus of CL

^a values in same column is not different($P>0.5$)

한우 경산우에도 생산성을 높이기 위해 인위적인 쌍자생산을 유기해보았다. Table 4에서 보는바와 같이 한우에서는 AI와 수정란 이식을 결합한 경우(AI후 7일에 체외수정란을 2개 황체가 없는 자궁각에 이식)에 임신율과 쌍자 생산율이 82.6%, 62.7%로 ET만 단독으로 하였을 때 보다 좋은 결과를 얻었다. ET만 단독으로 하였을때는 2개를 이식한경우에 3개를 이식한 경우 보다 임신율은 63.0%와 62.7%로 비슷하였으나 쌍자 생산율은 37.9%와 62.9%로 3개를 이식하는 경우가 좋았다. 이것은 이식 시 2개 이상 이식 하였을 때 배사망율 즉 임신유지에 좋지 않은 영향을 미친다. 결과적으로 한우 경산우에서는 1개의 수정란을 이식하는 것보다 AI에 따른 2개 또는 3개를 이식하여 임신율도 높이고 쌍자 생산을 유도하여 생산두수를 늘리는 것이 수익증대에 더 효과적이라고 사료된다.

실제적인 한우체외수정란의 활용에 있어서 이 실험에서 얻은 결과를 종합하여보면 난소와 자궁의 상태에 따른 임신율은 난소에의 영향은 거의 없었고 자궁의 상태에 따라 크게 영향 받는 것으로 나타났다. 이식용 용액의 종류에 따른 수태율은 20%FBS에서 가장 좋은 임신율을 보였다. 임상적으로 번식기에 질병이 없는 반복 교배우에서 항생제를 처리하고 수정란을 이식하는 경우가 높은 수태율을 보였고 적은 이식횟수로 임신이 가능하였다. 이식하는 수정란의 개수에 따른 임신율에서 경산우는 3개를 이식하였을때 쌍태 빈도는 높았으나 분만율에서는 2개를 이식하는것이 좋았다. 초임우에서는 1개를 이식하는것이 수태율, 분만율에서 좋았고 2개를 이식하였을때 수태율은 유사 하였으나 23.1%의 높은 손실(배사망, 유산, 쌍둥이로 인한 난산)로 미경산 유우에 한우수정란을 이식할 경우에는 우량한 수정란 1개만 이식하는 것이 좋다고 본다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1	난자의 유전자 발현을 조사하여 착상률 극대화된 수정란 생산	100	착상관련 유전자 조사에 의한 최적 배양 시스템 확보
2	한우품질확인 기술	100	SNP maker 를 이용한 한우 품질 보증 수정란 생산 체계 구축
3	육질관련 우량한우 수정란생산	100	육질 관련 유전자 마커 (Fatty acid synthase FASN, Calpain) 을 이용한 우량 한우 품질 보증 수정란 생산 체계 구축
4	체외 배양 조건 개선에 의한 수정란 생산 효율 개선	100	체외수정란의 최적 배양방법 결정, 배양방법의 최적조건 결정 및 무혈청배지 개발에 의한 최상의 수정란 생산과 거대 산자 생산 방지
5	체외수정란 생산에 있어 간단하고 저렴하며 높은효율의 배양방법개발	100	배양방법의 최적조건을 결정하기위해 혈청대신 BSA를 사용하여 간단하고 효율성 높은 최상의 수정란 생산 배양방법 개발
6	간편 유전자 검사 기술 확보 및 유전자 진단에 의한 보증 한우 수정란 생산	100	우수 수정란 marker를 이용한 한우 품질 보증 수정란 생산 체계 구축
7	체외 배양 조건 개선에 의한 최적의 수정란 생산 기반 구축	100	혈청배지와 무혈청배지에서 자란 난자간에 차이나게 발현되는 유전자를 활용하여 수정란의 최적 체외배양 기반구축
8	수정란 성감별에 의한 맞춤 쌍태유기 기술 개발	100	Amelogenin PCR과 sexual dimorphism방법을 이용한 성감별법 구축
9	수정란 이식에 수태율을 높이기 위한 외인성 황체영향물질의 사용으로 수태율을 높이는 방법 개발	100	Flunixin Meglumine(FM) 과 human chorionic gonadotrophin (hCG) 및 Lidocaine를 처리하여 수태율을 높일 수 있는 방법 개발
10	수태율 향상을 위한 이식용액과 농가소득을 높이기 위한 세부 이식방법 개발	100	고 수태율을 얻을 수 있는 이식용액의 개발 이식시 수정란의 개수에 따른 높은 수태율과 분만율을 얻을 수 있는 바람직한 이식수정란 수 확립

본 연구과제는 보증 수정란 생산 체계 확립 을 위한 난소의 유전자 검사에 의한 한우품질 보증 수정란 생산과 난자의 유전자 발현을 조사하여 한우보증수정란 과 최상의 육질로 평가할 수 있는 체외수정란의 생산 및 수정란 성감별에 의한 맞춤 쌍태유기 기술 개발과 수태율 향

상을 위한 프로그램 개발을 위한 체외수정란 생산방법 중 최상의 무혈청 배지를 이용한 체외 수정 및 배양방법을 확립하였고 수란우의 안정을 위한 호르몬 및 약제 투여에 의한 착상률 향상 프로그램 개발과 이식시기, 이식용액 그리고 이식수정란의 최적 이식 개수등을 규명하고 인위적인 쌍자 생산방법을 확립하여 농가에서 필요로 하는 최적 수정란 이식 기술 개발을 위한 첨단 생명공학 기술과 전통 번식기술을 결합하여 수정란이식 프로그램을 개발하는데 기여를 하였다.

본 과제는 2009년 6월에 시작한 과제로써, 3차년도로 진행한 바 다음과 같이 국내 연구 논문 2편 (한국 수정란이식학회지) 와 국외논문 (cloning and Stem cells, 출간) 1 편, 국내특허 출원 4편, 국내외 학술발표 20편의 연구 성과를 얻었다. 일부 연구 성과는 본 과제가 시작되기 전에 수행한 예비연구결과가 포함되어 있으나, 본과제의 지원을 통해 완성되었음을 밝혀둔다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

현재 기존의 낙농산업의 후퇴와 함께, 젖소에 한우수정란을 이식하여 농가의 소득 증대를 도모하고 있지만, 영세 수정란 이식소의 난립과 지방 축산 연구 기관의 주먹구구식인 수정란 이식 기술 보급으로 농가의 수입 증대에 크게 기여하고 있지 않는 실정이다. 한우의 효율적이고 지속적인 개량 및 농가소득 증대를 위해서는 수정란 이식기술의 활용도 및 효율성을 높이고, 이와 함께 첨단 유전체 기술 (DNA 마커)의 적용이 필요하고 유전형질을 검사하여 높은 유전형질을 갖은 수정란을 생산하고 최상의 체외수정방법 확립으로 최상의 수정란 생산-수태율 극대화로 이끌어 나갈 수 있으며 이식시기의 동기화로 소요경비 및 분만 후 신생자우 관리도 용이해지어 육우사육농가의 번식장애우의 비율 감소와 한우자우의 생산에 의한 경영비 절감과 소득증대 및 경쟁력을 제고함으로써 농가 수익증대에 크게 기여가 될 것으로 사료된다. 연구결과로 확립된 기술은 국내외에 원천특허가 가능하며, 생산동물의 특허를 통해 막대한 기술료를 창출할 수 있으며, 신약장기개발 시장에 적용할 경우 그 경제적 파급효과는 지대할 것으로 기대된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당사항없음

제 7 장 참고문헌

1. Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 350--355.
2. Aoki, F., and Schultz, R.M. (1999). NA replication in the 1-cell mouse embryo: stimulatory effect of histone acetylation. *Zygote* 7, 165--172.
3. Augustin, R., Pocar, P., Wrenzycki, C., et al. (2003). Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced in vitro. *Reproduction* 126, 91--99.
4. Boise, L.H., González-García, M., Postema, C.E., et al. (2003). Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74, 597-08.
5. Bortvin, A., Eggan, K., Skaletsky, H., et al. (2003). Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development* 130, 1673-680.
6. Campbell, K.D., Reed, W.A., White, K.L. (2000). Ability of integrins to mediate fertilization, intracellular calcium release, and parthenogenetic development in bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 62, 1702-709.
7. Cervera, R.P., Martí-Gutiérrez, N., Escorihuela, E., et al. (2009). Trichostatin A affects histone acetylation and gene expression in porcine somatic cell nucleus transfer embryos. *Theriogenology* 7, 1097-110.
8. Chan, J.A., Krichevsky, A.M., Kosik, K.S. (2005). MicroRNA-21 is an anti apoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 65, 6029-033.
9. Cibelli, J.B., Cunniff, K., Vrana, K.E. (2006). Embryonic stem cells from parthenotes. *Methods Enzymol.* 418,117-35.
10. Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., et al. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 13944-3949.
11. Cohen, G.M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326, 1-6.
12. Conway, E.M., Pollefeyt, S., Cornelissen, J., et al. (2000). Three differentially expressed survivin cDNA variants encode proteins with distinct antiapoptotic functions. *Blood* 15, 1435-6 1442.
13. Cryns, V., and Yuan, Y. (1998). Proteases to die for. *Genes Dev.* 12, 1551-570.
14. Cui, X.S., Li, X.Y., Jeong, Y.J., et al. (2006). Gene expression of cox5a, 5b, or 6b1 and their roles in preimplantation mouse embryos. *Biol. Reprod.* 74, 601-10.
15. Cui, X.S., Li, X.Y., and Kim, N.H. (2007). Global gene transcription patterns in in

- vitro-cultured fertilized embryos and diploid and haploid murine parthenotes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352, 709–15.
16. Cui, X.S., Zhang, D.X., Ko, Y.G., et al. (2009). Aberrant epigenetic reprogramming of imprinted microRNA-127 and Rtl1 in cloned mouse embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379, 390–94.
17. Daniels, R., Hall, V. and Trounson, A.O. (2000). Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. *Biol. Reprod.* 63, 1034–040.
18. Ding, X., Wang, Y., Zhang, D., et al. (2008). Increased preimplantation development of cloned bovine embryos treated with 5-aza-20-deoxycytidine and trichostatin A. *Theriogenology* 70, 622–30.
19. Dong, G., Luo, J., Kumar, V., et al. (2010). Inhibitors of histone deacetylases suppress cisplatin-induced p53 activation and apoptosis in renal tubular cells. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 298, F293–300.
19. Enright, B.P., Kubota, C., Yang, X., et al. (2003). Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-20-deoxycytidine. *Biol. Reprod.* 69, 896–01.
20. Fabian, D., Il'ova, G., Rehak, P., et al. (2004). Inhibitory effect of IGF-I on induced apoptosis in mouse preimplantation embryos cultured in vitro. *Theriogenology* 61, 745–55.
21. Fahrudin, M., Otoi, T., Karja, N.W., et al. (2002). Analysis of DNA fragmentation in bovine somatic nuclear transfer embryos using TUNEL. *Reproduction* 124, 813–19.
22. Feugang, J.M., Van Langendonck, A., Sayoud, H., et al. (2003). Effect of prooxidant agents added at the morula/blastocyst stage on bovine embryo development, cell death and glutathione content. *Zygote* 11, 107–18.
23. Hao, Y., Lai, L., Mao, J., et al. (2004). Apoptosis in parthenogenetic preimplantation porcine embryos. *Biol. Reprod.* 70, 1644–649.
24. Hardy, K. (1997). Cell death in the mammalian blastocyst. *Mol. Hum. Reprod.* 3, 919–25.
25. Hattori, N., Nishino, K., Ko, Y., et al. (2004). Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. *J. Biol. Chem.* 279, 17063–7069.
26. Hermeking, H. (2010). The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death. Differ.* 17, 193–99.
27. Herrler, A., Krusche, C.A., and Beier, H.M. (1998). Insulin and insulin-like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. *Biol. Reprod.* 59, 1302–310.

28. Iager, A.E., Ragina, N.P., Ross, P.J., et al. (2008). Trichostatin A improves histone acetylation in bovine somatic cell nuclear transfer early embryos. *Cloning Stem Cells* 10, 371–79.
29. Im, G.S., Seo, J.S., Hwang, I.S., et al. (2006). Development and apoptosis of pre-implantation porcine nuclear transfer embryos activated with different combination of chemicals. *Mol. Reprod. Dev.* 73, 1094–101.
30. Inoue, K., Ogonuki, N., Miki, H., et al. (2006). Inefficient reprogramming of the hematopoietic stem cell genome following nuclear transfer. *J. Cell Sci.* 119, 1985–991.
31. Kawamura, K., Sato, N., Fukuda, J., et al. (2003). Survivin acts as an antiapoptotic factor during the development of mouse preimplantation embryos. *Dev. Biol.* 256, 331–41.
32. Kishigami, S., Mizutani, E., Ohta, H., et al. (2006). Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340, 183–89.
33. Kishigami, S., Thuan, N. V., Hikichi, T., et al. (2006). Epigenetic abnormalities of the mouse paternal zygotic genome associated with microinsemination of round spermatids. *Dev. Biol.* 289, 195–05.
34. Kishigami, S., Wakayama, S., Thuan N.V., et al. (2006). Production of cloned mice by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Protoc.* 1, 125–38.
35. Kolle, S., Stojkovic, M., Boie, G., et al. (2002). Growth hormone inhibits apoptosis in vitro produced bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 1, 180–86.
36. Koo, D.B., Kang, Y.K., Choi, Y.H., et al. (2002). Aberrant allocations of inner cell mass and trophectoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. *Biol. Reprod.* 67, 487–92.
37. Koo, D.B., Kang, Y.K., Park, J.S., et al. (2004). A paucity of structural integrity in cloned porcine blastocysts produced in vitro. *Theriogenology* 62, 779–89.
38. Kure-Bayashi, S., Miyake, M., Katayama, M., et al. (1996). Development of porcine blastocysts from in vitro- matured and activated haploid and diploid oocytes. *Theriogenology* 46, 1027–036.
39. Li, X., Kato, Y., and Tsunoda, Y. (2005). Comparative analysis of development related gene expression in mouse preimplantation embryos with different developmental potential. *Mol. Reprod. Dev.* 72, 152–60.
40. Li, X., Kato, Y., Tsuji, Y., and Tsunoda, Y. (2008). The effects of trichostatin A on mRNA expression of chromatin structure-, DNA methylation-, and development-related genes in cloned mouse blastocysts. *Cloning Stem Cells* 10, 133–42.
41. Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta C(T))$ method. *Methods* 25,

402-08.

42. Lonergan, P., Rizos, D.A., Gutierrez-Adan, et al. (2003). Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. *Biol. Reprod.* 69, 1424-1431.
43. Matwee, C., Betts, D.H., and King, W.A. (2000). Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote* 8, 57-8.
44. Meng, F., Henson, R., Lang, M., et al. (2006). Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangio carcinoma cell lines. *Gastroenterology* 130, 2113-129.
45. Nutt, L.K., Gogvadze, V., Uthaisang, W., et al. (2005). Indirect effects of Bax and Bak initiate the mitochondrial alterations that lead to cytochrome c release during arsenic trioxide-induced apoptosis. *Cancer Biol. Ther.* 4, 459-67.
46. Palmieri, S.L., Peter, W., Hess, H., et al. (1994). Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev. Biol.* 166, 259-67.
47. Park, E.S., Hwang, W.S., Jang, G., et al. (2004a). Incidence of apoptosis in clone embryos and improved development by the treatment of donor somatic cells with putative apoptosis inhibitors. *Mol. Reprod. Dev.* 68, 65-1.
48. Park, E.S., Hwang, W.S., Kang, S.K., et al. (2004b). Improved embryo development with decreased apoptosis in blastomeres after the treatment of cloned bovine embryos with betamercaptoethanol and hemoglobin. *Mol. Reprod. Dev.* 67, 200-1 206.
49. Parrish, Susko-Parrish, J., Winer, M.A., et al. (1988). Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* 38, 1171-180.
50. Raff, M.C. (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356, 397
51. Regenstreif, L.J., and Rossant, J. (1989). Expression of the c-fms proto-oncogene and of the cytokine, CSF-1, during mouse embryogenesis. *Dev. Biol.* 133, 284-94. 15.
52. Rosenkrans, C.F. Jr., Zeng, G.Q., McNamara, G.T., et al. (1993). Development of bovine embryo in vitro as affected by energy substrates. *Biol. Reprod.* 49:459-62.
53. Rybouchkin, A., Kato, Y., and Tsunoda, Y. (2006). Role of histone acetylation in reprogramming of somatic nuclei following nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 74, 1083-089.
54. Salveson, G.S., and Dixit, V.M. (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91, 443-46.
55. Sempere, L.F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., et al. (2004). Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol.* 5, R13.
56. Shao, G.B., Ding, H.M., Gao, W.L., et al. (2009). Effect of trypanostatin A treatment on gene expression in cloned mouse embryos. *Theriogenology* 71, 1245-252.

57. Shen, X.H., Jin, Y.X., Ko, Y.G., et al. (2006). High mobility group box 1 (HMGB1) enhances porcine parthenotes developing in vitro in the absence of BSA. *Theriogenology* 66, 2077–083.
58. Shi, L.H., Miao, Y.L., Ouyang, Y.C., et al. (2008). Trichostatin A (TSA) improves the development of rabbit–rabbit intraspecies cloned embryos, but not rabbit–human interspecies cloned embryos. *Dev. Dyn.* 237, 640–48.
59. Shin, S., Sung, B.J., Cho, Y.S., et al. (2001). An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and 7. *Biochemistry* 40,1117–123.
60. Si, M.L., Zhu, S., Wu, H., et al. (2007). MiR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* 282, 14328–4336.
61. Steel, R.G.D., and Torrie, J.H. (1980). *Principles and Procedures of Statistics*. New York: McGraw Hill Book Co.
62. Van Soom, A., Boerjan, M., Ysebaert, M.T., et al. (1996). Cell allocation to the inner cell mass and the trophectoderm in bovine embryos cultured in two different media. *Mol. Reprod. Dev.* 45 171–82.
63. Vogelauer, M., Rubbi, L., Lucas, I., et al. (2002). Histone acetylation regulates the time of replication origin firing. *Mol. Cell* 10, 1223–233.
64. Winger, Q.A. Hill, J.R., Shin, T., et al. (2000). Genetic reprogramming of lactate dehydrogenase, citrate synthase, and phosphofructokinase mRNA in bovine nuclear transfer embryos produced using bovine fibroblast cell nuclei. *Mol. Reprod. Dev.* 56, 458–64.
65. Wrenzycki, C. Wells, D., Herrmann, D., et al. (2001). Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. *Biol. Reprod.* 65, 309–17.
66. Yang, X., Smith, S. L., Tian, X.C., et al. (2007). Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat. Genet.* 39, 295–02.
67. Yamakuchi, M., Ferlito, M., and Lowenstein, C.J. (2008). miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 13421–3426.
68. Yang, M.Y., and Rajamahendran, R. (2002). Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 70, 159–69.
69. Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., et al. (1990). Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* 265, 17174–7179.
70. Yu, Y., Ding, C., Wang, E., et al. (2007). Piezo-assisted nuclear transfer affects cloning efficiency and may cause apoptosis. *Reproduction* 133, 947–54.
71. Zhang, Y., Li, J., Villemoes, K., et al. (2007). An epigenetic modifier results in

improved in vitro blastocyst production after somatic cell nuclear transfer. *Cloning Stem Cells* 9, 357–363.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.