

최 종 보 고 서

<p>(뒷면)</p> <p>주 의 (편집순서 8)</p> <p>(15 포인트 고딕계열)</p> <p>↑ 6cm ↓</p>	<p>젖소 에 있 어 서 기 능 성 성 분 의 증 진 연 구 를 위 한 우 유 유 래 유 선 상 피 세 포 의 응 용</p> <p>농림축산식품부</p>	<p>(앞면)</p> <table border="1"><tr><td>발간등록번호</td></tr><tr><td>11-1543000-000235-01</td></tr></table> <p>↓</p> <p>젖소에 있어서 기능성 성분의 증진 연구를 위한 우유 유래 유선상피세포의 응용</p> <p>(Application of mammary epithelial cell from milk for improvement of functional nutrients in bovine milk)</p> <p>건국대학교 (17 포인트 명조계열)</p> <p>농림축산식품부 (17포인트 명조계열)</p>	발간등록번호	11-1543000-000235-01
발간등록번호				
11-1543000-000235-01				

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “젖소에 있어서 기능성 성분의 증진 연구를 위한 우유 유래 유선상피세포의 응용” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013 년 8 월 9 일

주관연구기관명 : 건국대학교

주관연구책임자 : 이홍구 교수

연 구 원 : 왕 도

연 구 원 : 김민정

요 약 문

I. 제 목

젖소에 있어서 기능성 성분의 증진 연구를 위한 우유 유래 유선상피세포의 응용

II. 연구개발의 목적 및 필요성

우유내 배출되는 유선상피세포를 효과적으로 추출하는 방법을 확립하여 유선 상피세포에서 합성되어지는 기능성 지방산으로 알려져 있는 *cis9*, *trans11*-CLA 합성 관련 영양 생리지표 발굴에 이용하고자 함.

III. 연구개발 내용 및 범위

연구 1: 우유내로 배출되는 유선상피세포의 효과적인 추출 방법 확립

○ 본 실험은 젖소의 비유생리 특성상 유분비시 미량 배출되는 유선상피세포를 효과적으로 추출할 수 있는 방법을 확립하고자 실시하였음.

연구 2: 우유 유래 유선상피세포를 이용하여 *cis9*, *trans11*-CLA 합성 관련 단백질 발현량 검증 연구

○ 본 실험에서는 연구 1에서 확립된 유선상피세포 추출방법을 이용하여 실제 *cis9*, *trans11*-CLA 합성에 관여하는 영양생리 지표를 발굴하고자 함.

연구 3: 우유 유래 유선상피세포를 이용하여 *cis9*, *trans11*-CLA 합성 관련 영양생리지표 발굴 연구

○ 본 실험에서는 젖소 개체별 식물성 oil 함유 사료 급여에 대한 *cis9*, *trans11*-CLA 합성 능력 차이와 관련된 영양생리 지표를 우유 유래 유선상피세포에서 발굴하고자 함.

IV. 연구개발결과

연구 1: 우유내로 배출되는 유선상피세포의 효과적인 추출 방법 확립

- 우유내 유선상피세포(MECs)에서 추출된 Total RNA는 높은 RNA Integrity Number를 보였음 (RIN; 7.8±1.0).
- Cytokeratin 8, β -casein, SCD1의 mRNA 발현수준은 RT-PCR로 측정되었으며, 이것들은 분리된 MECs에서 상당히 높은 발현수준을 보여주었음.
- 순도측정을 위한 marker로서 선택된 3개의 유전자 [lymphocyte-specific protein (LSP1),

hemoglobin subunit alpha (HBA) and hemoglobin subunit beta (HBB)]에 대한 MECs에서의 real time PCR 분석결과, mRNA 발현수준은 모든 유전자에서 우유내 체세포(MSC)보다 상당히 낮고, 비유연구에서 흔히 사용되는 MAC-T cell (bovine mammary alveolar cell line)과 차이가 없었음.

- 분리된 MECs의 단백질발현 양상이 MAC-T cell과 매우 유사하였으며, 2-DE gel의 image에 albumin을 발견할 수 없었음.

- MECs추출 방법중 immunomagnetic method에 의하여 분리된 MECs는 유선상피세포의 활성이 있었고 완전히 분화된 유선세포의 특성을 보였음. 이로써 비유생리연구에서 MECs의 사용은 유선의 biopsy없이 반복적인 sampling을 가능하게 하였음.

연구 2: 우유 유래 유선상피세포를 이용하여 *cis9*, *trans11*-CLA 합성 관련 단백질 발현량 검증 연구

- Soybean oil 처리구 ($0.72 \pm 0.00\%$) 우유 내 *cis*-9, *trans*-11 CLA 함량은 대조구 ($0.45 \pm 0.00\%$)보다 훨씬 높았고 ($P < 0.05$), EPA 함량은 soybean oil 처리구가 더 높았음 ($P < 0.05$). 반면에 C18:1n9c (Oleic acid), C18:2n6c (Linoleic acid)의 함량은 대조구에 비하여 낮았음 ($P < 0.05$).

- 선행연구에서 발굴된 *cis*-9, *trans*-11CLA synthesis에 관련 7개의 candidate proteins에 대한 MECs에서의 mRNA 발현양상을 조사한 결과 이들 7개의 protein들 중 GNPDA1, PGAM1의 RNA 발현수준이 선행연구결과와 동일하게 soybean oil 처리구 보다 대조구에서 상당히 높은 수준임을 보이고 있음을 알 수 있었음 (Independent-samples T-test, $P < 0.05$). 이 결과를 통해 SCD1과 GNPDA1, PGAM1이 2-DE 결과와 동일한 결과를 보이는 것을 다시 한 번 확인할 수 있었다. 아울러 SCD을 증가시켰을 때 SCD1의 발현이 TVA를 처리하였을 때와는 동일하게 감소함을 확인할 수 있었다.

- 이러한 결과는 본 연구를 통하여 확립된 분리 방법을 통하여 얻어진 MECs은 젖소의 유선조직과 같은 유전자 발현양상을 보이고 있음을 시사하고 있음

연구 3: 우유 유래 유선상피세포를 이용하여 *cis9*, *trans11*-CLA 합성 관련 영양생리지표 발굴 연구

- 우유 내 *cis*-9, *trans*-11CLA의 함량이 높은 시험구(High, $1.02 \pm 0.038\%$)는 낮은 시험구(Low, $0.59 \pm 0.042\%$)의 함량의 2배였고, Medium, High 시험구의 *cis*-9 C14:1/(*cis*-9C14:1+C14:0)의 desaturation index는 Low 시험구보다 상당히 높았음 ($p=0.010$, $p=0.016$). 하지만, *cis*-9C16:1/(*cis*-9C16:1+C16:0), *cis*-9C18:1/(*cis*-9C18:1+C18:0)의 desaturation index 실험군 간 차이가 없었음. 유지방에서 Medium, High 실험군의 total PUFA는 Low 실험군보다 더 높은 반면($p=0.000$, $p=0.007$), SFA, MUFA, U/S.에서는 뚜렷한 차이를 볼 수 없었다.

- 2-DE분석결과 3종류의 시험구로부터 MECs에서 많은 수의 spot을 관찰할 수 있었고 그 중 4개의 spot은 cathelicidin 5 (up-regulated), ZW10 interactor (down-regulated), annexin I (down-regulated), kappa casein (down-regulated)으로 확인되었음.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 젖소의 유중 유선상피세포를 분리기술 확립 및 유전자 발현양상 조사 가능 확인
- 우유 유래 유선상피세포를 이용하여 *cis9*, *trans11*-CLA 합성관련 유용 단백질 발굴
- 이를 이용하여 영양소 처리에 대한 기능성물질합성관련 각종 오믹스 data를 발굴하여 고기능성 *cis9*, *trans11*-CLA 우유 생산용 우량 젖소 개량 및 사양기술 개발에 활용
- 우유유래 유선상피세포에서 발굴된 유전자를 기능성 물질 생산 시스템에 활용한다면, 낙농가의 수입증 대는 물론 유가공 관련 산업에 기여될 수 있음.
- 유중 유선상피세포 분리 및 영양생리지표관련 결과를 활용한다면 젖소 유선에서의 영양소 대사관련 연구에 기여될 것으로 사료됨.

SUMMARY

Title:

Application of mammary epithelial cell from milk for improvement of functional nutrients in bovine milk

Aims:

This study was conducted in order to 1) establish a efficient isolation method of mammary epithelial cells from bovine milk; 2) explore proteins related to *cis*-9, *trans*-11 CLA synthesis in isolated MECs; 3) compare the individual variation of *cis*-9, *trans*-11 CLA synthesis utilizing isolated MECs.

Results:

In study 1, the results showed that the immunomagnetic method used in this study was effective. The isolated MECs were viable and exhibited the characteristics of fully differentiated alveolar cells. The total RNA extracted from the isolated MECs owned high RNA Integrity Number (RIN; 7.8 ± 1.0). The mRNA expression levels of cytokeratin 8, β -casein and SCD1 were measured by RT-PCR and all of them had considerably high expression in the isolated MECs. In addition, another three selected genes lymphocyte-specific protein (LSP1), hemoglobin subunit alpha (HBA) and hemoglobin subunit beta (HBB) chosen as markers for purity testing were detected by real time PCR. Their mRNA abundance in our isolated MECs were all significantly lower than that in MSCs ($P<0.05$) and has no difference with that of MAC-T cells, a bovine mammary alveolar cell line commonly used in lactation research. Moreover, the protein expression profile of isolated MECs was highly similar to that of MAC-T cells and no albumin was found in the 2-DE gel image.

In study 2, the milk *cis*-9, *trans*-11 CLA content of control group ($0.45\pm 0.00\%$) was much lower than that of the soybean oil group ($0.72\pm 0.00\%$; $P<0.05$). The contents of C18:1n9c (Oleic acid) and C18:2n6c (Linoleic acid) in the soybean oil group were all lower than those of the control group ($P<0.05$) whereas the content of EPA was higher in the soybean oil group. Then seven previously found candidate proteins in our lab that may related to the *cis*-9, *trans*-11 CLA synthesis were validated in the isolated MECs. Results showed that among these seven proteins, the mRNA levels of GNPDA1 and PGAM1 (Independent-samples T-test, $P<0.05$) in the control were all significantly higher than those of the soybean oil group.

In study 3, the effects of the individual variation among dairy cows on the *cis*-9,

trans-11 CLA synthesis and the related proteins were investigated. The milk *cis*-9, *trans*-11 CLA content of group High (1.02±0.038%) was about twice as high ($P<0.05$) as that of group Low (0.59±0.042%). The desaturation index *cis*-9 C14:1/(*cis*-9C14:1+C14:0) in groups Medium and High were all significantly higher than that in group Low ($P=0.010$ and $P=0.016$, respectively). However, neither the desaturation indexes *cis*-9C16:1/(*cis*-9C16:1+C16:0) nor *cis*-9C18:1/(*cis*-9C18:1+C18:0) were different among groups. In milk fat, the total PUFA of groups Medium and High was higher than that of group Low ($P=0.000$ and $P=0.007$, respectively) whereas no significant difference was observed for SFA, MUFA or U/S. Moreover, a number of differently expressed spots were observed in MECs from these three defined groups and four of them were identified as cathelicidin 5 (up-regulated), ZW10 interactor (down-regulated), annexin I (down-regulated) and kappa casein (down-regulated).

Conclusions:

All the above data demonstrated that the immunomagnetic method used in this study was competent and the isolated MECs were suitable for transcriptional research; GNPDA1 and PGAM1 may related to the *cis*-9, *trans*-11 CLA synthesis in cows; And the varied individual content of *cis*-9, *trans*-11 CLA in cows may associate with these proteins expression levels. These findings may provide some theoretical basements for the studies about effects of the individual variation among dairy cows on the *cis*-9, *trans*-11 CLA synthesis.

CONTENTS

Chapter 1. Synopsis of Study	10
Section 1: Purpose of study.....	10
Section 2: Necessity of study.....	10
Section 3: Contents of study.....	12
Chapter 2. Current Situation of the Technology Developing	13
Chapter 3. Contents and Results of Study	14
Section 1: The establishment of efficient isolation method of epithelial cells from bovine milk.....	14
Section 2: Exploring proteins related to <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA synthesis in isolated MECs.....	20
Section 3: Comparison on the individual difference of <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA synthesis utilizing isolated MECs.....	25
Chapter 4. Achievements and Contributions	29
Chapter 5. Results Application	30
Section 1: Application Plan.....	30
Section 2: Plan about Education.....	31
Section 3: Plan about Academic Journal/Meeting.....	31
Section 4: Plan about Subsequent/Other Research.....	32
Chapter 6. Collected Abroad Informations during the Study	33
Chapter 7. Current Situation of the Equipment and Facilities	34
Chapter 8. References	35

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요.....	10
제1절	연구개발의 목적.....	10
제2절	연구개발의 필요성.....	10
제3절	연구개발의 범위.....	12
제 2 장	국내외 기술개발 현황.....	13
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과.....	14
제1절	우유내로 배출되는 유선상피세포의 효과적인 추출 방법 확립.....	14
제2절	우유 유래 유선상피세포를 이용하여 <i>cis9</i> , <i>trans11</i> -CLA 합성 관련 단백질 발현량 검증 연구.....	20
제3절	우유 유래 유선상피세포를 이용하여 <i>cis9</i> , <i>trans11</i> -CLA 합성 관련 영양생리지표 발굴 연구능력 비교.....	25
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	29
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획.....	30
제1절	실용화·산업화 계획(기술실시 등).....	30
제2절	교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등.....	31
제3절	특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등.....	31
제4절	추가연구, 타연구에 활용 계획 등.....	32
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	33
제 7 장	연구시설·장비 현황.....	34
제 8 장	참고문헌.....	35

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 목적

우유내 배출되는 유선상피세포를 효과적으로 추출하는 방법을 확립하여 유선 상피세포에서 합성되어지는 기능성 지방산으로 알려져 있는 *cis9, trans11-CLA* 합성 관련 영양 생리 지표 발굴에 이용하고자 함.

제2절 연구개발의 필요성

- 최근 소비자들은 건강에 유익한 유제품에 대한 요구가 높아져 기능성 성분 증가연구가 필요함.

- 하지만 국내 젖소관련 연구는 주로 유량 및 유지방 증가에 목표를 가지고 연구해온 덕분에 현재 유량 및 유지방 수준은 세계적으로 높은 수준에 도달 했지만, 유중 기능성 물질 증가관련 연구는 미비한 실정임.

- CLA는 linoleic acid의 conjugated isomer 그룹의 하나인데 이들 중 *cis 9, trans 11-CLA*는 인체 건강에 많은 이점이 있어 가장 많이 연구 되어져 오고 있음. 특히 anti-carcinogenic activity(Ha 등, 1987; Ip 등, 1994, 1996; Scimeca, 1994), 면역기능 증진(Cook 등, 1993), 동맥경화증 억제 또는 치료 효과(Lee 등, 1994), 당뇨병 치료 효과(Cook 등, 1993) 및 항 비만 효과(Thiel-Cooper 등, 1999) 등과 관련된 연구 결과가 지속적으로 발표되고 있음.

- 이와 같은 이유로 유중 CLA의 함량 증가를 위한 연구가 활발하게 진행되면서 반추동물에서 *trans-11 vaccenic acid(TVA; trans-11 C18:1)*의 CLA로 전변에 관한 연구가 많이 보고되고 있음.

- 젖소의 유선에서 TVA가 CLA로의 전변 효율은 전체 CLA합성의 60%이상 차지하며 사료 원료에 따라 최대 90%이상까지 가능한 것으로 알려져 있음. 반추동물의 경우 linolenic acid가 많이 포함된 linseed oil을 사료로 급여 경우 반추위에서 미생물에 작용으로 linolenic acid는 주로 TVA로 hydration되면서 유선조직에서 *cis-9, trans-11 CLA*로 전변효율이 다른 동물보다 높아 TVA가 CLA로 70%이상 전변될 수 있다는 보고가 있어 이와 관련된 CLA생합성 단백질 발현양상연구는 우유중 CLA함량을 증가시킬 수 있는 기초연구자료가 될 것으로 사료됨.

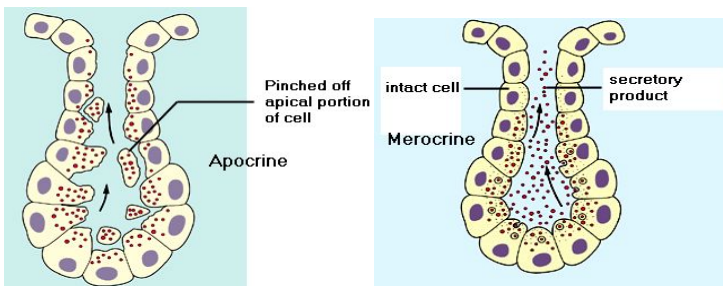
- 아울러 반추동물들의 생성물 내 *cis-9, trans-11CLA*함량은 여러 가지 인자들에 의해서 조절되는데(Dhiman 등, 2005), 특히 유선에서 *cis-9,trans-11CLA*의 함량에 영향을 미치는 여러 인자들 중에서 SCD가 가장 중요한 인자이며, 우유 중 *cis-9,trans-11CLA*는 유선조직내의 SCD에 의해서 생합성 됨 (Grinari 등, 2000). SCD는 여러 가지 인자들 즉, 호르몬이나 사료 등에 의

해서 전사 또는 번역 단계에서 조절 가능하고 이를 통해 CLA 함량 역시 간접적으로 조절이 가능함 (Ntambi 등, 2004). 현재, 마우스의 유선 상피 세포인 HC11에서 *cis*-9, *trans*-11CLA 생합성에 관여하는 단백질들(PDI, LAMR1, PRDX2)가 발굴된 상태임 (Jin 등, 2010).

- 하지만 젖소에 있어서 유선조직에서 기능성 성분으로 널리 알려져 있는 CLA 증가를 위한 생합성 관련 단백질 발현 연구는 거의 없는 실정이고, 이를 위해 유선조직을 채취하여야 하는데 이 경우 biopsy에 의한 스트레스와 비용문제가 발생하여 샘플규모가 적거나 연구의 정확성이 떨어지게 되는 단점을 가지고 있음.

- 따라서 CLA 생합성과 관련된 직접적인 영양 및 비유 생리학적 기전 규명을 통한 단백질 생리지표 발굴 연구를 위해서는 보다 손쉽게 이용할 수 있는 유선상피세포의 확보가 선행되어야 함.

- 일반적으로 젖소의 유분비 형식은 merocrine분비형식으로 유산양의 apocrine 분비형태보다 (그림 1) 유선 상피세포를 많이 포함하고 있지 않아 보다 정밀한 추출 기술이 필요함 (Table 1).



a) 유산양

b) 젖소

<http://www.mhhe.com/biosci/ap/histology_mh/glands.html>

그림 1. 젖소 및 유산양의 유분비 형태

Table1. Comparison of total somatic cells and cell type distribution in milk from different species

Species	Cell types					
	SCC 10 ⁶ cells/mL	Cytoplasmic particles 10 ³ /mL	Epithelial cells %	Neutrophils PMN %	Lymphocytes %	Macrophages %
Human	0.009	90	50-90*	6	5-9	8
Bovine	0.075	Not observed	Very low levels	5-20	20-30	61
Ovine	0.110	Not observed	Very low levels	22	10-25	70
Caprine	1.1	128	10-20	45-75	3-10	10-35
Porcine	1	-	60-90	5-10	15-25	5-10

* Human epithelial cells: foam cells and epithelial cells. *Reprod. Nutr. Dev.* 42 (2002) 133-147

- 따라서 젖소의 정상적인 생리적 상태에서 유중 유선상피세포를 분리하여 직접적으로 CLA의 생합성 관련된 유전 및 영양조절과 관련 생리지표물질 발굴을 위하여서는 우유 중 유선상피세포 추출 기술을 활용하는 것이 필요할 것으로 사료됨.

제3절 연구개발의 범위

연구 1: 우유내로 배출되는 유선상피세포의 효과적인 추출 방법 확립

- 본 실험은 젖소의 비유생리 특성상 유분비시 미량 배출되는 유선상피세포를 효과적으로 추출할 수 있는 방법을 확립하고자 함.

연구 2: 우유 유래 유선상피세포를 이용하여 *cis9*, *trans11*-CLA 합성 관련 단백질 발현 검증연구

- 본 실험에서는 연구 1에서 확립된 유선상피세포 추출방법을 이용하여 실제 *cis9*, *trans11*-CLA 합성에 관여하는 영양생리 지표를 발굴하고자 함.

연구 3: 우유 유래 유선상피세포를 이용하여 *cis9*, *trans11*-CLA 합성 관련 영양생리지표 발굴 연구

- 본 실험에서는 식물성 oil (Extruded full-fat linseed) 함유 사료 급여에 대한 개체간의 *cis9*, *trans11*-CLA 합성능력 차이와 관련된 영양생리 지표를 우유 유래 유선상피세포에서 발굴하고자 함.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 비유종인 흰쥐유선조직, 쥐 유래 유선상피세포(HC11), 젖산양 유선조직 및 산양유 중 체세포를 이용하여 유선에서 CLA합성관련 단백질 발굴 보고 하였음. (Jin et al.,2010; Jin,2011) (그림 2)
- 상기 연구결과는 국내 특허등록 1건 (등록번호:10-0997756), 공개 1건 (출원번호:10-2010-0063519), 출원 2건 (출원번호:10-2011-0078367,10-2011- 0078367)

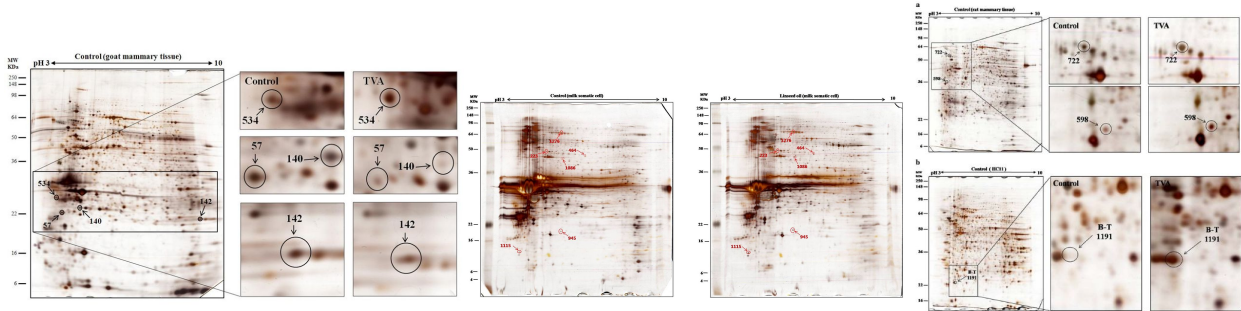
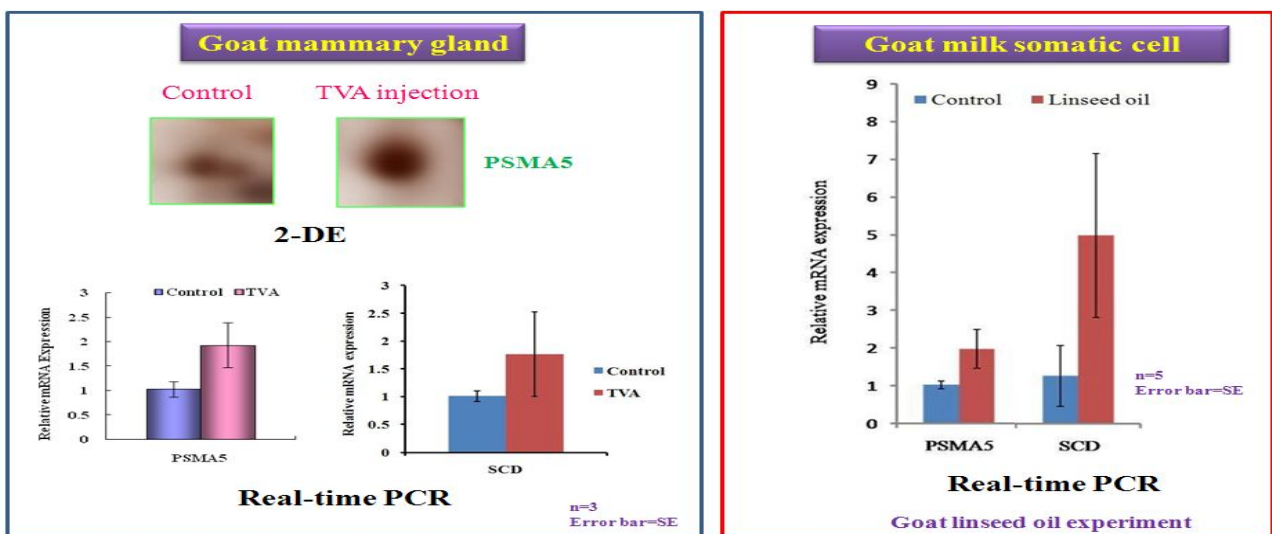


그림 2. Proteomics 기법을 이용한 CLA합성관련 후보 단백질 gel 사진

- 기 선발된 CLA합성관련 유전자 8개는 젖소 유선상피 세포주 (MAC-T cells)를 이용하여 기능연구를 진행 중에 있음.
- 젖소 유선상피 세포주(MAC-T cells) 및 유종 유선상피세포를 분리 이용하여 유종 단백질 및 기능성지방산합성 pathway연구 중에 있음.
- 산양유의 somatic cell은 조직의 유선상피세포와 단백질 발현양상이 거의 일치함을 확인하였음 (그림 3)



PSMA5: proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 5

그림 3. 유산양 유선조직과 유종 somatic cell에서의 PSMA5단백질의 발현양상 비교

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 우유내로 배출되는 유선상피세포의 효과적인 추출 방법 확립

○ 본 실험은 젖소의 비유생리 특성상 유분비시 미량 배출되는 유선상피세포를 효과적으로 추출할 수 있는 방법을 확립하고자 하는 실험임

1. 실험방법

가. 기본 사양 및 우유샘플 채취: 산차 1차인 홀스타인 비유중기 (128.5 ± 28.57 days) 10두 (평균 598 ± 43 kg) 에서 우유 채취(1.5L/두)

나. 기본 급여 사료 : 조사료 10kg (건물 91.5%, 조단백질 1.2%, 조지방 2.3%, NDF 58.3%, ADF 36.7%, 조회분 8.3%) + 농후사료 13kg (조단백질 23.6%, 조지방 5.2%, 조회분 7.0%, Ca 0.7%, P 0.4%, NDF 19.3%, ADF 8.9%)

다. 우유에서 유선상피세포 추출: Dynabeads Pan Mouse IgG, Anti-cytokeratin 8 antibody, 및 Magnetic particle concentrator 이용한 immunomagnetic 방법으로 우유내 상피세포를 추출

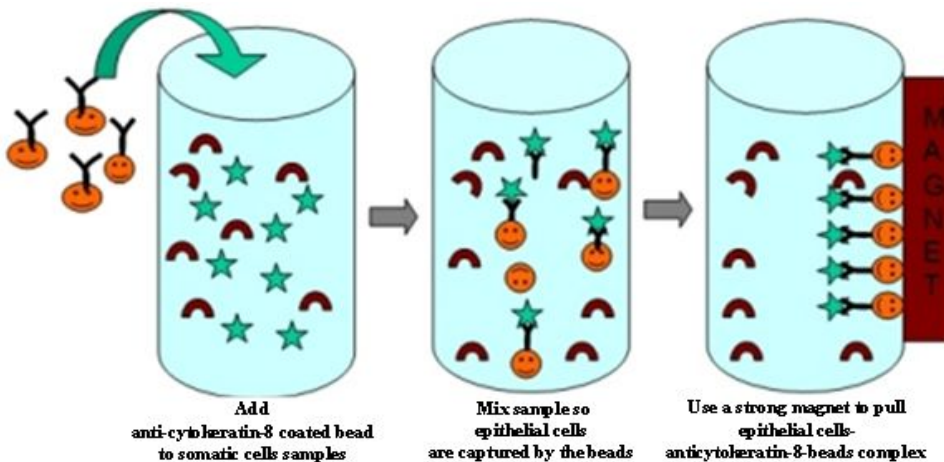


그림 4. 우유에서 유선상피세포 추출방법

- (1) 1.5L/마리, 50 mL tubes with 50 μ L 0.5 M EDTA in PBS
- (2) Centrifugation at 2,700 xg at 4°C for 10 min.
- (3) Cream 와 skim milk layers were removed
- (4) Cell pellets were washed twice in 5 mL ice-cold PBS (pH 7.2) with 0.5 mM EDTA.
- (5) 20 μ L of washed Dynabeads (110.41; Pan Mouse IgG; Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway) were incubated with 0.4 μ L of anti-cytokeratin 8 antibody (C5301; Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO) in 1 mL PBS on a rotary mixer at 4°C for 30 min.
- (6) Anti-cytokeratin 8 antibody-coated Dynabeads were resuspended in 0.5 mL PBS and

mixed with the prepared milk somatic cells.

(7) After incubating for 1 h on a rotary mixer at 4°C, the milk epithelial cells combined with anti-cytokeratin 8 antibody-coated Dynabeads were collected by a magnetic particle collecting unit (123.21D; MPC-S; Invitrogen Dynal AS).

라. 유선상피세포 관련 특정 단백질 확인: 상기 추출된 유선상피세포에 대한 SCD1, cytokeratin-8 단백질 발현량은 RT-PCR 방법으로 확인

(1) Total RNA 추출:

(가) MAC-T cells, MECs, TRIzol® (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA)

(나) Thermo NanoDrop 1000® Spectrophotometer - RNA-40 module (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE).

(2) cDNA 합성:

(가) 1µg extracted total RNA, 1µL oligo(dT), 4µL 5×first strand buffer, 2µL of 0.1M DTT, 1µL of 0.01M dNTPmix, 1µL reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA)

(나) 조건: 50 min at 37°C, 15 min at 70°C,

Thermo NanoDrop 1000® Spectrophotometer-ssDNA-33 module

(3) PCR필요한 시약:

(가) C1000™ Thermal Cycler System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA);

(나) 2 µg cDNA, 0.5 µL forward primer, 0.5 µL reverse primer, 5 µl 10x buffer, 4 µL of 2.5 mM dNTP mix, and 0.2µLi-Taq DNA polymerase (iNtRON Biotechnology, Seongnam-Si, Gyeonggi-do, SouthKorea).

(4) Primer sequences:

(가) SCD1 (NM_173959.4),
ACCATCACAGCACCTCCTTC (forward),
CTTCCGGTCATAAGCCAGAC (reverse);

(나) GAPDH (NM_001034034.1),
AAGGCCATCACCATCTTCCA (forward),
GGGCCATCCACAGTCTTCTG (reverse).

(5) Amplification조건:

(가) 95°C for 4 min,

(나) 30 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 60°C for 45 s, and extension at 72°C for 90 s, incubated at 72°C for 7 min and cooled to 4°C.

(6) Agarose gel electrophoresis:

(가) 10 µL PCR product, 1% agarose gel,

(나) 45 mA for 40 min,

(라) i-My Run series electrophoresis unit (Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan).

(7) Gel images분석:

(가) i-MAX gel image analysis system (CoreBioSystem, Seoul, South Korea).

마. 유선상피세포 관련 특정 단백질 확인: 상기 추출된 유선상피세포에 대한 LSP1, HBA 과

HBB단백질 발현량은 Real time-PCR 방법으로 확인

(1) Total RNA 추출과 cDNA 합성

(2) PCR필요한 시약:

(가) 2 μ g cDNA, 0.4 μ L forward primer, 0.4 μ L reverse primer, 10 μ L of 2x SYBR Green PCR Master Mix

(3) Primer sequences:

(가) β -actin (NM_173979.3):

5'-GCGTGGCTACAGCTTCACC (forward),
5'-TTGATGTCACGGACGATTTC-3' (reverse);

(나) Lymphocyte-specific protein 1 (LSP1; NM_001075374.2):

5'-GTGTGGAGGATGAGGAGGAG-3' (forward),
5'-TTCCTTCGTCTTCGTCTTGA-3' (reverse);

(다) Hemoglobin subunit alpha(HBA;NM_001077422.2):

5'-CCCAGACTCTGAGAGAACCC-3' (forward),
5'-GGAAGCTCAGGAACATCCTC-3' (reverse);

(라) Hemoglobin subunit beta (HBB;NM_173917.2):

5'-CATGGCAAGAAGGTGCTAGA-3' (forward),
5'-TCCACATGCAGCTTATCACA-3' (reverse).

(4) Amplification조건:

(가) CFX96TM Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)

(나) 95°C for 3 min,

(다) 40 cycles of denaturation at 94°C for 10 s, annealing at 60°C for 10 s and extension at 72°C for 30 s,

(라) 95°C for 10 s, 65°C for 5 s,

(마) 95°C at a rate of 0.5°C/s.

(5) Data 분석:

- 2- $\Delta\Delta$ CT method.

바. 유선상피세포 단백질 profile 확인: 상기 추출된 유선상피세포에 대한 단백질profile은 2-DE 방법으로 확인

(1) 단백질 추출

(가) lysis solution: 8M Urea, 4% CHAPS, 10% 0.5mM EDTA

(나) 추출물을 13,000rpm에서 15분 동안 15°C에서 원심분리한 후 1ml 주사기로 상층의 흰 층을피하여 중간층을 새로운 tube에 옮긴다.

(다) 추출된 단백질들은 2-D Quant Kit을 사용하여 정량한 후 2-DE 분석 전까지 -80°C에 보관

(2) First-dimension isoelectric focusing (IEF)

(가) Rehydration

① 단백질 최종 loading량 : 100ug

② Rehydration solution 조건 :

Urea 9M, Thiourea 2M, CHAPS 4%, EDTA(0.5mM) 1%, BPB 0.002%, DTT 75mM, Pharmalyte (PH3-10NL) 1%

(나) IEF

Condition setting	20℃ 50uA/gel
step 1	30V, 12H (Rehydration 단계)
step 2	500V, 1H
step 3	1,000V, 1H
step 4	8,000V, 56,000VHr
step 5	500V, holding

(3) Equilibration : Time (각각 15분씩), DTT(100mg/10ml), IAA(250mg/10ml)

(4) Second-dimension SDS-PAGE

(가) Running condition : 12%, 14%, 15% gel, 20℃

(나) 18cm인 경우 : gel당 2watte 로 30min running 후 16watte running

(5) Silver staining 방법과 image analysis

(가) 분리가 완료된 gel을 sensitizing solution (30% ethanol, 0.125%(w/v)

glutardialdehyde, 0.2%(w/v) sodium thiosulphate, 6.8% sodium acetate에 3차 증류수로 250ml까지 채움)과 30분간 반응시키고 증류수로 세척.

(나) Silver solution (0.25%(w.v) silver nitrate solution에 3차 증류수로 250ml까지 채움)으로 다시 20분간 반응시키고 증류수로 세척

(다) 고정화된 gel을 developing solution (2.5%(w/v) sodium carbonate 6.25g에 3차 D.W 로 250ml까지 채움)과 8분간 반응시키고, 마지막으로 stopping solution (1.46%(w/v) EDTA · Na · 2H₂O에 3차 D.W 로 250ml까지 채움)과 반응

(라) 염색된 gel을 ImageScanner flatbed scanner를 이용하여 scan한 후 각 protein spot 을 PROTEOMWEAVER(Definiens, Germany) 2D-gel image analysis를 이용하여 분석

(6) 단백질 동정은 LC-MS/MS로 실시하였음.

2. 실험결과

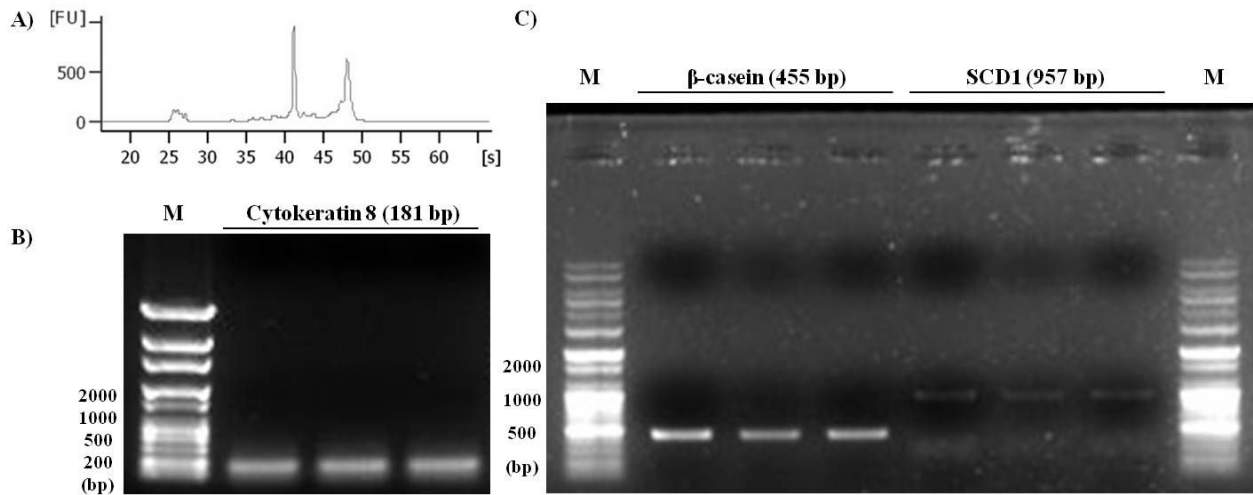


그림 5. Characteristics of isolated MECs: high total RNA quality (A) good Cytokeratin-8 (B), β -casein and SCD1 expression (C)

○ 실험 결과 분리된 MECs에서 추출된 Total RNA는 높은 RNA Integrity Number를 보였음 (RIN; 7.8 ± 1.0) (그림5 A).

○ Cytokeratin 8, β -casein, SCD1의 mRNA 발현수준은 RT-PCR로 측정되었으며, 이것들은 분리된 MECs에서 상당히 높은 발현수준을 보여주었음 (그림5 B, C).

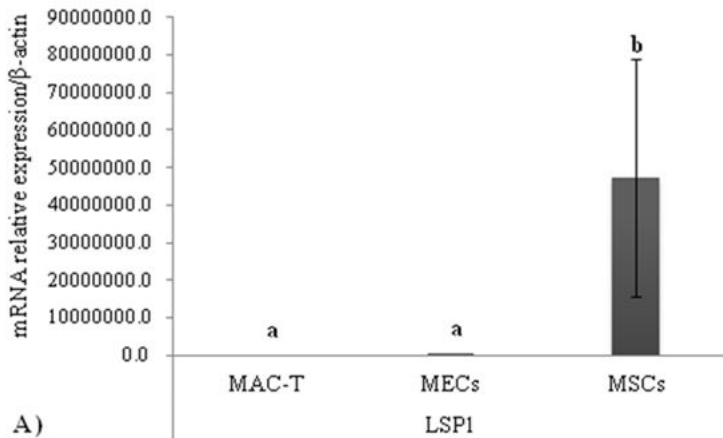


그림 6. Characteristics of isolated MECs: the mRNA abundance of LSP1 (A), HBA (B) and HBB (C) in MAC-T cells, MECs and MSCs.

○ 논문을 통하여 유선상피세포임을 증명할 수 있는 marker로서 선택된 3개의 유전자 [lymphocyte-specific protein (LSP1), hemoglobin subunit alpha (HBA) 그리고 hemoglobin subunit beta (HBB)]에 대한 real time PCR 분석결과 분리된 MECs의 mRNA 발현수준은 모든 유전에서 MSC보다 상당히 낮고, 비유관련 연구에서 흔히 사용되는 MAC-T cells (bovine mammary alveolar cell line)과 차이가 없는 것으로 나타났음 (그림 6).

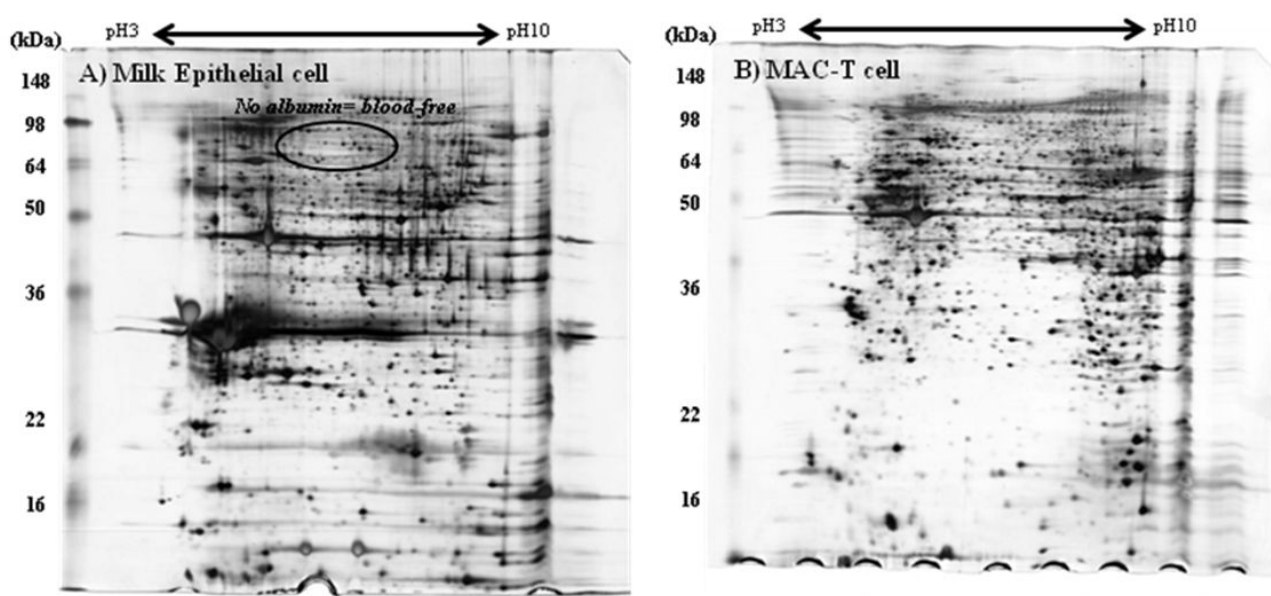
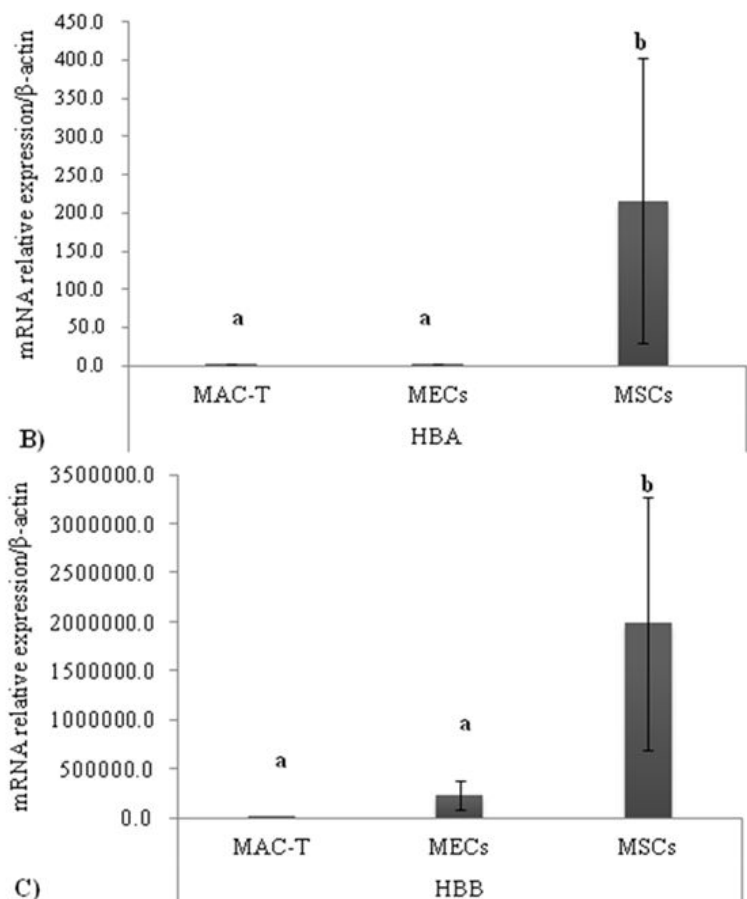


그림 7. Characteristics of isolated MECs: protein profiles of MECs (A) have a high similarity to that of MAC-T cells (B).

○ 게다가, 분리된 MECs의 2-DE image상 spot양상은 MAC-T cell과 매우 유사하였으며, 2-DE gel상에서 albumin을 발견할 수 없었음 (그림 7).

○ 이상의 연구결과는 본 연구에 사용된 immunomagnetic method가 효과적인 우유로 부터의 유선상피세포의 분리 방법임을 증명 하였으며, 분리된 MECs는 활성이 유지되어 있고 완전히 분화된 유선포세포의 특성을 보이고 있음을 확인할 수 있었음. 따라서 MECs의 사용은 유선의 손상 없이 전체연구과정에서의 쉽고 반복적인 sampling 및 젖소의 유선대사관련 다양한 연구에 활용가능성이 클 것으로 사료됨.

제2절 우유 유래 유선상피세포를 이용하여 *cis9, trans11*-CLA 합성 관련 단백질 검증연구

○ 본 실험에서는 연구 1에서 확립된 유선상피세포 추출방법을 이용하여 실제 *cis9, trans11*-CLA합성에 관여하는 영양생리 지표를 발굴하고자 함.

1. 실험방법

가. 사양 및 우유샘플 채취: 강원도 지역 젖소농장에서 동일사료를 급여 받은 산차 3차인 건강 한 홀스타인 젖소 26두 (평균 $576 \pm 20.1\text{kg}$)를 동일시기 (비유 중기: 142.5 ± 29.65 days)에 개체별로 우유를 채취, 한 마리당 1.5L

나. 기본 급여 사료 및 설계 : 대조구 (비유중기용 TMR 사료; 조단백질 18.5%, 조지방 3.5%, 조회분 3.9%, Ca 0.9%, P 0.4%, TDN 71%, ADF 9.8%, NDF 18.8%) 및 처리구 (비유중기용 TMR 사료 + soybean oil; 전체 Dray matter intake 24.2kg 기준 0.605kg 첨가)로 설계

나. 우유지방산분석: GC 이용하여 우유중 지방산 조성 조사

(1) *cis9, trans11*-CLA등 주요지방의 분리 및 추출 방법 확립

(가). Folch's solution(chloroform: methanol=2:1) 20ml첨가

(나). Internal standard 넣고 질소 채워 넣기

(다). Shaking incubator(20°C, 250rpm)에서 overnight

(라). 0.88% NaCl(생리 식염수 농도) 10ml 첨가

(마). 2h간 이상 shaking 20°C, 250rpm

(바). 빈 glass tube 무게 측정(뚜껑제외)

(사). Centrifuge 3500rpm, 4°C, 15min

(아). 상층액과 중간층 제거하여 하층액을 10ml glass tube에 따서 넣는다.

(자). 40°C로 heating 하며, N₂를 주입하면서 chloroform 증발시킴

(차). 증발 후, 무게 측정

(카). [Hexan25%+methanol 35% + 14% BF₃ 45%]를 2ml씩 첨가하여 질소 채움

- (타). 90°C에서 heating, 1h간 동안/ 15min 간격으로 충분히 vortexing
- (파). Cooling 후, 뚜껑을 열어 hexan 2ml, 0.88% Nacl 1ml 첨가
- (하). Vortexing 충분히 해준 후 실온에 3500rpm, 10 min간 원심분리, 상층액(hexane층)을 따라서 GC analysis glass tube에 옮겨 -20°C 저장

(2) GC 조건

(가). Column:

SPTM-2560 fused silica capillary column (100m × 0.25mm i.d. with 0.2um film thickness, Supelco Inc. USA)

(나). Oven temperature:

- ① 70°C for 1min
- ② ramp to 100°C at 5°C/min and hold for 2min
- ③ ramp to 175°C at 10°C/min and hold for 40min
- ④ ramp to 225°C at 5°C/min and hold for 40min

(다). Injector temperature: 255°C; Detector temperature: 260°C

(마). Standard:

- ① supelco 37 Comp. FAME Mix 10mg/ml in CH₂CL₂
- ② Methyl 10(E),12(Z)-Octadecanoate, 25mg(10,12-CLA)
- ③ Methyl 9(Z),11(E)-Octadecanoate, 25mg(9,11-CLA)
- ④ *trans*-11-Octadecenoic methyl ester analytical standard, 10 mg/mL in heptane, pkg of 1 mL(TVA)
- ⑤ *cis*-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid methyl ester-analytical standard, 10 mg/mL in heptane, pkg of 1 mL(EPA)
- ⑥ all-*cis*-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid methyl ester-analytical standard, 10 mg/mL in heptane, pkg of 1 mL(DHA)

(3). Data표시: TVA/total FA x100 (총 40개의 지방산에 대한 TVA의 함량; %)

다. 우유에서 유선상피세포를 추출: 연구 1 에서 확립된 immunomagnetic 방법 이용하여 우유 내 상피세포 추출

- (1) 단백질 기술을 이용하여 *cis*9, *trans*11-CLA 합성 관련 후보 영양생리지표 탐색
- (2) Real time-PCR 방법을 이용하여 상기 찾아낸 후보 단백질 발현량 검증

2. 실험결과

Table 2. Primer sequences specific for the target genes used for real time PCR

Gene	Accession number		Primers
ACTB	NM_173979.3	forward	GCGTGGCTACAGCTTCACC
		reverse	TTGATGTCACGGACGATTTC
SCD1	NM_173959.4	forward	CCCTTTCCTTGAGCTGTCTG
		reverse	ATGCTGACTCTCTCCCCTGA
RASGRP4	NM_001035379.2	forward	GAGGTTATAGGCCGCTTCTG
		reverse	AGGCTCTGCTGGACTGAGTT
GNPDA1	NM_001080287.3	forward	TGAAGCTCATCATCCTGGAC
		reverse	ATGATGCGGTTCCCTGATGTA
TPI1	NM_001013589.3	forward	GCAGAGGGACTTGGAGTGAT
		reverse	ATAGGCCAAGACAACCTTGC
PGAM1	NM_001034054.1	forward	GGGAAACGGGTACTAATTGC
		reverse	GCAGGTTTCAGCTCCATGATA
HSP 27	NM_001025569.1	forward	GAGGAGCTGACGGTCAAGA
		reverse	TGAAGCAACGGGAAATGTAG
ANXA3	NM_001035325.1	forward	AGAAAGGTGGGCTATCATGG
		reverse	TTACGAATCGCTTCAGCATC
TPMT	NM_001075531.1	forward	AGAAAGCACTGCGGGTATTT
		reverse	ATCCCAAGTTCGCTGATTTC

Table 3. Differences in major milk fatty acids composition (%)

Fatty acid %	Control	Soybean oil
C18:0 (Stearic acid)	15.16±0.03	15.20±0.04
t11-C18:1 (Vaccenic acid)	3.14±0.03	3.19±0.02
C18:1n9c(Oleic acid)	28.75±0.03 ^a	26.36±0.47 ^b
C18:2n6c(Linoleic acid)	3.85±0.01 ^a	2.07±0.00 ^a
C18:3n3(Linolenic acid)	0.33±0.00	0.60±0.00
9,11-CLA	0.45±0.00 ^b	0.72±0.00 ^a
C20:5n3 (EPA)	0.02±0.00 ^b	0.05±0.00 ^a
Others	48.30±0.03	51.83±0.41
Total (FAME 39)	100	100

Note: EPA means Eicosapentaenoic acid

○ Soybean oil 처리구(0.72±0.00%) 우유 내 cis-9, trans-11 CLA 함량은 대조구 (0.45±0.00%) 보다 훨씬 높았고 ($P<0.05$), EPA 함량은 soybean oil 처리구가 더 높았음 ($P<0.05$). 반면에 C18:1n9c (Oleic acid), C18:2n6c (Linoleic acid)의 함량은 대조구에 비하여 낮게 나타났음 ($P<0.05$) (Table 3).

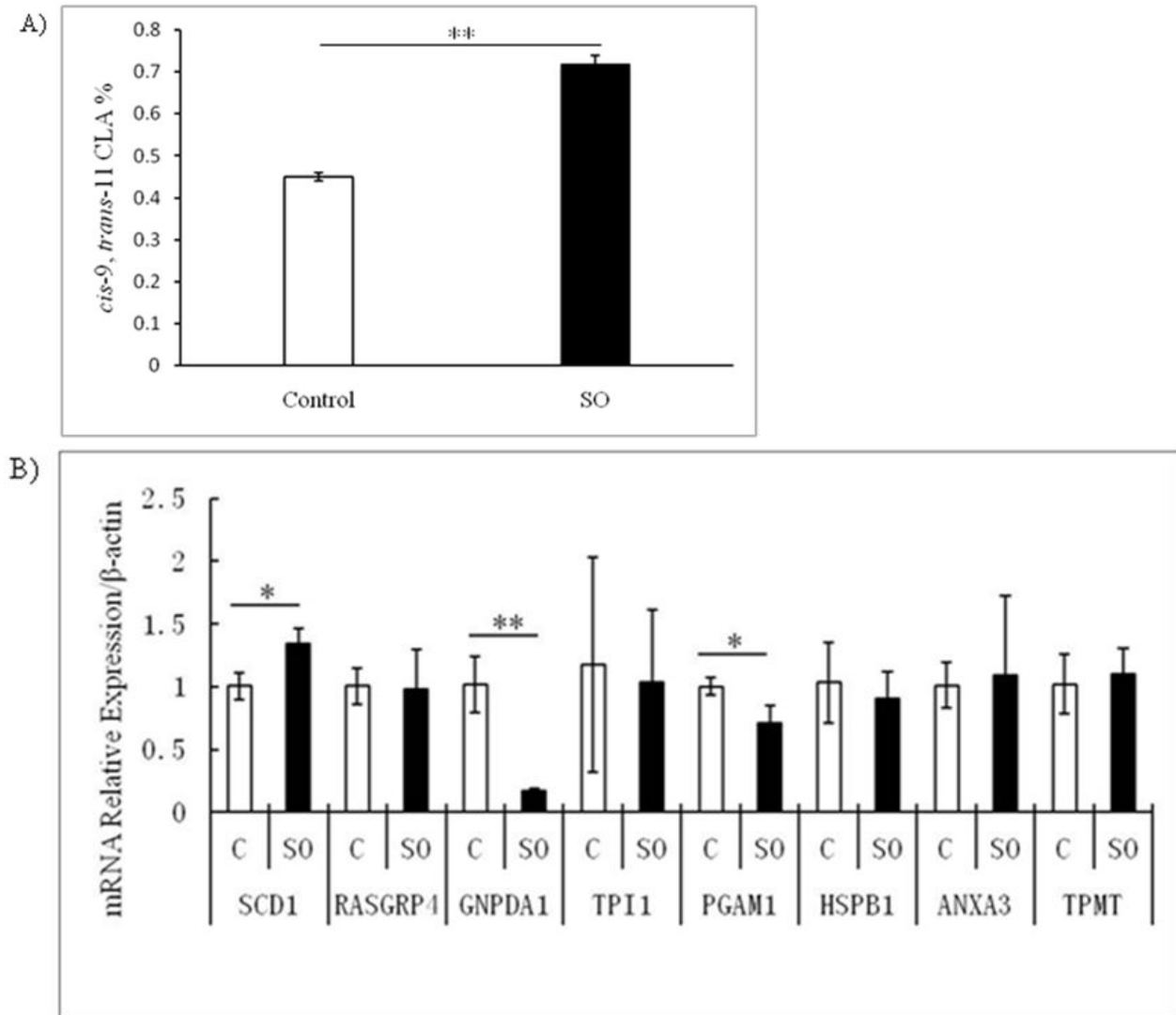


그림 8. mRNA abundance of the candidate proteins in MECs (B) isolated from bovine milk of the control group (C) (0.45% *cis-9,trans-11CLA*) and soybean oil group (SO; 0.72% *cis-9,trans-11CLA*) (A). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

○ 선행연구에서 MAC-T cell에서 TVA (*cis-9,trans-11 CLA* 전구물질)처리에 의해 발굴된 *cis-9,trans-11 CLA* synthesis에 관련 7개의 candidate proteins(Table 2, 4)에 대한 MECs에서의 mRNA 발현양상을 조사한 결과, 이들 7개의 protein들 중 GNPDA1, PGAM1의 RNA 발현수준이 선행연구결과와 동일하게 soybean oil 처리구보다 대조구에서 높은 수준을 보이고 있음을 알 수 있었음 (Independent-samples T-test, $P < 0.05$; 그림 8). 이 결과를 통하여 SCD1과 GNPDA1, PGAM1이 선행연구의 결과와 동일한 결과를 보이는 것을 다시 한 번 확인할 수 있었음. 아울러 SCD을 증가시켰을 때 SCD1의 발현이 TVA를 처리하였을 때와는 동일하게 감소함을 확인할 수 있었음.

○ 이러한 결과는 본 연구를 통하여 확립된 분리 방법을 통하여 얻어진 MECs은 젖소의 유선 상피세포(MAC-T cell)과 같은 유전자 발현양상을 보이고 있음을 시사하고 있음

[선행 연구내용]

- 선행연구에서 2-DE를 통해 BSA와 TVA를 처리한 MAC-T cell의 단백질 발현 정도를 비교한 결과 TVA 처리 후에 다양한 생물학적 기능을 가진 7개의 단백질의 발현정도가 다르게 나타났음. 이들 단백질들의 ID는 RAS guanyl releasing protein 4 isoform 1 (upregulated), Glucosamine-6-phosphate deaminase 1 (downregulated), Triosephosphate isomerase (downregulated), Phosphoglycerate mutase 1 (downregulated), Heat shock protein beta-1 (downregulated), Annexin A3 (downregulated) 그리고 Thiopurine S-methyltransferase (downregulated) 로 각각 동정되었음 (Table 4).

- 이들 단백질에 대한 mRNA발현량 검증실험에서 TVA (*cis*-9, *trans*-11 CLA 전구물질) 처리구에서 SCD1의 발현량은 두 배 이상 증가됨을 확인할 수 있었고($P=0.042$), TVA처리 MAC-T cell내 SCD1의 발현을 증가 시켰을 때, 후보단백질 중 GNPDA1 ($P<0.01$) 과 PGAM1 ($P<0.05$) 이 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었음(그림 9).

Table 4. Identification of differently expressed proteins in MAC-T cells

Protein No.	UniProt KB/Swiss-Prot Entry	Protein Name	Theory; Calculation Mol. Mass (kDa)/PI	MAS-COT Score	Peptides Matched	Sequence Coverage (%)	Molecular Functions	TVA/BSA
248751	Q1LZ97	RAS guanyl releasing protein 4isoform1 (RASGRP4)	74.8/7.99; 57.9/8.07	1.62	9	5.00	Cation-and diacylglycerol (DAG)-regulated nucleotide exchange factor activating Ras through the exchange of bound GDP for GTP	2.361
248607	A1L5B3	Glucosamine-6-phosphate deaminase 1 (GNPDA1)	32.6/6.42; 32.5/6.92	37.01	28	35.29	Glucosamine-6-phosphate deaminase activity	0.436
248200	Q5E956	Triosephosphate isomerase (TPI1)	26.7/6.45; 26.7/6.92	35.83	21	42.57	Gluconeogenesis; Glycolysis; Pentose shunt	0.441
248431	Q3SZ62	Phosphoglycerate mutase 1 (PGAM1)	28.9/6.67; 28.8/7.18	70.09	45	47.24	Glycolysis	0.457
248568	Q3T149	Heat shock protein beta-1 (HSPB1 HSP27)	22.4/5.98 22.4/6.40	11.24	14	32.34	Involved in stress resistance and actin organization	0.462
737	Q3SWX7	Annexin A3 (ANXA3)	36.1/6.49; 36.1/6.93	279.66	162	70.90	Phospholipase A2 inhibitor activity; Anti-coagulant	0.485
736	Q17QQ2	Thiopurine S-methyltransferase (TPMT)	28.3/6.11; 28.3/6.55	51.07	52	50.61	Thiopurine S-methyltransferase activity	0.339

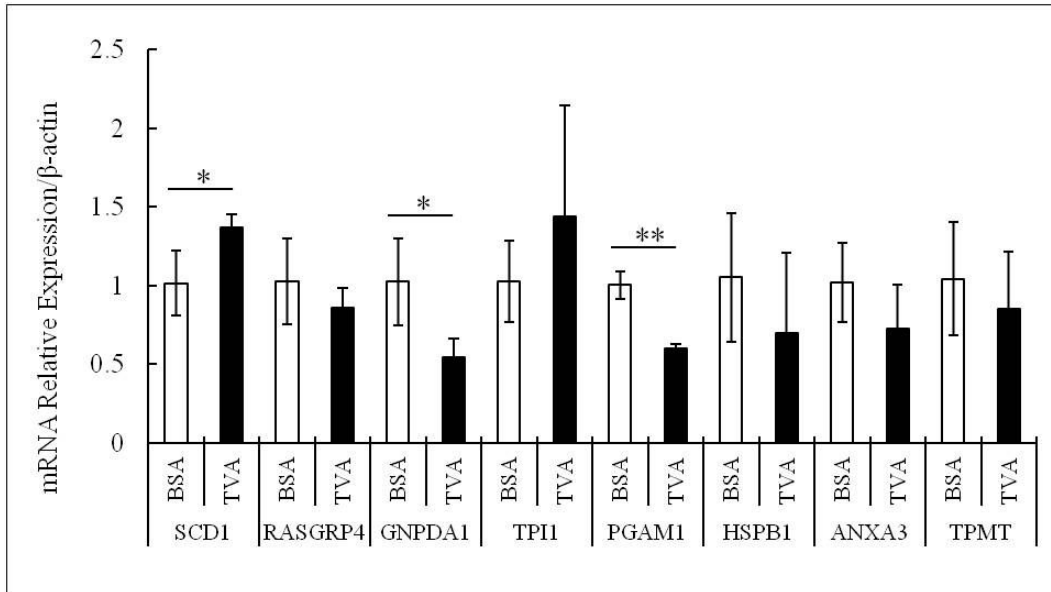


그림 9. The mRNA abundance of the candidate proteins in MAC-T cells. Cells were treated with BSA as the control or 50 μM *trans*-11 C18:1 in BSA (TVA) for 2.5 h. Independent-samples T-test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

제3절 우유 유래 유선상피세포를 이용하여 *cis9*, *trans11*-CLA 합성관련 영양생리지표 발굴연구

○ 본 실험에서는 식물성 oil (Extruded full-fat linseed) 함유 사료 급여에 대한 개체간의 *cis9*, *trans11*-CLA 합성능력 차이와 관련된 영양생리 지표를 우유 유래 유선상피세포에서 발굴하고자 함.

1. 실험방법

가. 기본 사양 및 우유샘플 채취: 산차 1차인 홀스타인 비유중기 (128.5 ± 28.57 days) 10두 (평균 598 ± 43kg) 에서 우유 채취(1.5L/두)

나. 기본 급여 사료 : 조사료 10kg (건물 91.5%, 조단백질 1.2%, 조지방 2.3%, NDF 58.3%, ADF 36.7%, 조회분 8.3%) + 농후사료 13kg (조단백질 23.6%, 조지방 5.2%, 조회분 7.0%, Ca 0.7%, P 0.4%, NDF 19.3%, ADF 8.9%)

다. 우유지방산분석: GC 이용하여 우유 중 지방산 조성 조사

라. 우유에서 유선상피세포를 추출: Study 1 에서 확립되는 immunomagnetic 방법 이용하여 우유중 상피세포를 추출

마. 2-DE를 이용하여 *cis*9, *trans*11-CLA 합성 능력 차이 있는 젖소들 간 유선조직에서 차이 있는 후보단백질 탐색

바. Real time-PCR 방법을 이용하여 상기 찾아낸 후보 단백질 발현량 검증

2. 실험결과

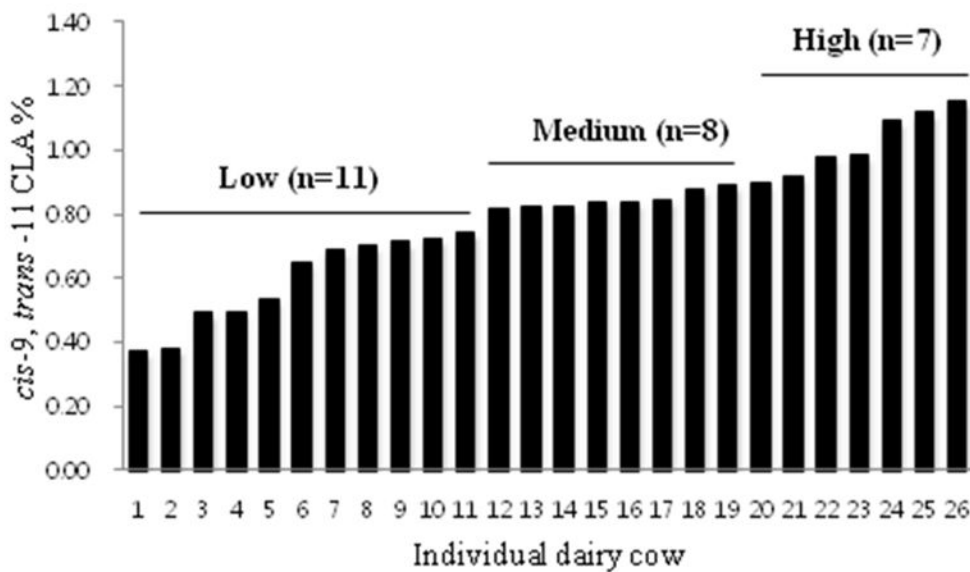


그림 10. Milk *cis*-9, *trans*-11 CLA contents of individual animals

○ 우유 내 *cis*-9, *trans*-11CLA의 함량은 High 시험구($1.02 \pm 0.038\%$)가 Low 시험구 ($0.59 \pm 0.042\%$)의 2배로 나타났음 ($P < 0.05$; 그림 10; Table 5). Medium과 High 시험구의 *cis*-9 C14:1/(*cis*-9C14:1+C14:0)의 desaturation index는 Low 시험구보다 높았지만 ($p=0.010$, $p=0.016$), *cis*-9 C16:1/(*cis*-9C16:1+C16:0), *cis*-9 C18:1/(*cis*-9C18:1+C18:0)의 desaturation index는 시험구 간 차이가 없었음. 우유중 지방산 조성에 있어서 Medium, High 시험구의 total PUFA는 Low 시험구보다 더 높은 반면($P=0.000$, $P=0.007$), SFA, MUFA, U/S는 뚜렷한 차이를 보이지 않았음 (Table 5).

Table 5. Differences in milk fatty acids composition (%).

Items	Low	Medium	High
<i>Fatty acid %</i>			
C4:0	2.09±0.496	1.68±0.505	1.90±0.169
C6:0	1.70±0.338	1.54±0.424	1.55±0.114
C8:0	1.14±0.269	1.11±0.314	1.03±0.182
C10:0	2.53±0.822	2.61±0.684	2.40±0.683
C11:0	0.28±0.109	0.34±0.108	0.30±0.047
C12:0	2.97±0.972	3.23±0.684	2.98±0.841
C14:0	9.76±2.003	10.83±1.096	10.24±1.247
C14:1	0.79±0.261 [†]	1.24±0.333 ^b	0.99±0.220 ^{ab}
C15:0	0.75±0.170	0.76±0.042	0.83±0.093
C15:1	0.01±0.005	0.02±0.007	0.01±0.003
C16:0	29.48±3.096	28.97±1.253	27.55±1.914
C16:1	1.78±0.498	1.89±0.426	1.68±0.427
C17:0	0.63±0.037 ^b	0.59±0.036 ^a	0.62±0.052 ^{ab}
C17:1	0.22±0.070	0.18±0.031	0.20±0.031
C18:0 (Stearic acid)	12.27±1.634 ^b	10.09±1.257 ^a	11.68±1.504 ^{ab}
C18:1n9t	0.42±0.099	0.45±0.076	0.46±0.046
<i>trans</i> -11 C18:1	2.39±0.302 ^a	2.62±0.473 ^{ab}	2.82±0.14 ^b
C18:1n9c (Oleic acid)	25.85±5.235	25.68±2.356	26.81±1.883
C18:2n6t	0.01±0.004	0.02±0.005	0.02±0.002
C18:2n6c (Linoleic acid)	3.24±0.516 ^a	4.10±0.440 ^b	3.63±0.757 ^{ab}
C20:0	0.16±0.028 ^a	0.15±0.020 ^a	0.19±0.018 ^b
C18:3n6	0.04±0.018	0.05±0.007	0.05±0.008
C20:1	0.10±0.032	0.08±0.012	0.09±0.009
C18:3n3 (Linolenic acid)	0.20±0.050 ^a	0.24±0.023 ^b	0.24±0.029 ^b
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA	0.59±0.140 ^a	0.85±0.027 ^b	1.02±0.100 ^c
C21:0	0.02±0.006	0.03±0.010	0.02±0.003
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA	0.02±0.010 ^a	0.03±0.010 ^b	0.03±0.005 ^b
C20:2	0.04±0.006	0.05±0.011	0.04±0.006
C22:0	0.05±0.011	0.05±0.007	0.06±0.005
C20:3n6	0.14±0.054	0.16±0.038	0.17±0.041
C22:1n9	0.02±0.003	0.02±0.003	0.02±0.003
C20:3n3	0.01±0.005	0.01±0.005	0.01±0.002
C20:4n6	0.20±0.036	0.20±0.038	0.21±0.050
C23:0	0.02±0.006	0.02±0.006	0.02±0.003
C22:2	0.02±0.006	0.02±0.006	0.03±0.004
C24:0	0.03±0.009	0.03±0.009	0.04±0.007
C20:5n3 (EPA)	0.02±0.007	0.03±0.005	0.03±0.002
C24:1	0.01±0.005	0.01±0.005	0.01±0.001
C22:6n3 (DHA)	0.00±0.000	0.00±0.000	0.00±0.000
SFA [‡]	63.88±1.670	62.04±1.196	61.45±0.887
MUFA [§]	31.58±1.605	32.20±1.089	33.11±0.812
PUFA [¶]	4.56±0.178 ^a	5.77±0.176 ^b	5.46±0.308 ^b
U/S ^{††}	0.58±0.043	0.62±0.033	0.63±0.024
<i>Desaturation index^{‡‡}</i>			
<i>cis</i> -9 C14:1	7.03±0.660 ^a	9.16±1.869 ^b	8.90±2.010 ^b
<i>cis</i> -9 C16:1	5.71±1.672 ^a	6.08±1.145 ^b	6.09±1.071 ^b
<i>cis</i> -9 C18:1	67.46±4.315 ^a	70.69±1.981 ^b	69.72±1.864 ^b

[†] a-c within a row, values with different superscripts are significantly different (p<0.05).

[‡] Saturated fatty acids Σ (C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C11:0, C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, C21:0, C22:0, C23:0, C24:0).

[§] Mono-unsaturated fatty acids Σ (C14:1, C15:1, C16:1, C17:1, C18:1n9t, C18:1n9c, *trans*-C18:1, C20:1, C22:1n9, C24:1).

[¶] Poly-unsaturated fatty acids Σ (C18:2n6t, C18:2n6c, C18:3n6, C18:3n3, *cis*-9, *trans*-11CLA, *trans*-10, *cis*-12CLA, C20:2, C20:3n6, C20:3n3, C20:4n6, C22:2, C20:5n3, C22:6n3).

^{††} (Mono-unsaturated fatty acids + Poly-unsaturated fatty acids) / Saturated fatty acids

^{‡‡} Desaturation index are calculated as follows: ratio of the $\Delta 9$ -desaturase product divided by the sum of the $\Delta 9$ -desaturase product and substrate. For example, the desaturase index for *cis*-9:1 would be $(cis-9:1)/(cis-9:1+14:0)\%CLA/TVA$ means $(cis-9, trans-11CLA)/(cis-9, trans-11CLA +trans-11C18:1)$

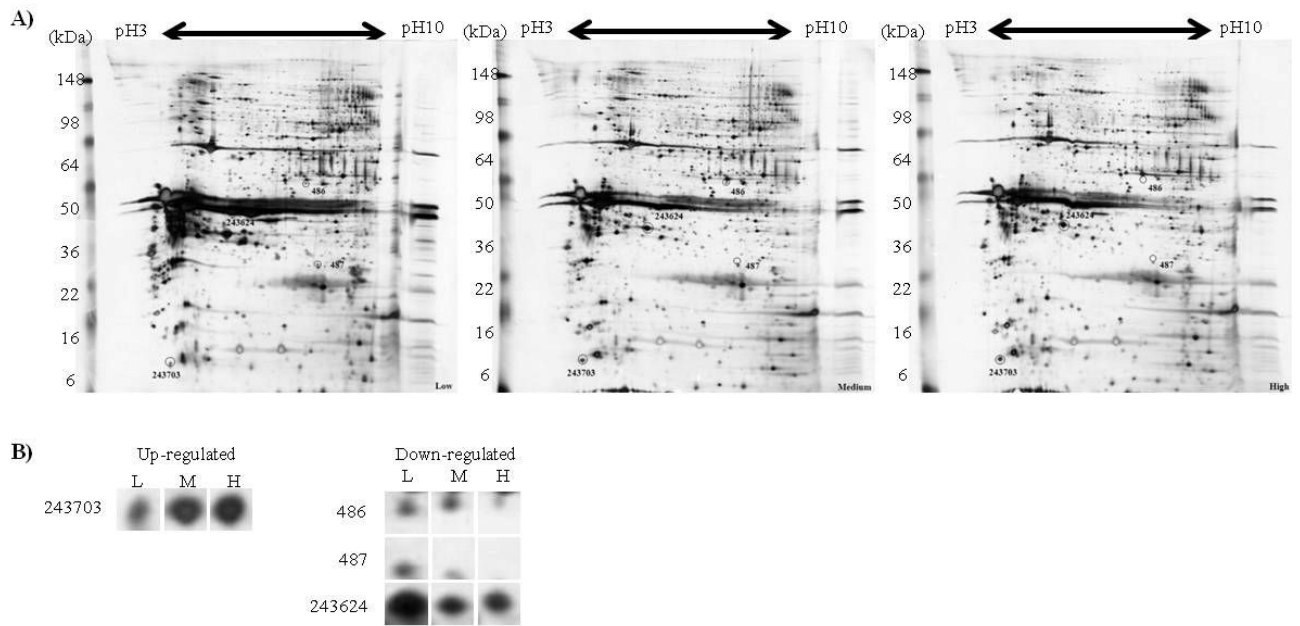


Figure 11. Differentially expressed proteins profiles in isolated MECs.

○ 2-DE분석결과 세 처리구간의 MECs에서 많은 수의 spot을 관찰할 수 있었음 (그림 11). 이들 spot중 4개의 spot이 LC-MS/MS로 동정되었는데 이들은 각각 cathelicidin 5 (up-regulated), ZW10 interactor (down-regulated), annexin I (down-regulated), kappa casein (down-regulated)으로 확인되었음 (Table 6).

Table 6. List of differentially expressed proteins in isolated MECs.

Protein No.	UniProtKB / Swiss-Prot Entry	Protein Name	Theory; Calculation Mol. Mass (kDa)/PI	MASC OT Score	Peptide-spectrum Matches	Sequence Coverage (%)	Molecular Functions	Protein Expression		
								Low	Medium	High
243703	P54229	Cathelicidin 5 (CATHL5)	17.6/8.37; 17.6/8.15	68.06	60	29.56	Defense against invasive bacterial infection	0.082	0.209	0.173
486	P46193	Annexin I (ANXA1)	39.0/6.37; 39.0/6.81	6.60	12	21.10	Promotes membrane fusion, involved in exocytosis, regulates phospholipase A2 activity	0.050	0.041	0.008
487	Q2TBH8	ZW10 interactor (ZWINT)	32.6/4.85; 32.6/4.88	2.01	3	10.49	Required for kinetochore formation and spindle checkpoint activity	0.050	0.011	0.000
243624	Q9N258	Kappa casein (CSN3)	17.9/7.01; 17.3/7.43	46.39	44	17.31	A mammalian milk protein	0.396	0.130	0.091

다. 본 실험을 통하여 발굴된 MEC유래 4개의 단백질은 젖소유선에서의 CLA합성과 관련된 후보 마커 단백질일 것으로 판단되어 이후 기능에 대한 추가연구가 요구됨

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

세부 연구 목표	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가	관련 분야에의 기여도
우유내로 배출되는 유선상피세포의 효과적인 추출 방법 확립	40	100	젖소의 비유생리 특성상 유분비시 미량 배출되는 유선상피세포를 효과적으로 추출할 수 있는 방법을 성공적으로 확립하였음	기존 유선상피세포를 효과적으로 추출할 수 있는 방법이 없음. 관련분야 연구수단과 기술 제공
우유 유래 유선상피세포를 이용하여 <i>cis9</i> , <i>trans11</i> -CLA 합성 관련 단백질 검증연구	30	100	연구 1에서 확립된 유선상피세포 추출방법을 이용하여 선행연구에서 발굴된 실제 <i>cis9</i> , <i>trans11</i> -CLA 합성관련 후보 단백질에 대한 발현양상을 성공적으로 확인하였음	유선상피세포 추출방법을 이용하여 실제 <i>cis9</i> , <i>trans11</i> -CLA 합성에 관여하는 영양생리 지표를 발현정도 확인. 추후 <i>cis9</i> , <i>trans11</i> -CLA 관련 분야에 많은 기여를 할 것이라 예상
우유 유래 유선상피세포를 이용하여 <i>cis9</i> , <i>trans11</i> -CLA 합성 관련 영양생리지표 발굴연구	30	100	젖소 개체별 식물성 oi 함유 사료 급여에 대한 <i>cis9</i> , <i>trans11</i> -CLA 합성 능력 차이와 관련된 영양생리지표를 우유 유래 유선상피세포에서 발굴실험이 목표대로 달성되었음	기존 연구들 중 젖소 개체별 식물성 oi 함유 사료 급여에 대한 <i>cis9</i> , <i>trans11</i> -CLA 합성 능력 차이와 관련된 영양생리지표를 우유 유래 유선상피세포에서 탐색 미비. 관련 분야 연구수단과 idea 제공 추후 발굴된 단백질의 lose/gain of function 규명 필요
합계	100			

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제1절 실용화·산업화 계획

1. 젓소의 유중 유선상피세포를 분리기술 확립 및 유전자 발현양상 조사 가능 확인.
2. 우유 유래 유선상피세포를 이용하여 *cis9*, *trans11*-CLA 합성관련 유용 단백질 발굴.
3. 이를 이용하여 영양소 처리에 대한 기능성물질합성관련 각종 오믹스 data를 발굴하여 고기능성 *cis9*, *trans11*-CLA 우유 생산용 우량 젓소 개량 및 사양기술 개발에 활용.
4. 우유유래 유선상피세포에서 발굴된 유전자를 기능성 물질 생산 시스템에 활용한다면, 낙농가의 수입증대는 물론 유가공 관련 산업에 기여될 수 있음.
5. 유중 유선상피세포 분리 및 영양생리지표관련 결과를 활용한다면 젓소 유선에서의 영양소 대사관련 연구에 기여될 것으로 사료됨.
6. 본 연구를 통하여 발굴된 후보 단백질에 대한 기능연구를 추가 연구과제로 제안.

제2절 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등

학위배출인력 성과정보							
과제번호	학위취득연월	학위구분	학위취득자				진로
			성명	성별	대학	학과	
201210150001	201302	박사	왕도	남성	부산대학교(밀양캠퍼스)	동물생명자원과학과	취업(박사후 연구원 포함)
201210150001	201303	석사	임지나	여성	부산대학교(밀양캠퍼스)	동물생명자원과학과	취업(박사후 연구원 포함)

제3절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

1. <특허출원계획>

가. 젓소의 우유로부터 유선상피세포의 분리방법 (국내특허출원 10월중)

2. <논문투고현황>

전문화술지 논문게재/투고 성과정보											
과제번호	게재연월	논문제목	총저자명	출처	학술지명	권(호)	학술지구분	SCI여부	Impact Factor	국제공동연구논문	기여도
201210150001	2013	Association of protein expression in isolated milk epithelial cells and cis-9, trans-11 CLA concentration in milk from dairy cows	TaoWang, Ji-NaLim, Jin-Deok Bok, Jeong-HoonKim, Sang-KeeKang, Sang-BumLee, Jin-HeeHwang, Kyung-HoonLee, Han-SeokKang, Yun-JaieChoi, Eun-Joong Kim, Seong-HoChoi, and Hong-Gu Lee (통신저자)		Journal of the Science of Food and Agriculture	Submitted	국외	SCI 등재	1.759	아니오	75
201210150001	2013	System-wide analysis reveals proteins involved in cis-9, trans-11 conjugated linoleic acids synthesis in bovine mammary gland1	T. Wang, S. B. Lee, J. H. Hwang, J. N. Lim, U. S. Jung, M. J. Kim, H. S. Kang, S. H. Choi, J. S. Lee, and H. G. Lee (통신저자)		Journal of Dairy Science	Submitted	국외	SCI 등재	2.566	아니오	25

제4절 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

1. 추가 연구의 필요

가. 확립된 유선상피세포 추출방법을 이용하여 실제 TVA에서 *cis9*, *trans11*-CLA로의 전변에 관한 연구 필요.

나. 유선 내의 *cis9*, *trans11*-CLA합성 관한 연구를 통하여 발굴된 후보 단백질에 대한 lose/gain of function 규명연구 필요

다. 유선 내의 젖소 개체별 *cis9*, *trans11*-CLA합성 능력 차이 관한 연구를 통하여 발굴된 후보 단백질을 이용한 실제 젖소에서의 육종개량을 위한 분자표지 마커 활용 또는 사료개발연구 필요

2. 타 연구에의 응용

가. 유선내의 지방흡수, 합성 및 대사과 세포내 지방산의 trans membrane 기전규명 연구에 응용

나. 본 연구를 통하여 확립된 유선상피세포 추출방법을 응용한 유단백관련 유전자 발굴 연구에 활용 가능함

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

젖소에 있어서 유선조직에서 기능성 성분으로 널리 알려져 있는 CLA 증가를 위한 생합성 관련 단백질 발현 연구는 거의 없는 실정이고, 이를 위해 유선조직을 채취하여야 하는데 이 경우 biopsy에 의한 스트레스와 비용문제가 발생하여 샘플규모가 적거나 연구의 정확성이 떨어지게 되는 단점을 가지고 있음. 따라서 CLA 생합성과 관련된 직접적인 영양 및 비유 생리학적 기전 규명을 통한 단백질생리지표 발굴 연구를 위해서는 보다 손쉽게 이용할 수 있는 유선 상피세포의 확보가 선행 되어져야 함. 체세포수는 우유 내 총 세포수를 나타내고 상피세포, 백혈구, 임파구, 단핵구 등으로 구성되는데 이중 다형핵 백혈구와 유즙 분비조직에서 탈락된 상피세포가 미량 존재하고 임파구와 단핵구의 비율은 적음. 일반적으로 젖소의 유분비 형식은 merocrine분비형식으로 유산양의 apocrine 분비형태보다 유선 상피세포를 많이 포함하고 있지 않아 보다 정밀한 추출 기술이 필요함. Boutinaud (2008년)는 Dynabeads Pan Mouse IgG, anti-cytokeratin 8 antibody, 및 Magnetic particle concentrator 이용한 immunomagnetic 방법으로 우유 내 상피세포 추출 방법을 발표하였다. 따라서 본 연구에서는 Boutinaud의 실험 방법을 이용하여 우유 내 유선상피 세포가 효과적으로 추출 될 수 있는지를 평가해 실용성을 확인하였음.

제 7 장 연구시설·장비 현황

연구시설·장비 현황정보								
과제번호	구입연월	기자재명	규격	수량	제조국	구매금액	활용용도	설치장소
201210150001	201208	Magnetic particle concentrator		1	미국	718,000	세포분리	건국대학교 504호
201210150001	201304	SP2560 Capillary column (100mx0.25mm x0.2um)		1	미국	1,955,000	지방산부석	건국대학교 504호
201210150001	201304	6890A GC Autosampler & Injector		1	미국	4,000,000	지방산부석	건국대학교 504호

제 8 장 참고문헌

Cook M.E., Miller, C.C., Park, Y., Pariza, M. 1993. Immune modulation by altered nutrient metabolism: nutritional control of immune-induced growth depression. *Poult Science*, 72(7):1301-1305.

Dhiman, T.R., Nam, S.H., and Ure, A.L. 2005. Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(6):463-482.

Griinari, J.M., Corl, B.A., Lacy, S.H., Chouinard, P.Y., Nurmela, K.V., and Bauman, D.E. 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by D9-desaturase. *Journal of Nutrition*, 130:2285-2291.

Ha, Y.L., Grimm, N.K., and Pariza, M.W. 1987. Anticarcinogens from fried ground beef: Heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*, 8:1881-1887.

Ip C, Scimeca JA, Thompson HJ. 1994. Conjugated linoleic acid. A powerful anticarcinogen from animal fat sources. *Cancer*, 74(3Suppl):1050-1054.

Ip C, Briggs SP, Haeghele AD, Thompson HJ, Storkson J, Scimeca JA. 1996. The efficacy of conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level or type of fat in the diet. *Carcinogenesis*, 17(5):1045-1050.

Jin, Y.C., Lee, H.G., Xu, C.X., Han, J.A. Choi, S.H., Song, M.K., Kim, Y.J., Lee, K.B., Kim, S.K., Kang, H.S., Cho, B.W., Shin, T.S., and Choi, Y.J. 2010. Proteomic analysis of endogenous conjugated linoleic acid biosynthesis in lactating rats and mouse mammary gland epithelia cells (HC11). *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins & Proteomics*, 1804(4):745-751.

Jin, Y.C. 2011. Profiling and functional study of proteins involved in synthesis of CLA in the mammary gland. PhD Thesis. Seoul National Univ., Seoul, South Korea.

Lee, K.N., Kritchevsky, D., Pariza, M.W. 1994. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*, 108(1):19-25.

Ntambi, J.M., Miyazaki, M., and Dobrzyn, A. 2004. Regulation of stearoyl-CoA desaturase expression. *Lipids*, 39(11):1061-1065.

Scimeca JA, Thompson HJ, Ip C. 1994. Effect of conjugated linoleic acid on

carcinogenesis. *Adv Exp Med Biol.*, 364:59-65.

Thiel-Cooper, R.L., Parrish Jr. F.C., Wiegand, B.R., Love, J.A. 1999. Body Composition and Sensory Characteristics of Pork from CLA-Fed Pigs. *Swine Research Report*, 72.

본문 작성 요령

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

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 신진연구자지원사업(해당사업 표기)의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 신진연구자지원사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.

[부 표]

인 쇄 내 용

I. 인쇄규격

1. 크기 : A4 신판(가로 210mm * 세로297mm)
2. 제본 : 좌철
3. 용 지
 - 가. 표지 200g/m² 양면 아트지
 - 나. 내용 80g/m² 모조지
4. 인쇄방법
 - 가. 표지 : 바탕 백색, 활자 흑색
 - 나. 내용 : 흑색 지정활자
 - 다. 양면인쇄

II. 편집순서

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

III. 참고사항

전자조판 인쇄 시에는 이에 준한다.