최 종
연구보고서

한우 고급육 생산을 위한
Calpain Proteolytic System
조절 기술 개발

Calpain Proteolytic System for Improving Meat Quality of Hanwoo

전 남 대 학 교

농 림 부

〔별지 제7호 서식〕

최 종 보 고 서

1995년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 "한우 고급육 생산을 위한 Calpain Proteolytic System 조절 기술개발" 에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 10부

2. 최종보고서 디스켓 1매

2000. 12. 20

주관연구기관 : 전 남 대 학 교

총괄연구책임자 : 김 재 홍 (인)

주관연구기관장 : 전 남 대 학 교 총 장

농 림 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “한우 고급육 생산을 위한 Calpain Proteolytic System **조절 기술개발에 관한 연구” 과제 (제1세부과제 “**Calpain proteolytic system **조절에의한 고급 한우육 생산기술개발”, 제2세부과제 “한우고급육 생산을위한** calpain antisense **및 근육세포 배양기술 개발”, 제3세부과제 “**calpain DNA **미세현미주입에의한 한우개량기술개발”)의 최종보고서로 제출합니다.**

2000년 12월 20일

주관연구기관명 : 전남대학교

총괄연구책임자 : 김 재 홍

연 구 원 : 명 규 호

연 구 원 : 문 승 주

연 구 원 : 선 상 수

요 약 문

Ⅰ. 제 목

한우 고급육 생산을 위한 Calpain Proteolytic System 조절 기술개발

1. Calpain proteolytic system 조절에의한 고급 한우육 생산기술개발
2. 한우고급육 생산을위한 calpain antisense 및 근육세포 배양기술 개발
3. Calpain DNA 미세현미주입에의한 한우개량기술개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

WTO 출범이후 농수축산물의 수입개방과 더불어 우리나라에서는 고부가가치성의 축산식품을 개발하는 것이 당면과제이다. 우리나라는 경제성장과 더불어 생활수준 향상으로 축산물의 소비도 급증하였다. 또한 소비자들 사이에서는 축산식품의 양적인 증가뿐만 아니라 질적인 향상도 요구하고있다. 최근 한우 사육농가가 늘어나고 농가 당 사육규모도 급증하고있는 추세로 1994년 후반부터 한우 송아지의 입식이 급증하여 마리 당 가격이 200만원대에 육박하였으며, 현재에도 높은 가격이 유지되고 있는 실정이다. 특히 값싼 수입육 시장의 개방으로 비록 한우육에 비하여 기호성에는 차이가 있다고 하지만 가격 경쟁력으로 볼 때 미래에 장기적인 경제적인 파급효과를 예측하기는 어렵지만 가까운 장래에 수요와 공급의 불균형이 예측된다. 이러한 추세의 주요한 요인은 소비자들 사이에서 수입육에 비하여 고급육으로 인정받고있는 한우육의 수요증가로 볼 수 있다.

이와 같은 상황의 인식아래 우리나라 사람들이 좋아하는 풍미와 맛을 갖춘 품질이 좋은 고기를 한우 고급육이라 정의하고 주로 소의 축체 부위별 성장발육특성과 이를 이용한 사료의 종류별 급여조절에 의한 육질개선과 이를 객관화하는 도체등급제도를 실시하고 있다. 현재 실시하고 있는 우리나라 소고기 도체 등급기준은 육량등급과 육질등급 두 가지를 근간으로 하고 있는데 특히 육질등급은 근내지방도, 육색 및 지방색표준을 정해 A-1에서 C-3 및 등외까지 모두 10개

의 등급으로 분류하고 있으나, 1994년 1년 동안 조사된 한우 46,104마리중 A-1등급은 고작 125마리로 겨우 0.27%에 그치며 A-3까지의 합계도 4,712마리로 10.2%에 그치고 있다. 이의 주된 이유는 육류등급판매제가 아직 정착되지 않는점도 있겠지만 더욱 중요한 이유는 후천적 사양기술 조절에 의한 한우 고급육 생산의 한계 때문이 아닌가 하는 의구심을 떨쳐버릴 수 가없다.

최근 생물공학의 발전과 더불어 동물배를 체외에서 조작하는 인공번식기술이 세계각국에서 집중적으로 연구되고 있다. 인공번식기법은 번식효율의 극대화 및 유전적 능력을 획기적으로 향상시킬 수 있기 때문에 가축의 유전적 개량, 번식효율 개선 등에 널리 이용되고 있다. 생쥐 난자내에 bovine gamma globulin을 미세현미 주입하여 성공한 이후 이 분야에 대한 연구는 여러 연구자들에 의해 활발하게 진척되어 미세현미 주입기법으로 외래유전자등 유전물질을 비롯한 다양한 물질들이 동물 난자내에 이식 좋은 성과를 거두었다. 이러한 미세현미 주입기법은 형질전환동물을 생산 가축 유전형질을 빠르게 개선할 수 있으며 동물의 성장 발육, 번식효율 등 형질개선에 크게 이용될 수 있다. 미세현미 주입기법에 의한 난자내 DNA주입은 형질전환동물 생산에 널리 이용되어지고 있다. 따라서 본 연구진은 관련된 proteolytic system의 현상을 파악하고 이를 근거로 이들을 인위적으로 조절함으로서 고급 한우육을 매우 효율적으로 생산하는 기술을 개발하며 쇠고기 연도에 중요하게 영향을 미치는 한우 Calpain DNA를 IVF기법에 의해 생산된 한우수정란에 주입하여 고급육을 생산하는 한우의 품종을 개량코자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

[제 1 세부과제] : Calpain proteolytic system조절에 의한 고급한우육 생산기술

* 한우의 성장단계별 사양시험

1. 장기, 단기, 호르몬처리에의한 사양시험

2. 도체분석, 도체평가, 관능검사

* 한우의 성장속도 및 거세에 의한 근육조직내 근육단백질 분석

1. Cathepsin 및 Cystatin분석법 개발

2. Western blotting에 의한 desmin, vinculin, nebulin 분석법 개발

* 한우의 성장속도 및 거세에 의한 근육조직내 Calpain/Calpastatin 활성변화

1. μ-Calpain, m-Calpain, Calpastatin 분석기술개발

* 한우의 성장속도 및 거세가Calpain/Calpastatin활성과 육생산성 및 육질에 미치는 영향

1. Calpain/Calpastatin 활성에 따른 상관관계 측정

* Calpain proteolytic system변화가 근원섬유 단백질 회전율내생단백효소 활성도 및 근육성장에 미치는 영향

1. 호르몬제 투여가 calpain/calpastatin활성도,근육단백질 합성 및 분해율에 미치는 영향

2. 거세가 calpain/calpastatin활성도, 근육단백질 합성 및 분해율에 미치는 영향

* 한우의 근육조직내 calpain/calpastatin활성도와 도체등급기준과 상관관계측정

1. 사후강직후 도체 근육내 calpain농도와 육질및 육량등급 기준과의 상관관계

2. 사후강직 후 도체 근육내 calpastatin 농도와 육질 및 육량등급 기준간의 상관관계

3. 고급 한우육 생산을 위한 적정 calpain 과 calpastatin 활성도 규명

[제 2 세부과제]: 한우 고급육 생산을 위한 근육위성세포 배양기술과 현미경적 근섬유구조분석

* 근육위성세포 cloning과 세포배양조건 관찰
  1. 근육 위성세포 Cloning
  2. 분리된 근육세포의 배양
  3. 근육세포 최적 배양조건 확립

* Calpain에 의한 골격근육내 근원섬유구조변화 및 관찰기술
  1. 광학현미경에 의한 근섬유 구조분석
  2. 전자현미경에 의한 근섬유의 초미시 구조 분석

* Calpain antisense DNA처리에 의한 근육연도개량
  1. Calpastatin DNA transfection
  2. pCMVblac plasmid transfaction
  3. Calpain 과 Calpastatin gene expression 측정

[제 3 세부과제] : 미세현미 주입기법으로 Calpastatin Antisense DNA를 주입한 한우난자의 발생

* 한우 난포난의 체외성숙 기술과 체외수정 기술 확립
  1. 최적의 난포난의 체외성숙 배양액
  2. 첨가 Hormone의 종류와 농도결정
  3. 체외수정 기술 확립

* 체외수정 기법에 의한 공시난자의 대량 생산
  1. 체외수정기술의 확립에 의한 한우 수정란의 대량생산

2. 수정란의 보존방법 확립

* 한우 난자의 체외배양 기술 확립

1. 체외 배양액 결정
2. 공배양 기술 확립
3. blocking 현상 극복방안 확립

* Calpastatin DNA를 위한 미세 현미 주입 기술 개발

1. Calpastatin antisense DNA를 위한 미세현미 주입기술 확립
2. 미세현미 주입후 난자의 체외배양기슬 확립

* Calpastatin Antisense DNA가 주입된 난자의 발생과 생산

1. 미세현미 주입기법에 의한 난자 발생과 생산
2. 미세 주입된 난자의 배란포배까지 체외배양 기술 체계확립

Ⅳ. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

제1세부과제 : Calpain Proteolytic System 조절에 의한 고급 한우육 생산 기술개발

1. 시험우사양성적

- 시험우 성장 성적 전반적으로 동일 월령에 숫소, 거세우, 암소의 순서로 체중의 차이가 발생하고 평균 증체량은 거세우 0.71, 숫컷 0.77, 암컷 0.56으로서 정상적인 성장을 유지하고 하였다.
- 동물의 성장률은 16개월령까지 유의적으로 성장하다가 그 이후에는 성장률이 감소하였다.

- 처리구간 일당증체량을 비교하여보면 속성성장군에서 0.86으로 유의적으로 높았으며, 호르몬처리구 (0.77) 와 정상성장군 (0.68) 사이에는 유의차가 나타나지 않았지만 호르몬 처리구에서 높은 성장률을 보였다.

- 수소는 거세우나 미경산우에서 보다는 근육 단백질 축적량이 증가하고 단백질 분해량은 감소한 결과이다.

- 호르몬 처리에 의하여 체중이 수소 (8.3%), 거세우 (7.7%), 미경산우 (23.2%) 증가하였다.

2. 도체성적

- 수소가 거세우에 비하여 성장속도가 빠르지만, 육량등급은 수소가 대부분 C 등급인데 반하여 거세우는 B 등급이 많은 편이다.

- 미경산우는 수소나 거세우에 비하여 등지방 두께가 높았다.

- 배최장근과 육량지수는 거세우나 미경산우에 비하여 수소에서 높았다.

- 육질등급에서 수소는 2.8로서 대부분 3등급이었으나, 거세우 에서는 평균 1.4로서 1-2등급의 분포를 보여 육질이 현저히 상승되었다.

3. Calpain 활성도

- 수소에서 calpastatin의 활성도가 calpain의 활성도에 비해 두드러지게 증가하였다.

- 육의 저장시간별 전단력을 측정한 결과와 비교해 볼 때 한우에서 거세로 인한 calpastatin의 활성도를 저하가 결국 전단력을 감소시켜 육질의 연도향상을 가져왔다고 생각된다.

4. 육즙발생량

- 수소에 비해 거세우에서 현저하게 육즙 발생량이 감소하여 거세가 육즙 발생량과 관련된 육질에 영향을 미치는 바가 크다고 보여진다.

5. 전단력

- 근육의 연도를 나타내는 shear force는 수소와 미경산우에서 보다는 거세우

에서 낮았다. 그러므로 거세우에서 근육연도가 향상됨을 볼 수 있다.

6.육색

- 육색은 수소에서는 Hunter color-L* 값이 미경산우나 거세우에 비하여 낮았다.
- Hunter color-a* 는 별다른 차이를 보이지 않았다.
- Hunter color-b 는 도축 후 숙성시간이 경과함에 따라 감소하였다.

이러한 결과로 미루어볼 때 18개월 사양은 설상도를 높이기는 미흡하다는 결론이다. 비록 비육우 품종이나 성별에 따라 도체성분이 다르게 나타날 지라도, 현재 소비자들이 원하는 고급육인 high marbling 이나 지방이적은 육고기를 생산하기 위하여 본연구가 크게 기여할 것으로 사료된다.

제2세부과제 : 한우 고급육 생산을위한 calpain DNA 및 근육세포 배양기술 개발

1. 근육위성세포

- 한우 근육 위성세포를 순수 cloning 하였다.
- 근육위성세포의 최적 성장조건은 DMEM + 10% FCS로 밝혀졌다.
- calpain 유전자를 pCMVβlac plasmid를 이용하여 세포내로전이하고 발현을 확인하였다.

2. 근육단백질 분석

- 근육단백질 중 vinculin 과 desmin 이 4℃에서 저장시간이 경과함에 따라 점차 분해되어감으로서 육의 연도를 향상시키는 요인이 된다.
- 한우의 수컷과 암컷에서 cathepsin B 의 특이활성도는 수컷에서 2배 이상 높게 나타났다.
- Vinculin은 day 0과 day 1일에 검출되었다, 그러나 day 3 이후에는 분해되

어 나타나지 않았다.

- Vinculin의 분자량은 약 90KDa로 밝혀졌다. Desmin은 도축후 숙성기간이 경과함에따라 분해되었고, 분자량은 약 50KDa로 나타났다. calpastatin의 분자량 71kD, calpain-Ⅰ 분자량 55kD, calpain-Ⅱ의 분자량은 80, 50, 30, kD등으로 나타났다.

3. 현미경적 근섬유분석

- 근육조직의 치밀도는 대조구에 비하여 24개월 장기사양 처리구에서 훨신 유연하게 보였다.

- 근육수축단위인 sarcomere 길이는 장기사양 처리구에서 45% 정도 그게 늘어났다.

- 호르몬처리구 에서는 근육단면이 이완되어있는 현상을 볼 수 있으며, 이는 근육단백질인 vinculin과 nebulin이 분해되어 간극이 늘어난 것으로 해석할 수 있다.

- 속성성장구에서는 명확하지는 않지만 근육조직이 연속적으로 연결되어 대조구에 비하여 훨신 더 치밀한 구조를 보이며, sarcomere 단위도 명확히 구분되지 않는 것으로 보아 근육단백질들이 그대로 존재하고 있으며, 훨신 견고한 결과를 shere force에 의해서도 알 수 있다.

4. Calpain/ calpastatin 유전자

- 2개의 calpastatin PCR product를 었었다.

- 유전자 염기서열 (826bp)은 미국 NIH의 NCBI에서 제공하는 GenBank data의 BLAST search 결과 본 연구에서 밝혀낸 819bp와 homology가 100% 일치한 것으로 나타났다

- 다른 동물의 calpastatin 유전자와 homology를 조사해보면 대부분 85%이상의 상관도를 보여주었다.

현재까지의 결과로서 일반적으로 알고있는 수소고기와 암소고기의 근육연도에 차이가 있다는 것을 뒷받침할 수 있을 것이다. 이러한 결과들은 도체의 등급과

calpain 등과의 상호관계를 연관시키면 보다 더 명확할 것이다.

제3세부과제 : 미세현미주입기법으로 calpastatin as-DNA를 주입한 한우난자의 발생

◎ 한우 미성숙난포란의 체외성숙기술과 체외수정기술확립

• 한우미성숙난포란의 등급은 Holstein종과 같은 타품종에 비하여 낮았다.

• 한우미성숙난포란의 체외성숙은 배양액으로 TCM-199과 Ham's F-10을 사용시 배양액 간에 차이가 없었고 단백질원으로 FCS, BSA, BFF를 첨가하였을 때 FCS를 첨가했을 경우 체외성숙율이 높았다.

• 체외성숙배양액내 FSH-LH 와 PMSG-HCG를 첨가 성숙배양했을 때 호르몬 종류간의 차이가 없었다.

• 배양액내 FCS, BSA, BFF 첨가시 FCS를 첨가했을 때 체외수정율과 다정자침 입율이 높았으며, 호르몬으로 FSH-LH를 첨가했을 때 체외수정율과 다정자침입율이 높았지만 PMSG-HCG 첨가했을 경우에 비하여 유의적인 차이는 없었다.

◎ 체외수정기법에 의한 공시난자의 대량생산

• 한우체외수정란의 동결융해후 생존율개선을 위하여 항동해제로 ethylene glycol 사용이 우수하며 EFS40(ethylene glycol, Focoll. sucrose 혼합)을 사용하는 것이 우수하였다.

• 정자의 수정능획득처리방법중 heparin, BFF, BOCM 처리시 대조구에 비하여 체외수정율과 웅성전핵형성율이 유의적으로 높았다.

◎ 한우난자의 체외배양기술확립

• 한우체외수정란의 배발달배양액으로 CR1aa 가 TCM-199, Ham's F-10 보다 난할율이 높았고, FCS와 BSA를 단백질급원으로 첨가했을 때 상실배와 배반포배발달율은 첨가농도가 높을때(20%와 1%) 높았으며 FCS를 첨가했을때가 BSA를 첨가했을때보다 높게 나타났다.

• 난관유래물질(BOEC, BOCM)과의 공배양시 난할율과 상실배 또는 배반포배

발달율이 모두 높았다.

• 체외발달배양액내 항산화제 첨가효과가 나타났으며 L-ascorbic은 62.5μmol, α-tocopherol은 2.5μ/ml첨가 수준에서 성적이 좋았다.

◎ Calpastatin antisense DNA 미세현미주입기술개발

• calpain 과 calpastatin 유전자는 한 근육으로부터 RT-PCR에 의하여 단리 동정하였다. 동정된 유전자는 이미 보고된 외국종과 비교하면 약 97%이상의 높은 상동성을 나타내었다.

• 한우체외수정란에 DNA 미세현미주입 후 난할율은 체외배발달 배양액에 따라 23.8 33.6%를 보였으나 상실배 및 배반포배 발달율이 극히 저조하였으나 L-ascorbic acid 와 α-tocopherol을 첨가 배양하여 좋은 성적을 얻을 수 있었다.

◎ Calpastatin antisense DNA가 주입된 난자의 발생과 생산

• 미세주입용 calpain과 calpastatin 유전자의 발현을 위해서는 metallothion 프로모터와 SV40의 poly A 시그날을 사용하였다.

• 발현확인을 위해서 사용한 유전자는 β-galactosidade 유전자로서 CMV 프로모터와 SV40의 poly A를 가지고 있으며 이 유전자를 발현시키고자하는 calpain과 calpastatin 발현벡터의 뒤쪽으로 연결함으로써 다른 프로모터에 의하여 발현할 수 있도록 하였다.

• 이러한 유전자를 미세주입하기전에 COS세포에 trasfection하여 정상적으로 유전자가 발현하는지를 X-gal staining 함으로써 확인하였다.

• 이들 유전자를 한우 전핵기 수정란에 미세주입하여 발현을 확인하였다. 전체 중 3.8%가 100%발현을 나타내었고 약 60%의 수정란에서는 모자이크현상으로 발현하였다. 그러므로 이러한 수정란을 이식하면 충분히 형질전환한우를 생산할 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

• 최근에는 복제방법에 의하여 형질전환 동물을 생산하고자 하는 연구가 진행되고 있다. 이러한 방법에 있어서도 현재 확보된 발현벡터를 이용하면 더욱 효과적으로 형질전환 동물을 생산 할 수 있을 것으로 기대된다.

2. 활용에 대한 건의

제1세부과제 : Calpain Proteolytic System 조절에 의한 고급 한우육 생산 기술개발

* 원래 최초의 계획에 비하연 연구비가 삭감됨으로서 실험동물 숫자가 줄어들어 효과적인 연구가 되지 못하였다.
* 연구비를 연도별 균등 분할하여 2,3,4년차에는 전년도의 실험동물 사양이 중복되어 어려움이 많았다.
* 근육단백 분해효소인 calpain system은 외국에서 많이 선호하고있는 내용으로 보다 더 많은 연구가 요구된다.
* 본 연구에서 밝혀진 사양기법을 토대로 국가지정 연구소를 통하여 농가에 보급하는 것이 바람직하다.

제2세부과제 : 한우 고급육 생산을위한 calpain DNA 및 근육세포 배양기술 개발

* 한우 근육위성세포 clone을 보유하고 있으므로, 한우 성장과 연관하여 연구소등에 보급하는 것이 바람직하다.
* 근섬유의 초미시적 구조를 근육연도와 연관시키는 연구가 더욱 요구된다.
* calpain DNA 염기서열을 이용하여 한우개량에 이용할 수 있을 것이다.

제3세부과제 : 미세현미주입기법으로 calpastatin as-DNA를 주입한 한우난자의 발생

- 한우체외수정란 생산율을 제고 할 수 있는 미성숙난포란의 체외성숙과 체외수정 체계 확립
- 한우체외수정란의 체외배양기술 확립 및 보급
- 미세현미주입된 한우수정란의 bank system 정립과 보급

SUMMARY

I. High quality Hanwoo meet production by the regulation of Calpain Proteolytic System

The objectives of this research was high quality beef production by the regulation of calpain proteolytic system. Experimental design was 3 treatments (long-term restricted feeding, LTFR; long-term restricted feeding and hormone treatment, LTFR-Ht; short-term non-restricted feeding, STFNR) and 3 sexes (bulls, steers, heifers). Thirty calves (5-6month old) was purchased from local farm and livestock market during 12 calves in 1996, each 9 calves during 1997 and 1998. Bulls (4-3 calves) was castrated by surgical method.

LTFR group was fed 96/4 - 97/10 (24month age), and LTFR-Ht group was fed 97/6 - 98/12 and was implanted sustained-release hormones, M-PO (progeste- rone + Oestradiol benzoate) for bulls and steers, and F-TO (Trenbolone acetate + Oestradiol benzoate) for heifers in year subcutaneously at before slaughter 6 month (18 month old), 4 month (20 month old), and 2 month (22 month old). Concentrate diet was fed based on programed restricted feeding methods. STFNR group was fed 98/7 - 99/8 (18 month age), and concentrate diet was fed ad libitum. All animals were slaughtered and meat quality was recorded by meat evaluator from slaughter house. Calpain and calpastatin activity was measured from loin and tenderloin (Wheeler and Koohmaraie, 1991). For drip loss and shear force measurement, 3 steaks were cutted from loin and tenderloin, vacum packaged, and then aged for 3, 9, 15, 21 days. Steaks were cooked in 75℃ water bath and 6 core was punchured (1.24cm DM) by the parallel to muscle fiber, and then sheared. Meat color was expressed the value of L* (lightness), a* (red-

green), b* (blue-yellow).

Animal growth rate was highest in bulls and subsequently steers and heifers. Average daily gain was 0.77 in bulls, 0.71 in steers, and 0.56 in heifers, LTFR group. the growth rate was linearly increased during feeding trial. In STFNR group, the slaughter weight was 490.7kg in bulls, 477.0kg in steers, and 439.2kg in heifers. The overall ADG was highest in STFNR (0.86), and then subsequently LTFR-Ht (0.77), LTFR (0.68). Therefore, high growth rate in bulls was enhanced protein accumulation and reduced protein degradation. However, growth rate was enhanced 8.3% in bulls, 7.7% in steers, and 23.2% heifers by hormone treatment.

Meat qualtity grade was C in bulls and B in steers although bulls have high growth rate. Back fat thickness was higher in heifers than in bulls and steers. However, longisissimus dorci was higher in bulls thann in steer and heifer. Also, meat quality grade was 2.8 in bulls, but steer has high grade as 1.4 in steers. Generally, low calpastatin activity was reducd shear forceand then enhanced meat tenderness. Also, low drip loss in steers may enhanced meat tenderness. Hunter color-L* was lower in bulls than in steer and heifers.

In conclusion, STFNR was not enough for high quality beef production and LTFR-Ht will produce high quality meat with high growth rate. Therefore, long-term restricted feeding with hormone treatment will be the best choice to farmers for high quality beef production.

II. Muscle satellite cell culture and microscopic muscle fiber examine for high quality hanwoo meat production

Muscle sample were collected from slaughtered experimental hanwoo. muscle satellite cells were cloned and cultured in vitro. Three medium (DME

/ F12, DMEM, McCoy's 5A) and three serum sources (FCS, CS, HS) were tested for optimum culture condition of muscle satellite cells. Cell proliferation was the highest in DMEM. The cell fusion was 32% in DMEM과 McCoy's 5A and was 21% in DME / F12. However, cell proliferation was more affected by different serum sources than in medium. Cell proliferation was the highest in FCS and 37.3% in CS and 10.2% in HS compare to FCS.

DNA transfection was made from cloned muscle satellite cells with pCMV βlac plasmid and liposome complex in DMEM + 10% FCS. Green color was appeared with gene transfection. The transfection ratio was low, it prove that the DNA was transfected and expressed in muscle satellite cells.

Vinculin and desmin were degraded by the increasing storage time in 4℃, which means that meat tenderness will be improved. Specific activity of cathepsin B was doubled in male than that in female, but cathepsin B+L activity was not different between male and female. Vinculin was detected in day 1 and day 1, however, the band was disappeared after day 3. Vinculin molecular weight was 90kD. Desmin was also degraded based on aging time and their molecular weight was 50kD. The molecular weights of calpastatin, calpain-I, and calpain-II were 71kD, 55kD, and 80, 50, 30kD, respectively.

Density of muscle fiber was very flaxible in long-term restriced feeding group. The length of sarcomere, muscle contraction unit, was extended about 45%. Muscle surface was relaxed in hormone treatment group. It may effect on muscle fiber relaxing due to vinculin and nebulin degradation. However, muscle fiber density was high by continuous connection among muscle fiber and sarcomere unit was not clear. Therefore, the muscle protein will be intact without degradation and very tough by high shear force.

Muscle total RNA was isolated by the method of Chomczynski and Sacchi (1987), mRNA was isolated using oliigo-dT cellulose and then purified (Sambrook et al., 1992). Several cDNA was amplified by RT-PCR. DNA sequence was used pGEM®-T Easy Vector System in ABI Prism 377 DNA

Sequencer. Two insert was sequenced, the one is 826bp, and the other was 1.6Kb. 826bp fragment was 100% homology of calpastatin DNA from NIH - NCBI, GenBank data. Also, other fragment was 85% homology of calpastatin from other species.

In conclusion, we identified calpain characteristics and relationship with muscle fiber. Muscle protein degradation during postmortem was directly connected with muscle tenderness and quality of meat.

III. Development of calpain antisense DNA microinjected hanwoo embryos

The purposes of this research is the production of hanwoo embryos derived from calpain antisense DNA microinjection to improve worsening livestock industry. This research was performed for 5 years and results were summarized as follows.

The Holstein oocytes classified as grade A and B were higher than korean native cattle. And the cumulus cell expantion rate of oocytes cultured in TCM-199 and Ham's F-10 medium supplemented with 10 % FCS and hormones were significantly($P<0.05$) higher(81.9 % 84.2 %) than non-treated groups(74.5 % 76.8 %). The fertilization and polyspermy rate of in vitro maturation oocytes, cultured in TCM-199 and Ham's F-10 medium supplemented with 10 % FCS, 1 % BSA and 10 % bFF were 53.8 % 55.0 %, 51.4 % 52.6 %, 47.0 % 50.0 % and 13.6 % 14.2 %, 10.0 % 11.1 %, 10.0 % respectively. The FSH-LH treatment was the highest fertilization and poly-spermy rate in medium containing of PMSG-HCG. The fertilization and male pronuclear formation rate of follicular oocytes, fertilized with capacitated spermatozoas by heparin and bFF methods were 70.9 %, 66.2 % and 48.8 %, 50.0 % respectively. And the fertilization and male pronuclear formation rate were higher method of heparin than other methods.

In the experiment to increase in survival rate of hanwoo immature oocytes and embryos, the best cryoprotectant was ethylene glycol. Futhermore, the addition of ficoll and sucrose to ethylene glycol(EFS40) showed higher efficiency than that to use ethylene glycol only.

When the in vitro fertilized oocytes were co-cultured with cumulus cells, the development rate to be morula and blastocyst was 22.7 % and the rates were higher than of without cumulus cells, 7.8 %($P<0.05$).

The embryos developed rate to morula and blastocyste stages in TCM-199, Ham's F-10, CR1aa and m-SOF medium containing 10 % FCS were 20.0 %, 17.8 %, 23.1 %, and 23.6 %. The embryos developed rate of oocytes cultured in CR1aa and m-SOF were higher than those of oocytes cultured in TCM-199 and Ham's F-10. The embryos developed from IVM, IVF were cultured in different culture medium with 20 %, 10 % FCS or 0.4 %, 1 % BSA in CR1aa and m-SOF. The higher developmental rates of IVM, IVF embryos developed beyond morula and blastocyte stages were obtained in cultuer medium with 20 % FCS group(22.9 % 22.9 %) than those of 10 % FCS group(15.4 % 17.1 %), 1 % BSA group(16.7 % 20.0 %) and 0.4 % BSA group(14.3 % 15.2 %, $P<0.05$). The cleavage rate of fertilized oocytes in CR1aa containing α-tocopherol, L-ascorbic, cysteamine and selenium were no significantly control group. However the fertilized oocytes were cultured for 168 hrs in culture medium with 2.5 μM α-tocopherol, the morulae and blastocyst rate were significantly higher than control group($P<0.05$). When the oocytes were cultured with L-ascorbic acid, the 4cell development rate were 46.7% 53.7%. The morulae rate were no significantly and the blastocysts rate were significantly higher than control group($P<0.05$). When the oocytes were cultured with 100 μM cysteamine, the 4cell development rate were significantly higher(50.0% 61.8%) than control group(50.0%, $P<0.05$). Morulae and blastocyst rate were higher than control group. The blastocysts development rate of oocytes cultured with 400 μM selenium were

9.4%. There were significantly higher than control group(3.3%, $P<0.05$). Addition of 2.5 μM α-tocopherol, 50 μM L-ascorbic acid, 100 μM cysteamine and 400 μM selenium to the culture medium increase the incidence of embryos developed to the morulae and blastocyst.

The percentage of DNA injected embryos reaching to the morula and blastocyst were slightly lower than those of control embryos. As the result of X-gal staning, the proportion of positive embryos was 55.6 -2% in morulae and blastocyst stage embryos. However, mosaicism has been observed in the most putative transgenic morulae and blastocyst.

These results indicated that the in vitro maturation and culture medium supplemented with hormones, serum and anti-oxidant can increase the proportion of maturation, fertilization and developed into morula and blastocysts stage embryos. And improved IVM/IVF system and culture condition increased the embro viability and expression of a microinjected transgene. By this research, we established the mass production of IVM/IVF hanwoo embryos after calpain DNA microinjection and this result make possible development of hanwoo industry.

CONTENTS

목 차

제2장 Calpain Proteolytic System 조절에 의한 고급 한우육 생산기술개발

제1절 : 실험 재료 및 방법

1. 시험우 입식 및 사육

Table 1. Experimental design for Hanwoo feeding trial.

년 도	1996년	1997년	1998년
총 두 수	12마리	9 마리	9마리
처 리	정상성장군(24개월)	BAA처리군(24개월)	속성성장군(18개월)
성 별	♂ ♀ 거세	♂ ♀ 거세	♂ ♀ 거세
두 수	4 4 4	3 3 3	3 3 3
참 고 사 항	노란색이표	붉은색이표	초록색이표

상기 Table 1의 시험우 구입 및 사양계획에 의해 1996년, 1997년, 19998년에 생후 5-6 개월령 송아지 수컷 6-8 마리 및 암컷 3-4 마리를 근교 농장과 우시장에서 구입하여 입식하여 1주간의 적응기간 후 ♂3-4마리는 외과적 방법에 의해 거세 후 시험구에 배치 완료하였다. 시험구 배치시 각 처리구마다 황, 적, 록색의 이표를 장착하였다.

예방접종은 소전염성 비기관염 및 바이러스 하리증, 우액, 탄저, 기종저 등을 예방프로그램에 의해 실시했으며, 구충은 봄, 가을 (3, 9월)에 내.외부 구제 프로그램에 의해 입식 직후 적응기간에 실시하였다.

Table 2. Diet feeding standard at different growth stage.

구 분			육 성 기		비 육 기	
			전 기 이유-5개월령	후 기 6-12개월령	전 기 (13-18개월령)	후 기 (18-24월령)
영 양 수 준		C P(%)	18-19	14-16	11-12	10-11
		TDN	70	68-70	71-72	72-73
급여기준 체중 비 (%)	배 합 사 료		2.0-2.5	1.2-1.5	1.7-1.8	1.8-2.0
	조 사 료	생 초	3.0-5.0	6.8-8.0	3.0-5.0	-
		싸일리지	2.5-4.0	5.0-6.0	2.5-4.0	-
		목 건 초	1.0-1.2	1.2-1.5	1.0-1.2	0.5-0.8
		볏 짚	0.8-1.0	1.1-1.5	0.7-1.1	0.4-0.6

Table 3. Monthly feeding pattern for experimental animals

(calf/day: kg as-fed bases)

Age(Month)	Stage	Concentrate	Rice Straw	Alfalfa Cube
5	Early Calf	3.0	ad lib	0.3
6	Middle Calf	3.2	ad lib	0.5
7		3.6	ad lib	0.6
8		4.0	ad lib	0.6
9		4.2	ad lib	1.0
10		4.5	ad lib	1.0
11		5.0	ad lib	1.0
12		5.5	ad lib	1.0
13	Early Fattening	6.0	ad lib	
14		7.5	ad lib	
15		7.5	ad lib	
16		8.0(7.5)	ad lib	
17	Late Fattening	10(8.0)	ad lib	
18		10(8.0)	ad lib	
19		11(8.5)	ad lib	
20		11(8.5)	ad lib	
21		ad lib	ad lib	
22		ad lib	ad lib	
23		ad lib	ad lib	
24		ad lib	ad lib	

* ( )은 암컷 급여량

Table 2, 3 의 성장 단계별 사료급여 기준에 의해 시판 비육용 중송아지 배합사료(농후사료), 볏짚 및 알팔파 큐브를 공급해 주는데, 급여방법은 농후사료는 1일 공급량을 주간에 3회로 나누어서, 알팔파 큐브는 1회 농후사료 급여 후 1일 공급량 전량을, 볏짚과 미네랄 블럭은 항시 필요시 섭취 가능토록 무제한급이 방식으로 급여하였다.

Table 4. Feed consumption of experimental animals (Calf / day : kg)

Age (m)	3			4			5			6			7			8			9		
Sex	C	♂	♀	C	♂	♀	C	♂	♀	C	♂	♀	C	♂	♀	C	♂	♀	C	♂	♀
Diet	3.0	3.0	2.7	3.0	3.0	3.0	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.0	4.2	4.2	4.2	4.5	4.5	4.5	5	5	5
Alfalfa	-	-	-	1.0	1.0	1.0	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Rice Straw	1.1	1.2	1.0	1.9	1.9	0.8	2.2	2.6	1.6	3.3	3.3	2.9	3.6	3.6	3.2	3.7	3.8	3.4	4.1	4.1	3.7

Table 4 에서와 같이 3월부터 9월까지 각 성장시기별 Table 3 의 급여 기준표와 유사하게 농후사료 및 조사료를 섭취했으며 다만 양질의 목건초라고 할 수 있는 알팔파 큐브를 요구수준 이상으로(체중의 0.5 %) 섭취시켰는데 이는 육성기에 양질의 조사료를 급여함으로서 소화장기를 발육시키고자 하는 시험목적을 달성키 위해 취한 조치였다. 한편으로 볏짚은 무제한 급여를 실시하였음에도 Table 2 의 성장기별 수준과 거의 일치하였는데 이는 농후사료를 제한급여하고 있는 사육방법을 생각해 보면 쉽게 이해 할 수 있는 현상이다. 전반적으로 시험기간 중 사료섭취수준은 고급육 생산을 위해 정상성장을 유도하기 위한 예상 수준과 거의 일치하고 있다고 볼 수 있다.

2. 급여사료

매월 체중 측정시 시험축에 급여한 농후사료 및 조사료의 내용을 시료 채취부에 기록 후 시료채취 용기에 담아 라벨링하여 실험실로 운반하여 AOAC (2) 및 Georing 과 VanSoest(3) 방법에 의해 분석한 사료의 분석치와 농후사료의 배합표는 Table 5 와 같다. 어린 송아지와 중송아지 농후사료내 단백질(%), NEm (Mcal/kg) 및 NEg (Mcal/kg)의 함량은 각각 18.05, 1.102, 1.667 및 14.05, 1.600, 1.037이었고 칼슘과 인의 함량(%) 역시 0.80, 0.57 및 1.07, 0.57로서 각각 이시기

에 급여한 알팔파 Cube 및 볏짚과 함께 급여 할 경우 한우의 표준 영양소 요구량에 규정된(4) 에너지, 단백질, 칼슘, 인의 요구량을 공히 충족시켜 줄 수 있는 사료들이었으므로 고급육 생산을 위한 정상성장을 유도하는데 매우 적절한 사료였다고 생각된다. [표 7]에서는 시험기간중 급여한 조사료 영양소 함량이 표시되어 있는데 알팔파 큐브의 조단백질, 중성세제섬유소, 산세제섬유소의 함량(%)이 각각 15.00, 50.00, 37.00으로 중등정도 등급정도의 알팔파로서 육성기 조사료원으로서 적당했으며 볏짚 역시 각 성분함량에 나타난 바와 같이 우리나라에서 생산되는 전형적인 영양소 함량을 나타내고 있었으며 실제 급여시에 기호성도 적당한 편이었다고 생각된다.

Table 5. Chemical composition and nutrient contents of fed diet

(as-fed bases, %)

Composition	Concentrate				Roughage	
	Early Calf	Middle Calf	Early Fattening	Late Fattening	Rice Straw	Alfalfa Cube
Water	11.70	11.84	11.95	12.36	9.01	14.35
C. Protein	18.05	14.05	12.34	10.99	4.50	15.19
C. Fat	2.95	2.69	2.65	3.14	2.18	2.79
C. Fiber	5.91	5.32	4.58	3.37	28.10	22.22
C. Ash	6.12	8.64	6.78	6.73	15.10	8.17
Ca	0.79	1.07	1.02	0.81	0.24	2.64
P	0.56	0.57	0.53	0.41	0.13	0.32
NEm*	1.67	1.60	1.62	1.69	0.51	1.09
NEg*	1.10	1.04	10.51	11.09	0.17	0.54

제2절 : 결과 및 고찰

1. 시험우 사양성적

가. 정상성장군 (LTFR)

시험우 성장 성적은 Fig 1 과 Table 6 에서와 같다. 전반적으로 동일 월령에 숫소, 거세우, 암소의 순서로 체중의 차이가 발생하고 있으며 3월부터 9월까지의 사양기간 중 체중은 대체로 고급육 생산을 위한 한우표준체중(1)과 거의 일치하여 11 개월령인 9월 체중이 거세우, 숫소, 암소의 순으로 각각 271.8, 275.6, 246.2 kg을 나타내고 있다. 다만 시험개시시인 3 - 4월의 일일 증체량이 육성기간중의 목표치인 1일 700g보다 훨씬 상회했던 이유는 겨울철 입식 스트레스를 극복시키기 위해 높은 영양소를 급여했기 떠문이며 그 이후는 평균 1일 600 - 700g을 유지하였다. 또한 5 - 6월 숫소와 7 - 8월 거세우와 암소의 증체율이 매우 낮은 이유는 전자는 체중측정오차에 의한 것으로 판명되었으며 후자는 혹서기 기온 및 유해충에 의한 스트레스로 생각된다. 혹서기의 저조한 증체량에도 불구하고 사료의 섭취량이 감소하지 않은 이유는 육성기 사육이 완전히 끝난 후 이에 대한 고찰이 이루어졌기 때문이라 생각된다.

Table 6 에서와 같이 평균 증체량은 거세우 0.71, 숫컷 0.77, 암컷 0.56으로서 정상적인 성장을 유지하고 하였다. 그러나 여름철인 22월령에는 성장이 거의 중단하였으나 그 이후에 정상성장으로 회복하였다. 암컷은 발정으로 인하여 성장률이 감소하였다. 일반 농가에서는 이러한 경우 일반적으로 수태를 시키고 2-3 산차에 출하하는 것이 보통이다. 본 시험기간 중 시험우의 증체량은 전반적으로 고급육 생산을 위한 체중증가 목표와 거의 일치하고 있다.

거세는 일반적으로 비육우를 길들이기 쉽게하고 많은 개체를 용이하게 관리하기 위하여 전세계적으로 많이 시행되고 있다. 거세방법은 무혈거세 방법(Burdizzo) 과 외과적 수술법이 이용되고 있다. 일반적으로 농가에서 성장한 송아지들은 2-3 개월령에 거세를 실시하고, 우시장에서 구입한 송아지는 3-4 개월령에 거세를 한다. 많은 연구보고들에 의하면 수소는 거세우에 비하여 보다 빨리

성장하고 보다 효율적으로 지방이 적은 고급육을 생산한다 (Hedrick, 1968; Field, 1971; Seideman 등, 1982). 수소는 거세우에 비하여 성장률이 빠르고 사료효율이 높은 편이다 (Arth명 등, 1969; Bidart 등, 1977; Field, 1971). 또한 수소는 거세우에 비하여 지육율은 높지만 풍미기호 특성이 약간 낮게 평가되고 있다 (Jacobs 등, 1977). 또한 거세에 의하여 상강도나 고기의 조직감이 높게 나타난다. 양축가들은 거세에 의하여 비육우 성장률이 전체적으로 10-15% 정도 감소하기 때문에 거세를 기피하고있는 실정이다. 그러나 이러한 손실은 사료소비량이 감소하고 고급육을 생산하여 높은 가격에 판매할 수 있으므로 보상될 것이다.

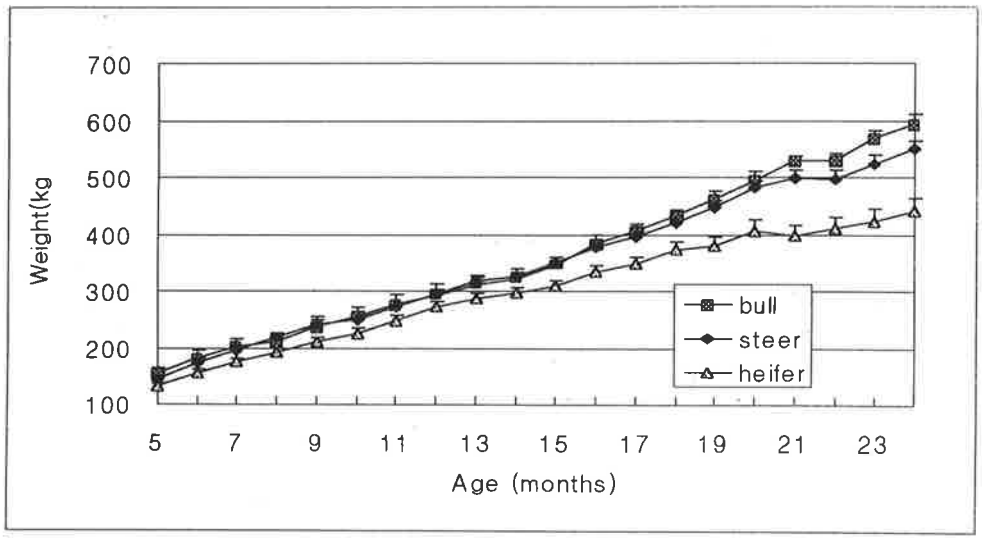


Fig. 1. BW gain during 24 month feeding in long-term restricted feeding (LTFR) of Korean cattle

Table 6. BW gain during 24 month feeding in long-term restricted feeding (LTFR) of Korean cattle

Age (Month)	Bulls			Steers			Heifers		
	BW	BW change	ADG	BW	BW change	ADG	BW	BW change	ADG
5	152.8			143.8			130.4		
6	180.0	27.2	0.91	171.6	27.8	0.93	154.4	24.0	0.80
7	200.6	20.6	0.69	195.2	23.6	0.79	173.8	19.4	0.65
8	209.2	8.6	0.29	217.8	22.6	0.75	190.4	16.6	0.55
9	237.0	27.8	0.93	239.4	21.6	0.72	210.0	19.6	0.65
10	254.0	17.0	0.57	248.8	9.4	0.31	224.6	14.6	0.49
11	275.6	21.6	0.72	271.8	23.0	0.77	246.2	21.6	0.72
12	292.0	16.4	0.55	294.0	22.2	0.74	270.4	24.2	0.81
13	309.4	17.4	0.58	315.6	21.6	0.72	285.8	15.4	0.51
14	321.0	11.6	0.39	324.2	8.6	0.29	295.8	10.0	0.33
15	344.8	23.8	0.79	350.4	26.2	0.87	308.1	12.3	0.41
16	383.4	38.6	1.29	375.4	25.0	0.83	332.0	23.9	0.80
17	405.0	21.6	0.72	394.4	19.0	0.63	346.8	14.8	0.49
18	431.0	26.0	0.87	420.4	26.0	0.87	372.4	25.6	0.85
19	461.8	30.8	1.03	445.8	25.4	0.85	378.2	5.8	0.19
20	494.8	33.0	1.10	481.2	35.4	1.18	405.4	27.2	0.91
21	528.0	33.2	1.11	498.2	17.0	0.57	420.4	15.0	0.50
22	529.0	1.0	0.03	496.3	- 1.9	- 0.06	430.4	10.0	0.33
23	567.6	38.6	1.29	523.2	26.9	0.90	442.4	12.0	0.40
24	593.4	25.8	0.86	548.8	25.6	0.85	452.4	10.0	0.33
Avg			0.77			0.71			0.56

나. 호르몬 처리구

호르몬 처리구는 24개월 장기사양에서 호르몬제를 이식하여 육질의 변화를 보는 연구이다. 97년 10월에 한우 송아지를 입식하여 99년 6월 24 **개월령으로 사양시험이 종결되었다** (Fig. 2 **와** Table 7). **성장 단계별 사료급여 기준에 의해 시판 비육용 중송아지 배합사료(농후사료), 볏짚 및 알팔파 튜브를 공급해 주는데, 급여방법은 농후사료는 1일 공급양을 주간에 3회로 나누어서, 알팔파 큐브는 1회 농후사료 급여 후 1일 공급량 전량을, 볏짚과 미네랄 블럭은 항시필요시 섭취가능토록 무제한급이 방식으로 급여하였다.**

호르몬은 서방형 제제로서 도축 6 (18**개월령**), 4 (20**개월령**), 2 (22**개월령**) **개월 이전에 귀의 피하조직에 이식하였다.** 수소와 거세우는 M-PO (progesterone

200mg/dose, Oestradiol benzoate 20mg/dose)를, 미경산우는 F-TO (Trenbolone acetate 200mg/dose, Oestradiol benzoate 20mg/dose) (Upjohn, USA)를 이식하였다.

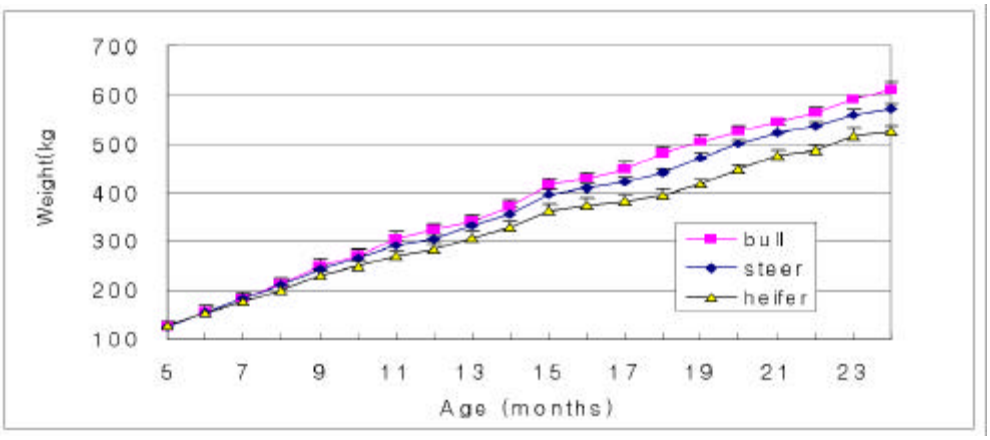


Fig. 2. BW gain of LTFR-tH of Korean cattle treated hormone (n=30)

Table 7. BW gain of LTFR-tH of Korean cattle treated hormone (n=30)

Sex / Age(M)	Bulls	Steers	Heifers
4	110.7	110.8	112.6
5	124.9	126.4	126.8
6	156.4	155.3	152.8
7	183.7	182.8	176.6
8	213.6	211.9	201.3
9	250.5	242.8	229.9
10	271.5	266.2	249.4
11	304.4	292.5	270.5
12	323.9	304.8	284.5
13	341.6	333.5	307.9
14	371.4	356.3	329.2
15	415.1	396.1	361.9
16	427.9	409.3	373.8
17	448.7	422.4	382.8
18	480.1	441.9	393.8
19	504.4	471.1	417.2
20	525.2	498.3	447.8
21	543.5	523.3	475.0
22	563.5	534.6	487.5
23	590.2.	558.8	516.2
24	610.8	572.9	525.4

다. 속성성장군

속성성장군 (제3차년도) 에는 지금까지 일반농가에서 사용되어져온 18개월 속성사양으로 한우를 사육하였을 때 성별 증체량, 육량 및 육질등 의 변화를 보는 연구이다. 98년 7월에 한우 송아지를 입식하여 99년 8월 18 개월령에 출하할 목표로 한우를 사양하였다. 사료급여는 무제한 급여 방식으로 급여하였다.

동물의 성장률은 16개월령까지 유의적으로 성장하다가 그 이후에는 성장률이 감소하였다. 최종 출하체중은 수소 490.7kg, 거세우 477.0kg, 미경산우는 439.2kg 이였다. 도체중은 수소와 암소에서 단지 50kg 이였고, 거세우 와는 단지 10kg 이였다. 그러나 개체간 변이가 크게 나타났다.

일반적으로 가축사료의 영양소함량은 육생산성과 밀접한 관계가 있다. 영양소 수준에 따라 근내 지방도는 증가하고, 근육과 뼈의 발달이 좋아진다 (Guenther 등, 1968). 특히 비육우에서 단백질 수준보다는 에너지수준이 성장률 개선효과와 사료효율이 높아진다 (Prior 등, 1977). 그러나 우사 사육 비육우의 사료효율은 사료 급여량을 조절함으로서 개선될 수 있다. 사료급여량을 제한하는 방법은 여러 가지가 있다. 대부분의 연구들에서 보면 일정량의 사료를 특정한 비육군에 급여하고 있다 (Plegge 등, 1985; Hanke 등, 1986; Wagner, 1987; Glimp 등, 1989). 계획 사양 프로그램이란 조제된 사료의 급여량을 제한하고, 출하 때까지 일당증체량을 일정하게 유지시키는 것이다 (Zinn, 1987).

제한급여는 비육우에 고에너지 사료를 급여하였을 때 사료효율을 개선시킬 수 있다 (Old 와 Garrett, 1987; Hicks 등, 1990). Zinn (1986) 의 연구에 의하면 거세우에서 무제한 급여의 94%로 사료량을 제한하여도 일당증체량은 무제한 급여 비육우와 유사하게 나타났다. 그러나, 사료 회전율은 (사료효율) 무제한 급여 비육우보다 제한급여 비육우에서 4.6% 개선효과를 보였다. 이러한 결과는 양에서도 유사하게 보고되었다 (Glim 등, 1989).

이상의 실험결과를 처리구간 비교하여보면 일당증체량은 속성성장군에서 0.86으로 유의적으로 높았으며, 호르몬처리구 (0.77) 와 정상성장군 (0.68) 사이에는 유의차가 나타나지 않았지만 호르몬 처리구에서 높은 성장률을 보였다. 본 연구결과에 의하면 수소는 거세우나 미경산우에서 보다는 근육 단백질 축적량이 증가하고 단백질 분해량은 감소한 결과이다. 그러나, 호르몬 처리에 의하여 체중이

수소 (8.3%), 거세우 (7.7%), 미경산우 (23.2%) 증가하였다.

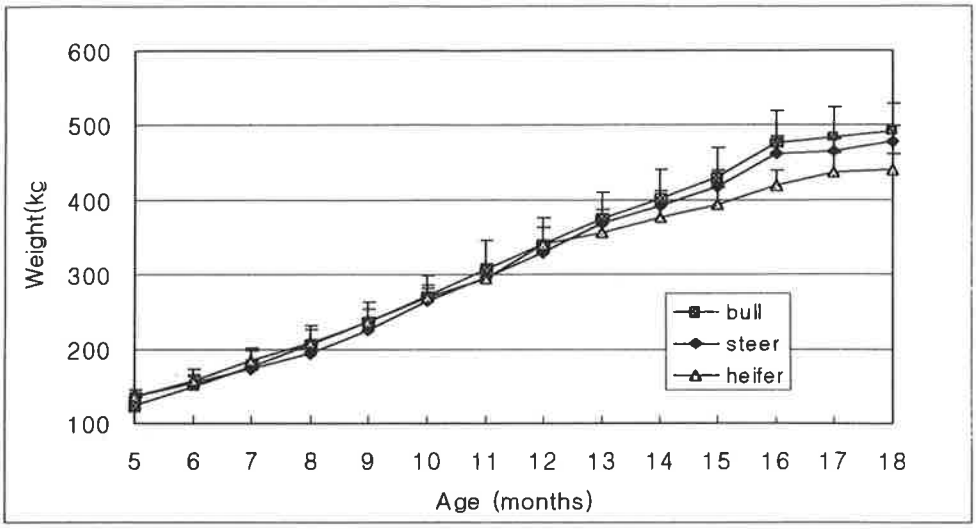


Fig. 3. Body weight gain of short-term feeding (STFNR) of Korean cattle

Table 8. Body weight gain of short-term feeding (STFNR) of Korean cattle

	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Bulls	124.0	149.0	176.3	206.0	235.0	269.7	306.7	340.0	374.3	401.7	429.0	475.0	483.3	490.7
Steers	136.5	153.8	172.5	193.8	225.3	264.3	295.0	328.0	368.3	391.3	417.5	461.0	465.0	477.0
Heifer	136.8	157.0	184.0	207.3	235.7	268.7	293.3	340.0	355.0	375.7	393.7	418.3	436.0	439.2

본 연구를 통하여 볼 때 지방이 침착되는 비육 정령기를 도출할 수 있다. 수소가 거세우에 비하여 성장속도가 빠르지만, 육량등급은 수소가 대부분 C 등급인데 반하여 거세우는 B 등급이 많은 편이다 (Cho 등, 1995). 거세는 육성기와 비육전기에 성장률이 낮은 편이다. 또한 거세에 의하여 체지방 침착은 많은 편이지만 지육율은 낮다 (hONG 등, 1996). 그러나, 거세에 의한 종합적인 이득을 결정하기는 어렵지만 근육단백 분해효소 활성, 근섬유 분포도, 육의 연화도, 근섬유 단백질 회전율 등과 연관하여 생각하면 충분한 이득이 될 것이다.

Table 9. Comparison of ADG among treatments and sexes (kg/d, LS mean)

	Treatment			Sex		
	LTFR	LTFR-tH	STFNR	Bull	Steer	Heifer
ADG	0.68b	0.77b	0.86a	0.85a	0.79b	0.67b

LTFR: long-term feeding by restricted supply of diets
LTFR-tH: long-term feeding by restricted diets with hormone treatment.
STFNR: short-term feeding by *ad libitum* of diets.
a,bMeans in the same row with a common superscript do not differ ($P<0.05$).

Fig 4. Experimental animals. feeding trial (top), weighing and blood sampling (middle), and anabolic implant in ear.

2. 도체성적

정상성장군은 (제1차년도) 96년 4월경에 한우 송아지를 입식하여 연구 프로그램에따라 비육을 시작하여 24개월령인 97년말 나주축협 공판장에서 도축하였다. 도축 후 24시간 동안 냉장온도 (2℃±2℃)에서 냉장한후, Carcass yield와 도체등급은 등급사에 의하여 평가되었다. 반도체의 한쪽은 각 부위별 육량 평가를 위하여 완전히 발골 하였다. 육량지수는 다음 수식에 의하여 계산하였다.

MQD = 65.834 - (0.393 x BFT) + (0.088 x LA) - (0.008 x CW)

[MQD(meat quantity index), BFT(back fat thickness), LA(longissimus area, cm2), CW(carcass weight, kg)]

도체성적은 Table 10 과 Table 11 에 나타나있다. 생체중은 수소가 평균 50kg 높게 나타났고, 지방은 수소에서 30kg 이었으나 거세우에서 47kg으로서 높았다. 그러나 다른 부위는 비율에 따라 계산하면 차이를 나타내지 않았다.

미경산우는 수소나 거세우에 비하여 등지방 두께가 높았다. 그러나 배최장근과 육량지수는 거세우나 미경산우에 비하여 수소에서 높았다 (Table 1). 다른 도체분석과 육질등급은 은 차이를 보이지 않았다. 등지방 두께는 미경산우에서 수소보다 4배정도 높았다. 이러한 결과로 미루어볼 때 18개월 사양은 설상도를 높이기는 미흡하다는 결론이다. 그리하여 수소의 육질등급은 유의적으로 감소하였다. 반면에 육질등급은 수소에서 여전히 높았다. 부분육은 처리간에 별다른 차이를 보이지 않았다(Table 2). 수소에서는 앞다리, 사태육이 수소에서 거세우나 미경산우 보다 높았다. 그러나 지방함량은 반대로 수소에서 높게 나타났다.

도체 등급의 결과는 Table 12 와 Table 13 에 나타나있다. 육량등급에서 수소는 1.4 이고, 거세우는 2.0 으로서 수소에서 근육량이 많았다. 이는 도체중이 높은 수소에서 나타나는 결과로 여겨진다. 또한 육질등급에서 수소는 2.8로서 대부분 3등급이었으나, 거세우 에서는 평균 1.4로서 1-2등급의 분포를 보여 육질이 현저히 상승되었다.

제한급여는 거세우에서 배최장근의 수분함량을 증가시키지만 지방함량은 감소시킨다 (한 등, 1996). 또한 제한급여에 의하여 등심과 안심의 비율은 증가하지

만 다른 부분은 변화가 없다. 본 연구를 통하여 결론지으면 영국종 이나 Bos indicus 보다 한우를 비롯한 유럽종 비육우인 Bos taurus에서 지육율이 높았다. 또한 성별에 따라 도체성분이 다르게 나타났다 (Garrett 와 Hinman, 1971; Knapp 등, 1989; Griffin 등, 1992). 비록 비육우 품종이나 성별에 따라 도체성분이 다르게 나타날 지라도, 현재 소비자들이 원하는 고급육인 high marbling 이나 지방이적은 육고기를 생산하기 위하여 본연구가 크게 기여할 것으로 사료된다.

Table 10. Carcass trait of bulls, steers and heifer in different feeding program of Korean cattle (n=5, kg)

Items	LTFR			STFNR		
	Bull	Steer	Siga	Bull	Steer	Heifer
Body wt	608.4±21.5	556.0±17.7	NS	556.7±41.1	548.3±24.6	500.0±35.1
Dressed wt	360.0±9.5	330.0±5.9	*	322.3±25.7	323.3±19.3	295.0±18.7
Tenderloin	8.1±0.2	8.2±0.6	NS	5.2±0.4	5.2±0.4	5.1±0.5
Loin	39.2±4.0	34.9±1.9	NS	37.7±3.5	34.1±1.6	29.3±1.1
Sirloin	7.8±0.1	8.2±0.2	NS	7.9±0.2	6.6±0.5	7.0±.1
Rump	22.6±0.6	19.3±0.6	**	17.9±1.3	17.4±1.5	16.4±1.1
Round	36.6±0.8	32.6±1.2	*	30.6±2.08	31.8±3.2	26.6±1.4
Foreleg	26.7±1.1	21.8±0.6	**	22.4a±1.3	20.5ab±1.51	16.4b±1.1
Chuck	23.1±2.3	11.7±1.5	**	13.6±2.1	7.7ab±0.8	7.2b±0.9
Brisket	43.7±1.4	36.1±1.4	**	34.1±4.0	34.4±2.5	27.8±2.2
Shank	16.0±0.2	14.8±0.5	NS	15.7±0.9	14.3±0.9	12.4±0.9
Whole Ribs	46.9±1.3	46.5±1.5	NS	43.5±4.5	47.8±3.2	45.3±2.7
Lean Carcs	262.3±13.8	234.2±4.7	NS	223.5±17.8	219.7±14.7	193.5±8.2
Fat	30.3±2.9	46.9±2.4	**	43.4a±0.5	40.4a±1.1	32.7b±1.9
Bone	46.4±0.6	41.3±1.0	**	47.4±8.4	60.5±13.5	66.1±10.8
By-product	76.7±2.6	88.2±2.4	*	90.8±8.3	100.9±13.4	98.8±12.1

aSig=significance. Means in a row marked with an asterisk differ (*P<.05, **P<.01, ***P<.001). short-term feeding (kg, n=9).

Table 11. Comparison of carcass trait among treatments and sexes (kg, LS mean)

Items	Treatment		Sex		
	LTFR	STFNR	Bull	Steer	Heifer
Body weight	564.7	535.0	585.3	549.4	514.9
Dressing weight	335.7	313.6	343.1	324.7	306.1
Tenderloin	8.2a	5.2b	6.7	6.7	6.6
Loin	34.8	33.7	38.5	34.5	29.9
Sirloin	7.9a	7.1b	7.7	7.5	7.4
Rump	20.6a	17.2b	20.5a	18.2b	18.1b
Round	33.1	29.7	34.0a	31.9ab	28.3b
Foreleg	22.6a	19.8b	24.8a	30.0b	17.9b
Chuck	16.3	9.5b	18.7a	9.4b	10.6b
Brisket	37.7a	32.1b	39.4a	34.8ab	30.6b
Shank	14.5	14.1	15.8a	14.5a	12.6b
Whole Ribs	46.6	45.5	45.5	46.9	45.9
Lean Carcass	238.8a	212.2b	244.3	225.4	206.8
Fat	35.6	38.9	35.6a	44.9b	31.1a
Bone	47.9	58.0	48.0	49.8	70.0

a,bMeans in the same row with a common superscript do not differ ($P < 0.05$). Beef cuts data for LTFR-tH of was not taken because of experimental conditions.

Table 12. Carcass grade of bulls, steers and heifers at three different feeding pattern in Hanwoo

Items	LTFR			LTFR-tH			STFNR		
	Bull	Steer	Siga	Bull	Steer	Heifer	Bull	Steer	Heifer
BFT (mm)	2.4±0.2	7.8±0.8	***	4.9b±0.6	13.7a±1.6	15.1a±1.2	4.5b±0.9	8.0ab±1.0	14.7a±2.6
LMA(cm2)	82.2±2.3	81.8±2.0	NS	86.4±2.2	85.7±2.1	90.6±2.81	88.7a±2.9	72.7b±4.5	85.7ab±2.6
CW (kg)	360±9.5	330±6.0	*	375a±7.2	345ab±7.0	331b±12.2	322±25.7	323±19.3	295±18.7
Yield index	77.0±0.2	76.3±0.1	**	70.5a±0.2	67.2b±0.7	67.2b±0.6	71.2a±0.3	68.5ab±0.6	67.25b±1.3
MQGc	1.4±0.2	2.0±0.0	*	1.0b±0.0	2.0a±0.2	2.1a±0.3	1.0±0.0	1.3±0.3	2.0±0.6
IMTd	1.2±0.2	3.8±0.4	***	1.1b±0.1	5.0a±0.3	5.0a±0.5	1.3±0.3	3.3±1.2	3.0±1.0
Meat colore	4.8±0.2	4.4±0.2	NS	4.9a±0.1	4.0b±0.0	4.9a±0.2	4.3±0.3	3.3±0.3	4.0±0.6
Fat colorf	2.0±0.0	2.4±0.2	NS	2.8±0.1	2.9±0.1	3.3±0.3	2.3±0.3	2.7±0.3	3.0±0.0
Textureg	2.0±0.0	1.4±0.2	*	2.0a±0.0	1.0c±0.0	1.6b±0.2	2.0±0.0	1.3±0.3	1.3±0.3
Maturityh	1.0±0.0	1.0±0.0	NS	1.3±0.2	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0
MQSi	3.8±0.2	2.4±0.2	**	2.9a±0.1	1.6b±0.2	1.7b±0.2	3.7±0.3	2.7±0.7	2.7±0.7

BFT (Back fat thickness), LMA (Iongissimus muscle area) CW (Carcass wt)
LTFR (n=5), LTFR-tH (n=10), STFNR (n=3).
a,bMeans in the same row with a common superscript do not differ (P<0.05).
c MQG (Meat quantity grade) : A, B, C, and D grade = each 1, 2, 3, and 4.
d IMT (Intramuscle fat) : 1 (devoid) → 7 (very good)
e Meat color : 1 (scarlet) → 7 (dark red)
f Fat color : 1 (white) → 7 (yellow)
g Texture : 1 (good), 2 (standard), 3 (bad)
h Maturity : 1 (less 3 years old), 2 (3-5 years old), 3 (more 5 years old)
I MQS (Meat quality score) : 1+, 1, 2, 3, and D grade = each 1, 2, 3, 4, 5

Table 13. Comparison of meat grade among treatments and sexes (LS mean)

Items	Treatment			Sex		
	LTFR	LTFR-tH	STFNR	Bull	Steer	Heifer
Back fat thick(mm)	7.2a	11.3ab	9.1b	3.6a	10.5b	13.5c
Longissimus area(cm2)	83.5	87.6	82.3	84.5ab	81.4b	87.6a
Carcass wt. (kg)	335.5ab	350.5a	313.6b	355.1a	330.2b	314.3b
Yield index	76.0a	68.3b	69.0b	73.0a	70.5b	69.8b
Meat quantity gradec	1.9	1.7	1.4	1.1b	1.9a	2.1a
Intramuscle fatd	3.0ab	3.7a	2.6b	0.9b	4.2a	4.2a
Meat colore	4.7a	4.6a	3.9b	4.7a	3.9b	4.7a
Fat colorf	2.4b	3.0a	2.7ab	2.4b	2.6ab	3.0a
Textureg	1.7	1.5	1.6	.2.0a	1.2c	1.6b
Maturityh	1.0	1.1	1.0	1.1a	1.0b	0.9b
Meat quality gradei	2.9a	2.1b	3.0a	3.5a	2.2b	2.3b

3. Calpain 활성도

Calpain 과 calpastatin의 활성도는 Wheeler 와 Koohmaraie (1991)의 방법에 의하여 측정하였다. 근육 시료는 도축후 1시간 이내에 등심 (Longissimus dorsi) 와 안심 (Psoas major) 근육을 채취하여

도축직후 체취한 등심과 안심의 근육시료에서 calpastatin과 calpain의 활성도를 측정하였다 (Table 14, table 15). 전반적으로 calpastatin과 calpain의 활성도가 숫소에서 높게 나타나고 있으나 1993년 Morgan 등의 연구논문에서와 같이 수소에서 calpastatin의 활성도가 calpain의 활성도에 비해 두드러지게 증가하였음을 알 수 있다. 이는 Table 18 과 Table 19의 육의 저장시간별 전단력을 측정한 결과와 비교해 볼 때 한우에서 거세로 인한 calpastatin의 활성도를 저하가 결국 전단력을 감소시켜 육질의 연도향상을 가져왔다고 생각된다. 비록 안심의 calapin-I 활성은 수소에서보다는 미경산우에서 높았지만 다른 활성은 낮았다. 높은 calpastatin 활성은 calpain 활성을 억제하여 근육연도를 경감시킬 수 있다 (Table 3).

Lysosomal cysteine 단백질 분해효소는 적혈구를 제외한 포유류의 모든세포에서 발견되어있다. 비록 세포종류나 조직에 따라 lysosome의 농도는 차이가 있

지만 (간 조직에는 높고, 골격근에는 낮다), 이러한 조직들에서 단백질 분해효소의 활성은 유사하다. 많은 종류의 단백질분해효소가 lysosome에서 분리가 되었지만 기능이 규명된 것은 cathepsins B, D, H 와 L 등이 있다.

Cathepsins은 근육단백질인 actin 과 myosin 단백질 분해의 주역을 담당하고 있다 (Whipple 과 Koohmaraie, 1991). 비록 대부분의 연화가 이 기간동안에 진행되지만, 사후에 도체를 냉장온도에 보관하면 72시간동안에 actin과 myosin의 분해는 거의 일어나지 않는다 (Banfman 와 Zdanis, 1988). 또한 같은 조건하에서 a-actinin 골격근 z-disk의 주요단백질의 분해는 거의 일어나지 않는다 (Hwan 와 Bandman, 1989). In vivo 상태에서 단백질 분해효소의 활성은 cystatin에 의해서 조절되어진다 (Barrett, 1987). Cystatin의 기능은 lysosome에서 분비되는 효소들이 세포질이나 세포외부 공간에서 부적절하게 단백질을 분해하는 것을 방지하는 역할을 하고 있다 (Barrett, 1987; Bond and Butler, 1987). Cathepsin이나 다른 단백질 분해효소 들은 Ca^{2+}에 의해서 활성화되지 않는다 (Koohmaraie, 1992).

그러나, calpain은 Ca^{2+}에 의해서 활성화 된다. Calpain 단백질 분해효소 system 은 사후 도체의 단백질을 분해하여 고기를 연화시키는 중요한 역할을 하고 있다(Koohmaraie, 1992). 또한 생축에서도 근육단백질 분해와 관계가 있거나 활성화시킬 수도 있다 (Goll 등, 1989). Calpain/ calpastatin system은 내생적인 Ca^{2+} 의존적 단백질 분해효소이며, in vivo 상태에서 근육 단백질의 분해를 활성화시킨다. 결과적으로 이러한 system은 사후 도체의 근육단백질을 분해하여 고기 연화에 중요한 작용을 한다. In vitro 상태에서 활성화된 calpain I 의 불활성화는 기질이 고갈되거나 많은 양의 기질이 존재하는 상태에도 서서히 불활화 될 수 있다 (Ouali, 1990; Croall 와 DeMartino, 1991; Koohmaraie, 1992; Geesink, 1993).

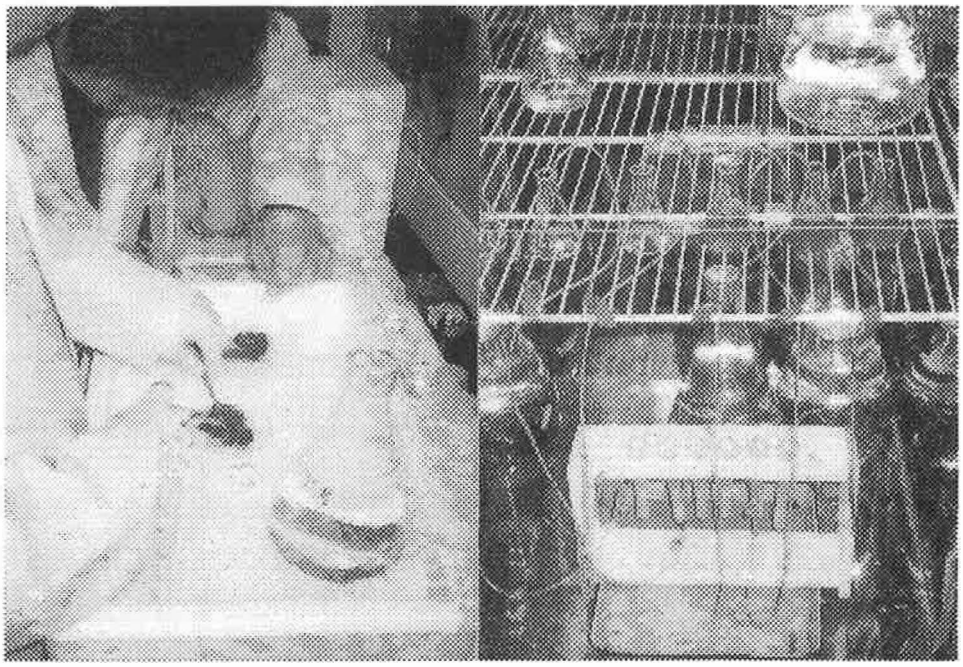


Fig 5. Muscle sample preparation and column elution for calpain and calpastatin activity measurement.

Table 15. Comparison of calpain/calpastatin activity (U/g) among treatments and sexes (n=18, LS mean)

Items	Treatment			Sex		
	LTFR	LTFR-tH	STFNR	Bull	Steer	Heifer
Calpastatin	12.10^{b}	13.85^{a}	10.98^{b}	13.97^{a}	10.81^{b}	12.21^{b}
Calpain-I	0.43^{b}	0.75^{a}	0.45^{b}	0.52^{b}	0.33^{c}	0.79^{a}
Calpain-II	0.76^{a}	0.69^{b}	0.65^{b}	0.79^{a}	0.64^{b}	0.67^{b}

LTFR: long-term feeding by restricted supply of diets

LTFR-tH: long-term feeding by restricted diets with hormone treated.

STFNR: short-term feeding by *ad libitum* of diets.

^{a,b}Means in the same row with a common superscript do not differ ($P<0.05$).

Table 14. Comparison of Calpastatin, Calpain-I, Calpain-II activity with different sexes and muscles at three different feeding pattern in Korean Cattle (U/g).

	Items	Loin			Tenderloin		
		Bull	Steer	Heifer	Bull	Steer	Heifer
LTFR (n=4)	Calpastatin	15.64±0.61	11.70±1.48	*	12.50±1.14	9.12±0.33	*
	Calpain-I	0.48±0.09	0.11±0.02	***	0.49±0.05	0.14±0.05	***
	Calpain-II	1.06±0.07	0.62±0.04	***	0.85±0.02	0.58±0.14	***
LTFR-tH (n=3)	Calpastatin	14.53±0.89	12.91±0.83	14.11±1.39			
	Calpain-I	0.53b±0.04	0.56b±0.08	1.18a±0.11			
	Calpain-II	0.65±0.03	0.76±0.06	0.67±0.06			
STFNR (n=3)	Calpastatin	14.2a±0.57	8.94b±1.31	10.19b±0.46	13.24a±1.66	9.26b±0.86	10.60b±0.88
	Calpain-I	0.6a±0.05	0.27b±0.02	0.62a±0.04	0.27b±0.03	0.32b±0.03	0.44a±0.05
	Calpain-II	0.82a±0.03	0.68b±0.01	0.71b±0.01	0.67a±0.01	0.51b±0.02	0.56b±0.03

aSig=significance. Means in a row marked with an asterisk differ (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$).

4. 육즙손실량 (Drip Loss, Cooking loss)

고기 시료는 수조에서 1시간동안 75 에서 가온한 후 실온에서 1시간동안 냉각시켰다. 육즙 손실량은 고기시료의 가온 전후의 무게차이로 계산하였다. 계산식은 다음과 같다.

Cooking Loss (%) = [A - (B + C)] x 100 ÷ (A - C)

(A: total weight of packaged sample, B: weight of sample removed meat juice, C:only weight of package)

Drip이란 조리에 의하여 육류에서 흘러나오는 육즙으로 수분, 수용성단백질, 아미노산, 염류뿐만 아니라 비타민 등을 함유한 영양소가 많이 함유된 용액이다. 즉 육즙의 유출이 된다는 것은 영양분의 감소뿐만 아니라 풍미의 감소현상을 같이 수반한다. Table 16 과 Table 17 에서와 같이 수소에 비해 거세우 에서 현저하게 육즙 발생량이 감소하기에 거세가 육즙 발생량과 관련된 육질에 영향을 미치는 바가 크다고 보여진다. Cooking loss는 등심과 안심에서 비록 통계적인 유의차이는 인정되지 않았지만 수소에서 거세우나 미경산우에서 보다 높았다.

이화작용제재와 아드레너직제재들은 비육말기의 소에서 성장률이나 사료효율을 증진하는 목적으로 사용되었다. 비록 이화작용 제재들의 이식이 육질에 부정적으로 작용할 수 있다고 하지만 경제적이 이득은 여러 연구결과들에 의하여 입증되었다 (Trenkle, 1987). National Beef Quality Audit에 의하면 이화작용제재의 이식에 의하여 비육우의 육질인 상강도와 연화도가 감소한다고 보고 있다 (Smith 등, 1992). b-adrenergic agonist 들은 여러 가지 생리적 조건하에서도 비육우의 골격근 성장을 촉진한다. 비록 b-adrenergic agonist들 투여가 면양에서 등심의 전단력을 증가시킨다고 하지만 CaCl2를 투여하면 이러한 영향은 극복된다고 한다 (Koohmaraie 와 Shckelfold, 1991).

Table 17. Comparison of cooking loss among treatments and sexes (%, n=18, LS mean)

Day	Treatment			Sex		
	LTFR	LTFR-tH	STFNR	Bull	Steer	Heifer
3	22.6^{ab}	21.70^{b}	26.64^{a}	24.79	22.78	23.4
9	20.25	20.03	23.04	21.48	20.79	21.06
15	16.88^{b}	19.46^{ab}	22.27^{a}	21.22^{a}	17.36^{b}	20.03^{ab}
21	10.94^{b}	18.50^{a}	18.68^{a}	18.14^{a}	13.94^{b}	16.03^{ab}

^{a,b}Means in the same row with a common superscript do not differ ($P<0.05$).

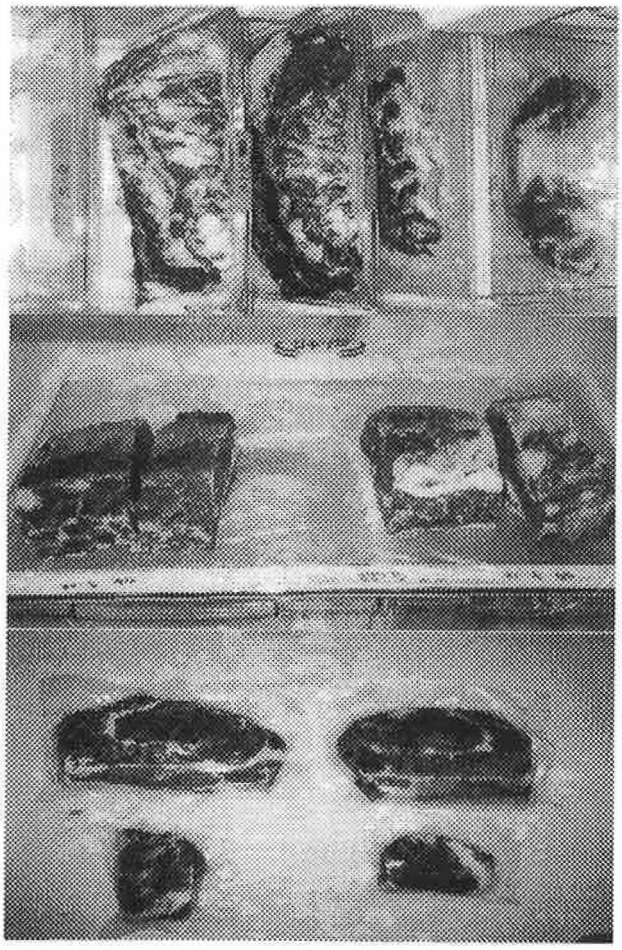


Fig. 8. Loin and tenderloin samples for drip loss and shear force measurement. (bottom) vacumn packaged steaks.

Table 16. Comparison of cooking loss between two difference sexes and muscles. (%).

	Day	Loin			Tenderloin		
		Bull	Steer	Heifer	Bull	Steer	Heifer
LTFR (n=4)	3	22.96±1.88	18.06±1.19	NS	27.40±0.22	22.65±0.72	**
	9	17.79±1.25	15.77±1.35	NS	24.10±2.45	23.48±1.26	NS
	15	17.18±1.38	15.54±1.91	NS	23.04±1.55	10.82±.56	**
	21	15.60±1.51	7.43±1.19	*	13.46±1.47	7.29± .67	*
LTFR-tH (n=3)	3	22.26±1.05	21.58±1.18	21.26±1.52			
	9	19.71±1.17	20.07±1.16	20.34±1.13			
	15	18.55±1.14	19.40±1.15	20.44±1.14			
	21	18.09± .90	19.16±1.15	19.01±1.27			
STFNR (n=3)	3	21.18±0.58	20.76±1.12	20.66±0.50	31.01±2.70	33.89±0.60	32.40±0.12
	9	20.42±1.52	18.84±1.64	18.62±1.15	26.53±2.02	27.03±0.73	26.84±0.69
	15	20.16±2.77	15.64±0.22	16.27±1.07	27.06±3.11	25.99±1.49	28.51±0.01
	21	17.79a±0.18	14.31b±0.75	13.77b±0.14	23.13±0.03	20.31±2.88	22.81±0.33
	28	15.34±0.73	12.61±2.25	11.20±1.22	18.78a±0.22	7.46b±0.54	14.03a±1.34

aSig=significance. Means in a row marked with an asterisk differ (* $P<0.05$, ** $P<0.01$).

5. 전단력 (Warner-Bratzler Shear force)

전단력 측정을 위하여 등심과 안심에서 세개의 steak (시료당 2.45cm-두께)를 절단하여, 진공포장 하고 3, 9, 15, 21일 동안 숙성시켰다. Steak는 75℃ 수조에서 가온한후, 냉각한후 근육섬유 방향에 평행한 방향으로 6개의 core (1.24cm-직경)를 도려내었다. 각각의 core는 Instron Universal Testing Machine (Instron, Canton, MA)을 사용하여 50kg load cell과 5cm/min crosshead speed로 shear force를 측정하였다.

Table 18 과 Table 19 는 저장시간별 등심, 안심의 전단력 변화를 보여주고 있다. 자료값의 통계처리 결과 3일, 9일의 등심, 안심에서 전단력 측정결과 거세 효과를 크게 보았다고 할 수 는 없지만 전단력이 거세의 영향을 받고 있으며 15일, 21일에서 뚜렷하게 이를 뒷받침하고 있다. 근육의 연도를 나타내는 shear force는 수소와 미경산우에서 보다는 거세우에서 낮았다. 그러므로 거세우에서 근육연도가 향상됨을 볼 수 있다.

최근 연구들에 의하면 도체의 육질을 향상시키거나 기호성을 예측하기위한 내용들이 많이 진행되고 있다. May 등 (1992) 은 등심에서 전단력과의 상관관계는 육의 온도 (-0.63), 상강도 (-0.61), 사육기간 (-0.56), 등지방두께 (-0.55), 도체중 (-0.53) 라고 보고하였다. 백 등 (1993)의 보고에 의하면 한우의 출하체중을 증가시키면 일당증체량, 육량지수, 전단력 등은 감소하지만, 도체율, 배최장근 단면적, 상강도는 점진적으로 증가한다고 하였다. 제한급여 동물에서 출하체중을 높이면 전단력은 감소한다. (한 등, 1996).

Table 18. Comparison of shear force value between two difference sexes and muscles (kg).

	Day	Loin			Tenderloin		
		Bull	Steer	Heifer	Bull	Steer	Heifer
LTFR (n=4)	3	11.97±.27	11.40±.23	NS	9.80±.29	10.04±.40	NS
	9	9.84±.46	9.17±.34	NS	9.77±.32	9.93±.43	NS
	15	9.10±.21	8.70±.30	NS	9.02±.28	7.43±.18	***
	21	8.39±.32	8.20±.50	NS	7.59±.12	6.30±.32	**
LTFR-tH (n=3)	3	8.73± .35	8.69± .22	8.65± .41			
	9	7.75± .43	7.67± .47	7.65± .55			
	15	7.44± .58	7.44± .34	7.43± .59			
	21	6.98± .22	6.87± .39	6.88± .30			
STFNR (n=3)	3	9.05a±0.42	6.68b±0.16	9.57a±0.34	9.93a±0.32	6.68b±0.27	7.83c±0.37
	9	7.48b±0.25	7.28b±0.61	9.26a±0.55	9.65a±0.38	5.70b±0.48	8.02a±0.67
	15	8.73a±0.58	6.06b±0.36	7.16b±0.22	9.06a±0.49	7.09b±0.74	7.35ab±0.25
	21	8.60a±0.62	6.33b±0.21	8.43a±0.50	8.25a±0.39	7.19a±0.35	8.04a±0.41
	28	9.51a±0.55	6.26b±0.48	7.58b±0.39	9.14a±0.33	5.29b±0.30	7.06c±0.44

aSig=significance. Means in a row marked with an asterisk differ (* $P<0.05$, ** $P<0.01$).

Table 19. Comparison of shear force among treatments and sexes (n=18, LS mean, kg)

Day	Treatment			Sex		
	LTFR	LTFR-tH	STFNR	Bull	Steer	Heifer
3	10.95a	8.69b	8.36b	9.76a	8.60b	9.64a
9	9.94a	7.69b	7.92b	8.70a	7.80b	9.05a
15	8.44a	7.40b	7.59b	8.61a	7.24b	7.57b
21	7.76a	6.91b	7.80a	7.85a	6.84b	7.79a

LTFR: long-term feeding by restricted supply of diets
LTFR-tH: long-term feeding by restricted diets with hormone treated.
STFNR: short-term feeding by *ad libitum* of diets.
a,bMeans in the same row with a common superscript do not differ ($P<0.05$).

6. 육색 (Meat Color)

육색은 Chromameter (Minolta, CR301)를 이용하여 측정하였다. 육색은 Commision International de Leclairage에서 정한 L* (명도), a* (적-녹), b* (청-황) 값으로 표현하였다. 육색은 등심과 안심에서 백색 타일의 표준판 (Y=92.40, x=0.3136, y=0.3196) 으로 측정하였다.

Hunter color-L* 는 도축 후 시간이 경과함에 따라 등심에서 증가하였다 (Table 20). 수소에서는 Hunter color-L* 값이 미경산우나 거세우에 비하여 낮았다. 그러나 Hunter color-a* 는 별다른 차이를 보이지 않았다.. 또한 Hunter color-b 는 도축 후 숙성시간이 경과함에 따라 감소하였다.

육색은 여러 가지 요인에 의하여 영향을 받는다. 이러한 요인들은 빛, 지방산화, 산소함량, 도축전상태, 미생물 성장 등이 있다.(Solberg, 1968). 육색은 육질을 평가하는데 중요한 요소이다. 이러한 특징은 저장조건에 따라 달라진다. 강 등 (1997)은 L*값은 수입육에 비하여 한우육에서 낮게 측정되고, 반면에 a* 값은 한우육에서 높게 나타난다고 보고하였다. 일반적으로 marbling이 높으면 a* 값은 증가하는 경향이 있다. Marrot 등 (1967)의 연구에 의하면 steak를 냉장온도에서 빛을 쪼였더니 육색이 심하게 바뀌었으나, 같은 온도에서 어두운곳에 보관하였더니 육색에 별다른 변화가 없었으며, 10일 저장 후에야 육색이 약간 변하기 시작했다고 보고하였다.

Table 20. Effect of storage days at 4℃ in Hunter color-L*a*b* values of Korean cattle beef in short-term feeding (n=3)

Day	Sex	L* (lightness)		a* (red-green)		b* (blue-yellow)	
		Loin	Tenderloin	Loin	Tenderloin	Loin	Tenderloin
1	bull	35.53b±1.05	34.37±1.22	22.74±4.13	21.71b±0.68	7.23±1.25	7.05b±0.48
	heifer	41.14a±1.23	38.47±1.40	22.56±1.80	22.57b±0.75	10.12±0.88	9.65ab±0.56
	steer	36.67b±0.94	33.84±1.19	20.52±0.60	28.13a±0.98	8.46±0.71	10.16a±0.88
3	bull	32.92b±1.11	31.78±1.34	15.72±0.92	18.63a±0.93	5.98b±0.63	6.83±0.37
	heifer	36.84ab±1.58	34.56±1.14	16.22±1.20	17.77a±1.47	8.12a±0.34	8.31±0.28
	steer	39.04a±2.89	34.09±0.42	18.22±1.21	14.35b±0.59	9.46a±1.25	6.97±0.27
9	bull	40.72±1.18	38.91b±0.98	8.06±0.84	9.52±0.73	3.56±0.61	3.90±0.55
	heifer	46.01±1.58	43.47a±2.80	7.46±0.40	8.50±0.62	4.26±0.90	5.18±0.92
	steer	44.31±1.11	41.75ab±3.92	9.90±1.19	8.30±1.26	5.79±1.13	5.18±1.44
15	bull	39.64b±1.12	38.15b±1.68	10.31±1.07	11.59±0.40	1.99±0.88	3.17±0.56
	heifer	44.96a±2.35	43.77a±1.33	9.83±1.05	12.43±1.34	3.26±1.30	4.63±0.39
	steer	44.16a±1.30	42.59a±1.82	9.54±0.79	9.93±1.31	3.30±0.69	4.03±1.30
21	bull	30.84b±8.80	40.82±1.02	9.74±1.04	10.08b±1.56	3.34a±1.11	2.37±0.81
	heifer	43.36a±1.91	43.82±2.79	12.12±1.62	14.68a±1.01	1.84b±0.68	3.17±1.42
	steer	44.72a±1.51	40.32±1.64	10.64±0.64	10.64b±0.84	4.09a±0.88	3.27±3.29
28	bull	40.32b±2.11	40.18±1.91	9.74±1.49	15.48a±2.04	2.43b±1.09	0.62±0.58
	heifer	48.12a±5.26	40.25±1.76	10.49±1.52	13.13a±1.22	3.58a±1.75	1.22±2.09
	steer	43.69b±1.96	40.65±4.06	11.12±1.65	8.93b±1.58	3.22a±1.48	1.12±2.68

a,bMeans in the same column of same day with a common superscript do not differ ($P < 0.05$).

제3장 : 한우 고급육 생산을위한 calpain DNA 및 근육세포 배양기술개발

제1절 근육위성세포 연구

1. 한우 근육위성세포 분리

도축장 (축협나주공판장) 에서 근육 시료를 채취하여 신선한 상태로 실험실로 운반하여 근육위성 세포분리에 사용하였다. 근육은 냉장 온도의 PBS로 3회 세척하여 가능한 한 세균의 오염을 방지하였다. 근육시료에서 결합조직과 지방조직 등을 제거하고 약 0.5 ㎠ 크기로 잘게 절편한 다음, 단백질분해효소 (Pronase E, 0.8 ㎎/㎖, Sigma)를 PBS에 용해하여, 2 vol의 용액으로 37℃에서 배양하였다. 배양하는 동안 가끔씩 서서히 교반 하였다. 배양혼합물은 1500 *g* 에서 6분 동안 원심분리 하여, 상층액을 제거하고, pellet은 PBS로 3회 세척하였으며, 400 *g* 에서 10분 동안 원심분리 함으로서 근육위성세포를 분리하였다. 위성세포가 부유되어있는 상층액을 다시 1800 *g* 에서 10분 동안 원심분리 하였다. 위성세포 pellet은 배양액 (DMEM + 10% FCS)에 부유하여 15㎝ (DM) well에 plating 하여 2시간 동안 예비 배양하여 기타 조직이나 다른 세포들을 제거하였다.

2. 근육위성세포 배양 및 cloning

제 1 차 근육위성세포는 DMEM + 10% FCS에서 배양하여 냉동보존하고, cloning 을 위하여 제 2 차 배양을 진행하였다. 순수한 clone을 얻기 위하여 2차례 계대배양을 진행하였다. 배양된 세포는 (Fig. 1)에 나타난 바와 같다. 제 1차 근육 위성세포는 DMEM + 10% FCS에서 배양하였다. 세포배양에는 많은 종류의 입자들(좌)이 있는데 이는 효소 작용에 의한 근육섬유들의 조각들이다. 이들은 배지를 바꾸어주고 제 2차 배양을 진행하여 대부분 제거되었다. (우)는 확대된 그림으로 전형적인 근육세포를 보이고 있다.

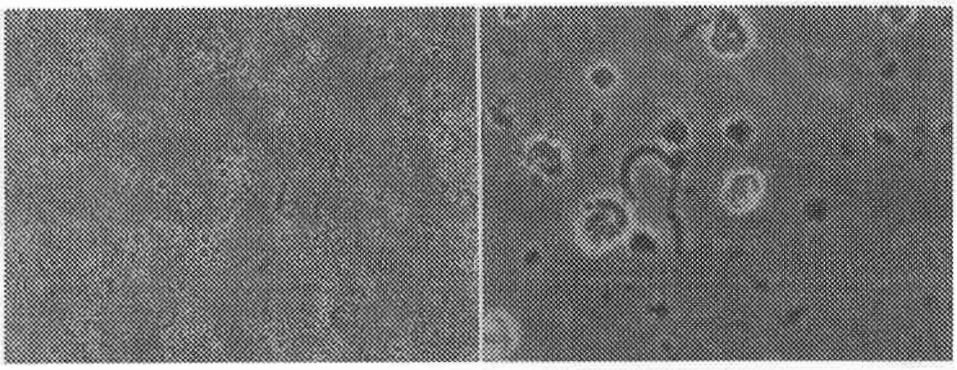


Fig. 1. Primary culture of muscle satellite cells from Hanwoo. (left) ×100, (right) ×400.

3. 근육위성세포 배양 평가

한우 와 홀스타인 비육우 근육위성세포의 최적 성장조건을 시험하기 위하여 3 가지 배양액 (DME/F12, DMEM, McCoy's 5A)과 3 가지 혈청 (fetal calf serum, FCS; chicken serum, CS; horse serum, HS)을 사용하였다 (Table 1). 단위 면적당 세포핵 숫자에서는 3 가지 배양액 중 DMEM 배양액에서 가장 높은 수준을 유지하였다. 이에 비하여 DME/F12에서는 68%, McCoy's 5A에서는 64% 정도의 세포성장율을 보였다 ($P<0.05$). 세포핵 융합은 DMEM과 McCoy's 5A에서 약 32%로서 차이가 없었으나 DME/F12에서는 21%로서 낮은 핵융합 비율을 나타냈다.

그러나 세포 성장률은 배양액의 차이에서보다는 혈청의 차이에서 더욱 더 큰 변화를 보이고 있다. 전반적으로 HS나 CS 보다는 FCS 에서 세포 성장률이 가장 높게 나타났는데 FCS에 비하여 CS 에서는 37.3%였고 HS 에서는 10.2%로서 커다란 차이를 보였다 ($P<0.05$). 또한 핵융합 비율에서도 FCS에서는 35.1%였지만 HS 와 CS 에서는 각각 24.7%와 25.6%로서 10%정도의 차이를 보이고 있다. 이상의 결과를 요약해 볼 때 한우 근육위성세포 배양에는 DMEM + 10% FCS 배양액을 이용한 세포 배양이 가장 좋은 것으로 나타나고 있다.

Table 1. Effect of media type and serum source on the proliferation subsequent myotube formation of **hanwoo** satellite cells.1

Media		Serum Sources		
		Horse	Chicken	Fetal Calf
DME/F12,	nuclei/mm2	102.1±15.6b	382.0±18.1a	1113.2±61.3a
	myonuclei/mm2	16.2±4.1	71.3±10.3	306.1±14.0
	fusion %	15.9	18.7	27.5
DMEM,	nuclei/mm2	183.1±19.7c	537.1±30.1c	1431.1±72.0b
	myonuclei/mm2	61.0±12.2	140.6±12.5	516.2±42.1
	fusion %	33.3	26.2	36.1
McCoy's 5A,	nuclei/mm2	87.1±9.2a	411.3±9.3b	1003.9±67.8a
	myonuclei/mm2	21.7±4.0	132.1±10.7	417.3±43.2
	fusion %	24.9	32.1	41.6

1 Means with the same superscript in column are not statistically different ($P < 0.05$). Mean±SE of six observations.

Table 2. Effect of media type and serum source on the proliferation subsequent myotube formation of **holstein** satellite cells.1

Media		Serum Sources		
		Horse	Chicken	Fetal Calf
DME/F12	nuclei/mm2	116.1±16.2a	316.2±17.2a	1362.1±89.3b
	myonuclei/mm2	12.3±3.2	60.7±9.3	421.3±21.7
	fusion %	10.6	19.2	30.9
DMEM	nuclei/mm2	197.3±18.3b	462.1±34.3c	1573.6±93.6c
	myonuclei/mm2	56.1±10.4	126.3±11.2	492.0±37.8
	fusion %	28.4	27.3	31.3
McCoy's 5A	nuclei/mm2	96.3±8.7a	378.4±22.3b	1184.9±71.4a
	myonuclei/mm2	19.4±4.6	117.0±13.6	452.5±42.6
	fusion %	20.1	30.9	38.2

1 Means with the same superscript in column are not statistically different ($P < 0.05$).

Mean±SE of six observations.

Holstein 근육 위성세포 배양 (Table 2) 에서도 DMEM 배양액에서 가장 잘 성장하는 것으로 나타났다. 세포 성장률은 DMEM 에 비하여 DME / F12 에서는 71 % 였고, McCoy's 5A 에서는 69 % 로 나타났다. 또한 핵융합 비율은 DMEM 과 McCoy's 5A에서 약 30 % 로서 차이가 없었으나, DME / F12 에서는 20 %로서 가장 낮은 핵융합 비율을 보이고 있다.

반면에 HS, CS, FCS 등 3 가지 혈청을 이용한 실험에서는 한우 근육위성세포 에서와 같이 FCS에서 가장 높은 성장률을 보이고 있다. 세포 성장률은 FCS 에 비하여 CS에서 28.2 % 였고, HS 에서는 9.7 %로서 매우 낮은 성장률을 나타내었다.

Holstein의 실험에서도 역시 DMEM + 10 % FCS 배양액에서 가장 성장률이 좋았다. 몇 가지 특이한 사항은 핵융합 비율에서는 한우와 holstein 에서 공히 McCoy's 5A + 10 % FCS 배양액에서 각각 41.6 %와 38.2 %로서 가장 높았다. 또한, 한우 근육위성세포 보다는 holstein 근육위성세포가 약간 더 높은 성장률을 보이고 있다. 이러한 결과는 한우보다는 holstein이 대체적으로 체형이 크고 성장률이 빠른 것을 뒷받침하고 있다.

3. Clone된 근육위성세포를 이용한 유전자 전이

전반기에 수행한 제1차 한우 근육위성세포로부터 순수한 clone을 얻었다. 분리된 clone을 이용하여 세포 DMEM + 10% FCS 에서 배양하여 제2차년도 수행한 calpain gene transfection에서 (Fig 2)의 결과를 얻었다. pCMVβlac plasmid를 lipofectin과 liposome complex를 만들어 배양된 세포에 혼합 culture 하여 세포내부로 전이하였다. 세포내부로 전이된 plasmid DNA는 expression되어 β-galactosidase를 합성하여 x-gal과 반응하면 Fig 2 에서 보는 바와 같이 녹색의 발색반응을 보인다. (우)에서는 phase contrastion에 의한 세포의 구조가 뚜렸하고, gene transfection의 +,-가 명확하게 구별되고 있다. 전체적으로 transfection비율이 낮기는 하지만 calpastatin 과 calpain에 대한 sense와 anstisense DNA를 직접 전이하여 나타난 결과이다.

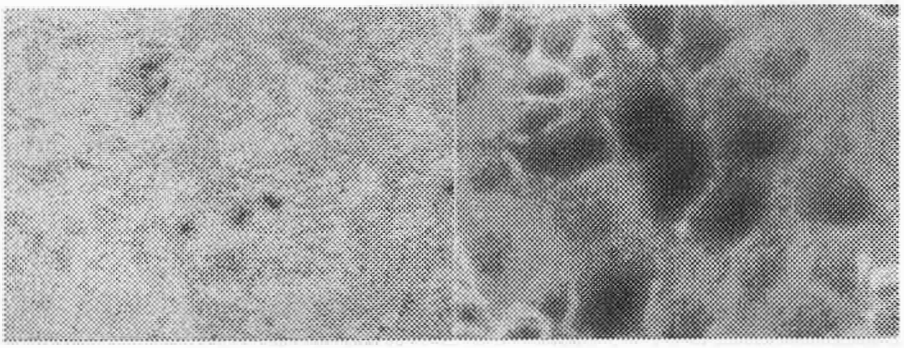


Fig 2. DNA (pCMVblac) transfection in muscle satellite cell culture.
(left) 50×, (right) 400×.

제2절 근육 단백질 분석

1. Western blotting에 의한 vinculin, desmin 구조 분석

도살후 0, 1, 3, 6일째 도체를 5g씩 나누어 15ml의 2%SDS, pH 7.0에서 균질화 한후 500ul 균질액을 동량의 sample buffer (8M urea, 2M thiourea, 3% SDS, 0.7% MCE,50mM Tris HCl, pH 6.8)에 용해시켜 70℃에서 4분간 가열하였다. 용액중 단백질 측정후 다시 50:50의 2% SDS와 sample buffer액에 4.0mg/ml로 희석한 후 5,000 x g에서 2분간 원심분리한 후 Lromophenol blue tracking dye를 0.1%수준으로 첨가하여 Wolfe등(1989)의 방법으로 SDS-PAGE를 하였다. 전기영동 후 gel을 nitrocellulose membrane에 옮겨 각 단백질을 옮기고 vinculin, desmin 단일항체와 함께 overnight 배양하고 세척후 horseradish peroxidase와 결합된 2차항체와 함께 1시간 배양후 enchanced chemilumine- sence(ELC) 방법으로 2차항체 signal을 찾아 각 단백질의 변화양상을 측정하였다.

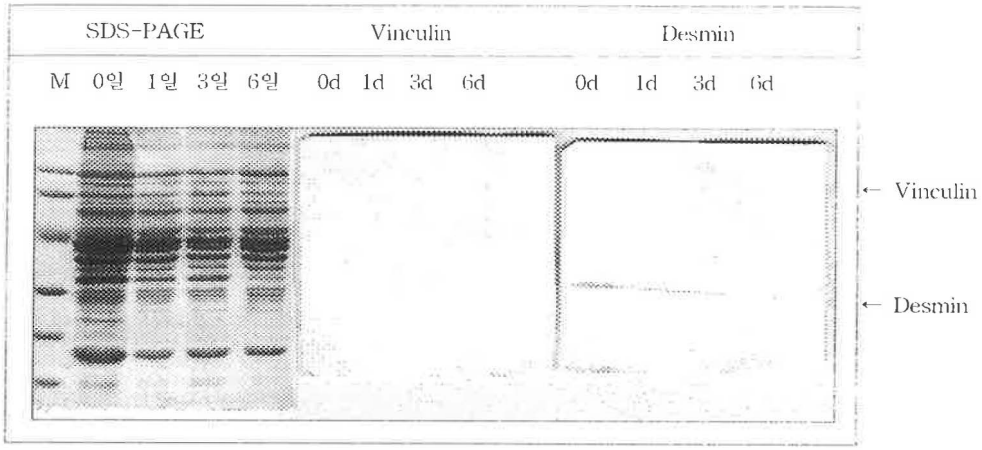


Fig. 3. Western blot analysis of vinculin and desmin degradation at different postmortem times. Longissimus homogenates were prepared from samples taken at 0, 1, 3, and 6 day of postmortem storage at 4℃. Each lane was loaded with 30ug of protein, electrophoresed, and blotted as described in Materials and Methods. Standard (M) lanes consist of molecular weight markers, including phosphorylase b (94 kDa), bovine serum albumin (83 kDa), ovalbumin (43 kDa), Carbonic Anhydrase (30 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa), α-lactalbumin (14.4 kDa).

Fig 3은 거세우의 등심내 근원섬유를 이루고 있는 근육단백질을 전기영동한 사진을 보여주고 있다. 근육단백질 중 vinculin 과 desmin 이 4℃에서 저장시간이 경과함에 따라 점차 분해되어감으로서 육의 연도를 향상시키는 요인이 된다.

2. Cathepsin B, Cathepsins B+L, Cystatin 분석

도살후 30분내에 시료처리되 -70℃에서 냉동보관중인 시료를 이용하여 7매의 lysine buffer (50 mM sodium acetate, 100mM NaCl, 1mM EDTA,0.2% Triton x-100 [vol/vol], 초산으로 pH 5.0 으로조절)로 균질 후 1시간 방치한후 다시 32,000 에서 원심분리하여 상층액을 유리섬유로 거른 후 단백질을 bovine serum albumin을 표준으로 하여 biuret 방법으로 정량후 다시 2ml의 상층액을 S-carboxymethylated-papain-Sepharose affinity chromatography를 통과시켜 cyatatin의 활성을 제거한 후 6ml의 lysing buffer로 2번 전개시켜 Kirschke 등 (1983)의 방법에 의해 fluorimetry에서 분석하였다. Cystatin은 affinity chromatography를 통과시키기 전후의 cathepsin B+L의 비율로 간접 결정하였다.

Cathepsin의 활성은 다른 근육단백질들과 같이 calpain/calpastatin과 더불어 근육연도에 밀접히 연관되어있다 (Table 3). 한우의 수컷과 암컷에서 cathepsin B 의 specific activity 는 수컷에서 2배 이상 높게 나타났으나 cathepsin B+L의 activity 에는 변화가 없었다. 그러나 activity를 근육 단위당으로 나타내면 cathepsin B에서는 차이가 없었으나 cathepsin B+L의 activity는 수컷에서 25% 정도 높게 측정되었다. 현재까지의 결과로서 단정하기는 어렵지만 우리가 일반적

으로 알고있는 수소고기와 암소고기의 근육연도에 차이가 있다는 것을 뒷받침할 수 있을 것이다. 이러한 결과들은 도체의 등급과 calpain 등과의 상호관계를 연관시키면 보다 더 명확할 것이다.

Table 3. Activity of Cathepsin B and Cathepsin B+L in Hanwoo.

(nmole/min/mg protein, n=5)

	Cathepsin B		Cathepsin B+L	
	Specific activity	Activity / g muscle	Specific activity	Activity / g muscle
Male	0.163±0.02a	0.126±0.03a	0.374±0.06a	4.760±0.36a
Female	0.072±0.01b	0.113±0.02a	0.321±0.05a	3.821±0.27b

* Means with the same superscript in column are not statistically different ($P < 0.05$).

3. SDS-PAGE Gel 전기영동과 western blotting에 의한 titin, vinculin, nebulin, desmin 구조 분석

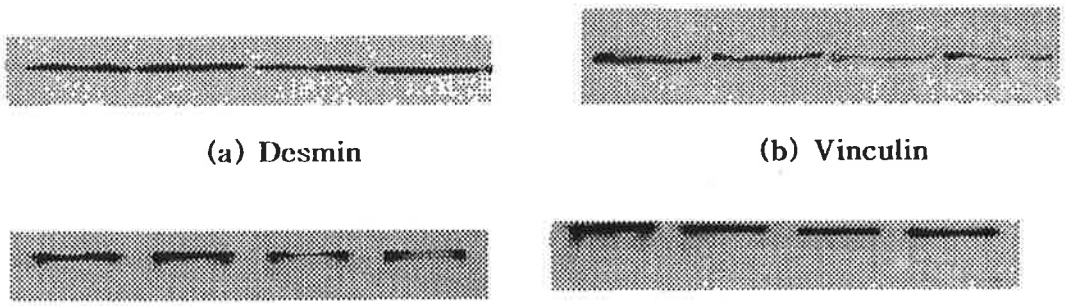
도축 후 0, 1, 3, 6일째 도체를 5g씩 나누어 15ml의 2%SDS, pH 7.0에서 균질화 한 후 500ul 균질액을 동량의 sample buffer (8M urea, 2M rhiourea, 3% SDS, 0.7% MCE, 50mM Tris HCl, pH 6.8)와 혼합하여 완전 용해시켜 70℃에서 4분간 가열하였다. 용액중 단백질 측정 후 다시 50:50의 2% SDS와 sample buffer액에 4.0mg/ml로 희석한 후 5,000 x g에서 2분간 원심분리 한 후 Lromophenol blue tracking dye를 0.1%수준으로 첨가하여 Wolfe등(1989)(21)의 방법으로 SDS-PAGE을 이용하여 전기영동 하였다.

전기영동 후 gel중의 단백질들을 nitrocellulose membrane에 옮겨 vinculin, nebulin, tifin, desmin 단일항체와 함께 overnight 배양하고 세척후 horseradish perooidase 와 결합된 2차 항체와 함께 1시간 배양후 enchanced chemilumine-sence(ELC) 방법으로 2차 항체 signal을 찾아 근육내 단백질인 titin, vinculin, nebulin, desmin의 변화양상을 분석하였다.

화 한 후 500ul 한질액을 동량의 sample buffer (8M urea, 2M rhiourea, 3% SDS, 0.7% MCE, 50mM Tris HCl, pH 6.8)와 혼합하여 완전 용해시켜 70℃에서 4분간 가열하였다. 용액중 단백질 측정 후 다시 50:50의 2% SDS와 sample buffer액에 4.0mg/ml로 희석한 후 5,000 x g에서 2분간 원심분리 한 후 Lromophenol blue tracking dye를 0.1%수준으로 첨가하여 Wolfe등(1989)(21)의 방법으로 SDS-PAGE을 이용하여 전기영동 하였다.

전기영동 후 gel중의 단백질들을 nitrocellulose membrane에 옮겨 vinculin, nebulin, tifin, desmin 단일항체와 함께 overnight 배양하고 세척후 horseradish perooidase 와 결합된 2차 항체와 함께 1시간 배양후 enchanced chemilumine-sence(ELC) 방법으로 2차 항체 signal을 찾아 근육내 단백질인 titin, vinculin, nebulin, desmin의 변화양상을 분석하였다.

도체의 저장시간에 따른 각각의 근육내 단백질의 분해양상을 data화 할 수 있으리라 사료되며 desmin, vinculin, nebulin, titin의 standard 단백질을 구입하여 western blotting해보면 한우의 근육내 desmin, vinculin, nebulin, titin의 분자량을 파악할 수 있다.



(a) Desmin (b) Vinculin

(c) Nebulin (d) Titin

Fig. 4. Western blot of muscle proteins, desmin, vinculin, nebulin, titin in Hanwoo.

Vinculin은 day 0과 day 1일에 검출되었다, 그러나 day 3 이후에는 분해되어 나타나지 않았다. Vinculin의 분자량은 약 90KDa로 밝혀졌다. Desmin은 도축후 숙성기간이 경과함에따라 분해되었고, 분자량은 약 50KDa로 나타났다.

제3절 현미경적 근섬유 분석

1. 광학현미경적 근섬유 특성분석

신선한 근육조직을 glutaraldehyde 등을 이용하여 고정화하고 급속 냉동하여, 조직을 microtome을 이용하여 5- 10㎛두께로 slice하여 slide glass에 고정시키고 염색하였다. Fig 5는 근육섬유의 cross-section 으로서 가지런히 정렬된 myofibril 들이 근육섬유를 형성하고 있는 모습이 보인다. 400×에서는 각각의 muscle fiber를 보여주고 있으며 몇 군데에 백혈구들과 모세혈관이 나타나 있다. 한우 근육섬유를 횡으로 slice 한 단면을 보이고 있다. 정연하지는 않지만 skeletal muscle의 특징인 횡문(striated)이 연속적으로 배열되어 있음을 볼 수 있다. 현재의 sample은 조직 고정화단계에서 근섬유가 영향을 받은 것으로 보인다.

사진에 보면 가느다란 근섬유가 촘촘히 밀집되어 있다. 본 연구의 결과에 의하면 한우에서는 조직학적으로 가느다란 근섬유다발 밀집유형이 Holstein 소에서와 다른 특징을 보이고 있다. Fig. 5 은 한우 근육섬유를 횡으로 slice 한 단면을 보이고 있다. 정연하지는 않지만 skeletal muscle의 특징인 횡문(striated)이 연속적으로 배열되어 있음을 볼 수 있다. 현재의 sample은 조직 고정화단계에서 근섬유가 영향을 받은 것으로 보인다. 사진에서 보는바와 같이 한우에서는 보통 굵기의 근섬유와 가느다란 근섬유가 같이 존재하는 특징을 보여주고 있다. 아마도 이러한 특징이 한우육을 다른 품종과 차별화 할 수 있을 것으로 생각된다.

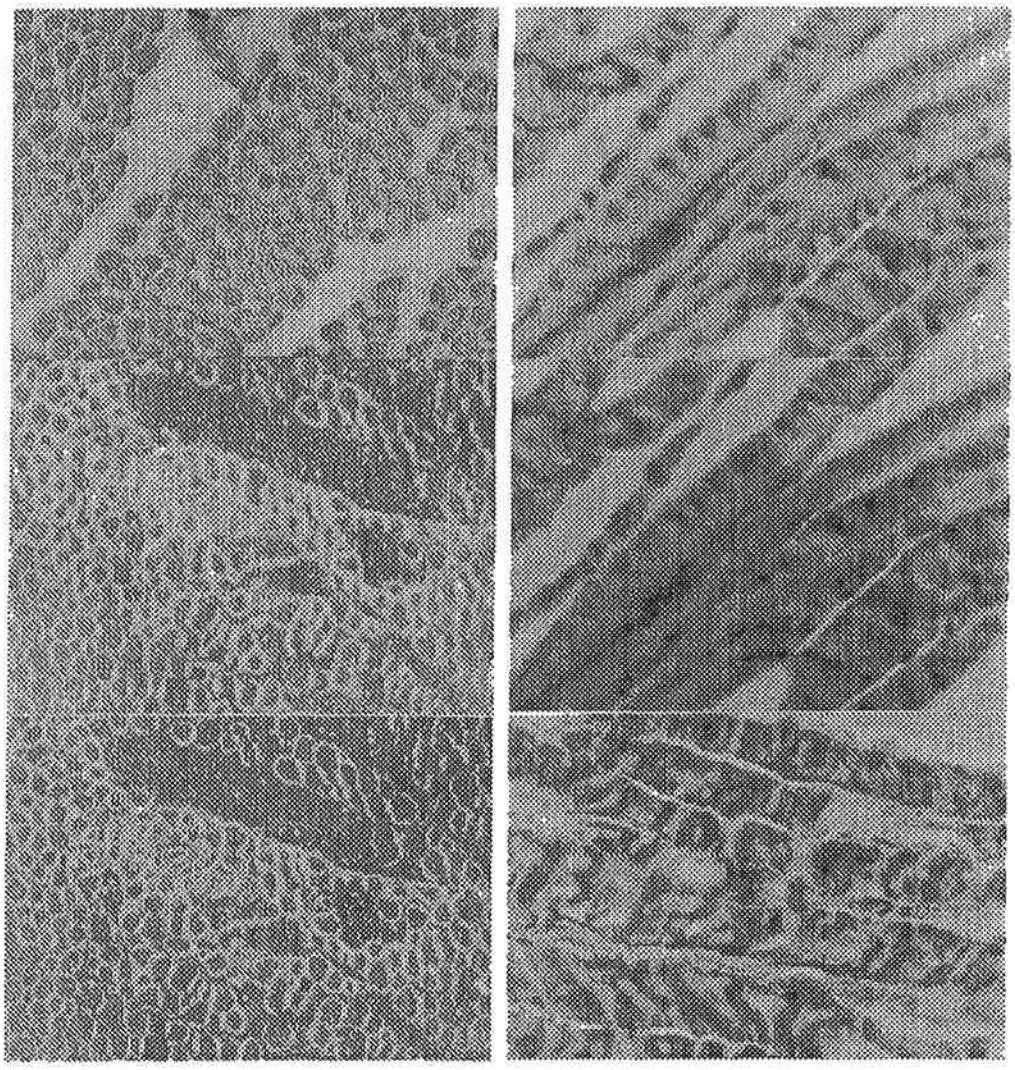


Fig. 5. Microscopic cross-sectional and longitudinal view (x50) of skeletal muscle of Hanwoo. Top : LTFR, middle : LTFR-Ht, bottom : STFNR

2. 전자현미경에 의한 myofibril 섬유의 초미시구조 변화 관찰

4mm x 30mm 크기의 이두근을 고정시키고 0.1M cacodylate buffer 속에 2.5% glutaraldehyde 로 4℃ 에서 4시간동안 고정시키고 세척후, 1% tannic acid

로 30분간 염색후 1% osmium 으로 1시간 동안 다시 고정시키고 25% 에틸알콜로 3회 세척하였다. 상기 시료를 일련의 에타놀로 탈수시킨 후 spurr 수지에 고착 시킨 후 절편을 만들어 다시 lead citrate와 uranyl acetate로 염색후 Taylor 등(1995,1)의 방법에 의해 전자현미경상에서 초미시 구조변화를 관찰하였다.

고기의 연화도는 고급육을 결정하는 중요한 요인이며, 고기의 가장 중요한 organoleptic 특성이다 (Weir, 1960; Lawrie, 1966; Moeller 등, 1977). 동물의 품종에 관계없이 도축후 시간이 경과함에따라 고기가 질겨진다. 내생 단백질 분해효소에 의하여 근섬유의 구조가 와해되는 것은 도축후 고기의 영화도가 증가되는 것을 의미한다. 비육우의 성장단계나 성축에서 근육단백질들이 끊임없이 합성되고 분해되고 있다 (Reeds, 1989). 이러한 단백질 분해는 근육내 단백질 분해효소에 의하여 주도되고 있다.

근육단백질 분해에는 cathepsin등과 다른 많은 단백질 분해효소에 의하여 z-disk가 분해되고, 아울러 a-actinin이 분해되는 과정이다. 특히 calpain은 근육으로부터 a-actinin을 분해하게 하여 z-disk를 분해를 유도하는 것으로 알려져 있다. 골격근 단백질인 desmin, nebulin, titin들이 고기의 연화에 중요한 것으로 알려져있다 (Young 등, 1980; Robson 등, 1984).

Desmin은 골격근의 intermediate 섬유소로서 근육단백의 구성요소이다. Intermediate 섬유소 (약 10nm 직경) 는 면역학적으로나 생화학적으로 heterogenous 단백질 단위이다. Desmin은 intermediate 섬유소의 5가지 단백질중의 하나이며, 골격근, 심근, 평활근 등에서 발견되고 있다.

Cytoskeletal 섬유소는 세포들이 접촉하는 plasma membrane 과 연결되어있다. 특히 섬유성세포 배양에서 보면 microfilament에 포함된 actin 단백질 다발이 세포와 기질이 접촉하는 cytoplasmic 표면에 부착되어있는 것을 볼 수 있다.

Vinculin은 세포막에 근접한 cytoplasmic 내부에 연결되어있다. 그러므로 vinculin은 actin 근육단백 다발과 plasma membrane과의 연결고리로 생각된다. 또한 actin 단백 다발이 transmembrane 구조와 연관되어 있는 것 같다. 그러므로 단백질 분해효소들이 근육단백질의 분해를 조절하면서 고기의 연화와 밀접한 연관이 있는 것으로 생각된다 (Goll 등, 1989; Penny, 1980; Valin, 1985).

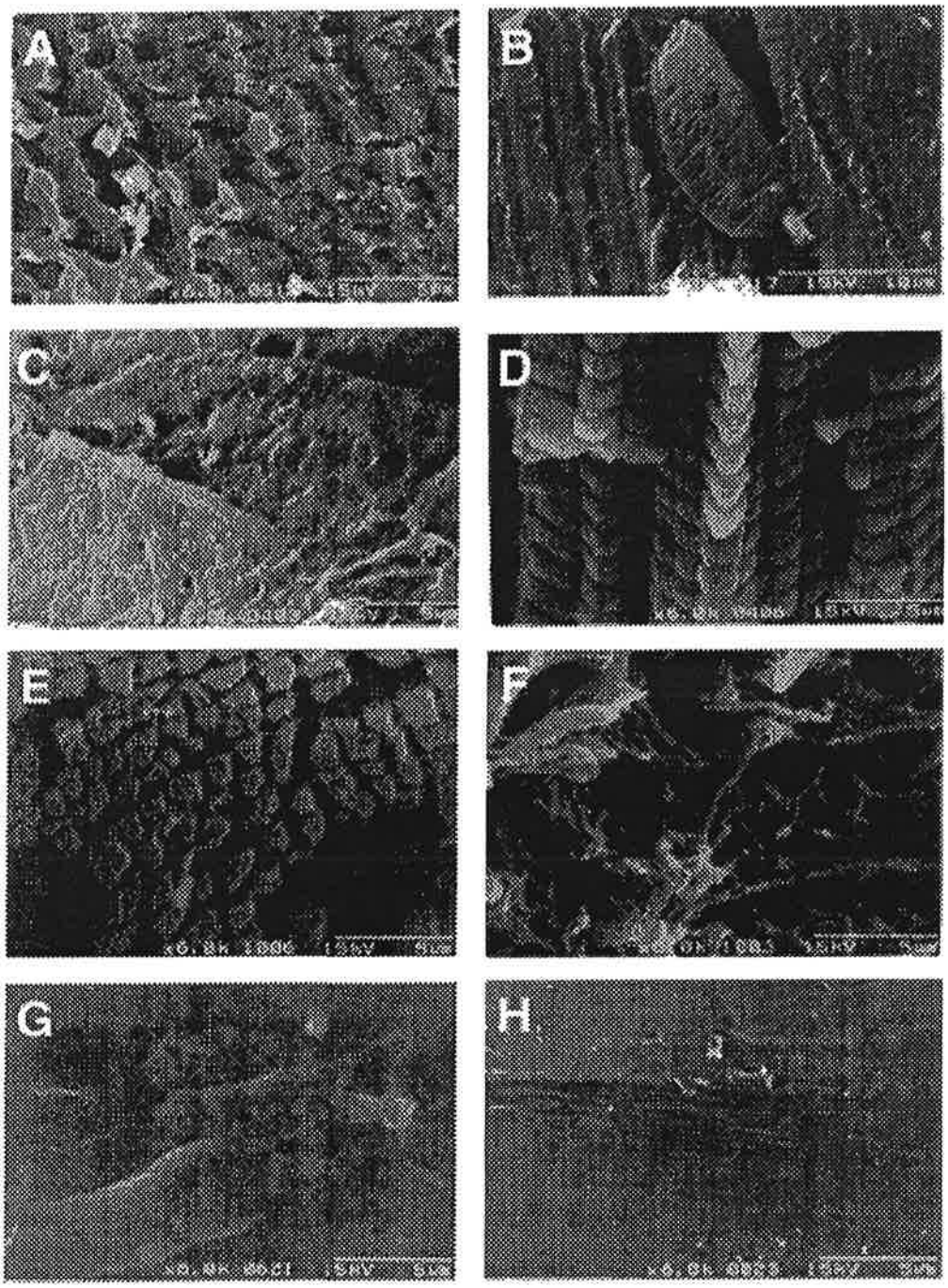


Fig 6. Electronmicrograph (magnitude x6.0k) of muscle tissue in hanwoo (left: cross-section, right: transversal, a,b: control, c,d: long-term feeding, e,f: b-agonist treat, g,h:short-term feeding).

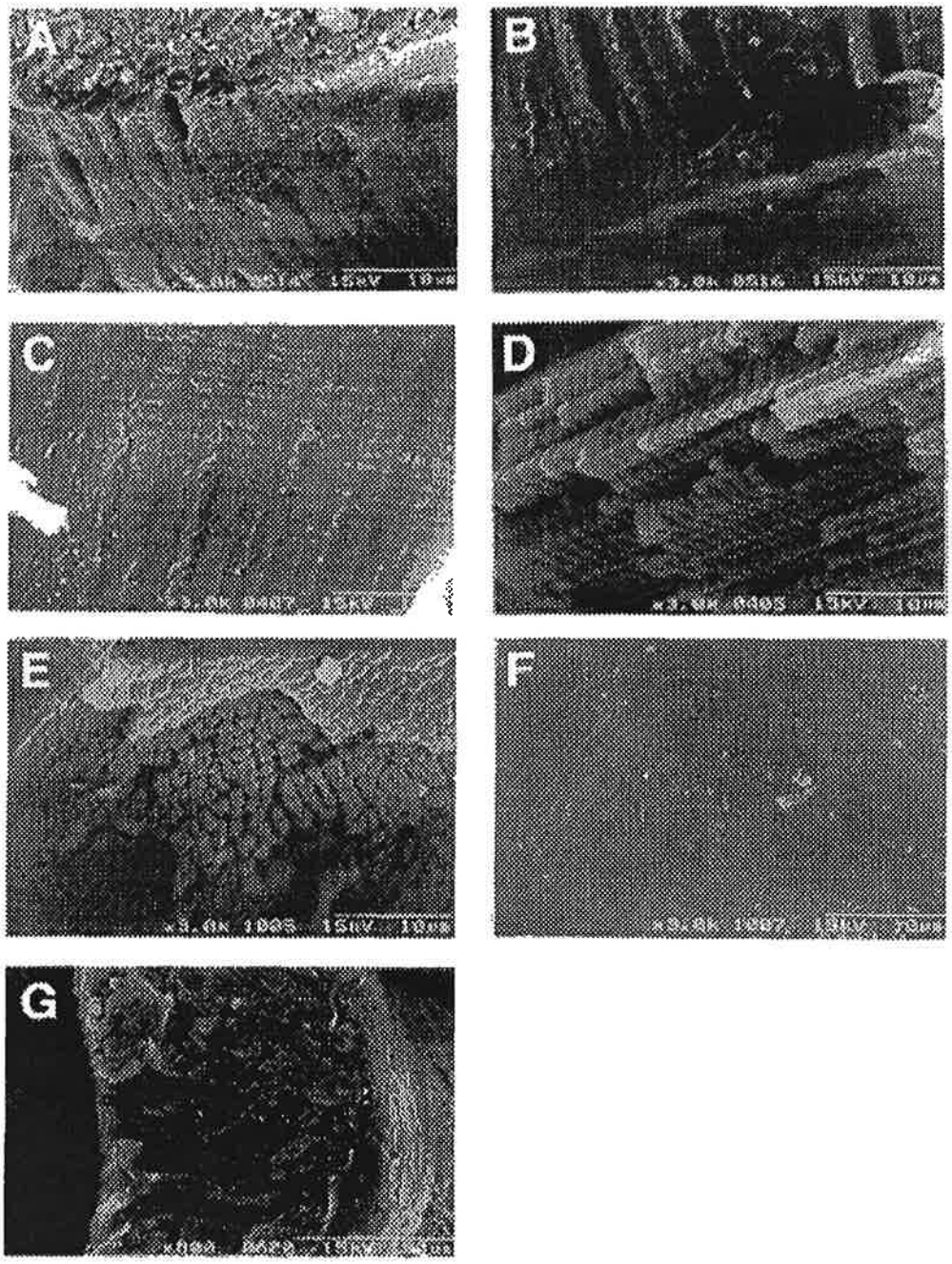


Fig 7. Electronmicrograph (magnitude x3.0k) of muscle tissue in hanwoo (left: cross-section, right: transversal, a,b: control, c,d: long-term feeding, e,f: b-agonist treat, g:short-term feeding).

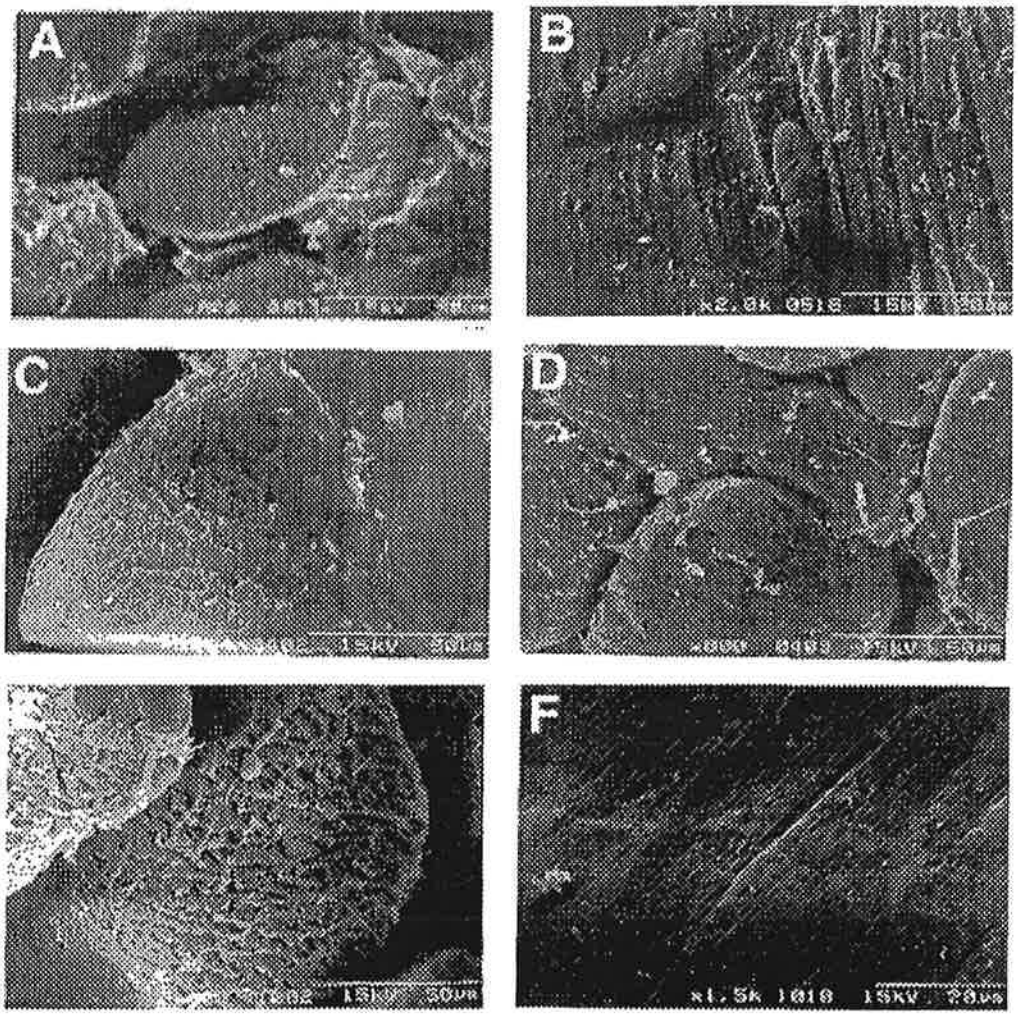


Fig 8. Electronmicrograph (magnitude x800-2.0k) of muscle tissue in hanwoo (left: cross-section, right: transversal, a,b: control, c,d: long-term feeding, e,f: b-agonist treat).

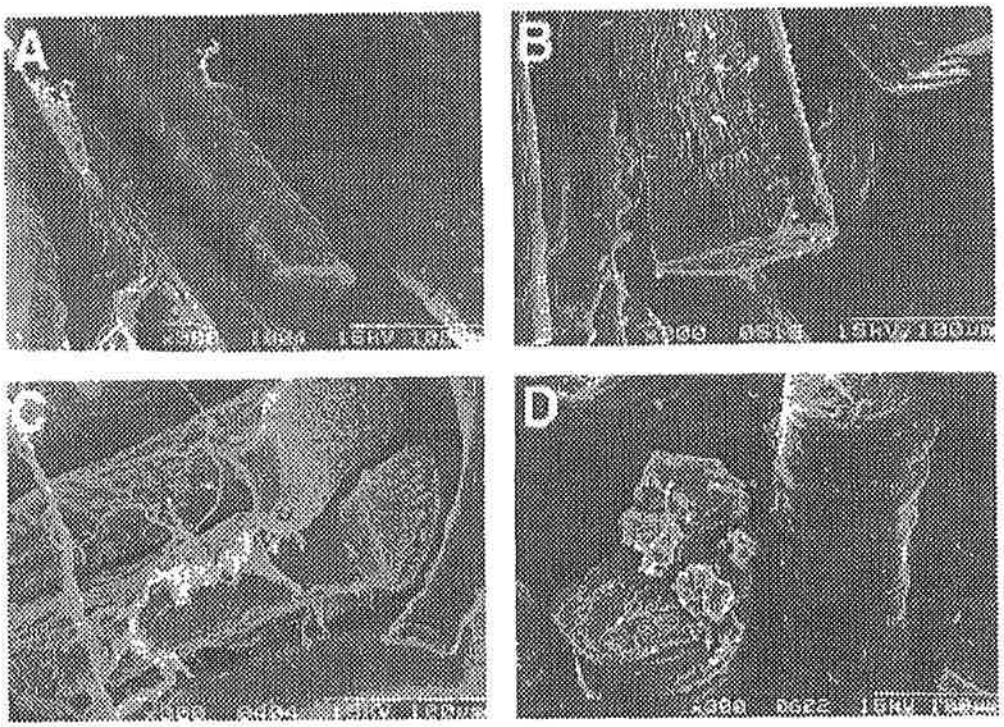


Fig 9. Electronmicrograph (magnitude x300) of muscle tissue in hanwoo. (a: control, b: long-term feeding, c: b-agonist treat, d:short-term feeding)

전자현미경을 이용해 근육조직의 초미시구조를 처리구간 비교하였다 (Fig 6 - 9). 근육조직의 치밀도는 대조구에 비하여 24개월 장기사양 처리구에서 확실 유연하게 보였다. 근육수축단위인 sarcomere 길이는 장기사양 처리구에서 45% 정도 크게 늘어났다. 이는 calpain 과 calpastatin 활성과 연관하여 유연한 결과라고 생각된다. 또한 효능부 (b-agonist) 처리구 에서는 근육단백의 이완되어있는 현상을 볼 수 있으며, 이는 근육단백질인 vinculin과 nebulin의 분해나이 간 수이 늘어난 것으로 해석할 수 있다. 단기사양 (18개월) 에서는 명확하지는 않지만 근육조직이 연속적으로 연결되어 대조구에 비하여 확실 더 치밀한 구조를 보이며, sarcomere 단위도 명확히 구분되지 않는 것으로 보아 근육단백질들이 그대로 존재하고 있으며, 확실 견고한 결과를 shere force에 의해서도 알 수 있다.

제4절 Calpain / Calpastatin 분리

1. Calpain 과 Calpastatin의 분리및 정제

사후 30분이내에 채취한 한우근육으로부터 proteolytic 효소를 분리하였다. 근육시료 5g 을 0.5㎤ 크기로 절편하고, 5배양의 균질화용액을 넣고 균질기 (Polytron PT-3000)에서 30초씩 5회 균질화 하였다. 시료는 항상 냉장상태를 유지하였다. 균질용액을 30,000 *g* 에서 30분간 4℃에서 원심분리하였다. 상층액을 수거하여 균질화 용액으로 conductivity를 교정하였다. DEAE-Cellulose column (1.5 x 20 cm, Sigma)을 buffer A로 평형상태에 이르도록하고, buffer 100mM NaCl, Buffer 200mM NaCl, Buffer 400mM NaCl 용액으로 각각 5ml 씩 15개 용출하였다.

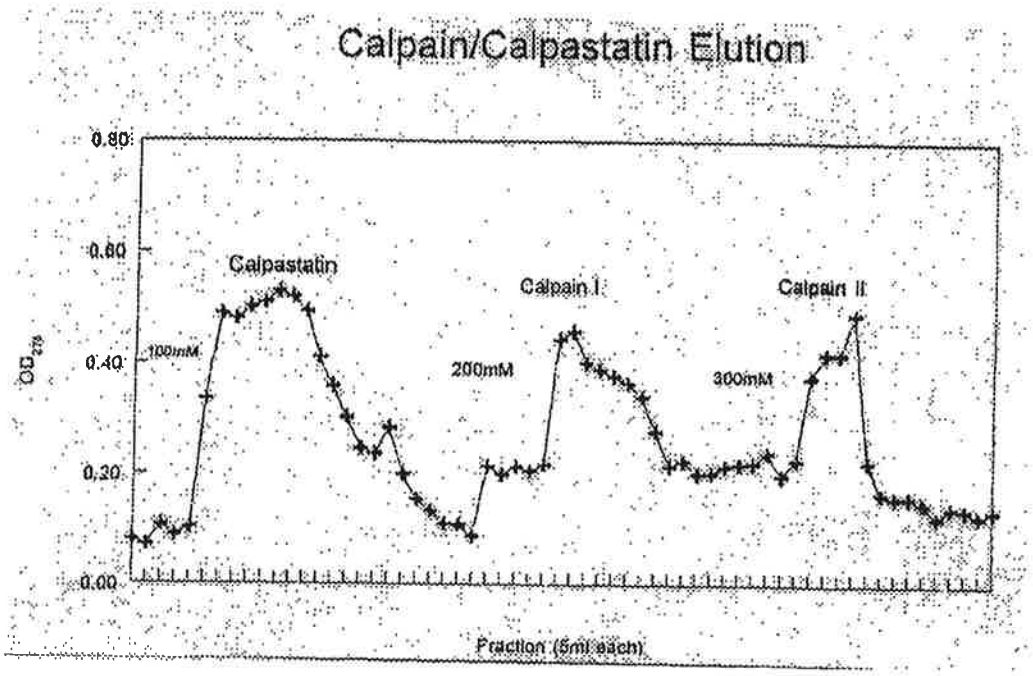


Fig 10. Proteolytic enzyme elution profile

Column에서 용출된 시료의 흡광도 (OD_{287})는 Fig 10에 나타난 바와 같다. Calpain과 calpain을 Buffer A 에 NaCl농도를 각각 100, 200, 400 mM로 증가시

켰을때 독특한 이온교환양상으로 완전히 분리된 peak를 보여주고있다.

6두의 한우근육시료로부터 calpstatin과 calpain의 elution형태는 Fig 11에 나타난바와 같다. Cellulose column에서 각 5ml씩 15 fraction을 용출하였다. Calpastatin은 4두에서는 단일 peak를 보여주고 있어서 calpastatin이 잘 분리되고 있음을 보여주고 있다.

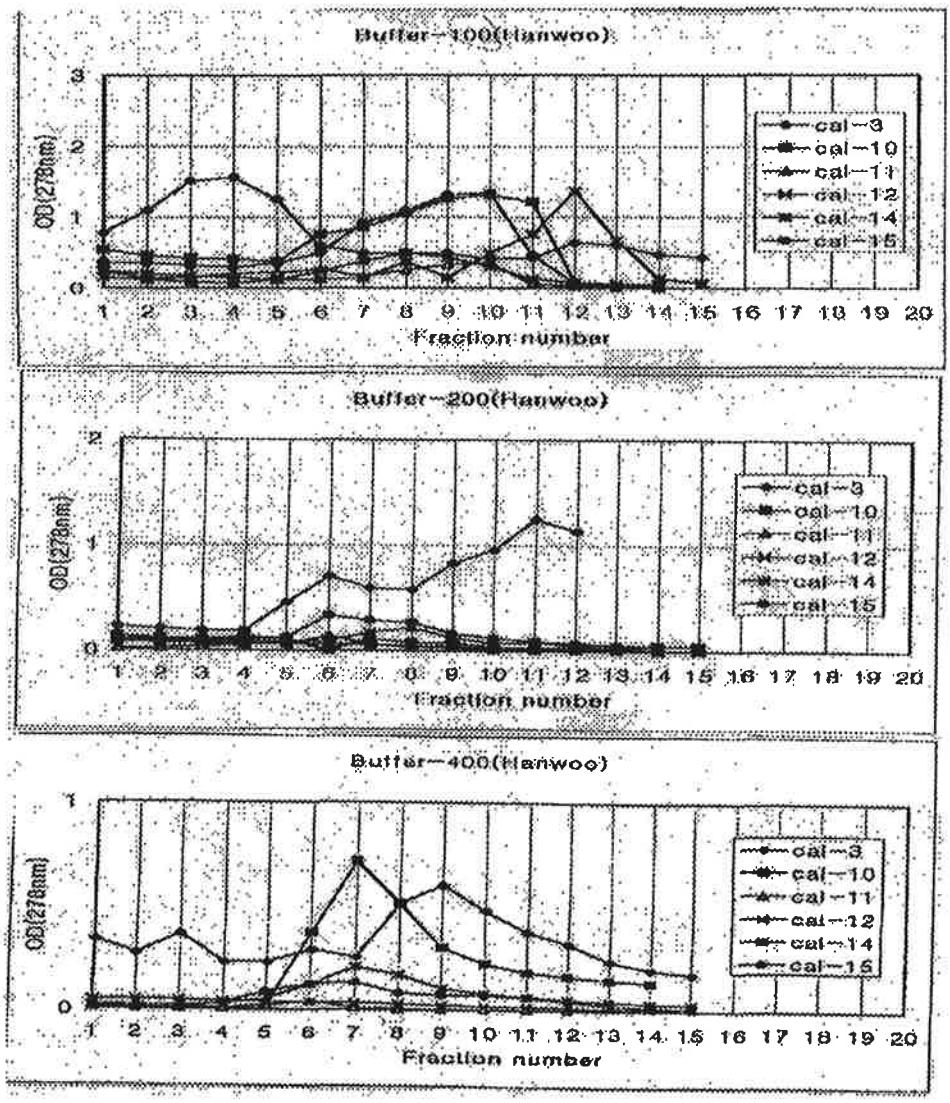


Fig 11. Column elution profile pattern of Calpastatin (top), calpain-I (middle), calpain-II (bottom) of Hanwoo skeletal muscle.

다른 2두에서도 비록 작기는 하지만 단일 band를 보이고 있다. 그러나. elution peak는 fraction 3-4, 9-10, 12 등으로 개체간의 차이를 보이고 있다. 이런한 결과는 column장치의 잘못이라기보다는 분자특성이 조금씩 다른 것으로 생각된다. Fig 11은 calpain-Ⅰ의 elution형식을 보여주고 있다. cal-3를 제외한 모든 sample에서 fraction 6-8에서 peak를 보여주고 있다. Cal-3에서도 역시 같은 범위에서 peak가 나타나지만 fraction 9-12에서의 peak는 calpain-Ⅱ가 완전히 분리되지 못하고 나타나고 있는 것으로 보인다. [그림 7]은 calpain-Ⅱ의 elution 형식을 보여주고 있다. Calpain-에서와 같이 cal-3 sample을 제외한 모든 개체의 fraction 6-9에서 single band를 나타내고 있고, 특히 cal-10은 calpain-Ⅱ함량이 높아 아마도 우수한 육질에 관계되는 calpain-Ⅱ 함유 개체일 것으로 사려된다. 결론적으로 DMEM-celluiose column을 이용한 calpastatin 과 calpain-Ⅰ,Ⅱ분리는 몇가지 분리조건만 최적화 한다면 완벽한 분리 system 으로서 한우 개체간의 육질 변화에 관계하는 calpastatin과 calpain의 preolytic enzyme함량을 구별하는데 유용하게 이용될 것으로 보인다.

2. Calpain / Calpastatin 분자량 결정

Column 에서 용출된 시료를 20배로 농축하여 SDS-PAGE에서 분자량을 결정하였다. 한우 4두에서 체취한 근육시료로부터 분리한 calpain과 calpastatin의 전기영동 사진은 Fig 12에 나타난바와 같다. ③ lane의 calpastatin의 band를 보면 약 71kD의 주된 band가 나타나고 약 5개의 크고 작은 band가 나타나는 것을 관찰할 수 있다. 또한 cal-17에서는 약 55kD에서 큰 band가 나타나고 있다. 이는 calpastatin의 조각이거나 또는 이동물에서의 calpastatin과 유사한 물질로 간주된다. ④ lane은 calpain-I의 banding 양상을 보여주고 있다. cal-17을 제외한 모든 개체에서 약 55kD의 유일한 band를 보이고 있다. 그러나 cal-17에서는 55kD band가 ④ lane에 없고 ③ lane에 나타나 있어서 calpain-I과 calpastatin이 분리되어 있지 않았음을 보여주고 있다. ⑤ lane 은 calpain-Ⅱ의 banding형태를 보여주고 있다. 80kD, 50kD, 30kD의 3가지 주된 band가 나타나고 있는 것을 볼 때 calpain-Ⅱ는 post-translational modification에 의하여 여러개의 단백질을 완성하는 것으로 생각된다. 그러나 3가지 분자의 각각의 기능에 대하여는 알려지 있지

않고 있다.

이상의 calpatatin and calpain분자량 결정실험에는 주된 band는 확연히 나타나지만 개체에 따라 몇가지 다른 분자량들이 나타나는 것을 알수 있다. 결론적으로 calpastatin의 분자량 71kD, calpain-Ⅰ 분자량 55kD, calpain-Ⅱ의 분자량은 80, 50, 30, kD등으로 나타났다.

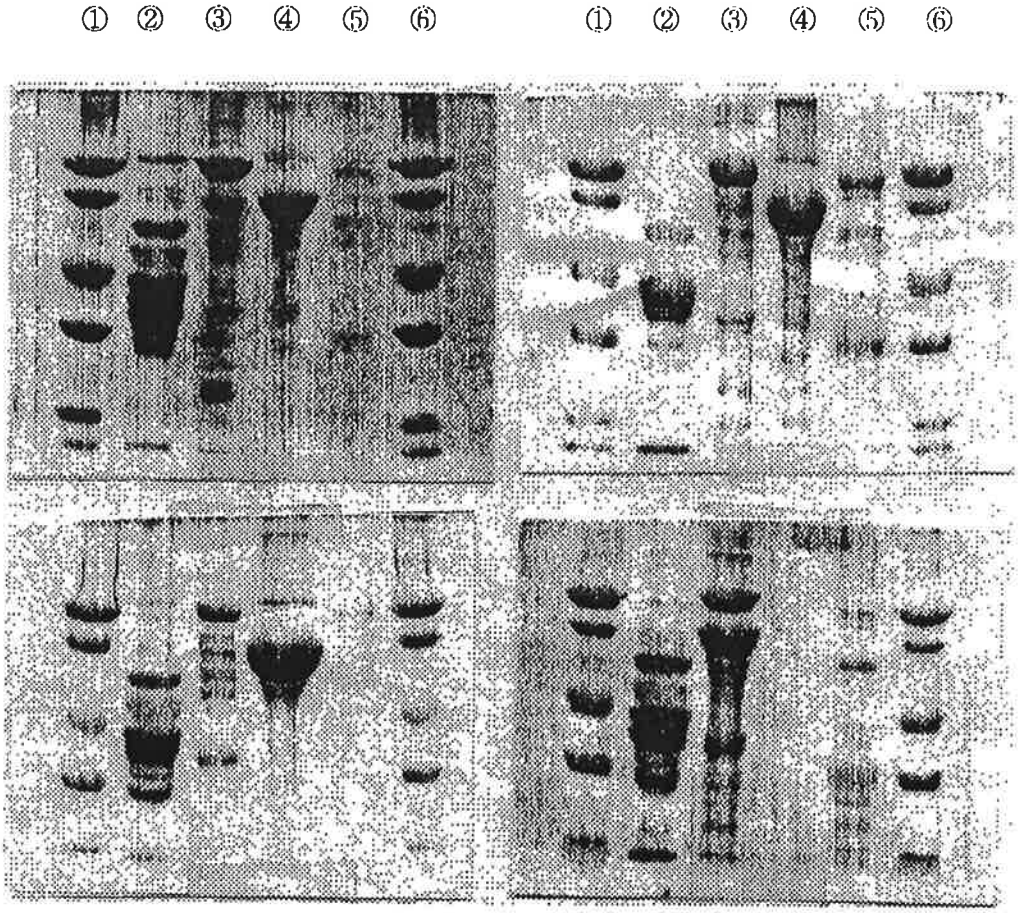


Fig. 12. SDS-PAGE of Calpain / Calpastatin. ①,⑥ Marker, ② Buffer A, ③ 100mM Nacl inbuffer A(Calpastatin), ④ 200mM Nacl in buffer A(Calpain-I), ⑤ 400mM Nacl in buffer A(Calpain-Ⅱ)

제5절 Calpain / Calpastatin 유전자 연구

1. Total RNA 분리

근육 시료는 도축직후 액체질소에 급속 냉동하여 실험실로 운반하였다. 근육내 total RNA는 Chomczynski and Sacchi (1987)의 방법에 따라 10g의 냉동 조직으로부터 분리하였다. 근육조직을 변성용액에 넣고 균질화 하였다. microtube에 균질화된 시료와 600ul의 변성용액과 60ul의 2M sodium acetate, ddH2O로 5회 saturation된 phenol 600ul, chlorogorm 120ul를 첨가 후 완전히 희석될때까지 강하게 혼합하여 원심분리(4℃, 15,000rpm, 20분)하였다. 상등액(약 600ul)에 phenol(25):chloroform(24):isoamylalcohol(1)용액을 첨가한 후 완전히 희석하여 원심분리(4℃, 15,000rpm, 10분)한 후 상등액을 모았다. 만약 상등액이 깨끗하지 않을 경우에는 phenol 처리 반복하였다. 상등액과 같은 양의 2-propanol를 첨가하여 -20℃에서 2시간 RNA를 침전시켰다. 침전된 용액을 원심분리(4℃, 15,000 rpm, 20분간)하여 RNA pellet을 모은 다음 70% ethanol로 세척하여 실온에서 자연건조 시켰다. Pellet의 크기에 따라 적당량 DEPC처리된 0.5% SDS용액에 완전히 용해시킨 다음 OD를 측정하여 RNA의 양을 계산하고, 1% 한천 겔을 ethidium bromide로 염색하면 ethidium bromide가 핵산의 이중나선사이에 끼어서 자외선을 쪼이면 Fig 13과 같이 보이게 된다. RNA가 분리과정중에 거의 분해되지 않을 경우 28s 라이보좀 RNA와 18s 라이보좀 RNA가 뚜렷하게 분리되서 보이게 되며 28s의 띠가 18s 띠의 밀도에 비하여 약 2배정도 진하게 보인다. mRNA들은 28s와 18s 라이보좀 RNA 사이에 희미하게 도말된 것 처럼 보인다. 결과적으로 위와 같은 방법으로 전기영동하여 라이보솜 RNA 띠(28s, 18s)를 볼 수 있었기에 total RNA가 분해되지 않고 잘 분리되었음을 확인 하였다. 전체 RNA는 -80℃에 보존하였다.

(1)(2)(3)(4)(5)

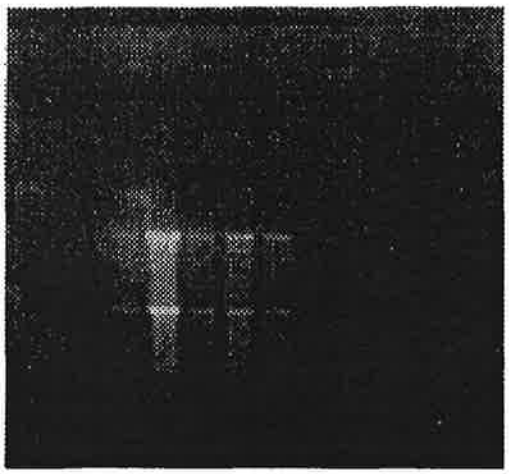


Fig. 13. RNA band pattern in agarose electrophoresis. Total RNAs were extracted from skeletal muscle of Korean cattle and separated by electrophoresis as described in Materials and Methods. The two bands clearly visible in each lane represent the rRNA:the upper band is 28S rRNA and the lower is 18S rRNA. The smear between these two bands represents the mRNAs. lane 1 : steer- loin; lane 2 : steer-tenderloin; lane 3 : bull-loin; lane 4 : bull-tenderloin; lane 5 : heifer-loin.

2. mRNA분리

Total RNA로 부터 oligo-dT cellulose를 이용하여 mRNA를 분리, 정제하였다. (Sambrook 등, 1987). Oligo-dT cellulose를 실험에 이용하기 위하여 1.5ml microtube에 0.05g의 oligo-dT cellulose와 1 x binding buffer 500ul를 넣고 조심스럽게 vortexing한 후 원심분리(3,400rpm, 3분)하여 상등액을 제거하였다. 0.1N NaOH 500ul를 넣고 조심스럽게 vortexing한 다음 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 이 과정을 각각 10회, 5회 반복하였다. Total RNA를 실험에 이용하기위해 RNA용액을 원심분리하여 70% ethanol로 세척후 실온에서 자연건조하였다. 250ul elution buffer를 첨가한 후 혼합하고 가열(65°C, 5분)하였다. 250ul의 2 x binding buffer를 첨가한 후 10분동안 상온에 방치하였다. 준비된 oligo-dT cellulose와 total RNA를 혼합하여 상온에서 약 3분간격으로 vortexing하며 15분

간 반응시키 원심분리(상온, 3,400rpm, 4분)하였다. 서로 결합된 poly-A⁺와 oligo-dT cellulose를 200ul의 1x binding buffer로 4회 반복 세척하였다. Oligo-dT cellulose에 부착된 poly-A⁺ RNA를 elution시키기 위해 세척한 sample에 elution buffer 200ul를 첨가한 다음 가열하여 원심분리하였다. oligo-dT cellulose가 섞이지 않도록 주의하여 상등액을 4회정도 반복하여 분리하였다. Total RNA에서와 마찬가지로 1% agarose gel에서 전기영동해보면 각각의 부수히 많은 정보를 담고 있는 여러 크기의 single strand 의 mRNA로 인해 어떤 선명한 띠가 보이지 않고 연무 형태로 뿌옇게 보였다. 또한 O.D. 값을 측정한 결과 흡광도 260/280의 값이 1.8로서 순수하게 mRNA가 잘 분리되었음을 확인하였다.

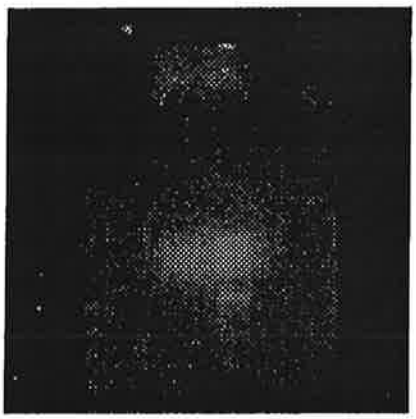


Fig. 14. mRNA in agarose electrophoresis after mRNA isolation from muscle tissue. (1): mRNA (2): total RNA

3. Total RNA로부터 cDNA 합성

한우의 근육내 존재하는 calpastatin의 sequencing을 알아보기 위하여 한우의 근육시료를 도살직후 채취하여 액체질소에 급속 냉동하여 실험실로 운반한 다음 근육내 total RNA는 Chomczynski and Sacchi (1987)의 방법에 따라 10g의 냉동 조직으로부터 분리하였다. cDNA를 합성하기위하여 먼저 새로운 1.5ml tube에 주형 RNA 1ug, oligo dT 1ul(100pmol/ul)와 10.5ul의 ddH_2O를 첨가한 다음 70℃에서 10분간 변성시켰다. 다음으로 5 x RT buffer 4ul, 0.1M DTT 2ul,

dNTP(10mM) 1ul, RNase inhibitor(40U/ul) 0.5ul 와 Reverstransecriptase (200U/ul) 1ul를 첨가하여 총 20ul로 반응용량을 만든 다음 37℃로 맞추어진 circulator에서 1시간동안 반응시켰다.

사진상에 나타나는 바와 같이 (2)(3) lane은 smear하게 나타남으로써 매우 여러 크기의 DNA들이 합성됨을 추측할 수 있다. 이는 total RNA를 주형으로하여 역기서열이 상보적인 매우 여러 종류의 1차 DNA 가닥들이 비교적 양호하게 합성됨을 알 수 있었다.

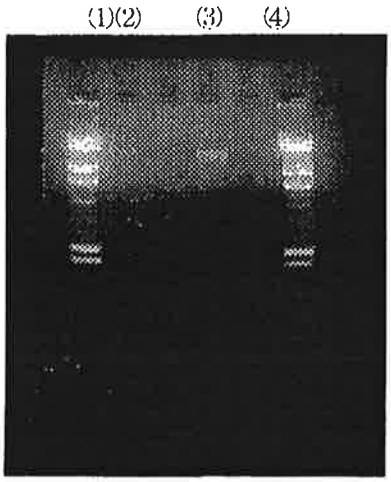


Fig. 15. cDNA synthesized by the Reverse Tanscriptase. A complementary DNA strand was synthesized by Moloney Murine Leukemia virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT). lane 1 and 4, λDNA/Hind III; lane 2 and 3, cDNA

4. Specific primer 합성

이미 토끼나 소에서 calpastatin 유전자의 염기서열들이 국내외 연구자들에게서 발표되고 있다. 이러한 calpastatin 유전자 염기서열들에 근하여 primer를 design한 다음 국내 Primer합성 전문업체인 (주)바이오니아에 크기가 2kb 정도로 추정되는 calpastatin 유전자의 5'방향 3개, 3'방향 3개로 하여 primer를 주문을 의뢰하였다. 각각 21개의 염기로 만들어진 specific 한 primer들은 PAGE에 의해 정제되었다.

Table 4. Synthetic primers for calpastatin RT-PCR in Hanwoo

Set	Primers	Direction
1	5‘-ATGAATCCCACAGAAGCCAAG-3'	5'
	5‘-CTTCAGAAAGTCACCATCTAC-3'	3'
2	5'-AATGATGCCATCGATGCCTTG-3'	5'
	5'-CTTTTCTCTTTGGGTGGAGCA-3'	3'
3	5'-TCTCACGATCCTCTTCTTTGG-3'	5'
	5'-AAACCCGTAGAGGATAAAGTC-3'	3'
4	5'-CCAAAGAAGAGGATCGTGAGA-3'	5'
	5'-TGTCTCTGTGTTCAGCTTTGG-3'	3'

5. 한우 calpastatin cloning을 위한 RT-PCR

소의 calpastatin **염기서열이 밝혀짐**(killefer **등**, 1994) **에 따라** RT-PCR(**역전사 중합효소 연쇄반응**)**을 이용하면 보다 용이하게 한우의** calpastatin**의 염기서열을 밝혀낼 수 있다**. **한우의 근육세포에서 분리되어진** RNA**를 주형으로 사용하여** RNA **양쪽 염기서열과 상보적인 염기**(A, T, G, C)**를 제작하여 시발체로 이용하였다**. **시발체는 주식회사 한국생명공학에 의뢰하여** 0.2 umole**를** poly-acrylamide gel**로 순수하게 정제하여 만들었다**.

Oligo name : u-CPST 5'-ATgAA TCCCA CAgAA gCCAA g-3'
Oligo name : d-CPST 5'-gCTgA TggAA AAAgT ACAAg-3'

만들어진 시발체와 역전사효소를 이용하여 1**차적으로 상보적인** DNA**가닥을 완성한다음** Taq DNA **중합효소를 이용하여 그와 똑같은 염기서열을 갖는** calpastatin **정보를 가지고 있는** DNA**를 만들었다**. PCR **조건은** ddH2O 84.5ul, 10x PCR buffer(+Mg) 10ul, 10mM dNTP 2ul, 5'**방향** primer(100pmol/ul) 1ul, 3'**방향** primer(100pmol/ul) 1ul, **주형** DNA(200ng/ul) 1ul, Taq DNA Polymerase (5U/ul) 1ul**를 함께 첨가하여** PCR **자동화 장치에서 특정한 온도조절 하에서 각** primer**들에 해당하는 부위를** RT-PCR**를 수행함으로서 증폭시켰다**.

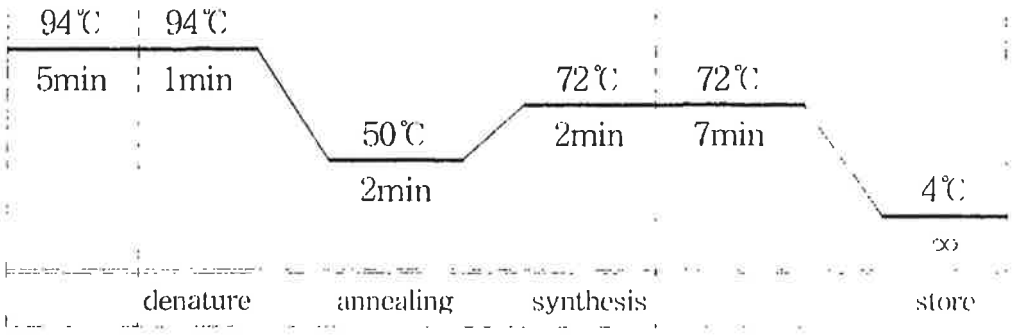


Fig 16. PCR condition for calpastatin synthesis (35 cycle)

그 결과 7가지의 PCR 반응을 유도하여 다음 Fig 17의 결과를 얻어냈다. 그러나 각각의 조건들이 다르므로 어떤 특정한 반응만을 유도하여 그 primer 조건에 알맞는 조건을 조사하였다.

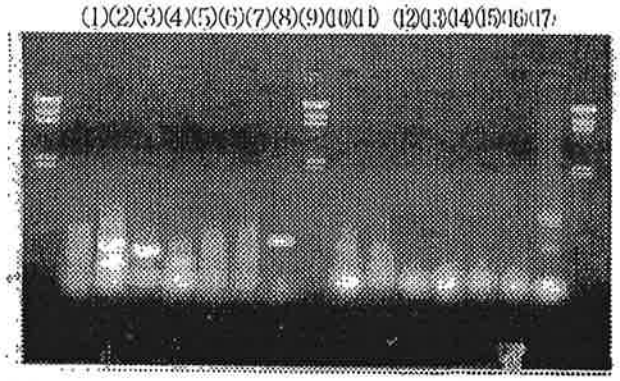


Fig 17. PCR amplified fragments for calpastatin. (1)(9)(17) : λ HindⅢ DNA maker, (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(10)(11)(16) : amplified products, (12)(13)(14)(15) : not synthesized

Table 4의 8개의 primer들을 이용하여 PCR를 해보면 Fig 17와 같이 여러개의 PCR product를 얻을 수 있다. 이 때 예상할 수 있는 PCR product 크기를 고려하여 최적의 PCR 조건을 확립하면서 한우의 calpastatin 유전자로 예상되는 부위를 증폭시켰다. Fig 18에서 (1)(6)은 DNA size marker(λ Hind Ⅲ, 123bp)이고, (2)(3)(4)(5)는 각각의 서로 다른 primer에서 증폭, 합성되어진 product이다.

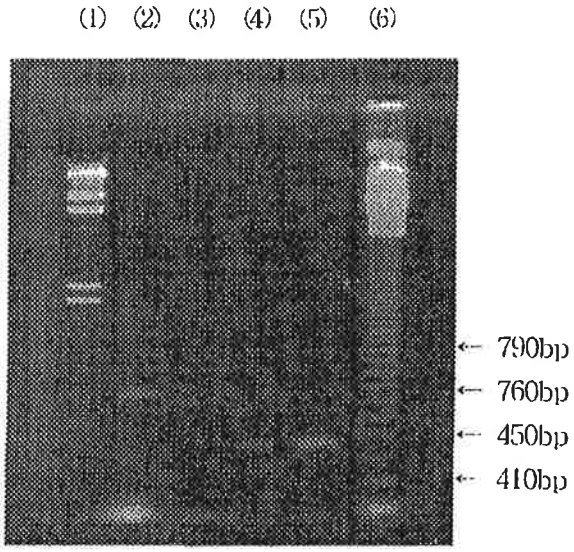


Fig 18. PCR products for specific calpastatin DNA. (lane 1, λDNA/Hind Ⅲ size marker; lane 2, 3, 4, and 5, amplified PCR products; lane 6, 123 DNA ladder size marker.

6. DNA ligation

이 과정은 보다 신속하고 정확한 sequencing를 위하여 PCR product를 plasmid vector에 삽입하는 과정으로서 유전공학적 기법의 일부이다. 일반적으로 합성되어진 PCR product는 3' 쪽에 염기중 하나인 A를 생성하게 된다. 이러한 현상을 이용하여 Promega 에서 제품화 되어진 pGEM(R)-T Easy Vector System 를 이용하여 PCR product를 ligation 시켰다. Microcentrifuge tube에 2X Rapid ligation buffer, T4 DNA ligase 5ul, pGEM(R)-T Easy Vector(50ng) 1ul, PCR product 3ul, T4DNA ligase(3weiss units/ul) 1ul 첨가후 실온에서 1시간 incubation 시키지만 4℃에서 overnight 하면 ligation 반응이 최적화된다.

아래 Fig 19 에서 보는 바와 같이 PCR product는 vector의 cloning site에 ligation 되어 plasmid에 삽입되어 JM109 라는 *E.coli* cell에 transformation 되어 진다.

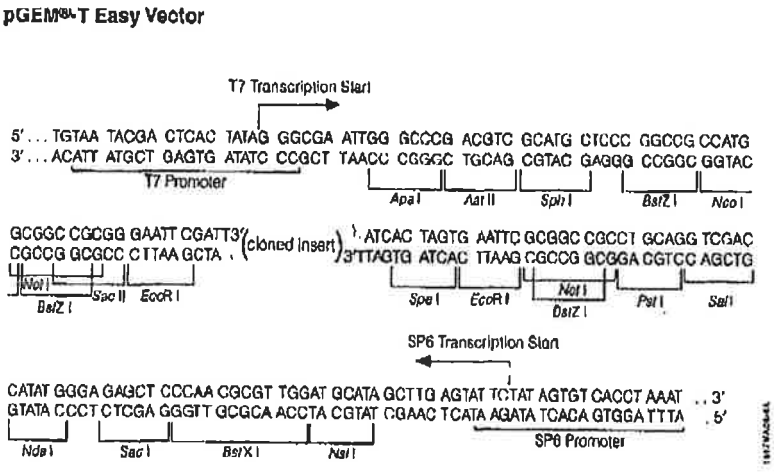


Fig 19. Promoter site and multiple cloning site in pGEM(R)-T Easy Vector

7. Calcium chloride를 이용한 competent *E.coli* 준비 및 DNA 전이

PCR product를 가지고 있는 plasmid는 *E.coli* cell의 세포막을 뚫고 쉽게 transformation 되어지지는 않는다. 이를 위하여 *E.coli* cell의 세포벽을 얇게 하는 작업이 competent cell을 제조하는 것이다. ① *E.coli* cell(JM109)를 LB plate에 streaking시켜서 37℃에서 16-20시간정도 배양한 후 single colony를 따서 LB broth 10ml에 넣는다. 강하게 shaking 하면서 O.D. 값이 0.5 이상이 되지 않도록 배양한다 (효과적인 transformation를 위하여). ② 배양액을 얼음에 식힌 다음 4℃, 4000rpm으로 10분간 원심분리하여 cell를 모은다. ③ 얼음 속에 넣어둔 0.1M $CaCl_2$ 2ml에 각 pellet를 재현탁 다음 다시 원심분리하여 cell를 모은다. ④ 0.1M CaCl2 200ul에 각 pellet을 재현탁한 다음 competent cell 20ul 와 최적의 plasmid DNA를 첨가하여 42℃의 항온수조에서 90초 동안 반응시킨다. ⑤ 이 tube에 SOC medium 800ul를 첨가한다. Plasmid에 의해 암호된 antibiotic resistance marker의 발현과 bacteria 회복을 위해서 37℃의 항온수조에서 45분간 배양한다. ⑥ Plasmid 에 의해 형질전환된 cell를 20mM MgSO4와 항생물질(Ampicillin)을 포함한 SOB agar plate에 도말한다. ⑦ 37℃에서 plate를 12-16시간 incubation한다.

배양 후 white colony 와 blue colony가 생기는데 white colony는 ligation 되

어진 plasmid가 transformation 되어 ampicillin 저항성을 가지고 있어서 증식되어진 것이고 blue colony는 PCR product 가 삽입되지 않아서 plasmid 자체가 self-ligation 되어진 것이다. 이것은 plasmid를 Miniprep 한다음 얻어진 DNA를 전기영동해보면 ligation 된것과 그렇지 않은 것을 쉽게 구분할 수 있다. 이외에 transformation 되지 않은 *E.coli* 는 모두 사멸된다.

8. Plasmid의 Miniprep

① 배양이 끝난 LB/Amp broth 5ml 중 1.5ml 씩 2개의 ET에 옮겨 3,400rpm에서 5분간 cell을 침전시킨 후, 상등액을 버린 다음 Solution I(50mM glucose, 25mM Tris-HCl(pH 8.0), 10mM EDTA) 100ul를 첨가하고 vortexing 한다. ② 시험당일에 제조한 Solution II(0.2N NaOH, 1% SDS)를 200ul 첨가한 후 5번정도 흔들어 얼음속에 저장한다. ③ 차가운 Solution III(5M Potassum acetate 60ml, glacial acetic acid 11.5ml, H_2O 28.5ml)넣고 흔들어준다. ④ 4℃, 15000rpm, 5분간 원심분리하고 새로운 tube에 상등액을 따른 후 phenol:chloroform으로 정제 다음 ethnol로 침전하고 세척한 후 DNA pellet를 모아 TE buffer에 녹여 sequencing에 이용한다.

9. Calpastatin DNA Sequencing

합성된 PCR product들의 염기서열을 결정하기 위하여 초반 실험에서는 Sanger 방법을 이용하여 direct sequencing를 실시하였으나 실험결과가 그리 좋지 않아 위에 설명하것처럼 pGEM®-T Easy Vector System을 이용하여 실시하였다. Sequencing은 전남대학교내 기초과학지원연구소에서 실시하였고 이에 이용되어진 kit는 ABI Prism Bigdye Terminator cycle sequencing kit(part No. 4303149)를 사용하였고 분석기기는 자동분석기기인 ABI Prism 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer, Co.)를 이용하였다. 그 결과 다음과 같이 총 4개의 PCR product 중 그림 5의 ④⑤ lane에 해당하는 2개의 insert를 sequencing 할 수 있었다.

5'-CCAAAGAAGAGGATCGTGAGAAACTTGGTGAAAAAGAAGAAACGAT
TCCTCCTGATTACAGATTAGAAGAAGCCAAGGATAAAGACGGAAAACCA
CTGCTGCCAAAAGAGGTCAAGGAACCGCTCCCACCCTTGAGTGAAGACGT
CCTCCTCGATGCTCTGTCCAAGGACTTCACTGTCCCCTCAGACACATCAT
CGCCTCAATTTGAAGATGCTAAACTTTCAGCTGTCGTCTCTGAAGTGGT
TTCCCAAACCCCAGCTCCAACCACCCAGGCAGCCGGTCCACCCCCCAGCAC
TGCGCAGCGTGACAACAAAGAACTTGACGATGCCCTGGATCAACTTTCT
GACAGTCTCGGGCAAAGACAGCCTGATCCAGATGAGAATAAACCCGTAG
AGGATAAAGTCAAGGAAAAAGCCAAAGCTGAACACAGAGACAAGCTGGG
AGAAAGAGATGACACCATCCCACCTAAATACCAACATCTTTTGGATGAC
AACAAGGAGGGCACACCCGGGAAGCCAAAGGCATCAGAGAAGCCCAAGG
CATCAGAGAAACCTGCAGGTGCCCAGGACCCCATTGATGCCCTCTCAGGG
GACTTTGACAGCTGTCCCTCGACTACAGAAACCTCGACAGACACACCAA
AGGACAAAGACAAGAAGCCTGCTTCCAGTGCCGAAGCACCTAGGAATGG
CGGGAAAGCAAAGGATTCCACAAAGGCAAAGGAGGAAACTTCCAAGCCA
AAAGCTGATGGAAAAAGTACAAGTTAAAGTTCACACTATTTGGTATCT
GCATATAAAATCTTCAGCGGGTAGATGGTGACTTTCTGAAG-3'

위의 826bp**의 염기를 미국** National Institutes of Health (NIH)**의** National Center for Biotechnology Information (NCBI)**에서 제공하는** GenBank data**의** BLAST search **결과 다음과 같은 결과가 얻어졌다**.

Query: 1 ccaaagaagaggatcgtgagaaacttggtgaaaaagaagaaacgattcctcctgattaca 60
S:1726 ccaaagaagaggatcgtgagaaacttggtgaaaaagaagaaacgattcctcctgattaca 1785

Query: 61 gattagaagaagccaaggataaagacggaaaaccactgctgccaaaagaggtcaaggaac 120
Sbjct: 1786 gattagaagaagccaaggataaagacggaaaaccactgctgccaaaagaggtcaaggaac 1845

Query: 121 cgctcccacccttgagtgaagacgtcctcctcgatgctctgtccaaggacttcactgtcc 180
Sbjct: 1846 cgctcccacccttgagtgaagacgtcctcctcgatgctctgtccaaggacttcactgtcc 1905

Query: 181 cctcagacacatcatcgcctcaatttgaagatgctaaactttcagctgtcgtctctgaag 240
Sbjct: 1906 cctcagacacatcatcgcctcaatttgaagatgctaaactttcagctgtcgtctctgaag 1965

Query: 241 tggtttcccaaaccccagctccaaccacccaggcagccggtccacccccccagcactgcgc 300
Sbjct: 1966 tggtttcccaaaccccagctccaaccacccaggcagccggtccacccccccagcactgcgc 2025

Query: 301 agcgtgacaacaaagaacttgacgatgccctggatcaactttctgacagtctcgggcaaa 360
Sbjct: 2026 agcgtgacaacaaagaacttgacgatgccctggatcaactttctgacagtctcgggcaaa 2085

Query: 361 gacagcctgatccagatgagaataaacccgtagaggataaagtcaaggaaaaagccaaag 420
Sbjct: 2086 gacagcctgatccagatgagaataaacccgtagaggataaagtcaaggaaaaagccaaag 2145

Query: 421 ctgaacacagagacaagctgggagaaagagatgacaccatcccacctaaataccaacatc 480

Sbjct: 2146 ctgaacacagagacaagctgggagaaagagatgacaccatcccacctaaataccaacatc 2205

Query: 481 ttttggatgacaacaaggagggcacacccgggaagccaaaggcatcagagaagcccaagg 540
Sbjct: 2206 ttttggatgacaacaaggagggcacacccgggaagccaaaggcatcagagaagcccaagg 2265

Query: 541 catcagagaaacctgcaggtgcccaggaccccattgatgccctctcaggggactttgaca 600
Sbjct: 2266 catcagagaaacctgcaggtgcccaggaccccattgatgccctctcaggggactttgaca 2325

Query: 601 gctgtccctcgactacagaaacctcgacagacacaccaaaggacaaagacaagaagcctg 660
Sbjct: 2326 gctgtccctcgactacagaaacctcgacagacacaccaaaggacaaagacaagaagcctg 2385

Query: 661 cttccagtgccgaagcacctaggaatggcgggaaagcaaaggattccacaaaggcaaagg 720
Sbjct: 2386 cttccagtgccgaagcacctaggaatggcgggaaagcaaaggattccacaaaggcaaagg 2445

Query: 721 aggaaacttccaagccaaaagctgatggaaaaagtacaagttaaagttcacactatttgg 780
Sbjct: 2446 aggaaacttccaagccaaaagctgatggaaaaagtacaagttaaagttcacactatttgg 2505

Query: 781 tatctgcatataaaatcttcagcgggtagatggtgactt 819
Sbjct: 2506 tatctgcatataaaatcttcagcgggtagatggtgactt 2544

Cong, M. 등이 1998년 J. Biol. Chem. 273 (1), 660-666 에 발표한 논문에서 소(Bos taurus 종)의 심장근육내 calpastatin 유전자의 sequencing을 보고했는데 우리가 밝혀낸 819bp와 homology가 100% 일치한 것으로 나타났다. 한우도 Bos taurus종의 한 품종이기에 이러한 결과가 나왔으리라 보여지지만 심장근육과 저희가 시료로 사용한 골격근내 calpastatin의 sequence가 100% 같다는 것은 흥미로운 결과가 아닐 수 없다. 또한 Koohmaraie, M 등은 1994년 J. Anim. Sci. 72(3):606-14에 Bos taurus 종의 골격근내 calpastain 유전자의 sequencing을 발표하였는데 흥미롭게도 우리와 같은 골격근을 시료로 사용하였는데 96% homology를 보였다. 이미 밝혀진 다른 동물의 calpastatin 유전자와 homology를 조사해보면 대부분 85%이상의 상관도를 보여주었다.

5'-ATGAATCCCACAGAAGCCAAGGCTGTAAAAACAGAACCTGAGAAGA
AGCCACAATCATCTAAGCCATCTGTGGTTCATGAGAAAAAAACCCAAGA
AGTAAAGCCAAAGGAACACACAGAGCCAAAAAGCCTACCCAAGCACTCA
TCAGATACAGGAAGCAAGCATGCTCCTAAGGAAAAAGCCGTTTCCAAAT
CAAGCGAGCAGCCACCATCAGAGAAATCAACAAAACCAAAGACCAAGTC
ACAGGACAAGATCTCCGGTGGTGGAAAGAGCGCTGTTCCTGCTGCTGCT
GCTGCAGCATCTGCCAAACCAGCTGACAAGAATAAAGAAAATAAATTGT
TAACATCGGCCGTACCAGCTGAATCTAAACCAAGTAAACCATCTGGAAA
GTCAGACATGGACACTGCTCTTGGATGACTTAATAGACACTTTAGGAGA
ACCTGAAGAGATGAAAGAAGATAACACAACATATACTGGACCAGAAGT
GTCGGATCCAATGAGTTCTACCTACATAGAGGAACTGGGTAAAAGAGAA
TCCACACTTCCTCCAAAATATAAGGAACTTCTGAATAAAGAAGAAGGGA
TCGCAGGGCCTTCTTCAGACTCCTTGAAACCCCTGGGGCCCAATGATGCC
ATCGATGCCTTGTCATCCGACTTCACCTGCAGTTCCCCTACAGCTGATGC
AAAGAAAACTGAGAAAGAGAAATCTACAGAAGAGGCTTTAAAAGCTCA
GTCAGCTGGGGTGATCAGAAGTGCTGCTCCACCCCAAGAGAAAAAAAGG
AAAGTGGAAAAGGATGCCATGACTGAGCACGCCCTGGAGGCCCTGTCAG
CCTCCCTGGGCACCCGGAAGCCGGAGCCGGAGCTCGACCCCAGCTCCATT
AAGGAGGTCGATGAGGCAAAAGCCAAAGAAGAGAAAGTAAAGAAATGT
GGTGAAGATGAGGAAACAGTCCCATCGGAGTACAGATTAAAACCGGCCA
CAGATAAAGATGGAAAACCACTCTTGCCAGAGGCTGAAGAAAAACCCAA
GCCCCTGAGTGAATCAGAACTCATCGATGAACTCTCAGAAGATTTTGAC
CAGTCTAAGTGTAAAGAAAAACAATCTAAGCCAACTGAAAAAACAGAG
GCATCCCCGGCTGCTGCCCCCGTGCCCGTGGCAGAGGACGTGCCTCGGACC
TCCATGTGTTCTGTGCAGTCGGCTCCGCCACAGCAGCTCCAGCGAAGGGC
ATGGTGCCAGACGATGCTGTCGAAGCCTTGGCTGGAAGCCTGGGCAAAA
AGGAAGCAGATCCAGAAGACGGAAAGCCTGTGGAGGATAAAGTCAAGGA
GAAAGCCAAAGAAGAGGATCGTGAGAAACTTGGTGAAAAAGAAGAAAC
GATTCCTCCTGATTACAGATTAGAAGAAGCCAAGGATAAAGACGGAAA
ACCACTGCTGCCAAAAGAGGTCAAGGAACCGCTCCCACCCTTGAGTGAAG
ACGTCCTCCTCGATGCTCTGTCCAAGGACTTCACTGTCCCCTCAGACACA
TCATCGCCTCAATTTGAAGATGCTAAACTTTCAGCTGTCGTCTCTGAAG
TGGTTTCCCAAACCCCAGCTCCAACCACCCAGGCAGCCGGTCCACCCCCCA
GCACTGCGCAGCGTGACAACAAAGAACTTGACGATGCCCTGGATCAACT
TTCTGACAGTCTCGGGCAAAGACAGCCTGATCCAGATGAGAATAAACCC
GTAGAGGATAAAGTCAAGGAAAAAGCCAAAGCTGAACACAGAGACAAGC
TGGGAGAAAGAGATGACACCATCCCACCTAAATACCAACATCTTTTGGA
TGACAACAAGGAGGGCACACCCGGGAAGCCAAAGGCATCAGAGAAGCCC
AAGGCATCAGAGAAACCTGCAGGTGCCCAGGACCCCATTGATGCCCTCTC
AGGGGACTTTGACAGCTGTCCCTCGACTACAGAAACCTCGACAGACACAC
CAAAGGACAAAGACAAGAAGCCTGCTTCCAGTGCCGAAGCACCTAGGAA
TGGCGGGAAAGCAAAGGATTCCACAAAGGCAAAGGAGGAAACTTCCAAG
CCAAAAGCTGATGGAAAAAGTACAAGTTAAAGTTCACACTATTTGGTA
TCTGCATATAAAATCTTCAGCGGGTAGATGGTGACTTTCTGAAG-3'

Fig. 20. Full-length nucleotide sequence of hanwoo calpastatin DNA.

제4장 미세 현미주입 기법으로 calpastatin antisense DNA를 주입한 한우 난자의 발생

제1절 서론

포유동물 난자의 미성숙 난포란을 채취하여 체외배양시 체내에서 일어나는 일련의 핵성숙 과정이 일어난다는 최초보고(Pincus와 Enzman, 1935)이후, 난소의 형태(Motlick 등, 1984 ; Byun 과 Lee, 1992)와 난포의 크기(Leibfried 와 First, 1979 ; Nagai 등, 1993) 및 성숙배양시간(Yoshida 등, 1989 ; Wang 등, 1992 ; Bousquet, 1994 ; 이 등, 1994)등이 미성숙 난포란의 체외성숙에 미치는 영향에 관하여 연구가 수행되어 왔으며, 배양액의 종류 (Eng 등, 1986 ; 정 등, 1993), 배양액내 성선자극 호르몬과 혈청의 첨가(Linder 등, 1974 ; Channing 등, 1978 ; Racowsky, 1985 ; Naito 와 Toyoda 등, 1992) 등 적절한 체외성숙 배양조건을 구명하려는 연구가 이어져 왔다. 그러나 체외성숙 유기시 난구세포와 난포란이 미세융모로 연결되어 있는 수가 적고, 쉽게 분리되어 gap junction의 감소가 빨라지기 때문에 물질이동에 장해가 발생(Motlick 등, 1984)하고, 성숙시 일어나는 난 세포질 내에 glutathione과 같은 물질의 합성에 장해를 초래(Funahashi 등, 1995)하여 성숙시간이 길어지고 수정시 다정자 침입율이 높아지며, 정자 두부의 팽화, 웅성전핵(male pronucleus)형성율의 감소 및 체외발생능 정지현상(in vitro cell block)을 초래하는 등 결과적으로 체외수정란 생산 및 산자생산이 극히 제한되고 있는 실정이다(Ball, 1983 ; Racowsky, 1991). 이러한 체외 성숙난자의 배발생이 저조한 것은 난포란의 핵 성숙 및 세포질 성숙이 체내상태에서의 성숙과 같이 정상적으로 일어나지 않을 뿐 아니라 수정 및 배발생의 조건이 적합하지 않은데 있으며(Sanbuissho 와 Threlfall, 1989 ; Iwasaki 와 Nakahara, 1990), 체외배양시 핵 성숙은 정상적으로 일어나 제 2성숙분열 중기에 도달하나, 세포질 성숙이 정상적으로 일어나지 않아 이것이 그 후의 수정 및 배 발생에 영향을 미치기 때문(Schellander 등, 1990)이라고 여겨지고 있다. 소 체외수정란의 체외배양시 8 16 세포기에서 발육정지 현상(Thibault, 1966)이 나타나서 이식 가능한

상실배기 이상의 수정란 확보율은 극히 저조한 실정인데, 이러한 발육억제 원인으로는 난관 또는 자궁상피세포에서 분비되는 미지의 인자와, 난관과 자궁의 조건 및 수정란의 발육에 유해한 영향을 미치는 요인을 제거하는 조건을 체외에서 만들지 못하여 일어나는 것으로 보고되고 있다(Bigger, 1987 ; Riger 등, 1991). 최근에는 초기배 수정란의 genome 활성화 유·무와 체외배양액 내의 높은 산소농도에 의해 발생되는 free radical 이 원인으로 보고되고 있는데(Bize 등, 1991 ; Pabon 등, 1989), 수정란의 체외배양체계가 체내와 상이한 조건 중에 한가지로 체외수정란의 체외배양 조건은 체내에서 발육되는 것보다 산소 농도가 높기 때문에 배양액 내에는 free radical의 생성이 많은 것으로 알려져 있다. Thompson 등(1990)은 체세포 공동배양체계가 산소농도를 줄여주며, 항산화물질을 생산하는 작용을 하는 것으로 보고하였고, 체외 배양액 내에 존재하는 free radical을 제거하기 위한 수단의 일환으로 항산화제를 첨가함으로써 수정란의 발육억제 현상을 극복시킬 수 있다고 보고(Li와 Foote, 1993 ; Grupen 등, 1995 ; Guyader- Joly 등, 1998)하고 있다. 한편, 근래 생식세포와 관련된 발생생물학적 연구들이 많은 연구자들에 의해 연구되어지고 있다. 이러한 연구결과들이 산업적인 기술로 발전되기 위하여 대량의 난포란이 원할하게 공급되어져야 하는데 이를 위하여 미성숙 난포란, 미수정란, 수정란의 동결보존, 융해 및 체외수정기술의 개발이 매우 시급히 요청되고 있다.

최근 Wood등(1995)은 생쥐 난포란을 완만동결시켜 높은 산자 생산율(46%)을 보고하고 있으나 경제동물인 소나 돼지에서의 난포란의 동결보존에 관한 연구가 많지 않고 동물종에 따라서 난포란의 동결보존 결과가 매우 다르게 보고되고 있다. 난포란은 수정란과는 달리 온도충격에 매우 민감하며(Heyman, 1986 ; Niemann, 1991) 특히 고농도 유리화 동결액의 독성과 삼투압 피해는 난포란의 성장을 억제하는 세포분열의 정체현상 또는 수정이 진행되는 동안 염색체의 비분리현상으로 인하여 다배체 수정란 혹은 정자침입이 이루어지지 않아 해결해야 할 많은 문제점이 있다. Lin(1966)이 생쥐 난자내에 bovine gamma globulin을 미세현미주입하여 성공한 이후 이 분야에 대한 연구는 많은 연구자들에 의하여 활발하게 연구되어 미세현미주입 기법으로 외래 유전자 등 유전물질을 비롯한 다양한 물질들이 동물 난자내에 이식 좋은 성과를 거두고 있다. (lin 과 Monie,

1973 ; Glass 등 , 1974 ; Seidel 1982, 1983 ; Brem 등, 1985 ; Hammer 등, 1986 ; Pursel 등 , 1987 ; McEvoy 와 Sreenan, 1990 ; Takeda 와 Toyoda, 1991 ; 나 등, 1994 ; Kubisch 등, 1995) 이러한 미세현미주입 기법은 형질전환 동물을 생산 동물 유전형질을 빠르게 개선할 수 있으며 동물의 성장 발육, 번식 효율 등 형질 개선에 크게 이용 될 수 있다.

따라서 본 연구는 첫째 배양액과 배양액내 호르몬 및 혈청첨가가 초우체외수정란의 효율적 생산과 둘째 초우 미성숙난포란과 체외수정란의 동결배지종류, 평형시간, 급속동결 융해 후 생존성에 미치는 영향을 구명, 미세 현미주입된 초우 수정란의 보존성증진 셋째 한우체외수정란에 micro injection technique을 적용 형질전환된 한우 수정란을 생산하고자 수행하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 체외성숙

가. 난포란의 채취 및 평가

체외수정기법에 의하여 한우체외수정란을 대량 생산하기 위하여 우선 미성숙 난포란의 체외성숙기술의 확립이 필수적이다. 이를 위하여 한우 미성숙 난포란의 체외성숙용 배양액, 배양액에 첨가하는 혈청과 호르몬의 종류 등에 관한 연구가 요청되는데 지금까지 수행한 연구내용은 다음과 같다. 도살된 암소로부터 난소를 채취 100IU/ml의 penicilline G와 100 ug /ml streptomysin sulfate를 첨가한 생리식염수에 보존, 2시간이내 실험실로 운반 2-3회 세척한 다음 10ml 주사기(18G)를 이용 직경 3-8 mm 인 난포로 부터 흡인하여 난포란을 채취하였다. 회수된 난포란은 실체현미경(Nikon, Japan)하에서 Fig. 1에 제시한 바와 같이 다층의 난구세포로 둘러싸여 있으며 난세포질이 균한것은 A등급, 다층의 난구세포로 난자의 대부분이 둘러싸여 있으며 난세포질이 균일하나 일부분이 적게 보일때 B등급, 난구세포가 거의 벗겨져 있고 전체적으로 난세포질이 어두워 보일때 C등급, 난구세포층이 사방으로 퍼져 있고 난세포질이 균일하지 않을때

D등급 등 난포란의 형태에 따라 4등급으로 분류하고 A와 B등급에 해당하는 난포란만을 선택 체외성숙을 유도하였다.

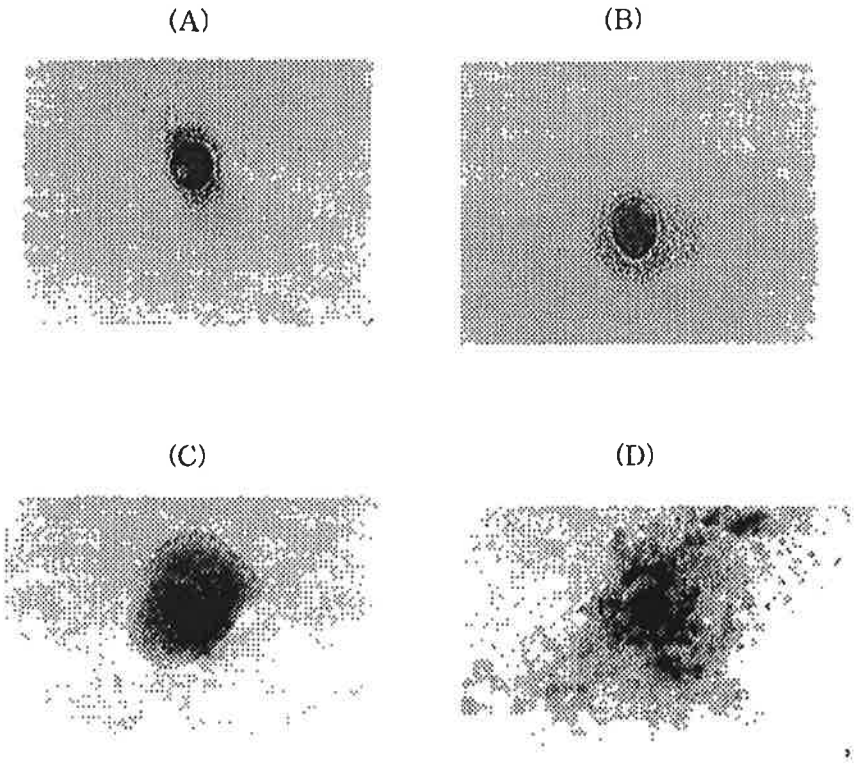


Fig 1. Quality of follicular oocytes classified by cumulus cells

Grade A - Cumulus-oocytes complexes(COC) completely surrounded by at least 4~5 layers of cumulus cell in combination with a homogeneous cytoplasmic pigmentation.

Grade B - COC surrounded by 2 or 3 layers of cumulus cells.

Grade C - COC partially denuded.

Grade D - COC spread and unhomogeneous.

나. 체외성숙

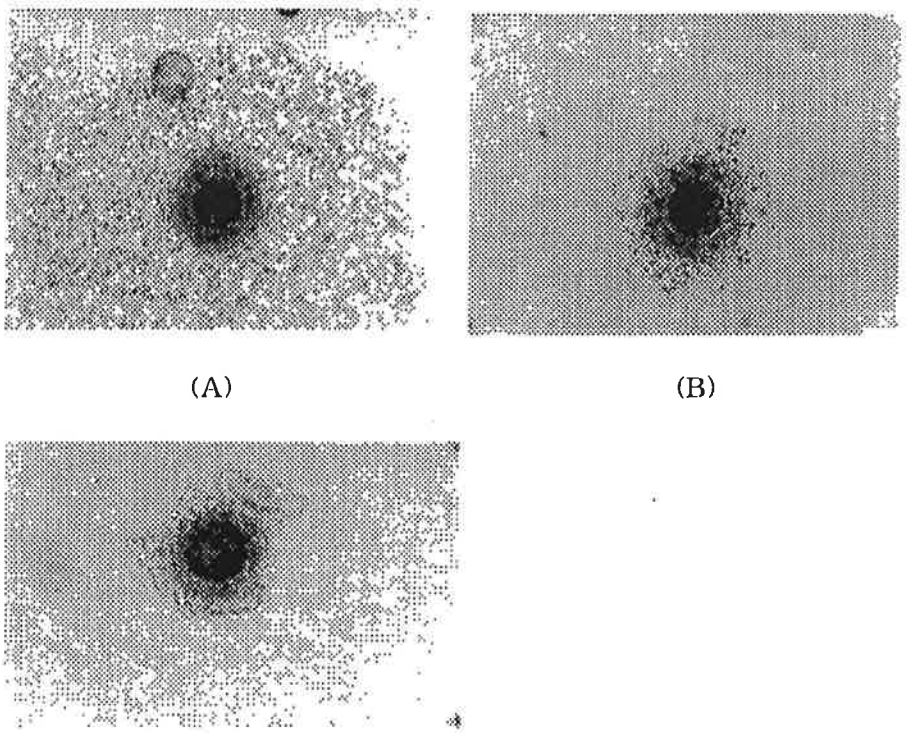
한우 미성숙 난포란의 동결융해 후 체외성숙을 위한 배양액 조성은 Table 1과 같다.

Table 1. Hanwoo oocytes maturation medium

TCM-199	8mℓ
Fetal cell serum	2mℓ
Pyruvate stock	100μℓ
Gentamycine stock	10μℓ
PMSG	10IU/mℓ
HCG	10IU/mℓ
17β-estradiol	1μg/mℓ
Adjust the pH to 7.4	

2. 체외수정

미성숙 난포란을 체외성숙 유기후 Fig. 2에 제시한 바와같이 A와 B등급 난포란만을 체외수정에 공시하였다.



(A) (B)

(C)

Fig 2. Cumulus cell expension of bovine oocytes at 20h in vitro maturation.
A - Fully expanded, B - Partially expanded, C - None expanded

가. 정자의 준비

한우개량본부 한우 개량부에서 생산된 한우 동결정액을 액체질소탱크에서 꺼내 공기 중에서 약 5초간 방치하고 38 ℃의 water bath에서 30초간 융해시킨 후 10 mM caffeine이 첨가된 B.O. 배양액이 담겨져 있는 15 ㎖ 시험관에 혼합하여 희석한 다음 500 × g 으로 5분간 2 3회 원심분리 한 후, 정자 pellet을 5 mM caffeine 과 0.5 % BSA, 10 ㎍/㎖ heparin이 첨가된 B.O. 배양액으로 재부유 하였다. 그 후 정자의 최종 농도가 1 × 106 정자/㎖가 되게 조정하여 체외수정에 대비하였다.

나. 체외수정

수정능획득 정자를 함유한 체외수정 배양액 200 ㎕의 소적을 60 × 15 ㎜ petri-dish(Nunc, Denmark)에 만든 후 mineral oil(Sigma, U.S.A)로 피복하고 체외성숙된 난자를 체외수정용 B.O. 배양액으로 2 3회 세척한 후 정자 소적 당 45 50 개씩 옮겨 6시간 동안 CO2 incubator에서 체외수정을 유도하였다. 체외수정 6시간 후에 체외배양액에 옮긴 후 다시 6시간 동안 체외배양 시킨 수정란을 acetic acid 와 ethylalcohol을 3 : 1 로 혼합한 용액에 48시간 이상 고정시킨 후 1 % orcein 과 45 % acetic acid 로 염색하여 위상차 현미경(Nikon, Japan)하에서 난자의 수정율과 다정자 침입율을 조사하였다. 난자 내 정자 또는 웅성전핵이 관찰되면 정자의 침입이 이루어졌다고 판단하고, 한 개 이상의 정자와 웅성전핵이 관찰되면 다정자 침입으로 간주하였다(Nagai 등, 1984 ; Kano 등, 1994).

다. 정자의 첨체반응 조사

정자의 첨체반응 조사는 CTC(Chloride tetracycline)염색방법으로 정자를 염색한 후 정자 두부의 bend를 조사하였다. 즉 정액을 세척액(B.O medium)으로 3회 세척한 후 체외 수정시와 동일한 방법으로 정자수를 계산(1×107/㎖), 1000 ㎕의 정액을 취하여 CO2 배양기에서 배양한 다음 6 cc PVP Solution 과 혼합 후 1200 g 에서 6분간 원심분리한 후 CTC 염색용액과 혼합하여 알미늄 호일로 빛을 차단하였다. 여기에 CTC 고정용액을 넣고 Slide를 제작 형광현미경 하에서 정자 두부를 관찰하여 첨체반응을 조사하였다(Lynn 등, 1995).

3. 체외수정란의 배양 및 판정

가. 체외수정란의 배양

체외발달 배양액(TCM-199, Ham's F-10, CR1aa, SOF)에 FCS(10% VS 20%)와 BSA(0.4% VS 1%)를 첨가 미소적을 작성한 후 mineral oil로 피복 CO2 배양기내에서 정치 체외발달에 대비하였다. 체외수정이 완료된 체외수정란 20 25개씩을 준비한 미소적 내로 옮겨 CO2배양기 내에서 배양시키면서 체외발달 상태를 24시간 간격으로 조사하였으며, 소 OVCM (Oviductal conditioned medium) 제조는 난관을 채취 난관내벽이 보이도록 절개하고 길이 3-4mm 정도씩 잘게 자른 다음 petri dish에 배양액(TCM-199) 5㎖ 당 10조각정도씩 넣고 epidermal growth factor(25ng/㎖)를 넣은 다음 CO2 배양기 내에서 16-18시간 배양 후 다시 2㎖의 신선배양액을 보충하고 24시간동안 배양한 후 원심분리하여 상층액만 분주 동결보존 사용하였다.(Anderson 과 Killian, 1994)

나. 체외 수정란의 판정

체외 수정란의 수정과 생존성의 판정은 배양액에서 배양시키면서 상실배 또는 배반포배로의 발달상태를 관찰 판정하였다.

4. 체외수정란의 동결보존

가. 한우 미성숙 난포란의 동결보존액

1) 동결보존액 : 한우 미성숙 난포란의 동결보존액은 Table 2에 제시한 2종류의 보존액을 제조 이용하였다.

Table 2. Vitrification solution for hanwoo oocytes

Type	
Ⅰ	. TCM-199+20% FCS+1.5M DMSO+2.0M Glycerol+0.25M sucrose
Ⅱ	·DPBS+20% FCS+10% Glycerol+0.25M Sucrose+0.125M Glucose
	·DPBS+20% FCS+10% Glycerol+10% Ethyleneglycol+0.25M Sucrose+ 0.25M Glucose
	·DPBS+20% FCS+10% Glycerol+10% Ethylene glycol+0.375M Sucrose+0.375M Glucose

2) **동결 및 융해방법** : Table 2**에 제시한 동결보존액에 평행시킨 다음** 0.25㎖ Straw(I.M.F., France)**에** Fig. 3**에 제시한 방법으로 충전하고** 1㎝ **높이의 액체질소 부표 위에** 5**분간 예냉시킨 다음 곧바로 액체질소에 침지하여 동결하였다. 동결 미성숙난포란의 융해는 액체질소탱크에 저장된** Straw**를 꺼내** 35℃ **온수조에서 융해 후 내용물을** petri dish**에 옮겨 신선한 배양액으로** 3 4**회 세척하여 체외성숙 시켰다.**

SP	VS	A	EFS	A	EFS	A	EFS	A	VS	CP

Fig 3. Configutration of 0.25㎖ straws loaded vitrification solution before vitrification

CP : Cotton plug, VS : Vitrification solution, A : Air

EFS : Vitrification solution + Oocytes, SP : Straw powder

나. 한우체외수정란의 동결보존액

제2**세포기와 배반포배 한우체외수정란은** straw**에** loading**후 항동해제** EG**와** EFS40**을 사용, 알콜 동결기에서 동결 유도하였다.**

5. 미세주입

가. 미세현미 피펫 제작

미세현미 피펫 제작 및 세공은 Microelectrode puller, Microforge (Narishige Co., Japan) 등을 사용하여 Lin(1966, 1971) 그리고 Seidel(1982)의 방법에 준하여 Fig. 4에 제시한 바와 같이 제작하였다.

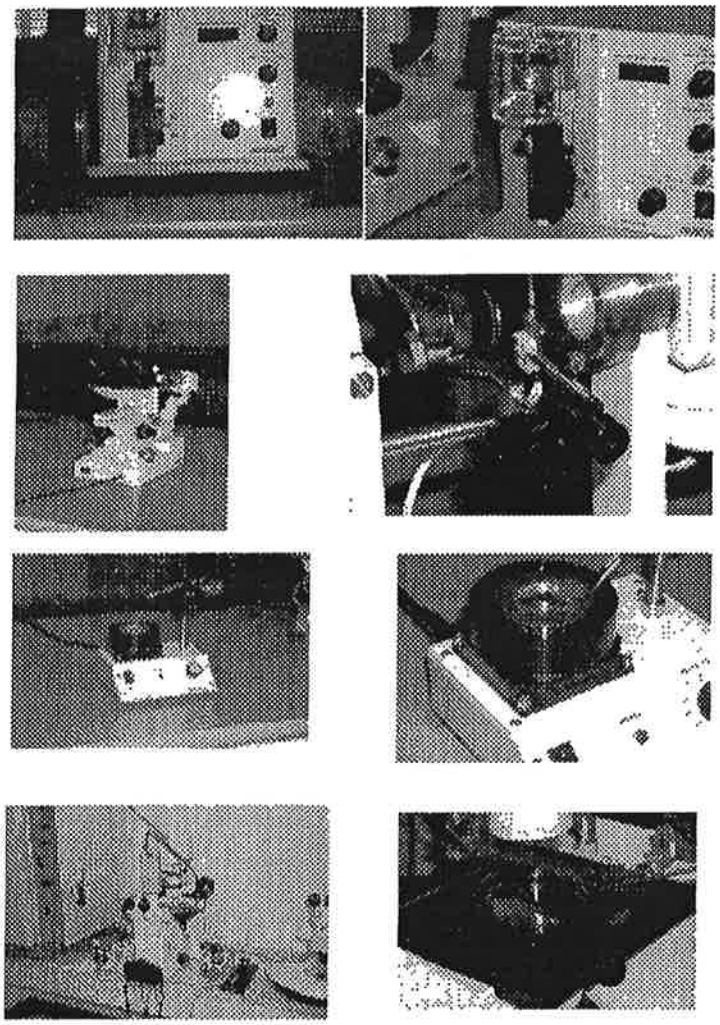


Fig 4. Micromanipulator system

A : Micro puller B : Micro forge C : Micro grainder

D : Inverted microscope with micro injector

나. 공시 난자의 준비와 미세현미주입

체외수정 유기 16 - 18 시간 후 원심분리하여 수정란의 난구세포와 지방구를 제거한 다음 전핵이 형성된 난자만을 선택 Fig. 5에 제시한 바와 같이 전핵 내에 DNA를 미세주입 하였다. 즉 Wagner 등(1984)의 방법에 준하여 100 - 400 배율로 조정된 도립현미경(Narishige)에서 슬라이드에 난자 보존액 0.2ml를 방울이 형성되도록 떨어뜨린 다음 Oil로 덮었다. 난자 보존액 방울속에 모세관 피펫을 사용하여 5 - 10 개의 공시 난자를 옮긴 다음 holding 피펫으로 공시 난자를 흡인 보정하고 DNA를 충전한 injection 피펫을 보정된 공시 난자의 투명대를 천자하고 투명대 통과 후 곧바로 난황막을 천자하는데 이때 난황막이 밀려가 난황막과 투명대 사이에 간극이 벌어지지 않도록 유의하였다.

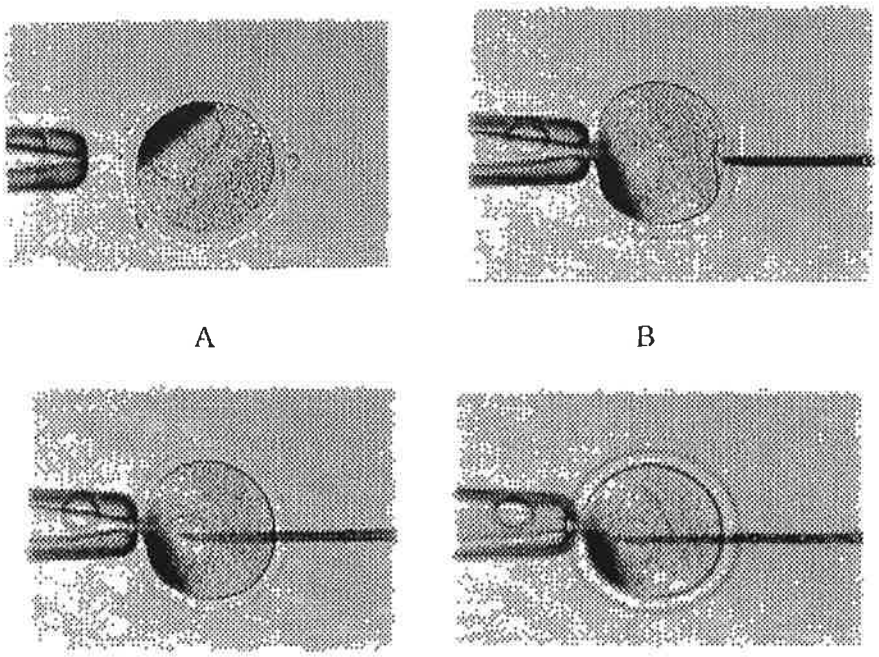


Fig 5. Microinjection of bovine embryo. A : Egg is held by holding pipette using gentle suction. B : Injection pipette aligned before DNA injection. C : Expended pronucleus. D : DNA injection

제3절 결과 및 고찰

1. 한우 미성숙 난포란의 체외성숙과 체외수정

가. 한우 미성숙 난포란의 질

Table 3은 한우와 Holstein종 난소로부터 채취한 난포란의 질을 Fig. 1에서 제시한 난포란의 형태에 따른 4등급 분류방법에 의해 소 품종별로 구분 제시하였다.

Table 3. Quality of follicular oocytes classified by breeds

Breed	No. of Oocytes examined	Oocytes Quality(%)			
		A	B	C	D
Hanwoo	341	144(42.2)a	103(30.2)a	55(16.1)a	39(11.4)a
Holstein	291	156(53.7)b	89(30.6)b	34(11.7)b	12(14.0)b

A : grade A Oocytes with compact and dense cumulus cells

B : grade B Partially made oocytes with cumulus layer

C : grade C Incompletely

D : grade D Oocytes with foggy cumulus cell

a , b : Different superscripts within column denote significant differences($p < 0.05$)

Holstein종의 경우 채취된 난포란 291개중 A와 B등급 난포란이 245개로 84.3%를 보였으나 한우는 난포란 341개중 247개로 72.4%를 보여 채취된 난포란의 질이 Holstein종에 비하여 떨어졌다. 한우 난포란의 질이 떨어진 이유는 분명치 않으나 한우와 타품종과의 난자 발생생리 차이와 연관지어 고찰해 볼 필요가 있다고 생각된다.

나. 한우미성숙난포란의 체외성숙

난포란의 체외성숙에 영향을 미치는 배양액과 배양액에 첨가하는 혈청 및 호르몬의 종류에 대한 연구결과는 Table 4,5,6에 제시하였다.

Table 4. Effect of maturation medium of nuclear maturation of hanwoo oocytes

Media	No. of oocytes examineda	No. of oocytes at the stage of b			Maturation rate
		GV	Pro-TI	MII	
TCM-199	177	2	31	144	81.4
Ham's F-10	164	3	29	132	80.5

a GV : germinal vesicle, Pro. : prometaphase, TI : telophase I, MII : metaphase II

Table 4는 TCM-199와 Ham's F-10 등 두 종류의 체외성숙용 배양액에 FCS(Fetal calf serum) 10%를 첨가, 채취한 한우 난포란을 배양한 결과를 나타내고 있다. 총 341개의 미성숙 난포란을 TCM-199와 Ham's F-10에 각각 177개와 164개를 배양한 결과 2차 감수분열 중기 난포란이 각각 144(81.4%)와 132(80.5%)개를 보여 TCM-199에 배양한 성적이 약간 높게 나타났으나 배양액간에 큰 차이는 없었다.

체외성숙 배양액에 FCS, BSA(Bovine Serum Albumin)와 BFF (Bovine Follicular Fluid)를 첨가 하였을때 난포난의 핵 성숙도는 Table 5에 제시하였다. 난포난의 최종성숙단계인 metphase II까지의 성숙율은 TCM-199에 FCS, BSA, BFF를 첨가했을때 각각 81.4%, 76.5%, 78.0%를 보였고 Ham's F-10에 FCS, BSA, BFF를 첨가 했을때는 80.5%, 77.6%, 76.0%를 보여 두 종류의 체외성숙 배양액에 FCS를 첨가했을때 BSA와 BFF를 첨가 배양했을때 보다 체외성숙율이 높았다.

Table 5. Effect of FCS, BSA, BFF in maturation medium of nuclear maturation of Hanwoo oocytes

Media	Supplementa	No. of oocytes examined	No. of oocytes at the stage of b			Maturation rate
			GV	Pro-TI	MII	
TCM	FCS	177	2	31	144	81.4
	BSA	136	2	30	104	76.5
	BFF	118	0	26	192	78.0
Ham's F-10	FCS	164	3	29	132	80.5
	BSA	112	0	25	87	77.6
	BFF	125	0	30	95	76.0

a FCS = 10%(v/v) fetal calf serum, BSA = 1%(w/v) bovine serum albumin
BFF = 10%(v/v) bovine follicular fluid

b GV : germinal vesicle, Pro. : prometaphase, TI: telophase I, MII: metaphase II

체외 성숙용 배양액에 호르몬을 첨가하여 체외성숙율에 미치는 효과를 검토하기 위하여 두 종류의 체외배양액 (TCM-199, Ham's F-10)에 FCS 10%를 첨가하고 FSH(0.2 AU/ml)와 LH(10ug/ml) 그리고 PMSG와 HCG (10 IU/ml)을 각각 첨가하여 한우 난포란을 체외배양한 성적은 Table 6에 나타난 바와 같다. 즉, 총 609개의 한우 미성숙 난포란을 TCM-199과 Ham's F-10에 전술한 바와 같이 10% FCS, FSH-LH와 PMSG-HCG를 첨가 배양한 결과 TCM-199에서는 총 300개의 미성숙 난포란중 85.6%인 257개의 난포란이 제2성숙분열 중기까지 정상적인 난포란의 성숙이 유기되었으며 Ham's F-10의 경우 총 309개중 83.8%인 259개가 제2성숙분열 중기까지 성숙이 유기되어 Table 6에서 제시한 호르몬을 첨가하지 않고 10% FCS만을 첨가하여 배양한 성적보다 체외성숙율이 3-5%정도 높게 나타났다. 이러한 결과는 체외성숙율이 82.9%로 보고한 Gott등 (1988)의 결과보다는 우수하지만 Younis등 (1989)이 보고한 97.7% 체외성숙율에는 미치지 못한 성적이었다.

이상을 종합해보면 효과적인 한우 미성숙난포란의 체외성숙을 위해서는 난포란의 선별이 중요하며 체외성숙용 배양액은 Ham's F-10 보다는 TCM-199이 좋

으며 배양액에 호르몬을 첨가 체외성숙을 유기하는것이 정상적인 난포란의 체외성숙을 위해 유리하다고 생각된다. 또한 배양액에 FCS 첨가했을때 체외성숙율이 높았으나 BFF(bovine follicular fluid)를 첨가 배양했을때 체외성숙율에 큰 차이가 없기 때문에 체외성숙용 배양액에 소 난포액의 첨가 사용도 바람직하다고 생각된다.

Table 6. Effect of hormone supplements on nuclear maturation of hanwoo oocytes

Media	Hormonea	No. of oocytes examined	No. of oocytes at the stage of b			Maturation rate
			GV	Pro-TI	MII	
TCM-199	FSH-LH	128	0	18	110	85.9
	PMSG-HCG	172	0	25	147	85.4
Ham's F-10	FSH-LH	145	0	23	122	84.1
	PMSG-HCG	164	0	27	137	83.5

a FSH : 0.2AU/ml, LH : 10ug/ml, PMSG : 10 IU/ml, HCG : 10 IU/ml

b GV : germinal vesicle, Pro. : prometaphase, TI : telophase I MII : metaphase II

다. 체외수정

미성숙 난포란을 체외성숙 유기 후 Fig. 2에 제시한 바와 같이 A와 B등급 난포란만을 체외수정에 공시하였다. 체외수정은 체외성숙이 이루어진 난포란을 BO액으로 2-3회 세정한 후 준비된 50 ul BO액의 소적에 20개씩 수정능 획득이 유기된 정자 부유액을 주입하였으며 최종 정자농도는 1x10⁷/ml로 조정하였다. Table 7는 두종류의 성숙용 배양액에 FCS, BSA 그리고 BFF를 첨가 체외 성숙 유기된 난포란을 체외수정시켜 체외수정율과 다정자 침입율을 나타내고 있다. 체외수정율은 47.6%-55.0% 수준을 보였고 다정자 침입율은 10-14.2% 수준을 나타냈다.

Table 7. Effects of FCS, BSA, BFF on fertiligation and polysperm rates of hanwoo oocytes matured in vitro

Media	Supplementa	No. of oocytes examined	No. of oocytes fertilized(%)	No. of polyspermic oocytes(%)
TCM-199	FCS	40	22(55.0)	3(13.6)
	BSA	38	20(52.6)	2(10.0)
	BFF	42	20(47.0)	2(10.0)
Ham's F-10	FCS	39	21(53.8)	3(14.2)
	BSA	35	18(51.4)	2(11.1)
	BFF	40	20(50.0)	2(10.0)

a FCS : 10%(v/v) fetal calf serum, BSA : 1 % (w/v) bovine serum albumin
BFF : 10%(v/v) bovine follicular fluid

한편, 체외성숙용 배양액에 10% FCS**와 호르몬을 첨가 체외성숙 유기된 난포란을 체외수정시킨 결과는** Table 8**에 제시하였다.**

Table 8. Effect of hormone on fertiliation and polysperm rates of hanwoo oocytes matured in vitro

Media	Supplement	No. of oocytes examined	No. of oocytes fertilized(%)	No. of polyspermic oocytes(%)
TCM-199	FSH-LH	42	34(81.0)	5(14.7)
	PMSG-HCG	45	35(77.8)	5(14.3)
Ham's F-10	FSH-LH	38	31(81.6)	5(16.1)
	PMSG-HCG	48	35(72.9)	6(17.1)

FSH : 0.2IU/ml, LH : 10ug/ml, PMSG : 10 IU/ml, HCG : 10 IU/ml

배양액에 호르몬을 첨가 체외성숙 유기된 난포란의 체외수정 성적은 두종류의 배양액에서 FSH**와** LH**를 첨가했을때** PMSG**와** HCG**를 첨가했을 때보다 체외수정율이 높았으며 호르몬을 첨가하지 않고 체외성숙을 유기했을 경우에 비하여 체외수정율이 현저히 높았다. 이러한 결과는 소태아혈청과** FSH **및** HCG**의 첨가가 체외수정율의 증가를 가져온다는** Shalgi (1979), Ball **등**(1983) **그리고** Hensleigh**와** Hunter(1985) **등의 보고와 일치되는 결과였다.**

라. 정자의 수정능력획득 처리방법이 한우체외수정에 미치는 영향

1) 정자의 수정능획득 방법

① BFF(Bovine follicular fluid) 처리방법

채취 보관한 소난포액을 정자의 수정 능력 획득 배양액(sperm-TL)에10% (v/v) 첨가하여 4.5시간 전 배양하여 수정능 획득을 유기하였다. 또한 세 종류의 배양액 (BO액 , sperm-TL , TCM-199) 내에 10 % BFF를 첨가하여 1.5 , 3 , 4.5 , 6 시간 동안 배양하면서 정자의 운동성을 관찰하였다.

② BOCM (Bovine oviductal conditioned medium) 처리방법

준비한 난관배양액과 수정능 획득 배양액 동량을 혼합 정자와 4.5시간 전 배양하여 수정능 획득을 유기 하였으며 세 종류의 배양액에 동량의 난관배양액을 혼합 배양하면서 배양시간별로 정자의 운동성을 관찰하였다.

③ Heparin 처리방법

수정능 획득 배양에 정액을 혼합하고 여기에 heparin(10㎍/㎖)을 첨가 4.5시간 전 배양하여 수정능 획득을 유기하였으며 세 종류의 각각 heparin (10㎍/㎖)을 첨가 배양하면서 배양시간별로 정자의 운동성을 관찰하였다.

2) 정자의 수정능력 처리방법에 따른 체외수정율

한우 난포란의 체외수정이 수정 능력 획득 처리방법에 따른 체외수정율은 Table 9와 같다.

Table 9. Effects of capacition methods of sperms on in vitro fertilization rate of hanwoo oocytes

Capacitation method	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes fertiliged	Male pronuclear formation
Control	140	86(61.4)	25(29.1)
BFF	136	93(68.4)	47(50.5)
BOCM	165	119(72.1)	58(48.7)
Heparin	182	139(76.3)	66(47.5)

BFF : Bovine follicular fluid

BOCM : Bovine oviductal conditiond medium

정자의 수정 능력 획득 배양액내 10 % BFF를 첨가하여 4.5 시간 전 배양한 후 체외수정한 결과 수정율이 68.4%, BOCM 첨가시 72.1%, Heparin 첨가시 76.3%를 보여 대조구 61.4%로 체외수정율에 차이가 있었으며 heparin 첨가시 가장 높은 수정율을 보였다. heparin 첨가시 체외수정율이 높은 이유는 난포액과가 자궁액에 존재하는 heparin과 hyaluronic acid를 함유하는 GAG (Glycos amino glycans) 가 첨체반응을 촉진시켜 수정 능력 획득을 강력하게 유기하여 체외 수정율을 높이기 때문인 것 같다. (Ball 등 , 1981 , Parrish 등, 1986)

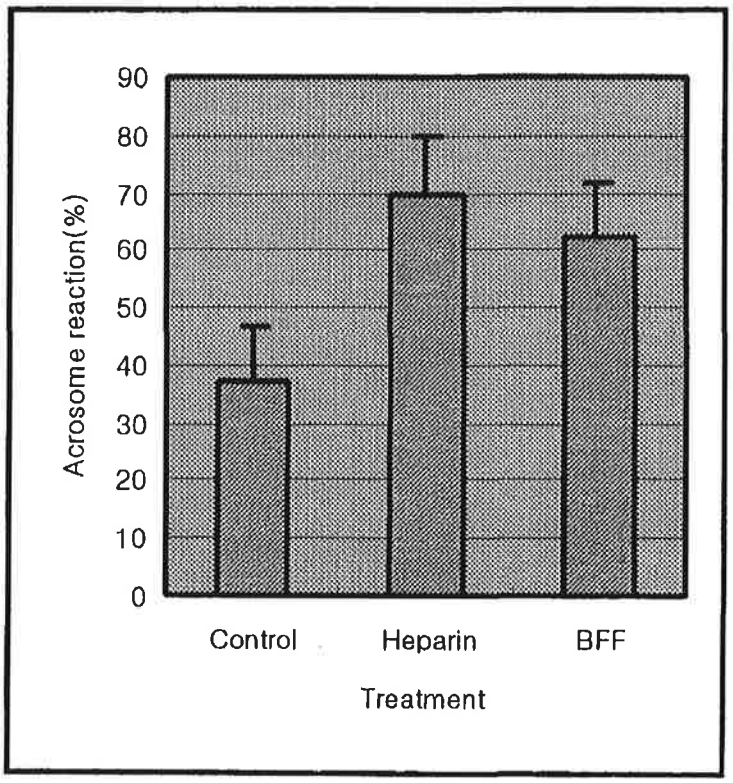


Fig 6. Effect of heparin and bFF on acrosome reaction incubated 4 hours. Sperm were incubated in medium(TCM-199) alone, with heparin (10㎍/㎖) and bFF(10 % v/v)

CTC 염색방법으로 조사한 정자의 첨체반응 결과는 Fig. 6에 제시한 바와 같다. 정자 수정능 획득 배양액(sperm-TL)에 10% 소 난포액 (BFF)과 heparin (10 ㎍/㎖), 소 난관 배양액 (BOCM)을 첨가 4.5 시간 배양후 첨체반응을 조사한 겨로가는 대조구에서 19.8%, BFF 54.7%, HEP 55.9%, BOCM 53.8%로 처리구가 대조구에 비하여 유의적으로 높게 나타났다($P<0.05$). 또한 세 종류의 수정능 획득 배양액 (BO, sperm-TL, TCM-199)에 BFF, BOCM, heparin을 첨가 CO_2 배양기에서 1.5 시간, 3 시간, 4.5 시간, 6 시간 동안 배양하면서 정자의 운동성을 조사한 겨로가는 Fig. 5, 6, 7 에 제시하였다. 세 종류의 배양액 모두에서 배양 1.5 시간 후 운동성 조사 결과 처리구와 대조구에서 차이가 없었으나 배양 3시간 이후부터 차이가 나타났다. 즉 배양 4.5 시간의 경우 BO액에서 대조구 58.2% 처

리구 61.9~70.4%로 나타나 운동성에 큰 차이가 있었다. 이상의 결과는 종합해보면 수정능 획득 배양액내 BFF, BOCM, heparin 첨가가 첨체반응, 정자의 운동성, 체외수정율에 큰 영향을 미침을 알 수 있었으며 난관배양액 첨가시에는 그 효과가 큼을 알 수 있었다.

2. 한우체외수정란의 체외배양기술

가. 체외발달 배양액이 배발달에 미치는 영향

한우 체외 수정란을 몇 종류의 체외 배양액에 FCS 20%를 첨가 체외 발달을 유도한 결과는 Table 10과 같다.

Table 10. Effect of culture media on in vitro development of bovine oocytes following insemination

Culture media	No.of oocytes examined	No.of oocytes cleaved at 48 h (%)	No. of embryos developed to the following stage		
			at 48 h (%)		at 192 h (%)
			2 cell	4 cell	Mor & Blast
TCM-199	90	50(55.6)	33(66.0)	14(28.0)	10(20.0)
Ham's F-10	90	45(50.0)	27(60.0)	15(33.3)	8(17.8)
CR_1aa	90	52(57.8)	35(67.3)	15(28.8)	12(23.1)

체외수정 유도 48시간 후에 관찰한 난할율은 TCM-199에서 55.6%, Ham's F-10에서 50%, CR_1aa에서 53.3%를 보여 배양액간에 큰 차이가 없었다. 체외수정 후 8일간 체외배양 결과는 CR_1aa 배양액에서 상실배와 배반포배 발달율이 23.1%로 TCM-199에서 20.0%, Ham's F-10에서 17.8%보다 높게 나타났다.

나. 체외발달 배양액 내 혈청 첨가가 배발달에 미치는 영향

세종류의 체외발달 배양액에 FCS(10%와 20%)와 BSA(0.4%와 1%)를 첨가 체외수정 후 배발달율 조사한 결과는 Table 11와 같다. 체외수정 48시간 후 난할율은 FCS와 BSA를 20% 와 1% 첨가 했을 때 10%와 0.4%를 첨가했을 때 보다

모두 높았으며 상실배와 배반포배 발달율도 FCS와 BSA의 첨가 농도가 높은구가 높았다. 또한 난할율과 상실배와 배반포배 발달율은 FCS를 첨가했을 때 BSA를 첨가 했을 때 보다 높게 나타났다.

Table 11. Effect of FCS and BSA in culture media on in vitro development of bovine oocytes following insemination

Culture media	Conc. of suppl. (%)	Oocytes examined	Oocytes cleaved at 48h (%)	No. of embryos developed to the following stage (%)		
				48 h		192 h
				2 cell	4 cell	Mor & Blast
TCM-199	FCS 10%	80	38(47.5)	24(63.2)	10(26.3)	5(13.2)
	20%	90	50(55.6)	35(70.0)	14(28.0)	10(20.0)
	BSA 0.4%	60	24(40.0)	15(62.5)	8(33.3)	3(12.5)
	1 %	100	55(55.0)	37(67.2)	16(29.0)	8(14.5)
Ham's F-10	FCS 10%	80	35(43.8)	18(51.4)	15(39.4)	5(14.3)
	20%	90	45(50.0)	27(60.0)	15(33.3)	8(17.8)
	BSA 0.4%	60	26(43.3)	14(53.8)	10(38.4)	2(7.7)
	1 %	80	41(51.3)	23(56.1)	17(41.5)	5(12.2)
CR_1aa	FCS 10%	80	39(48.8)	26(66.7)	12(30.8)	6(15.4)
	20%	90	48(53.3)	32(66.7)	14(29.2)	11(22.9)
	BSA 0.4%	60	28(46.7)	15(53.5)	12(42.9)	4(14.3)
	1 %	80	42(52.5)	24(57.1)	15(35.7)	7(16.7)

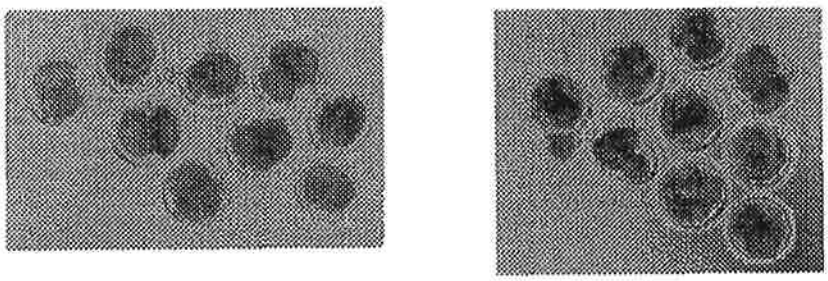
다. Modified synthetic oviduct fluid(mSOF)배양액이 배발달에 미치는 영향

mSOF (Takahashi & First, 1992)에 FCS와 BSA를 첨가 난할율과 배발달율을 조사한 결과는 Table 12에 제시한 바와 같다.

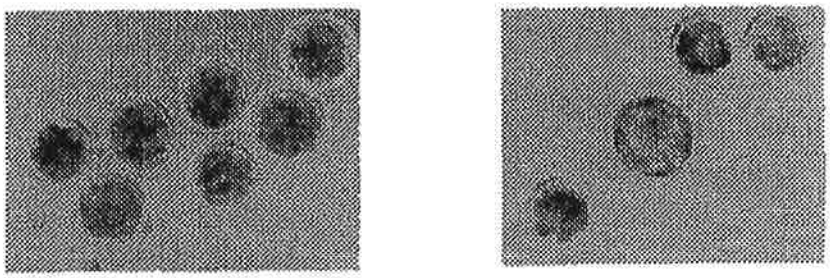
Table 12. Effect of FCS and BSA in mSOF medium on in vitro development of bovine oocytes following inseminatio

Concentration supplements (%)		No.of oocytes examined	No.of oocytes cleaved at 48 h(%)	No. of embryos developed to the following stage		
				48 h (%)		192 h (%)
				2 cell	4 cell	Mor. Blast
FCS	10%	80	41(51.3)	25(61.0)	13(31.7)	7(17.1)
	20%	90	55(61.1)	30(54.5)	20(36.3)	13(23.6)
BSA	0.4%	70	33(47.1)	17(51.5)	13(39.3)	5(15.2)
	1%	80	45(56.3)	30(66.7)	12(26.7)	9(20.0)

체외수정 48시간 후 난할율은 FCS 10%와 20%를 첨가했을 때 각각 51.3%와 61.1%, BSA 0.4%와 1%를 첨가했을 때 47.1%, 56.3%로 TCM-199, Ham's F-10, CR1aa보다 높았고 상실배와 배반포배 발달율도 각각 17.1%, 23.6%,15.2% 그리고 20.0%로 상기 세종류의 배양액에서 배양한 결과보다 높게 나타났다. 그러나 Fukui 등(1991)이 TCM-199에서 배반포 발달율이 3.5%, SOF에서 11.1%로 SOF에서 배양했을 때 현저하게 높았다는 결과와는 차이가 있었다. 체외발달 배양액으로 SOF가 우수하다고 생각되지만 이에 대한 광범위한 연구가 더욱 필요하다고 생각된다.



A B



C D

Fig 7. The in vitro development of hanwoo embryos.

A : 2 cell embryos B : 4 cell embryos

C : 8~16 cell embryos D : Morulae~Blastocyste cell embryos

라. 난관유래물질과의 공배양이 배발달에 미치는 영향

체외발달 배양액(CR1aa, TCM-199)에 BOEC를 첨가 난할율과 배발달 성적을 조사한 결과는 Table 13과 같다. 체외수정 48시간 후 난할율은 CR1aa와 TCM-199에서 각각 59.7% 와 56.2%를 보였으며 상실배와 배반포 발달율도 25.6%와 25.0%를 보여 BOEC를 첨가하지 않은 결과와 비교할 때 난할율과 상실배와 배반포 발달율 모두 약간씩 높게 나타났다. 한편 BOCM에서 체외수정란의

난할율과 배발달 성적은 체외수정 48시간 후 난할율은 57.3% 이었으며 배발달 성적은 2세포기와 4세포기 수정란이 각각 58.5%와 31.4%였다.(Table 14) 또한 상실배와 배반포배 발달율은 25.7%로 BOEC 와 공배양 했을때와 차이가 없었다. 이러한 결과는 Xu등 (1992)이 BOCM을 TALP와 TCM-199에 첨가배양한 결과 난할율이 각각 48.2% 와 33.3% 상실배와 배반포배율이 각각 2.4%와 18.3% 라고 보고한 성적보다 높은 경향이었으며 BOCM과 공배양시 배반포배 발달율이 45.8% 였다고 보고한 Gandolfi 와 Moor(1987)의 결과보다는 낮은 수준이었다. 체외수정란의 체외발달성적을 향상시키기 위한 공배양에서 난관상피세포와 같은 체세포의 효과는 세포를 자극 유사분열 촉진 인자와 여러 가지 유사분열 물질을 분비하여 체외발달율을 향상시키고 배양액내에 존재하는 유해물질을 제거하는 것으로 보고되고 있으며(Bavister등, 1992) 난관상피세포는 체외수정란의 성장을 자극하는 영양물질을 분비 체외발달을 향상시키며, 배양액에 존재하는 수정란의 발달에 악영향을 주는 독소를 제거시킨다고 보고하고 있다.(Kataska등, 1992) 또한 난관에서 분비하는 당단백질(GAG'S)이 정자의 수정능 획득, 수정과 난할에 중요한 역할을 하고있기 때문에 (Brown 등, 1986 ; Anderson과 Killian, 1994) 난관유래물질과의 공배양시 좋은 체외발달 성적을 얻고 있다고 생각된다.

마. 체외발달 배양액내 항산화물질 첨가가 배발달에 미치는 영향

항산화물질은 포유동물 세포내에 존재하는 황화합물인 GSH의 증가를 가져오고 GSH는 아미노산의 수송, 단백질 합성과 DNA의 deoxyribonu- cleotid 전구물질합성 및 free radical 과 reactive oxygen compounds 에 대한 세포보호 등 많은 생물학적 기전에 있어 중요한 역할을 수행하고 있기 때문에 체외발달 배양액내 항산화제(L-ascorbic acid, α-tocoperol)를 첨가 체외발생능 정지현상 극복 방안을 모색하고자 수행하였다. 즉, 2세포기 체외수정란을 CR_1aa와 TCM-199등 2종류의 체외발달 배양액내에 L-ascorbic acid(sigma, U.S.A)를 각각 0, 50μmol, 62.5μmol, 75μmol씩 첨가 배양 수정란의 발달 상태를 관찰 체외발달 배양액내 L-ascorbic 첨가효과를 Table 15에 제시하였다. 배양 48시간 후 배양성적은 CR_1aa에 50μmol과 75μmol 첨가시 4세포기 수정란이 각각 49.2%와 56.4% 8세포기 발달 성적은 62.5μmol과 75μmol 첨가시 11.8%와 7.7%로 대조구에 비하여 처리구

에서 유의적으로 높게 나타났으며 특히 배반포배 발달율은 처리구에서 대조구에 비하여 모두 유의적으로 높게 나타났다. (P<0.05) TCM-199에 L-ascorbic acid를 첨가결과도 CR_1aa에서와 같이 배반포배 발달율이 유의적으로 높았다. (P<0.05) 한편 상기 배양액내 α-tocoperol(sigma, U.S.A)을 각각 0, 2.5, 5.0, 7.5 ㎕/㎖씩 첨가하였을때.(Table 16)

Table 13. Development of bovine embryos after fertilization in vitro to co-culture with bovine oviductal epithelial cells(BOEC)

Medium	No. of embryos examined	No.(%) of oocytes cleaved, 48h	No.(%) of embryos developed to the following stage		
			at 48 h		at 192 h
			2 cell	4 cell	Mor & Blast
CR_1aa	72	43 (59.7)	26 (60.4)	14 (32.6)	11 (25.6)
TCM-199	64	36 (56.2)	22 (61.1)	10 (27.8)	9 (25.0)

Table 14. Development of bovine embryos after fertilization in vitro to co-culture with bovine oviductal conditioned medium(BOCM)

No. of embryos examined	No.(%) of oocytes cleaved at 48 h	No.(%) of embryos developed to the following stage		
		at 48 h		at 192 h
		2 cell	4 cell	Mor & Blast
122	70 (57.3)	41 (58.5)	22 (31.4)	18 (25.7)

배양 성적은 4cell 발달율이 CR_1aa 와 TCM-199에서 모두 대조구에 비하여 처리구에서 유의적으로 높았으며 배반포배 발달성적은 CR_1aa에서 대조구에서는 0%인데 반하여 처리구에서 6.6-14.7%로 유의적으로 높았으며(P<0.05)TCM-199에서는 배반포 발달율이 대조구와 처리구에서 모두 0%였지만 상실배 발달성적은 대조구(5.8%)에 비하여 처리구에서 12.5%- 14.8%로 유의적으로 높았다 (P<0.05). 이와같이 체외발달 배양액내 항산화물질이 좋은 성적을 얻고 있는 이유는 체외배양액내 항산화물질은 thiol 화합물인 disulfide를 산화시켜 발생되는 free radical을 제거함으로써 과산화수소의 세포내 축적을 막아주어 수정란의 발육정지 현상을 극복하게 해주기(Rong등, 1994)때문이라고 생각된다.

Table 15. Effect of L-ascorbic acid in culture media on in vitro development of bovine 2-cell embryos after fertilization in vitro

Culture medium	Treatment (μmol)	No. of 2-cell embryos examined	No.(%) of embryos developed to the following stage				
			at 48 h			at 144 h	
			2 cell	4 cell	8 cell	Morulae	Blastocyste
CR1aa	0	68	24(35.3)a	28(41.1)a	0	8(11.8)	0a
	50	71	19(26.7)ab	35(49.2)ab	0	8(11.3)	7(9.9)b
	62.5	76	15(19.7)b	34(44.7)a	9(11.8)b	12(15.8)	11(14.4)c
	75	78	13(16.7)b	44(56.4)b	6(7.7)b	9(11.5)	8(10.2)bc
TCM-199	0	71	17(23.9)ab	31(43.7)	10(14.1)a	8(11.3)a	0a
	50	73	15(20.5)ab	27(40.0)	16(21.9)b	16(21.9)b	7(9.6)b
	62.5	70	11(15.7)a	33(47.1)	18(25.7)b	21(30.0)c	10(14.3)c
	75	76	20(26.3)b	36(47.3)	13(17.1)ab	13(17.1)ab	4(5.3)b

a,b,c Different superscripts with columns denote significant difference($P<0.05$).

Table 16. Effect of α-tocoperol in culture media on in vitro development of bovine 2-cell embryos after fertilization in vitro

Culture medium	Treatment (μℓ/mℓ)	No. of 2-cell embryos examined	No.(%) of embryos developed to the following stage				
			at 48 h			at 144 h	
			2 cell	4 cell	8 cell	Morulae	Blastocyste
CR1aa	0	92	17(18.5)	24(26.1)a	21(22.8)	11(11.9)	0a
	2.5	102	12(11.8)	31(30.4)a	28(27.5)	20(19.6)	15(14.7)b
	5.0	90	14(15.6)	33(36.7)b	25(27.8)	16(17.8)	8(8.9)ab
	7.5	106	20(18.9)	34(32.1)ab	24(22.6)	12(11.3)	7(6.6)ab
TCM-199	0	86	18(20.9)	13(15.1)a	8(9.3)	5(5.8)a	0
	2.5	81	20(24.7)	13(16.0)a	8(9.9)	12(14.8)b	0
	5.0	70	14(20.0)	20(28.6)c	7(10.0)	10(14.3)b	0
	7.5	72	14(19.4)	16(22.2)b	8(11.1)	9(12.5)b	0

a,b,c Different superscripts with columns denote significant difference($P<0.05$).

이상의 결과를 종합해볼 때 한우 수정란의 체외발달 성적을 높이기 위해서는 난관유래 세포와의 공배양과 체외발달 배양액내 항산화물질을 첨가 배양하는 것이 매우 효과적이라고 생각된다.

3. 한우 미성숙난포란과 체외수정란의 동결보존

가. 한우 미성숙난포란의 동결융해후 체외성숙 및 체외수정율

한우 난포란을 채취 전술한 동결보존액과 동결보존방법에 의거 급속동결후 융해하여 체외성숙과 체외수정을 유도한 결과는 Table 17과 18에 제시한바와 같다. Table 17는 Table 2의 Type Ⅰ의 동결액에 채취한 한우난포란을 평행시간을 달리하여 평형시킨후 동결융해후 성적을 나타냈다.

Table 17. The effect of equilibration period in vitrification solution on the in-vitro maturation and fertilization rates of hanwoo oocytes cryopreserved by a rapid freezing method

Equilibration period(mim)	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured(%)	No. of oocytes fertilized(%)
5	42	24(57.1)	15(35.7)
10	45	27(60.0)	17(37.8)
20	40	23(57.5)	13(32.5)
40	39	23(59.0)	13(33.3)

동결보존액에 5, 10, 20, 40분간씩 평형시킨후 동결융해후 체외성숙율과 체외수정율은 10분간 평형시켰을 때 체외성숙율 60% 체외수정율 37.8%로 가장 높았으나 5분, 20분, 40분간 평형시켰을때와 통계적인 유의차는 없었다. 공시 난포란의 수와 다양한 동결보존액 그리고 충전방법에 따른 다각적인 검토가 요청된다고 생각된다.

Table 18은 Table 2의 Type 1과 2의 동결액에 채취한 한우 난포란을 동결시킨후 융해하여 체외성숙과 체외수정율을 제시한 결과이다.

Table 18. Effect of vitrification solution on the in-vitro maturation and fertilization rates of hanwoo oocytes cryopreserved by rapid freezing method

Vitrification solution	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured(%)	No. of oocytes fertilized(%)
Type Ⅰ	166	98(59.0)	68(41.0)
Type Ⅱ	147	95(64.6)	70(47.6)

채취한 난포란을 동결보존액 Type Ⅰ에서 10분간 Type Ⅱ에서 각각 10분, 10분, 1분간 평형시킨후 동결융해후 생존성을 조사하였다. Type Ⅱ에서 10분, 10분, 1분간 평형시킨후 동결시킨 결과 체외성숙율 64.6% 체외수정율 47.6%로 Type Ⅰ방법보다 높은 경향을 보였다. 따라서 효과적인 한우 난포란의 동결보존을 위해서는 Type Ⅱ동결보존액과 동결방법이 우수하다고 생각된다.

나. 한우 체외수정란의 동결보존

(1) 2세포기 한우체외수정란의 동결

Whittingham등 (1972)에 의하여 최초로 생쥐 수정란의 동결보존이 성공한 이후 수정란의 동결보존에 관한 많은 연구결과가 보고 되고 있다. 수정란의 동결보존방법으로 가장 먼저 실효를 거둔 동결법은 glycerol을 이용한 다단계 평형법이었고 식빙없이 평형직후 액체질소(-196℃)에 보존하는 초자화 동결기법이 동결융해 후 비교적 높은 생존율을 보여 그 이용성이 강조되고 있다. (Takai 등, 1994) 그러나, 수정란의 동결에는 동결배지의 종류와 평형시간 등 수정란의 생존에 영향을 미치는 요인이 대단히 많다. 따라서 본 연구는 한우 체외수정란의 급속 동결시 동결배지의 종류와 평형시간에 따른 생존율에 미치는 영향을 구명코자 실시하였다.

Table 19. Effect of freezing media on in vitro development rates of frozen hanwoo 2cell embryos

Treatment	No. of embryos examined	Development (%)
None	125	80 (64.0)
EG	133	69 (51.9)
EFS40	138	74 (53.6)

2 세포기 한우체외수정란을 두종류의 항동해제를 사용 동결융해후 체외수정란의 발달율은 동결배지종류에 따라 53.6%와 51.9%로 발달율에는 큰차이가 없었다.

⑵ 배반포기 한우체외수정란의 동결

Table 20. In vitro development of hanwoo early blastocysts after vitrification in EG and EFS40

Treatment	No. of embryos examined	Development (%)
None	50	36 (72.0)
EG	82	49 (59.8)
EFS40	96	63 (65.6)

한우 배반포배 체외수정란의 항동해제로 EG와 EFS40을 사용 동결 후 생존율을 조사한 결과 부화배반포배로의 발달율이 각각 59.8% 와 65.6%로 EFS40에서 높았다. 따라서 EFS40을 한우체외수정란 동결시 항동해제로 사용하는 것이 좋다고 사료된다.

4. Capain DNA 미세현미주입에 의한 한우개량기술개발

가. 한우 calpastatin antisense DNA을 수정란에 발현시키기 위한 발현벡터 개발

외래 유전자를 수정란 내에서 발현시키기 위해서는 유전자의 발현을 조절하는 프로모터가 필요하고 또한 발현 시키고자하는 유전자와 mRNA의 안정화에 기여하는 poly A signal이 필요하다. 그러므로 한우 calpastatin을 수정란에 발현시키기 위한 발현벡터를 개발하기 위하여 다음과 같이 실험을 수행하였다.

유전자의 발현을 조절하는 프로모터는 metallothion(MT) 유전자의 프로모터 영역을 사용하였다. 그리고 mRNA의 안정화에 기여하는 poly A시그날은 SV40의 poly A 시그날을 사용하였고 발현 시키고자하는 calpastatin 유전자는 한우

근육으로부터 단리동정 한 cDNA를 사용하였다. 그리고 수정란 내에서 미세주입 한 유전자의 발현을 확인 하고자 CMV 프로모터에 의하여 발현 할 수 있는 β-galactosidase 유전자를 calpastatin 유전자의 뒤쪽에 연결하였다.

1) Metallothion 프로모터의 준비

pMT/SV의 플라스미드을 제한 효소 Xho I 과 Cla I으로 37°C에서 소화 한 후 8% 전기영동 겔에서 전기영동 한 다음 1.8kb의 벤드를 분리하였다. 그리고 pBluescript II SK-의 Xho I, Cla I 위치를 제한효소로 소화하고 1.8kb의 MT 프로모터와 연결하였다. 이러한 플라스미드를 pBSK-MT로 하였다. (Fig. 8)

2) poly A의 준비

poly A는 pSV2-dhfr 플라스미드를 제한효소 BamH I 과 Bgl II로 소화 한 후 8% 전기영동 겔에서 전기영동한 다음 0.75kp의 단편을 분리하였다. 그리고 이 단편을 위에서 준비한 pBSK-MT의 BamH I 위치에 삽입하였으며 이러한 플라스미드를 pBSK-MT-poly A로 하였다. 또한, 이 플라스미드를 Pst I 과 BamH I 으로 소화한 후 poly A가 정상 위치로 삽입되었는지 확인하였다. (Fig. 9)

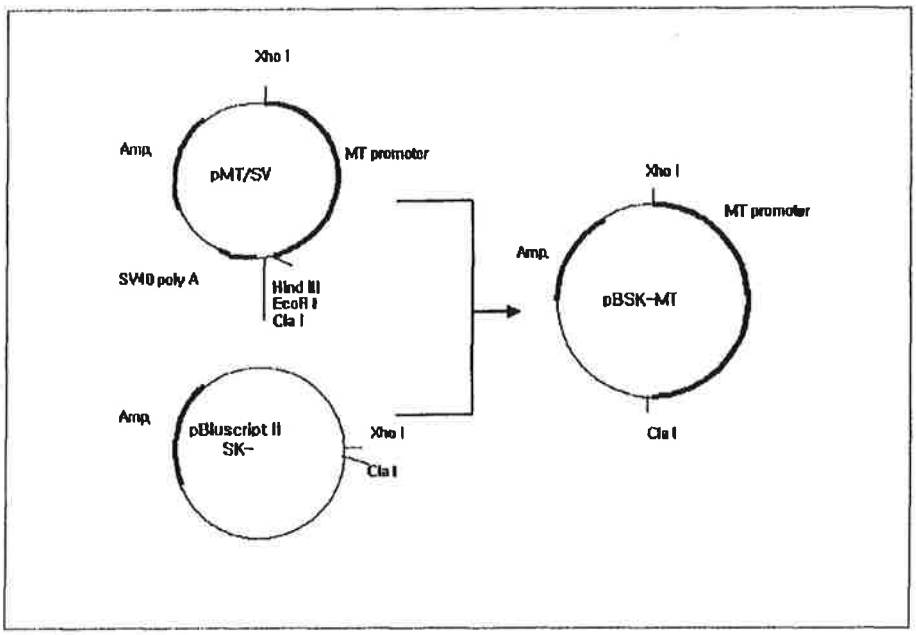


Fig 8. Subcloning Metallothion(MT) promoter

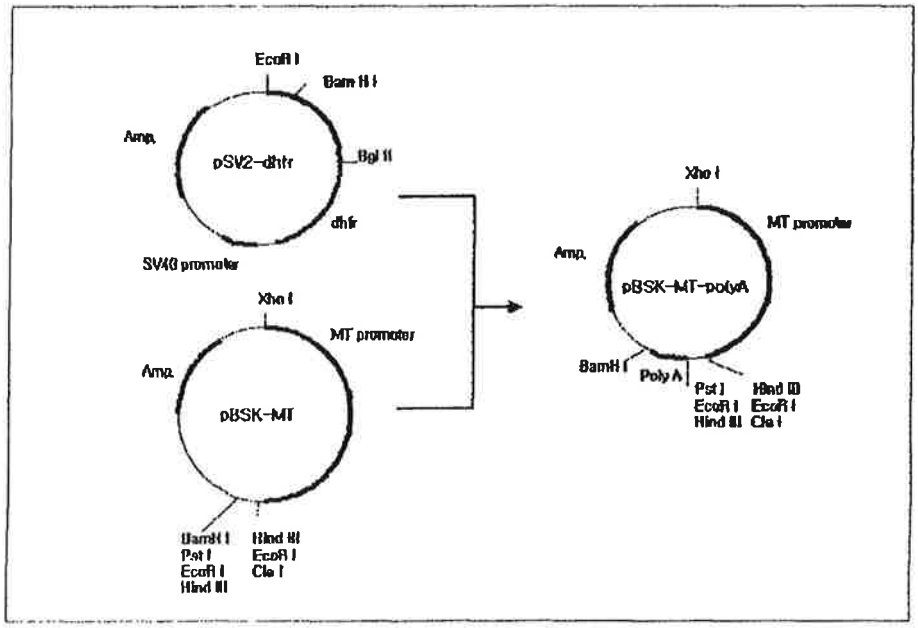


Fig 9. Subcloning of poly A into Metallothion promoter

3) pMT-calpastatin-poly A 플라스미드의 준비

한우 근육으로부터 단리하고 pGEM-T Easy Vector(Promega사)에 삽입된 calpastatin cDNA를 제한효소 EcoR I으로 소화하고 2.2kb의 단편을 분리한 다음 pBSK-MT-poly A를 EcoR I으로 소화한 벡터에 ligation 시킴으로써 calpastatin 유전자를 삽입하였다. 이러한 플라스미드를 pMT-cpst-poly A로 하였다(Fig. 10). 이러한 플라스미드는 Xho I, Sph I, Kpn I, Ssp I 등의 제한효소로 소화한 후 정상적인 위치로 유전자가 삽입되었는지 확인하였다(Fig. 11). 이러한 발현 유전자는 1.8kb의 프로모터, 2.2kb의 calpastatin, 0.75kb의 poly A를 가지고 있으므로 Xho I 과 Not I으로 소화하면 4.75kb의 DNA를 얻을 수가 있으며 이러한 유전자를 미세주입용으로 하였다. 또한, 이러한 유전자는 수정란에 주입한후 형질전환 가축이 생산되어야 그 유전자의 삽입 및 발현 여부가 확인되므로 본 실험에서는 이러한 유전자의 뒤쪽에 CMV 프로모터에 의하여 발현 할 수 있는 β-galactosidase 유전자를 연결하여 수정란에서 그 유전자의 삽입여부를 X-gal로 염색함으로써 확인 하고자 하였다.

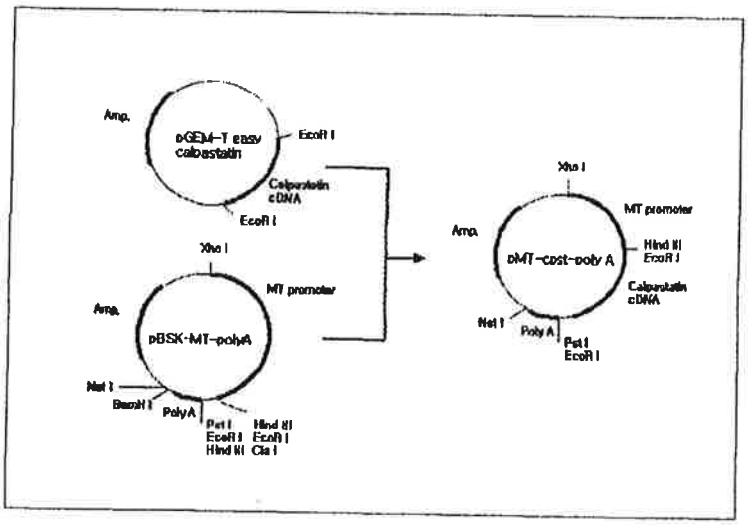


Fig 10. Construction of pMT-cpst-poly A Expression vector

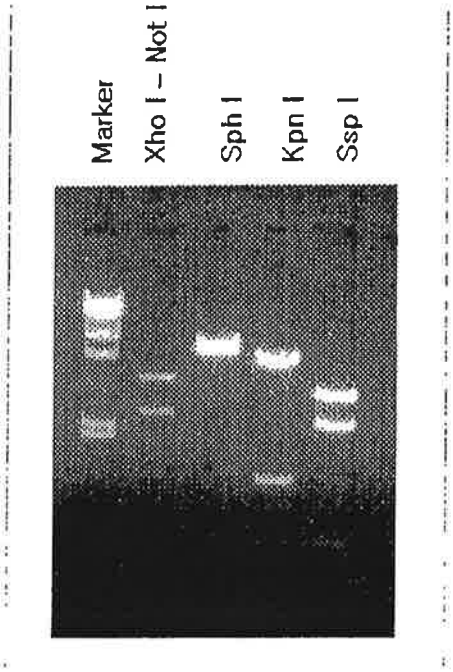


Fig 11. Electrophoresis of pMT-cpst-poly A after restriction enzyme digestion

Xho I과 Not I으로 소화한 것에서는 4.75kb의 pMT-cpst-poly A의 벤드와 백터 2.9kb의 벤드를 확인할 수 있었다. 또한 Sph I은 한 개로서 단일 벤드를 보였고, Kpn I은 두 site가 있다. 그리고 Ssp I으로 소화하면 2.2kb의 벤드가 두 개, 3.25kb의 벤드가 1개로 Ssp I site는 전부 3군데였다.

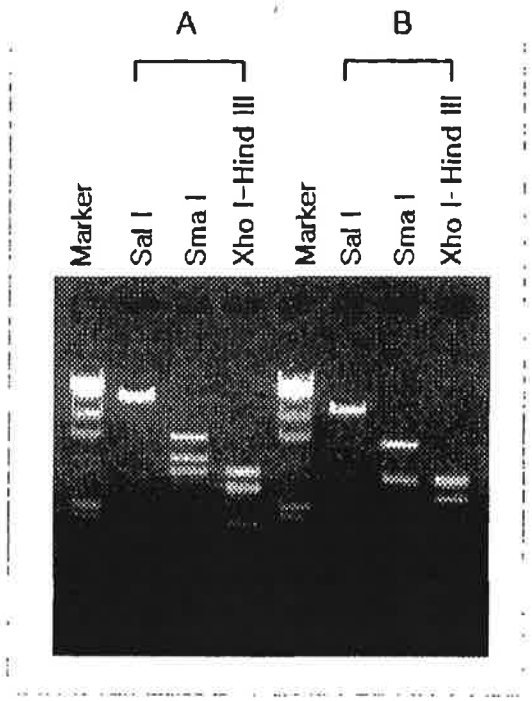


Fig 12. Electrophoresis of pMT-cpst-CMV-β after restriction enzyme digestion

A는 16.9kb로 pMT-cpst-poly A (4.75kb)가 두 번 반복하여 삽입된 것이며, B는 한 개의 pMT-cpst-poly A가 β-galactosidase 유전자와 연결된 것을 나타내고 있다. Sal I site은 β-galactosidase 유전자의 3′ 에 위치하며 미세주입용 DNA을 정제할 때 이 제한효소로 절단하였다. 그리고 Sma I, Xho I, Hind III로 소화하여 이들 유전자가 정상적으로 연결되었는지 확인하였다.

4) pMT-cpst-poly A플라스미드에 β-galactosidase 유전자의 삽입

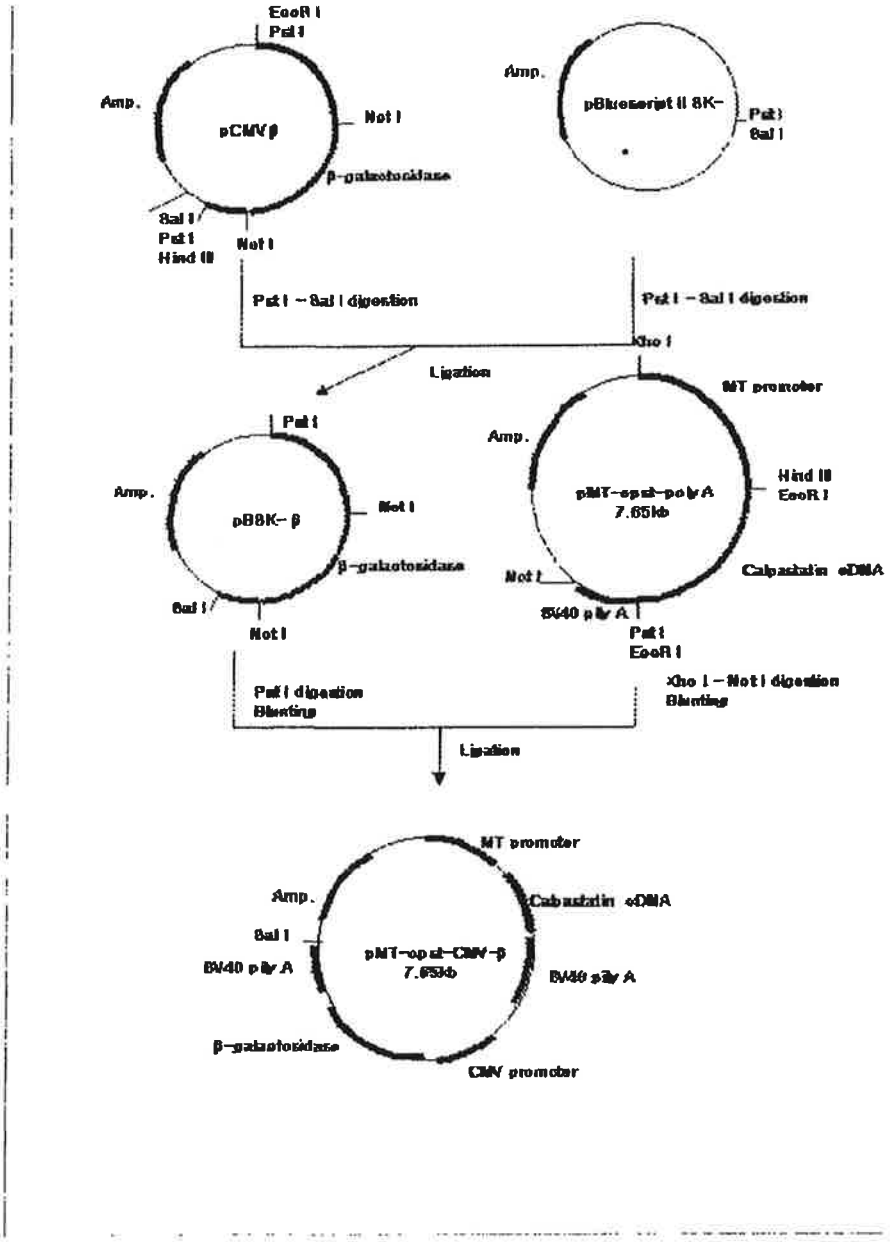


Fig 13. Subcloning of β-galactosidasegene into pMT-cpst-plasmid.

pCMV-β를 Pst I과 Sal I으로 소화한 다음 CMV프로모터, β-galactosidase 유전자와 poly A를 포함하는 단편 4.5kb을 분리하고 이 단편을 pBluescript II SK-의 Pst I과 Sal I위치에 ligation하였다. 이러한 플라스미드를 Pst I으로 소화한 다음 T4 DNA polymerase를 이용하여 평골화 벡터를 제조하였다. 이 평골화 벡터에 pMT-cpst-poly 플라스미드를 Xho I과 Not I으로 소화하고 T4 DNA polymerase를 이용하여 5′와 3′말단을 평골화 한 calpastatin 유전자 4.75kb를 ligation하였다. 그리고 이들을 대장균에 형질전환(transformation) 시켜 대량의 플라스미드를 제조하는데 이용하였다. 제조된 플라스미드는 Sal I, Sma I, Xho I, Hind III로 소화하여 정상적으로 calpastatin 유전자가 β-galactosidase 유전자와 연결이 되었는지 확인하였다. 이 플라스미드를 pMT-cpst-CMV-β라고 하였다 (Fig. 12, 13).

5) 미세주입용 calpastatin 유전자의 정제

미세주입용 DNA는 매우 순도가 높아야 함으로 다음과 같은 방법에 의하여 염색체DNA와 다른 불순물을 제거하였다. 먼저, 대장균에 형질전환(transformation)된 pMT-cpst-CMV-β와 pMT-cpst-poly A 플라스미드를 아가플레이트에 접종하고 그 다음날 단일의 colony를 50ml의 LB (+Ampicillin, 50 μg/ml)배지에서 하루밤 37℃에서 배양하였다. 이렇게 배양한 균체로부터 알카리법으로 플라스미드를 제조하였으며, 제조된 플라스미드는 CsCl(0.97g/ml)와 ethidium bromide(10mg/ml)를 포함하는 용액에 넣고 초고속원심을 2회 수행하였다. 그리고 난 다음 ethidium bromide (10mg/ml)를 수포화 부타놀로 제거하고 TE 용액(1M Tris·Cl pH 7.5, 100mM EDTA)에서 하루밤 투석을 4℃에서 행하였다.

투석이 끝난 pMT-cpst-CMV-β플라스미드는 제한효소 Sal I으로 pMT-cpst-poly A 플라스미드는 Not I과 Xho I으로 소화하여 직선화 하였다. 그리고 이들을 8% 아가로스겔에서 전기영동하고 각각 12.12kb와 4.75kb의 단편을 geneclean kit(BIO 101, USA)로 회수하였다. 회수된 DNA는 ELUTIP-d(Schleicher & Schuell GmbH, Germany)로 불순물을 제거하고 최종적으로는 미세주입용 buffer(10mM Tris·Cl pH 7.5, 0.1mM EDTA)로 5ng/㎕가

되도록 녹여 사용전 까지 -20℃에 보존하였다(Fig. 14, 15).

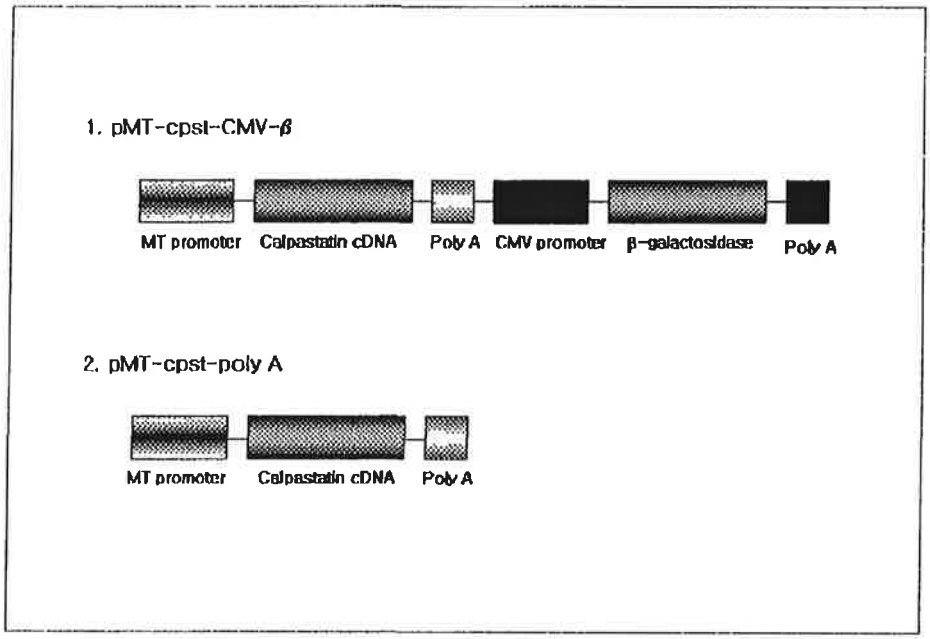


Fig 14. Diagram of pMT-cpst-CMV-β(1) and pMT-cpst-poly A(2) vector for microinjection.

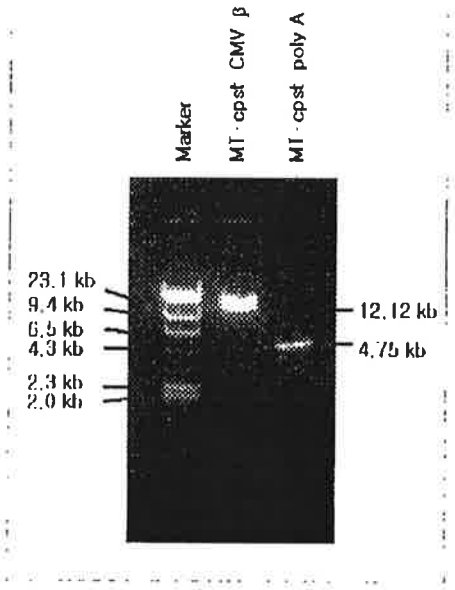


Fig 15. Electrophoresis of pMT-cpst-CMV-β and pMT-cpst-poly A after restriction enzyme digestion.

pMT-cpst-CMV-β은 12.12kb를, pMT-cpst-poly A은 4.75kb로 정상적인 크기를 나타내고 있으며 또한 매우 깨끗하게 정제되었음을 나타내고 있다.

6) pMT-cpst-CMV-β 플라스미드의 발현확인

pMT-cpst-CMV-β를 COS세포에 transfection한 다음 X-gal 염색에 의하여 확인하였다. 먼저, COS세포($5X10^5$세포)를 5ml의 10% FCS를 포함하는 DMEM 배지에서 37℃, 5% CO_2중에서 18시간 배양하였다. 배지를 제거하고 5ml의 PBS로 세포를 1회 세척한고, 2㎍의 pMT-cpst-CMV-β 플라스미드를 Effectene transfection kit (Qiagen사)로 transfection하였다. DNA존재 하에 16시간 배양한 다음 PBS로 1회 세척하고 새로운 DMEM배지로 교환하였다. 그리고 다음날 X-gal 염색을 실시하였다.

X-gal 염색은 먼저 세포를 PBS로 1회 세척한 다음 고정액(2% 포름알데히드, 0.2% 글루타알데하드)으로 15분간 고정하였다. 그리고 다시 PBS로 1회 세척하고

x-gal 염색액으로 4시간 염색을 실시하였다. 염색후 PBS로 3회 세척한 다음 사진촬영을 실시하였다. 그 결과 pMT-cpst-CMV-β 플라스미드가 transfection된 세포는 대조군에 비하여 강한 초록색을 나타내었다. 그러므로 제조된 플라스미드는 정상적으로 발현하고 있음을 확인하였다. 그림 A는 pMT-cpst-CMV-β 플라스미드가 transfection된 세포로서 강한X-gal 염색을 나타내고 있으며, B는 대조군으로서 전혀 염색이 되지 않음을 나타내고 있다.

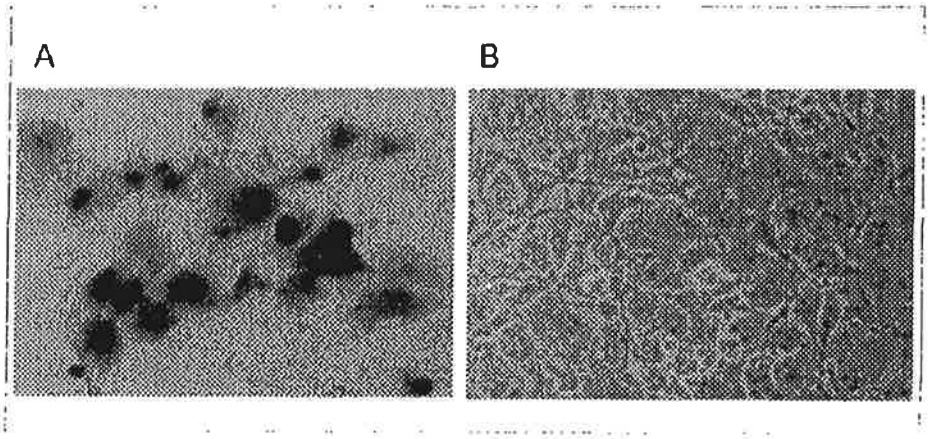


Fig 16. X-gal staining of coscell transfected pMT-cpst-CMV-β.

나. Calpastatin antisense DNA 미세주입과 한우난자에서의 발현확인

1) 체외수정후 전핵 형성율

체외수정 후 전핵 형성율을 Table 21에 제시한 바와 같다. 전핵형성율은 75% 였으며 정상수정란 (2PN) 발생율은 61.2 %를 보였다 .

Table 21. Pronuclear formation of bovine oocyte maturated in TCM-199 after in vitro fertilization

No(%) of oocytes examined	No(%) of oocytes maturated	No(%) of oocytes PN formation	No(%) of oocytes forming PN		
			1	2	3≥
244	220(90.2)	165(75.0)	60(36.4)	101(61.2)	4(2.4)

2) DNA injection

동물 난자내 DNA 주입 방법에는 물리적, 화학적 및 생물학적 방법 등 많은 수단이 강구되었으나, 이들 방법 중 효율성이 좋고 응용 가능성이 있어 활발히 연구 개발되고 있는 방법은 Microinjection technique, Stem cell insertion technique, Retroviral insertion technique, sperm-mediated DNA transfer technique 등이 있지만 주입된 유전자의 후대에서의 발현율이 낮아 실용화하는데 큰 어려움이 있는 실정이다. 따라서 당해연도 연구기간 중에는 Micro injection technique을 한우 체외 수정란에 적용하였다.

① 미세현미 피펫 제작

미세현미 피펫 제작 및 세공은 Microelectrode puller, Microforge (Narishige Co., Japan)등을 사용하여 Lin(1966, 1971) 그리고 Seidel(1982) 의 방법에 준하여 제작 사용하였다.

② 공시 난자의 준비와 미세현미주입

체외수정 유기 16 - 18 시간후 원심분리하여 수정란의 난구세포와 지방구를 제거한 다음 전핵이 형성된 난자만을 선택해서 전핵 내에 DNA를 미세주입 하였다. 즉 Wagner 등(1984)의 방법에 준하여 100-400 배율로 조정된 도립현미경 (Narishige)에서 슬라이드에 난자 보존액 0.2ml를 방울이 형성되도록 떨어뜨린 다음 Oil로 덮었다. 난자 보존액 방울속에 모세관 피펫을 사용하여 5 - 10 개의 공시 난자를 옮긴 다음 holding 피펫으로 공시 난자를 흡인 보정하고 DNA를 충전한 injection 피펫을 보정된 공시 난자의 투명대를 천자하고 투명대 통과후 곧바로 난황막을 천자하는데 이때 난황막이 밀려가 난황막과 투명대 사이에 간극이 벌어지지 않도록 유의하였다.

③ 미세현미주입 난자의 발달

Table 22. Development stage of bovine embryos by microinjection

Medium	No. of embryos	No.(%) of embryos cleaved at 48hr.	No.(%)of embryo developed to				
			48 hr			196 hr	
			2 cell	4 cell	8 cell	Mor.	Blast.
CR1aa	140	47(33.6)	18(38.2)	22(46.8)	7(14.8)	1(2.1)	0
TCM-199	155	37(23.8)	10(27.0)	15(40.5)	12(32.4)	0	0

미세현미주입된 난자는 CR1aa와 TCM-199 에서 배양하면서 난할율과 배발달 성적을 조사하여 Table 22에 제시하였다. 미세현미주입 48시간후에 조사된 난할율은 CR1aa에서 33.6%, TCM-199에서 23.8% 였고 4세포기 발달율이 높게 나타났다. 그러나 196시간 배양 후 조사 결과는 CR1aa에서 상실배 발달율이 2.1%로 매우 낮게 조사되었을 뿐 배반포배 난자는 관찰되지 않아 심한 난자의 체외 발생능 정지 현상이 나타났다. 따라서 미세현미 주입 난자의 원활한 체외 발달을 위한 배양 기법의 응용을 적극 검토해야 할 것으로 생각된다.

④ 배양액 내 항산화제 첨가 효과

항산화제인 L-accorbic acid 와 α-tocopherol을 두 종류의 체외배발달 배양액(CR1aa, TCM-199)에 농도별로 첨가 체외배발달 성적을 비교 조사한 결과는 Table23, 24와 같다.

Table 23. Effect of L-accorbic acid supplements in culture media on in vitro development of KNC* oocytes following insemination

Culture media	concentration of supplement (μM)	No. of embryos	No.(%)of embryos cleaved at 48 hr	No.(%) of embryos developed to				
				48 h			168 h	
				2 Cell	4 Cell	8 Cell	Mor	Blast
CR1aa	0	66	19(28.8)	7(36.8)	8(42.1)	4(8.2)	-	-
	50	55	20(36.4)	4(20.0)	11(50.0)	5(25.0)	3(15.0)	1(5.0)
	100	55	18(32.7)	5(27.7)	8(44.4)	5(27.8)	1(5.6)	1(5.6)
TCM-199	0	78	18(23.1)	6(33.3)	8(44.4)	4(22.2)	-	-
	50	50	15(30.0)	3(23.0)	7(46.7)	5(33.3)	2(13.3)	1(6.7)
	100	49	14(28.6)	4(28.6)	6(42.9)	4(28.6)	1(7.1)	-

Table 24. Effect of α-tocopherol supplements in culture media on in vitro development of KNC* oocytes following insemination

Culture media	concentration of supplement (μM)	No. of embryos	No.(%)of embryos cleaved at 48 hr	No.(%) of embryos developed to				
				48 h			168 h	
				2 Cell	4 Cell	8 Cell	Mor	Blast
CR1aa	0	50	16(32.0)	5(31.3)	6(37.5)	5(31.3)	-	-
	5.0	50	19(38.0)	4(21.1)	8(42.1)	7(36.8)	2(10.5)	2(10.5)
	10.0	44	15(34.1)	5(33.3)	6(40.0)	4(26.7)	1(6.7)	1(6.7)
TCM-199	0	47	11(23.4)	4(36.4)	5(45.5)	2(18.2)	1(9.1)	-
	5.0	50	16(32.0)	3(18.8)	8(50.0)	5(31.3)	2(12.5)	1(6.3)
	10.0	45	13(28.9)	3(23.1)	6(46.2)	4(30.8)	2(15.4)	-

체외 배발달 배양액 CR1aa**에** L-ascorbic acid**를 각각** 50μM**과** 100μM**을 첨가 배양시 난할율은** 36.4 % **와** 32.7 %**로 대조구** 28.8 %**보다 약간 높았으나 통계적인 차이는 없었다. 그러나** 48**시간 동안 배양 후 난자의 발달상태를 보면** 8**세포기 발달율이 첨가구에서 대조구에 비하여 현저히 높았으며,** 196**시간 동안 배양 후 성적은 대조구에서는 상실배와 배반포배가 관찰되지 않았지만** 50μM **첨가구에서는 상실배 발달율이** 15.0 %, **배반포배 발달율이** 5.0 %**로 조사되었다. 이러한 결과는 체외발달 배양액으로** TCM- 199**을 사용하였을 때도 유사한 경향을 보였다. 또한 체외발달 배양액 내** α-tocopherol **첨가시험에서도** CR1aa **와** TCM-199 **배양액에서 난할율은 대조구에 비하여 상살배와 배반포배 발달율은 현저한 차이를 보였다. 체외 배발달 배양액 내 항산화제 첨가는 난포란이 체외에서 성숙되는 동안 세포질의 산화에 의한 손상을 보호하고**(Grupen **등,** 1995) Murray **등**(1990)**은 세포의 체외배양시 세포내의 과산화물은 세포의 독성물질로 작용하는데, 이러한 과산화물을 환원시키기 위하여 체내에는** α-tocopherol(Vit. E), ascorbic acid(Vit. C), superoxide dismutase, catalase **등과 같은 항산화물질**(antioxidants)**이 존재하나, 체외에서는 이와 같은 항산화물질이 배양액내에 첨가되지 않아 세포의 성장을 억제하는 경우가 있다고 하였는데 본 실험의 결과에**

서도 대조구에 비해 항산화제 첨가구에서 높은 초기배 및 후기배 발달율을 얻을 수 있었다.

이러한 결과는 배양액내 항산화물질을 첨가시 cell block 현상을 제거하여 배발달율을 향상시킨다(Matsuuyama 와 Fukuo, 1994)는 보고와 일치하였고 이 등(1999)이 돼지의 체외수정란 배양 시 α-tocopherol 과 cystea- mine의 첨가가 무첨가구에 비해 상실배와 배반포배까지 도달율이 높다는 결과와 일치하는 경향을 보였다. 또 Parbon 등(1989)이 free oxygen radical이 수정란 발육억제현상의 한 원인이라고 제시하였고, 체외배양액 내에서 생성되는 free radical을 제거하기 위한 수단으로 Li(1993 a)이 항산화제를 첨가함으로써 발육억제 현상을 극복할 수 있었다고 보고한 것과 유사한 결과를 나타났다. 따라서 체외배발달 배양액내 항산화제를 첨가함으로써 미세현미 주입된 수정란의 체외배발달 시 특정 배발달 단계에서 발생되는 체외발생능 정지(in vitro cell block)현상을 극복할 수 있으리라 생각된다.

그리고 미세현미주입된 한우 수정란을 난관유래물질(난관상피세포, 난관상피세포 conditoned medium)과 공배양은 현제 실험 진행중이어서 결과를 제시할 수 없으나 배양액 내 항산화제 첨가, 난관유래물질과 공배양 등은 미세현미주입 한우 수정란의 체외배발달율을 크게 높힐 수 있으리라 생각된다.

Table 25. Development stage of hanwoo embryos with different culture condition after calpastatin antisense DNA injection

culture condition	No of embryos examined	No of (%) of embryos developed to					
		1 cell	2 cell	4 cell	8 cell	morula	blasto
control	317	120 (37.85)	95 (29.96)	32 (10.09)	48 (15.14)	20a (6.30)	2a (0.63)
cumulus cell	236	86 (36.4)	65 (27.54)	27 (11.44)	25 (10.59)	19b (8.05)	14b (5.93)
GSH	289	58 (20.06)	94 (32.52)	20 (6.92)	60 (20.76)	32b (11.07)	25b (8.65)
cumulus cell + GSH	245	52 (21.22)	79 (32.24)	39 (15.91)	41 (16.73)	21b (8.57)	13b (5.31)

*Different superscripts within columns denote significant different ($p<0.05$).

한우 체외수정란에 Calpain antisense DNA를 주입한후 체외배발달 성적을 Table 25에 제시하였다. 난구세포와 공배양 , 배양액내 GSH (0.1 M) 첨가 및 난구세포와 GSH 동시첨가 공배양 했을 때, 대조구에 비하여 상실배와 배반포배 발달율이 유의적으로 높았다 ($p<0.05$).

Table 26. The expression of calpastatin antisense DNA after 7 days of culture following microinjection

Stage of embryos examined	No. of embryos examined	No. (%) of embryos expressed Calpastatin gene	No . (%)of mosaicism
Morula	92	23(25.0)	20(87.0)
Blastocyst	54	10(18.5)	9(90)

체외수정란에 calpastatin antisense DNA를 주입한후 7 일간 체외배발달을 유도하고 상실배와 배반포배 수정란만을 X-gal staining 하여 gene expression 정도를 나타낸 결과는 Table 26에 제시한 바와 같다. 상실배와 배반포 배 수정란을 염색한 결과 gene expression rate 가 각각 25.0 % 와 18.5 % 였으나 배반포배의 경우 90 % 상실배의 경우 87.0 % 의 mosaicism 이 나타났다.

5. Calpain DNA가 주입된 한우난자의 발생과 대량생산

가. Calpain cDNA의 단리동정

Calpain cDNA를 단리동정하기 위하여 도살장으로부터 근육을 액체질소에 넣어 운반하고 그 근육을 이용하여 TRIzol regeant(Gibuco BRL사)음 사용하여 total RNA을 정제하였다. 그러고 난 다음 total RNA를 이용하여 RT-PCR에 의하여 calpain cDNA를 단리동정 하였다. 먼저, GeneBank로부터 보고되 있는 외국 소의 calpain cDNA를 기본으로 primer을 합성하였다. S1 primer로 GAATTCAGCTGAATCTTGCTGTC를, A1 primer로

CCCGGGTGAAATTGAAATCCTGA를 이용하였다. Total RNA 5㎍과 random primer를 이용하여 역전사효소로 1st strand cDNA를 합성하였다. 이들 중 일부를 취하여 앞에서 언급한 primer로 PCR을 수행하였다. DNA의 변성은 94℃ 30초, annealing은 58℃ 30초, 신장반응은 72℃ 3분의 조건으로 33 cycle로 수행하였다. 그 결과 약 2.2kb의 DNA 밴드를 얻을 수 있었으며 그 DNA을 pGEM-T easy 백터에 삽입하고 염기배열을 결정하였다. (Fig. 17)

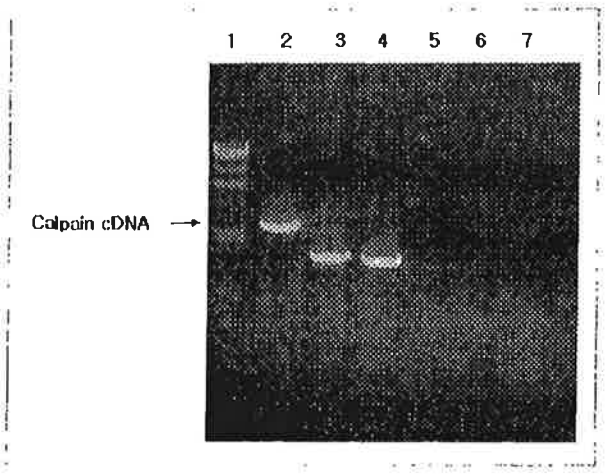


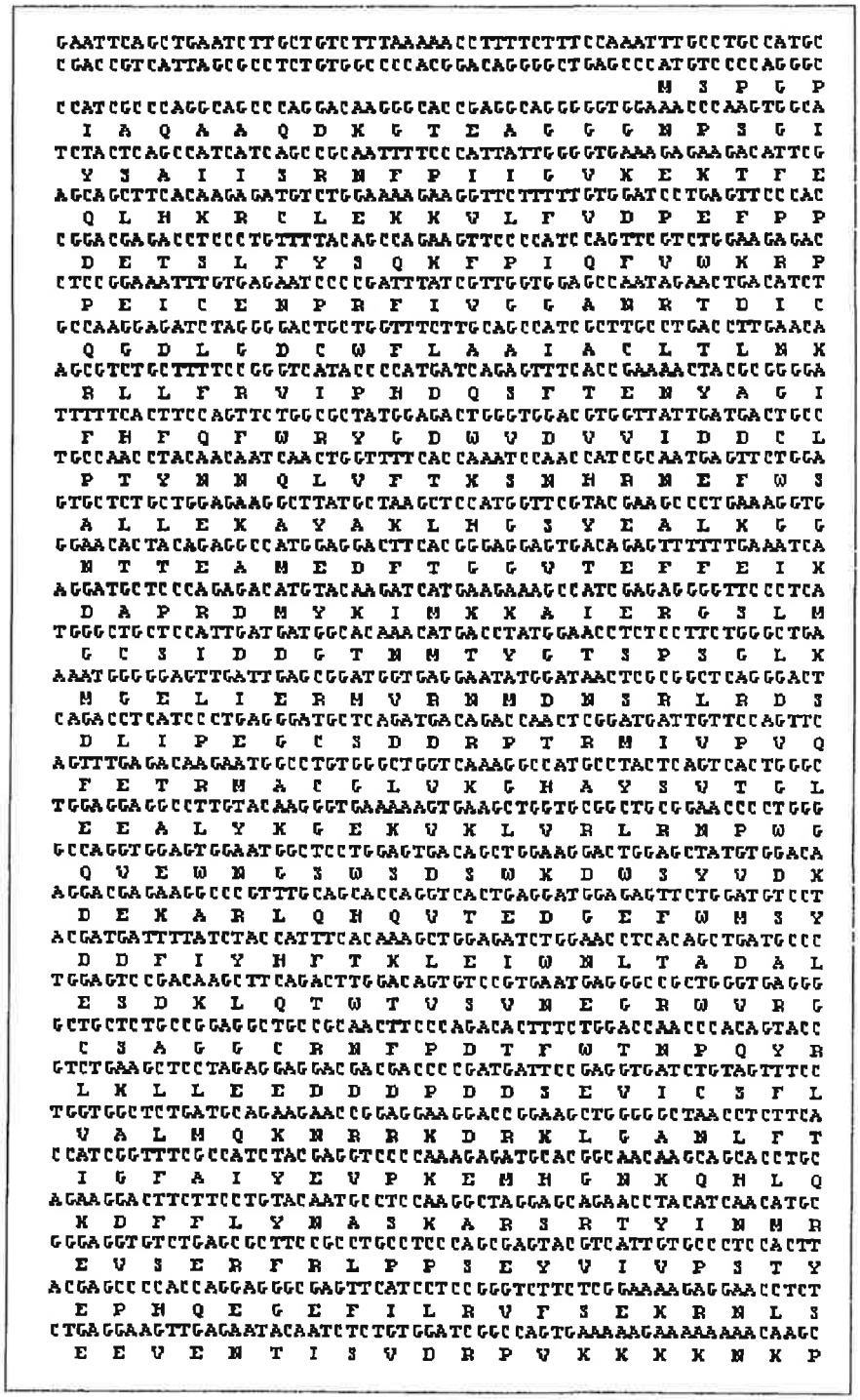
Fig 17. RT-PCR of hanwoo calpain cDNA

1. λ/Hind III marker 2. S1, A1 primer

3. S1, A2 primer 4. S2

A1 primer, negative control(5, 6, 7)

염기배열을 결정하고 이미 보고되 있는 외국 소의 calpain cDNA와 비교하였을 때 그 상동성은 약 99%로 매우 높은 결과 였다. 그러므로 RT-PCR에 의하여 단리 동정한 cDNA는 calpain cDNA임을 확인하였다. 이러한 cDNA를 가지고 발현 백터를 제조하였다. (Fig. 18)



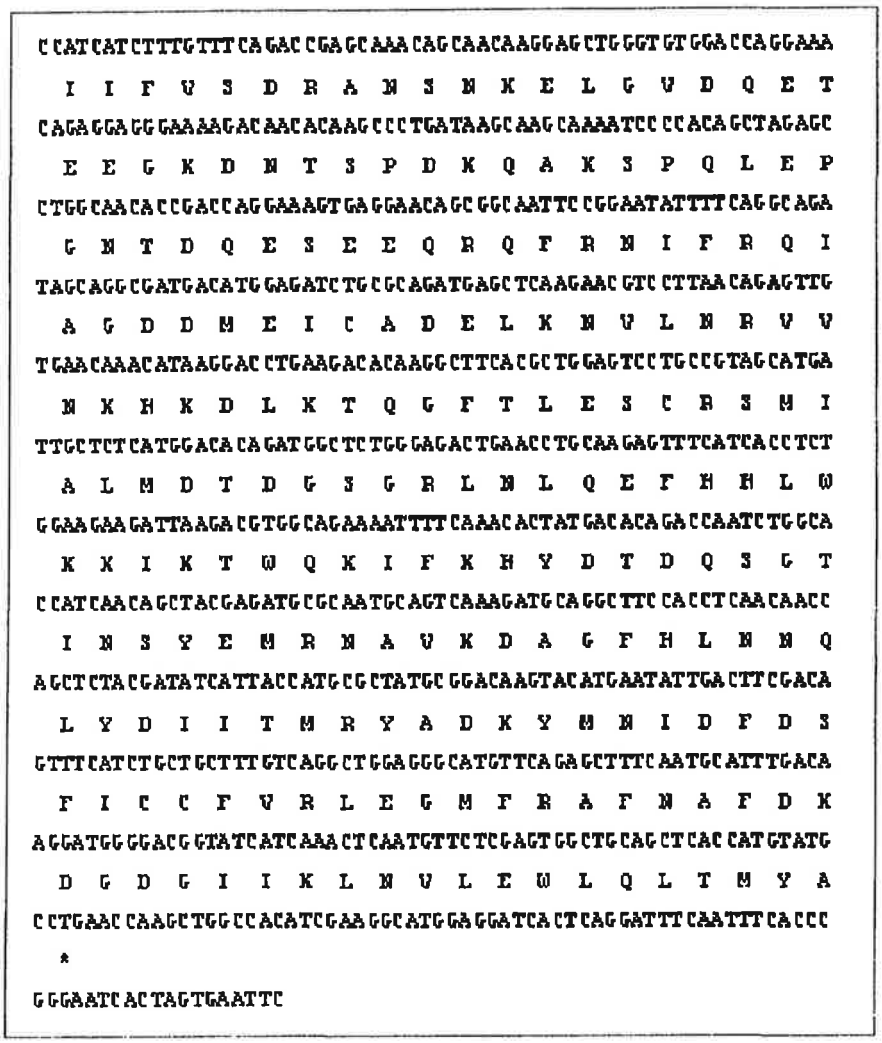


Fig 18. Nucleotide and deduced amino acid sequence of hanwoo calpain gene

나. 한우 calpain cDNA를 수정란에 발현시키기 위한 발현 벡터 개발

pGEM-T easy 벡터에 있는 calpain cDNA를 pMT-cpst-CMV-poly A plasmid를 EcoR I으로 소화하고 그 위치에 ligation 시킴으로서 미세주입용 calpain 유전자를 제조하였다.

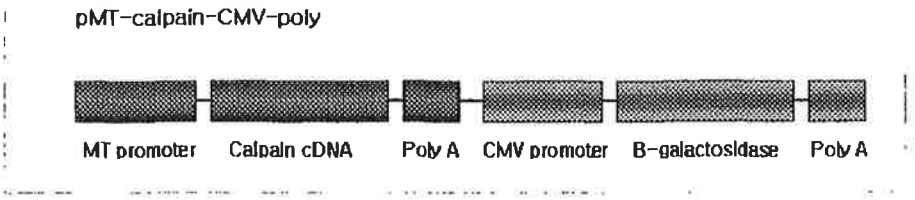


Fig 19. Diagram of pMT-calpain-CMV-poly A vector for microinjection.

다. 미세주입용 calpastatin 유전자의 정제

미세주입용 DNA는 배우 순도가 높아야 함으로 다음과 같은 방법에 의하여 염색체DNA와 다른 불순물을 제거하였다. 먼저, 대장균에 형질전환(transformation)된 pMT-calpain-CMV-poly A 플라스미드를 아가플레이트에 접종하고 그 다음날 단일의 콜로니를 50ml의 LB(+Ampicillin, 50㎍/ml)배지에서 하루밤 37℃에서 배양하였다. 이렇게 배양한 균체로부터 알카리법으로 플라스미드를 제조하였으며, 제조된 플라스미드는 CsCl(0.97g/ ml)와 ethidium bromide(10mg/ml)를 포함하는 용액에 넣고 초고속원심을 2회 수행하였다. 그리고 난 다음 ethidium bromide(10mg/ml)를 수포화 부타놀로 제거하고 TE 용액(1M Tris · Cl pH 7.5, 100mM EDTA)에서 하루밤 투석을 4℃에서 행하였다.

투석이 끝난 pMT-calpain-CMV-poly A플라스미드는 제한효소 Sal I으로 소화하여 직선화 하였다. 그리고 이들을 8% 아가로스겔에서 전기영동하고 각각 12.12kb와 4.75kb의 단편을 geneclean kit(BIO 101, USA)로 회수하였다. 회수된 DNA는 ELUTIP-d(Schleicher & Schuell GmbH, Germany)로 불순물을 제거하고 최종적으로는 미세주입용 buffer(10mM Tris · Cl pH 7.5, 0.1mM EDTA)로 5ng/㎕가 되도록 녹여 사용전 까지 -20℃에 보존하였다(Fig. 19).

라. Calpastatin antisense DNA 미세주입과 한우난자에서의 발현확인

1) 한우 수정란의 전핵에 외래유전자의 미세주입과 미세현미주입난자의 발달

동물 난자내 DNA 주입 방법에는 물리적, 화학적 및 생물학적 방법 등 많은 수단이 강구되었으나, 이들 방법 중 효율성이 좋고 응용 가능성이 있어 활발히 연구 개발되고 있는 방법은 Microinjection technique, Stem cell insertion technique, Retroviral insertion technique, sperm-mediated DNA transfer technique 등이 있지만 주입된 유전자의 후대에서의 발현율이 낮아 실용화하는데 큰 어려움이 있는 실정이다. 따라서 당해연도 연구기간 중에는 Micro injection technique을 한우 체외 수정란에 적용하였다.

Table 27. Development of Hanwoo embryos after calpain DNA microinjection

Treatment	No. of embryos examined	No. of(%) embryos developed to			
		4cell	8cell	morula	blasto
control	50	4(8)	20(40)	23(46)	3(6)
injected	90	14(15.6)	24(26.7)	50(55.6)	2(2.2)

한우 체외수정란에 Calpain cDNA를 주입한후 체외배발달 성적을 Table 27에 제시하였다 . 미세주입한 수정란은 정상적으로 발달하였으며 이들중 상실배기 이상인 수정란을 가지고 X-gal 염색을 실시하였다.

2) pMT-calpain-CMV-β 플라스미드의 발현확인

pMT-calapin-CMV-β를 한우 1세포기 수정란에 미세 주입한 다음 6일간 배양한 후X-gal 염색에 의하여 확인하였다. 먼저 수정란을 PBS로 2회 세척한고, 고정액(2% 포름알데히드, 0.2% 글루타알데하드)으로 10분간 고정하였다. 그리고 다시 PBS로 2회 세척하고 x-gal 염색액으로 1시간 염색을 실시하였다. 염색후 PBS로 3회 세척한 다음 사진촬영을 실시하였다. 그 결과 calpain 유전자가 발현하는 수정란에서는 대조군에 비하여 강한 초록색을 나타내었다. 그러므로 calpain 유전자는 정상적으로 발현하고 있음을 확인하였다. (Table 28, Fig. 20, 21)

Table 28. The expression of calpain DNA after 6 days of culture following microinjection

Treatment	No. of embryos examined	No. of embryos expressed calpain gene(%)			
		100	>80	>50	>10
control	26	0	0	0	0
injected	52	2(3.8)	10(19.2)	2(3.8)	20(38.5)

calpain 유전자를 미세주입한 다음 100%, 80% 이상, 50% 이상, 10% 이상을 각각 조사한 경우 3.8, 19.2, 3.8, 38.5% 였다. 대부분의 수정란의 발현은 mosaic 이었으나 80% 이상이 발현하는 수정란도 23%나 되었다. 이러한 결과는 이 들 수정란을 이식하면 calpain 유전자가 발현하는 형질전환 한우가 태어날 확율이 높음을 시사하고 있는 것이다.

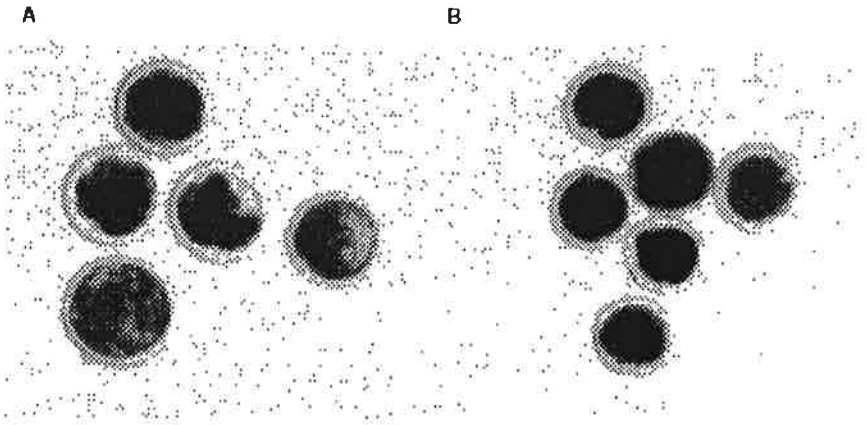


Fig 20. X-gal staining of bovine embryo injected calpain gene.

A는 대조군으로 전혀 염색이 안 되었고 B는 calpain 유전자를 미세주입한 수정란으로 초록색의 발현이 확인되었다.(80%이상 발현을 보이는 수정란)

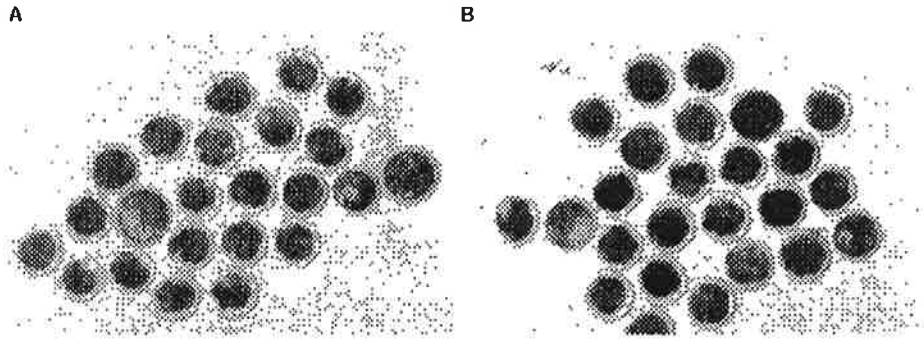


Fig 21. Mosaic expression of calpaingene in the bovine embryo

A는 대조군으로 미세주입하지 않은 수정란이며, B는 calpain 수정란을 미세주입한 수정란으로 100% 발현하는 수정란과 80% 이상, 50% 이상, 10% 이상을 나타내는 수정란들을 보여 주고 있다.

제4절 참고문헌

1. Adamson, E.D. 1990. EGF receptor activities in mammalian development. Mol. Reprod. Dve. 27 : 16-22.

2. Aoyagi, Y., Fujii, K., Iwazumi, M. Furudate, Y. Fukui and H. Ono. 1988. Effect of two treatments on semen from different bulls on in vitro fertilization results of bovine oocytes. Theriogenology, 30 : 973-985.

3. Aoyagi, Y., Fukui, Y., Iwazumi, Y., Urakawa, M. and Ono, H. 1989, Effects of culture systems on development of in vitro fertilized bovine ova into blastocysts. Theriogenology. 31 : 68.

4. Ball, G.D., et al. 1982. Glycosaminoglycans in bovine cumulus-oocyte complexes : morphology and chemistry. Mol. Cell Enocrinol. 28 : 113-122.

5. Ball, G.B., L. Leibfried, R.W. Lent, R.L. Ax, B.D. Bavister and N.L. Frist. 1983. Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. Biol. Reprod. 28 : 717-725.

6. Babcock, D.F., J.P. Singh and H.A. Lardy. 1979. Alteration of membrane permeability to calcium ions during maturation of bovine spermatozoa. Dev. Biol. 69 : 85-93.

7. Bae I. 1981. Role of calcium in resumption of meiosis of cultured porcine cumulus-enclosed oocytes. Biol. Reprod. 24(suppl.1) : 92A(ABS)

8. Ball G.D, Bellin ME, Ax RL and First N.L. 1982. Glycosaminoglycans in bovine cumulus-oocyte complexes : morphology and chemistry. Mol. Cell. Endocrinol. 28 :113—122.

9. Bavister, B.D. 1988, Role of oviductal secretions in embryomic growth in vivo and in vitro. Theriogenology. 29 : 143-154.

10. Betteridge, K.J., C. Smith, R.B. Stubbings, R.K. Xu and W.A. King. 1989. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. J. Reprod. Fert. Suppl. 38 : 87-91.

11. Biggers, J.D., R.B.I. Gwatkin and R.L. Brinster. 1962. Development of mouse embryos in organ cultures of fallopian tubes in a ch emically defined medium. Nature. 194 : 747-749.

12. Bize, I., G. Santander, P. Cabello, D. Driscoll and C. Sharpec. 1991.

Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation in vitro. Biol. Reprod. 44 : 398-403.

13. Boland, D.P. 1984. Use of a rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. Theriogenology 21 : 126-137.

14. Bronslaeger E.A., Mattei Pard Schultz R.M. 1986. Involvement of cAMP dependent protein kianse and protein phosphorylation in regulation of mouse oocytes maturation. Dev. Biol. 114 :453—462°

15. Bondioli, K.R. and R.W. Wright, Jr. 1983. In vitro fertilization of bovine oocytes by spermatozoa capacitated in vitro. J. Anim. Sci. 57(4) : 1001-1005.

16. Bousquet, D., C. Milovanov, J. C. Bell, J. Drocher and L. C. Smith. 1994. Nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes aspirated from large follicles in superovulated heifers. Theriogenology, 172. Abstr.

17. Brackett, B.G., A.I. Younis and R.A. Rayer-Hosken. 1989. Enhanced viablity after in vitro fertilization of bovine oocytes matured in vitro with high concentration of luteinizing hormone. Fertil. Steril. 52 : 319-324.

18. Brackett, B.G. and Oliphant, G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. Biol. Reprod. 12 : 260-274.

19. Brackett, B.G., et al. 1980. Fertilization and early development of cow ova. Biol. Reprod. 23 : 189-205.

20. Brackett, B.G., D. Bousquet, M.L. Boice, W.J. Donawick, J.F. Evans and M.A. Dressel. 1982. Normal development following in vitro fertilization in the cow. Biol. Reprod. 27 : 147-158.

21. Brown, C.R. and W.K.T. Cheng. 1986. Changes in composition of the porcine zona pellucida during development of the oocyte to the 2-to 4-cell embryos. J. Embryol. Exp. Morph. 37 : 411-417.

22. Byun, T.H. and S.H. Lee. 1992. Morphological and cellular criteria ovaries, follicles and oocytes for in vitro maturation in the pig, Kor. J. Emb. Trans. 7 : 97-110.

23. Byrd. W. 1981. In vitro capacitation and the chemically induced acrosome reaction in bovine spermatozoa. J. Exp. Zool. 215-246.

24. Caamano, J.N., Z.Y. Ryoo, J.A. Thoms and C.R. Youngs, 1996. β-Mercaptoethanol enahnces blastocyst formation rate of bovine in

vitro-matured / in vitro-fertilized embryos. Biol. Reprod. 55 : 1179-1184.

25. Camous, S., Y. Heyman, W. Meiziou and Y. Menezo. 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. J. Reprod. Fert. 72 : 479—485.

26. Channing, C.P. and Tasfriri. 1978. Regulation of ovulatory processes : Ovum maturation, follicular repture and luteinization. Plenum Press, NewYork.

27. Clark, A. J., H. Bessos, J. O. Bishop, P. Brown, S. Harris, R. Lathe, M.McClenaghan, C. Prowse, J. P. Simons, C. B. A. Whitelaw and I. Wilmt. 1989. Expression of human anti-hemophili factor IX in the milk of transgenic sheep. Bio/technology.

28. Cole, R.J. and J. Paul. 1965. Properties of cultured preimplantation mouse and rabbit embryos and cell strains derived from them. J. Anim. Sci. 59 : 1661-1675.

29. Corsby, I. M., F. Gandolfi et al. 1998. Control of protein synthesis during cleavage of sheep embryos. J. Reprod. Fert. 82 : 769-775.

30. Crister, E.S., M.L. Leibfried-Rutledge. W.H. Eyestone, D.L. Northey and N.L. First. 1986. Acquisition of developmental competence during maturation in vitro. Theriogenology 25 : 150(Abstr).

31. Dobrinsky JR, Johnson LA and Rath D. 1996. Development of a culture medium(BECM-3) for porcine embryos : Effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on embryo development. Bio. Reprod. 55 : 1069-1974.

32. Ebert, K. M., J. P. Selgrath, P. DiTullo, J. Denman, T. E. Smith, M. N. Memon, J. E. Schindier, G. M. Monastersky, J. N. Vitale and K. Gordon. 1991. Transgenic production of a variant of human tissuetype plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis pf expression. Bio/technology. 9: 835

33. Edward, R.G. 1965. Maturation of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey, and human ovarian oocytes. Nature. 208 : 349-352.

34. Ellington, J.E., P.B. Farrell and R.H. Foote. 1990. Comparison of six-day bovine embryo development in uterine tube(oviduct) cell co-culture versus in vivo development in the cow. Theriogenology. 34 : 837-844.

35. Ellington, J.E., E.W. Carney, B.P. Farell, M.E. Simkin and R.H. Foote. 1990. Bovine 1, 2-cell embryo development using a simple medium in three

oviduct epithelial cell co-culture system. Biol. Reprod. 43 : 97-104.

36. Ellington, J.E., P.B. Farrell, M.E. Simkin, R.H. Foote, E.E. Goldman and A.B. McGrath. 1989. Development and survival after transfer of cow embryos cultured from 1-2 cells to morula or blastocysts in rabbit oviducts or in a simple medium with bovine oviduct epithelial cells. J. Reprod. Fert. 89 : 293-299.

37. Eng. L.A., E.T. Konegay, J. Huntington and T. Wellman. 1986. Effects incubation temperature and bicarbonate on maturation of pig oocytes in vitro. Reprod. Fert. 76 : 657-662.

38. Eppig, J.J. 1982. The relationship between parthenogenetic embryonic development and cumulus cell oocyte intercellular coupling during oocyte meiotic maturation. Gamete. Res. 5 : 229-237.

39. Eppig. J.J and Downs. S.M. 1984. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. Biol. Reprod. 30 : 1-11.

40. Eyestone, W.H. and N.L. First. 1989a. Variation in bovine embryo development in vitro due to bulls. Theriogenology. 31 : 191(Abstr).

41. Eyestone, W.H. and N.L. First. 1989b. Co-culture of domestic animal embryos. J. Reprod. Fert. 85 : 715-720.

42. Eyestone, W.H. and First, N.L. 1989, Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviduct tissue or on conditioned medium. J. Reprod. Fert. 85 : 715-720.

43. Eyestone, W.H. and J.M. Jones and N.L. First. 1991. Some factors affecting the efficancy of oviduct tissue conditioned medium for the culture of early bovine embryos. J. Reprod. Fert. 92 : 59-64.

44. Eyestone, W.H., D.L. Northey and M.L. Leibtried-Rutlege. 1985. Culture of one-cell bovine embryos in the sheep oviduct. Biol. Reprod. 32(Suppl. 1), 100A(Abstr).

45. First, N. L. and J.J. Parrish. 1988. Sperm maturation and in vitro fertilization. In The 11th Int. Congr. on Reprod. and A. I., Dublin, Ireland.

46. Folstad, L., J.D. Bennett and R.I. Dorfman. 1969. In vitro culture of rat ova. J. Reprod. Fert. 18 : 145-146.

47. Foote. W.D and Thibault C. 1969. Researches experimentales surla maturation in vitro les oocytes de truce et de veau. Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys. 9 : 239-342.

48. Fukui, Y. 1990. Effects of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro. Mol. Reprod. Dev. 26 : 40-46.

49. Fukui, Y. and H. Ono. 1989. Effect of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. J. Reprod. Fert. 86 : 501-506.

50. Fukui, Y. M. Fukushima and H. Ono. 1983. Fertilization in vitro of bovine oocytes after various sperm procedures. Theriogenology. 29(6) : 651-660

51. Fukui, Y. and Ono, H. 1988. In vitro development to blastocyst of in vitro matured and fertilized bovine oocytes. Vet. Rec. 122 : 202.

52. Fukui, Y. and Y. Sakuma. 1980. Maturation of bovine oocytes cultured in vitro : Relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. Biol. Reprod. 22 : 669.

53. Fukui, Y., Y. Terawaki and H. Ono. 1982. Effects of gonadotropin, steroids and culture on bovine oocyte maturation. Theriogenology. 18 : 161-175.

54. Fulka, J. Jr., A. Palvok and J. Fulka. 1982. In vitro fertilization of zona-free bovine oocytes matured in culture. J. Reprod. Fertil. 64 : 496-499.

55. Funahashi, H. and B.N. Day. 1993. Effects of different serum supplements in maturation medium on meiotic and cytoplasmic maturation of pig oocytes. Theriogenology. 39 : 965-973.

56. Funshashi H., Cantley T. and Day B. N. 1994. Different hormoneal requirements of pig oocytes-cumulus complexs during maturation in vitro. J. Reprod. Fert. 101 : 159-165.

57. Funahashi, H., T.T. Stumpf, T.C. Cantley, N. H. Kim and B.N. Day. 1995. Pronuclear formation and intracelular glutathione content of in vitro matured porcine oocytes following in vitro fertilization and / or electrical activation. Zygotes, 3 : 273-281.

58. Gandolfi, F., Brevini, T.A.L., Modina, S. and Lauria, S. 1991. Detection

and characterization of a growth factor in bovine oviduct secretions. J. Reprod. Fert. 7 : 6(Abstr).

59. Gandolfi, F., et al. 1991. Oviduct enviroment and embryonic development : in vivo and in vitro relationships. University of Milano- Italy.

60. Gandolfi, F., and Moor, R.M. 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co- culture with oviduct epithelial cells. J. Reprod. Fert. 81 : 23- 28.

61. Goto, K., Iwai, N., Takuma, Y. and Nakanishi, Y. 1992. Co- culture of in vitro fertilized bovine embryos with different cell monolayers. J. Anim. Sci. 70 : 1449- 1453.

62. Goto, K., Kajihara, Y., Kosaka, S., Koba, M., Nakanishi, Y. and Ogawa, K. 1988, Pregnancies after co- culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in vitro fertilization of in vitro matured follicular oocytes. J. Reprod. Fert. 83 : 753- 758.

63. Grupen, C.G., H. Nagashima, and M.B. Nottle. 1995. Cyseamine enhances in vitro development of porcine oocytes matured and fertilized in vitro. Biol. Reprod. 53 : 173- 178.

64. Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge. 1992. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press Oxford.

65. Handrow R.R., Lenz. R.W and Ax. R.L. 1982. Structual comparisions among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. Biochem. Biophys. Res. Comm. 197 : 1326.

66. Hensleigh, H.C. and A.G. Hunter. 1985. In vitro maturation of bovine cumulus enclosed primary oocytes and their subwequent in vitro fertilization and cleavage. J. Dairy. Sci. 68 : 1456- 1462.

67. Holmdahl, T.H. and L. Mastroianni. Jr. 1965. Continious collection of rabbit oviduct secretions at low temperature. Fert. Steril. 16 : 587- 595.

68. Iritani. A, M. Kasai, K. Niwa and H.B. Song. 1984. Fertilization in vitro of cattle follicular oocytes with ejzculated spermatozoa capacitated in a chemically defined medium J. Reprod. Fert. 70 : 487- 492.

69. Ishii, T.S. Bannai and Y. Sugita. 1981. Mechanism of growth stimulation of L1210 cells by 2- mercaptoethanol in vitro. J. Biol. Chem. 256 (23) : 12387- 12392.

70. Iwasaki, S. and Nakahara, T. 1990. Cell number and incidence of chromosomal anomalies in bovine blastocysts fertilized in vitro followed by culture in vitro or in vivo in rabbit oviducts. Theriogenology. 33 : 669-675.

71. Jagieloo G, Ducayen M.B, Downey R and Jonassen A. 1982. Alterations of mammalian oocytes meiosis I with divalent cations and calmodulin cell calcium. 3 :153—162.

72. Kajihara, Y., E. G. Blackewood, M.W. Mycrs, N. Kometani, K. Goto and R.A. Godke. 1991. In vitro maturation and fertilization of follicular oocytes obtained from calfs. Theriogenology. 35 : 220(Abstract).

73. Kane, M.T. 1987. In vitro growth of preimplantation rabbit embryos. In : Bavist, B. D. ed. The mammalian preimplantation embryo : Regulation of growth and differentiation in vitro. Plenum Press, New York pp. 139-217.

74. Kane, M.T., Carney, E.W. and Ellington, J.E. 1992. The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in development of preimplantation embryos in vitro. Theriogenology. 38 : 297-313.

75. Kano, K., T. Miyano and S. Kato. 1994. Effect of oviductial epithelial cells on fertilization of pig oocytes in vitro. Theriogenology. 42 : 1061-1068.

76. Kapur, R.P. and L.V. Johnson. 1986. Selective sequestration of an oviductal fluid glycoprotein in the periviteline space of mouse oocytes and embryos. J. Exp. Zool. 238 : 249-260.

77. Kim, C.I., J.E. Ellington and R.H. Foote. 1990. Maturation, fertilization and development of bovine oocytes in vitro using TCM-199 and a simple defined medium with co-culture. Theriogenology. 33 :433—440.

78. Kim, N.H., H. Funahashi, S.J. Moon, L. Abeydeera, R.S. Prather and B.N. Day. 1996b. Effects of oviductal fluid on the cortical granule reaction and polyspermy in the porcine oocytes. J. Reprod. Fertil. In press.

79. Kito, S. and B.D. Bavister. 1997. Male pronuclear formation and early embryonic develpment of hamster oocytes matured in vitro with gonadotropin, amino acids and cysteamine. J. Reprod. Fert. 110 : 35-46.

80. Kohler, G. and C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cell secreting antibody of predefined specificity. Nature. 256 : 495.

81. Kuwayama, M., et al. 1989. Effects of culture medium and time of

transter to the rabbit oviduct on the developmental capacity of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. Jpn. J. Anim. Reprod. 35 : 1-6.

82. Lin. 1966. Science 151 : 333-336.

83. Lin and Monie. 1973. J.Reprod. Fert. 32 : 149-151.

84. Lafleur, M.V. M., J.J. Hoorweg, E.J. Westmijze and J. Retel. 1994. The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against singlet oxygen. Free. Radic. Res. 21 : 9-17.

85. Legge, M. and M.H. Sellens, 1991. Free radical sacvengers ameliorate the 2-cell block in mouse embryo culture. Hum. Reprod. 6 : 867-871.

86. Lebfried, M.L. and N.L. First. 1979. Characterization of bovine follicular oocyte sand their ability to mature in vitro. J. Anim. Sci. 48 : 76-86.

87. Leibfried-Rutledge, M.L.. E.S. Critser, W.H. Eyestone, D.L. Northey and N.L. First. 1987. Development potential of bovine oocytes matured in vitro or in vitro. Biol. Reprod.. 36:376-383.

88. Leibfried- Rutledge, M.L., et al. 1989. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. Theriogenology. 31 : 61-74.

89. Leibfried- Rutledge, M.L., Critser E. S. and First N.L. 1986. Effect of fetal calf serum and bovine serum albumin on in vitro maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus ocytes complexes. Biol. Reprod. 35 : 850-857.

90. Lenz, R.W., G.D. Ball, J.K. Lohse, M.L. First and R.L. Ax. 1983. Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and in vitro fertilization. Bio. Reprod. 28 : 683-690.

91. Li, J. R.H. Foote and M. Simkin. 1993a. Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine, or superoxide dismutase. Biol. Reprod. 49 : 33-37.

92. Li, J. and R.H. Foote. 1993b. Culture of rabbit zytotes into blastocysts in protein-free medium with one to twenty percent oxygen. J. Reprod. Fertil. 98 : 163-167.

93. Lim, J.M., S.S. Liou and W. Hansel. 1996. Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of β-mercaptoethanol in preimplantation

development of bovine embryos. Theriogenology. 46 : 429-439.

94. Lu, K.H., Gordon, I., Gallagher, M. and McGovern, H. 1987. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. Vet. Rec. 121 : 259-260.

95. Lutterbach, A., R.A. Koll and G. Brem. 1987. In vitro maturation of bovine oocytes in co-culture of granulosa cells and their subsequent fertilization and development. Zuchthyg. 22 :145—150.

96. Lynn. R.F., L.R. Abeydeer and R. Niwa. 1995. Ca regulating mechanisms that determined by chloridetetracycline analysis. Mol. Reprod. Develop. 40 : 233-241.

97. Mammoto, A., N. Masumoto, M. Tahara, Y. Ikebuchi, M. Ohmihi, K. Tasaka and A. Miyake. 1996. Reactive oxygen species block sperm-egg fusion via oxidation of sperm sulfhydryl proteins in mice. Biol. Reprod. 55 : 1063-1068.

98. Matos, D.G., C.C. Furnus, D.F. Moses and H. Baldassarre. 1995. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocytes matured in vitro. Mol. Reprod. Develop. 42 : 432-436.

99. Mayer, J.F., Jr. and H.I. Fretz. 1974. Culture of preimplantation rat embryos and the production of allophenic rats. J. Reprod. Fert. 39 : 1-9.

100. McCaffrey, C., T.G. McEvoy, M.G. Diskin, F.C. Gwazdauskas, M.T. Kane and J.M. Sreenan. 1991. Successful co-culture of 1-4 cell cattle ova to the morula or blastocyst stage. J. Reprod. Fert. 91 : 119-124.

101. Miami, M., B.D. Bavister and A. Iritani. 1988. Development of hamster two-cell embryos in the isolated mouse oviduct in organ culture system. Gamete Res. 19 : 235-240.

102. Mochizuki, H., Fukui, Y. and Ono, H. 1991, Effect of the number of granulosa cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization and development of bovine oocytes. Theriogenology. 36 : 973-986.

103. Moor, R.M., and A.O. Trounson. 1977. Hormonal and follicular factors caffection maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. J. Reprod. Fert. 49 : 101-109.

104. Moor, R.M., C. Polge and S.M. Willadsen. 1980. Effect of follicular

steroids of the maturation and fertilization of mammalian oocytes. J. Embryol. Exp. Morph. 56 : 319-335.

105. Motlik, J., N. Crozet and J. Fulka. 1984. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. J. Reprod. Fert. 72 : 323-328.

106. Murray, R.K., D.K. Granner., P.A. Mayes and V. W. Rodwell. 1990. Lipid peroxidation is a source of free radicals in vivo. Harper's Biochem(eds.). pp. 142-143.

107. Nagai, T., J. Ding and R. M. Moor. 1993. Effects of follicle cells and steroidogenesis on maturation and fertilization in vitro of pig oocytes. J. Exp. Zool. 266 : 146-151.

108. Nagai T, Niwa K and Iritani A, 1984. Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization in vitro of pig follicular oocytes. J. Reprod. Fert. 70 : 271-275.

109. Nagai, T. and R.M. Moor. 1990. Effect of oviductal cells on the incidence of polyspermy in pig eggs fertilized in vitro. Mol. Reprod. Dev. 26 : 377-382.

110. Naito, K. and Y. Toyoda. 1992. Comparison of histone between two types of pig oocytes matured in different media in vitro. Biol. Reprod. 47 : 43-47.

111. Nakao, H. and N. Nakatsuji. 1990. Effects of co-culture, medium components and gas phase on in vitro culture of in vitro matured and fertilized bovine embryos. Theriogenology. 33 : 591-600.

112. Nasr-Esfahani., M.H., N.J. Winston and M.H. Johnson. 1992. Effects of glucose, glutamine, ethylendiaminetraacetic acid and oxygen tension on the concentration of reactive oxygen species and on development of the mouse preimplantation embryo in vitro. J. Reprod. Fert. 96 :219—231.

113. Newcomb, R., W.B. Christie and L.E.A. Rowson. 1978. Birth of calves after in vivo fertilization of oocytes removed from follicles and matured in vitro. Vet. Rec. 102 : 461-465.

114. Niemann, H., Halter, R., Carnwath, J. W., Herrmann, D., Lemme, E., Paul, D. 1999. Expression of human blood clotting factor VIII in the mammary gland of transgenic sheep. Transgenic Res. 8, 237

115. Niwa, N. and Ohgoda, O. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin

on in vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture. Theriogenology. 30 : 733-741.

116. Noda, Y., et al. 1991. Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. Mol. Reprod. Dev. 28 : 356-360.

117. Pabon, W.E., W.E. Findley and W.E. Gibbons. 1989. The toxic effect of short exposure to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. Fertil. Steril. 51 : 896-900.

118. Parrish, J.J., Susuko-Parrish, J.L., Leibfried-Rutledge, M.L., Crister, E.S., Eyestone, W.H. and First, N.L. 1986. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. Theriogenology. 25 : 591-600.

119. Parrish, J.J., J.L. Susuko-Parrish, N.L. First. 1985. Effect of heparin and chodroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. Theriogenology. 24 : 537-549.

120. Parrish, J.J., J.L. Susuko-Parrish, M.A. Winer and N.L. First. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. Biol. Reprod. 38 : 1171-1180.

121. Pincus, G. and E.V. Enzmann. 1935. The comparative behaviour of mammalian eggs in vivo and in vitro. J. Exp. Med. 62 :655—657°

122. Poleos. G.A and Powars R.D. 1981. The effect of calcium on the first meiotic dirision of the mammalian oocytes. J. Exp. Zool. 217 : 409-416.

123. Polge, C. and C.L. Frederck. 1968. Culture and storage of fertilized pig eggs. Proc. 6th Int. congr. Anim. Reprod. and A. I., Paris. pp. 211(Abstr)

124. Prather et al. 1989b. Biol. Reprod

125. Prather et al. 1989. Biol. Reprod. 41:414-418.

126. Pursel, V. G., P. Sutrave, R. J. Wall, A. M. Kelly and S. H. Huges. 1992. Transfer of sSKI gene into swine to enhance muscle development. Theriogenology. 37: 278 (Abstr).

127. Quinn, P. and G.M. Harlow. 1978. The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro. J. Exp. Zool. 206 : 73-80.

128. Racowsky, C. 1985. Effect of forskolin on maintenance of meiotic arrest and stimulation of cumulus expansion, progesterone and cyclic AMP

production by pig oocyte cumulus complexs. J. Reprod. Fert. 74 :9-24.

129. Racowsky C. 1991. Gamete resources : Origin and production of oocytes. In R. A. Pedersen, A. McLaren, N. First(eds) : "Animal Application of Research in Mammalian Development." Cold Spring Harbor Laboratory Press : New York, pp 22-82.

130. Renard. J. P., F. du Mesnil du Buission, S. Wintenberger-Torres, and Y. Menezo. 1976. In vitro culture of cow embryos from day 6 and day 7. In egg transfer in cattle. Ed. L. E. A. Rowson. Commission of the European Communities. Luxemberg. pp. 159-164.

131. Rexroad, Jr.C.E. 1989. Co-culture of domestic animal embryos. Theriogenology. 31 : 105-114.

132. Rexroad, C.E. and A.M. Powell. 1988. Co-culture of ovine ova with oviductal cells in medium 199. J. Anim. Sci. 66 : 947-953.

133. Risopatron, J. 1989. Fertilization in vitro de ovoeitos bovinos : dfecto de la temperatura de conservacion de los ovarios, Ph. D. Thesis, Universidad Austral, Valdivia, Chile.

134. Roble et al. 1986. Boil. Reprod. 34:733-739.

135. Roble et al. 1987. J.Anim Sci. 64:642-647.

136. Saeki, K., M.L. Leifried-Rutledge and N.L. First. 1990. Are fetal calf serum and hormones necessary during in vitro maturation of cattle oocytes for subsequent development. Theriogenology. 33 : 316(Abstr).

137. Sanbissho, A. and W.R. Threlfall. 1989. The effects of estrous cow serum on the in vitro maturation and fertilization of the bovine follicular oocytes. Theriogenology. 31 : 693-699.

138. Sato, E., A. Iritani and Y. Nishikawa. 1977. Factors involved in maturation of pig and cattle follicular oocytes cultured in vitro. Jpn. J. Anim. Reprod. 23 : 12-18.

139. Schellander, K., F. Fuhrer, B.G., Brackett, H. Krob and W. Schleger. 1990. In vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with estrus serum. Theriogenology. 33 : 477-485.

140. Seidel, G.Jr., T. Glass and S.E. Olson. 1991. Culture of 1-cell bovine embryos to blastocysts in chemically defined media. Biol. Reprod. Suppl. :

88(Abstract).

141. Shi, D. S., K.H. Lu and I. Gordon. 1990. Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development in vitro. Theriogenology. 33 :24(Abstr).

142. Shioya, Y., M. Kuwayama, M. Fukushima, S. Iwasaki and A. Hanada. 1988. In vitro fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. Theriogenology. 30 : 489-496.

143. Sirard, M.A. 1989. Practical aspects of in vitro fertilization in cattle. J. Reprod. Fert. Suppl. 38 : 127-132.

144. Sirad, M.A., J.J. Parish, C.B. Ware, M.L. Leibfried-Rutledge and N.L. First. 1989. The culture of oocytes to obtain developmentally competent embryos. Biol. Reprod. 39 : 546-552.

145. Sirad, M.A., Lambert, R.D., Menard, D.P. and Bedoya, M. : 1985. Pregnancies after in vitro fertilization of cow follicular oocytes, their incubation in rabbit oviduct and their transfer to the cow uterus. J. Reprod. Fert. 75 : 551-556.

146. Staigmiller, R.B and R.M. Moor. 1984. Effects of follicle cells on for maturation and developmental compatence of ovine oocytes matured outside the follicle. Gamete Res. 9 : 221 229.

147. Subramanian, A., Paleyanda, R. K., Lubon, H., William, B. L., Gwazdauskas, F. C., Knight, J. W., Drohan, W. N., Velander, W, H. 1996. Rate limitations in posttranslational processing by the mammary gland of transgenic animal. Annual N. Y. Acad. Sci. 782, 87.

148. Susko-Parrish, J.L., et al. 1990. The effect of penicillamine, hypotaurin, epineprine and sodium metabisulfate on bovine in vitro fertilization. Theriogenology 33 : 333(Abstract).

149. Takagi Y, Mori K, Tomizawa M, Takahashi T, Sugawara S and Masaki J. 1991. Development of bovine oocytes matured, fertilized and cultured in a serum-free, chemically defined medium. Theriogenology. 35 : 1197-1207.

150. Takahashi, H., M. Kuwayama, S. Hammo, M. Takahashi, A. Okano, H. Kadokawa, T. Kariya and T. Nagai. 1996. Effect of β-mercaptoethanol on the viability of IVM/IVF/IVC bovine embryos long-distance transportation in plastic straws. Theriogenology. 46 : 1009-1015.

151. Takahashi, Y. and A. Hanada. 1984. Penetration of zona-free hamster eggs in vitro by ejaculated bull sperm after treatment with ionophore A 23187. J. Anim. Reprod. 31(1) : 30-38.

152. Takahashi, Y. and N.L. First. 1992. In vitro development of bovine one-cell embryos : influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acid and vitamin. Theriogenology. 37 : 963-978.

153. Tervit, H.R.. D.G. Whittingham and L.E.A.Rowson. 1972. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. J. Reprod. Fertil., 30:493-497.

154. Thibault, C. 1966. In vitro culture of cow egg. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys 6:159-164.

155. Thibodeaux, J.K., Del Vecchio, R.P. and Hansel, W. 1993. Role of platelet-derived growth factor in development of in vitro matured and in vitro fertilized bovine embryos. J. Reprod. Fert. 98 : 61-66.

156. Tompson JG. 1996. Defining the requirements for bovine embryo culture. Theriogenology. 45 : 27-40.

157. Thompson, J.G.E., A.C. Simpson., P.A. Pugh., P.E. Donnelly. and H.R. Tervit. 1990. Effect of oxygen concentration on in vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. J. Reprod. Fertil. 89 : 573-578.

158. Velander, W. H., J. L. Johnson, R. L. Page, C. G. Russell, A. Subramanian, T. D. Wilkins, F. Q. Gwazdauskas, C. Pittius and W. N. Drohart. 1992. High level expression in the milk of transgenic swine using the cDNA encoding human proteinC. Proc. Nati. Acad. Sci. USA. 89: 12003.

159. Voelkel, S.A. and Hu, Y.X. 1992. Effect of gas atmosphere on the development of one-cell bovine embryos in two culture systems. Theriogenology. 37 : 1117-1131.

160. Wall, R. J., V. C. Pursel, A. Shamay, R. Mcknight, C. Pittius and L. Hennighausgn. 1991. High level synthesis of a heterologus milk protein in the mammany glands of swine. Proc. Nati. Acad. Sci. USA 88: 1696.

161. Wang, Z.K., P.H. Wei, J.Z. Wang, C. Lei and M. Q. Kou. 1992. Maturation and fertilization of porcine oocytes in vitro. Theriogenology. 37 : 733-739.

162. Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, McKenna AI, Fick GH and Schultz GA. 1991. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. Mol. Reprod. Dev. 30 : 330—338

163. Werb, Z. 1990. Expression of EGF and TGF-a genes in early mammalian development. Mol. Reprod. Dev. 27 :10—15.

164. White, K.L., K.L.F. Hehnke, L.L. Rickords, D.L. Southern, J.R. Thompson and T.C. Wood. 1989. Early embryonic development in vitro by co-culture with oviductal epithelial cells in pigs. Biol. Reprod. 41 : 425-430.

165. Whitten, W.K. and J.D. Biggers. 1968. Complete development in vitro of the preimplantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. J. Reprod. Fert. 17 : 399-401.

166. Whitingham, D.G. 1968. Development of zygotes in cultured mouse oviduct. I. The effect of varing oviductal conditions. J. Exp. Zool. 169 : 391-398.

167. Whitingham, D.G. and B.D. Bavister. 1974. Development of hamster eggs fertilized in vitro or in vivo. J. Reprod. Fert. 38 : 489-492.

168. Wright, R.W.Jr. and K.R. Bondioli. 1981. Aspects of in vitro fertilization and embryos culture in domestic animals. J. Anim. Sci. 53 : 702-729.

169. Wright, C., A. Carver, D. Cottom, D. Reeves, A. Scott, P. Scott, P. Simons, I. Wilumt, I. Caner 문 A. Colman, 1991. High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. Bio/technology. 9: 830.

170. Wu, G.M., P.C. Qin, J.H. Tan and L.A. Wang. 1992. In vitro maturation of in vitro matured pig oocytes. Therio. 37 : 323.

171. Xu, K.P., T.Greve, H. Callesen and P. Hyttel. 1987. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro. J. Reprod. Fert. 81 : 501-504.

172. Yanagimachi, R. and M.C. Chang. 1964. In vitro fertilization of golden hamster ova. J. Exp. Zool. 156 : 361-376.

173. Yanagimachi, R. and N. Usui. 1974. Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. Exp. Cell Res. 89 :161—

174.

174. Yanagimachi, R. 1981. Mechanisms of fertilization in mammalians. In : Mastroianni, L. Jr, Biggers, J.D. Ed. Fertilization and embryonic development in vitro. New York : Plenum Press. pp. 81-182.

175. Yang, B.K., Yang, X. and Foote, R.H. 1993. Effect of growth factors on morula and blastocyst deveolpment of in vitro matured and in vitro fertilized bovine oocytes. Theriogenology. 40 : 521-530.

176. Yang, Y.B. and Lu, K.H. 1990. The influence of bovine oocytes type on in vitro fertilization and subsequent development in vitro. Theriogenology. 33 : 355(Abstract).

177. Yang, X., Jiang, S. and Foote, R.H. 1993. Bovine oocytes development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. Mol. Reprod. Dev. 34 : 94-100.

178. Yoshida, M., Y. Kojima. 1989. Male pronuclear formation by boar spermatozoon with hairpin-curved tail in zona-free hamster egg. Jpn. J. Vet. Sci. 51(2) : 428-430

179. Younis, A.I., B.G. Brackett and R.A. Fayrer-Hoskon. 1989. Influence of serum and hormones on bovine oocytes maturation and fertilization in vitro. Gam. Res. 23 : 189-201.

180. Ziomm, C. A. 1998. Commercialization of proteins produced in the mammary gland. Theriogenology. 49, 139.

181. Zmuda, J. and B. Frieenson. 1983. Changes in intracellular glutathione levels in stimulated and unstimulated lymphocytes in the presence of 2-mercaptoethanol or cystein. J. Immunol. 130 : 362-364.

182. **花田 章**. 1985. **牛 卵胞內 未熟卵子 受精卵 生産**. **臨床獸醫**. 3(9) : 71-75.

183. **김동훈, 정형민, 박세필, 이훈택, 정길생**. 1994. **우 난구세포의 공동배양과 CR1aa 배양액이 체외생산된 우 수정란의 체외발생에 미치는 영향**. **한국가축번식학회지** 17(4) : 271-278.

184. **김창근, 정영채, 이명식, 윤종택, 박명경, 정길생**. 1990. **돼지 난포란의 체외성숙에 관한 연구**. **한국 가축번식학회지** 14(1) : 84-91.

185. **나 등**. 1994. **한축지 제9권 2호** 189-195.

186. 박세필, 박태균, 윤상현, 고대환, 정길생. 1989. 우 난포란의 체외성숙에 관한 연구 Ⅲ. 체외성숙 우 난포란의 체외수정과 발달. 한국 가축번식학회지 13 : 105-112.

187. 신성진, 한만희, 이규승. 1988. Cysteine 및 Glutathione이 돼지난포란의 체외성숙에 미치는 영향. 한국 가축번식학회지 22(4) : 385-393.

188. 양부근, 박춘근, 김종복, 정희태, 김정익. 1993. TCM-199 배양액과 Synthetic Oviduct Fluid(SOF)에서 배양된 소 체외수정란의 체외발육. 한국 가축번식학회지 17(3) : 243-248.

189. 양부근, 황환섭, 박동헌, 정희태, 박춘근, 김종복, 김정익. 1996. 항산화제 첨가와 체세포 공동배양이 소 체외수정란의 체외발육에 미치는 영향 Ⅰ. 항산화제 첨가가 소 체외수정란의 체외발육에 미치는 효과, Ⅱ. 체세포 공동배양과 항산화제 첨가가 소 체외수정란의 체외발육에 미치는 효과. 한국 가축번식학회지 20(2) 163-177.

190. 양부근, 박동헌, 우문수, 정희태, 박춘근, 김종복, 김정익. 1997. Thiol 화합물과 항산화제 첨가배양이 소 체외수정란의 체외발육과 세포내 Glutathione 농도 변화에 미치는 효과 Ⅰ. β-Mercaptoethanol 과 cystea- mine 첨가가 소 체외수정 란의 체외발육과 세포내 Glutathione 농도 변화에 미치는 영향, Ⅱ. 항산화제 첨가와 체세포 공동배양이 소 체외수정란의 체외발육과 세포내 Glutathione 농도 변화에 미치는 영향. 한국 가축번식학회지 21(4) : 335-353.

191. 이경호, 문승주, 김재홍. 1999. α-tocopherol과 cysteamine 첨가가 돼지 미성숙난포란의 체외성숙, 체외수정 및 배발달에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지 14 (1) : 9-15.

192. 이장희, 김창근, 정영채. 1994. 돼지 난포란의 체외성숙시 성선자극호르몬의 첨가가 체외성숙, 체외수정 및 배발달에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지 9 (1) : 85-93

193. 이홍준, 서승운, 이광희, 김기동, 이상호, 송해범. 1997. β-mercapto-ethanol 첨가배양에 의한 소 초기배의 체외발생 효과. 한국 가축번식학회지 21(4) :389-396.

194. 정형민. 1993. 형질전환동물의 생산을 위한 돼지 난포란의 체외발생에 관한 연구. 건국대학교 박사학위논문. pp. 13-23.